

Aus dem Oscar Langendorff Institut für Physiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling

**Persistierende Effekte von 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) auf die
zelluläre und synaptische Erregbarkeit im Pilocarpinmodell der
Temporallappenepilepsie**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Felix Burckhart Schulze, geb. am 08.02.1987 in Leer

aus Rostock

Rostock, den 14.02.2020

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003062

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Timo Kirschstein, Oscar Langendorff Institut für
Physiologie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Johannes Prudlo, Klinik und Poliklinik für Neurologie,
Zentrum für Nervenheilkunde, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Toni Schneider, Institut für Neurophysiologie,
Zentrum Physiologie und Pathophysiologie, Universität zu Köln

Tag der Eröffnung: 18.02.2020

Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2021

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hippocampus	1
1.1.1	Anatomie und Histologie	1
1.1.2	Integration des Hippocampus in neuronale Netzwerke	3
1.2	Temporallappenepilepsie	4
1.3	Tiermodelle in der Epilepsieforschung	6
1.4	Die Elektrophysiologie des Aktionspotenzials und seiner Nachpotenziale	8
1.4.1	Das Aktionspotenzial	8
1.4.2	Das AHP und seine Ströme, die es bilden	9
1.5	Proteinkinase CK2 und 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol	10
1.6	Fragestellung	12
2	Material & Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Geräte und Materialien	13
2.1.2	Chemikalien und Lösungen	15
2.2	Methoden	17
2.2.1	TBB-Behandlung	17
2.2.2	Status epilepticus	17
2.2.3	Video-Monitoring	18
2.2.4	Hippocampuspräparation	19
2.2.5	Extrazelluläre elektrophysiologische Feldpotenzialmessungen	20
2.2.6	Intrazelluläre elektrophysiologische Messungen	21
2.2.7	HCN-Kanalblockade mit ZD7288	23
2.2.8	Datenaufzeichnung und statische Analyse	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Video-Monitoring	25
3.2	Extrazelluläre elektrophysiologische Feldpotenzialmessungen	28
3.3	Intrazelluläre elektrophysiologische Messungen in reinem ACSF	31
3.3.1	Intrinsische Parameter	31
3.3.2	Voltage sag und AHP	32
3.3.3	Beurteilung der AP-Frequenz	34
3.3.4	Burstverhalten bei kurzen Strominjektionen	35
3.3.5	Mögliche Beeinflussung des ADP durch SE oder TBB	35
3.4	Intrazelluläre elektrophysiologische Messungen in ACSF, inkubiert mit ZD7288	37
3.4.1	Wirksamkeit von ZD7288	37

3.4.2	Intrinsische Parameter unter HCN-Kanalblockade.....	38
3.4.3	Burster versus Non-Burster.....	39
3.4.4	Veränderung des AHP durch HCN-Inhibition	39
3.4.5	Beurteilung der AP-Frequenz	40
4	Diskussion	42
4.1	Krankheitsmodifikation durch vorübergehende CK2-Inhibition in vivo.....	42
4.2	Beeinflussung der synaptischen Erregbarkeit von CA1-Neuronen durch TBB.....	44
4.3	Modulation der intrinsischen Erregbarkeit durch CK2-Inhibition.....	45
4.3.1	Beeinflussung des AHP	45
4.3.2	Intrinsisches Burstverhalten.....	46
4.3.3	Die Erregungsphysiologie von HCN-Kanälen.....	47
4.3.4	Veränderung der Erregbarkeit durch Beeinflussung der HCN-Kanäle	49
4.3.5	Funktionelles Interaktionspotenzial zwischen K_{Ca2} und HCN	51
4.3.6	Klinische Bedeutung von TBB.....	52
4.4	Limitationen der Arbeit	53
4.5	Zusammenfassung.....	55
5	Thesen	56
6	Anhang	57
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	57
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	59
6.3	Tabellenverzeichnis.....	59
6.4	Literaturverzeichnis.....	60
7	Curriculum Vitae	70
8	Danksagung	71
9	Eidesstattliche Erklärung	72

1 Einleitung

Im Rahmen einer Promotionsarbeit an unserem Institut konnte 2015 gezeigt werden, dass es durch die Hemmung der Caseinkinase 2 zu bleibenden zellulären Veränderungen von Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus kam (Brehme et al. 2014). Diese Veränderungen beeinflussten die Elektrophysiologie der Neurone und hoben teilweise die Veränderungen auf, die durch die Induktion einer chronischen Temporallappenepilepsie entstanden. Die Inhibition der Caseinkinase 2 wurde in diesem Falle nach der Induktion der Chronifizierung durchgeführt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Hemmung der Caseinkinase 2 auf die Erregungsphysiologie von Pyramidenzellen des Cornu Ammonis 1 (CA1) untersucht, wobei die Inhibition des Enzyms bereits vor Induktion einer chronischen Epilepsie stattfand. Die folgenden Kapitel geben einen Überblick über die Anatomie und Physiologie des Hippocampus sowie die Erregungsphysiologie der CA1-Neuronen. Darüber hinaus werden die bisherigen Erkenntnisse zur Temporallappenepilepsie, Tiermodelle in der Epilepsieforschung und die betroffenen Proteine und Substanzen kurz vorgestellt.

1.1 Hippocampus

1.1.1 Anatomie und Histologie

Der Hippocampus gehört als Teil des Archikortex zu den ältesten phylogenetischen Regionen des Großhirns und bildet am Boden des Seitenventrikels liegend den medialen Rand des Temporallappens. Von dort zieht er nach dorsal bis zum Indusium griseum und dem Gyrus paraterminalis. Nach rostral, ventral und lateral wird er vom Periarichikortex, bestehend aus Prä- und Parasubiculum und der Area entorhinalis, die phylogenetisch dem Periarichikortex zugeordnet werden, begrenzt.

Der Hippocampus besteht aus dem Gyrus dentatus, der Fascia dentata, dem Cornu Ammonis (Ammonshorn; CA) mit seinen vier Regionen und dem Subiculum. Makroskopisch erkennt man bei transversalen Hirnschnitten dieser Region die typischen C-förmigen ineinandergreifenden Zellbänder der Pyramidenzellen des Cornu Ammonis und der Körnerzellen des Gyrus dentatus.

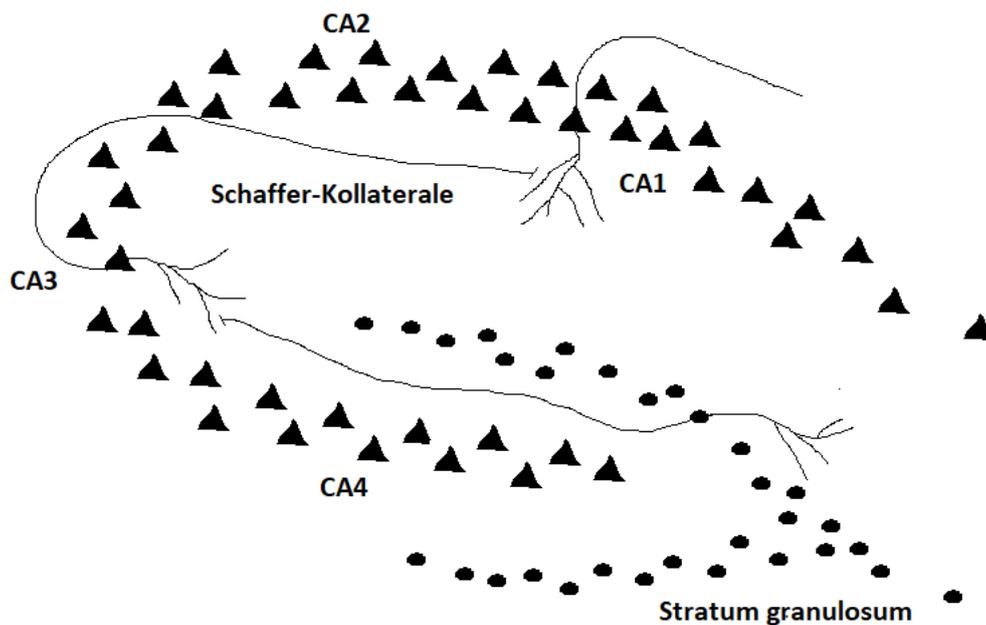


Abbildung 1.1 Schematische Abbildung des Hippocampus.

Dargestellt ist das Stratum pyramidale des Cornu Ammonis und das Stratum granulosum sowie die dort verlaufenden relevanten Faserbahnen.

Aufgrund der Architektur der verschiedenen Zellschichten wird der Hippocampus dem Allokokortex mit seinem typischen dreischichtigen Aufbau hinzugerechnet. Im Bereich des Gyrus dentatus findet sich zwischen dem Sulcus fimbriodentatus und dem Sulcus hippocampi an den Seitenventrikel grenzend das Stratum moleculare, das im Bereich der Fissura hippocampi an die Abschnitte 1 und 2 des Cornu Ammonis (CA) grenzt. Aufgrund der bekannten ortstypischen Ausbildung von Synapsen schichtspezifischer Leitungsbahnen lässt sich das Stratum moleculare nochmals in eine äußere und eine innere Schicht unterteilen. Dieser inneren Schicht anliegend folgt das Stratum granulare, das die exzitatorischen Körnerzellen des Gyrus dentatus beinhaltet und bei denen noch im Erwachsenenalter Neurogenese beobachtet werden kann. Auf der efferenten Seite dieser Zellen liegt eine sehr dünne Schicht, das Hilum, welches direkt in die Region 4 des Cornu Ammonis (CA) übergeht.

Äquivalent zur Schichtung des Gyrus dentatus findet man im Bereich der afferenten Dendriten des Ammonshorns von distal nach proximal gehend das Stratum moleculare, das Stratum lacunosum und das Stratum radiatum, welches die Schaffer-Kollaterale beinhaltet; Nervenfaserbündel, die von den Pyramidenzellen der CA3-Region ausgehen und zu denen der CA1-Region ziehen. Zum Perisubiculum hin schließt sich an das Stratum pyramidale das Stratum oriens an, welches ebenfalls

außer weiteren Schaffer-Kollateralen noch andere inhibitorische Afferenzen mit sich führt. Daran anschließend folgt der Alveus, der die efferenten Axone der Pyramidenzellen beinhaltet.

1.1.2 Integration des Hippocampus in neuronale Netzwerke

Der Hippocampus ist als funktioneller Teil des limbischen Systems und als Teil der Verarbeitung von Sinneseindrücken ein wichtiger Knotenpunkt in der neuronalen Organisation des Großhirns. Er erhält zum einen Informationen aus der Area entorhinalis über den glutamatergen Tractus perforans, der das Subiculum durchbricht und an den distalen Dendriten sowohl der Körnerzellen des Gyrus dentatus als auch der Pyramidenzellen von CA1-CA3 endet. Genauso werden diese Zellschichten von Neuronen der medialen Kerne des Septums über im Fornix verlaufende sowohl cholinerge exzitatorische als auch GABAerge inhibitorische Nervenfasern angesteuert. Darüber hinaus projizieren sowohl die Amygdala als auch der Hypothalamus direkt in den Hippocampus. Diese Fasern vermitteln u. a. viszerale und gustatorische Sinneseindrücke. Eine weitere Projektionsbahn verläuft vom Thalamus zum Hippocampus und vermittelt nozizeptive Informationen. Diese Afferenzen haben je nach Fasertrakt ihren Ursprung in der ipsi- oder kontralateralen Hemisphäre.

Von den Efferenzen des CA verläuft der Großteil im Fornix und verbindet so den Hippocampus über den präkommissuralen Fornix mit den Areae septalis und preopticae sowie u.a. dem Nucleus accumbens. Über den postkommissuralen Anteil des Fornix verlaufen Efferenzen zu thalamischen und hypothalamischen Kernen. Besonders zu erwähnen sind die angesteuerten Corpora mamillaria, die ihrerseits Efferenzen zum Hippocampus besitzen. Ein weiterer Teil der Projektionen des CA verlaufen direkt oder über die Umschaltung im Subiculum zur Area entorhinalis. Die Körnerzellen des Gyrus dentatus selbst projizieren nur in die CA3-Region.

Innerhalb des Hippocampus verlaufen weitere Projektionsbahnen, die sich sowohl in der Längs- als auch in der Querachse befinden.

Die wechselseitige Verknüpfung von Area centralis, Gyrus dentatus, CA1, CA3 und Subiculum und wieder Area entorhinalis findet sich auch im Konstrukt des Papez-Kreises wieder und wird als Hippocampusformation bezeichnet. Ramon y Cajal konnte durch histologische Untersuchungen und Analyse der intrahippocampalen Verschaltungen zeigen, dass diese Hippocampusformation einen lamellären Aufbau besitzt (Roxo et al. 2011). Diese Lamellen liegen senkrecht zur Longitudinalachse des Hippocampus, so dass bei horizontalen Schnitten durch den Hippocampus die Zellen innerhalb der Schnitte synaptische Netzwerke bilden. Diese Besonderheit macht man sich bei elektrophysiologischen Messungen im Hippocampus zunutze.

1.2 Temporallappenepilepsie

Epilepsien sind eine Gruppe verschiedener Krankheitsbilder, die zwar eine unterschiedliche Ätiologie, Epidemiologie, Symptomatik und Prognose aufweisen, jedoch die Gemeinsamkeit haben, dass sie eine dauerhaft abnormal gesteigerte Prädisposition zur Ausbildung von epileptischen Anfällen zeigen. Zur Definition gehören neben der gesteigerten Rate an Anfällen zusätzlich mindestens ein stattgehabter epileptischer Anfall und das Vorliegen von assoziierten neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Störungen (Fisher et al. 2005). Man unterscheidet je nach Ätiologie, Anfallsmuster und Begleitsymptomatik juvenile von adulten Epilepsien, fokale von generalisierten und einfache von komplexen Epilepsien (mit intraikterisch oder postikterisch neuropsychologischen Beeinträchtigungen). Die Prävalenz für Epilepsien wird mit 0,45-1% angegeben. Die Inzidenz liegt zwischen 40-70 neuen Fällen auf 100000 Einwohner pro Jahr (Sander & Shorvon 1996). Es wird aber vermutet, dass die Dunkelziffer höher liegen könnte.

Die Temporallappenepilepsie (TLE) ist die häufigste fokal symptomatische Epilepsie des Erwachsenenalters (Kwan & Brodie 2000; Blumcke et al. 2013). Die Ursachen sind vielfältig. Als Auslöser kommen zum Beispiel Fieberkrämpfe, Tumore, Traumata, Schlaganfälle, Infektionen (bei der Temporallappenepilepsie klassischerweise Infektionen mit Herpes simplex) oder Fehlbildungen in Frage. Morphologisch lässt sich bei etwa einem Drittel aller Patienten mit Temporallappenepilepsie in der Magnetresonanztomographie (MRT) jedoch keine strukturelle Schädigung des Hippocampus, wie zum Beispiel Tumore, Gefäßmalformationen, Gliosis bzw. Sklerosis oder Entwicklungsstörungen des hippocampalen Kortex, erkennen (Nguyen et al. 2013). Von diesen bekannten Läsionen ist die Hippocampussklerose die häufigste Ätiologie der Temporallappenepilepsie (Blumcke et al. 2013). Sie wird auch in Abgrenzung zu der den Neokortex betreffenden Temporallappenepilepsien (laterale TLE oder neokortikale TLE) als mesiale TLE bezeichnet.

Gemein ist vielen Ätiologien, dass sie irgendwann zu einem Untergang der Neuronen führen, der zu einer Übererregbarkeit der verbleibenden Zellen führt. Als Folge dieser kommt es zu einer Reorganisation der neuronalen Netzwerke (Sutula et al. 1989), die unter anderem zu einem gehäuftem Auftreten von Konvulsionen (Leite et al. 2002) und zu einer verstärkten Aussprossung von Moosfasern vom Gyrus dentatus in die Area entorhinalis führt (Scheibel et al. 1974; Sutula et al. 1989). Bender et al. konnten 2003 zeigen, dass Hyperexzitabilität und Moosfasersprossung aber auch ohne Zellverlust und veränderte Neurogenese entstehen können (Bender et al. 2003a). Diese Moosfasersprossung, die histologisch durch die Timm-Färbung sichtbar gemacht werden kann (TIMM 1958), kann auch durch Kindling ausgelöst werden, was die Beobachtung unterstützt, dass es im Laufe einer chronischen Epilepsie durch wiederholte Anfälle zu einer Verstärkung der

hippocampalen Übererregbarkeit und einer Verschlechterung der klinischen Symptomatik kommt (Cavazos et al. 1991). Als Kindling wird die zunehmende Häufung von elektroenzephalographisch nachweisbaren und klinisch beobachtbaren Anfällen durch repetitive periodische elektrische oder chemische Stimulation der neuronalen Netzwerke bezeichnet (Goddard et al. 1969).

Bei der Hippocampusklerose-bedingten Temporallappenepilepsie konnte gezeigt werden, dass es zu einer Atrophie des Hippocampus kommt (van Paesschen 2004), die sich histologisch als Zelluntergang des Stratum granulosum des Gyrus dentatus und des Stratum pyramidale von CA1-CA3 zeigt. Besonders die CA1-Region (auch Sommer-Sektor genannt) ist sehr sensibel gegenüber einer Hypoxie und ist am stärksten mit betroffen. Makroskopisch lässt sich eine Ausdünnung der grauen Zellschicht erkennen, die durchzogen ist von zahlreichen weißlichen bindegewebigen Narben. Die angrenzende CA2-Region ist am schwächsten betroffen (Blümcke et al. 2007). An der Pathogenese sind verschiedene Kanäle, deren Transkription herunterreguliert ist, beteiligt. Zu diesen gehören unter anderem $K_v4.2$ (Bernard et al. 2004), $K_{Ca}2.2$ (Schulz et al. 2012) und HCN1 (Bernard et al. 2004; Jung et al. 2010). An dieser Veränderung der Transkription scheinen zum Teil bestimmte durch extrazelluläre Signale regulierte Kinasen und Phosphatasen, zu denen die Caseinkinase 2 (CK2) gehört, beteiligt zu sein (Jung et al. 2010; Bernard et al. 2004). Die Aktivierung dieser Enzyme wird in Zusammenhang mit spontanen epileptischen Anfällen gebracht (Jung et al. 2010; Kernig et al. 2012).

Obwohl sich die Ätiologien der Läsionen in ihrer Morphologie unterscheiden, lassen sich sowohl zwischen der Hippocampusklerose-bedingten Temporallappenepilepsie (TLE) und den anderen MRT-positiven TLEs als auch zwischen den im MRT nicht läSIONalen TLE und den läSIONalen TLE keine Unterschiede bezüglich der Gedächtnisfunktionen und der neuropsychologischen Störungen erkennen. Darüber hinaus ist ein frühes Alter bei Erstauftreten von epileptischen Anfällen ein Prädiktor für stärkere kognitive und neuropsychologische Defizite bei Patienten mit MRT-negativer TLE (Rayner et al. 2019).

Zu diesen klinischen Symptomen zählen außer den einfach oder komplex fokalen Anfällen, die häufig im Krankheitsverlauf auch sekundär generalisieren, alle Defizite der Funktionen, die durch den Hippocampus mit beeinflusst werden, sowie durch die Einbindung in das limbische System auch psychiatrische Symptome. Ein weiteres Merkmal ist das Auftreten von Auren vor Beginn der Krämpfe, die in ihrer Qualität von der Lokalisation und Beeinflussung der betroffenen neuronalen Netzwerke abhängig sind.

Ein anderes typisches Merkmal von chronisch epileptischem Gewebe ist das Auftreten von Neuronen, die so genannte Bursts generieren: schnelle Salven von 2-4 Aktionspotenzialen

hintereinander bei einem Reiz, der normalerweise nur 1 AP als Reizantwort auslöst. Dieses Phänomen ist intrinsischer Herkunft und besonders in der Region CA1 ausgeprägt (Chen et al. 2011).

Die Inzidenz der Temporallappenepilepsie hat zwei Häufigkeitsgipfel. Der erste Gipfel liegt in der zweiten Hälfte der ersten Lebensdekade, die als Hippocampusklerose-bedingte TLE gehäuft auch in Verbindung mit Fieberkrämpfen gebracht wird (Bender et al. 2003a) und der zweite Häufigkeitsgipfel wird ab 60 Jahren beobachtet, jeweils abhängig von der jeweiligen Ätiologie.

Die unterschiedlichen Ätiologien und die noch immer nicht ausreichend verstandenen Pathomechanismen, die zur Entstehung einer TLE führen, könnten erklären, dass es zwar antikonvulsive Therapien gibt, jedoch keine Therapie, die die TLE kausal behandelt oder der Entstehung derselben prophylaktisch entgegenwirkt (Schmidt & Sillanpää 2016). Mittel der Wahl ist die Gabe von Antikonvulsiva wie Oxcarbazepin, Levetiracetam, Lamotrigin und Pregabalin, mit denen in ca. 60-80% der Fälle eine Anfallsfreiheit bewirkt wird. Bei Pharmakoresistenz kommen als neurochirurgische Verfahren neben der Entfernung der Läsion (Casazza et al. 1997) die vordere Temporallappenresektion oder die selektive Amygdala-Hippokampektomie (Wieser & Yaşargil 1982) zur Anwendung. Trotz der teilweise schon langen Nutzung werden die Vor- und Nachteile der einzelnen Techniken besonders im Hinblick auf den Zeitpunkt des Eingriffs, das Vorliegen mehrerer Läsionen und die Prognose bezüglich der Anfallsfreiheit und Besserung der kognitiven und neuropsychologischen Defizite aktuell noch diskutiert (Luan et al. 2018; Radhakrishnan et al. 2018).

1.3 Tiermodelle in der Epilepsieforschung

In der Erforschung der Epilepsie existieren verschiedene Tiermodelle. Einige arbeiten mit chemisch oder elektrisch induzierten Epilepsien, andere mit genetischen Auslösern. Zu diesen genetischen Tiermodellen gehören das „Genetic absence epilepsy rat from Strasbourg“-Modell (GAERS), welches zur Erforschung der Absence-Epilepsien genutzt wird (Marescaux et al. 1992), und das „Genetically epilepsy prone rat“-Modell (GEPR), das audiogene Epilepsien imitiert (Jobe et al. 1995; Reigel et al. 1986).

Zu den elektrisch induzierten Epilepsiemodellen gehört das Kindling-Modell, bei dem durch die repetitive Stimulation des Hippocampus und der Amygdala eine gesteigerte Rate von epileptischen Anfällen und das Entstehen einer chronischen Epilepsie bewirkt wird. Diese Effekte konnten auf die elektrische Stimulation zurückgeführt werden und nicht auf Zellschäden, Gifte oder sonstige

histologische Veränderungen (Goddard et al. 1969). Dieses Verfahren, das nach seiner Entwicklung zum Standardverfahren für die Erforschung der Temporallappenepilepsie (TLE) wurde, war jedoch sehr zeitaufwendig, da es erst nach hunderten Stimulationen zu spontanen epileptischen Anfällen kam. Abgelöst wurde es seit den 80er Jahren von chemisch oder elektrisch induzierten Tiermodellen, bei denen ein Status epilepticus (SE) ausgelöst wurde, in dessen Folge es zur Entwicklung einer chronischen progredienten TLE kam (Gorter et al. 2016). Intraamygdaloid applizierte Kainsäure (Kainat) ist ein häufig genutzter Auslöser eines Status epilepticus (Ben-Ari et al. 1979) oder auch Pilocarpin, das für das post-SE-Tiermodell der vorliegenden Arbeit genutzt wurde. Die ausführliche Beschreibung des Ablaufes zur Induktion eines SE durch die Gabe von Pilocarpin befindet sich im Methodik-Teil (s. Kapitel 2.2.2).

Doch es bleiben immer noch Zweifel, ob die Erkenntnisse, die durch diese post-SE-Tiermodelle gewonnenen werden, auf die TLE beim Menschen übertragbar sind (Gorter et al. 2016). Daher unterliegen diese Tiermodelle einer ständigen Verfeinerung der Methodik und Aussagekraft. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das Hitzeschockprotein HSP27 ein zuverlässiger Marker für einen stattgefundenen Pilocarpin-induzierten SE ist (Kirschstein et al. 2012).

Bislang wurde davon ausgegangen, dass es nach dem ausgelösten Status epilepticus eine Latenzphase gibt, in der es zu keinen epileptischen Ereignissen kommt. Diese Latenzzeit wurde je nach Tiermodell zwischen wenigen Wochen und Monaten angegeben, bevor dann erstmalig spontane epileptische Anfälle auftreten (Cendes et al. 1995; Turski et al. 1983). J. A. Gorter konnte jedoch nachweisen, dass es auch in dieser scheinbar anfallsfreien Periode zu in der Elektroenzephalografie (EEG) nachweisbaren epileptischen Aktivitäten kommt, die in den ersten Tagen post-SE auftreten und mit der Zeit zunehmen. Er konnte zeigen, dass der Zeitpunkt der ersten spontanen Anfälle mit der spezifischen Schädigung oder Neuorganisation korreliert (Gorter et al. 2001). Ein solch ausgelöster SE resultiert letztendlich in der Ausbildung einer Hippocampusklerose.

