

Universität  
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin  
Rostock

AUS DEM OSCAR-LANGENDORFF-INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE DER  
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DIREKTOR: UNIV.-PROF. DR. MED. R. KÖHLING

# Funktionelle Veränderungen von hippocampalen Kv7-Kaliumkanälen im Modell chronischer Epilepsie

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER ZAHNMEDIZIN

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

RICARDA BENZ | GEB. AM 10.06.1998 IN ECKERNFÖRDE

ROSTOCK | 07.02.2022

Verteidigt am 21.12.2022 | Rostock



Dieses Werk ist lizenziert unter einer  
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Timo Kirschstein, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof.Dr. Astrid Bertsche, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Terlau, Universität Kiel

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	i
<b>Abkürzungen</b> .....	ii
<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Anatomie und Verschaltung des Hippocampus .....	1
1.2 Epilepsie .....	2
1.3 Temporallappenepilepsie .....	4
1.4 Tiermodell/Pilocarpininduzierte Epilepsie .....	4
1.5 Kaliumkanäle .....	5
1.5.1 Struktur von Kaliumkanälen .....	5
1.5.2 SK2 Kanäle .....	7
1.5.3 BK Kanäle .....	7
1.5.4 K <sub>v</sub> 4.2 Kanäle .....	7
1.5.5. K <sub>ir</sub> 2.1 Kanäle .....	8
1.5.6. K <sub>v</sub> 7 Kanäle .....	8
1.6. Zielstellung .....	11
<b>2 Material und Methode</b> .....	12
2.2 Mehr- und Einwegartikel .....	13
2.3 Geräte .....	14
2.4 Lösungen .....	16
2.5 Stammlösungen .....	16
2.6 Tierhaltung .....	17
2.7 Behandlung mit Pilocarpin und TBB .....	17
2.8 Dekapitierungsvorgang .....	17
2.9 Präparation .....	17
2.10 Slicevorgang .....	18
2.11 Durchführung der Messung .....	18
2.12 Analyse der Daten und grafische Darstellung .....	19
2.13 Statistik und grafische Abbildung der Daten .....	19
2.14 Messungen im Gyrus dentatus .....	20
2.15 Messungen in der CA1 Region .....	21
<b>3 Ergebnisse</b> .....	22
3.1 Der Effekt von Gabazin und Gabazin + XE991 auf naive Tiere und Kontrolltiere .....	22
3.2 Effekt von Gabazin + XE991 .....	26
3.3 Effekte von magnesiumfreier und magnesiumhaltiger Lösung .....	30

3.4 Effekt von TBB .....	34
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>40</b>
4.1 Der Effekt von Gabazin und Gabazin + XE991 auf naive Tiere und Kontrolltiere.....	41
4.2 Der Effekt von Gabazin und der Kombination aus Gabazin + XE991 auf chronisch epileptische Tiere im Vergleich mit Kontrolltieren .....	42
4.3 Der Effekt von magnesiumhaltiger und magnesiumfreier Lösung auf Pilotiere und Kontrolltiere .....	43
4.4 TBB.....	44
4.5 Limitationen der Arbeit .....	46
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>47</b>
<b>6 Thesen .....</b>	<b>49</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>iii</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>ix</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>xi</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Abbildung des Hippocampus	2
Abbildung 2:	Einteilung Kaliumkanäle	6
Abbildung 3:	Darstellung einer Prä- und Postsynapse	10
Abbildung 4:	Einteilung der Versuchsgruppen für Messungen im Gyrus Dentatus	20
Abbildung 5:	Einteilung der Versuchsgruppen für Messungen in der CA1 Region des Hippocampus	21
Abbildung 6:	Die Effekte von Gabazin und der Kombination von Gabazin + XE991	23
Abbildung 7:	Effekte von Gabazin und Gabazin + XE991 auf das Doppelpulsverhältnis	24
Abbildung 8:	Originalableitungen der drei Versuchsgruppen im Vergleich	25
Abbildung 9:	Der Effekt von Gabazin und Gabazin + XE991 auf Pilotiere im Vergleich zu Kontrolltieren	27
Abbildung 10:	Paired Puls Ratio: Effekt der medikamentösen Behandlung auf das Doppelpulsverhältnis der Versuchsgruppen	28
Abbildung 11:	exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen unter Gabazin	29
Abbildung 12:	exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen unter Gabazin + XE991	29
Abbildung 13:	Input-Output-Kurve Der Effekt von magnesiumhaltiger und magnesiumfreier Lösung auf Pilotiere und Kontrolltiere	31
Abbildung 14:	Paired Puls Ratio Effekt von magnesiumfreier und magnesiumhaltiger Lösung auf das Doppelpulsverhältnis der Pilotiere und der Kontrolltiere	32
Abbildung 15:	exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen mit und ohne $Mg^{2+}$	32
Abbildung 16:	exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen mit und ohne $Mg^{2+}$ im Vergleich	33
Abbildung 17:	Input-Output-Kurve: Effekt der TBB Behandlung auf die Amplitude von Pilotieren und Kontrolltieren unter ACSF Standard Bedingungen	34
Abbildung 18:	Paired Puls Ratio Effekt der TBB Behandlung auf das Doppelpulsverhältnis von Pilotieren und Kontrolltieren unter ACSF Standard Bedingungen	35
Abbildung 19:	Input-Output-Kurve: Grafischer Vergleich zwischen Pilotieren und Kontrolltieren, jeweils mit und ohne TBB unter magnesiumfreier Lösung.	36
Abbildung 20:	Paired Puls Ratio Effekt der TBB Behandlung auf das Doppelpulsverhältnis von Pilotieren und Kontrolltieren unter magnesiumfreier Lösung.	37
Abbildung 21:	exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen unter TBB	38
Abbildung 22:	exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen unter TBB im Vergleich	38
Abbildung 23:	exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen unter TBB ohne $Mg^{2+}$	39
Abbildung 24:	exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen unter TBB ohne $Mg^{2+}$ im Vergleich	39

## Abkürzungen

ACSF	Artificial cerebrospinal fluid
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
ANOVA	Englisch: Analysis of Variance
BFNC	gutartige familiäre Anfälle bei Neugeborenen (engl. benign familial neonatal convulsions)
BK-Kanal	engl. large-conductance calcium- and voltage-activated potassium channel
CA1,2,3,4	Cornu ammonis
CK2	Casein-Kinase 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
GABA <sub>A</sub>	$\gamma$ -Aminobuttersäure-Rezeptoren
Gabazin	6-Imino-3-(4-methoxyphenyl)-1(6H)-pyridazinebutanoicacid hydrobromide
GD	Gyrus dentatus
HS	Hippocampussklerose
ILAE	engl. „International League Against Epilepsy“
K <sub>ir</sub>	engl. inward rectifier potassium channels
M-Strom	Muskarin-abhängiger Strom
MTLE	Mesiale Temporallappenepilepsie
NaCl	Natriumchlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
Pilotiere	mit Pilocarpin behandelte Tiere
sAHP	Langsames hyperpolarisierendes Nachpotential (slow afterhyperpolarisation potential)
SE	Status epilepticus
SEM	Standardfehler
SK-Kanal	engl. small-conductance calcium-activated potassium channel
TBB	4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazole
TLE	Temporallappenepilepsie

# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie und Verschaltung des Hippocampus

Phylogenetisch entstammt der Hippocampus dem Archikortex und liegt an der Medialseite des unteren Temporallappens. Er formt die mediale Wand des Unterhorns des Seitenventrikels. Der Hippocampus lässt sich in Subiculum, Cornu ammonis und Gyrus dentatus einteilen (siehe Abb. 1). Das Cornu ammonis wiederum lässt sich in die nach Lorente de No bezeichneten Regionen CA1, CA2, CA3 und CA4 unterteilen (Waschke et al. 2015). Histologisch können im Cornu ammonis die Schichten Stratum moleculare, Stratum radiatum (Stratum moleculare und radiatum werden zusammengefasst auch als Stratum radiatum-lacunosum-moleculare bezeichnet), Stratum pyramidale und Stratum oriens unterschieden werden. Im Gegensatz dazu gliedert sich der Gyrus dentatus in ein Stratum moleculare, Stratum granulare und Stratum multiforme. Mikroskopisch können in den einzelnen Schichten unterschiedliche Zelltypen gefunden werden: Im Stratum oriens befinden sich die basalen Dendriten der glutamatergen Pyramidenzellen sowie der Korbzellen. Die Zellkörper der Pyramidenzellen befinden sich im Stratum pyramidale, während die apikalen Dendriten im Stratum radiatum und im Stratum lacunosum moleculare gelegen sind. In den Schichten des Gyrus dentatus befinden sich die Körnerzellen im Stratum moleculare und haben ihren Zellkörper im Stratum granulosum positioniert. Das Stratum multiforme bildet einen fließenden Übergang zur CA4 Region (Welsch et al. 2018).

Der Hippocampus erhält Afferenzen aus dem Thalamus, dem Gyrus cinguli und dem Corpus amygdaloideum. Des Weiteren empfängt er Afferenzen über den Fornix aus dem Septum und über den Tractus perforans aus der Regio entorhinalis. Seine Efferenzen gelangen über die Fornix cerebri zu den Corpora mamillaria, auf dem Weg werden Faserzüge an das Septum, Corpus amygdaloideum und den Hypothalamus abgegeben (Trepel 2022). Als Teil des limbischen Systems hat der Hippocampus eine wichtige Rolle in der Verarbeitung und Weiterleitung von Emotionen sowie in der Übertragung von erlernten Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis. Diese Informationsweiterleitung gelingt nur unter der Einhaltung eines strikten Verschaltungsmusters: Über den Tractus perforans projizieren Pyramidenzellen der Area entorhinalis auf die Körnerzellen im Gyrus dentatus. Von dort aus gelangen die Informationen über die Moosfasern (Axone der Körnerzellen) überwiegend auf die Pyramidenzellen der CA3-Region. Innerhalb des Cornu ammonis gelangen die Informationen über die Schaffer Kollateralen zu den CA1-Neuronen und schließlich über das Subiculum zum entorhinalen Kortex (Trepel 2022; Waschke et al. 2015).

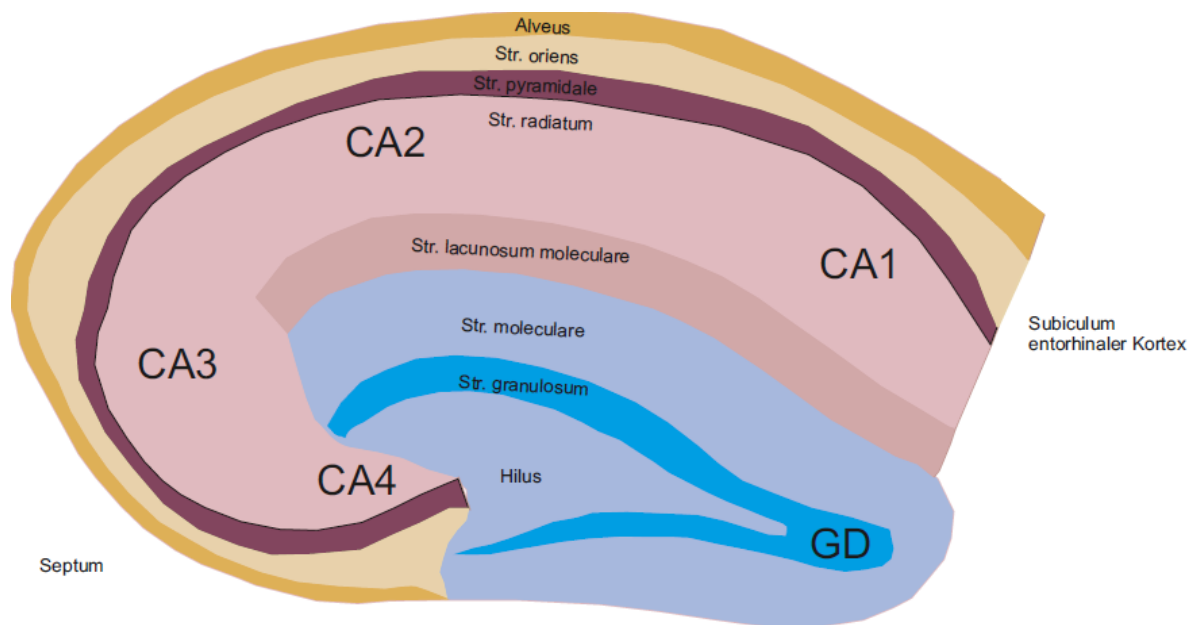


Abbildung 1: Schematische Abbildung des Hippocampus

Einteilung des Cornu ammonis nach Lorente de No in die Abschnitte CA1, CA2, CA3 und CA4. Besonders CA1- und CA3-Region spielen eine wichtige Rolle in der Informationsverarbeitung. Der Gyrus dentatus (auch Fascia dentata, GD) sitzt dem Cornu ammonis kappenartig auf. Er enthält in dem Stratum moleculare Körnerzellen, die von den Axonen des Tractus perforans erreicht werden. Eine Verbindung zwischen Körnerzellen und Pyramidenzellen wird über die Moosfasern (Axone der Körnerzellen) hergestellt. Histologisch wird das Cornu ammonis in vier Schichten und der Gyrus dentatus in drei Schichten unterteilt.

## 1.2 Epilepsie

Epilepsie ist eine der häufigsten Hirnerkrankungen, von der weltweit mehr als 70 Millionen Menschen betroffen sind. Das Risiko, an einer Epilepsie zu erkranken, betrifft vor allem Säuglinge und ältere Menschen (Thijs et al. 2019). Die Prävalenz beträgt bei Kindern zwischen 41 und 187 pro 100.000 (Camfield und Camfield 2015). Bei Erwachsenen liegt die Prävalenz bei etwa 67,77 pro 100.000 (Fiest et al. 2017). Laut WHO leben fast 80% der Menschen mit Epilepsie in Ländern mit niedrigem und mittlerem Bruttosozialprodukt. Es ist wichtig, begrifflich zwischen Anfällen und Epilepsie zu unterscheiden. Anfälle sind kurzfristige paroxysmale Veränderungen, die zu einer übermäßigen, hypersynchronen Entladung von Neuronen im Gehirn führen. Anfälle können im Zusammenhang mit einer Epilepsieerkrankung stehen, können aber auch unabhängig davon auftreten (z.B. durch psychische Belastung). Als Epilepsie bezeichnet man den Zustand wiederkehrender unprovoked Anfälle (Fisher et al. 2014). Die Arbeitsgruppe der ILAE (International League Against Epilepsy) definiert Epilepsie als eine Erkrankung des Gehirns, die beim Vorliegen der folgenden Bedingungen diagnostiziert werden kann: 1.) In einem Abstand von mehr als 24 Stunden treten mindestens zwei unprovoked oder reflexartige Anfälle auf. Oder 2.) Es tritt ein unprovoked oder

reflexartiger Anfall auf und die Wahrscheinlichkeit erneuter Anfälle entspricht dem allgemeinen Wiederholungsrisiko nach zwei unprovokierten Anfällen (60%) innerhalb der nächsten 10 Jahre. 3.) Die Diagnose eines Epilepsiesyndroms. Die Ursachen für eine Epilepsieerkrankung können strukturelle, genetische, infektiöse, metabolische, immunvermittelte oder unbekannte Störungen sein (Fisher et al. 2014).

Die Unterteilung verschiedener Epilepsieformen wird anhand der Klassifikation der ILAE vorgenommen. Dazu wird in einem ersten Schritt die Anfallsform festgestellt, es folgt die Diagnose der Anfallsart. Zuletzt wird die Erkrankung einem spezifischen Epilepsiesyndrom zugeordnet. Seit 2017 werden bei jedem der drei Teilschritte zusätzliche ätiologische Aspekte berücksichtigt (Fisher et al. 2014). Epilepsieformen werden in generalisierte Epilepsie, fokale Epilepsie, kombinierte generalisierte und fokale Epilepsie sowie in unklassifizierte Epilepsie eingeteilt. Laut ILAE bezeichnet ein Epilepsiesyndrom ein Cluster von Merkmalen inklusive der Anfallsformen, des EEGs und der Befunde der Bildgebung. Die ILAE klassifiziert Anfälle als Anfälle mit fokalem, mit generalisiertem oder mit unbekanntem Beginn (Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology).

Diagnostisch werden neben der visuellen Beobachtung eines akuten Anfalls auch Informationen aus der Anfallssemiologie, aus Blutuntersuchungen des Blutzuckers, des pH-Wertes, des Lactatwertes sowie der Kreatinkinase und bildgebende Verfahren wie ein kraniales CT oder MRT hinzugezogen. Das EEG gibt zusätzliche Informationen in Form von epilepsietypischen Potentialen (Rosenow et al. 2015). Die Akuttherapie der Epilepsie besteht in der Gabe von Benzodiazepinen wie Diazepam oder Clonazepam. Die Langzeittherapie erfolgt mit spezifischen Antikonvulsiva (Andreas Schulze-Bonhage 2020).

Die Epilepsie gilt als überwunden, wenn der Patient über eine längere Zeit anfallsfrei ist und keine Medikamente einnimmt. Das jährliche Risiko für Rückfälle ist nach 5 Jahren selten und nach 10 Jahren ohne anfallshemmende Medikamente sehr gering (Fisher et al. 2014).