Bei den im Tiermodell genutzten Ratten werden 5 Anfallsstadien unterschieden, die von R. Racine erstmalig klassifiziert wurden und folgendermaßen definiert sind (Racine 1972):

Stadium 1: Immobilität, schwacher Klonus der mimischen Muskulatur, Schließen von einem oder beiden Augen, Zittern der Tasthaare, stereotypes Schnüffeln

Stadium 2: gesteigerter Klonus der mimischen Muskulatur mit Kaubewegungen und Kopfnicken

Stadium 3: Ipsilateral zum Anfallsherd unilateraler Klonus der vorderen Extremität

Stadium 4: Bilateraler Klonus der vorderen Extremitäten, Aufrichten auf die Hinterläufe, Erhalt der Stellreflexe, generalisierter Anfall

Stadium 5: Verlust der posturalen Kontrolle, Aufrichten auf die Hinterläufe mit konsekutivem Umfallen und Weiterkrampfen auf der Seite oder dem Rücken liegend

Ein Stadium beinhaltet dabei die Eigenschaften der vorangegangenen bzw. vom Stadium niedriger eingestuften Merkmale. Die Geschwindigkeit der Generalisierung dieses primär fokalen Anfallsgeschehen ist dabei sehr variabel. Je nach Tierversuchsmodell werden Prodromalstadien definiert, in denen das Bewusstsein noch teilweise vorhanden ist.

1.4 Die Elektrophysiologie des Aktionspotenzials und seiner Nachpotenziale

1.4.1 Das Aktionspotenzial

Das Aktionspotenzial (AP) ist eine klar definierte Abfolge von Ionenströmen durch Ionenkanäle an einer semipermeablen Membran. Aktionspotenziale können nur an den Membranabschnitten generiert werden, an denen eine bestimmte Kombination von diesen verschiedenen Ionenkanälen vorliegt. Ein Aktionspotenzial besteht aus einer schnellen depolarisierenden Komponente und einer unmittelbar darauffolgenden repolarisierenden Komponente. Auf die Repolarisation folgt die Hyperpolarisation. Sie wird durch ein Membranpotenzial gekennzeichnet, das negativer als das Ruhemembranpotenzial (RMP) ist. Insgesamt dauert ein AP etwa 1-2 Millisekunden. Der Ausgangszustand der Potenzialverschiebung ist in der Regel das Ruhemembranpotenzial, das durch die unterschiedlichen Ionenkonzentrationen, im wesentlichen Kalium, Natrium und Chlorid, und ihren daraus resultierenden Gleichgewichtspotenzialen in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit der Membran entsteht. Zusätzlich senken die aktive Natrium-Kalium-ATPase und membrannahe intrazelluläre negativ geladene Proteine das RMP um weitere -10 mV. In vielen Neuronen liegt das RMP daher physiologisch zwischen -60 und -70 mV.

Die Depolarisation in den positiven Membranpotenzialbereich wird hauptsächlich durch spannungsgesteuerte Natriumkanäle gebildet, die sehr schnell nach Öffnung inaktivieren und unter anderen Tetrodotoxin-sensitiv sind. Die Inaktivierung bezeichnet den Verschluss des offenen Kanals durch die n-terminalen Enden der Polypeptidketten, die den Kanal bilden. Die meisten Natriumkanäle öffnen sich bei ca. -55 mV, so dass es ab diesem Punkt zu einem nicht mehr aufhaltbaren Überschießen der Depolarisation kommt, bei der alle noch nicht geöffneten Natriumkanäle ebenfalls aktiviert werden. Infolge der schnellen Inaktivierung kurz nach Aktivierung kommt es nach diesem Überschießen unmittelbar zur Repolarisation, die durch das Öffnen von spannungsgesteuerten und anderen Kaliumkanälen verstärkt wird. Infolge der langsamen

Schließung dieser Kanäle kommt es zu einer Hyperpolarisation, die auch als Afterhyperpolarization potential (AHP) bekannt ist. Da die Entstehung des AHP für die hier vorliegende Arbeit relevant ist, soll sie im Folgenden genauer beleuchtet werden.

1.4.2 Das AHP und seine Ströme, die es bilden

Innerhalb dieses AHP konnten bislang drei Anteile bestimmt werden, die durch unterschiedliche Kanäle und die dadurch entstehende Ströme charakterisiert sind: ein nur 2-5 Millisekunden andauerndes schnelles AHP (fAHP), ein mittelschnelles 50-300 Millisekunden währendes AHP (mAHP) und ein bis zu 1-2 Sekunden anhaltendes AHP (sAHP) (Lancaster & Nicoll 1987; Storm 1987, 1989). Alle 3 Anteile beeinflussten elementar die Erregbarkeit der Zelle (Madison & Nicoll 1984; Storm 1987, 1989).

Sowohl das fAHP als auch das sAHP sind Calcium-abhängig, jedoch konnten die sAHP-Ströme in vitro nicht auf die gleiche Weise blockiert werden, wie die fAHP-Ströme, was darauf schließen lässt, dass unterschiedliche Kanäle aktiv sind (Lancaster & Nicoll 1987). Als schnelle Komponente beeinflusst das fAHP die späte Phase der Repolarisation und wird von Calcium-abhängigen und spannungsgesteuerten Kaliumkanälen mit großer Leitfähigkeit (Large conductance) bestimmt. Der Einfluss von Chloridkanälen ist dabei nur unwesentlich mitbestimmend (Storm 1987).

Das mAHP ist größtenteils von spannungsunabhängigen Calcium-abhängigen Kaliumkanälen mit geringer Leitfähigkeit (Small conductance, SK), abhängig (Stocker et al. 1999; Stackman et al. 2002). Von diesen gibt es die 3 Isoformen $K_{Ca2.1}$, $K_{Ca2.2}$ und $K_{Ca2.3}$, die unterschiedlich stark exprimiert werden. So findet man zum Beispiel die Isoformen $K_{Ca2.1}$ und $K_{Ca2.2}$ im Neokortex und CA1-3, die Isoform $K_{Ca2.3}$ im Nucleus supraopticus und die Isoformen $K_{Ca2.2}$ und $K_{Ca2.3}$ im Nucleus olivarius inferior (Stocker & Pedarzani 2000). Auf der zellulären Ebene sind die $K_{Ca2.2}$ -Kanäle fast ausschließlich postsynaptisch zu finden, während es auch präsynaptisch zur Ausbildung von $K_{Ca2.3}$ -Kanälen kommt (Obermair et al. 2003; Sailer et al. 2004). Sie bestehen aus jeweils vier Untereinheiten, von den alle Calmodulin (CaM) binden können und im nativen Zustand auch gebunden haben (Allen et al. 2007). Die Sensitivität für Calcium, das nur intrazellulär gebunden werden kann, ist bei allen drei Isoformen gleich hoch (Köhler et al. 1996). K_{Ca2} -Kanäle sind am hippocampalen Lernen und der Gedächtnisbildung beteiligt (Hammond et al. 2006). Zusätzlich spielen sie in der postsynaptischen Regulation der Übererregbarkeit eine Rolle (Madison & Nicoll 1984; Gu et al. 2008). Darüber hinaus scheinen diese Kanäle durch ihre embryologisch frühzeitige Expression einen relevanten Beitrag zur Hirnentwicklung zu leisten (Gymnopoulos et al. 2014). Aufgrund dieser Modulation der Erregbarkeit und der synaptischen Funktionen bei neuronalen

Dysfunktionen innerhalb der zentralen Schaltstellen des Zentralen Nervensystems sind sie entweder als Ursache und oder als Ziel neuer Therapien in Betracht zu ziehen (Pedarzani & Stocker 2008).

Vom sAHP ist bekannt, dass es nach einer schnellen Folge von Aktionspotenzialen auftritt und maßgeblich die Adaptation der Aktionspotenzial-Frequenz mit beeinflusst (Lancaster et al. 1991). Ursprünglich nahm man an, dass an seiner Entstehung K_{Ca2} -Kanäle beteiligt seien, jedoch konnte diese Theorie widerlegt werden (Stocker et al. 1999; Bond et al. 2004; Villalobos et al. 2004; Pedarzani et al. 2005). Vermutet wird, dass HCN-Kanäle eine Rolle spielen (Gu et al. 2005; Kaczorowski 2011). Diese werden durch Hyperpolarisation aktiviert, durch zyklische Nukleotide moduliert und durchlässig für Natrium und Kalium. Durch die Reduktion der postsynaptischen Antwort auf eine präsynaptische hochfrequente Stimulation könnte die Schwelle für die Tetanus-induzierte synaptische Plastizität beeinflusst werden (Lancaster et al. 2001).

Diese Regulation der Frequenzen von Aktionspotenzialfolgen dient der Prävention von synchronen epileptischen Entladungen. Diese können ebenfalls durch das intrinsische Burstverhalten epileptisch veränderter Neuronen getriggert werden (Beck & Yaari 2008). Als Burst versteht man eine kurze Folge von dicht aufeinander folgenden Aktionspotenzialen, bei denen nur das erste AP durch einen externen Stimulus ausgelöst wurde, wobei die restlichen Aktionspotenziale als Folge der intrinsischen Übererregbarkeit als typisches Zeichen epileptischer Nervenzellen ausgelöst werden (Chen et al. 2011).

1.5 Proteinkinase CK2 und 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol

Die auch als Caseinkinase 2 bekannte Protein-Kinase CK2 ist eine in eukaryoten Zellen sowie in Hefen ubiquitär vorkommende, hoch pleiotrope und ständig aktive Serin/Threonin-Proteinkinase, deren Beteiligung an vielen Pathologien wie beispielsweise Neoplasien, der Apoptosehemmung oder viralen Infektionen nachgewiesen wurde. Nur ein Bruchteil ihrer Substrate sind physiologisch metabolisch aktive Enzyme (Meggio & Pinna 2003; Battistutta 2009). Sie verdankt ihren Namen der Tatsache, dass sie *in vitro* Casein spalten kann; ein Substrat, das aber im menschlichen Körper keine Rolle spielt. Die CK2 ist ein Tetramer mit zwei katalytischen α -Untereinheiten und zwei regulatorischen β -Untereinheiten, jedoch können sich die freien α -Untereinheiten gegenseitig aktivieren (Blanquet 2000). Während die CK1 eine reine Serin-Kinase ist, die nur ATP als Substrat verwendet und nicht von Heparin oder 2,3-diphosphoglycerat gehemmt wird, kann die CK2 sowohl Adenosintriphosphat als auch Guanosintriphosphat nutzen und wird durch Heparin und 2,3-Diphosphoglycerat gehemmt. Für ihre Aktivierung ist die Anwesenheit von Mg^{2+} erforderlich und

beide werden von monovalenten Kationen stimuliert (Hathaway et al. 1980). Eine Autoinhibition durch Polymerisation wurde diskutiert (Lolli et al. 2012).

Die für das Thema dieser Arbeit relevanten Substrate der CK2 sind Calmodulin (CaM) und $K_{Ca2.2}$ (Bildl et al. 2004; Allen et al. 2007). Aktuell wird davon ausgegangen, dass CaM zum einen die Aktivität der K_{Ca2} -Kanäle steigert und zum anderen die Integration der Kanäle in die Membran bewirkt. Die Expression an der Membranoberfläche ist dabei Calcium-unabhängig, während für die Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit Calcium-bindendes CaM benötigt wird (Keen et al. 1999; Lee et al. 2003). Durch diese Wirkungen hat die CK2 unmittelbar Einfluss auf die Übererregbarkeit und die Entstehung von Epilepsien.

Um diesem entgegenzuwirken, verfügt man mit 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) und 2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol (DMAT) über zwei potente kommerziell erhältliche Enzyblocker (Sarno et al. 2001; Sarno et al. 2005). Beide besitzen die höchste Affinität für die CK2. Die Verbesserung der Sensitivität von TBB/DMAT-Derivaten als CK2-Inhibitoren ist Gegenstand vieler aktueller Forschungen.

Für die vorliegende Arbeit wurde TBB verwendet, da es sowohl oral als auch intraperitoneal appliziert werden kann.

1.6 Fragestellung

Brehme et al. konnten in einer früheren Studie aufzeigen, dass die orale Gabe von TBB als Inhibitor von CK2 nach Auslösen eines Status epilepticus einen Einfluss auf das Nachpotenzial (AHP) sowie auf die intrinsische Erregbarkeit hat, was mit einer Beeinflussung der sAHP-Ströme assoziiert wurde (Brehme et al. 2014). Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, sich den Antworten auf folgende Fragen zu nähern:

1. Kann die prophylaktische Gabe von TBB vor der Initialisierung eines Pilocarpin-induzierten SE ebenfalls eine Veränderung des AHPs und der damit verbundenen intrinsischen Erregbarkeit auslösen?
2. Gibt es darüber hinaus noch Hinweise auf weitere Wirkungen von TBB?
3. Lassen sich in diesem Zusammenhang Veränderungen der synaptischen Übertragung darstellen?
4. Lassen sich die Veränderungen in der Erregbarkeit des Hippocampus auch in der Frequenz motorischer Anfälle der Versuchstiere wiederfinden?

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Materialien

Tabelle 1 Pilocarpin-induzierter Status Epilepticus und TBB-Behandlung

Einmal-Pasteurpipette 3.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einmalspritze 1 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzenkanüle 16G	Braun, Melsungen, Deutschland
Waage	Ladenwaage, Institut für Physiologie, Rostock, Deutschland
Wistar-Ratte (männlich)	Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld,

Tabelle 2 Präparation des Hippocampus

Aufbewahrungskammer	Eigenbau, Institut für Physiologie, Rostock, Deutschland
Bad mit Thermostat: Haake C 10	Thermo, Karlsruhe, Deutschland
Begasungsfritte	Robu, Hattert, Deutschland
Carbogen-Gas 5% CO ₂ , 95% O ₂	Linde, Wiesbaden, Deutschland
Doppelspatel	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Gasverteilungsrohrsystem	Robu, Hattert, Deutschland
Kleintier-Dekapitator	WPI, Sarasota, Florida, USA
Mikroskopierschere	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Narkosekammer	Eigenbau, Institut für Physiologie, Rostock, Deutschland
Petrischale	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pinzetten stumpf	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Rasierklinge Classic	Wilkinson Sword, Solingen, Deutschland
Becherglas 500 ml	VITLAB GmbH, Grossostheim, Deutschland
Rundfilter 55 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schere spitz	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Sekundenkleber	UHU, Bühl, Deutschland
Skalpell	Präzisa plus, P. J. Dahlhausen, Köln, Deutschland
Spatellöffel	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Spritzenkanüle: Microlance 3, 21G	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Transferpipetten, 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Vibratom Leica VT 1200S	Leica Biosystems, Nussloch Deutschland

Tabelle 3 Elektrophysiologische Messungen

Absaugvorrichtung ALA VWK	ALA Scientific Instruments, Westbury, USA
Analog-Digital-Konverter CED 1401mkII	CED, Cambridge, England
Bad mit Thermostat: Haake C 10	Thermo, Karlsruhe, Deutschland
Borosilikatpipetten: GB120F-10	Science Products, Hofheim, Deutschland
Borosilikatpipetten: GB150-10	Science Products, Hofheim, Deutschland
Extrazellulärverstärker EXT 10-2F	npi electronic, Tamm, Deutschland
Faradaykäfig	Eigenbau, Institut für Physiologie, Rostock, Deutschland
Frequenzgenerator Master-8	A.M.P.I., Jerusalem, Israel
Infusionsbesteck Intrafix Air P	Braun, Melsungen, Deutschland
Interfacekammer	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Intrazellulärverstärker SEC-10LX	npi electronic, Tamm, Deutschland
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott, Mainz, Deutschland
Manipulator EXFO 8200 Inchworm	EXFO, Quebec, Kanada
Mikrofilter 0.22 µm, Millex GV	Millipore, Cork, Irland
Mikroskop Leica MZ6	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikropipettennadel MicroFil MF28G	WPI, Saratota, USA
Peristaltische Pumpe Perimax 12	Spetec, Erding, Deutschland
Personalcomputer (Microsoft Windows XP)	HP, Palo Alto, USA
Pipettenständer	Eigenbau, Institut für Physiologie, Rostock, Deutschland
Pipettenziehgerät P-97	Sutter Instruments, Novato, USA
Pipettenziehgerät HEKA PIP3	HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland
Platindraht 0.05 mm	Science Products, Hofheim, Deutschland
Pulsstimulator A365 Stimulus Isolator	WPI, Sarasota, Florida, USA
Schlauchsystem aus Silikon	Eigenbau, Institut für Physiologie, Rostock, Deutschland
Silberdraht	Science Products, Hofheim, Deutschland
Temperaturregler TC-10	npi electronic, Tamm, Deutschland
Tisch (schwingungsgedämpft)	TMC, Peabody, USA

Tabelle 4 **Zusätzliches Labormaterial und -technik**

Glasflasche 500 ml, 1000 ml, 2000 ml	Schott, Mainz, Deutschland
Kühl- und Gefrierschrank	Liebherr, Biberach a. d. Riß, Deutschland
Magnetrührer RET-GS	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
Messkolben	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Messzylinder	Brand, Wertheim, Deutschland
Mikroliterpipetten, div.	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Osmometer Osmomat 030	Gonotec, Berlin, Deutschland
pH-Meter CG840	Schott, Mainz, Deutschland
Reagenzgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spatel (diverse)	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Vortex-Mixer neoLab Vortex 7-2020	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Waage MC1 analytic AC 1205	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserdestillierer Pureless flex	Veolia, Saint-Maurice, Frankreich

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 5 **Chemikalien**

Aqua dest.	
CaCl ₂	Sigma, Taufkirchen,
CH ₃ COOK	Sigma, Taufkirchen,
D-(+)-Glucose	Sigma, Taufkirchen,
Diazepam	Ratiopharm, Ulm,
Diethylether	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt,
HCl	Sigma, Taufkirchen,
KCl	Sigma, Taufkirchen,
MgCl ₂	Sigma, Taufkirchen,
N-Methylscopolamin	Sigma, Taufkirchen,
NaCl	Sigma, Taufkirchen,
NaH ₂ PO ₄	Sigma, Taufkirchen,
NaHCO ₃	Sigma, Taufkirchen,
NaOH	Sigma, Taufkirchen,
Pilocarpin	Sigma, Taufkirchen,
Sucrose	Sigma, Taufkirchen,

ZD7288 (C ₁₅ H ₂₁ ClN ₄)	Tocris Bioscience, Bristol,
4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB)	Calbiochem, Darmstadt,

Tabelle 6 **Lösungen**

	Präparationslösung (mmol/l)	ACSF (mmol/l)
CaCl ₂	0,5	2,5
D-	10	10
KCl	2,5	3
MgCl ₂	1,3	1,3
NaCl	87	124,5
NaHCO ₃	25	26
NaH ₂ PO ₄	1,25	1,25
Sucrose	75	

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

Die Pipettenlösung besteht aus Kaliumacetat (3 mmol/l) und Kaliumchlorid (0,03 mmol/l).

Der pH-Wert wurde mittels Titration von HCl oder NaOH und die Osmolarität durch Titration von Sucrose oder Aqua dest. eingestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 TBB-Behandlung

Die Zuordnung zu den 4 Versuchsgruppen erfolgte randomisiert. Für die TBB-Injektion, beginnend zwischen dem 26. und dem 29. Lebenstag, wurde eine für die Ratten möglichst stressfreie Umgebung genutzt. Verwendet wurden männliche Wistarratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld) mit einem Durchschnittsgewicht von 120-160 g am Tag der Pilocarpinapplikation.

Jedem Tier aus den Gruppen Pilocarpin-TBB und Kontrolle-TBB wurde nach Messung des Körpergewichts 6 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht (KG) TBB intraperitoneal (i.p.) appliziert. TBB wurde so verdünnt, dass die applizierte Flüssigkeitsmenge 100 $\mu\text{l}/100$ g KG betrug. Die für die TBB-Wirkung als Kontrollen dienenden Versuchstiere bekamen ebenfalls 100 $\mu\text{l}/100$ g KG Dimethylsulfoxid (DMSO) i.p. verabreicht. Diese Prozedur wurde an den darauffolgenden 3 Tagen wiederholt. Am 4. Tag der TBB-Behandlung erfolgte 60 Minuten nach der letzten i.p.-Applikation die Induktion des Status epilepticus (SE).

2.2.2 Status epilepticus

Systemisch appliziert hat der Acetylcholin-Agonist Pilocarpin vielfältige Nebenwirkungen, so zum Beispiel kardiovaskuläre Symptome (Bradykardie, Herzrhythmusstörungen) oder exkretorische Überfunktionen (Sekretion von Schweiß, Speichel, Magensaft). Um die Belastungen intra- und postinterventionell daher so gering wie möglich zu halten und die SE-bedingte Letalität zu senken, wurde jedem Tier 30 Minuten vor Pilocarpingabe das Anticholinergikum N-Methylscopolamin i.p. in der Dosis 1 mg/kg KG injiziert. Dieses hatte aufgrund seiner geringen Lipophilie als quartäres Amin keine zentralnervöse Wirkung.

Nach der darauffolgenden intraperitonealen Pilocarpingabe von 340 mg/kg KG (250 $\mu\text{l}/100$ g) kam es innerhalb von wenigen Minuten zum Auftreten von ersten fokalen und sekundär generalisierten Anfällen als Zeichen der zentralnervösen Wirkung des Pilocarpins. Kam es zu andauernden Krämpfen und dem daraus resultierenden Bewusstseinsverlust eines Tieres über einen Zeitraum von mehr als 5 Minuten, wurde davon ausgegangen, dass es sich im Status epilepticus befindet. Dieser musste für mindestens 40 Minuten ohne Wiedererlangen des Bewusstseins bestehen bleiben, damit das Tier für die weitere Verwendung in der Studie zugelassen werden konnte. Nach 40 Minuten im SE wurde dieser durch die Einmalgabe von 200mg Diazepam i.p. beendet. Sofern diese Dosis nicht ausreichte, konnte bis zur Beendigung des Anfalls Diazepam i.p. nachgespritzt werden. Die Versuchstiere wurden dann zur Regenerationsbeschleunigung mit 5% Glucoselösung

ad libitum gefüttert. Tiere, die innerhalb einer Stunde nach Pilocarpingabe keine Anfälle oder einen SE über 40 Minuten aufzeigten, wurden aus den weiteren Versuchen herausgenommen.

Die Kontrolltiere bekamen parallel zu den Pilocarpin-behandelten Tieren nach der gewichtsadaptierten Gabe von N-Methylscopolamin (s.o.) 250 µl/100 g isotone Kochsalzlösung (NaCl) i.p. und Diazepam i.p. appliziert und zeigten wie erwartet keine Anfälle.

Nach Abschluss der Behandlung wurden alle Tiere in Einzelkäfigen, bestehend aus durchsichtigem Kunststoff mit abnehmbarer Gitterdecke, mit ausreichend Nahrung, Wasser und Streu versorgt. Die Käfige und Nahrungsmittel wurden regelmäßig gewechselt beziehungsweise erneuert und die Streu ausgewechselt. Bis zur weiteren Versuchsdurchführung befanden sich alle Tiere in Tierställen mit konstanter Raumtemperatur und regelmäßigem Tag-Nachtrhythmus (6:00 - 18:00 Uhr Tag, 18:00 - 6:00 Uhr Nacht)

Aus dieser Behandlung resultierten die vier Versuchsgruppen, die Bestandteile aller weiteren Versuche waren:

1. Mit NaCl und DMSO behandelte Kontrolltiere (Kontrolle, Ctrl)
2. Mit NaCl und TBB behandelte Kontrolltiere (Kontrolle-TBB, Ctrl-TBB)
3. Mit Pilocarpin und DMSO behandelte epileptische Tiere (Pilocarpin, Pilo)
4. Mit Pilocarpin und TBB behandelte epileptische Tiere (Pilocarpin-TBB, Pilo-TBB)

Sämtliche Tierversuche (TBB-Behandlung und Status epilepticus) wurden unter Einhaltung der tierschutzrechtlichen Bestimmungen von Mitarbeitern des Instituts für Physiologie durchgeführt (AZ: 7221.3-1-019/13). Alle Versuche waren konform mit der Europäischen Richtlinie (86/609/EEC), außerdem wurde darauf geachtet, sowohl die Tierzahl als auch die Belastung der Tiere zu minimieren.

2.2.3 Video-Monitoring

Für die elektrophysiologische Messungen wurden nicht alle Tiere verwendet. Ein Teil wurde mittels Video-Monitoring auf das Auftreten von epileptischen Anfällen hin untersucht. Dafür konnten über einen Zeitraum von 47 - 49 Tagen jeweils 12 Tiere, denen Pilocarpin appliziert wurde und die mit DMSO oder TBB vorbehandelt waren, mit ihren Käfigen in einem Käfigständer von einer Kamera (Logitech, Lausanne, Schweiz) gefilmt und über ein Computerprogramm (WebcamXP, Moonware Studios) aufgezeichnet werden. Die Umgebungsbedingungen und das Angebot von Wasser und Nahrung blieb dabei unverändert bestehen (s.o.). Die Zuordnung zu den zu den Käfigen

wurde einfach verblindet durchgeführt, so dass der Beobachter keine Information über den Vorbehandlungsstatus der Tiere hatte.

Registriert wurden alle sichtbaren Anfälle, die mit Bewegungen des Kopfes, des Rumpfes und/oder der Extremitäten einhergingen. Als Anfallsgeschehen wurde das sichere Auftreten eines Stadiums (s. Kapitel 1.3) angesehen. Das Ende jedes Anfalles war durch das Wiedererlangen des Bewusstseins mit Erlangen der Willkürmotorik gekennzeichnet. Letzteres Kriterium ist entscheidend bei der Bestimmung von zwei einzeln zu wertenden, kurz aufeinanderfolgenden Anfällen gewesen, bei denen ohne zwischenzeitliches Wiedererlangen des Bewusstseins auch ein möglicher SE hätte vorliegen können.

Der Beginn der Videoaufzeichnungen lag je nach Versuchsgruppe zwischen 5 und 12 Tagen nach Applikation von Pilocarpin. Für die statistische Auswertung wurde der Zeitraum herangezogen, der von allen Versuchsreihen abgedeckt wurde.

Tiere, die für das Video-Monitoring genutzt wurden, konnten nicht für elektrophysiologische Messungen dieser Arbeit, sondern für immunhistochemische und histologische Untersuchungen der Projektgruppe, weiterverwendet werden.

2.2.4 Hippocampuspräparation

Für die Präparation des Hippocampus wurde das Versuchstier zuerst in einer Narkosekammer mit Diethylether betäubt und nach Eintritt einer suffizienten Narkose, gekennzeichnet durch vollständigen Verlust der Halte- und Stellreflexe, dekapitiert. Unmittelbar darauf erfolgte die Eröffnung des Schädels in einer mit annähernd 4° Celsius kalten Präparationslösung auf Sucrose-Basis, um das Überleben des neuronalen Gewebes zu optimieren. Dazu wurde die Schädelkalotte durch einen medianen Schnitt mit dem Skalpell von der Stirn bis zur Dekapitationswunde freigelegt. Mit einer Schere konnte daraufhin der Schädel mittels eines Schnittes vom Foramen magnum durch die Sutura sagittalis bis zum Bregma gespalten und die beiden Parietalhälften beidseits mit einem anterolateralen Schnitt vom Foramen magnum zum Felsenbein mobilisiert werden. Unter Zuhilfenahme einer anatomischen Pinzette konnten dann beide Knochen vorsichtig zur Seite geklappt und das Zerebellum mit einem Skalpell abgetrennt werden. Um bei der Herauslösung des Gehirns aus dem knöchernen Schädel das Gewebe nicht zu verletzen, sollten noch im Wege stehen Überreste der Dura mater vorsichtig mit einem Skalpell entfernt werden. Mit einem stumpfen und abgewinkelten Spatel wurde das Gehirn unterminiert und nach Durchtrennung der restlichen Gehirnnerven aus dem Schädel entnommen. Nach vorsichtiger Säuberung des Präparates wurde das Gehirn mit dem Vertex nach unten mit Sekundenkleber auf einer Präparationsplatte fixiert und

in die Schnittkammer des Vibratoms (Leica VT1200S) gesetzt, welche mit sauberer und oxygenierter Präparationslösung aufgefüllt war. Um ein möglichst einwandfreies Ergebnis zu erzielen, waren alle Arbeitsschritte ab der Dekapitation bis zur Überführung in das Vibratom, mit Ausnahme der Fixierung auf der Platte, in gekühlter, oxygenierter Präparationslösung und in einem Zeitraum von 60-90 Sekunden, maximal 120 Sekunden vorgenommen worden.

Das Vibratom trug eine handelsübliche doppelseitige Rasierklinge (Wilkinson Sword Classic) und war vor jeder Präparation so einzustellen, dass die Klingebewegung sich in Relation zum Vibratom lediglich zur Seite und nicht nach oben/unten oder vorne/hinten bewegte.

Die 400 µm dicken Schnitte wurden mit einem Vortrieb von 8µm/s und einer Schwingungsfrequenz von 80Hz gefertigt. Noch nicht entfernte Reste der Meningen wurden vorher mit einer feinen Präparationsschere entfernt, um akzidentelle Verletzungen des Hirngewebes zu vermeiden. Die Heraustrennung des Hippocampus aus dem Schnitt heraus erfolgte mithilfe einer gebogenen Kanülenspitze. Anschließend wurde das Präparat in eine Aufbewahrungskammer mit oxygeniertem ACSF überführt und verblieb in diesem bis zur Inkubation in der Messkammer.

2.2.5 Extrazelluläre elektrophysiologische Feldpotenzialmessungen

Für die extrazellulären Messungen wurden die Hippocampusschnitte mit einer Transferpipette aus der Aufbewahrungskammer in die Messkammer überführt, in der sie durch konstante Begasung mit 5%-Carbogen und Umspülung von 32°C.-warmen künstlichen Liquor (Artificial cerebrospinal fluid, ACSF) für 30 Minuten inkubiert wurden. Dieser Schritt diente der Anpassung an das Milieu und der Regeneration der Schnitte von der Überführung in die Messkammer. Die Geschwindigkeit der Zuführung von ACSF in die Kammer war so zu wählen, dass sich ein konstanter über dem Schnitt geschlossener und in der Kammer etwas konkav geformter Flüssigkeitsfilm bildete.

Die Stimulationselektrode, bestehend aus einem mit Teflon ummantelten Platindraht, wurde im Bereich der Schaffer-Kollateralen im Stratum radiatum zwischen CA2 und CA1 platziert. Die Ableitungselektrode, bestehend aus einem chlorierten Silberdraht, der in einer mit ACSF gefüllten Glaspipette (Öffnungswiderstand: 2-3 MΩ nach Herstellung mit HEKA PIP3 Pipette Puller) lag und mit dem Verstärker (EXT 10-2F) verbunden war, wurde im Stratum pyramidale des CA1 platziert. Die Referenzelektrode, die sich am Boden der Messkammer befand und aus chloriertem Silberdraht bestand, war ebenfalls an den Verstärker angeschlossen.

Um die ordnungsgemäße Lage der Elektroden zu überprüfen, erfolgte die Stimulation der Schaffer-Kollateralen als Doppelpuls mit einem Interpulsintervall (IPI) von 40ms. Bewertet wurden dabei die Amplitude der gemessenen Feldpotenziale und die notwendige Amplitudenzunahme der zweiten

Reizantwort als Zeichen einer stattgefundenen synaptischen Übertragung. Zur Kontrolle der Elektrodenplatzierung erfolgte der Vergleich der Messwerte mit Messplatz-typischen Referenzwerten. Kam es dabei über einen Zeitraum von 5 Minuten nicht zu einer Veränderung der gemessenen Potenziale, wurden die weiteren Versuche und die daraus resultierenden Daten für die Auswertung zugelassen.

Die Messungen erfolgen nach dem folgenden Protokoll in vier direkt aufeinander folgenden Schritten:

1. 20 Doppelpulse, steigend von 0-30 mA, Interstimulationsintervall (ISI) 40 ms, Interpulsintervall (IPI) 40 s (im Weiteren als Input-Output-Protokoll bezeichnet)
2. 10 Doppelpulse mit halbmaximaler Stimulationsstärke, ISI 40 ms, IPI 40 s; die maximale Stimulationsstärke ist dabei die Stimulationsstärke aus Punkt 1 des Messprotokolls, die die stärkste Reizantwort ergibt (im Weiteren als Baseline-Protokoll zur Bestimmung der basalen Erregbarkeit bezeichnet)
3. 10 Serienpulse mit fünf Stimulationen bei halbmaximaler Stimulationsstärke, IPI 60 s, Serienpulse mit einer Frequenz von 33 Hz, 25 Hz und 10 Hz (zur Analyse der Kurzzeitpotenzierung (Short term potentiation, STP))
4. 10 Doppelpulse mit halbmaximaler Stimulationsstärke, ISI 40 ms, IPI 40 s (*Baseline-Protokoll*)

Die Wechsel der Frequenzen und Zeitabstände erfolgte manuell am Frequenzgenerator (Master-8). Der Stromimpuls wurde durch einen Pulsstimulator (A365 Stimulus Isolator) erzeugt. Die Aufnahme erfolgte nach Verstärkung mit einem Frequenzfilter von 1 kHz.

Um Kohorten-Effekte unter den vier Versuchsgruppen (Kontrolle, Kontrolle-TBB, Pilocarpin, Pilocarpin zu vermeiden, wurden die Experimente in mehrwöchigen Phasen durchgeführt, wobei stets Tiere aus täglich wechselnden Versuchsgruppen untersucht wurden.

In der Auswertung wurden die Steigung und Amplitude der fEPSP bestimmt. Stabile Ableitungsbedingungen waren dadurch charakterisiert, dass sich die Veränderungen in Steigung und Amplitude im gleichen Verhältnis zueinander verhielten. Aus diesem Grund wurde im Ergebnisteil immer die Steigung dargestellt.

2.2.6 Intrazelluläre elektrophysiologische Messungen

Für die intrazellulären Ableitungen erfolgte mit einer Glaspipette die Punktion von Pyramidenzellen im Stratum pyramidale im CA1. Diese Pipette wurde vorher in einem Pipetten-Ziehgerät (P97) aus

Glaskapillaren hergestellt. Die Temperatur war dabei von den aktuell vorherrschenden thermischen und atmosphärischen Bedingungen abhängig, sodass vor Herstellung der geeignete Schwellenwert für den optimalen Innenwiderstand der Pipetten durch ein in das Gerät integriertes Programm zur Kalibrierung erfolgte. Das Innere der Pipette wurde mit einer Lösung aus destilliertem Wasser, Kaliumacetat und Kaliumchlorid (s. Kapitel 2.1.2) befüllt. Vor Verwendung der Kapillaren war darauf zu achten, dass sich in der Spitze keinerlei Lufteinschlüsse befanden. Andernfalls bestand die Möglichkeit der Verfälschung des Innenwiderstandes und damit der Messergebnisse. Für Messungen wurden nur Pipetten zugelassen, die einen Innenwiderstand von 90-120 M Ω aufwiesen.

Der Aufbau der Messkammer glich dem der extrazellulären Messungen (s. Kapitel: 2.2.5). Die Stimulationselektrode war in diesem Fall identisch mit der Ableitungselektrode gewesen und bestand aus einem chlorierten Silberdraht, der sich in der Glaspipette befand und über einen Kapazitätskompensator, der die kapazitiven Effekte der Pipette ausglich, mit dem Verstärker verbunden war. Die Pipette wurde in einen Führungsschlitten eingespannt, der sich in allen drei Achsen im μm -Bereich über ein Steuermodul (EXFO 8200 Inchworm Motor Controller) bewegen ließ. Mit diesem Stepper wurde die Pipettenspitze in den über dem Schnitt sich befindende künstlichen Liquor zur Überprüfung und Einstellung des Pipettenwiderstandes (s.o.) und Einstellung der Referenzspannung eingetaucht. Mögliche kapazitative Artefakte konnten mit dem Kapazitätskompensator (s.o.) ausgeglichen und der Ausgleich des Pipettenwiderstandes und die Referenzspannung (Offset) über den Verstärker (SEC-10LX) eingestellt werden.

Während des Eindringens mit der Glaspipette in die Pyramidenzellschicht (CA1) wurde das Gewebe intermittierend mit einem Intervall von zwei Sekunden für jeweils 400ms und mit -0,5 nA hyperpolarisiert. Diese Methode diente der Identifizierung von Pyramidenzellen. Für den Fall der intrazellulären Ableitung konnte es nach der Hyperpolarisation und der folgenden Depolarisation auf das ursprüngliche Ruhemembranpotenzial (RMP) zurück zu einer überschießenden Depolarisation durch aktivierte Natriumkanäle kommen. Auslöser dafür ist das Öffnen von zusätzlichen spannungsabhängigen Natriumkanälen. Diese öffnen sich bei Potenzialwerten unterhalb des RMPs und werden durch die Hyperpolarisation in den aktivierbaren Zustand zurückversetzt. Sichtbar wird dieser Effekt der Depolarisation bei Überschreiten des Schwellenwertes durch die Bildung von Aktionspotenzialen. Bei erfolgreichem Eintritt in die Pyramidenzelle erfolgte durch Strominjektion die sofortige Hyperpolarisation auf -90 bis -100 mV, bis sich das Membranpotenzial stabilisierte. Daraufhin wurde der hyperpolarisierende Strom langsam reduziert, bis sich ein stabiles RMP ohne den Bedarf eines zusätzlichen Haltestroms einstellte. Für die folgenden Messungen waren Zellen zu nutzen, die ein stabiles RMP negativer als -55 mV aufwiesen.

Die Messungen erfolgten nach dem folgenden Protokoll:

1. Bei nativem RMP: Injektion von prolongierten Strömen (400ms Rechteckstrom (-1,0 bis 0,5 nA in 0,1 nA-Schritten, Stimulationsintervall: 2 s, s. Abbildung 3.5 A)
2. Nach durch Haltestrom eingestelltem Membranpotenzial von -70 mV: Injektion von prolongierten Strömen (400 ms Rechteckstrom (-1,0 bis 0,5 nA in 0,1 nA-Schritten, Stimulationsintervall: 2 s)
3. Nach durch Haltestrom eingestelltem Membranpotenzial von -70mV: Injektion von 3 Rechteckströmen (Dauer 3/5/7 ms, Intervall: 0,3 s; Stimulationsstärke steigend von 0,5 – 2,4 nA, s. Abbildung 3.6 A)

Die Aufnahme der Potenziale erfolgte nach Verstärkung mit einem Frequenzfilter von 20 kHz. Um Kohorten-Effekte unter den vier Versuchsgruppen (Kontrolle, Kontrolle-TBB, Pilocarpin, Pilocarpin) zu vermeiden, wurden die Experimente in mehrwöchigen Phasen durchgeführt, wobei stets Tiere aus täglich wechselnden Versuchsgruppen untersucht wurden.

2.2.7 HCN-Kanalblockade mit ZD7288

Um den Einfluss von TBB auf HCN-Kanäle zu untersuchen, wurden die intrazellulären Ableitungen unter Einfluss von ZD7288 reproduziert. Jede der obengenannten Versuchsgruppen (s. Kapitel 2.2.2) unterteilte sich dafür nochmal in eine Gruppe mit und eine ohne Zugabe von ZD7288. Für die Erläuterung der Versuchsdurchführung ohne ZD7288 siehe Kap. 2.2.6. Mindestens 30 Minuten vor Beginn der Messungen wurde das ACSF mit ZD7288 (20mM) inkubiert, um eine ausreichende Durchdringung des Hirnschnittes mit dem Kanalblocker zu gewährleisten.

2.2.8 Datenaufzeichnung und statische Analyse

Die Anzahl und Anfallsstadien der im Video-Monitoring sichtbaren Anfälle wurden mit WebcamXP (Moonware Studios) aufgezeichnet und nach Durchsicht der Videos mit dem VLC Media Player (VideoLan, Paris, Frankreich) in einem Datensatz mit Excel 2016 (Microsoft Deutschland, Hamburg, Deutschland) zusammengefasst.

Alle elektrophysiologischen Messungen wurden mit Signal 2.16 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) aufgezeichnet und ausgewertet. Die daraus resultierenden Daten wurden wie die Daten aus dem Video-Monitoring mit SigmaStat 3.5 (Systat Software, Erkrath, Deutschland) statistisch ausgewertet und graphisch mit Excel 2016 dargestellt.

Die Angabe der ausgewerteten Daten erfolgte als Mittelwert mit Standardfehlerabweichung (SEM=Standard Error of the Mean). Nach Prüfung auf Normalverteilung wurde die statistische Signifikanz durch eine Varianzanalyse (ANOVA) berechnet. Wenn nicht anders angegeben, wurde dabei die Holm-Sidak-Methode angewendet. Hierbei wurde ein Signifikanzniveau $p < 0,05$ als niedrig signifikanter Unterschied angenommen und mit einem Sternchen in den Grafiken dargestellt. Ein $p < 0,01$ wurde mit zwei und ein $p < 0,005$ mit drei Sternchen markiert. Sofern ein Trend ($p < 0,1$) zu erkennen war, wurde dieser mit einem + gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Video-Monitoring

Es wurden insgesamt 24 Tiere in 2 Gruppen zu je 12 Tieren gleichzeitig in ihren durchsichtigen Kunststoffboxen über einen Zeitraum von 50 Tagen beobachtet. Insgesamt wurden über 1100 Stunden Videomaterial ausgewertet. Die Bedingungen waren für alle Tiere gleich. Der Beginn der Aufzeichnung lag zwischen dem 5. und 12. Tag post-SE.

Von den 24 Tieren wurden 14 mit TBB und Pilocarpin vorbehandelt, 10 Tiere bekamen DMSO und Pilocarpin (s. Kapitel 2.2.1 und 2.2.2). Registriert wurden alle sichtbaren Anfälle, die die Kriterien von Stadium 3-5 (Racine, 1972) erfüllten. Aus jeder Versuchsgruppe entwickelte jeweils ein Tier trotz stattgehabtem SE über 40 Minuten in der Folge keine chronische Epilepsie, zeigte über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Anfälle und wurde daher aus der Auswertung des Versuchs herausgenommen. Der ausgewertete Zeitraum betraf den 12. – 53. Tag nach SE.

In der Pilocarpin-TBB-Gruppe kam es über den beobachteten auswertbaren Zeitraum zu $1,2 \pm 0,3$ Anfällen pro Tag, in der Pilocarpin-DMSO-Gruppe zu $1,6 \pm 0,5$ Anfällen pro Tag. Der Unterschied in der Anfallshäufigkeit war nicht signifikant ($p > 0,05$). In beiden Gruppen lag der Anteil der Anfälle im Stadium 4 nach Racine an der Gesamtzahl aller Anfälle bei $\approx 95\%$ und für das Stadium 3 bei unter 1%. Abbildung 3.1 A zeigt die durchschnittlich beobachteten Anfälle pro Tag innerhalb des ausgewerteten Zeitraums.

Von den 8 TBB-Tieren, die ab dem 5. post-SE-Tag beobachtet wurden, zeigten drei Tiere am 5., vier Tiere am 6. und ein Tier am 10. post-SE-Tag die ersten Anfälle. Von den zwei DMSO-Tieren, die ab dem 5. Tag post-SE beobachtet wurden, zeigte ein Tier über den gesamten Zeitraum keine Anfälle und ein Tier bereits am 5. Tag post-SE. In beiden Gruppen wurden bei allen Tieren spätestens am 18. Tag post-SE epileptische Anfälle aufgezeichnet.

Von 9 DMSO-Tieren zeigten 6 Tiere ein als Cluster bezeichnetes Verteilungsmuster von motorischen Anfällen, welches eine Häufung und Konzentrierung aller gezeigter motorischen Anfälle auf wenige Tage zeigte, die in relativ regelmäßigen Abständen auftraten. Bei den mit TBB vorbehandelten Tieren zeigte sich nur in 4 von 13 Fällen ein Cluster-ähnliches Verteilungsmuster. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,096$, χ^2 -test). Eine internationaler wissenschaftlicher Konsens für eine

genaue Definition, ab wann es sich um einen Cluster von Anfällen handelt, ist bislang noch nicht gefunden worden (Jafarpour et al. 2018).

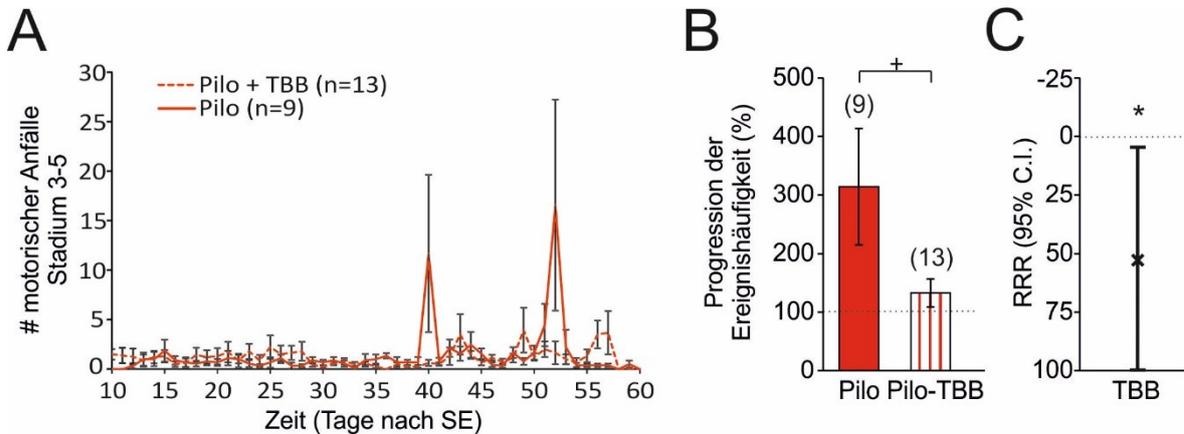


Abbildung 3.1 Krankheitsprogression in der Videoanalyse

(A) Anzahl motorischer Anfälle (mindestens Stadium 3) bei Tageslicht (von 06:00 bis 18:00 Uhr) für beide Tiergruppen als Durchschnittswert für den gesamten Erfassungszeitraum. Die Abbildung umfasst einen größeren Zeitraum, als er für die statistische Auswertung genutzt wurde. **(B)** Das Fortschreiten der Anfallslast als prozentuale Zunahme der Anfallsraten während der Epileptogenese war bei TBB-vorbehandelten epileptischen Tieren deutlich verringert ($P = 0,062$, t-Test). **(C)** Die relative Risikoreduktion (RRR) des Fortschreitens der Anfallslast durch TBB-Vorbehandlung war signifikant ($P < 0,05$, t-Test).

Die Krankheitsprogression, gemessen als prozentualer Anstieg der Frequenz von motorischen Anfällen während des Beobachtungszeitraumes, war stärker in der Gruppe ohne TBB-Vorbehandlung ausgeprägt ($314 \pm 99\%$ vs. $133 \pm 24\%$, $p=0,062$, T-Test, s. Abbildung 3.1 B). Daraus ließ sich eine signifikante Reduktion des relativen Risikos um 53% errechnen (95%-Konfidenzintervall 4-100%, $p < 0,05$, T-Test, s. Abbildung 3.1 C).

Im Folgenden sind alle beobachteten motorischen Anfälle von 5 Tieren exemplarisch dargestellt.