### 1.3 Temporallappenepilepsie

Temporallappenepilepsie ist die häufigste lokalisationsbedingte Epilepsieform bei Erwachsenen (Tatum 2012). Die epileptogene Zone sind der Hippocampus und/oder die Amygdala. Die Patienten leiden unter neurokognitiven Defiziten, das Bewusstsein beeinträchtigenden Anfällen und verminderter Lebensqualität. Prognostisch handelt es sich bei der Temporallappenepilepsie um eine schlecht medikamentös behandelbare Epilepsieform. Bei rund 40% der Patienten mit TLE kann trotz optimaler medizinischer Therapie keine Anfallsfreiheit erzielt werden. (Englot et al. 2020)

Ursache für die TLE ist sehr häufig eine Hippocampusklerose, die meist einseitig im MRT sichtbar wird und mit einer Reorganisation der Körnerzellen und Veränderungen der Interneuronenpopulation, des Neuropeptidfasernetzwerkes und der Moosfasersprossung einhergeht (Thom 2014). Weitere Ursachen sind Enzephalitis, Entwicklungsstörungen, neurodegenerative Erkrankungen oder Tumore (Todt 2019). Untersuchungen zeigen eine Moosfasersprossung mit einer wiederkehrenden axonalen Verzweigung und Projektion von Moosfaserkollateralen in die molekulare Schicht des Gyrus dentatus. Dadurch wird ein exzitatorischer synaptischer Kontakt mit den apikalen Dendriten und Stacheln der Körnerzellen in der inneren molekularen Schicht hergestellt. Als Ergebnis entsteht die Synchronisation neuronaler Gruppen (Thom 2014).

Die Patienten erleiden Anfälle, die meist mit einer Aura beginnen und dann komplexe fokale Anfälle mit motorischen Symptomen, vegetativen Symptomen und Bewusstseinsveränderungen entwickeln. Abschließend folgt eine postiktale Reorientierungsphase mit Amnesie für das Anfallsgeschehen (Todt 2019).

### 1.4 Tiermodell / Pilocarpininduzierte Epilepsie

Um die menschliche Epilepsie möglichst analog in einem Tiermodell nachzubilden, etablierten sich im Laufe der Jahre verschiedene Modelle. Methoden wie das Kainat (Kainsäure)-Modell erfordern eine intrahippocampale, intraamygdaloide oder systemische Injektion von Kainsäure (Lévesque und Avoli 2013). Diese Injektion muss über mehrere Stunden wiederholt werden, um einen Status epilepticus zu erzielen (Hellier et al. 1998). Eine weitere häufig genutzte Methode ist das Kindling-Modell. Dieses nutzt wiederholte Applikation von Stromimpulsen zur Induktion von Verhaltensveränderungen und Induktion lokaler Anfallsentladungen (Goddard et al. 1969). Das Kindling-Modell ist zeitintensiver als andere Modelle und zeigt zusätzlich weniger deutliche histopathologische Veränderungen als sie im Zuge der mesialen Temporallappenepilepsie sichtbar werden (Sharma et al. 2007).

Das in dieser Arbeit verwendete Pilocarpin-Modell (siehe Abschnitt „Behandlung mit Pilocarpin“) zeigt eine erhöhte Zuverlässigkeit in dem Auftreten der Anfälle als das Kainat-Modell (Lévesque und Avoli 2013). Das Modell eignet sich, da es mithilfe einer einzigen Injektion von Pilocarpin in Kombination mit dem nicht liquorgängigen Methyloscopolamin in der Lage ist, einen Status epilepticus zu provozieren. Anders als nach einer intraperitonealen Injektion von Kainsäure wird der Zustand eines Status epilepticus bereits nach einmaliger Injektion von 340 mg/kg Körpergewicht Pilocarpin erreicht. Nach einer Latenzzeit treten wiederkehrende spontane Anfälle und ausgedehnte cerebrale Läsionen auf (Leite et al. 1990). Im Bereich dieser Läsionen zeigen sich, genau wie beim humanen TLE Patienten, eine Hippocampussklerose und eine Umstrukturierung des neuronalen Netzwerks durch Moosfasersprossung (Wieser 2004). Zwischen TLE-Patienten und pilocarpinbehandelten Tieren werden weitere Parallelen sichtbar: so zeigen sich temporale Anfallsmuster, typische Veränderungen im EEG, und dass eine medikamentöse Behandlung mit Antikonvulsiva nur schlecht wirkt (Leite und Cavalheiro 1995; Chakir et al. 2006).

Pilocarpin ist ein cholinerges Agonist und stimuliert Muskarinrezeptoren. Dadurch kommt es zu einer Steigerung der parasympathischen Aktivität, welche durch die vorausgehende Applikation von Methyloscopolamin gedämpft wird, und zentralnervöse Effekte wie Starrkrämpfe, olfaktorische und gustatorische Automatismen sowie motorische limbische Anfälle. Akut kommt es durch Pilocarpin zu einem Status epilepticus und langfristig zu einer Hippocampussklerose (Turski et al. 1983).

## 1.5 Kaliumkanäle

In den vergangenen Jahrzehnten wurde nach der Ursache für Epilepsieerkrankungen gesucht. Dabei wurde Mutationen von Kaliumkanälen eine große Rolle zugesprochen.

Kaliumkanäle sind die am weitesten verbreiteten und in eukaryontischen Zellen ubiquitär auftretenden Kanäle. Kaliumströme wurden inzwischen in allen Zellen gefunden, die Na-, Ca-, Na- und Ca- oder Cl- vermittelte Aktionspotentiale aufweisen (Rudy 1988).

### 1.5.1 Struktur von Kaliumkanälen

Der Aufbau von Ionenkanälen soll im Folgenden anhand der spannungsabhängigen Kaliumkanäle erläutert werden.

Spannungsabhängige Kaliumkanäle bestehen aus vier Domänen mit jeweils sechs Segmenten. Diese Segmente sind in die Membran eingelagert und gehen über extra- und intrazelluläre Aminosäureketten ineinander über. Die Ionenpore, die einen Kaliumstrom ermöglicht, wird wahrscheinlich durch die Segmente 5, 6 und durch die verbindenden Aminosäureketten aller

vier Domänen gebildet. Kaliumkanäle werden bereits im Zuge der Depolarisation der Nervenzelle geöffnet, allerdings steigt der resultierende Kaliumausstrom nur sehr langsam an und erreicht sein Maximum erst, wenn die Natriumkanäle bereits geschlossen sind. Aufgrund der langsamen Inaktivierung von Kaliumkanälen kommt es vorübergehend nicht nur zu einer Repolarisation sondern zu einer Hyperpolarisation der Zelle. Durch Kaliumkanäle wird die Dauer eines Aktionspotentials limitiert, eine Rückkehr zum Ruhemembranpotential und damit erneute Erregbarkeit ermöglicht.

$K^+$ -Kanäle können nach der Anzahl der Transmembrandomänen in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Jene, die aus zwei Transmembrandomänen gebildet werden, werden auch als Kir-Kanäle oder einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle bezeichnet. Die aus vier Transmembrandomänen gebildeten Kanäle werden als K2P-Kanäle oder Kaliumleckkanäle bezeichnet. Eine dritte Gruppe bilden solche Kaliumkanäle, die aus sechs Transmembrandomänen bestehen. Sie werden als spannungsabhängige Kaliumkanäle oder Kv-Kanäle bezeichnet (Köhling und Wolfart 2016).

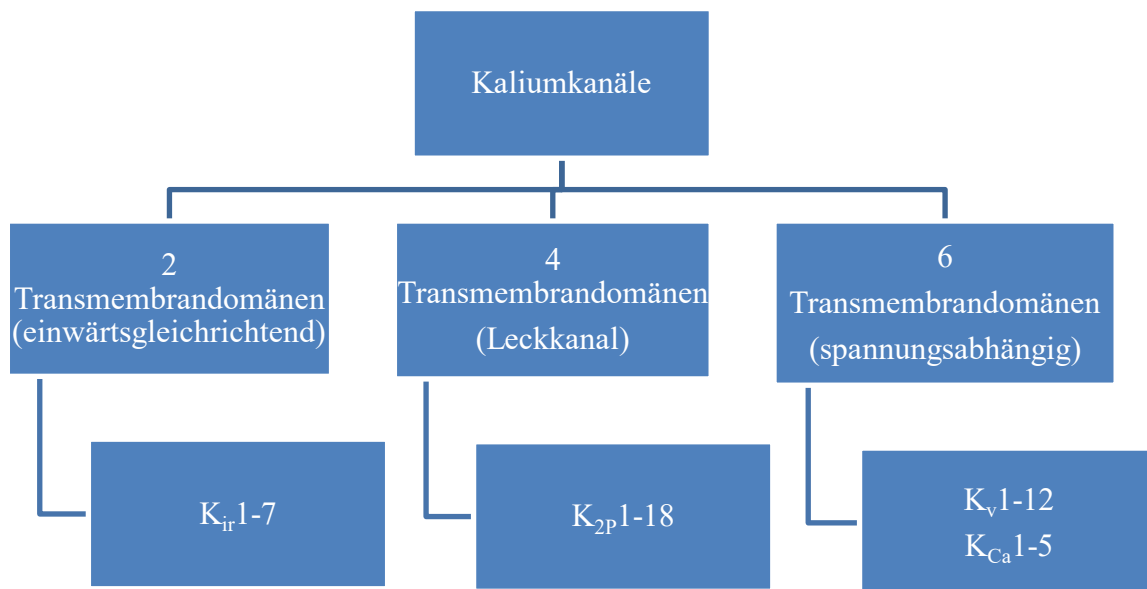


Abbildung 2: Einteilung Kaliumkanäle

Die Grafik gibt einen Überblick über die derzeitige Einteilung von Kaliumkanälen. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten können die Kanäle nach der Anzahl der Transmembrandomänen in Kanäle mit 2, 4 oder 6 Transmembrandomänen eingeteilt werden.

Da in der Forschung zur Epileptogenese ein Zusammenhang mit SK2-Kanälen, BK-Kanälen, Kv4.2-Kanälen, KIR 2.1- und KV7-Kanälen beobachtet wurde, wird im Folgenden eine Übersicht über den derzeitigen Forschungsstand gegeben.

### 1.5.2 SK2 Kanäle

SK2 Kanäle gehören zu der Gruppe der calciumaktivierten Kaliumkanäle. Sie kontrollieren die Aktivität verschiedener calciumkanäle und sind damit an der Steuerung verschiedener  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege, der Kontrolle der Amplitude und der Dauer des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beteiligt (Sun et al. 2020). Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen SK2 Kanälen und der Nachhyperpolarisation (AHP) haben gezeigt, dass Tiere, die zuvor mit Pilocarpin behandelt wurden, einen signifikant reduzierten SK-Kanal-vermittelten hyperpolarisierenden Auswärtsstrom haben. Damit einher geht die Abnahme des somatischen AHPs. (Schulz et al. 2012) fanden heraus, dass eine Hemmung des SK2-Kanals zu einer Verstärkung der  $0\text{-Mg}^{2+}$  induzierten epileptischen Aktivität in Hirnschnitten von chronisch epileptischen Tieren führt, nicht aber in Kontrolltieren. Sie schlossen daraus, dass die Netzwerkerregbarkeit in chronisch epileptischem Gewebe von der AHP-Vermittlung der verbleibenden SK Kanäle abhängt; eine Herunterregulation der SK2 führt daher zu einer akuten Netzwerkdekompensation.

### 1.5.3 BK Kanäle

Auch BK Kanäle gehören zu den calciumaktivierten Kaliumkanälen. Der Kanal kann sowohl spannungsgesteuert aktiviert werden als auch durch eine steigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Kanäle dienen als Rückkopplungssystem für den Calciumstrom und deaktivieren spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle oder steigern die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (N'Gouemo 2011). Eine Studie von Ermolinsky et al. (2008) zeigte, dass sich die Expression der *Kcnma1* mRNA, welche für die Expression von BK Kanälen und Maxikanälen verantwortlich ist, bei Tieren nach Pilocarpininjektion signifikant verringert. Im Vergleich zu Kontrolltieren verringerte sich die *Kcnma1* Expression nach 24 h um 21.6%, nach 10 Tagen um 32.7%, nach 1 Monat um 51% und nach mehr als 2 Monaten um 33.2%. Sowohl ein Funktionsverlust als auch ein Funktionsgewinn der  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  Kanäle kann zu Modifikationen der Refraktärzeit der assoziierten Leitfähigkeit führen und dadurch Anfallsaktivität induzieren (N'Gouemo 2011).

### 1.5.4 $\text{K}_{\text{v}4.2}$ Kanäle

$\text{K}_{\text{v}4.2}$  Kanäle gehören zu der Gruppe der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle. Gross et al. (2016) untersuchten die Herunterregulierung von  $\text{K}_{\text{v}4.2}$  Kanälen nach epileptischen Anfällen und das Potential von microRNA, den Kanal zu regulieren und so Anfälle zu hemmen. Sie fanden heraus, dass sowohl eine Behandlung mit Kainsäure als auch mit Pilocarpin bei Mäusen zu einem reduzierten  $\text{K}_{\text{v}4.2}$  Proteinlevel führt. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die mikro-RNA miR-324-5p für eine gehemmte  $\text{K}_{\text{v}4.2}$  Proteinexpression verantwortlich gemacht werden kann und eine gezielte Antagonisierung von miR-324-5p neuroprotektiv und anfallshemmend wirkt. An  $\text{K}_{\text{v}4.2}$  Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von  $\text{K}_{\text{v}4.2}$  Kanälen

mit einer gesteigerten Anfälligkeit für konvulsive Stimulation einhergeht. Daraus resultiert, dass ein Mangel an  $K_v4.2$  Kanälen zu einer abnormalen Erregbarkeit des Netzwerks führt und die Anfallsschwelle reduzieren kann (Forbes, L., Barnwell, S., Joaquin N. Lugo, Wai Ling Lee, Willis, S., Shira J. Gertz 2009).

#### 1.5.5. $K_{ir}2.1$ Kanäle

$K_{ir}2.1$  gehört zu der Gruppe der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle. Sie haben die Aufgabe, den Kaliumgrundstrom aufrecht zu halten (Stanfield et al. 2002). Im Kainsäure-Modell der Temporallappenepilepsie haben Young et al. (2009) herausgefunden, dass  $K_{ir}2.1$  Ströme bei von hypocampaler Sklerose (HS) betroffenen Körnerzellen des Gyrus dentatus stark verändert sind. Dadurch wird  $V_{rest}$  stabilisiert und die intrinsische Erregbarkeit sowie der Eingangswiderstand werden deutlich reduziert. Die betroffenen Körnerzellen des Gyrus dentatus mit HS zeigen eine chronische Hochregulierung der gesamten  $K_{ir}2$  Gruppe sowie der  $K_{2P}$  Kanäle  $TW1K1$  und  $TW1K2$  (Young et al. 2009). Eine verstärkte Expression von  $K_{ir}2$  Kanälen sowie von  $HCN1$  Kanälen führt zu einer verminderten Erregbarkeit der von HS betroffenen Körnerzellen (Stegen et al. 2012). Jorge et al. (2011) untersuchten die Modifikation des  $K_v2.1$ -Kanalmodifikators  $K_v8.2$  und ermittelten eine Korrelation dieser Mutation mit dem Auftreten einer schweren, vorzeitig tödlichen Form von Epilepsie. Dabei klassifizieren Jorge et al. (2011) das Gen  $KCN2$  als Epilepsie-Gen.

#### 1.5.6. $K_v7$ Kanäle

Auch der Gruppe von  $K_v7$  Kanälen wird im Zusammenhang mit Epilepsie eine große Bedeutung zugesprochen. Sie gehören zu der Gruppe der spannungsabhängigen Kaliumkanäle. Bis 2012 wurden bereits mehr als 60  $K_v7.2$ - und vier  $K_v7.3$ -Kanalmutationen gefunden. Es ist zu erwarten, dass weitere Kanalmutationen gefunden werden (Übersichtsartikel Köhling und Wolfart 2016).

Mutationen des  $K_v7.1$ -Kanals werden mit Epilepsie, frühem, unerwartetem Tod und dem langen QT-Syndrom assoziiert (Goldman et al. 2009), (Wang et al. 1996), (Barhanin et al. 1996), (Maslarova et al. 2013).  $K_v7.2$ - und  $K_v7.3$ -Kanäle, welche den M-Strom vermitteln, werden bei Mutationen mit BNFCs (Benign familial nocturnal convulsions) assoziiert (Maslarova et al. 2013). Ein ca. 25-prozentiger Kanalverlust von  $K_v7.2$ - und  $K_v7.3$ -Kanälen führt zur elektrischen Übererregbarkeit in BNFC (Björn C. Schroeder et al. 1998). Durch die Blockade des M-Stroms mittels Linopiridin kann epileptische Aktivität bei pilocarpinbehandelten Tieren provoziert werden (Maslarova et al. 2013), während Retigabin Anfälle verhindern kann (Qi et al. 2014) und die Verfügbarkeit von  $K_v7.2$ - und  $K_v7.3$ -Kanälen zu einem stärker hyperpolarisierten Potential verschiebt. Retigabin ist damit ein  $K_v7$ -

Kanalöffner, der über Modulation des M-Stroms antikonvulsive Wirkung hat (Main et al. 2000).

Das in dieser Forschungsarbeit verwendete XE991 (siehe Abb. 3) hemmt Kaliumkanäle der  $K_v7$ -Familie. Diese sind im Hippocampus besonders in Form der Untereinheiten 2 und 3 vertreten (Brown und Passmore 2009) und sind grundsätzlich prä- und postsynaptisch denkbar. Unter dieser Voraussetzung könnte XE991 die Präsynapse und/oder Postsynapse depolarisieren. In dem Netzwerk existieren gabaerge Interneurone, deren Transmitter GABA hemmend wirkt (siehe Abb. 3). Interneurone können prä- und postsynaptisch hemmen. Gabazin hemmt die  $GABA_A$  Rezeptoren und verhindert dadurch den hyperpolarisierenden Effekt, der physiologisch durch einen Einstrom von Chloridionen entsteht.

Weitere Forschungen nach möglichen Ansatzpunkten zur Regulation der Epilepsieerkrankung und einer Reduktion der Krampfanfälle richteten die Aufmerksamkeit auf die Casein-Kinase 2. Es ist bekannt, dass diese Einfluss auf zahlreiche Stoffwechselwege hat, und sie wurde auch in neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Morbus Corea Huntington, Spinocerebelläre Ataxie und Amyotrophe Lateralsklerose als wichtiger Regulator enttarnt (Borgo et al. 2021). Jüngst veröffentlichte Ergebnisse von Borgo et al. (2021) stützen die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen Mutationen der CK2 und dem Auftreten von Epilepsieerkrankungen.

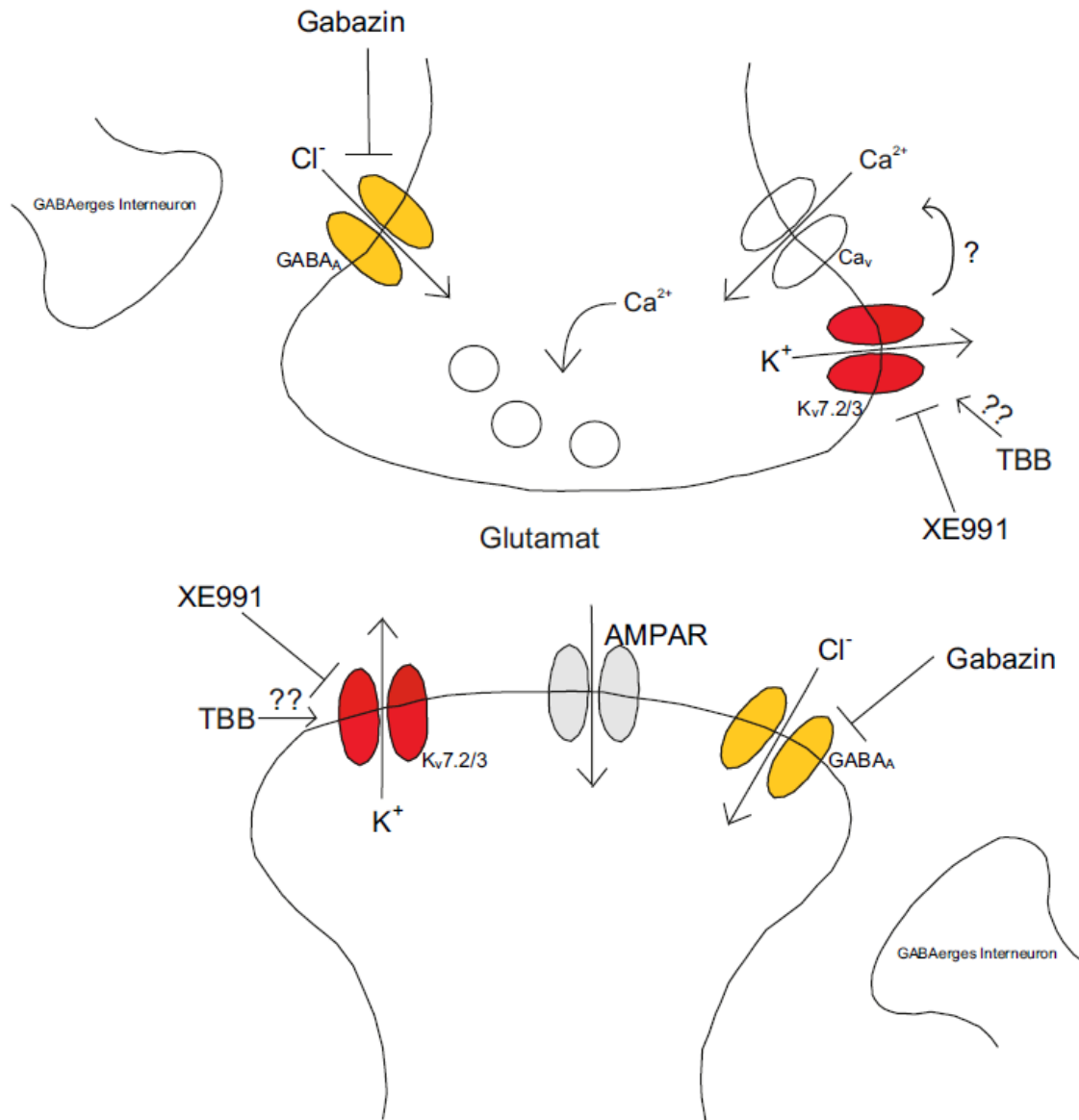


Abbildung 3: Darstellung einer Prä- und Postsynapse

Die Abbildung zeigt eine mögliche Situation an der Prä- und Postsynapse und den  $GABA_A$ -ergen Interneuronen. Die eingesetzten Substanzen sind dargestellt: XE991 hemmt  $K_v7.2/3$ -Kanäle und dadurch den Kaliumausstrom. Gabazin hemmt  $GABA_A$  Rezeptoren und dadurch den Chloridioneneinstrom, es resultiert eine enthemmende Wirkung. ? deutet auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Aktivität der  $K_v7$ -Kanäle und dem Calciumeinstrom und einen damit verbundenen Effekt auf die Vesikelfreisetzung hin; diese könnte durch die Erhöhung der Verfügbarkeit gesteigert oder Erhöhung der Schwelle gesenkt werden. ?? Deutet auf einen fraglichen Effekt von TBB auf die  $K_v7.2/3$ -Kanäle hin.

## 1.6. Zielstellung

Epilepsie ist eine Erkrankung, die nach wie vor nur symptomatisch mit antiepileptischen Arzneimitteln behandelt wird. Die Notwendigkeit weiterer Ursachenforschung und der Entwicklung eines ursächlichen Therapieansatzes wird im Falle der Temporallappenepilepsie offensichtlich, denn nur etwa 40% der Patienten sprechen auf die derzeit übliche medikamentöse Therapie an. Erste Ansätze mit TBB (Caseinkinase-2-Inhibitor 4,5,6,7-Tetrabromtriazol) liefern interessante Ergebnisse, die auf eine Hochregulation von KCa2.2 im Neocortex und der CA1-Region hinweisen (Bajorat et al. 2018). Als weiterer Ansatzpunkt sind in der letzten Zeit Kaliumkanäle der Kv7-Familie entlarvt worden (Köhling und Wolfart 2016). Ergebnisse unserer Forschungsgruppe (Karthaus 2021) zeigen, dass es im Pilocarpinmodell zu einer Reduktion der Kv7-Kanäle auf Transkriptionsebene kommt.

Folgende Fragestellungen sollen in der vorliegenden Arbeit untersucht werden:

- 1.) Inwiefern verändert sich die Funktion der Kv7-Kanäle im Pilocarpinmodell?
- 2.) Hat eine frühe TBB Behandlung nach dem Status epilepticus einen Einfluss auf die Funktion der Kv7-Kanäle?

## 2 Material und Methode

### 2.1 Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Calciumchlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Diazepam	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Diethylether	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
DMSO	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Gabazin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MMF	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
N-Methylscopolamin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Linde, Pullach, Deutschland
Pilocarpin	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Saccharose	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TBB	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

XE991

Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-  
Nordenstadt, Deutschland

## 2.2 Mehr- und Einwegartikel

### **Bezeichnung**

### **Hersteller**

Ablaufbecher

Schott, Mainz, Deutschland

Becherglas

Schott, Mainz, Deutschland

chlorierte Mess und Stimulationselektrode

Science Products, Hofheim, Deutschland

Crushed Ice

Scotsman, Milan, Italien

Filterpapier

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Glasflaschen

Schott, Mainz, Deutschland

Glaspipetten

Science Products, Hofheim, Deutschland

Löffel

Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland

Messkolben

Hirschmann, Eberstadt, Deutschland

Messzylinder

Brand, Wertheim, Deutschland

Pinsel

Henry Schein, Deutschland

Pinzette

Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland

Pipettenaufsätze

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Platzierungszange

Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland

Rasierklinge

Campden Instruments, Campden, England

scharfer Löffel/ abgerundetes Skalpell

Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland

Schere

Geuder AG, Heidelberg, Deutschland

Sekundenkleber

UHU, Bühl, Deutschland

Silikonschläuche

Braun, Melsungen, Deutschland

Skalpell	P.J. Dahlhausen & Co.GmbH, Köln, Deutschland
Spritze mit langer, dünner Kanüle	P.J. Dahlhausen & Co.GmbH, Köln, Deutschland
Thermobox	Schaupalast, Reilingen, Deutschland
Trägerkammer mit Nylonnetz	Eigenbau, Institut für Physiologie, Universität Rostock, Deutschland
Transferpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 2.3 Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Analog-Digital-Konverter Micro 1401	CED, Cambridge, England
Computer mit Windows 2007	hp, Palo Alto, USA
Elektrodenfüße	Noga Engineering & Technology, Shlomi, Israel
Faradaykäfig	Eigenbau, Institut für Physiologie, Universität Rostock, Deutschland
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Frequenzgenerator Master 8	A.M.P.I., Jerusalem, Israel
Guillotine	Stoelting, Wood Dale, USA
Heizung TC-10	Npi electronics, Tamm, Deutschland
Kabel	Institut für Physiologie, Universität Rostock, Deutschland
Krokodilkammern	Institut für Physiologie, Universität Rostock, Deutschland
Kühl- und Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland

Lampe	Schott, Mainz, Deutschland
Magnetrührer, Magnetfisch	IKA, Staufen, Deutschland
Messkammer	Eigenbau, Institut für Physiologie, Universität Rostock, Deutschland
MICRO 1401	CED. Cambridge Electronic Design, Cambridge, United Kingdom
Mikroskop	Nikon Instruments, Melville, USA
Minipiuls 3 Pumpe	Gilson, Villieres le Bel, Frankreich
Osmometer	Automatic, Knauer, Berlin, Deutschland
PH-Meter	Omnilab, Gehrden, Deutschland
Pipettengerät	PIP5 from HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany
Pipettenziehgerät	HEKA, Ludwigshafen, Deutschland
Pulsstimulator A365	WPI, Saratota, USA
Silberdraht	Science Products, Hofheim, Deutschland
Interfacekammer	BSC-HAT, Harvard Apparatus, Holliston, USA
Temperaturregler	Npi electronics, Tamm, Deutschland
Tierkäfig/ Narkosekäfig	Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland
Tisch, schwingungsgedämpft	TMC, Peabody, USA
Vibratom	Campden Instruments, Campden, England
Wärmebad	Haake, Vreden, Deutschland

## 2.4 Lösungen

Für den Ablauf der Versuchsreihe wurden drei verschiedene Lösungsansätze verwendet. Alle Lösungen wurden im 5-Liter-Maß angesetzt. Für den Präparationsvorgang wurde eine Saccharoselösung verwendet, diese bestand aus 25,4214 g NaCl, 10,50125 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,932 g KCl, 0,75 g NaHPO<sub>4</sub>, 0,2775 g CaCl<sub>2</sub>, 3,3327 g MgCl<sub>2</sub>, 9,01 g Glucose, 128,3625 g Saccharose. Die Lösung wurde auf eine Osmolarität zwischen 326 und 328 mosmol/l eingestellt.

Nach der Präparation wurden die Schnitte in ACSF (Artificial Cerebrospinal Fluid) gelagert. Dieses bestand aus 36,525 g NaCl, 10,9213 g NaHCO<sub>3</sub>, 1,1184 g KCl, 0,75 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3875 g CaCl<sub>2</sub>, 0,61893 g MgCl<sub>2</sub>, 9,008 g Glucose. Die Lösung wurde auf eine Osmolarität zwischen 306-314 mosmol/l eingestellt.

Außerdem wurde eine ACSF Lösung ohne Mg<sup>2+</sup> angesetzt, diese bestand aus 36,525 g NaCl, 10,9213 g NaHCO<sub>3</sub>, 1,1184 g KCl, 0,75 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3875 g CaCl<sub>2</sub>, 9,008 g Glucose. Die Lösung wurde auf eine Osmolarität zwischen 306-314 mosmol/l eingestellt.

Alle Lösungen wurden auf einen pH-Wert zwischen 7,38 und 7,4 eingestellt.

## 2.5 Stammlösungen

XE991 wurde als 20 millimolare Stammlösung angesetzt.

Gabazin wurde als 5 millimolare Stammlösung angesetzt.

## 2.6 Tierhaltung

Für die Versuchsreihe wurden ausschließlich männliche Wistarratten (120-160 g) der Firma Charles River, Sulzfeld, verwendet. Tierpflegerin Hanka Schmidt versorgte die Tiere, so dass ihnen Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung stand. Der Raum wurde im Tag-Nacht Rhythmus zwölf Stunden pro Tag beleuchtet (Tag 6-18 Uhr, Nacht 18-6 Uhr). Die Tiere wurden in abgeschlossenen, klimatisierten Räumen in Einzelkäfigen gehalten.

## 2.7 Behandlung mit Pilocarpin und TBB

Die Tiere wurden am Schwanz beschriftet und gewogen. Nach Berechnung der gewichtsspezifischen Dosis wurde den Tieren N-Methylscopolamin als Anticholinergikum zur Reduktion der Letalität und Nebenwirkungen intraperitoneal gespritzt (1 mg/kg Körpergewicht). Danach wurde eine Pause von 30 min eingelegt und anschließend Pilocarpin intraperitoneal injiziert (340 mg/kg Körpergewicht). Nach ungefähr 5 min konnten bei den Tieren erste leichte Anfälle beobachtet werden, die im Verlauf stärker wurden und sich schließlich als Status epilepticus etablierten. 40 min nach Eintritt des Status epilepticus wurde dieser mittels Diazepam (40 mg/kg Körpergewicht) beendet. Die Versuchsreihe der TBB-Tiere erhielt zusätzlich in DMSO gelöstes TBB intraperitoneal gespritzt (6 nmol/g Körpergewicht). Die Pilocarpiertiere erhielten anstatt Pilocarpin isotone NaCl-Lösung. Die TBB-Kontrolltiere erhielten anstatt TBB nur das Lösungsmittel DMSO. Die Tiere wurden mit 5 % Glukoseflüssigkeit und zusätzlich zu dem üblichen Futter und Wasserangebot mit angefeuchtetem Futter und einem Papiertuch als Aspirationsschutz und Unterkühlungsschutz versorgt.

## 2.8 Dekapitierungsvorgang

Jedes Versuchstier wurde durch einen befugten Mitarbeiter des Oscar Langendorff Instituts aus der Haltung dokumentiert entnommen und aus dem Haltungskäfig in den Narkosekäfig umgesetzt. Anschließend wurde das Tier mit Diethylether betäubt. Die ausreichende Narkosetiefe wurde anhand des Verlusts der Haltereфлекse, Stellreflexe und Schmerzreflexe überprüft, das Tier anschließend in die Kleintierguillotine gelegt und dekapitiert.

## 2.9 Präparation

Mit einem Skalpell oder einer Schere wurde durch sagittale Schnittführung das Fell vom Ansatz der Nackenmuskulatur bis zwischen die Augen aufgeschnitten. Anschließend wurden ausgehend vom Foramen magnum zwei knöcherne Lateralschnitte sowie ein Medianschnitt

entlang der Fissura longitudinalis ausgeführt und dadurch das Os occipitale aufgebrochen. Mit der Pinzette wurden die Kalottenfragmente abgenommen. Das Gehirn lag nun offen. Zunächst wurde das Cerebellum mit Hilfe eines Skalpell abgetrennt, anschließend wurden mit einem scharfen Löffel die Sehnerven vom Gehirn getrennt und das frei bewegliche Gehirn in ein Becherglas mit gekühlter, begaster Saccharoselösung gegeben. Der ganze Präparationsprozess dauerte zwischen 60 und 90 Sekunden, so dass Hypoxieschäden vermieden wurden.

## 2.10 Slicevorgang

Die Rasierklinge wurde mithilfe des Inbusschlüssels in das Vibratom eingespannt. Die Schnittkammer wurde mit Saccharoseeiswürfeln und halb voll mit flüssiger Saccharoselösung gefüllt, in das Außenbecken wurde Crushed Ice gefüllt. Ein Tropfen Sekundenkleber wurde auf den Slicetisch gegeben. Das Rattengehirn wurde mit dem Löffel aus der Saccharoselösung genommen, auf dem Filterpapier abgelegt und dann mithilfe der Platzierungszange auf den Slicetisch platziert, wo es durch den Sekundenkleber festklebte. Die Schnittkammer wurde soweit mit Saccharoselösung aufgefüllt, bis das Gehirn vollständig bedeckt war. Sowohl die Schnittkammer als auch das Becherglas wurden kontinuierlich mit CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> begast. Die Schnittkammer wurde hochgefahren, so dass die Rasierklinge sich in etwa auf Höhe der A. cerebri media befand. Nachdem durch den ersten Schnitt der Hippocampus sichtbar wurde, erfolgte die Einstellung der Schnittdicke auf 400 µm bei einer Frequenz von 100 Hz und einer Geschwindigkeit von 0,09 mm/sec. Im Folgenden wurden zwischen 8 und 12 Schnitte angefertigt. Jeder Schnitt wurde durch die Manövriehilfen mit Kanülenansatz vom Gehirn getrennt und mittels Transferpipette aus der Schnittkammer in das Becherglas mit ACSF Standard auf die Transporthilfe gesetzt. Es wurde insbesondere darauf geachtet, dass sich die Hippocampusschnitte nicht überlappten und jeder Hippocampusschnitt vollständig und blasenfrei mit ACSF-Standard umspült wurde.