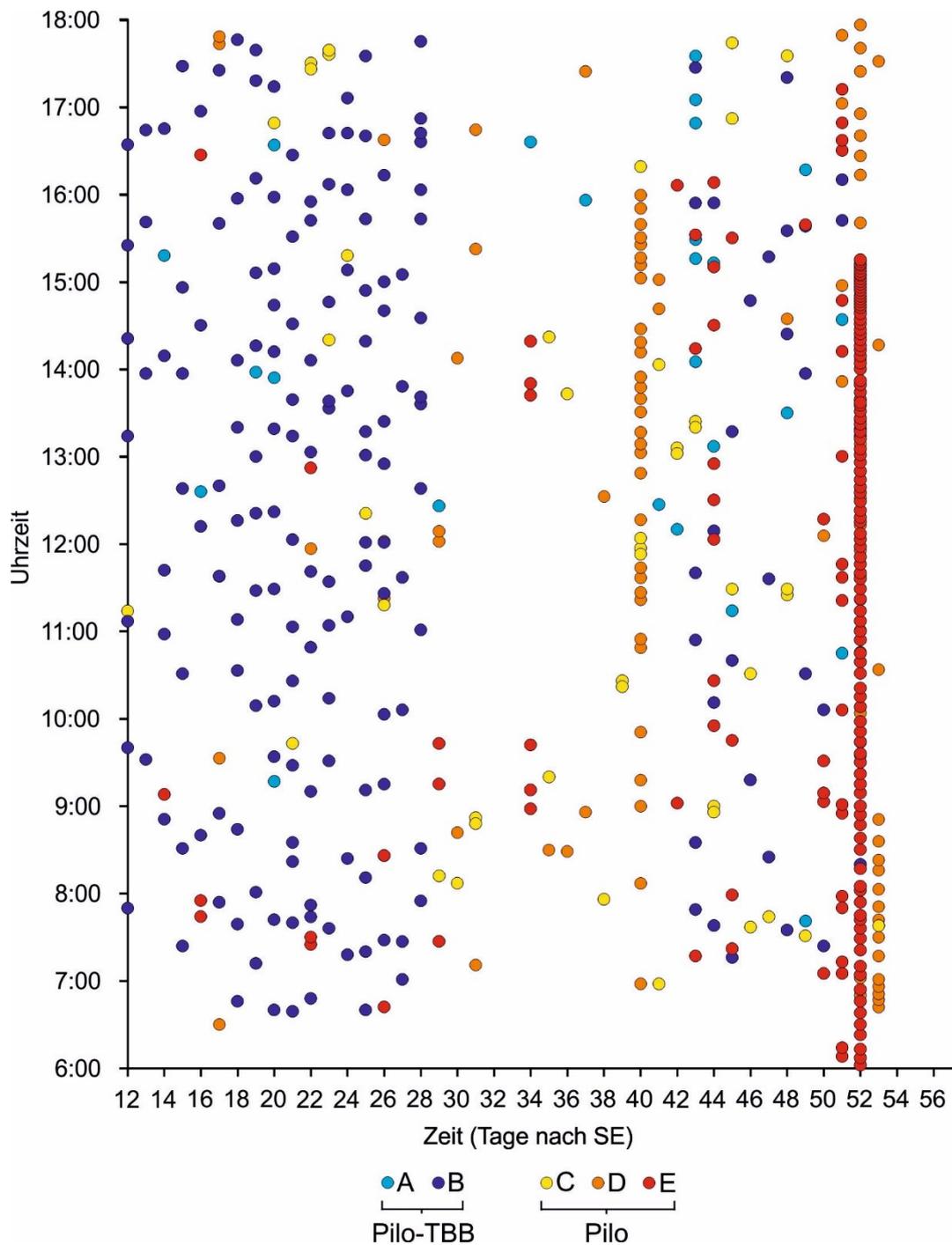


Abbildung 3.2 Unterschiede in der Anfallslast

Darstellung aller motorischen Anfallsereignisse (Stadium 3-5 nach Racine) von 5 Versuchstieren über den beobachteten Zeitraum. **(A-B)** Zu sehen sind aus der Pilocarpin-TBB-Gruppe ein Tier mit durchschnittlicher (A) und mit maximal beobachteter Anfallslast (B). **(C-E)** Aus der Pilocarpin-Gruppe sind ebenfalls ein Tier mit durchschnittlicher (C) und maximaler Anfallslast (D) abgebildet, sowie ein Tier, das am 52. Tag nach SE über 100 motorische Anfälle zeigte, von denen der letzte in einen SE führte, der nach ≈ 50 Minuten spontan sistierte (E). In (D) und (E) sind jeweils Cluster zu sehen.

3.2 Extrazelluläre elektrophysiologische Feldpotenzialmessungen

Für die Versuche wurden 14 Wistarratten verwendet. Die aus ihnen gewonnenen Hirnschnitte unterteilten sich wie folgt in die vier Versuchsgruppen: Kontrolle (n=15), Kontrolle/TBB (n=21), Pilocarpin (n=17), Pilocarpin/TBB (n=15). Die Ratten waren zum Messzeitpunkt zwischen 68 und 84 Tage alt. Die gesamte Messreihe wurde en-bloc durchgeführt.

Aus dem Messprotokoll der extrazellulären Feldpotenzialmessungen ließen sich verschiedene Daten erheben. Zu Beginn der Messungen wurden so wie im Protokoll beschrieben (s. Kapitel: 2.2.5) die halbmaximalen Stimulationsstärken bestimmt. Diese betragen für die Kontrollgruppe $6,3 \pm 0,8$ nA, für die Kontrolle/TBB-Gruppe $5,5 \pm 0,6$ nA, für die Pilocarpin-Gruppe $6,9 \pm 0,5$ nA und für die TBB-behandelten Pilocarpin-Tiere $7,1 \pm 0,6$ nA.

Der erste Punkt des Messprotokolls ermöglichte außerdem die Analyse der Reizantwort, bezogen auf die Amplitude und ihre Anstiegssteigung, auf stetig in ihrer Intensität steigende Stimulationspulse. Daraus ließ sich für jeden Einzelpuls innerhalb der Doppelpulse eine so genannte Input-Output-Kurve erstellen. Zusätzlich dazu konnte das Verhältnis des zweiten Pulses zum ersten Puls innerhalb des Doppelpulses ermittelt werden (Paired pulsed ratio).

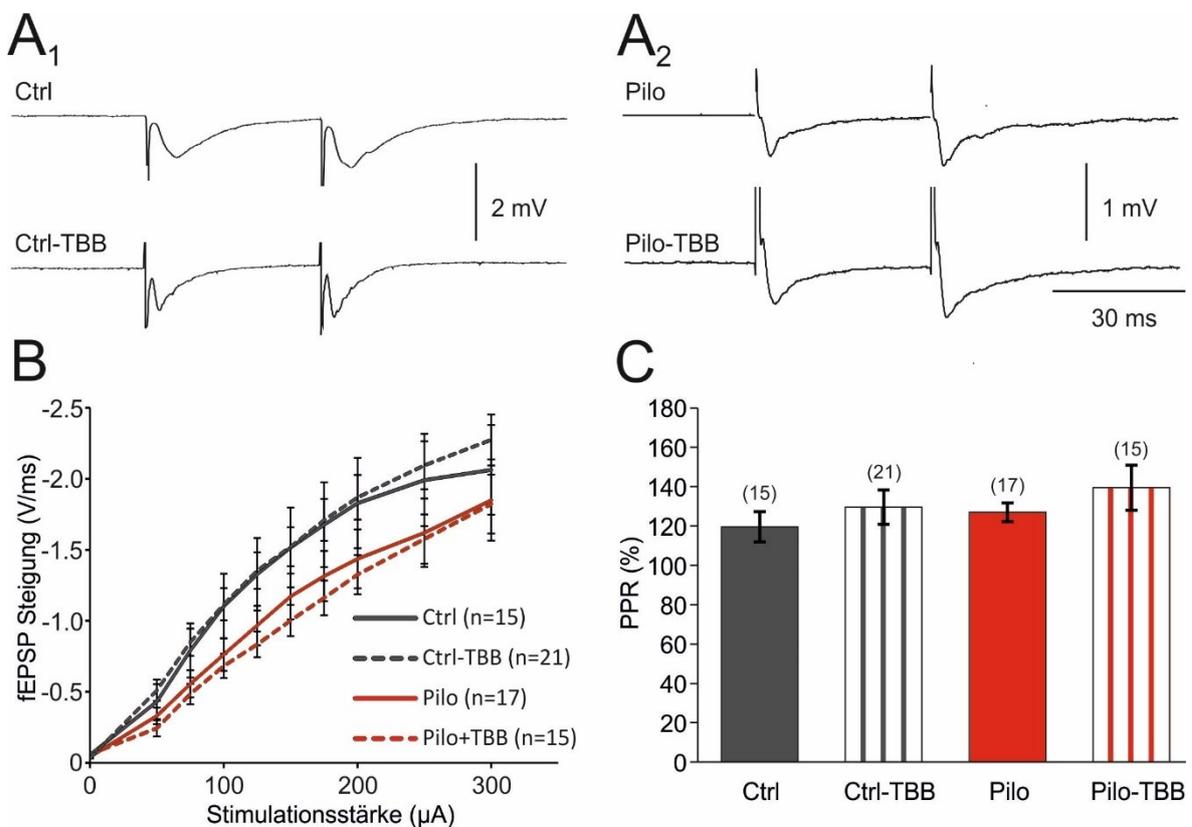


Abbildung 3.3 Reizantwort auf die steigende Stimulation der Schaffer-Kollateralen

(A) Beispielmessungen des postsynaptischen Feldpotenzials (fEPSP), abgeleitet im CA1-Stratum radiatum nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen. **(B)** Input-Output-Kurven aller vier Gruppen

ohne signifikante Gruppenunterschiede. **(C)** Das Verhältnis vom zweiten zum ersten Puls (Paired-Puls-Ratio, PPR) war bei allen vier Versuchsgruppen ähnlich.

Aus der Veränderung der Werte von Schritt 4 im Vergleich zu Schritt 2 des Messprotokolls ließ sich das Verhalten der über Synapsen verbundenen Neuronen bei intermittierender Stimulation mit hoher Frequenz ableiten. Aufgezeichnet wurden die Feldpotenziale, ausgelöst durch die vorherige Stimulation der Schaffer-Kollateralen. Der dazwischen liegende Schritt 3 diente der Aufzeichnung einer möglichen Veränderung der Plastizität im Bereich der Synapsen der CA1-Region. Die Stimulationsstärke entsprach den in Schritt 1 ermittelten halbmaximalen Simulationsstärken.

In den folgenden Abbildungen ist das Steigungs-Niveau der beiden fEPSP im Verlauf über zweimal 6 Minuten dargestellt. Man erkennt, dass TBB im Vergleich zum unwirksamen DMSO keinen Einfluss auf Amplitude und Steigung hatte ($p > 0,05$), jedoch die chronische Epilepsie in der CA1-Region signifikant niedrigere Amplituden und Steigungen bewirkte, als es im gesunden Gewebe zu beobachten war ($p < 0,005$).

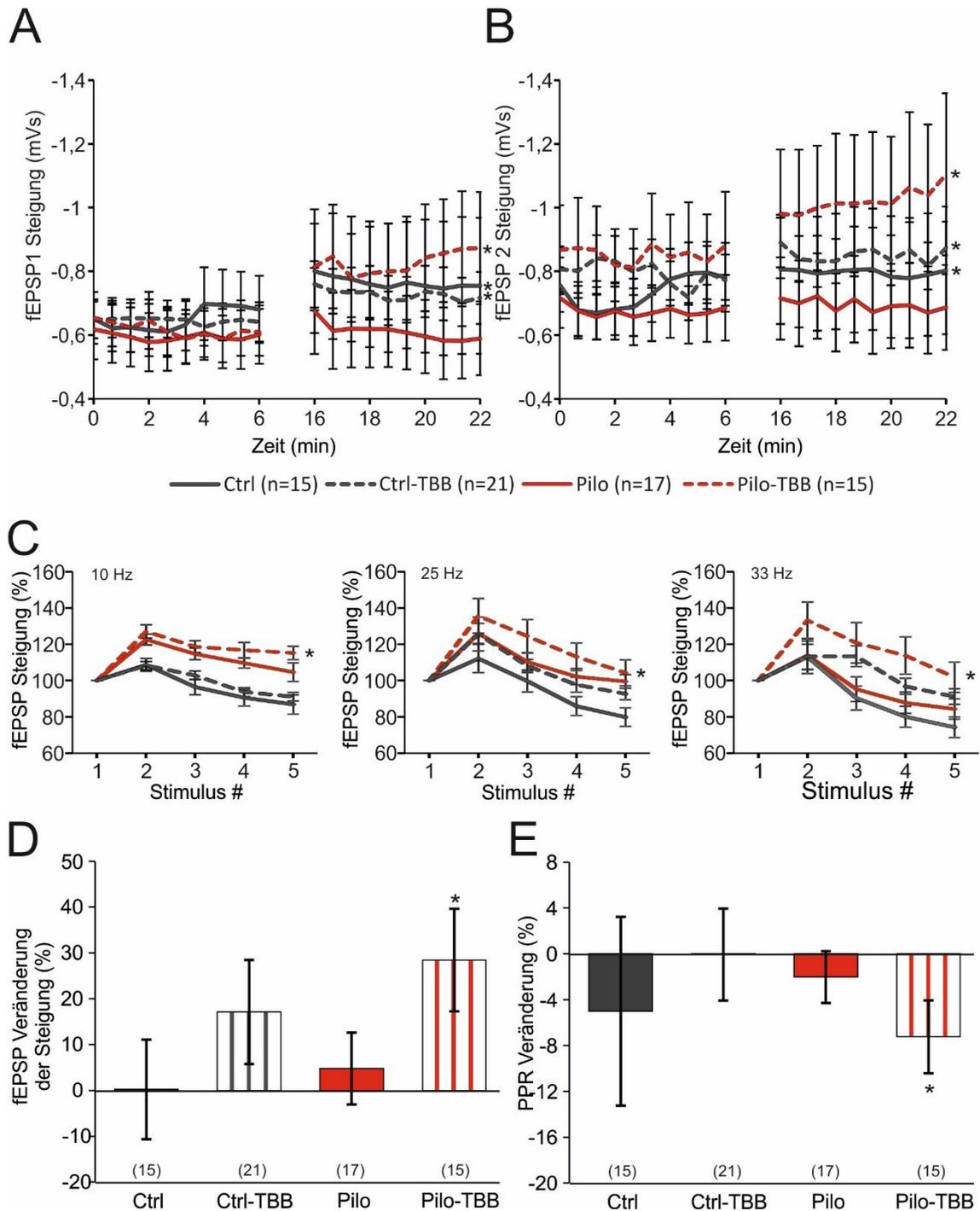


Abbildung 3.4 Veränderung der Plastizität durch Kurzzeitpotenzierung

(A-E) Anstiegssteigung von fEPSP 1 (A) und fEPSP2 (B) vor (Minute 0 - 6) und nach (Minute 16 – 22) der Reizung mit 5 Stimuli unterschiedlicher Frequenz. (D) Kurzzeitplastizität während 5 Stimuli bei Frequenzen von 10 Hz, 25 Hz und 33 Hz zwischen Minute 6 und 16 (A,B) und daraus resultierende nachfolgende Änderungen der fEPSP-Steigung (D) und des PPR (E) nach diesem Kurzzeitplastizitätsparadigma. Nur Hirnschnitte aus der mit TBB vorbehandelten epileptischen Gruppe zeigten eine signifikant erleichterte Plastizität.

3.3 Intrazelluläre elektrophysiologische Messungen in reinem ACSF

3.3.1 Intrinsische Parameter

Für die Versuchsreihe ohne den HCN-Kanalblocker ZD7288 wurden insgesamt 28 Wistar-Ratten verwendet, von denen 8 wegen technischer Probleme oder irregulärer Bedingungen bei der Präparation oder der Messung von der weiteren Versuchsdurchführung ausgeschlossen wurden. 16 Tiere erfüllten die Einschlusskriterien (s. Kapitel 2.2.6). Aus diesen konnten 39 verwertbare Zellen gewonnen werden, die sich wie folgt auf die vier Gruppen aufteilten: Kontrolle (n=9), Kontrolle/TBB (n=10), Pilocarpin (n=10) und Pilocarpin/TBB (n=10).

Zum Zeitpunkt der Messungen war ein Teil der Tiere, dessen Zellen ohne Einfluss von ZD7288 gemessen wurde 36 - 47 Tage alt, der Rest wurde nach 107 - 115 Tagen gemessen. Diese beiden Kohorten beinhalteten zu gleichen Teilen alle Versuchsgruppen. Es ließ sich zwischen der frühen und der späten Kohorte innerhalb der Gruppen kein Unterschied messen. Daher wurden sie als eine Kohorte zusammengefasst.

Die folgenden intrinsischen Parameter wurden durch die Strominjektionen von 400 ms Dauer gemessen und sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7 Zusammenfassung der intrinsischen Membraneigenschaften

Zusammenfassung der intrazellulären Parameter. Werte, die in Anwesenheit von ZD7288 gemessen wurden, sind in grauer Schrift geschrieben.

	Kontrolle	Kontrolle-TBB	Epileptisch	Epileptisch-TBB
RMP (mV)	-58,9 ± 1,2 (n=12)	-60,0 ± 1,2 (n=12)	-59,3 ± 2,1 (n=9)	-57,3 ± 2,2 (n=12)
	-69,6 ± 5,5 (n=5) *	-72,1 ± 2,1 (n=5) **	73,9 ± 4,1 (n=6) **	-68,1 ± 5,5 (n=5)
R _m (MΩ)	77,4 ± 9,7 (n=11)	65,3 ± 7,1 (n=10)	58,8 ± 8,0 (n=10)	63,5 ± 5,5 (n=9)
	81,6 ± 10,6 (n=5)	95,7 ± 8,8 (n=5) **	98,5 ± 7,2 (n=6) *	88,3 ± 11,0 (n=6)
τ _m (ms)	8,5 ± 1,0 (n=11)	8,9 ± 0,7 (n=10)	8,9 ± 0,7 (n=10)	8,2 ± 0,6 8 (n=9)
	11,0 ± 2,0 (n=5)	25,1 ± 2,6 (n=5) **	23,2 ± 3,6 (n=6) **	23,5 ± 3,0 (n=6) **

Um die Qualität der gemessenen Zellen zu gewährleisten, wurde zuerst das RMP bestimmt. Dieses lag bei den Kontrolltieren ohne TBB bei - 58,9 ± 1,2 mV (n=12), bei den Kontrolltieren mit TBB bei - 60,0 ± 1,2 mV (n=12), bei den epileptischen Tieren ohne TBB bei - 59,3 ± 2,1 mV (n=9) und bei den epileptischen Tieren mit TBB bei - 57,3 ± 2,2 mV (n=12). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant (p>0,05).

Die Einstellung auf nahezu - 70 mV war notwendig für den Vergleich der unterschiedlichen Zellen. Das durch Haltestrom erzeugte RMP lag bei den Kontrolltieren ohne TBB bei $-70,97 \pm 0,19$ mV, bei den Kontrolltieren mit TBB bei $-70,88 \pm 0,22$ mV, bei den epileptischen Tieren ohne TBB bei $-71,64 \pm 0,47$ mV und bei den epileptischen Tieren mit TBB bei $-70,98 \pm 0,52$ mV.

Der Membranwiderstand (R_m) ist der Kehrwert der Membranleitfähigkeit, die durch die Ausstattung der Membran mit Ionenkanälen und deren Offenwahrscheinlichkeit bestimmt wird. Auch dieser wurde bestimmt. Wie im Ohm'schen Gesetz beschrieben wird, lässt sich der Widerstand über einer Membran an der Spannungsänderung durch eine definierte Stimulationsstärke berechnen. Als Spannungsänderung wurde die Spannung in der zweiten Hälfte der Hyperpolarisationsdauer gemessen. Der Membranwiderstand lag bei den Kontrolltieren ohne TBB bei $77,4 \pm 9,7$ M Ω (n=11), bei den Kontrolltieren mit TBB bei $65,3 \pm 7,1$ M Ω (n=10), bei den epileptischen Tieren ohne TBB bei $58,8 \pm 8,0$ M Ω (n=10) und bei den epileptischen Tieren mit TBB bei $63,5 \pm 5,5$ M Ω (n=9). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant ($p > 0,05$).

Die Membranzeitkonstante τ_m gibt an, wie schnell sich an einer Membran eine Spannung auf- oder abbaut. Als Membranzeitkonstante τ_m wird daher die Zeit angegeben, nach der 63 % der maximalen Spannungsamplitude sich entweder aufgebaut hat oder abgefallen ist. Bestimmt wurde die Membranzeitkonstante durch die im Messprotokoll angegebenen anfänglichen Hyperpolarisationsströme von -1 nA bis -0.1 nA mit dem resultierenden Abfall der Spannung. Die Zeitkonstante lag für die Kontrolle ohne TBB bei $8,5 \pm 1,0$ ms (n=11), für die Kontrolltiere mit TBB bei $8,9 \pm 0,7$ ms (n=10), für die epileptischen Tiere ohne TBB bei $8,9 \pm 0,7$ ms (n=10) und für die epileptischen Tiere mit TBB bei $8,2 \pm 0,6$ ms (n=9). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

3.3.2 Voltage sag und AHP

Bei der Auswertung der intrazellulär gemessenen Spuren (s. Abbildung 3.5 A) konnte nach Depolarisation ein signifikant niedrigeres AHP in den Pilocarpin-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen beobachtet werden.

Aus der Arbeit von H. Brehme ging hervor, dass TBB einen messbaren Einfluss auf das AHP ausübt (Brehme et al. 2014). Daher wurde zuerst die Amplitude des AHPs nach Ende der prolongierten Strominjektionen gemessen. Je stärker die vorherige Depolarisation war, desto größer wurde auch die Amplitude des folgenden AHP. Wie in Abbildung 3.5 B zu erkennen ist, wiesen die Zellen von nicht epileptischem Gewebe ein signifikant größeres AHP auf als das von chronischer Epilepsie betroffenes Gewebe ($p < 0,05$). Innerhalb der Epilepsiegruppen und der Kontrollgruppen ließ sich kein signifikanter Effekt von TBB auf das AHP nachweisen ($p > 0,05$).

Anschließend wurde die Zeitkonstante der Rückbildung des AHP (τ_{AHP}) ermittelt. Diese lag bei Kontrollen ohne TBB bei $21,6 \pm 3,6$ ms ($n=11$), für die Kontrolltiere mit TBB bei $19,2 \pm 4,0$ ms ($n=10$), für die epileptischen Tiere ohne TBB bei $16,9 \pm 2,9$ ms ($n=10$) und für die epileptischen Tiere mit TBB bei $19,3 \pm 3,0$ ms ($n=9$). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse ($p>0,05$).

In der weiteren Beobachtung der Potenzialverschiebungen als Folge der hyperpolarisierenden Ströme fiel auf, dass es in den beiden Gruppen, die mit TBB vorbehandelt wurden, es nach der initialen Hyperpolarisation zu einer stärkeren Depolarisation kam als in den Gruppen Kontrolle und Pilocarpin (s. Abbildung 3.5 B). Dieses Phänomen wird auch als Voltage sag (Beispiel s. Abbildung 3.7) bezeichnet, welches unter anderem durch HCN-Kanäle vermittelt bei der Hyperpolarisation nach dem Abfall der Spannung zu einer leichten Depolarisation führen soll (Berger et al. 2001). Die Berechnung wurde als Differenz des lokalen Minimums zum Steady state-Membranpotenzial in der Hyperpolarisation ermittelt (s. Abbildung 3.5 A). Bei der Auswertung der Membranzeitkonstanten fiel auf, dass sich der Voltage sag abhängig von der applizierten Stimulationsstärke bei den mit TBB behandelten Versuchsgruppen stärker ausbildete als bei den DMSO-behandelten Tieren. In Abbildung 3.5 B ist dargestellt, wie sich der Voltage sag bei den Kontrollen und den epileptischen Tieren durch den Einfluss von TBB verändert.

Eine Möglichkeit für diese verstärkte Gegenregulation der Hyperpolarisation ist eine mögliche TBB-bedingte Beeinflussung von HCN-Kanälen, für die diese Funktion typisch ist. Aus diesem Grund wurden alle intrazellulären Messungen nochmal mit der zusätzlichen Blockade der HCN-Kanäle durch den selektiven Kanalinhibitor ZD7288 wiederholt.

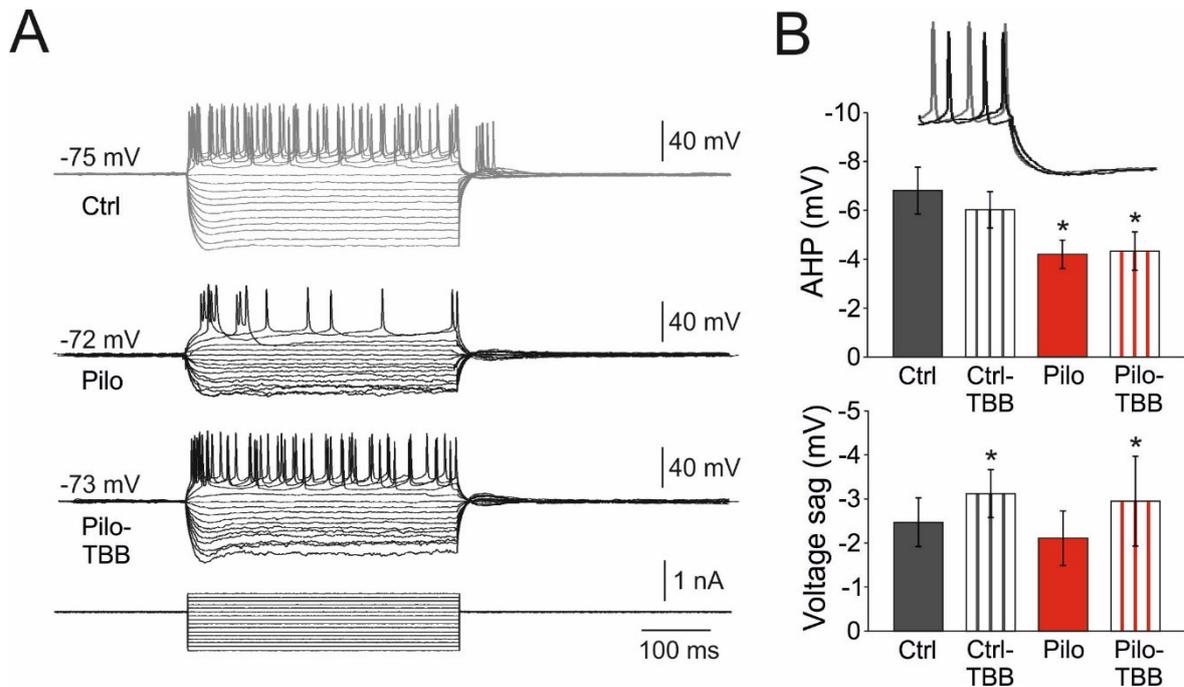


Abbildung 3.5 Voltage sag und Afterhypopolarisation potenzial

(A) Beispielmessungen des Membranpotenzials nach hyperpolarisierenden und depolarisierenden Strominjektionen in intrazellulären Aufzeichnungen von CA1-Neuronen (von oben nach unten: Kontrolle, Pilocarpin, Pilocarpin-TBB, Strominjektion). **(B)** Balkendiagramme der AHP-Amplitude und des Spannungsabfalls, die aus den in Tafel A gezeigten Aufzeichnungen erhalten wurden. Der AHP war in epileptischen Geweben ungeachtet der Behandlung mit TBB signifikant kleiner ($p < 0,05$, 2WayAnova, Tukey post-hoc). Im Gegensatz dazu war der Spannungsabfall in TBB-vorbehandeltem Gewebe sowohl von Kontrolltieren als auch von epileptischen Tieren erhöht ($p < 0,05$, 3WayAnova, Holm Sidak).