## 2.11 Durchführung der Messung

Um Lösungsreste aus vorhergegangenen Messungen vollständig ausschließen zu können, wurde die Messkammer zunächst mit 50 ml destilliertem Wasser durchgespült. Glaspipetten wurden im Pipettenzieher gezogen und mit ACSF Standard blasenfrei gefüllt. Die Silberelektroden wurden eingesteckt, in den Elektrodenfuß eingespannt und mit Hilfe der Krokodilkammern angeschlossen. ACSF Standard und ACSF ohne Mg<sup>2+</sup> wurden in die 1000 ml Glasflaschen gefüllt und in das Wärmebad gestellt. Um ein Umkippen zu verhindern, wurden die Flaschen beschwert. Die Begasung wurde in die Flaschen eingehängt und ACSF

Standard durch die Messkammer geleitet. Mithilfe des Thermometers erfolgte dauerhaft eine Überprüfung der Temperatur von 32°Celsius; dabei wurden ggf. Abweichungen durch Erwärmung bzw. Kühlung mittels Heizung ausgeglichen. Mithilfe der Transferpipette wurde ein Schnitt in die Trägerkammer auf das Nylonnetz gesetzt und ausgerichtet. Unter Zuhilfenahme eines Mikroskops und externer Beleuchtung konnten die Elektroden im Bereich der Schaffer-Kollateralen platziert werden. Dabei saß die Stimulationselektrode in der CA2/3 Region vor der Ableitungselektrode. Die korrekte Platzierung der Elektroden konnte durch einen Stromimpuls mit anschließender Reizantwort und Aufzeichnung in dem Programm „Signal“ überprüft werden. Anschließend wurde das EPSP bei steigenden Stimulationsstärken von 0, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 und 300  $\mu$ A aufgezeichnet.

## 2.12 Analyse der Daten und grafische Darstellung

In der Analyse der Daten wurde sowohl die Änderung der Amplitude, die aus der ersten Stimulation resultierte, betrachtet (Input-Output-Kurve), als auch das Verhältnis zwischen erster und zweiter Messung (Paired Puls Ratio).

Mithilfe der Paired Puls Ratio kann eine Aussage über eine erfolgte Depression bzw. Bahnung getroffen werden. Dabei gilt:

Wert  $<1$   $\rightarrow$  2. Reizantwort ist schwächer als 1. Reizantwort  $\rightarrow$  Depression

Wert  $= 1$   $\rightarrow$  2. Reizantwort genauso groß wie 1. Reizantwort

Wert  $>1$   $\rightarrow$  2. Reizantwort ist stärker als 1. Reizantwort  $\rightarrow$  Bahnung

## 2.13 Statistik und grafische Abbildung der Daten

Die in dem Programm „Signal 2.16“ (Cambridge Electronic Design, Cambridge, Vereinigtes Königreich) erhobenen Daten sind in voneinander unabhängigen Messungen erhoben worden. Sie wurden mit dem Programm MS Office Excel 2010 (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland) gemittelt, und der Standardfehler wurde berechnet.

Die Daten wurden mithilfe des Programms „Sigma Stat“ (Systat Software, Point Richmond, USA) unter Verwendung des Tukey Tests auf Signifikanz getestet. Als signifikant werden Daten mit einem p-Wert von  $p = 0,05$  gewertet.

Mittels zwei-faktorieller Varianzuntersuchung (Two Way ANOVA) ließen sich signifikante Unterschiede zwischen mehreren Versuchsgruppen ermitteln.

## 2.14 Messungen im Gyrus dentatus

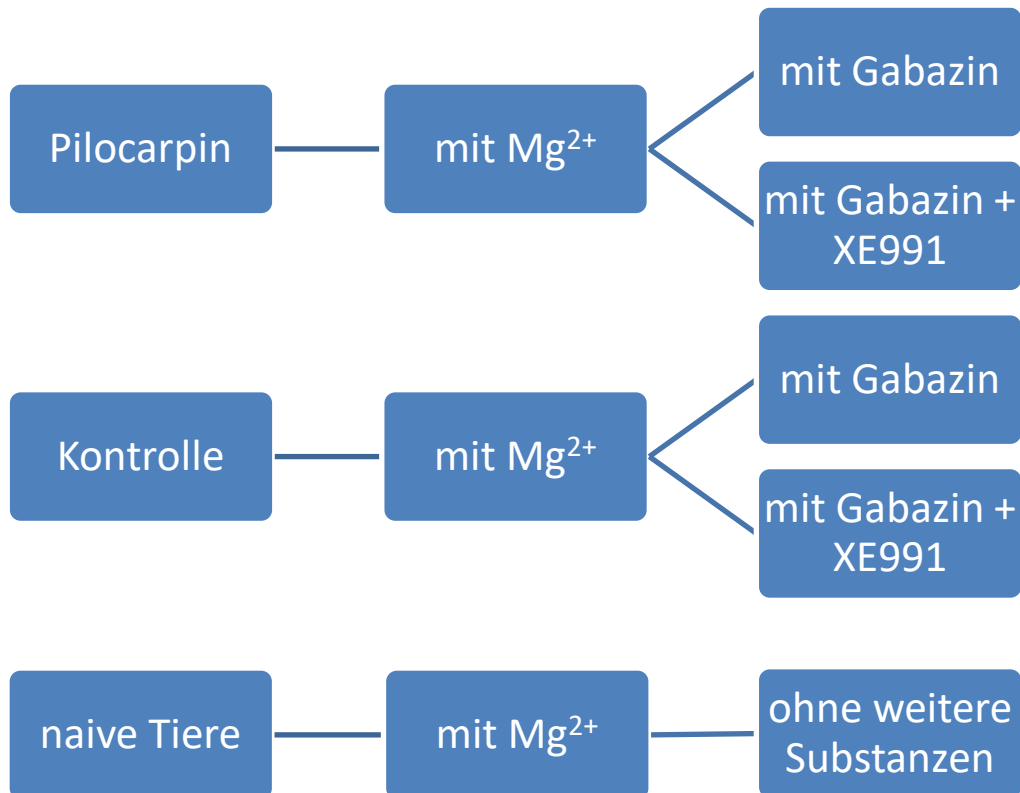


Abbildung 4: Einteilung der Versuchsgruppen für Messungen im Gyrus Dentatus

Es wird das Vorgehen der Behandlung der Tiere nach der jeweiligen Gruppe dargestellt. Die einzelnen Tiere wurden den Gruppen unter zweifacher Verblindung zugeteilt. Tiere der Pilocarpingruppe erhielten zunächst Methylscopolamin und Pilocarpin und anschließend Diazepam und Glucoselösung. Erst die Hippocampuschnitte wurden Gabazin bzw. Gabazin + XE991 ausgesetzt. Die Kontrollgruppe erfuhr zunächst eine Behandlung mit NaCl und anschließend mit Diazepam und Glucoselösung. Auch hier erfolgte die Behandlung mit Gabazin bzw. Gabazin + XE991 erst am präparierten Hippocampuschnitt. Die Messungen an naiven Tieren erfolgten ohne die Zugabe von Versuchssubstanzen in ACSF Standard.

## 2.15 Messungen in der CA1-Region

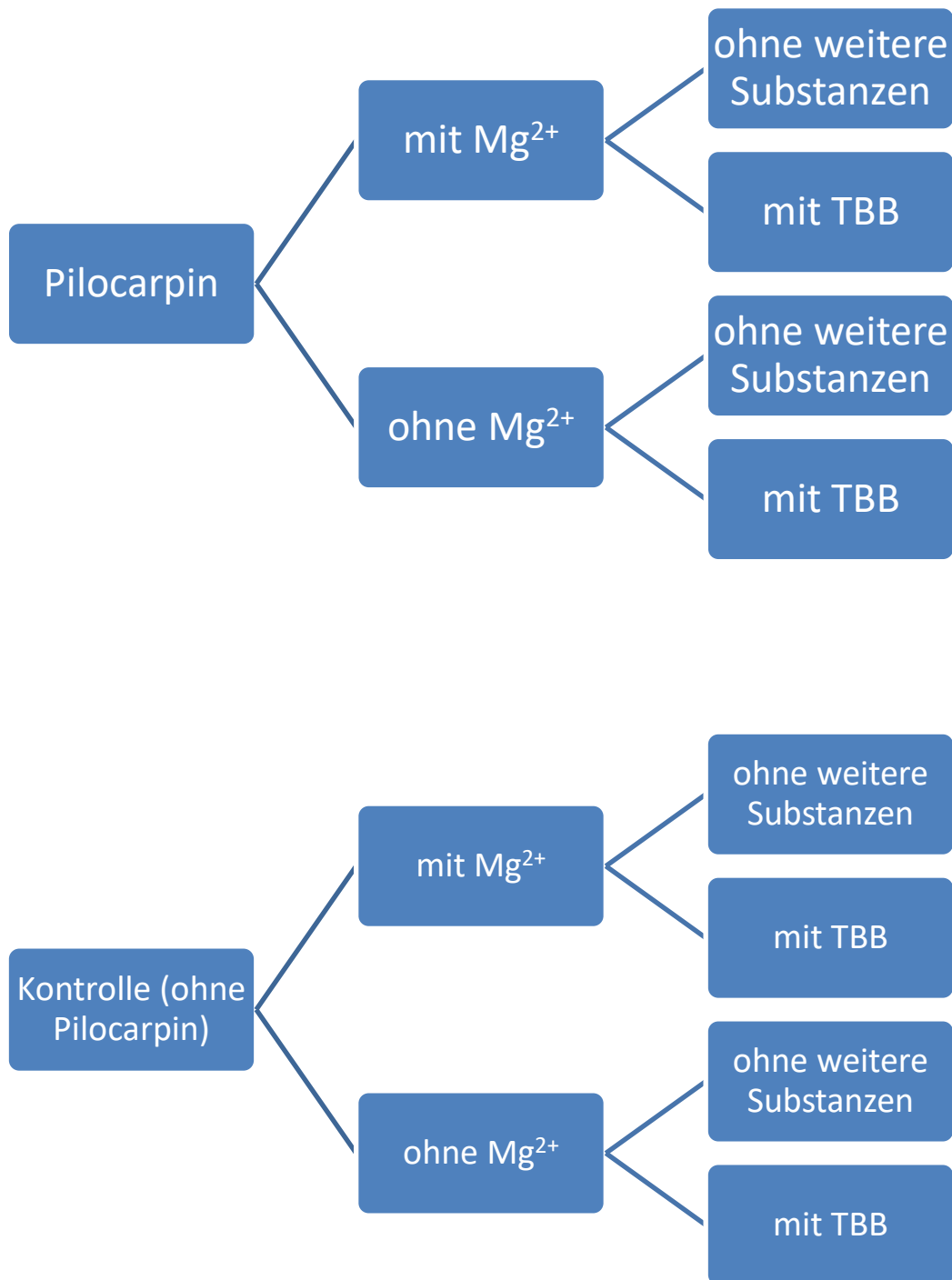


Abbildung 5: Einteilung der Versuchsgruppen für Messungen in der CA1-Region des Hippocampus

Dargestellt ist die Einteilung der Versuchstiere in eine Pilocarpingruppe und eine Kontrollgruppe. Die Einteilung erfolgte unter doppelter Verblindung. Beide Gruppen wurden unter magnesiumhaltiger und magnesiumfreier Lösung und unter zusätzlicher Gabe von TBB untersucht.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Effekt von Gabazin und Gabazin + XE991 auf naive Tiere und Kontrolltiere

Um den Effekt des GABA<sub>A</sub> Rezeptorantagonisten Gabazin und die Kombination aus Gabazin mit dem K<sub>v</sub>7-Kanalblocker XE991 zu untersuchen (Abbildung 6), erfolgten Aufzeichnungen evozierter Potentiale im Sinne einer Feldpotentialmessung. Anhand der Änderung der Amplitude sollte der Effekt der Pharmaka an Hippocampusschnitten von Tieren sichtbar gemacht werden, die vorab keine Behandlung mit Pilocarpin erfahren hatten, also nicht epileptisch waren.

Im Vergleich der Daten ist erkennbar, dass die Hippocampusschnitte aus der Gruppe der naiven Tiere (n = 5) die kleinste Amplitude zeigten (150 µA: -1,84 ± 0,45 mV). Die Hippocampusschnitte der Gruppe der Kontrolltiere, die zusätzlich Gabazin erhalten haben (n = 35), zeigten eine Veränderung der Amplitude; diese war jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu den Ergebnissen der Kontrollgruppe ohne Gabazin (p = 0,066). Die Hippocampusschnitte der Kontrolltiere, die sowohl Gabazin als auch XE991 erhalten haben, reagierten mit einer ausgeprägten Steigerung der Amplitude (n = 22; 150 µA: -3,03 ± 0,48 mV). Statistisch ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen von Hippocampusschnitten von naiven Tieren und Schnitten der Kontrollgruppe, die Gabazin + XE991 bekommen hat, feststellen (p ≤ 0,001). Außerdem bestand ein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen zwischen den Schnitten der Kontrollgruppe, die mit Gabazin behandelt wurde, und denen der Kontrollgruppe, die mit Gabazin + XE991 behandelt wurde (p ≤ 0,001).

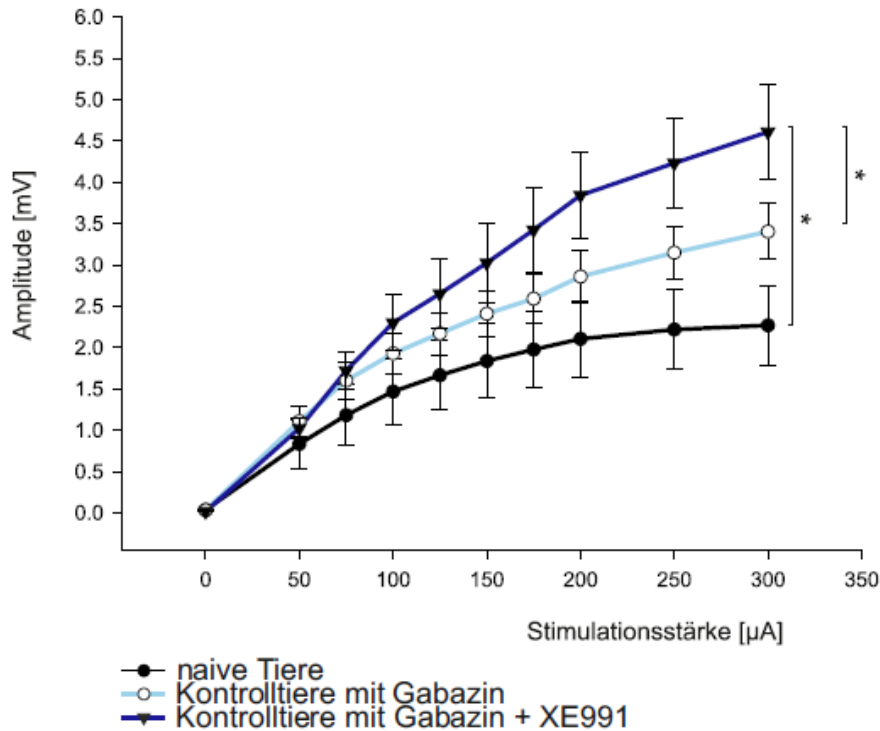


Abbildung 6: Die Effekte von Gabazin und der Kombination von Gabazin + XE991

Dargestellt ist die Input-Output-Kurve, die Amplitude (in mV) ist gegen die Stimulationsstärke ( $\mu\text{A}$ ) aufgetragen. Der Stern (\*) weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen den farblich eingezeichneten Versuchsgruppen hin (naive Tiere: schwarz; Kontrolltiere mit Gabazin: hellblau; Kontrolltiere mit Gabazin + XE991: dunkelblau).

In der Betrachtung der Verhältnisse zwischen erster und zweiter Reizantwort (Abbildung 7) wurde sichtbar, dass die Hippocampuschnitte der Kontrolltiere, die Gabazin + XE991 bekommen haben, bei mittlerer Stimulationsstärke eine geringe Bahnung erfuhren ( $n = 14$ ;  $150 \mu\text{A}$ :  $1,02 \pm 0,03 \text{ mV}$ ), während es bei niedrigen und hohen Stimulationsstärken eher zu einer Depression kam. Hippocampuschnitte von Kontrolltieren, die nur Gabazin bekommen haben, wiesen unabhängig von der Stimulationsstärke eine Depression auf ca. 80 % der ersten Reizantwort auf ( $n = 27$ ). Das Doppelpulsverhältnis der Hippocampuschnitte der naiven Tiere zeigte bei steigender Stimulation eine Depression der Amplitude ( $n = 5$ ;  $150 \mu\text{A}$ :  $0,67 \pm 0,08 \text{ mV}$ ). Signifikante Unterschiede im Doppelpulsverhältnis bestanden zwischen den Ergebnissen von Schnitten der Kontrolltiere mit Gabazin + XE991 und der Gruppe der naiven Tiere ( $p \leq 0,001$ ). Ebenfalls ließ sich dies zwischen Hippocampuschnitten der Kontrolltiere mit Gabazin und Hippocampuschnitten der naiven Tiere ( $p \leq 0,001$ ), sowie der Kontrolltiere mit Gabazin + XE991 und der Kontrolltiere mit Gabazin ( $p \leq 0,001$ ) feststellen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Gabazin die Amplitude des EPSP signifikant steigerte und dass die Kombination aus Gabazin + XE991 diesen Effekt signifikant weiter übertraf.

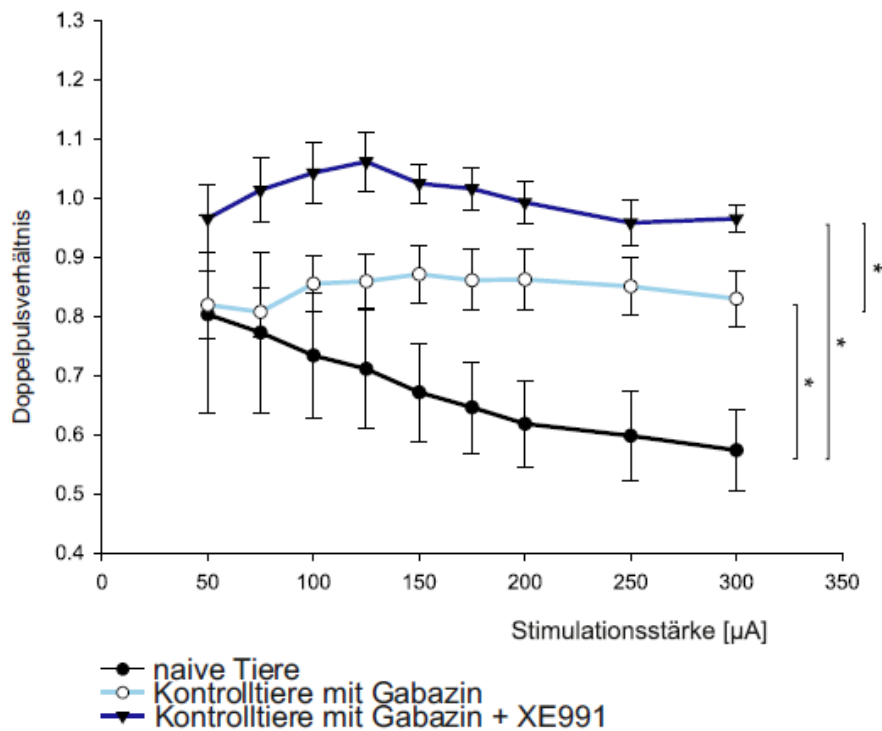


Abbildung 7: Effekte von Gabazin und Gabazin + XE991 auf das Doppelpulsverhältnis

In der Abbildung ist das Doppelpulsverhältnis gegen die Stimulationsstärke ( $\mu\text{A}$ ) aufgetragen. Der Stern (\*) weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen den farblich eingezeichneten Versuchsgruppen hin (naive Tiere: schwarz; Kontrolltiere mit Gabazin: hellblau; Kontrolltiere mit Gabazin, mit XE991: dunkelblau). Das Doppelpulsverhältnis der Hippocampusschnitte von Kontrolltieren, die Gabazin bekommen haben, wies unabhängig von der Stimulationsstärke eine Depression auf ca. 80 % der ersten Reizantwort auf. Das Doppelpulsverhältnis der Schnitte von naiven Tiere wies bei steigender Stimulationsstärke eine Depression auf, während Hippocampusschnitte von Kontrolltieren mit Gabazin + XE991 ein konstantes Doppelpulsverhältnis um 1 zeigten.

In den Originalableitungen (Abbildung 8) waren die Veränderungen unter der Behandlung der Hippocampusschnitte mit Gabazin bzw. Gabazin in Kombination mit XE991 sichtbar.

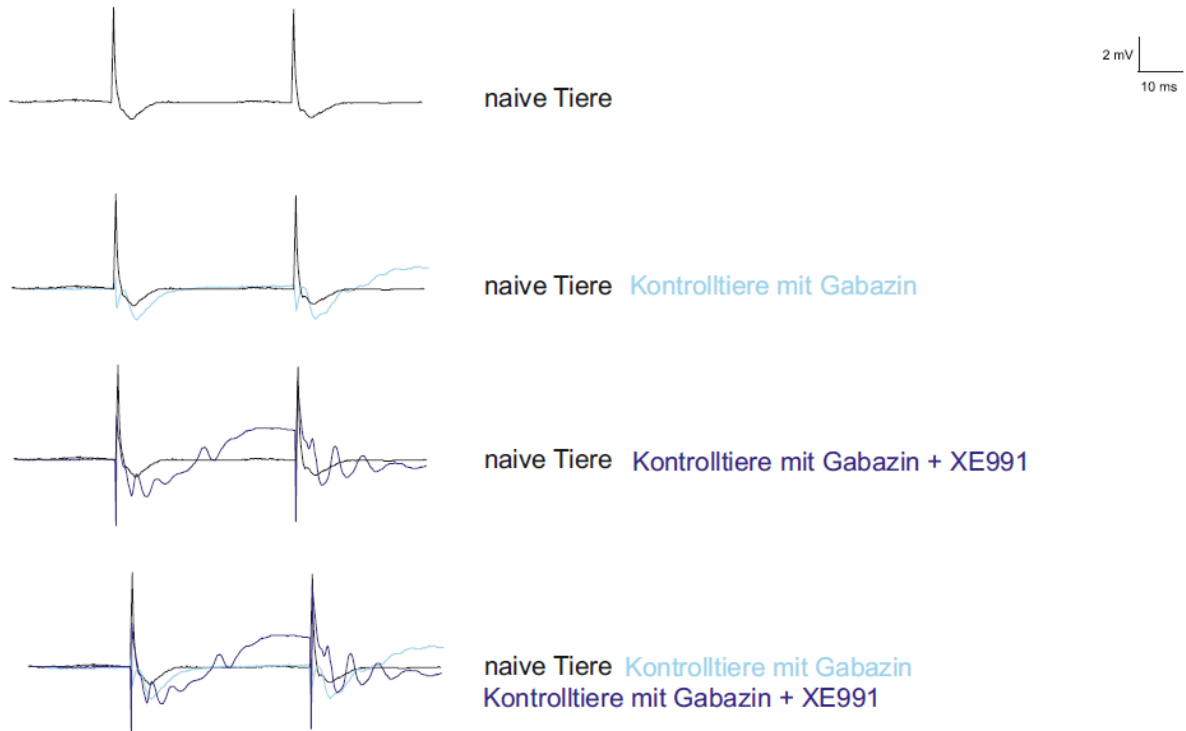


Abbildung 8: Originalableitungen der drei Versuchsgruppen im Vergleich

Die Abbildung zeigt Originalableitungen, die nach einer Stimulation mit 150  $\mu$ A im Gyrus dentatus des Hippocampus aufgezeichnet werden konnten. Es erfolgte ein Vergleich der Ableitungen der Versuchsgruppen im Bezug zur Versuchsgruppe „naive Tiere (schwarz)“. Deutlich werden Veränderungen in der Amplitude und in der Rückkehr zum Ruhemembranpotential. Die Hippocampusschnitte der Kontrollgruppe mit Gabazin (hellblau) zeigten eine Steigerung der Amplitude mit einer schnellen Rückkehr zum Ruhemembranpotential nach der ersten Stimulation. Im Gegensatz dazu wurde in der Ableitungsspur der Kontrollgruppe mit Gabazin + XE991 (dunkelblau) sichtbar, dass es zwischen erster und zweiter Stimulation nicht zur Rückkehr auf das Ruhemembranpotential kam.

### 3.2 Effekt von Gabazin + XE991

Im Folgenden vergleiche ich den Effekt, der von einer Zugabe von Gabazin + XE991 auf pilocarpinbehandelte Tiere ausgeht, mit den Daten der Kontrolltiere (Abbildung 7). Die evozierten Feldpotentiale wurden im Gyrus dentatus abgeleitet, alle Messungen erfolgten an chronisch epileptischen Tieren frühestens vier Wochen nach der Pilocarpingabe. Bei der Betrachtung der Input-Output-Kurve ließ sich feststellen, dass die Amplitude der Hippocampusschnitte aus der Gruppe der Kontrolltiere, die mit Gabazin behandelt wurden, am kleinsten war ( $n = 35$ ;  $150 \mu\text{A}$ :  $-2,41 \pm 0,27 \text{ mV}$ ). Schnitte von mit Pilocarpin behandelten Tieren (Pilotiere), die sowohl Gabazin als auch XE991 bekommen haben ( $n = 28$ ;  $150 \mu\text{A}$ :  $-2,71 \pm 0,30 \text{ mV}$ ), zeigten eine größere Amplitude als die Schnitte der Kontrolltiere mit Gabazin aber eine kleinere Amplitude als die Hippocampusschnitte von Kontrolltieren mit Gabazin + XE991 ( $n = 22$ ;  $150 \mu\text{A}$ :  $-3,03 \pm 0,48 \text{ mV}$ ). Die Schnitte der Kontrolltiere mit Gabazin + XE991 hatten die zweitgrößte Amplitude und die der Pilotiere mit Gabazin hatten die größte Amplitude ( $n = 23$ ,  $150 \mu\text{A}$ :  $-3,45 \pm 0,24 \text{ mV}$ ).

Im statistischen Vergleich der Ergebnisse zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Hippocampusschnitten der Kontrolltiere mit Gabazin und der Kontrolltiere mit Gabazin + XE991 ( $p \leq 0,001$ ). Auch die Ergebnisse der Kontrolltiere mit Gabazin waren signifikant unterschiedlich zu denen der Pilotiere mit Gabazin ( $p \leq 0,001$ ). Des Weiteren erwiesen sich die Schnitte der Pilotiere mit Gabazin + XE991 als signifikant unterschiedlich zu den Schnitten der Kontrolltiere mit Gabazin + XE991 ( $p \leq 0,001$ ).

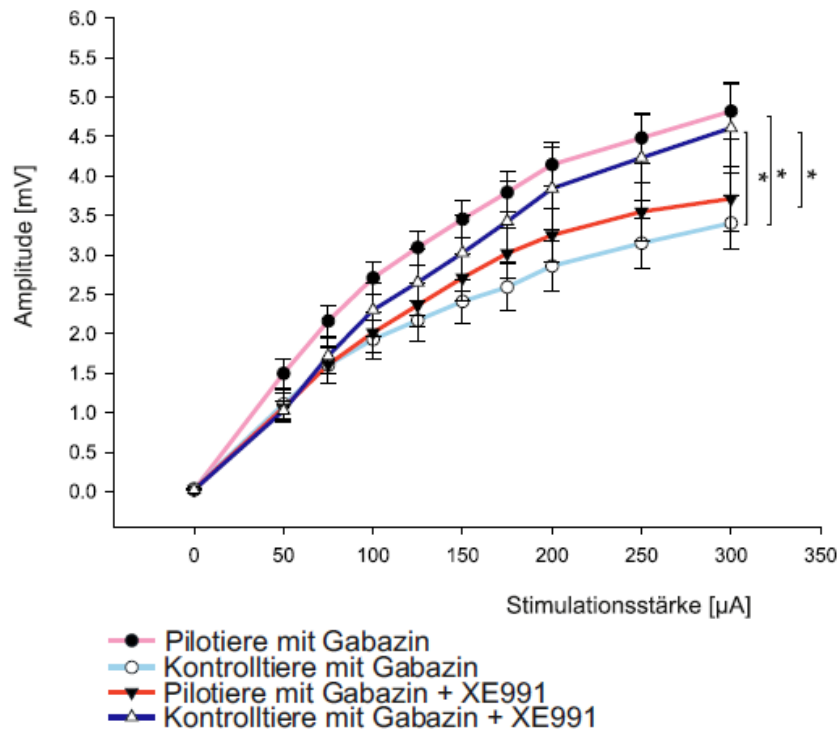


Abbildung 9: Der Effekt von Gabazin und Gabazin + XE991 auf Pilotiere im Vergleich zu Kontrolltieren

Dargestellt ist die Input-Output-Kurve. Die Amplitude (in mV) ist gegen die Stimulationsstärke ( $\mu\text{A}$ ) aufgetragen. Der Stern (\*) weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen den farblich eingezeichneten Versuchsgruppen hin (Pilotiere mit Gabazin: rosa; Kontrolltiere mit Gabazin: hellblau; Pilotiere mit Gabazin + XE991: rot; Kontrolltiere mit Gabazin + XE991: dunkelblau). Schnitte von Pilotieren mit Gabazin zeigten im Vergleich zu den Hippocampuschnitten der anderen Versuchsgruppen und bei allen Stimulationsstärken die größte Amplitude.

In der Betrachtung der Paired Puls Ratio (Abbildung 10) war deutlich zu sehen, dass sowohl das Doppelpulsverhältnis der Hippocampuschnitte der Pilotiere mit Gabazin ( $n = 10$ ,  $150 \mu\text{A}$ :  $0,79 \pm 0,05 \text{ mV}$ ), als auch der Kontrolltiere mit Gabazin ( $n = 27$ ;  $150 \mu\text{A}$ :  $0,87 \pm 0,05 \text{ mV}$ ) eine Depression aufwiesen. Die Schnitte der Kontrolltiere mit Gabazin+XE991 zeigten ein konstantes Doppelpulsverhältnis ( $n = 14$ ,  $150 \mu\text{A}$ :  $1,02 \pm 0,03 \text{ mV}$ ). Auffällig war der starke Abfall in der Gruppe der Pilotiere mit Gabazin+XE991. Während es bei geringer Stimulationsstärke zu einer geringen Depression kam, war diese bei hohen Stimulationsstärken stärker ( $n = 13$ ;  $150 \mu\text{A}$ :  $0,86 \pm 0,05$ ;  $300 \mu\text{A}$ :  $0,70 \pm 0,05 \text{ mV}$ ). In der statistischen Analyse zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Hippocampuschnitte von Kontrolltieren mit Gabazin + XE991 und Pilotieren mit Gabazin + XE991 ( $p = 0,031$ ), außerdem zwischen den Pilotieren mit Gabazin und den Kontrolltieren mit Gabazin ( $p \leq 0,001$ ). Auch zwischen den

Doppelpulsverhältnissen von Schnitten der Pilotiere mit Gabazin und der Pilotiere mit Gabazin + XE991 bestand eine signifikante Differenz ( $p = 0,020$ ).

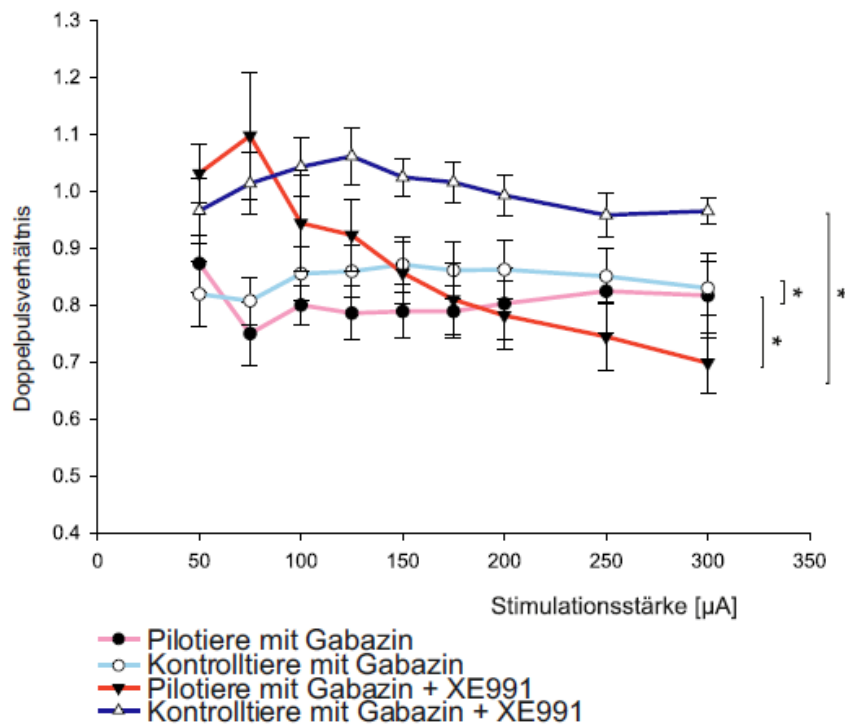


Abbildung 10: Paired Puls Ratio: Effekt der medikamentösen Behandlung auf das Doppelpulsverhältnis der Versuchsgruppen

Die Abbildung zeigt das Doppelpulsverhältnis gegen die Stimulationsstärke (in  $\mu\text{A}$ ) aufgetragen. Der Stern (\*) weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen den farblich eingezeichneten Versuchsgruppen hin (Pilotiere mit Gabazin: rosa; Kontrolltiere mit Gabazin: hellblau; Pilotiere mit Gabazin + XE991: rot; Kontrolltiere mit Gabazin + XE991: dunkelblau). Pilotiere mit Gabazin + XE991 zeigten unter hohen Stimulationsstärken eine deutliche Depression des Doppelpulsverhältnisses. Im Gegensatz dazu blieb das Doppelpulsverhältnis von Hippocampuschnitten der Pilotiere mit Gabazin, der Kontrolltiere mit Gabazin und der Kontrolltiere mit Gabazin + XE991 bei steigender Stimulationsstärke konstant.

In den Originalableitungen von pilocarpinbehandelten Tieren und Kontrolltieren sind die Veränderungen unter der Behandlung der Hippocampuschnitte mit Gabazin (Abbildung 10) bzw. Gabazin in Kombination mit XE991 (Abbildung 11) sichtbar.