3.3.3 Beurteilung der AP-Frequenz

Es ist bereits bekannt, dass eine Funktion von $K_{Ca2.2}$ die Unterbrechung beziehungsweise Frequenzmodulation von AP-Serien hoher Frequenz (train of action potentials) ist. Daher wurde die Anzahl der über den Depolarisationszeitraum von 400 ms aufgetretenen Aktionspotenziale bestimmt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p > 0,05$). Die Anzahl der Aktionspotenziale über den Zeitraum von 400 ms lag bei den Kontrollen ohne TBB bei $8,1 \pm 1,9$ ($n=11$), bei den Kontrolltieren mit TBB $7,5 \pm 1,0$ ($n=10$), bei den epileptischen Tieren ohne TBB $7,8 \pm 1,5$ ($n=10$) und bei den epileptischen Tieren mit TBB $11,6 \pm 1,9$ ($n=9$).

Bislang wurde nur untersucht, wie die untersuchten Nervenzellen auf 400 ms lange Strominjektionen reagieren und ob TBB als CK2-Inhibitor oder Pilocarpin als Auslöser einer SE-vermittelten TLE einen Effekt ausüben. Als nächstes wurde untersucht, wie die Zelle auf kurze Stromimpulse unterschiedlicher Dauer (3/5/7 ms) reagiert, die kontinuierlich von 0,5 nA auf 2,4 nA gesteigert wurden.

3.3.4 Burstverhalten bei kurzen Strominjektionen

Die in der englischen Sprache als Burst bezeichnete kurze Serie von dicht aufeinander folgenden Aktionspotenzialen, bei denen nur das erste AP durch einen externen Stimulus ausgelöst wird und die restlichen Aktionspotenziale durch die intrinsische Übererregbarkeit generiert werden, gilt als typisches Zeichen epileptischer Nervenzellen (Chen et al. 2011). Beurteilt wurde dafür das Verhalten der Nervenzellen bei erstmaligem Überschreiten des Schwellenpotenzials. Kam es bei diesem zu einem Burstverhalten, wurde die Zelle als so genannter Low-threshold-Burster (LTB) bezeichnet (s. Abbildung 3.6 A).

Nach diesen Maßstäben wurden alle gemessenen Zellen als Burster oder Non-Burster klassifiziert. Bewertet wurde jeweils die Reizantwort auf die 3 ms andauernden Stromimpulse. Als einzige Gruppe wies die nicht mit TBB vorbehandelte epileptische Tiergruppe einen signifikanten Anteil an Zellen auf, die als Burster klassifiziert wurden (s. Abbildung 3.6 B).

3.3.5 Mögliche Beeinflussung des ADP durch SE oder TBB

Storm et al. beschrieben innerhalb der Charakterisierung der Ströme des AHP nicht nur die drei hyperpolarisierenden Ströme I_{fAHP} , I_{mAHP} und I_{sAHP} , sondern auch eine depolarisierende Komponente (Afterdepolarization potential, ADP) (Storm 1987). Durch die intrazelluläre Potenzialmessung lassen sich jedoch nicht die einzelnen Stromkomponenten unterscheiden. Bei der Messung der Potenzialverschiebungen als Reaktion auf die kurzen Stromimpulse von 3-7 ms Dauer, kam es zu Ausbildung von ADPs, die besonders deutlich in der epileptischen Versuchsgruppe ohne TBB-Behandlung ausgeprägt war. Während die ADPs der anderen drei Gruppen eher einen monoexponentiellen Spannungsabfall aufwiesen, zeigte diese Gruppe keinen monoexponentiellen Spannungsabfall (s. Abbildung 3.6 C). Um dieses Phänomen objektiv abbilden zu können, erfolgte die Berechnung der Fläche unterhalb der Spannungskurve (Area under the curve = AUC). Um eventuelle Auswirkungen durch noch existente Aktionspotenziale, die die erste reguläre Reizantwort auf den Stromreiz waren, nicht in die Berechnung einfließen lassen, wurde ein Zeitraum von 50 ms nach Ende des Stromimpuls von der Auswertung ausgeschlossen. Im Vergleich zu allen anderen Gruppen wies die nicht mit TBB vorbehandelte epileptische Tiergruppe ein signifikant größeres ADP auf (s. Abbildung 3.6 D).

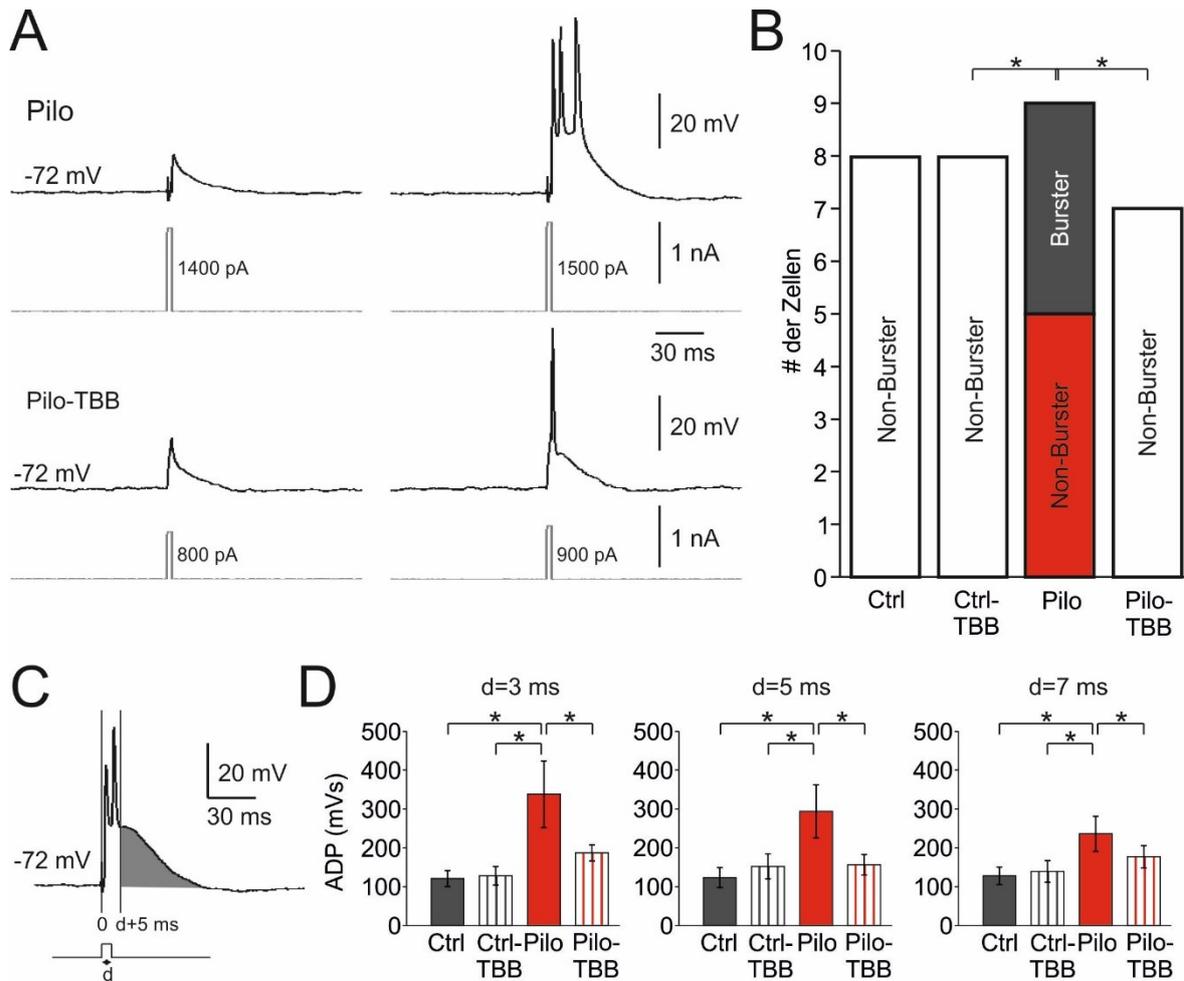


Abbildung 3.6 Burst-Verhalten von Pyramidenzellen in CA1

(A) Beispielmessungen von intrazellulären CA1-Pyramidenzelleitungen einer mit DMSO vorbehandelten epileptischen Ratte (Pilo) und einer mit TBB vorbehandelten epileptischen Ratte (Pilo-TBB). Beachten Sie das Entstehen von 3 Aktionspotenzialen der oberen Ableitung (Pilo) bei erstmaliger Stimulation über dem Schwellenwert (Burst-Verhalten). (B) Anteile von Burster- und Non-Burster-Neuronen in den vier Versuchsgruppen ($p < 0,05$, χ^2 -test). (C-D) Nachdepolarisierungspotenzial (ADP) mit unterschiedlichen Pulsdauern ($d = 3$ ms, 5 ms, 7 ms). Die Fläche unter der Kurve des ADP (beginnend mit $d + 5$ ms, in grau in Feld C angegeben) von Zellen von mit DMSO vorbehandelten epileptischen Tieren (Pilo) war gegenüber dem ADP aller anderen Versuchsgruppen signifikant ($p < 0,05$, 2-Way-ANOVA, Tukey post-hoc).

3.4 Intrazelluläre elektrophysiologische Messungen in ACSF, inkubiert mit ZD7288

3.4.1 Wirksamkeit von ZD7288

Der durch TBB-Vorbehandlung vergrößerte Voltage sag deutete auf eine Mitbeeinflussung von HCN-Kanälen hin (Berger et al. 2001). Um diese nachzuweisen, wurden die intrazellulären Versuche mit einer neuen Versuchsgruppe erneut durchgeführt. Die ursprünglichen Messparameter blieben gleich, bis auf die zusätzliche Inhibition der HCN-Kanäle durch N-ethyl-1,6-dihydro-1,2-dimethyl-6-methylamino-N-phenyl-4-pyrimidinohydrochlorid (ZD7288). Für die Auswirkung des HCN-Kanalblockers ZD7288 wurden die intrazellulären Messungen mit dem gleichen Messprotokoll an neuen Tieren wiederholt. Die 12 Tiere, die für die ZD7288-Versuchsreihe genutzt wurden, waren zum Zeitpunkt der Versuche 48 - 56 Tage alt. Die gemessenen Zellen teilten sich wie folgt auf die vier Versuchsgruppen: Kontrolle (n=5), Kontrolle-TBB (n=5), Pilocarpin (n=6) und Pilocarpin-TBB (n=6).

Um die Wirksamkeit des benutzten ZD7288 (20 mmol/l) zu zeigen, wurde eine Zelle der Kontrollgruppe zuerst ohne ZD7288 gemessen, wobei das Messprotokoll mit den prolongierten Strominjektionen sowohl bei unbeeinflusstem RMP als auch bei auf - 70 mV eingestelltem RMP zur Anwendung kam (s. Abbildung 3.7). Die Zelle wies ohne ZD7288 ein natives RMP vom - 59,7 mV, nach Einstellung auf - 70 mV RMP einen Membranwiderstand von 51,5 M Ω und eine Membranzeitkonstante τ_m von 14,6 ms auf. Nach Wiederherstellung des nativen RMP durch Beendigung der Spannungsklemme (Voltage clamp) und der Hinzufügung von ZD7288 in die Perfusionslösung (ACSF) kam es nach ca. 30 min zu einem Abfall des RMP auf - 75,6 mV. Nach erneuter Messung bei RMP ohne Haltestrom und folgender Einstellung auf - 70 mV RMP betrug der neue Membranwiderstand 57,4 m Ω und die Membranzeitkonstante τ_{ZD7288} 17,3 ms. Der im nativen Zustand erkennbare Voltage sag war bei Inhibition durch ZD7288 nicht mehr vorhanden. Die gemessenen Werte (verstärktes hyperpolarisiertes RMP, größerer Membranwiderstand und längerer Membranzeitkonstante) entsprachen der Wirkungsweise bei Hemmung der HCN-Kanäle, wodurch der Nachweis der Wirkung von ZD7288 erbracht wurde.



Abbildung 3.7 Veränderung der Hyperpolarisation durch HCN-Blockade

Dargestellt sind die Spuren der gleichen Zelle einmal zuerst ohne HCN-Inhibition (grau) und danach mit HCN-Inhibition (schwarz). Zu sehen ist, dass der Voltage sag unter ZD7288-Einfluss nicht mehr zu beobachten ist.

Durch den Einfluss von ZD7288 lag das RMP bei den mit dem HCN-Kanalblocker behandelten Zellen der Kontrolltiere ohne TBB bei $-69,6 \pm 5,5$ mV, bei den Kontrolltieren mit TBB bei $-72,1 \pm 2,1$ mV, bei den epileptischen Tieren ohne TBB bei $-73,9 \pm 4,2$ mV und bei den epileptischen Tieren mit TBB bei $-68,1 \pm 5,5$ mV. Zwischen den 4 Gruppen der ZD7288-Kohorte gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

3.4.2 Intrinsische Parameter unter HCN-Kanalblockade

Wie auch bei der Messung des intrinsischen RMPs aller Zellen wurde auch bei der ZD7288-Kohorte die Einstellung auf ein RMP von -70 mV vorgenommen und überprüft. Dieses lag bei den Kontrolltieren ohne TBB bei $-69,6 \pm 5,5$ mV, bei den Kontrolltieren mit TBB bei $-72,1 \pm 2,1$ mV, bei den epileptischen Tieren ohne TBB bei $-73,9 \pm 4,1$ mV und bei den epileptischen Tieren mit TBB bei $-68,1 \pm 5,5$ mV. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant ($p > 0,05$).

Betrachtet man die Veränderungen zwischen den 4 Gruppen und ihren Pendanten in der Versuchsreihe ohne ZD7288-Gabe, so kam es durchschnittlich in der Kontrollgruppe ohne TBB zu einem Abfall des RMPs von etwa 11 mV, in der Kontrollgruppe mit TBB zu einem Abfall von etwa 13 mV, bei den epileptischen Tieren ohne TBB-Vorbehandlung zu einem Abfall von etwa 14,38 mV und in der Gruppe mit den TBB vorbehandelten epileptischen Tieren zu einem Abfall von etwa 8 mV.

Als nächstes wurde wie in der Versuchsreihe ohne ZD7288 nach der Einstellung jeder Zelle auf nahezu -70 mV das durch den Haltestrom erzeugte RMP erneut gemessen. Dieses lag bei den Kontrolltieren ohne TBB bei $-71,0 \pm 0,2$ mV, bei den Kontrolltieren mit TBB bei $-70,9 \pm 0,2$ mV, bei den epileptischen Tieren ohne TBB bei $-71,6 \pm 0,5$ mV und bei den epileptischen Tieren mit TBB bei $-71,0 \pm 0,5$ mV. Die Einstellung auf nahezu -70 mV war notwendig, um die unterschiedlichen Zellen miteinander vergleichen zu können.

Der Membranwiderstand lag bei den Kontrolltieren ohne TBB bei $81,6 \pm 10,6 \text{ M}\Omega$, bei den Kontrolltieren mit TBB bei $95,7 \pm 8,8 \text{ M}\Omega$, bei den epileptischen Tieren ohne TBB bei $98,5 \pm 7,2 \text{ M}\Omega$ und bei den epileptischen Tieren mit TBB bei $88,3 \pm 11,0 \text{ M}\Omega$. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant ($p > 0,05$).

Vergleicht man nun die Membranwiderstände zwischen einer Gruppe ohne HCN-Inhibition und der äquivalenten Gruppe mit Inhibition, so beträgt der durchschnittliche Unterschied bei den Kontrollen etwa $2 \text{ M}\Omega$, bei den mit TBB vorbehandelten Kontrollen etwa $30 \text{ M}\Omega$, bei den epileptischen Tieren ohne TBB-Vorbehandlung etwa $40 \text{ M}\Omega$ und bei denen mit TBB-Vorbehandlung etwa $25 \text{ M}\Omega$.

Die Zeitkonstante τ_m lag für die Kontrolltiere ohne TBB bei $11,0 \pm 2,0 \text{ ms}$, für die Kontrolltiere mit TBB bei $25,1 \pm 2,6 \text{ ms}$, für die epileptischen Tiere ohne TBB bei $23,2 \pm 3,6 \text{ ms}$ und für die epileptischen Tiere mit TBB bei $23,5 \pm 3,0 \text{ ms}$. Während bei den epileptischen Tieren durch das applizierte TBB kein Effekt nachgewiesen werden konnte ($p = 0,967$), war der Unterschied bei den Kontrolltieren durch den Einfluss von TBB signifikant ($p < 0,01$, 2WayANOVA mit Holm-Sidak). Genauso war der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ohne Vorbehandlung mit TBB signifikant ($p < 0,05$, 2WayANOVA mit Holm-Sidak).

Ausgehend von den Versuchsgruppen ohne HCN-Inhibition konnte eine durchschnittliche Verlängerung von τ_m gemessen werden, die innerhalb der TBB-negativen Kontrollen bei 3 ms , bei den TBB-positiven Kontrollen bei etwa 16 ms , bei den TBB-negativen Epilepsietieren bei etwa 14 ms und bei den TBB-positiven Epilepsietieren bei etwa 15 ms lag (s. Tabelle 7).

Durch die von der Inhibition der HCN-Kanäle veränderte Kinetik der Ionenströme ließ sich kein Voltage sag mehr nachweisen. Aufgrund des fehlenden lokalen Minimums während der Einstellung des „Steady State“-Potenzial können dazu auch keine Messwerte angegeben werden.

3.4.3 Burster versus Non-Burster

Ohne Inhibition der HCN-Kanäle konnte nur in der Pilocarpin-Gruppe ein signifikanter Anteil an Zellen identifiziert werden, die Burster waren. Unter dem Einfluss von ZD7288 konnte auch in der Kontrollgruppe eine Zelle mit Burstverhalten beobachtet werden. Darüber hinaus konnte kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den epileptischen Zellen und den anderen Gruppen beobachtet werden (s. Abbildung 3.8 A)

3.4.4 Veränderung des AHP durch HCN-Inhibition

Während die $K_{Ca2.2}$ -Kanäle nicht spannungsabhängig, sondern vielmehr aktivitätsabhängig sind, verändert sich bei einer Potenzialverschiebung auch die Öffnungswahrscheinlichkeit der HCN-Subtypen. Aus diesem Grund wurde erneut die AHP-Amplitude unter HCN-Inhibition analysiert. Im

Versuchsaufbau ohne ZD7288-Einfluss konnte eine signifikante Verkleinerung ($p < 0,05$) in der Amplitude der epileptischen CA1-Pyramidenzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen der gleichen Region beobachtet werden. Dabei war es egal, ob die Tiere vorher mit TBB behandelt wurden, oder nicht. Dieser Unterschied war unter HCN-Inhibition nur bei TBB-Vorbehandlung zwischen den epileptischen Ratten und den Kontrolltieren signifikant (Control-TBB vs. Pilo-TBB: $-10,33 \pm 1,70$ mV vs. $-5,75 \pm 1,49$ mV; $p < 0,05$, Holm Sidak). Während TBB bei den epileptischen Tieren mit HCN-Inhibition erneut keinen Einfluss ausübte, konnte zwischen den beiden Versuchsgruppen, die keinen SE durchlaufen hatten, eine signifikante Vergrößerung der AHP-Amplitude durch TBB beobachtet werden (Control vs. Control-TBB: $-5,80 \pm 0,97$ mV vs. $-10,33 \pm 1,70$ mV; $p < 0,05$, Holm Sidak). Das AHP der epileptischen Tiere ohne TBB betrug $-3,44 \pm 0,59$ mV und unterschied sich nicht signifikant von den anderen Gruppen ($p > 0,05$) (s. Abbildung 3.8 C).

3.4.5 Beurteilung der AP-Frequenz

Bei der Analyse der Anzahl aller ausgelösten Aktionspotenziale während der 400 ms Depolarisation zeigte sich (siehe Abbildung 3.8 D) ein signifikanter Effekt durch die TBB-Behandlung ($p < 0,05$; Tukey post-hoc).

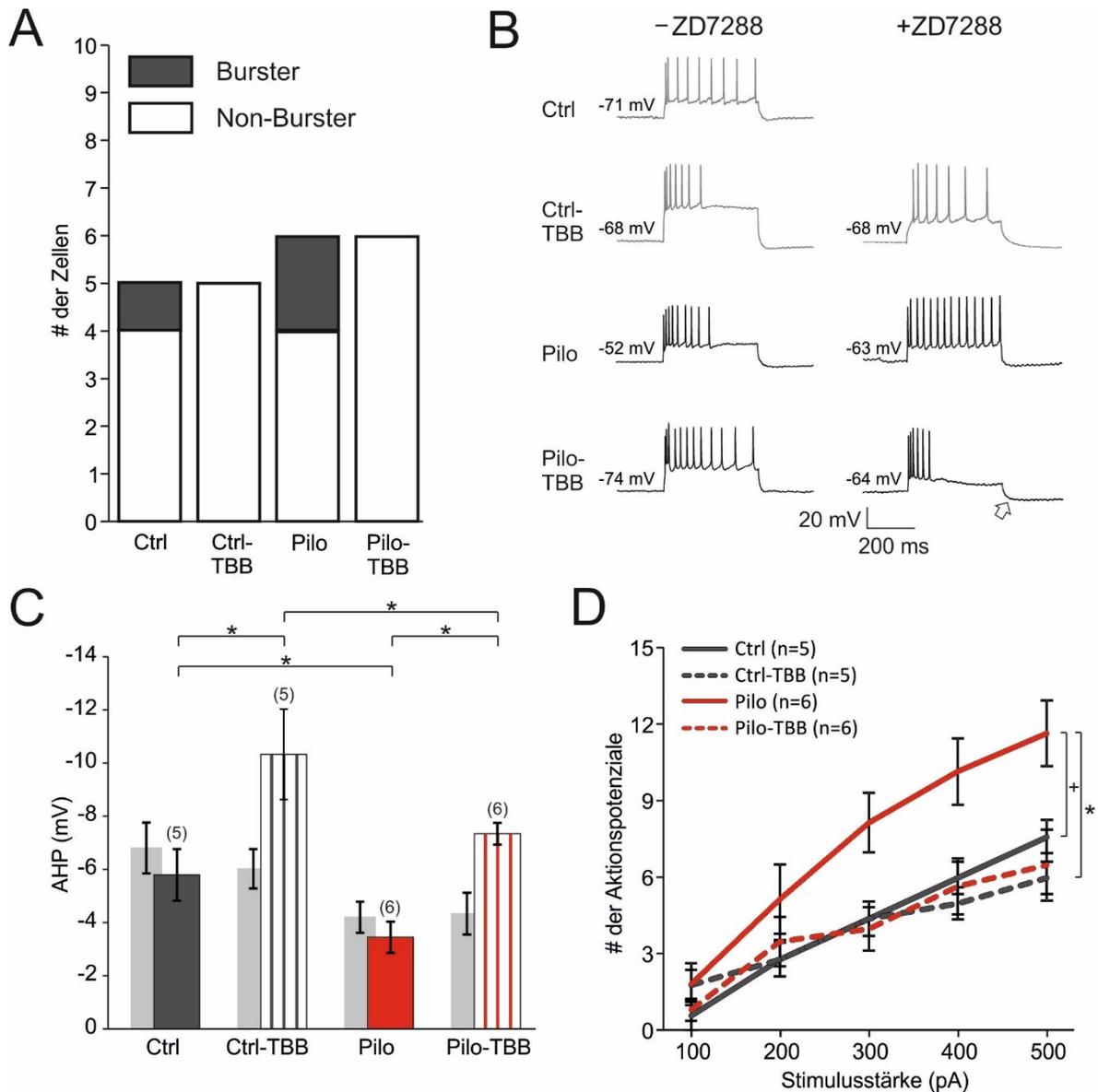


Abbildung 3.8 Inhibition von CK2 vergrößert das AHP und senkt die Erregbarkeit unter HCN-Kanalblockade

(A) Anteile von Burster- und Non-Burster-Neuronen in den vier Versuchsgruppen in Gegenwart des HCN-Kanalblockers ZD7288. **(B)** Beispielmessungen von intrazellulären Aufzeichnungen nach längerer Depolarisation (400 ms), die für die AHP-Amplitude (z. B. siehe schwarzer Pfeil) und die Anzahl der Aktionspotentiale verwendet wurden. Zum Vergleich wurden auch Probenspuren in Abwesenheit von ZD7288 angegeben (linke Seite). **(C)** Balkendiagramm der AHP-Amplitude zeigt ein signifikant erhöhtes AHP in Zellen von TBB-vorbehandelten epileptischen Ratten (weiß-rotes Balkendiagramm). Der Klarheit halber ist auch das AHP in Abwesenheit von ZD7288 (graue Balkendiagramme, Werte aus Abbildung) gezeigt. Signifikante Effekte wurden zwischen Tiergruppen (Ctrl versus Pilo) und Behandlungsgruppen (DMSO versus TBB) nachgewiesen (2WayANOVA, Tukey post-hoc). **(D)** Anzahl der Aktionspotentiale während 400 ms Depolarisation (von 100 bis 500 pA). Ebenso zeigte sich ein Trendeffekt zwischen den Tiergruppen (Ctrl versus Pilo, $p=0,08$) und einen signifikanten Effekt zwischen den Behandlungsgruppen (DMSO versus TBB, $P < 0,05$, 2WayANOVA, Tukey post-hoc).