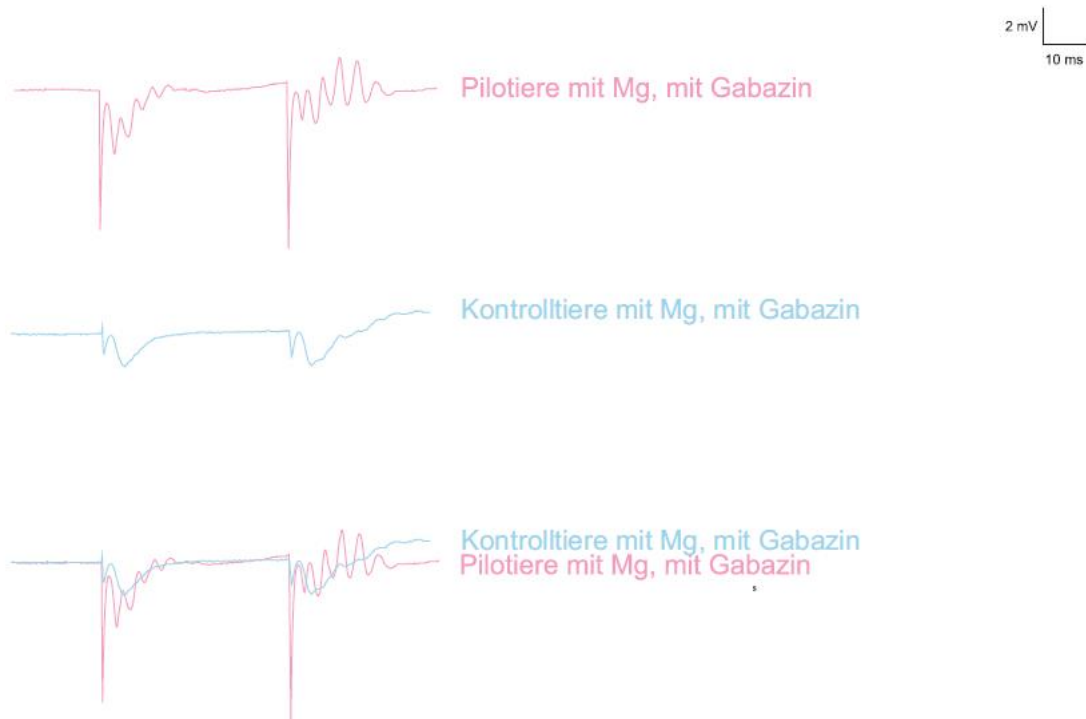


Abbildung 11: exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen unter Gabazin

Die Abbildung zeigt im grafischen Vergleich den unterschiedlichen Verlauf der einzelnen Ableitungsspur, die im Gyrus dentatus des Hippocampus abgeleitet werden konnten, und den direkten grafischen Vergleich der Versuchsgruppen untereinander. Deutlich wird, dass die synaptischen Antworten der Pilotiere unter einer Behandlung mit Gabazin eine größere Amplitude als die der Kontrollgruppe zeigten. (Mg entspricht  $Mg^{2+}$ )

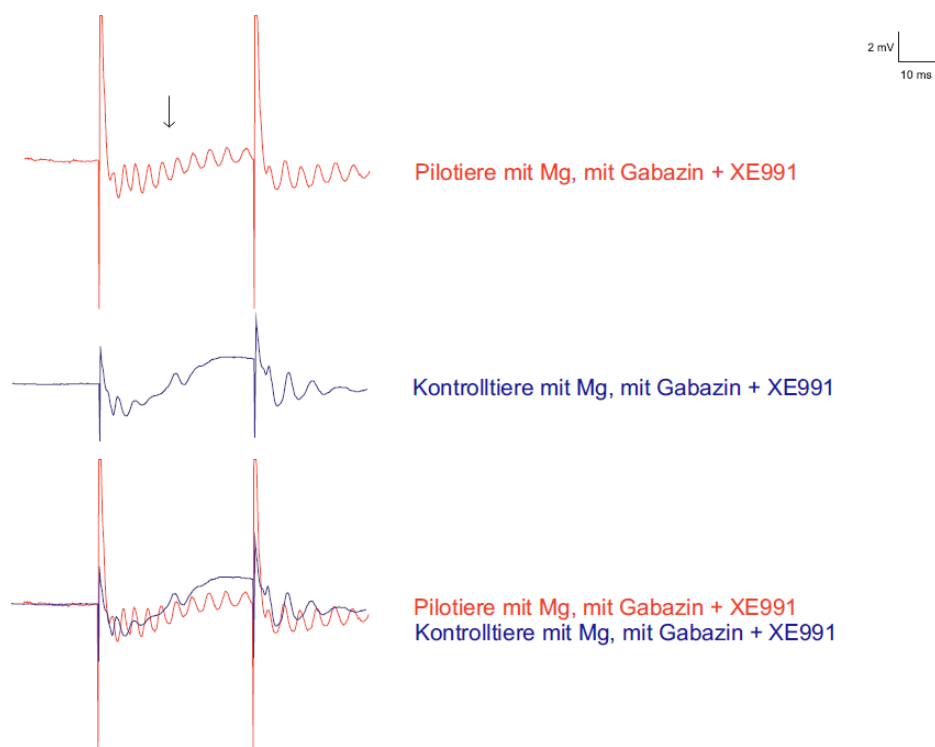


Abbildung 12: exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen unter Gabazin + XE991

Die Abbildung zeigt einzelne Beispielspuren originaler Ableitungen, die unter der Stimulation mit  $150 \mu A$  im Gyrus dentatus des Hippocampus abgeleitet werden konnten, und den Vergleich der Gruppen untereinander. Besonders deutlich sichtbar ist

der Effekt von Gabazin in Kombination mit XE991 auf die Schnitte der Pilotiere. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe kam es nach der ersten Stimulation zu oszillierenden Potentialschwankungen (siehe Pfeil), die sich vor der zweiten Stimulation nicht beruhigten. (Mg entspricht  $Mg^{2+}$ )

### 3.3 Effekte von magnesiumfreier und magnesiumhaltiger Lösung

In einer weiteren Versuchsreihe an Hippocampuschnitten von pilocarpinbehandelten Tieren sowie an Kontrolltieren wurden die Effekte von magnesiumfreier und magnesiumhaltiger Lösung in der Messkammer untersucht. Dabei provozierte magnesiumfreie Lösung das Auftreten epileptiformer Entladungen. Die evozierten Potentiale wurden bei Stimulationen zwischen 0 und 300  $\mu A$  in der CA1-Region des Hippocampus abgeleitet. Dabei zeigte sich in der Input-Output-Kurve (Abbildung 13), dass Schnitte von Pilotieren mit  $Mg^{2+}$  bei niedrigen Stimulationsstärken eine kleinere Amplitude ( $n = 6$ ; 50  $\mu A$ :  $-0,22 \pm 0,06$  mV) als Hippocampuschnitte von Pilotieren ohne  $Mg^{2+}$  ( $n = 10$ , 50  $\mu A$ :  $-0,32 \pm 0,07$  mV) hatten. Jedoch konnten bei hohen Stimulationsstärken in den Hippocampuschnitten der Pilotiere mit  $Mg^{2+}$  größere Amplituden (300  $\mu A$ :  $-1,15 \pm 0,26$  mV) beobachtet werden als bei Schnitten von Pilotieren ohne Mg (300  $\mu A$ :  $-1,05 \pm 0,13$  mV). Die Schnitte von Kontrolltieren mit Mg ( $n = 14$ ) hatten die zweitgrößte Amplitude, während die der Kontrolltiere ohne Mg ( $n = 41$ ) die größte Amplitude zeigten (150  $\mu A$ :  $-1,86 \pm 0,23$  mV).

Signifikant waren die Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus Schnitten der Kontrolltiere mit Mg und der Kontrolltiere ohne Mg ( $p \leq 0,001$ ), sowie zwischen den Hippocampuschnitten der Pilotiere mit Mg und der Pilotiere ohne Mg ( $p \leq 0,001$ ). Zusätzlich war ein signifikanter Unterschied zwischen Schnitten der Kontrolltiere mit Mg und der Pilotiere mit Mg gegeben. ( $p < 0,001$ ).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Effekt der magnesiumfreien Lösung vor allem in Hippocampuschnitten der Kontrollgruppe, nicht aber in denen der pilocarpinbehandelten Tiere sichtbar war.

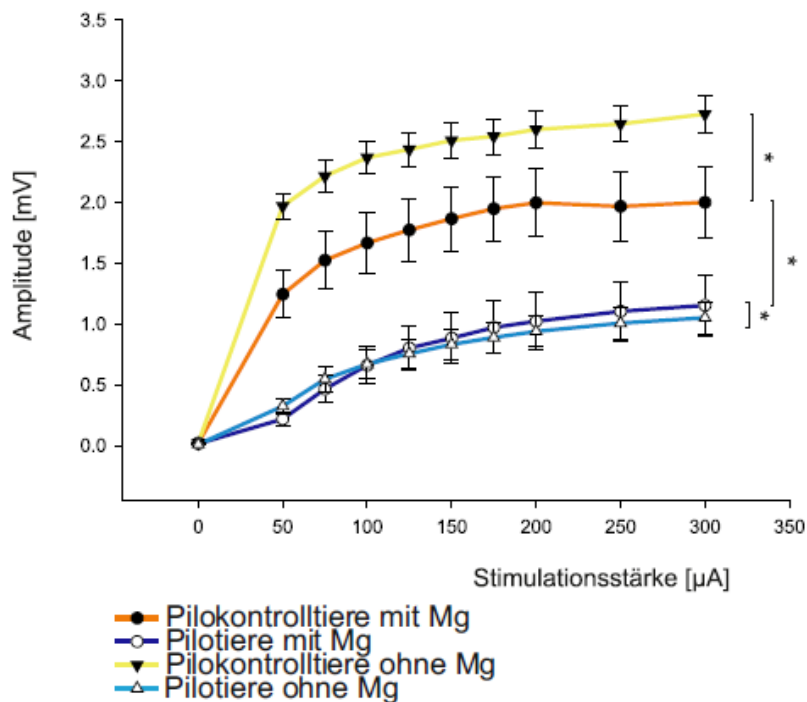


Abbildung 13: Input-Output-Kurve Der Effekt von magnesiumhaltiger und magnesiumfreier Lösung auf Pilotiere und Kontrolltiere

Dargestellt ist die Input-Output-Kurve, dabei ist die Amplitude (in mV) gegen die Stimulationsstärke ( $\mu\text{A}$ ) aufgetragen. Der Stern (\*) weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen den farblich eingezeichneten Versuchsgruppen hin (Kontrolltiere mit Mg: orange; Pilotiere mit Mg: dunkelblau; Kontrolltiere ohne Mg: gelb; Pilotiere ohne Mg: hellblau). Unter magnesiumfreier Lösung steigerte sich die Amplitude der Hippocampuschnitte der Kontrolltiere signifikant zu der Amplitude von Hippocampuschnitten der Kontrolltiere mit Magnesium. Im Gegensatz dazu sank die Amplitude unter magnesiumfreier Bedingung in Hippocampuschnitten der Pilotiere im Vergleich zu Schnitten der Pilotiere mit Magnesium. (Mg entspricht  $\text{Mg}^{2+}$ )

In der Betrachtung der Paired Puls Ratio (Abbildung 14) zeigte sich sowohl bei den Schnitten der Pilotiere mit Mg ( $n = 4$ ;  $150 \mu\text{A}$ :  $1,38 \pm 0,05 \text{ mV}$ ) als auch bei denen von Kontrolltieren mit Mg ( $n = 11$ ,  $150 \mu\text{A}$ :  $1,17 \pm 0,03 \text{ mV}$ ) eine Bahnung. Das Doppelpulsverhältnis der Hippocampuschnitte der Pilotiere mit Mg zeigte bei geringer Stimulationsstärke einen hohen Ausschlag ( $50 \mu\text{A}$ :  $2,01 \pm 0,13 \text{ mV}$ ). Schnitte von Kontrolltieren ohne Mg hatten zunächst ein konstantes Doppelpulsverhältnis; erst bei maximaler Stimulation zeigte sich eine geringe Depression ( $n = 21$ ,  $150 \mu\text{A}$ :  $1,01 \pm 0,03 \text{ mV}$ ;  $300 \mu\text{A}$ :  $0,94 \pm 0,04 \text{ mV}$ ). Hippocampuschnitte von Pilotieren ohne Mg zeigten bei allen Stimulationsstärken eine Depression der Reizantwort ( $n = 3$ ,  $150 \mu\text{A}$ :  $0,86 \pm 0,26 \text{ mV}$ ). Bei Stimulationen zwischen  $50 \mu\text{A}$  und  $150 \mu\text{A}$  bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Hippocampuschnitte von Pilotieren ohne Mg und Kontrolltieren ohne Mg ( $p < 0,001$ ). Zwischen  $75 \mu\text{A}$  und  $250 \mu\text{A}$  bestand außerdem ein signifikanter Unterschied zwischen den Doppelpulsverhältnissen der Schnitte von Pilotieren mit Mg und Kontrolltieren mit Mg ( $p < 0,001$ ).

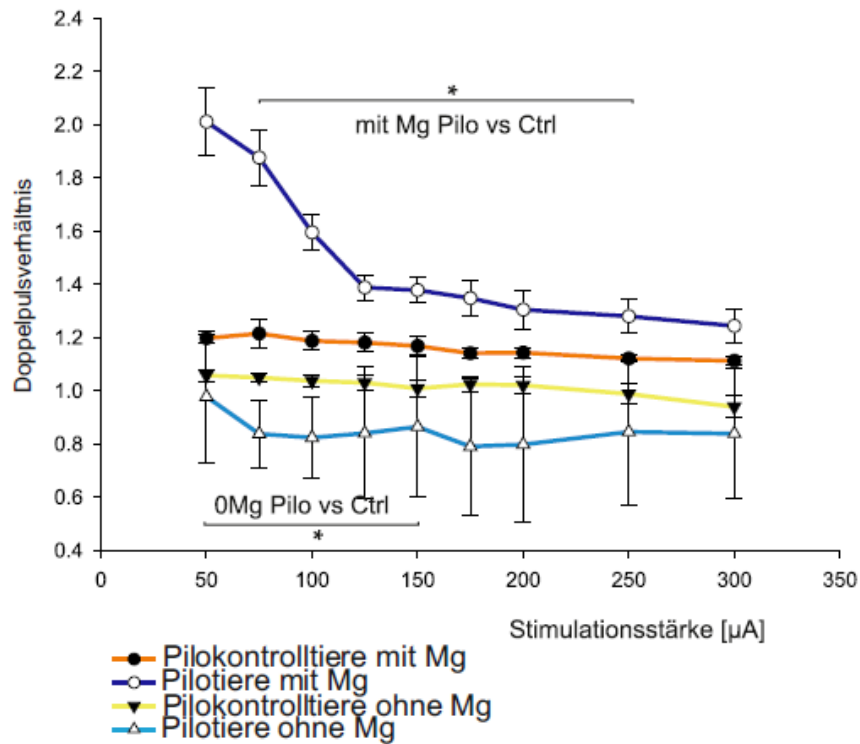


Abbildung 14: Paired Puls Ratio Effekt von magnesiumfreier und magnesiumhaltiger Lösung auf das Doppelpulsverhältnis der Pilotiere und der Kontrolltiere

Aufgetragen ist das Doppelpulsverhältnis gegen die Stimulationsstärke (in  $\mu\text{A}$ ). Der Stern (\*) weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen den farblich eingezeichneten Versuchsgruppen hin (Kontrolltiere mit Mg; orange, Pilotiere mit Mg; dunkelblau; Kontrolltiere ohne Mg; gelb; Pilotiere ohne Mg; hellblau). Es ist sichtbar, dass das Doppelpulsverhältnis bei steigender Stimulationsstärke in Hippocampuschnitten von Kontrolltieren konstant bei Werten um 1 blieb. Das Doppelpulsverhältnis der Hippocampuschnitte der Kontrolltiere mit Mg zeigte hingegen eine konstant bleibende Bahnung. Schnitte von Pilotiere mit Mg wiesen bei niedrigen Stimulationsstärken (50 - 125  $\mu\text{A}$ ) eine deutliche Bahnung auf, die sich jedoch bei hohen Stimulationsstärken auf Werte um 1.4 einstellte. Im Gegensatz zu den anderen Versuchsgruppen konnte in den Hippocampuschnitten von Pilotieren ohne Mg eine Depression des Doppelpulsverhältnisses beobachtet werden. (Mg entspricht  $\text{Mg}^{2+}$ )

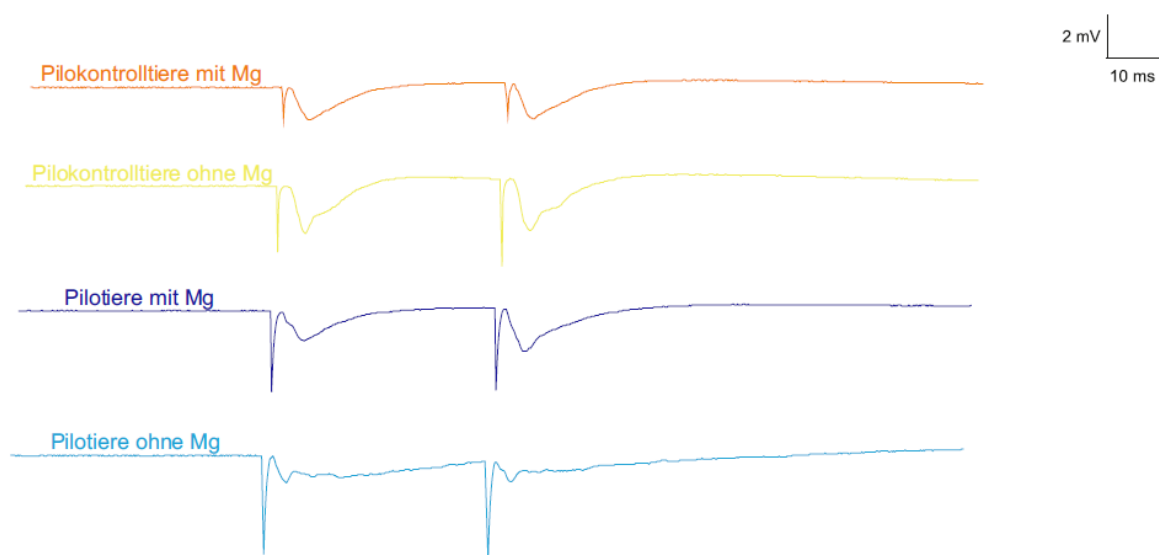


Abbildung 15: exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen mit und ohne  $\text{Mg}^{2+}$