4 Diskussion

4.1 Krankheitsmodifikation durch vorübergehende CK2-Inhibition in vivo

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss des CK2-Inhibitors TBB auf die Entwicklung und Modifikation einer chronischen Epilepsie anhand elektrophysiologischer Untersuchungen und Videomonitoring untersucht.

Aus bislang noch nicht veröffentlichten Vordaten des Oscar-Langendorff-Instituts für Physiologie ging hervor, dass es nach vorheriger Gabe von TBB infolge der Induktion des SE mit Pilocarpin später zu generalisierten Anfällen kam als ohne die CK2-Inhibition. Ebenso starben in der TBB-Gruppe vor Eintritt des SE weniger Ratten an epileptischen Anfällen als bei den epileptischen Kontrolltieren. Vermutet wurde ein Effekt von TBB, der die Entstehung von Anfällen bremsen könnte. Diese Theorie wurde durch frühere Untersuchungen gestützt, die aufzeigten, dass es durch TBB bedingt seltener zu den typischen epileptischen Anfallsclustern kam als bei der Kontrollgruppe, in der es in über der Hälfte der Fälle zu diesen Anfallsmustern kam (Bajorat et al. 2011; Bajorat et al. 2016; Bajorat et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des Videomonitorings aufgezeigt werden, dass durch TBB zwar die Anzahl an sichtbaren generalisierten Anfällen nicht beeinflusst werden konnte, jedoch der Progress der Krankheitsentwicklung gemindert wurde. Dieser Effekt von TBB muss während der Entstehung der chronischen Epilepsie eingetreten sein, denn es hatte in einer früheren Arbeit der Projektgruppe keine Auswirkungen mehr auf die TLE der Versuchstiere, wenn es nach Eintreten eines chronischen Stadiums oral verabreicht wurde (Bajorat et al. 2018). In der 2014 publizierten Arbeit von Brehme et al. konnte gezeigt werden, dass TBB darüber hinaus keinen Einfluss in vitro hatte, wenn es während der elektrophysiologischen Messungen dem ACSF hinzugefügt wurde (Brehme et al. 2014).

Weitere Daten von anderen parallel Promovierenden aus EEG-Untersuchungen an Versuchstieren mit abgeschlossener Epileptogenese zeigten einen zirkadianen Effekt von TBB auf die Häufigkeit von Spikes. Diese Daten passten zu Untersuchungen von Tamaru et al., die eine zirkadiane CK2-vermittelte BMAL1 Phosphorylierung am Serin-90 nachweisen konnten. BMAL1 ist ein heterodimeres Protein, das als Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle in der zirkadianen Rhythmik spielt (Tamaru et al. 2015). Dieser zirkadiane Effekt ließ sich aber anhand der Videodaten der vorliegenden Arbeit nicht nachweisen, sodass Anfälle und Spikes in diesem Tiermodell nicht notwendigerweise korrelieren, wie in diesem Tiermodell bereits beobachtet werden konnte (Bajorat et al., 2016).

Western-Blot-Analysen, die ebenfalls im Institut für Physiologie parallel durchgeführt wurden, zeigten eine signifikante Reduktion der Anhäufung von CK2 in epileptischem Gewebe von mit TBB

vorbehandelten Tieren. In Versuchen mit dem Morris-Wasserlabyrinth konnte gezeigt werden, dass dieses Training zu einer signifikanten Reduktion von CK2 in der CA1-Region führte, jedoch nicht im Gyrus dentatus (Chao et al. 2007). Diese Daten implizieren regionsverschiedene Regulationen dieses Enzyms. In einer weiteren Studie, basierend auf Versuchen mit dem Morris-Wasserlabyrinth, wurde eine Langzeitpotenzierung innerhalb der CA1-Region nach dem Training beobachtet (Rehberg et al. 2017), was auf einen Zusammenhang zwischen der CK2-Reduktion und der Ausbildung einer Langzeitpotenzierung hinweisen könnte. Daraus folgt, dass die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse nur für die CA1-Region gelten.

Welche Bedeutung könnte die Senkung der CK2-Konzentration für epileptische Zellen in der CA1-Region haben? Eines der bekanntesten Substrate der CK2 ist Calmodulin (CaM), das von der CK2 phosphoryliert und wiederum von der Proteinphosphatase 2A (PP2A) dephosphoryliert wird (Bildl et al. 2004; Allen et al. 2007). T80D-Calmodulin, das phosphoryliertes CaM imitieren kann, senkt die Calcium-Sensitivität und damit auch die Funktion der K_{Ca2} -Kanäle (Allen et al. 2007). Es ist anzunehmen, dass auch natives CaM diesen Effekt ausübt. Für den Fall der Inhibition von CK2 durch TBB und die damit einhergehende überwiegende Wirkung der PP2A auf Calmodulin und $K_{Ca2.2}$ kommt es zu einer Steigerung der K_{Ca2} -Funktion, ohne dass dafür auf Transkriptions- oder Translationsebene eine Veränderung auftreten muss. In einer anderen Arbeit der Forschungsgruppe wurde eine gesteigerte Transkription von $K_{Ca2.2}$ bei Versuchstieren unter TBB-Einfluss beobachtet, jedoch nicht in der Epilepsiegruppe ohne TBB-Vorbehandlung (Bajorat et al. 2018). Diese Daten lassen vermuten, dass die Entwicklung einer chronischen Epilepsie mit einer verminderten Transkription von $K_{Ca2.2}$ einhergeht, wie es auch Schulz et al. bereits beschrieben haben. Sie konnten aufzeigen, dass sowohl $K_{Ca2.2}$ -mRNA als auch das $K_{Ca2.2}$ -Protein bei epileptischen CA1-Neuronen vermindert waren (Schulz et al. 2012).

Genauso wird dieser Funktionsverlust durch die Internalisierung und den Abbau von $K_{Ca2.2}$ durch Langzeitpotenzierung (Long term potentiation = LTP) an Synapsen zugeschrieben (Lin et al. 2008), wie er auch nach epileptischer Aktivität zu beobachten ist (Kernig et al. 2012; Müller et al. 2018). Müller et al. konnten diesen Funktionsverlust auf einen gesteigerten proteasomalen Abbau von $K_{Ca2.2}$ zurückführen.

Zusammengefasst lässt sich aus der Inhibition von CK2 durch TBB eine bleibende gesteigerte Funktion von $K_{Ca2.2}$ herleiten. Dieser Effekt von TBB kann den Krankheitsverlauf einer chronischen Epilepsie positiv beeinflussen.

4.2 Beeinflussung der synaptischen Erregbarkeit von CA1-Neuronen durch TBB

Wenn TBB also über die CK2-Inhibition und die daraus resultierende gesteigerte Funktion von K_{Ca2} -Kanälen einen Einfluss auf epileptisches Nervengewebe hat, bleibt die Frage, in welchen Bereichen der Nervenzellen diese Prozesse stattfinden. Wie im vorherigen Kapitel (s. Kapitel 4.1) beschrieben, wurde als ein wichtiges Protein, das bei der Entstehung oder Prävention einer chronischen Epilepsie eine Rolle spielt, $K_{Ca2.2}$ identifiziert. Jedoch soll sich dieser Kanal fast ausschließlich an der postsynaptischen Membran befinden (Sailer et al. 2004). Um der Frage nachzugehen, ob TBB einen Einfluss auf die synaptische Erregbarkeit hat, wurden extrazelluläre Feldpotenzialmessungen in der Region CA1 nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen durchgeführt. Aus den gewonnenen Daten wurde ersichtlich, dass durch die Entstehung der Epilepsie die synaptische Übertragung in epileptischem Gewebe signifikant schwächer war als in gesundem Nervengewebe der CA1-Region. In einem Versuch mit der Initialisierung eines SE durch die intraperitoneale Gabe von Pentetrazol (Pentylentetrazol) konnte der gleiche Effekt nachgewiesen werden (Postnikova et al. 2019). Dieser wurde nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen durch extrazelluläre Feldpotenzialableitung über der CA1-Region gemessen. Die Autoren führten diese Veränderung auf eine Abnahme der Freisetzungswahrscheinlichkeit von Glutamat an der präsynaptischen Membran zurück. In ihrem Tierversuchsmodell bildete sich jedoch ein Großteil der veränderten Funktion nach spätestens einem Monat wieder zurück. Es konnten aber immer noch kleinere Amplituden bei der Feldpotenzialmessung wie in der hier vorliegenden Arbeit beobachtet werden (Postnikova et al. 2019).

Bei der basalen Erregbarkeit ließen sich keine Effekte von TBB nachweisen. Diese Daten waren kongruent zu Ergebnissen von Arbeiten, die einen präsynaptischen Effekt von $K_{Ca2.2}$ ausschlossen (Sailer et al. 2004). Jedoch wurde in einer anderen Arbeit ein präsynaptischer Effekt von $K_{Ca2.2}$ auf die Regulation der synaptischen Plastizität beschrieben (Hammond et al. 2006). Als Folge dieser Regulation sollte es laut der Autoren zu einer Hemmung der Langzeitpotenzierung (Long term potentiation= LTP) kommen (Hammond et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde die basale Erregbarkeit innerhalb des Messprotokolls zweimal mit dem Baseline-Protokoll (s. Kapitel 2.2.5) gemessen. Zwischen beiden Protokollen lag eine Zeitspanne von 10 Minuten, in denen Fünffach-Pulse mit verschiedenen Frequenzen in Abständen von jeweils 60 Sekunden appliziert wurden. Hier ließen sich bei den mit TBB vorbehandelten epileptischen Ratten signifikant höhere Amplituden nachweisen, als sie sowohl bei den Kontrollen ohne TBB, als auch bei den epileptischen Tieren ohne TBB zu messen waren. Die Ergebnisse des Vergleichs zwischen den beiden Baseline-Protokollen zeigten eine signifikante Veränderung der basalen Erregbarkeit nach bereits 10 Minuten. Diese Daten deuten auf eine beginnende Langzeitpotenzierung hin. Einhergehend mit dieser Entwicklung

kam es zu einer Reduktion der Paired-Pulsed-Ratio (PPR) durch TBB sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Epilepsietieren. Die PPR gibt das Verhältnis vom zweiten fEPSP zum ersten fEPSP von jedem Doppelpuls an. Auch diese Daten suggerieren einen präsynaptischen Effekt von TBB, der zu bleibenden Veränderungen der synaptischen Netzwerke in der CA1-Region führt.

Was ist also aus diesen Ergebnissen zu schließen? Die Ergebnisse von Hammond et al. (2006) und die gemessene Veränderung der basalen Erregbarkeit nach STP deuten auf präsynaptische Effekte von $K_{Ca2.2}$ -Kanälen hin. Jedoch konnte in der Arbeit von Sailer et al. (2004) mittels Immunhistochemie an Hirngewebe von Mäusen aufgezeigt werden, dass $K_{Ca2.2}$ -Kanäle nur in geringem Umfang präsynaptisch ausgebildet sind. Die hierfür verwendeten Antikörper wurden sowohl in Hirngewebe von Mäusen als auch von Ratten nachgewiesen. Möglicherweise sind die in dieser Arbeit erhobenen Daten aber auch auf noch nicht geklärte Effekte von TBB beziehungsweise der CK2 zurückzuführen. Neben diversen unterschiedlichen Substraten (Meggio & Pinna 2003) phosphoryliert die CK2 das mit der RNA-Polymerase II assoziierte Histon-Chaperon-Protein Spt6 und steigert über diese Verbindung die Transkription verschiedener Proteine (Dronamraju et al. 2018). Daraus ergeben sich unterschiedliche Interaktionen mit TBB und bislang unbekanntem Effekten auf die Neurophysiologie. Diese Problematik bietet Anlass zu weiteren Forschungen.

4.3 Modulation der intrinsischen Erregbarkeit durch CK2-Inhibition

4.3.1 Beeinflussung des AHP

Sofern die Inhibition von CK2 und die damit einhergehende gesteigerte Funktion von $K_{Ca2.2}$ -Kanälen also nicht auf einen präsynaptischen Effekt zurück zu führen ist, muss diese Inhibition die intrinsischen Eigenschaften der Nervenzellen verändern. Bisher gut erforschte Eigenschaften von $K_{Ca2.2}$ -Kanälen von CA1-Neuronen sind die Beteiligung am mAHP und die Frequenz-Adaptation (Bond et al. 2004; Pedarzani et al. 2005; Hammond et al. 2006; Schulz et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Verkleinerung der AHP-Amplitude in epileptischem Hirngewebe gezeigt werden. Diese Daten sind übereinstimmend mit den Ergebnissen von Brehme et al., die ebenfalls eine Verkleinerung der AHP-Amplitude messen konnten. Sie konnten darüber hinaus eine Verkürzung des AHP beobachten (Brehme et al. 2014). Beide Eigenschaften begünstigen durch die schnellere Repolarisation die Entstehung von Übererregbarkeit, die ein typisches Merkmal von chronisch epileptischem Nervengewebe ist. In der Arbeit von Brehme et al. ließen sich zudem die Amplitudenreduktion und Verkürzung des AHP durch TBB aufheben, so dass sich die Werte der Kontrollen ohne TBB-Einfluss nicht signifikant von den Werten der epileptischen Nervenzellen unter TBB-Einfluss unterschieden. Die Daten der hier vorliegenden Studie konnten

diese Aufhebung jedoch nicht zeigen. Dies mag daran liegen, dass es methodische Unterschiede zur Arbeit von Brehme et al. gab, beispielsweise in der Messmethode. Brehme et al. nutzten keine intrazellulären Ableitungen, sondern Ganzzelleitungen mittels Patch-Clamp-Methode. Beide Methoden unterscheiden sich dadurch erheblich in der Zusammensetzung der zytosolischen Ionenkonzentrationen. Für die Interpretation der unterschiedlichen Beobachtungen dürfte jedoch noch wichtiger sein, dass in der Arbeit von Brehme et al. TBB unmittelbar vor den Experimenten verabreicht wurde, während in dieser Arbeit die Versuchstiere vor dem Status epilepticus TBB erhielten. Da in der zitierten Arbeit (Brehme et al.) akut appliziertes TBB keinen Effekt hatte, lässt sich übereinstimmend die Schlussfolgerung ziehen, TBB auf der Transkriptionsebene wirken muss, da TBB auch in der vorliegenden Arbeit zum Zeitpunkt der Messungen bereits aus dem Organismus eliminiert wurde.

4.3.2 Intrinsisches Burstverhalten

Ein wichtiges Merkmal von chronisch epileptischem Gewebe ist das Vorkommen von Neuronen, die ein intrinsisches Burstverhalten zeigen (Beck & Yaari 2008). Durch die intrazellulären Messungen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den epileptischen Tieren ohne TBB und den anderen drei Gruppen aufgezeigt werden. Dieses Burstverhalten könnte im Zusammenhang mit einem stärker ausgeprägten ADP stehen. Dieses war in den durchgeführten Versuchen ebenfalls signifikant größer in der Epilepsiegruppe ohne TBB als in den anderen drei Gruppen. Das gemeinsame Auftreten dieser zwei Eigenschaften von chronisch epileptischen Neuronen wurde bereits mehrfach beschrieben, besonders im Subiculum und der CA1-Region (Magee & Carruth 1999; Su et al. 2001; Yue & Yaari 2004; van Welie et al. 2006; Jarsky et al. 2008). Das ADP wurde als Folge von persistierenden Natriumkanälen und Ni^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -Kanälen, weniger als Folge von Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanälen beschrieben (Magee & Carruth 1999; Su et al. 2001). Su et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass Ni^{2+} das fAHP und das sAHP unterdrückt, jedoch das mAHP durch die Ni^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -Kanäle aufrechterhalten wird. Im Kontrast zu dieser Datenlage stehen jedoch die Ergebnisse von Yue und Yaari, die durch pharmakologische Blockade von KCNQ/M-type Kaliumkanälen das ADP und auch das Burstverhalten in der CA1-Region steigern konnten (Yue & Yaari 2004). Das Verhältnis von Zellen mit LTB-Verhalten (4/9) zu Zellen ohne LTP-Burstverhalten (0/7) in der Epilepsiegruppe ohne TBB-Vorbehandlung entsprach dem Verhältnis, das bereits Chen et al. (2011) beschrieben haben (Chen et al. 2011). Sie untersuchten den Anteil von LTB und High-threshold-Burstern innerhalb einer Population von chronisch epileptischen Tieren und den dazugehörigen Kontrolltieren. Die gewonnenen Daten zeigten ein Maximum ($\approx 93\%$) an Zellen mit Burstverhalten nach einer Woche post-SE. Innerhalb dieser Fraktion mit Burst-

Verhalten lag das Verhältnis von LTB zu HTB bei $\approx 2:1$, welches sich im Verlauf der folgenden 4 Monate umkehrte. Gleichzeitig reduzierte sich der Anteil von Zellen mit intrinsischem Burst-Verhalten, das innerhalb des ersten Monats post-SE zwischen 90 und 100% lag, bis zum vierten Monat post-SE auf unter 60%. Die Autoren deuteten diese Ausprägung des Burstverhaltens als Beleg für die Rolle von CA1-Neuronen, die intrinsische Bursts generieren und dadurch die Entstehung von simultanen Entladungen größerer neuronaler Netzwerke triggern (Chen et al. 2011). Diese Neuronen können so als Initiatoren und Schrittmacher von epileptischen Entladungen dienen (Sanabria et al. 2001). Die Abnahme der Burst-Fraktion nach Chronifizierung innerhalb der Epilepsie-Gruppe, die Chen et al. beschrieben, lässt sich durch die Charakterisierung des intrinsischen Burstverhaltens von CA1-Neuronen bestätigen, die Postnikova et al. durchgeführt haben (Postnikova et al. 2019). In der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass es unter dem Einfluss der TBB-Vorbehandlung zumindest zu einer signifikanten Reduktion epileptischer Zellen mit Burstverhalten kam.

4.3.3 Die Erregungsphysiologie von HCN-Kanälen

Das LTB-Verhalten ist aber nicht alleine auf die im vorherigen Kapitel beschriebenen selektiven Ionenkanäle zurückzuführen. In Neuronen des Thalamus konnte nachgewiesen werden, dass die gesteigerte Funktion von HCN3-Kanälen, die durch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat reguliert wird, das Auftreten von LTBs triggert (Ying et al. 2011). Darüber hinaus beeinflussen HCN-Kanäle auch die Ausbildung des sAHP und über diesen Effekt verstärken sie die Adaptation hoher AP-Frequenzen (Gu et al. 2005; Kaczorowski 2011).

In der hier vorgelegten Arbeit konnte unter Inhibition von HCN-Kanälen ein signifikanter Effekt von TBB auf die Ausprägung des AHP sowie ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Aktionspotenziale pro Stimulation (400 ms) zwischen den epileptischen Zellen und allen drei anderen Versuchsgruppen beobachtet werden. Es konnte jedoch beim Burstverhalten kein Unterschied mehr zwischen den epileptischen Zellen und den anderen drei Versuchsgruppen gezeigt werden, wie es ohne Einfluss der HCN-Inhibition beobachtet werden konnte.

Von den verschiedenen Strömen und den dafür verantwortliche Kanälen, die in der Nähe des Ruhemembranpotenzials aktiviert sind, spielen die durch Hyperpolarisations-aktivierten und durch zyklische Nukleotide gesteuerten nichtselektiven Ionenkanäle (HCN) eine wichtige Rolle (Santoro & Tibbs 1999). Es gibt 4 Isoformen, die als homomere oder heteromere Tetramere in unterschiedlicher Konzentration in verschiedenen Geweben vorkommen (Santoro & Tibbs 1999; Moosmang et al. 1999; He et al. 2014) und darüber altersabhängig variieren (Bender et al. 2001).

Alle 4 Kanäle sind im menschlichen Gehirn zu finden, wobei HCN3 unterrepräsentiert ist und bislang weniger erforscht worden ist. Die Kanäle unterscheiden sich besonders in ihrer Öffnungsgeschwindigkeit. HCN1 aktiviert sich als schnellster und HCN4 als langsamster Kanal (Stieber et al. 2005). Da sie sowohl Kalium- als auch Natriumionen mit einem Selektivitätsverhältnis von 3 zu 1 leiten, liegt das Gleichgewichtspotenzial für diese Kanäle bei etwa -35 mV (Santoro & Tibbs 1999; Stieber et al. 2005). Die Aktivierung im unter-schweligen Membranpotenzialbereich (-80 bis -50 mV) ist dabei abhängig von der Bindung an zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), aber auch von der Bindung an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), durch die sich das zur Öffnung benötigte Membranpotenzial in den positiven Bereich verschiebt. Experimente haben gezeigt, dass durch den verstärkten Abbau von PIP₂ die Frequenz von Schrittmacherzellen im Herz und Gehirn abgenommen hat (Zolles et al. 2006). Lange wurde vermutet, dass der weniger gut erforschte HCN3-Subtyp auch von der Modulation durch cAMP abhängig sei, jedoch konnte nachgewiesen werden, dass dieses nicht der Fall war, obwohl HCN3 die Fähigkeit besitzt, cAMP zu binden (Stieber et al. 2005).

Funktionell haben die durch die HCN-Kanäle generierten Ionenströme (funny currents, I_f) verschiedene Aufgaben. Die Namensgebung dieser Ströme geschah aufgrund ihrer Fähigkeit, sich anders als die bis dahin bekannten spannungsgesteuerten Kanäle, die durch Depolarisation aktiviert werden, erst durch Hyperpolarisation zu aktivieren. Sie depolarisieren und stabilisieren aufgrund ihres Gleichgewichtspotenzials (Santoro & Tibbs 1999) das RMP und tragen durch zirkadiane cAMP-Stimulierung über die Oszillationen des RMPs und der daraus resultierenden veränderten Genexpression zur zirkadianen Rhythmik bei (O'Neill et al. 2008; Atkinson et al. 2011). Darüber hinaus sind sie, je nach dem, in welchen Hirnabschnitten sie exprimiert sind, am episodischen Gedächtnis (Fransén et al. 2004; Nolan et al. 2007), motorischen Lernen und motorischer Gedächtnisbildung (Nolan et al. 2003) sowie räumlicher Vorstellung und prozeduralem Gedächtnis beteiligt (Nolan et al. 2004). Sie scheinen eine Schlüsselfunktion in den Sternzellen der zweiten Schicht des entorhinalen Kortex zu spielen und damit einen Einfluss auf einen großen Teil des Inputs auf den Hippocampus zu haben (Nolan et al. 2007). Innerhalb der CA1-Region des Hippocampus findet man HCN1-Kanäle nur an den Dendriten, wobei mit zunehmender Entfernung vom Zellsoma auch die Dichte der Kanäle im distalen Dendriten zunimmt. Darüber hinaus befinden sich die Kanäle hauptsächlich im dendritischen Schaftbereich und weniger an den dendritischen Spines, was auf eine überwiegende Beeinflussung durch GABAerge Synapsen hindeutet (Lörincz et al. 2002).