Die Abbildung zeigt einzelne Beispielspuren originaler Ableitungen, die unter der Stimulation mit 150  $\mu\text{A}$  in der CA1-Region des Hippocampus abgeleitet werden konnten. (Mg entspricht  $\text{Mg}^{2+}$ )

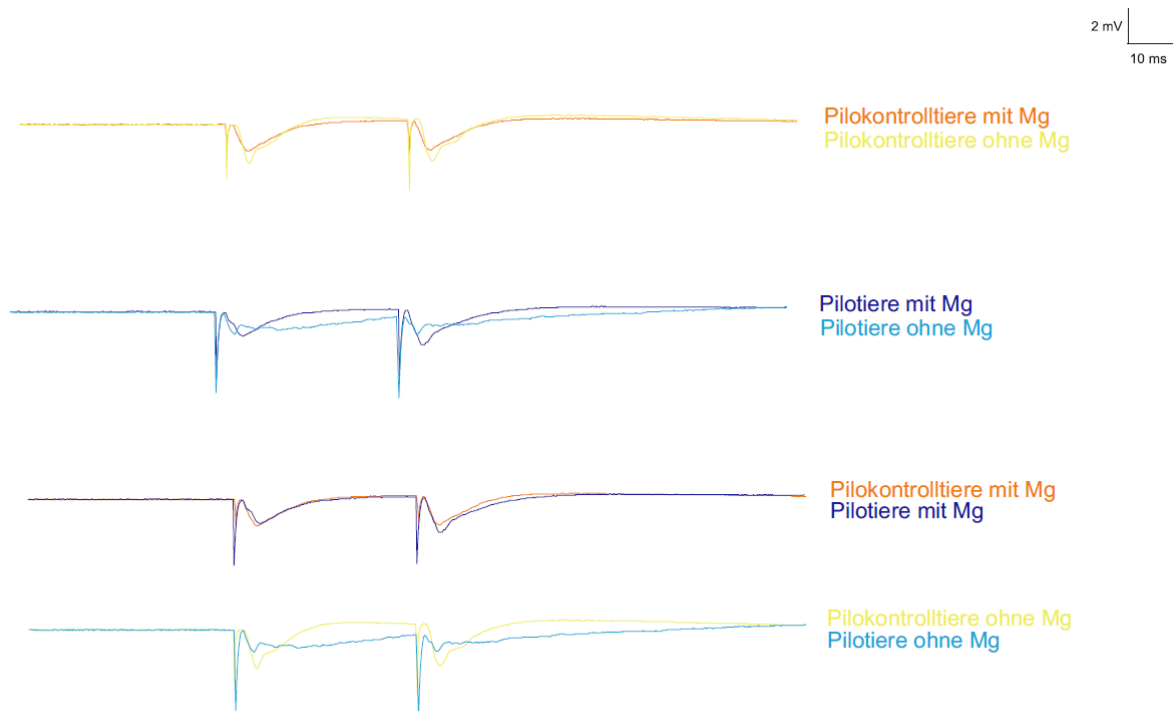


Abbildung 16: exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen mit und ohne  $Mg^{2+}$  im Vergleich

Die Abbildung zeigt den grafischen Vergleich der in Abbildung 15 einzeln gezeigten Ableitungsspurten. Deutlich wird, dass der Effekt von magnesiumfreier Lösung in Hippocampusschnitten von Pilokontrolltieren stärker war als in den Schnitten von Pilotieren. Im direkten Vergleich zwischen Hippocampusschnitten von Pilotieren und Kontrolltieren zeigt sich unter magnesiumhaltiger Lösung ein annähernd gleicher Verlauf der Amplitude mit der Tendenz, dass die Schnitte von Pilotieren mit Mg eine größere zweite Reizantwort hatten. Hippocampusschnitte von Pilotieren ohne Mg hatten eine kleine Amplitude, diese wird von der Amplitude von Schnitten der Pilokontrolltiere ohne Mg deutlich übertroffen. (Mg entspricht  $Mg^{2+}$ )

### 3.4 Effekt von TBB

Im Zuge der Epilepsieerkrankung erfahren Patienten häufig Krampfanfälle (Beghi et al. 2015). Medikamentenstudien zur Erforschung von Wirkmechanismen und der Weiterentwicklung krampflösender Medikamente weisen eine Veränderung des Nachpotentials durch die orale oder intraperitoneale Gabe von 4,5,6,7 Tetrabromobenzotriazol (TBB) bei Ratten, die zuvor mit Pilocarpin behandelt wurden, nach (Brehme et al. 2014). In diesem Kapitel wird darauf eingegangen, welchen Effekt die zusätzliche intraperitoneale Vorbehandlung mit dem CK2 Inhibitor TBB auf die Amplitude und das Doppelpulsverhältnis hat.

Input-Output-Messungen unter ACSF Standard (Abbildung 17) zeigten, dass die Schnitte der Pilotiere mit TBB die kleinste Amplitude erzeugten ( $n = 5$ ;  $150 \mu\text{A}$ :  $-0,22 \pm 0,07 \text{ mV}$ ). Im Vergleich dazu erzeugten die Hippocampuschnitte der Pilotiere ohne TBB Vorbehandlung (Pilotiere mit Mg) eine signifikant größere Amplitude ( $n = 6$ ;  $p \leq 0,001$ ,  $150 \mu\text{A}$ :  $-0,88 \pm 0,21 \text{ mV}$ ). Die Schnitte der TBB Kontrolltiere erreichten die zweitgrößte Amplitude ( $n = 7$ ;  $150 \mu\text{A}$ :  $-1,51 \pm 0,31 \text{ mV}$ ). Im Vergleich dazu war die Amplitude der Hippocampuschnitte der Pilokontrollgruppe signifikant höher ( $n = 10$ ;  $p \leq 0,001$ ,  $150 \mu\text{A}$ :  $-2,00 \pm 0,36 \text{ mV}$ ).

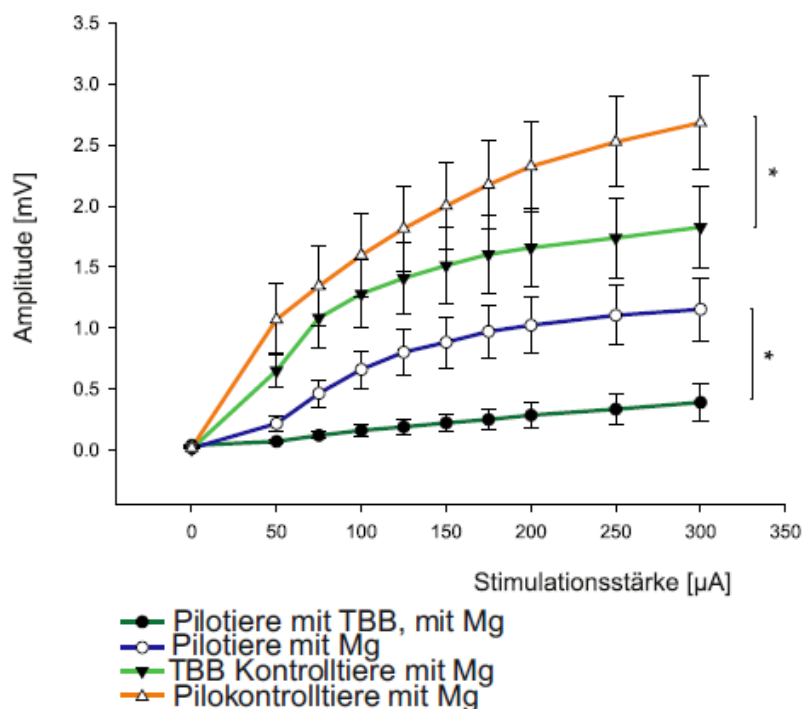


Abbildung 17: Input-Output-Kurve: Effekt der TBB Behandlung auf die Amplitude von Pilotieren und Kontrolltieren unter ACSF Standard Bedingungen

Dargestellt ist die Input-Output-Kurve, dabei ist die Amplitude (in mV) gegen die Stimulationsstärke ( $\mu\text{A}$ ) aufgetragen. Der Stern (\*) weist auf signifikante Unterschiede zwischen den farblich eingezeichneten Versuchsgruppen hin (Pilotiere mit TBB, mit Mg: dunkelgrün; Pilotiere mit Mg: dunkelblau; TBB Kontrolltiere mit Mg: hellgrün; Pilokontrolltiere mit Mg: orange).

Deutlich wird, dass eine Behandlung mit TBB sowohl bei Hippocampuschnitten von Kontrolltieren als auch bei Schnitten von Pilotieren zu einer Verringerung der Amplitude führt. (Mg entspricht  $Mg^{2+}$ )

In der Betrachtung der Paired Puls Ratio (Abbildung 18) zeigte sich, dass die Hippocampuschnitte aller vier Gruppen eine Bahnung erfuhren. Schnitte von Pilotieren hatten bei niedrigen Stimulationsstärken die höchste Ratio ( $n = 4$ ;  $50 \mu A$ :  $2,01 \pm 0,13$  mV), gefolgt von TBB Kontrolltieren ( $n = 7$ ;  $50 \mu A$ :  $1,90 \pm 0,59$  mV). Es zeigte sich bei hohen Stimulationsstärken außerdem ein annähernd gleicher Verlauf zwischen dem Doppelpulsverhältnis von Schnitten der TBB Kontrolltiere ( $n = 11$ ;  $300 \mu A$ :  $1,22 \pm 0,13$  mV) und dem der Pilotiere mit TBB ( $n = 2$ ;  $300 \mu A$ :  $1,11 \pm 0,003$  mV). Ab einer Stimulationsstärke von  $125 \mu A$  näherten sich die Kurvenverläufe der Hippocampuschnitte der Pilotiere und der TBB Kontrolltiere an.

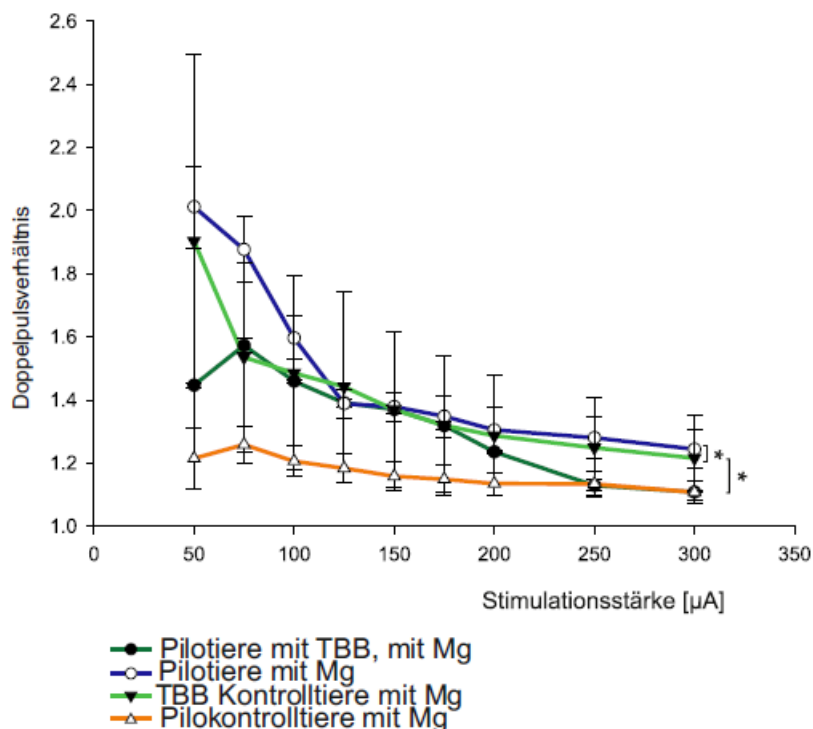


Abbildung 18: Paired Puls Ratio Effekt der TBB Behandlung auf das Doppelpulsverhältnis von Pilotieren und Kontrolltieren unter ACSF Standard Bedingungen

Die Abbildung zeigt das Doppelpulsverhältnis gegen die Stimulationsstärke in Mikroampere aufgetragen. Der Stern (\*) weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen den farbig eingezeichneten Versuchsgruppen hin (Pilotiere mit TBB, mit Mg: dunkelgrün; Pilotiere mit Mg: dunkelblau; TBB Kontrolltiere mit Mg: hellgrün; Pilokontrolltiere mit Mg: orange). Die Hippocampuschnitte aller vier Versuchsgruppen zeigten eine Bahnung des Doppelpulsverhältnisses. Während die Schnitte der Kontrolltiere die niedrigste, aber unter steigenden Stimulationsstärken konstanteste Bahnung zeigten, war das Doppelpulsverhältnis der Schnitte von Pilotiere mit TBB inkonstant und fiel bei hohen Stimulationsstärken auf das Kontrollniveau. Die Hippocampuschnitte der Pilotiere mit Mg und die der TBB Kontrolltiere mit Mg wiesen bei niedrigen Stimulationsstärken ein hohes Doppelpulsverhältnis auf, das sich jedoch ab einer Stimulationsstärke von  $125 \mu A$  auf Werte um 1.4 einstellte. (Mg entspricht  $Mg^{2+}$ )

Mit Hilfe des Tukey-Tests ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen Hippocampusschnitten von TBB Kontrolltieren und Pilotieren ( $p \leq 0,001$ ), sowie zwischen TBB Kontrolltieren und Kontrolltieren ( $p = 0,002$ ) nachweisen. Die gleichen Messungen wurden mit magnesiumfreier Lösung durchgeführt. Hierbei zeigte sich in der Betrachtung der Input-Output-Messungen (Abbildung 19), dass die Schnitte der Pilotiere die kleinste Amplitude zeigten ( $n = 3$ ;  $150 \mu\text{A}$ :  $-0,83 \pm 0,21 \text{ mV}$ ). Die Hippocampusschnitte der Kontrolltiere hatte die größte Amplitude ( $n = 41$ ,  $150 \mu\text{A}$ :  $-1,86 \pm 0,23 \text{ mV}$ ) gefolgt von den Schnitten der TBB Kontrolltiere ( $n = 18$ ) und der Hippocampusschnitte der Pilotiere mit TBB ( $n = 15$ ).

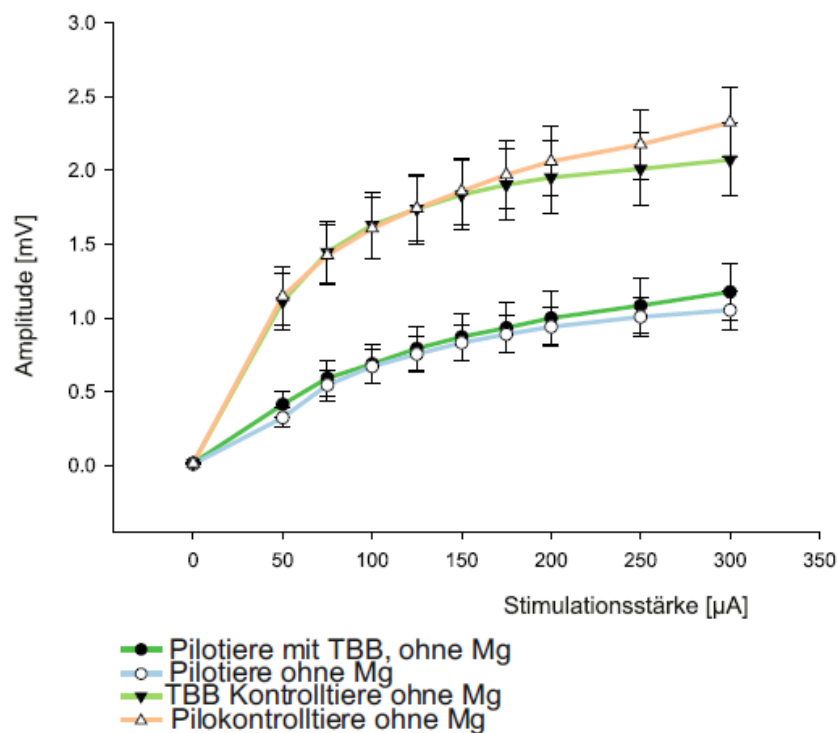


Abbildung 19: Input-Output-Kurve: Grafischer Vergleich zwischen Pilotieren und Kontrolltieren, jeweils mit und ohne TBB unter magnesiumfreier Lösung.