Die verschiedenen HCN-Kanäle rücken als Schaltstellen, Modulatoren und Schrittmacher vieler neuronalen Systeme zunehmend auch in den Blickpunkt der Epilepsieforschung. So wurde ein mutationsbedingter Funktionsverlust von HCN1 und HCN2 mit der Entstehung von idiopathischen

generalisierten Epilepsien in Verbindung gebracht (Tang et al. 2008; DiFrancesco et al. 2011). Eine Überfunktion von HCN2 hingegen wurde unter anderem als pathogenetisch wichtiger Faktor bei der Entstehung von genetisch bedingten Fieberkrämpfen vermutet (Dibbens et al. 2010), wobei HCN2 eine pathologische Sensibilität und Reaktion auf hohe Temperaturen entwickelte (Nakamura et al. 2013). Genetisch bedingte generalisierte Epilepsien stehen ebenfalls mit einer HCN2-Überfunktion in Zusammenhang (Li et al. 2018), während bei HCN1 ein Funktionsverlust pathogen wirken könnte (Bonzanni et al. 2018). Bei den HCN4-Kanälen wurde ein Funktionsverlust bei familiären myoklonischen Epilepsien beobachtet (Campostrini et al. 2018).

Mit ZD7288 ist ein selektiver Blocker von HCN1-4 bekannt, der für HCN1 und HCN4 annähernd die gleiche Affinität besitzt, HCN3 etwas schwächer bindet und für HCN2 etwa die doppelte effektive Dosis zur Hemmung benötigt wie für HCN1 (Stieber et al. 2005).

4.3.4 Veränderung der Erregbarkeit durch Beeinflussung der HCN-Kanäle

Ist der krankheitsmodifizierende Effekt von TBB, der bislang nur auf die Beeinflussung von SK2-Kanälen zurückgeführt wurde, eventuell auch auf eine Beeinflussung von Isoformen der HCN-Familie zurückzuführen?

Bei der Analyse der durch die prolongierte Strominjektionen ausgelösten Potenzialveränderungen fiel in den beiden Versuchsgruppen, die mit TBB behandelt wurden, auf, dass es zu einem deutlich stärkeren Voltage sag kam, als in den Gruppen, die nicht unter dem Einfluss von TBB standen. Dieser Voltage sag bezeichnet das lokale Minimum während der Hyperpolarisation, das gleichzeitig auch die negativste Potenzialverschiebung darstellt. Dieses Phänomen wird durch die durch Hyperpolarisation aktivierten HCN-Kanäle ausgelöst, die sich im Vergleich zur Strominjektion leicht verzögert öffnen. Dadurch fällt das Potenzial zuerst auf das lokale Minimum, bevor es leicht ansteigt und sich stabilisiert, solange die Strominjektion konstant bleibt. Um zu überprüfen, ob der gemessene signifikante Unterschied tatsächlich HCN-abhängig war, wurde in einer neuen Versuchsreihe der HCN-Kanalblocker ZD7288 dem ACSF mit hinzugefügt. Alle anderen Parameter der Versuchsdurchführung blieben dabei gleich. Es konnte gezeigt werden, dass der in der ersten Versuchsreihe von TBB ausgelöste Effekt in der Versuchsreihe mit HCN-Inhibition nicht mehr nachweisbar war. Darüber hinaus kam es zu einem Anstieg des Membranwiderstandes und der Membranzeitkonstante τ_m . Der Anteil von Neuronen mit LTB-Verhalten in epileptischer CA1-Region war im Vergleich zu den Neuronen der gleichen Versuchsgruppe ohne HCN-Inhibition reduziert, aber immer noch präsent. Der Unterschied zu den mit TBB-vorbehandelten epileptischen Tieren

war nicht mehr signifikant. Diese Ergebnisse stützen die These, dass sowohl K_{Ca2} als auch HCN-Kanäle das Burstverhalten epileptischer Neuronen in der CA1-Region beeinflussen.

Darüber hinaus konnte im Gegensatz zur gleichen Gruppe ohne die HCN-Inhibition durch ZD7288 in der epileptischen TBB-Versuchsgruppe unter Einfluss von ZD7288 ein deutlich vergrößertes AHP beobachtet werden. Mit HCN-Inhibition wurde ähnliche Werte gemessen, wie in der Kontrollgruppe ohne TBB-Vorbehandlung. Es zeigte sich unter ZD7288-Einfluss sowohl ein das AHP steigernder Effekt von TBB, als auch ein das AHP schwächender Effekt durch die Chronifizierung des epileptischen Gewebes. Interessanterweise entspricht diese Konstellation der vier Versuchsgruppen bei der Ausprägung des AHPs den Beobachtungen, die bereits Brehme et al. ohne HCN-Inhibition machen konnten (Brehme et al. 2014). Sie konnten gesteigerte sAHP-Ströme identifizieren. Die intrazelluläre Ableitung der Potenzialveränderungen ließ keine Differenzierung zu, durch welchen Anteil des AHP (fAHP, mAHP oder sAHP) es zu dieser Veränderung kam, jedoch konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass die HCN-Inhibition durch ZD7288 zu einem Anstieg der Ionenströme führt, die das sAHP bilden (Gu et al. 2005). Problematisch ist jedoch, dass je nach Ort der intrazellulären Ableitung der Besatz der Zellmembran mit HCN-Kanälen stark variiert (Nolan et al. 2004), was zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann.

Eine weitere Beobachtung war, dass es durch die Blockade der HCN-Kanäle in den epileptischen Neuronen zu einer beeinträchtigten Anpassung an hohe AP-Frequenzen kam, während der Einfluss von TBB in der gleichen Gruppe zu einer Frequenzadaptation führte. Wie bereits erwähnt, ist dieses Verhalten eine bekannte Eigenschaft von K_{Ca2} (Bond et al. 2004; Pedarzani et al. 2005; Hammond et al. 2006; Schulz et al. 2012).

Aus der Analyse des Voltage sag geht also hervor, dass TBB einen steigernden Effekt auf die HCN-Funktion ausübt. Die Analyse des AHPs zeigt jedoch, dass TBB die HCN-Funktion hemmt. Wie passen diese Erkenntnisse nun zusammen?

Es gibt 4 unterschiedliche HCN-Isoformen mit unterschiedlicher Kinetik und auch unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen (Stieber et al. 2005). Noch nicht veröffentlichte Daten aus laborinternen Versuchen (PCR, Western-Blot) zeigten, dass es in der epileptischen CA1-Region zu einer gesteigerten Expression von HCN1 und einer verminderten Expression von HCN3 kam. Dieses widerspricht Berichten, die im Pilocarpin-Modell der Ratte eine verminderte Expression von HCN1-Kanälen aufgezeigt haben (Jung et al. 2007; Jung et al. 2010). In einer weiteren Studie konnte dargestellt werden, dass sich die Expression von HCN1-Kanälen während der Epileptogenese stetig verändert. Unmittelbar nach dem SE kam es besonders in der CA1-Region zu einer verstärkten Expression, in den folgenden 2 Wochen fiel die Konzentration jedoch auf Werte unterhalb der

Kontrollgruppe, nur um innerhalb der nächsten 2-3 Monate wieder auf signifikant erhöhte Konzentrationslevel zu steigen (Oh et al. 2012). Die Autoren führten diese Schwankung der HCN1-Expression auf die sich verändernde Erregbarkeit während der Epileptogenese zurück. Dass es während dieser Chronifizierung zu unterschiedlichen Veränderungen der synaptischen und zellulären Eigenschaften kommt, konnten bereits Postnikova et al. bei ihrer Analyse der intrinsischen und extrinsischen Erregbarkeit zeigen (Postnikova et al. 2019). Darüber hinaus konnte eine Hochregulierung von HCN1 auch im epileptischen Gyrus dentatus gezeigt werden (Surges et al. 2012; Bender et al. 2003b). Diese Daten suggerieren, dass die Expression von HCN1 vom Zelltyp und Zeitpunkt der Epileptogenese abhängig sein könnte.

4.3.5 Funktionelles Interaktionspotenzial zwischen K_{Ca2} und HCN

Was also ist die Konsequenz aus diesen Überlegungen? Da die pharmakologische Hemmung der HCN-Kanäle zu einem Anstieg der Ströme führt, die das sAHP bestimmen (Gu et al. 2005), ist es möglich, dass eine Steigerung der HCN-Funktion durch TBB (Verkleinerung des AHP) durch eine TBB-induzierte Steigerung der K_{Ca2} -Funktion (Vergrößerung des sAHP) antagonisiert wird, wie sie Brehme et al. beschrieben haben (Brehme et al. 2014). Auf der einen Seite kann dieser gemessene Effekt abhängig von der Messmethode sein, denn Brehme et al. nutzen andere elektrophysiologische Messmethoden, die an anderen Membranregionen als die intrazellulären Ableitungen. Auf der anderen Seite könnte diese Diskrepanz auch auf daher kommen, dass die durch die CK2-Inhibition ausgelöste gesteigerte Funktion der HCN-Kanäle zeitversetzt eintritt und, wie in einer anderen Quelle beschrieben wurde, aktivitätsabhängig ist (Shin & Chetkovich 2007). Wegen der Vielfalt der Interaktion von HCN-Kanälen und der Caseinkinase 2 sollten diese Zusammenhänge in weiteren Studien weiter erforscht werden.

Das AHP, das in Form des mAHP von der Funktion der SK2-Kanäle mitbestimmt wird, war in Anwesenheit des selektiven HCN-Inhibitors ZD7288 im mit DMSO vorbehandelten epileptischen Gewebe reduziert, konnte jedoch durch TBB gesteigert werden, genauso wie in nicht epileptischem Gewebe. Das ist ein interessantes Ergebnis, denn die Hemmung von HCN-Kanälen verschiebt das Ruhemembranpotenzial hin zu hyperpolarisierten Werten. Als Folge kommt es durch die resultierende Abnahme der elektrischen Kraft zu einer verminderten Funktion von Kaliumkanälen, wie es K_{Ca2} -Kanäle sind. Auf der anderen Seite ist der Membranwiderstand auch abhängig von HCN-Kanälen (Surges et al. 2004), wodurch ZD7288 den Widerstand erhöht. Durch den erhöhten Widerstand verändert sich auch das Gleichgewichtspotenzial für Kalium und damit verstärkt sich die elektrische Triebkraft. Daher könnte die Zunahme des R_m die möglicherweise reduzierten Kaliumströme antagonisieren. Unter diesem Blickpunkt bestätigen die durch intrazelluläre

Messungen erhobenen Daten der hier vorgelegten Arbeit die Ergebnisse, die Brehme et al. mit der Analyse der Ionenströme durch die Patch-Clamp-Methode erzielt haben. Die zweite wichtige Funktion von K_{Ca2} -Kanälen, die Frequenz-Adaptation nach hohen Frequenzen (Pedarzani et al. 2005), war unter HCN-Inhibition in epileptischem Gewebe beeinträchtigt und TBB konnte diese Adaptation wiederherstellen.

4.3.6 Klinische Bedeutung von TBB

In welchem klinischen Zusammenhang könnte die Wirkung von TBB nun eine Rolle spielen?

Aktuell gibt es in der Therapie von Epilepsien keine kausalen Therapiemöglichkeiten. Antiepileptische Therapie bedeutet bislang, dass lediglich das Auftreten von Anfällen im Rahmen einer antikonvulsiven Therapie verhindert beziehungsweise abgeschwächt wird. Für TBB konnte bislang gezeigt werden, dass eine solche Wirkung nach Chronifizierung einer Epilepsie nicht mehr beobachtet werden konnte (Bajorat et al. 2018).

In der Zusammenschau aller in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten kann man sehen, dass es in der CA1-Region von epileptischen Neuronen, die mit TBB vor dem SE behandelt wurden, zu einer signifikant gesteigerten Funktion von K_{Ca2} -Kanälen kommt, wodurch es zu einer positiven Beeinflussung des Krankheitsverlaufs kommt. Dieser Effekt von TBB kann als wichtiger antiepileptischer Mechanismus anzusehen sein, wie er bereits zuvor auch beschrieben wurde (Brehme et al. 2014). Antiepileptogen bedeutet in diesem Zusammenhang, dass das Auftreten, die Schwere und/oder der Verlauf der Erkrankung positiv beeinflusst wird.

Mit der Applikation von TBB und der induzierten Hemmung der Caseinkinase 2 scheint es also einen Mechanismus zu geben, der antiepileptogen wirkt. Die Entwicklung einer Epilepsie wird zwar nicht verhindert, aber doch zumindest abgemildert. Daraus ergeben sich vielfältige Ansatzpunkte für weitere Forschungen, um zum einen die Pathomechanismen der Epilepsie genauer zu untersuchen und zum anderen wirksame Therapien zu entwickeln, um die bislang nicht kurativ therapierbare Erkrankung zu behandeln. TBB selbst ist nicht als Medikament geeignet, da die beeinflusste Caseinkinase 2 zu viele unterschiedliche Substrate hat, wodurch die Auswirkungen der Inhibition bislang nicht absehbar sind.

Daher sollte ein Ziel zukünftiger Forschungen die Entwicklung einer interaktionsarmen Substanz zur Sekundärprophylaxe nach epileptogenen Insult sein.

4.4 Limitationen der Arbeit

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen gibt es verschiedene Einflussfaktoren. Die erste ist die Selektivität von TBB. Durch die bei Proteinkinasen häufig vorkommenden Serin/Threonin-Bindungsdomänen ist eine mögliche Beeinflussung von anderen Substraten von TBB nicht auszuschließen.

Die zweite mögliche Fehlerquelle ist die Fülle von Substraten der CK2. Die für die Erregungsphysiologie des Aktionspotenzials wichtigen Substrate sind Calmodulin und K_{Ca2} , die im Zentrum vieler Forschungen stehen, jedoch ist eine Interaktion mit anderen Substraten nicht auszuschließen.

ZD7288 ist nicht isoform-spezifisch. Selektive Inhibitoren für die Isoformen HCN1-HCN4 sind bislang nicht verfügbar.

Eine Unterteilung nach den HCN-Isoformen oder den Subtypen der K_{Ca2} -Familie durch intrazelluläre Potenzialmessungen ist nicht möglich, da sich keine Membranabschnitte oder sogar einzelne Ionenkanäle wie bei der Patch-Clamp-Methode selektieren lassen. Während bei dieser in der Regel durch die vorherige Isolation von einzelnen Neuronen das Zellsoma mit der Messpipette angesteuert wird, lässt sich bei der intrazellulären Messung die genaue Lage der Messelektrode nicht bestimmen. Nur durch die Analyse der Amplituden der Zellerregung und den Vergleich der Daten mit ähnlichen Messungen in der Fachliteratur lässt sich retrospektiv sagen, ob man die Messelektrode eher im Zellsoma oder dem proximalen Dendriten mit ihrer unterschiedlichen Ionenkanalkonstellationen platziert hat. Dieses Problem kann zu fehlerhaften Interpretationen der Messergebnisse führen.

HCN-Kanäle befinden sich innerhalb der CA1-Region überwiegend am distalen Dendriten und nur zu einem geringen Anteil im Bereich des Somas oder des proximalen Dendriten. Daher bleibt offen, wie groß der Anteil der HCN-Kanäle ist, deren Einfluss erfasst werden kann.

Die intrazellulären Ableitungen besitzen methodenimmanente Limitationen. So müssen bei der Einstellung des korrekten Membranwiderstandes sämtliche Artefakte, die durch die kapazitiven Effekte der Messpipette ausgelöst werden, ausgeglichen werden. Durch das Erhitzen während der Fertigung und Zuspitzung ist die Qualität der Glaspipetten sehr unterschiedlich. Auch kann durch längere Nutzung einer Pipette während der Messung ein gleichgerichteter zusätzlicher Widerstand auftreten, der zu unterschiedlichen Spannungsamplituden gegensätzlich gepolter Strominjektionen des gleichen Betrages führen. In diesen Fällen wurden die entsprechenden Zellen von einer weiteren Analyse ausgeschlossen.

Bei der Analyse der Videoaufzeichnungen ist die Zweidimensionalität der Aufzeichnung ein Problem. Wenn ein Tier sich im ungünstigen Winkel zur Kamera befand, konnte es Anfälle des Stadiums 3 haben, ohne dass die Krämpfe im Blickfeld der Kamera lagen. Das ist als Grund für die Möglichkeit anzunehmen, dass nicht alle Anfälle im Stadium 3 sicher aus der Perspektive des Beobachters wahrgenommen werden konnten. Daher wurde auch keine Auswertung nach Ausprägung des Status der fokalen oder generalisierten Anfälle vorgenommen.

Durch den unterschiedlichen Start der Videoaufzeichnungen konnte auch keine Analyse des über die Verteilung des ersten sichtbaren Anfalls als Zeichen einer Chronifizierung erfolgen. Ebenso lässt sich durch die fehlende Aufzeichnung in der Nacht keine Aussage auf die absolute Häufung der Anfälle im gesamten Beobachtungszeitraum treffen.

4.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des selektiven Caseinkinase 2-Inhibitors 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol auf die Epileptogenese und die Ausprägung der chronischen Epilepsie in der Pyramidenzellschicht der CA1-Region des Hippocampus untersucht. Dafür wurden extrazelluläre Feldpotenzialmessungen, intrazelluläre Potenzialableitungen und die Analyse von epileptischen Anfällen, die durch Videomonitoring aufgezeichnet wurden, verwendet. Bei den elektrophysiologischen Messungen wurde dabei neben den $K_{Ca2.2}$ -Kanälen die Rolle von HCN-Kanälen genauer untersucht. Es zeigte sich, dass die Gabe von TBB vor der Induktion eines Status Epilepticus mit Pilocarpin und der dem Status Epilepticus folgenden Entwicklung einer chronischen Epilepsie die Krankheitsprogression bremst. Einer der daran beteiligten Mechanismen scheint die durch TBB gesteigerte Funktion von Calcium-abhängigen Kaliumkanälen zu sein, die eine Minderung des Nachpotenzials von Aktionspotenzialen antagonisiert. Diese Minderung des AHP ist eine Folge der Chronifizierung der Epilepsie und ein relevanter Pathomechanismus, das zur Übererregbarkeit führt. Ein zweiter wichtiger Mechanismus, der zur pathologischen Erregbarkeit führt, ist eine gestörte Adaptation auf zu hohe Aktionspotenzialfrequenzen. Auch diese Funktion lässt sich durch TBB wiederherstellen. Wie diese Arbeit darüber hinaus zeigt, sind an beiden Mechanismen, die relevant für eine pathologische Übererregbarkeit sind, HCN-Kanäle beteiligt, auf die auf bislang noch unbekannt Weise TBB ebenfalls wirkt. Teilweise noch unveröffentlichte Daten aus dem Labor des Instituts für Physiologie konnten unterschiedliche Veränderungen der Genexpression von $K_{Ca2.2}$, HCN1 und HCN3 zeigen. Da TBB zum Zeitpunkt der Versuche nicht mehr in den Zellen anwesend war, müssten diese Genveränderungen auf Transkriptionsebene entstanden sein. Aus der Analyse der Videoaufzeichnungen ließ sich eine Abschwächung des Krankheitsprogresses erkennen, die durch TBB induziert war, sodass diese Substanz antiepileptogene Eigenschaften aufweist.

5 Thesen

1. Die Temporallappenepilepsie gehört zu den häufigsten Epilepsien des Erwachsenenalters.
2. Es gibt aktuell keine kausale Therapie von epileptischen Erkrankungen.
3. Am schwersten ist bei der Temporallappenepilepsie die Region CA1 betroffen.
4. Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell eignet sich dazu, Temporallappenepilepsien beim Menschen nachzustellen.
5. Intrinsische Parameter von epileptisch veränderten Neuronen in der Region CA1 sind ein verkleinertes AHP und eine verminderte Adaptation auf zu hohe Aktionspotenzial-Frequenzen.
6. Das AHP gliedert sich in eine schnelle (fAHP), eine mittelschnelle (mAHP) und eine langsame Komponente (sAHP). Die 3 Anteile des AHP sind durch unterschiedliche Zusammensetzung und pharmakologische Beeinflussung gekennzeichnet.
7. TBB ist ein selektiver Hemmstoff der Caseinkinase 2, die ubiquitär im menschlichen Körper vorkommt und durch Phosphorylierung K_{Ca2} -Kanäle inaktiviert.
8. Die Wirkung von TBB bleibt auch über die eigene Elimination hinaus bestehen.
9. Eine zeitnahe Vorbehandlung mit TBB vor der Entstehung einer chronischen Temporallappenepilepsie kann den Krankheitsprogress verzögern und abschwächen.
10. Die TBB-vermittelte gesteigerte Funktion von K_{Ca2} -Kanälen führt zu einer Verstärkung des AHP und einer verbesserten Frequenzadaptation in CA1-Pyramidalzellen.
11. Eine gesteigerte Funktion von K_{Ca2} -Kanälen führt zu erleichterter Plastizität in der Region CA1.
12. Die Hemmung der Caseinkinase 2 führt zu einer gesteigerten Funktion von HCN-Kanälen.
13. Die Blockade von HCN-Kanälen senkt signifikant die Erregbarkeit von Pyramidenzellen.
14. Die Inhibition der Caseinkinase 2 kann als Zielmechanismus für eine pharmakologische Therapie von Temporallappenepilepsien dienen.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ACSF	Artificial cerebrospinal fluid
(f/m/s) AHP	(fast/medium/slow) Afterhyperpolarization potential
ANOVA	Analysis of variance
AP	Aktionspotenzial
ATP	Adenosintriphosphat
CA	Cornu Ammonis/Ammonshorn
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CK2	Caseinkinase 2
DMAT	2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EEG	Elektroenzephalografie
fEPSP	Field excitatory postsynaptic potential
GAERS	Genetic absence epilepsy rat from Strasbourg
GEPR	Genetically epilepsy prone rat
HCN	<u>H</u> yperpolarization-activated <u>c</u> yclic nucleotid gated <u>n</u> on-selective channel
i.p.	Intraperitoneal
ISI	Interstimulusintervall
IPI	Interpulsintervall
KG	Körpergewicht
K _v	Kaliumkanal, von Membranpotenzial getriggert
K _{Ca}	Kaliumkanal, von Calcium getriggert
LTB	Low threshold burster

LTP	Long term potentiation
MRT	Magnetresonanztomografie
MW	Mittelwert
Ncl.	Nucleus
PP2A	Proteinphosphatase 2A
RMP	Ruhemembranpotenzial
SE	Status epilepticus
SEM	Standardfehler/standard error of the mean
SK	Small conductance-Kanal
STP	Short term potentiation
TBB	4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol
TLE	Temporallappenepilepsie
ZD7288	N-ethyl-1,6-dihydro-1,2-dimethyl-6-methylamino-N-phenyl-4-pyrimidaminohydrochlorid
ZNS	Zentrales Nervensystem
#	Anzahl, Nummer

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Schematische Abbildung des Hippocampus.	2
Abbildung 3.1	Krankheitsprogression in der Videoanalyse	26
Abbildung 3.2	Unterschiede in der Anfallslast	27
Abbildung 3.3	Reizantwort auf die steigende Stimulation der Schaffer-Kollateralen	28
Abbildung 3.4	Veränderung der Plastizität durch Kurzzeitpotenzierung	30
Abbildung 3.5	Voltage sag und Afterhypopolarisation potenzial	34
Abbildung 3.6	Burst-Verhalten von Pyramidenzellen in CA1	36
Abbildung 3.7	Veränderung der Hyperpolarisation durch HCN-Blockade	38
Abbildung 3.8	Inhibition von CK2 vergrößert das AHP und senkt die Erregbarkeit unter HCN-Kanalblockade	41

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Pilocarpin-induzierter Status Epilepticus und TBB-Behandlung	13
Tabelle 2	Präparation des Hippocampus	13
Tabelle 3	Elektrophysiologische Messungen	14
Tabelle 4	Zusätzliches Labormaterial und -technik	15
Tabelle 5	Chemikalien	15
Tabelle 6	Lösungen	16
Tabelle 7	Zusammenfassung der intrinsischen Membraneigenschaften	31

6.4 Literaturverzeichnis

Allen D, Fakler B, Maylie J, Adelman JP (2007) Organization and regulation of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel multiprotein complexes. *J Neurosci* 27: 2369–2376.

Atkinson SE, Maywood ES, Chesham JE, Wozny C, Colwell CS, Hastings MH, Williams SR (2011) Cyclic AMP signaling control of action potential firing rate and molecular circadian pacemaking in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 26: 210–220.

Bajorat R, Goerss D, Brenndörfer L, Schwabe L, Köhling R, Kirschstein T (2016) Interplay between interictal spikes and behavioral seizures in young, but not aged pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsy Behav* 57: 90–94.

Bajorat R, Porath K, Kuhn J, Goßla E, Goerss D, Sellmann T, Köhling R, Kirschstein T (2018) Oral administration of the casein kinase 2 inhibitor TBB leads to persistent KCa_{2.2} channel up-regulation in the epileptic CA1 area and cortex, but lacks anti-seizure efficacy in the pilocarpine epilepsy model. *Epilepsy Res* 147: 42–50.

Bajorat R, Wilde M, Sellmann T, Kirschstein T, Köhling R (2011) Seizure frequency in pilocarpine-treated rats is independent of circadian rhythm. *Epilepsia* 52: e118-22.

Battistutta R (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: Structural bases of protein kinase CK2 inhibition. *Cell Mol Life Sci* 66: 1868–1889.

Beck H, Yaari Y (2008) Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nat Rev Neurosci* 9: 357–369.

Ben-Ari Y, Lagowska J, Tremblay E, Le Gal Salle G (1979) A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res* 163: 176–179.

Bender RA, Brewster A, Santoro B, Ludwig A, Hofmann F, Biel M, Baram TZ (2001) Differential and age-dependent expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel isoforms 1–4 suggests evolving roles in the developing rat hippocampus. *Neuroscience* 106: 689–698.

Bender RA, Dubé C, Gonzalez-Vega R, Mina EW, Baram TZ (2003a) Mossy fiber plasticity and enhanced hippocampal excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis, in an animal model of prolonged febrile seizures. *Hippocampus* 13: 399–412.

Bender RA, Soleymani SV, Brewster AL, Nguyen ST, Beck H, Mathern GW, Baram TZ (2003b) Enhanced Expression of a Specific Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Cation

Channel (HCN) in Surviving Dentate Gyrus Granule Cells of Human and Experimental Epileptic Hippocampus. *J. Neurosci.* 23: 6826–6836.

Berger T, Larkum ME, Luscher HR (2001) High I(h) channel density in the distal apical dendrite of layer V pyramidal cells increases bidirectional attenuation of EPSPs. *J Neurophysiol* 85: 855–868.

Bernard C, Anderson A, Becker A, Poolos NP, Beck H, Johnston D (2004) Acquired Dendritic Channelopathy in Temporal Lobe Epilepsy. *Science* 305: 532–535.

Bildl W, Strassmaier T, Thurm H, Andersen J, Eble S, Oliver D, Knipper M, Mann M, Schulte U, Adelman JP, Fakler B (2004) Protein kinase CK2 is coassembled with small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and regulates channel gating. *Neuron* 43: 847–858.

Blanquet PR (2000) Casein kinase 2 as a potentially important enzyme in the nervous system. *Prog Neurobiol* 60: 211–246.

Blumcke I, Cross JH, Spreafico R (2013) The international consensus classification for hippocampal sclerosis: an important step towards accurate prognosis. *Lancet Neurol* 12: 844–846.

Blümcke I, Pauli E, Clusmann H, Schramm J, Becker A, Elger C, Merschhemke M, Meencke H-J, Lehmann T, Deimling A von, Scheiwe C, Zentner J, Volk B, Romstöck J, Stefan H, Hildebrandt M (2007) A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta Neuropathol* 113: 235–244.

Bond CT, Herson PS, Strassmaier T, Hammond R, Stackman R, Maylie J, Adelman JP (2004) Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel knock-out mice reveal the identity of calcium-dependent afterhyperpolarization currents. *J Neurosci* 24: 5301–5306.

Bonzanni M, DiFrancesco JC, Milanesi R, Campostrini G, Castellotti B, Bucchi A, Baruscotti M, Ferrarese C, Franceschetti S, Canafoglia L, Ragona F, Freri E, Labate A, Gambardella A, Costa C, Rivolta I, Gellera C, Granata T, Barbuti A, DiFrancesco D (2018) A novel de novo HCN1 loss-of-function mutation in genetic generalized epilepsy causing increased neuronal excitability. *Neurobiol Dis* 118: 55–63.

Brehme H, Kirschstein T, Schulz R, Köhling R (2014) In vivo treatment with the casein kinase 2 inhibitor 4,5,6,7-tetrabromotriazole augments the slow afterhyperpolarizing potential and prevents acute epileptiform activity. *Epilepsia* 55: 175–183.

Campostrini G, DiFrancesco JC, Castellotti B, Milanesi R, Gneocchi-Ruscione T, Bonzanni M, Bucchi A, Baruscotti M, Ferrarese C, Franceschetti S, Canafoglia L, Ragona F, Freri E, Labate A, Gambardella A, Costa C, Gellera C, Granata T, Barbuti A, DiFrancesco D (2018) A Loss-of-Function HCN4 Mutation

Associated With Familial Benign Myoclonic Epilepsy in Infancy Causes Increased Neuronal Excitability. *Front Mol Neurosci* 11: 269.

Casazza M, Avanzini G, Ciceri E, Spreafico R, Broggi G (1997) Lesionectomy in epileptogenic temporal lobe lesions: preoperative seizure course and postoperative outcome. *Acta Neurochir Suppl* 68: 64–69.

Cavazos JE, Golarai G, Sutula TP (1991) Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J. Neurosci.* 11: 2795–2803.

Cendes F, Andermann F, Carpenter S, Zatorre RJ, Cashman NR (1995) Temporal lobe epilepsy caused by domoic acid intoxication: evidence for glutamate receptor-mediated excitotoxicity in humans. *Ann Neurol* 37: 123–126.

Chao CC, Ma YL, Lee EHY (2007) Protein kinase CK2 impairs spatial memory formation through differential cross talk with PI-3 kinase signaling: activation of Akt and inactivation of SGK1. *J Neurosci* 27: 6243–6248.

Chen S, Su H, Yue C, Remy S, Royeck M, Sochivko D, Opitz T, Beck H, Yaari Y (2011) An increase in persistent sodium current contributes to intrinsic neuronal bursting after status epilepticus. *J Neurophysiol* 105: 117–129.

Dibbens LM, Reid CA, Hodgson B, Thomas EA, Phillips AM, Gazina E, Cromer BA, Clarke AL, Baram TZ, Scheffer IE, Berkovic SF, Petrou S (2010) Augmented currents of an HCN2 variant in patients with febrile seizure syndromes. *Ann Neurol* 67: 542–546.

DiFrancesco JC, Barbuti A, Milanesi R, Coco S, Bucchi A, Bottelli G, Ferrarese C, Franceschetti S, Terragni B, Baruscotti M, DiFrancesco D (2011) Recessive loss-of-function mutation in the pacemaker HCN2 channel causing increased neuronal excitability in a patient with idiopathic generalized epilepsy. *J Neurosci* 31: 17327–17337.

Dronamraju R, Kerschner JL, Peck SA, Hepperla AJ, Adams AT, Hughes KD, Aslam S, Yoblinski AR, Davis IJ, Mosley AL, Strahl BD (2018) Casein Kinase II Phosphorylation of Spt6 Enforces Transcriptional Fidelity by Maintaining Spn1-Spt6 Interaction. *Cell Rep* 25: 3476-3489.e5.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46: 470–472.

Fransén E, Alonso AA, Dickson CT, Magistretti J, Hasselmo ME (2004) Ionic mechanisms in the generation of subthreshold oscillations and action potential clustering in entorhinal layer II stellate neurons. *Hippocampus* 14: 368–384.

Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK (1969) A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 25: 295–330.

Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E, Da Silva FHL (2001) Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. *Eur J Neurosci* 13: 657–669.

Gorter JA, van Vliet EA, Lopes da Silva FH (2016) Which insights have we gained from the kindling and post-status epilepticus models? *J Neurosci Methods* 260: 96–108.

Gu N, Hu H, Vervaeke K, Storm JF (2008) SK (KCa2) channels do not control somatic excitability in CA1 pyramidal neurons but can be activated by dendritic excitatory synapses and regulate their impact. *J Neurophysiol* 100: 2589–2604.

Gu N, Vervaeke K, Hu H, Storm JF (2005) Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol (Lond)* 566: 689–715.

Gymnopoulos M, Cingolani LA, Pedarzani P, Stocker M (2014) Developmental mapping of small-conductance calcium-activated potassium channel expression in the rat nervous system. *J Comp Neurol* 522: 1072–1101.

Hammond RS, Bond CT, Strassmaier T, Ngo-Anh TJ, Adelman JP, Maylie J, Stackman RW (2006) Small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel type 2 (SK2) modulates hippocampal learning, memory, and synaptic plasticity. *J Neurosci* 26: 1844–1853.

Hathaway GM, Lubben TH, Traugh JA (1980) Inhibition of casein kinase II by heparin. *J Biol Chem* 255: 8038–8041.

He C, Chen F, Li B, Hu Z (2014) Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. *Prog Neurobiol* 112: 1–23.

Jafarpour S, Hirsch LJ, Gaínza-Lein M, Kellinghaus C, Detyniecki K (2018) Seizure cluster: Definition, prevalence, consequences, and management. *Seizure*.

Jarsky T, Mady R, Kennedy B, Spruston N (2008) Distribution of bursting neurons in the CA1 region and the subiculum of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 506: 535–547.

Jobe PC, Mishra PK, Adams-Curtis LE, Deoskar VU, Ko KH, Browning RA, Dailey JW (1995) The genetically epilepsy-prone rat (GEPR). *Ital J Neurol Sci* 16: 91–99.

Jung S, Bullis JB, Lau IH, Jones TD, Warner LN, Poolos NP (2010) Downregulation of dendritic HCN channel gating in epilepsy is mediated by altered phosphorylation signaling. *J Neurosci* 30: 6678–6688.

Jung S, Jones TD, Lugo JN, Sheerin AH, Miller JW, D'Ambrosio R, Anderson AE, Poolos NP (2007) Progressive dendritic HCN channelopathy during epileptogenesis in the rat pilocarpine model of epilepsy. *J Neurosci* 27: 13012–13021.

Kaczorowski CC (2011) Bidirectional pattern-specific plasticity of the slow afterhyperpolarization in rats: role for high-voltage activated Ca²⁺ channels and I_h. *Eur J Neurosci* 34: 1756–1765.

Keen JE, Khawaled R, Farrens DL, Neelands T, Rivard A, Bond CT, Janowsky A, Fakler B, Adelman JP, Maylie J (1999) Domains Responsible for Constitutive and Ca²⁺-Dependent Interactions between Calmodulin and Small Conductance Ca²⁺-Activated Potassium Channels. *J. Neurosci.* 19: 8830–8838.

Kernig K, Kirschstein T, Würdemann T, Rohde M, Köhling R (2012) The afterhyperpolarizing potential following a train of action potentials is suppressed in an acute epilepsy model in the rat Cornu Ammonis 1 area. *Neuroscience* 201: 288–296.

Kirschstein T, Mikkat S, Mikkat U, Bender R, Kreutzer M, Schulz R, Köhling R, Glocker MO (2012) The 27-kDa heat shock protein (HSP27) is a reliable hippocampal marker of full development of pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsy Res* 98: 35–43.

Köhler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, Adelman JP (1996) Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science (New York, N.Y.)* 273: 1709–1714.

Kwan P, Brodie MJ (2000) Early identification of refractory epilepsy. *NEJM* 342: 314–319.

Lancaster B, Hu H, Ramakers GMJ, Storm JF (2001) Interaction between synaptic excitation and slow afterhyperpolarization current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol (Lond)* 536: 809–823.

Lancaster B, Nicoll RA (1987) Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J Physiol (Lond)* 389: 187–203.

Lancaster B, Nicoll RA, Perkel DJ (1991) Calcium activates two types of potassium channels in rat hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 11: 23–30.

Lee W-S, Ngo-Anh TJ, Bruening-Wright A, Maylie J, Adelman JP (2003) Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and calmodulin: cell surface expression and gating. *J Biol Chem* 278: 25940–25946.

Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA (2002) New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res* 50: 93–103.

Li M, Maljevic S, Phillips AM, Petrovski S, Hildebrand MS, Burgess R, Mount T, Zara F, Striano P, Schubert J, Thiele H, Nürnberg P, Wong M, Weisenberg JL, Thio LL, Lerche H, Scheffer IE, Berkovic SF, Petrou S, Reid CA (2018) Gain-of-function HCN2 variants in genetic epilepsy. *Hum Mutat* 39: 202–209.

Lin MT, Luján R, Watanabe M, Adelman JP, Maylie J (2008) SK2 channel plasticity contributes to LTP at Schaffer collateral-CA1 synapses. *Nat Neurosci* 11: 170–177.

Lolli G, Pinna LA, Battistutta R (2012) Structural determinants of protein kinase CK2 regulation by autoinhibitory polymerization. *ACS Chem Biol* 7: 1158–1163.

Lörincz A, Notomi T, Tamás G, Shigemoto R, Nusser Z (2002) Polarized and compartment-dependent distribution of HCN1 in pyramidal cell dendrites. *Nat Neurosci* 5: 1185–1193.

Luan L, Sun Y, Yang K (2018) Surgical strategy for temporal lobe epilepsy with dual pathology and incomplete evidence from EEG and neuroimaging. *Exp Ther Med* 16: 4886–4892.

Madison DV, Nicoll RA (1984) Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol (Lond)* 354: 319–331.

Magee JC, Carruth M (1999) Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 82: 1895–1901.

Marescaux C, Vergnes M, Depaulis A (1992) Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg—a review. *J Neural Transm Suppl* 35: 37–69.

Meggio F, Pinna LA (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* 17: 349–368.

Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (1999) Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem* 380: 975–980.

Müller S, Guli X, Hey J, Einsle A, Pfanz D, Sudmann V, Kirschstein T, Köhling R (2018) Acute epileptiform activity induced by gabazine involves proteasomal rather than lysosomal degradation of KCa2.2 channels. *Neurobiol Dis* 112: 79–84.

Nakamura Y, Shi X, Numata T, Mori Y, Inoue R, Lossin C, Baram TZ, Hirose S (2013) Novel HCN2 mutation contributes to febrile seizures by shifting the channel's kinetics in a temperature-dependent manner. *PLoS ONE* 8: e80376.

Nguyen DK, Mbacfou MT, Nguyen DB, Lassonde M (2013) Prevalence of nonlesional focal epilepsy in an adult epilepsy clinic. *Can J Neurol Sci* 40: 198–202.

Nolan MF, Dudman JT, Dodson PD, Santoro B (2007) HCN1 channels control resting and active integrative properties of stellate cells from layer II of the entorhinal cortex. *J Neurosci* 27: 12440–12451.

Nolan MF, Malleret G, Dudman JT, Buhl DL, Santoro B, Gibbs E, Vronskaya S, Buzsáki G, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2004) A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell* 119: 719–732.

Nolan MF, Malleret G, Lee KH, Gibbs E, Dudman JT, Santoro B, Yin D, Thompson RF, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2003) The Hyperpolarization-Activated HCN1 Channel Is Important for Motor Learning and Neuronal Integration by Cerebellar Purkinje Cells. *Cell* 115: 551–564.

Obermair GJ, Kaufmann WA, Knaus H-G, Flucher BE (2003) The small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel SK3 is localized in nerve terminals of excitatory synapses of cultured mouse hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 17: 721–731.

Oh Y-J, Na J, Jeong J-H, Park D-K, Park K-H, Ko J-S, Kim D-S (2012) Alterations in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN) expression in the hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *BMB Reports* 45: 635–640.

O'Neill JS, Maywood ES, Chesham JE, Takahashi JS, Hastings MH (2008) cAMP-dependent signaling as a core component of the mammalian circadian pacemaker. *Science (New York, N.Y.)* 320: 949–953.

Pedarzani P, McCutcheon JE, Rogge G, Jensen BS, Christophersen P, Hougaard C, Strøbaek D, Stocker M (2005) Specific enhancement of SK channel activity selectively potentiates the afterhyperpolarizing current I(AHP) and modulates the firing properties of hippocampal pyramidal neurons. *J Biol Chem* 280: 41404–41411.

Pedarzani P, Stocker M (2008) Molecular and cellular basis of small- and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cell Mol Life Sci* 65: 3196–3217.

Postnikova TY, Amakhin DV, Trofimova AM, Smolensky IV, Zaitsev AV (2019) Changes in Functional Properties of Rat Hippocampal Neurons Following Pentylentetrazole-induced Status Epilepticus. *Neuroscience* 399: 103–116.

Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32: 281–294.

Radhakrishnan A, Menon R, Thomas SV, Abraham M, Vilanilam G, Kesavadas C, Thomas B, Cherian A, Varma RP (2018) "Time is Brain"-How early should surgery be done in drug-resistant TLE? *Acta Neurol Scand* 138: 531–540.

Rayner G, Tailby C, Jackson G, Wilson S (2019) Looking beyond lesions for causes of neuropsychological impairment in epilepsy. *Neurology*.

Rehberg M, Kirschstein T, Guli X, Müller S, Rohde M, Franz D, Tokay T, Köhling R (2017) Functional Metaplasticity of Hippocampal Schaffer Collateral-CA1 Synapses Is Reversed in Chronically Epileptic Rats. *Neural Plast* 2017: 8087401.

Reigel CE, Dailey JW, Jobe PC (1986) The genetically epilepsy-prone rat: an overview of seizure-prone characteristics and responsiveness to anticonvulsant drugs. *Life Sci* 39: 763–774.

Roxo MR, Franceschini PR, Zubarán C, Kleber FD, Sander JW (2011) The limbic system conception and its historical evolution. *Scientific World Journal* 11: 2428–2441.

Sailer CA, Kaufmann WA, Marksteiner J, Knaus H-G (2004) Comparative immunohistochemical distribution of three small-conductance Ca²⁺-activated potassium channel subunits, SK1, SK2, and SK3 in mouse brain. *Mol Cell Neurosci* 26: 458–469.

Sanabria ERG, Su H, Yaari Y (2001) Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol (Lond)* 532: 205–216.

Sander JW, Shorvon SD (1996) Epidemiology of the epilepsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 61: 433–443.

Santoro B, Tibbs GR (1999) The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci* 868: 741–764.

Sarno S, Reddy H, Meggio F, Ruzzene M, Davies SP, Donella-Deana A, Shugar D, Pinna LA (2001) Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett* 496: 44–48.

Sarno S, Ruzzene M, Frascella P, Pagano MA, Meggio F, Zambon A, Mazzorana M, Di Maira G, Lucchini V, Pinna LA (2005) Development and exploitation of CK2 inhibitors. *Mol Cell Biochem* 274: 69–76.

Scheibel ME, Crandall PH, Scheibel AB (1974) The hippocampal-dentate complex in temporal lobe epilepsy. A Golgi study. *Epilepsia* 15: 55–80.

- Schmidt D, Sillanpää M (2016) Prevention of Epilepsy: Issues and Innovations. *Curr Neurol Neurosci Rep* 16: 95.
- Schulz R, Kirschstein T, Brehme H, Porath K, Mikkat U, Köhling R (2012) Network excitability in a model of chronic temporal lobe epilepsy critically depends on SK channel-mediated AHP currents. *Neurobiol Dis* 45: 337–347.
- Shin M, Chetkovich DM (2007) Activity-dependent regulation of h channel distribution in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Biol Chem* 282: 33168–33180.
- Stackman RW, Hammond RS, Linardatos E, Gerlach A, Maylie J, Adelman JP, Tzounopoulos T (2002) Small Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels Modulate Synaptic Plasticity and Memory Encoding. *J. Neurosci.* 22: 10163–10171.
- Stieber J, Stöckl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F (2005) Functional expression of the human HCN3 channel. *J Biol Chem* 280: 34635–34643.
- Stocker M, Krause M, Pedarzani P (1999) An apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ current in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci* 96: 4662–4667.
- Stocker M, Pedarzani P (2000) Differential distribution of three Ca(2+)-activated K(+) channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 15: 476–493.
- Storm JF (1987) Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol (Lond)* 385: 733–759.
- Storm JF (1989) An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol (Lond)* 409: 171–190.
- Su H, Alroy G, Kirson ED, Yaari Y (2001) Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 21: 4173–4182.
- Surges R, Freiman TM, Feuerstein TJ (2004) Input resistance is voltage dependent due to activation of I_h channels in rat CA1 pyramidal cells. *J Neurosci Res* 76: 475–480.
- Surges R, Kukley M, Brewster A, Rüschemschmidt C, Schramm J, Baram TZ, Beck H, Dietrich D (2012) Hyperpolarization-activated cation current I_h of dentate gyrus granule cells is upregulated in human and rat temporal lobe epilepsy. *Biochem Biophys Res Commun* 420: 156–160.
- Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L (1989) Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* 26: 321–330.

- Tamaru T, Hattori M, Honda K, Nakahata Y, Sassone-Corsi P, van der Horst GTJ, Ozawa T, Takamatsu K (2015) CRY Drives Cyclic CK2-Mediated BMAL1 Phosphorylation to Control the Mammalian Circadian Clock. *PLoS Biol* 13: e1002293.
- Tang B, Sander T, Craven KB, Hempelmann A, Escayg A (2008) Mutation analysis of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels HCN1 and HCN2 in idiopathic generalized epilepsy. *Neurobiol Dis* 29: 59–70.
- TIMM F (1958) Zur Histochemie der Schwermetalle; das Sulfid-Silberverfahren. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med* 46: 706–711.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9: 315–335.
- van Paesschen W (2004) Qualitative and quantitative imaging of the hippocampus in mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Neuroimaging Clin N Am* 14: 373-400, vii.
- van Welie I, Remme MWH, van Hooft JA, Wadman WJ (2006) Different levels of Ih determine distinct temporal integration in bursting and regular-spiking neurons in rat subiculum. *J Physiol (Lond)* 576: 203–214.
- Villalobos C, Shakkottai VG, Chandy KG, Michelhaugh SK, Andrade R (2004) SKCa channels mediate the medium but not the slow calcium-activated afterhyperpolarization in cortical neurons. *J Neurosci* 24: 3537–3542.
- Wieser HG, Yaşargil MG (1982) Selective Amygdalohippocampectomy as a Surgical Treatment of Mesobasial Limbic Epilepsy. *Neurochirurgia (Stuttg)* 25: 39–50.
- Ying S-W, Tibbs GR, Picollo A, Abbas SY, Sanford RL, Accardi A, Hofmann F, Ludwig A, Goldstein PA (2011) PIP2-mediated HCN3 channel gating is crucial for rhythmic burst firing in thalamic intergeniculate leaflet neurons. *J Neurosci* 31: 10412–10423.
- Yue C, Yaari Y (2004) KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24: 4614–4624.
- Zolles G, Klöcker N, Wenzel D, Weisser-Thomas J, Fleischmann BK, Roeper J, Fakler B (2006) Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides. *Neuron* 52: 1027–1036.

7 Curriculum Vitae

Name: Felix Burckhart Schulze
Adresse: Lomonossowstr. 16, 18059 Rostock
Geboren am: 08.02.1987
Geburtsort: Leer

Ausbildung

2013 – 2019 Studium der Humanmedizin, Universität Rostock
2019 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Universität Rostock
2018 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Universität Rostock
2015 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Universität Rostock
2007 – 2010 Ausbildung zum Physiotherapeuten, Abschluss: Staatsexamen
2006 Abitur, Ubbo-Emmius-Gymnasium Leer

Berufserfahrung

2020 - heute Arzt in Weiterbildung und Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Abt. für Kinderchirurgie, Prof. Stuhldreier, Chirurgische Universitätsklinik, Universitätsmedizin Rostock
2010 – 2013 Physiotherapeut, Praxis Ina Wolf, Moormerland

Promotionsarbeit

2016 – 2020 Persistierende Effekte von 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) auf die zelluläre und synaptische Erregbarkeit im Pilocarpinmodell der Temporallappenepilepsie, Themenvergebender: Prof. Dr. med. T. Kirschstein, Oscar Langendorff-Institut für Physiologie, Universitätsmedizin Rostock, Direktor: Prof. Dr. med. R. Köhling

Publikationen

2020 Schulze F, Müller S, Guli X, Schumann L, Brehme H, Riffert T, Rohde M, Goerss D, Rackow S, Einsle A, Kirschstein T and Köhling R (2020) CK2 Inhibition Prior to Status Epilepticus Persistently Enhances KCa2 Function in CA1 Which Slows Down Disease Progression. Front. Cell. Neurosci. 14:33.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling für die Bereitstellung aller benötigten Instrumente und Materialien sowie die Möglichkeit der selbstständigen Planung meiner Versuche.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. med. Timo Kirschstein für die Vergabe dieses Themas, die hervorragende Unterstützung und Betreuung während der gesamten Zeit.

Des Weiteren danke ich Dr. rer. nat. Marco Rhode und Dr. rer. nat. Xiati Guli für die Einweisung und technische Betreuung an den jeweiligen Messplätzen.

Genauso sei meinen Kommilitonen Juliane Becker und Victor Sudmann für den konstruktiven Austausch gedankt.

Darüber hinaus bin ich Dr. rer. nat. Steffen Müller, Katrin Porath, Tina Sellmann, Simone Rackow und allen anderen Mitarbeitern des Oscar Langendorff-Instituts für Physiologie für ihre Unterstützung dankbar.

Ferner danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung des Projekts.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden bedanken für ihren Rückhalt, die Unterstützung und Motivation, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.

Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock anerkenne.

Rostock, 14. Februar 2020

Felix Burckhart Schulze