Dargestellt ist die Input-Output-Kurve. Die Amplitude (in mV) ist gegen die Stimmulationsstärke ( $\mu\text{A}$ ) aufgetragen. Gezeigt sind die einzelnen, farbig dargestellten Versuchsgruppen (Pilotiere mit TBB, ohne Mg: dunkelgrün; Pilotiere ohne Mg: hellblau; TBB Kontrolltiere ohne Mg: hellgrün; Kontrolltiere ohne Mg: orange). Es wird sichtbar, dass die Hippocampusschnitte beider pilocarpinbehandelter Versuchsgruppen eine kleinere Amplitude aufwiesen als die Schnitte beider Kontrollgruppen. (Mg entspricht  $\text{Mg}^{2+}$ )

Die Analyse der Paired Puls Ratio (Abbildung 20) zeigte in Hippocampusschnitten der Kontrolltiere (n = 28) und der Pilotiere (n = 3), dass die Reizantwort konstant blieb. Das Doppelpulsverhältnis der Schnitte von Pilotieren mit TBB (n = 7) wies bei niedrigen Stimulationsstärken eine Bahnung (50  $\mu$ A:  $1,28 \pm 0,06$  mV), unter hohen Stimulationsstärken jedoch eine Depression auf (300  $\mu$ A:  $0,71 \pm .0,08$  mV). Gleiches ließ sich in der Betrachtung des Doppelpulsverhältnisses der Hippocampusschnitte von TBB Kontrolltieren beobachten (n = 8, 50  $\mu$ A:  $1,37 \pm 0,19$  mV; 300  $\mu$ A:  $0,89 \pm 0,07$  mV)

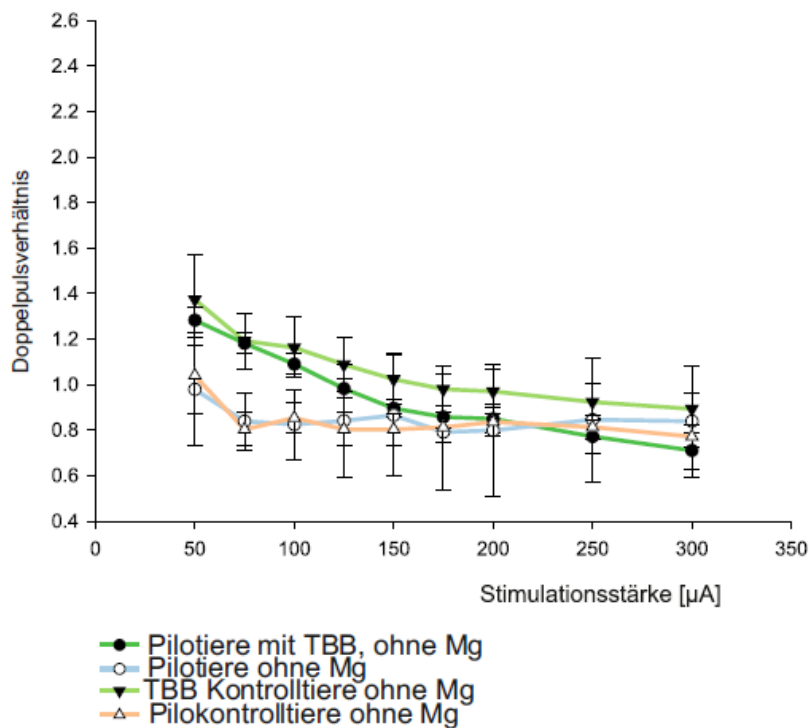


Abbildung 20: Paired Puls Ratio Effekt der TBB Behandlung auf das Doppelpulsverhältnis von Pilotieren und Kontrolltieren unter magnesiumfreier Lösung.

Die Abbildung zeigt das Doppelpulsverhältnis gegen die Stimulationsstärke (in  $\mu$ A) aufgetragen. Es ist sichtbar, dass die Doppelpulsverhältnisse von Hippocampusschnitten der Pilotiere und der Kontrolltiere einen ähnlichen Verlauf aufwiesen, diese zeigen Werte zwischen 0.8 und 1 und deuteten damit auf ein konstantes Verhältnis bzw. eine Depression hin. Die Schnitte der TBB Kontrolltiere erfuhren hinsichtlich des Doppelpulsverhältnisses eine Bahnung, diese war bei kleinen Stimulationsstärken stärker als unter hohen Stimulationsstärken. Hippocampusschnitte von Pilotieren mit TBB wiesen als einzige Gruppe zunächst eine deutliche Bahnung bei niedrigen Stimulationsstärken, jedoch im Vergleich zu den Schnitten der anderen Versuchsgruppen bei hohen Stimulationsstärken die größte Depression des Doppelpulsverhältnisses auf. (Mg entspricht  $Mg^{2+}$ )

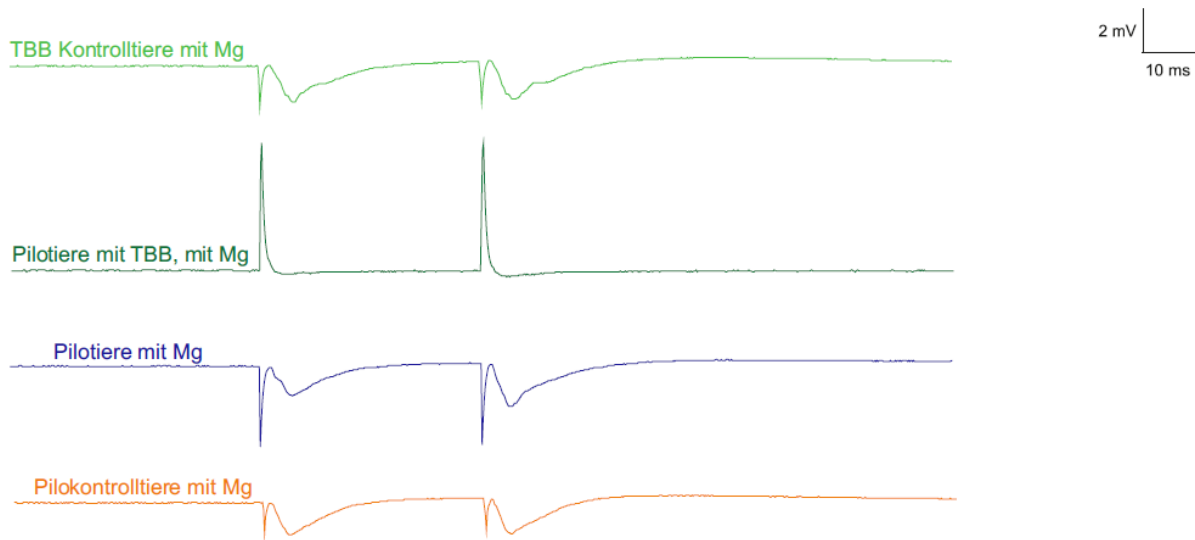


Abbildung 21: exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen unter TBB

Originale Ableitungen aus der CA1-Region des Hippocampus der vier Versuchsgruppen nach einer Stimulation mit 150  $\mu$ A unter magnesiumhaltiger Lösung. TBB Kontrolltiere mit Mg: hellgrün; Pilotiere mit TBB, mit Mg: dunkelgrün; Pilotiere mit Mg: dunkelblau; Pilokontrolltiere mit Mg: orange. (Mg entspricht  $Mg^{2+}$ )

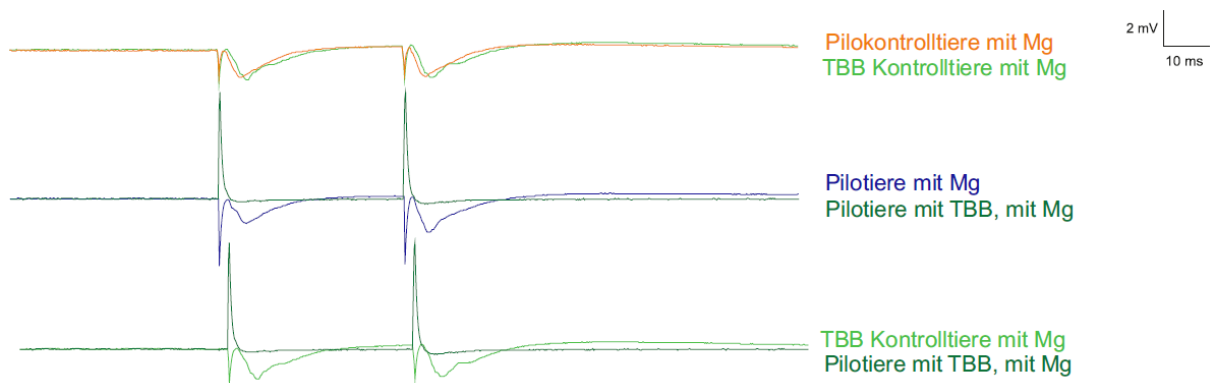


Abbildung 22: exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen unter TBB im Vergleich

Die Abbildung zeigt den direkten grafischen Vergleich der unterschiedlichen Ableitungsspuren aus Abbildung 21. Deutlich wird, dass die Hippocampuschnitte der Pilotiere mit TBB eine sehr geringe Reizantwort zeigten. Im Vergleich dazu zeigten sowohl die Schnitte der Pilotiere, als auch die der TBB Kontrolltiere eine deutlichere Reizantwort. Hippocampuschnitte von Pilokontrolltieren und TBB Kontrolltieren wiesen einen nahezu gleichen Verlauf der Reizantwort auf. (Mg entspricht  $Mg^{2+}$ )

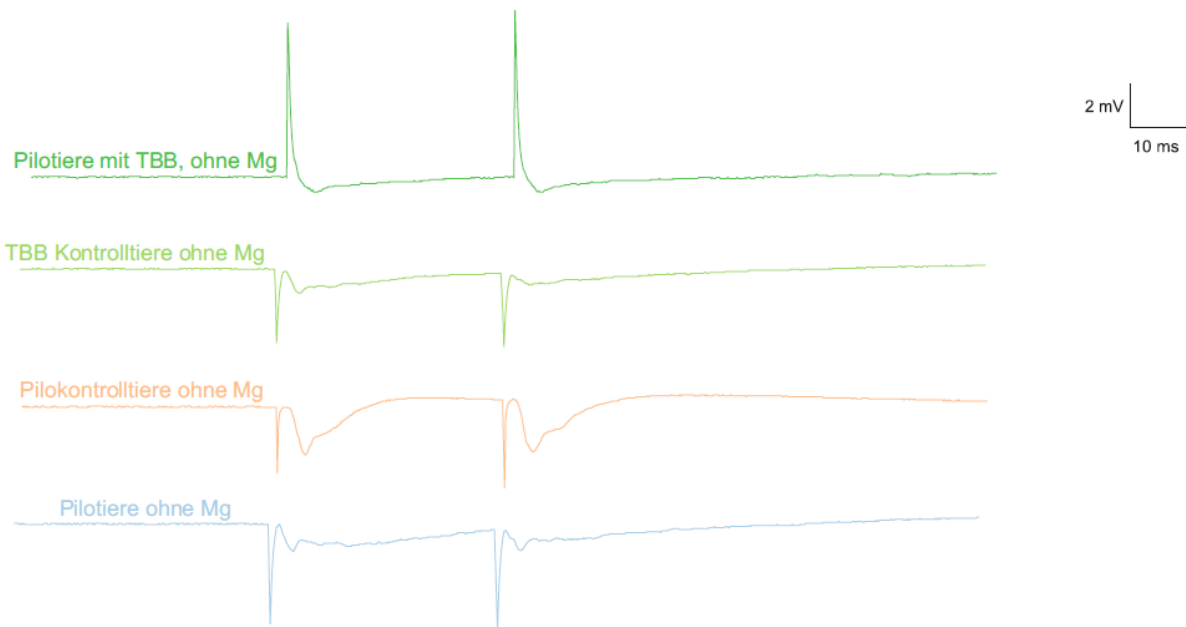


Abbildung 23: exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen unter TBB ohne  $Mg^{2+}$

Originale Ableitungen aus der CA1-Region von Hippocampusschnitten der vier Versuchsgruppen nach einer Stimulation mit  $150 \mu A$  unter magnesiumfreier Lösung. Pilotiere mit TBB, ohne Mg: grün; TBB Kontrolltiere ohne Mg: hellgrün; Pilokontrolltiere ohne Mg: orange; Pilotiere ohne Mg: hellblau. (Mg entspricht  $Mg^{2+}$ )

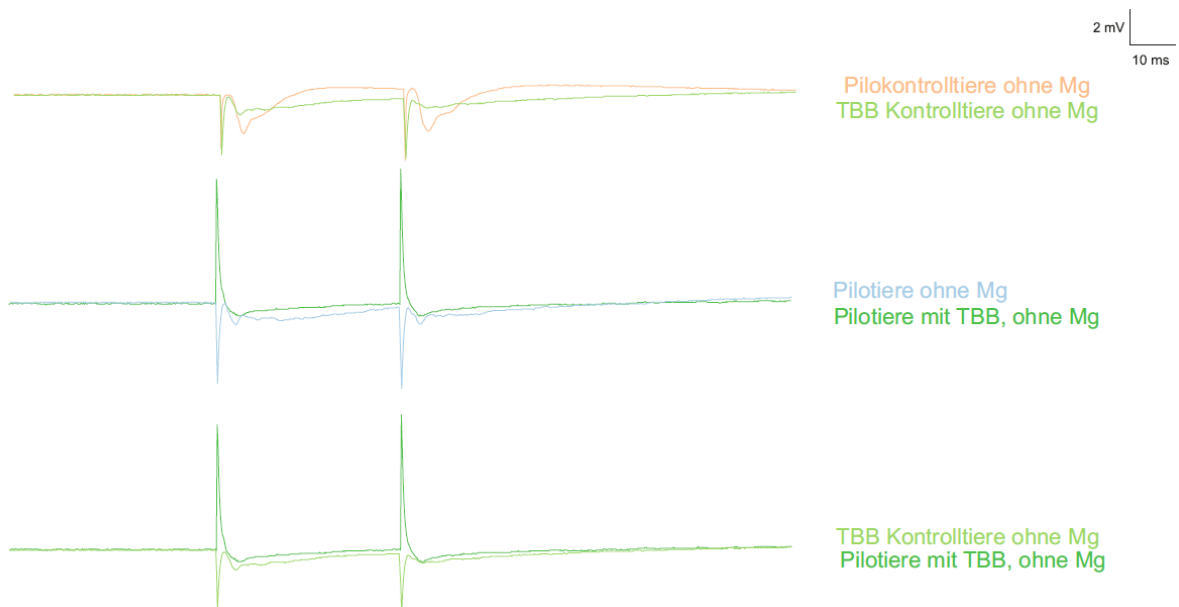


Abbildung 24 exemplarische Originalableitungen der Versuchsgruppen unter TBB ohne  $Mg^{2+}$  im Vergleich

Die Abbildung zeigt im grafischen Vergleich den unterschiedlichen Verlauf der Ableitungsspur aus Abbildung 23. Die Reizantwort der Schnitte von TBB Kontrolltieren war geringer als die Reizantwort der Schnitte der Pilokontrolltiere. Auch im Vergleich zwischen den Schnitten der Pilotiere und der Pilotiere mit TBB wurde sichtbar, dass die Reizantwort unter TBB Behandlung kleiner war. Gleiches zeigte der Vergleich zwischen den Verläufen von Hippocampusschnitten der TBB Kontrolltiere und der Pilotiere mit TBB. (Mg entspricht  $Mg^{2+}$ )

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Effekt eine chronische Epilepsie auf die Reizantwort hippocampaler Nervenzellen hinsichtlich der Amplitude und des Doppelpulsverhältnisses hat. Im Fokus der Untersuchung standen dabei die spannungsabhängigen Kaliumkanäle  $K_v7.2$  und  $K_v7.3$ . Diese werden vor allem im Hippocampus und im Cortex exprimiert, sie befinden sich an Pyramidenzellen schwerpunkthaft am Axon (Pan et al. 2006) und am Ranvier-Knoten (Niday und Tzingounis 2018).  $K_v7$  Kanäle bilden durch spannungsabhängige  $K^+$ -Ströme die Grundlage für den M-Strom. Dieser ist als langsam aktivierender, nicht inaktivierender, zeit- und spannungsabhängiger Kaliumstrom für die Regulierung des Ruhemembranpotentials verantwortlich (Dirkx et al. 2020). Des Weiteren wurde beleuchtet, welche Auswirkungen aus einer Behandlung mit dem Kaliumkanalantagonisten XE991, und dem  $GABA_A$ -Antagonisten Gabazin hinsichtlich der Amplitude und des Doppelpulsverhältnisses resultierten. Die Ergebnisse ließen Rückschlüsse auf die Lokalisation der Kaliumkanäle und auf Zusammenhänge zwischen Calciumangebot und Transmitterfreisetzung zu. Abschließend wurde ermittelt, ob eine intraperitoneal verabreichte Dosis mit dem selektiven CK2-Inhibitor TBB eine Änderung der Amplitude und des Doppelpulsverhältnisses bewirken kann.

Anhand früherer Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen Expressionsveränderungen und Funktionsveränderungen der Kanäle mit unterschiedlichen Arten der Epilepsie festgestellt werden (Shah et al. 2013). Nähere Untersuchungen von Ionenkanälen zeigten bereits Expressionsveränderungen, sind jedoch hinsichtlich der Kenntnis über funktionelle Veränderungen noch lückenhaft.

Ein bewährtes Modell für weiterführende Untersuchung der Epilepsieerkrankung ist das Pilocarpinmodell. Nach der Injektion von Pilocarpin kommt es zu strukturellen neuronalen Veränderungen, die histopathologisch sichtbar gemacht und mit Daten von Patienten, die an mesialer Temporallappenepilepsie erkrankt sind, verglichen werden können (Brehme et al. 2014). Es ist bekannt, dass wiederkehrende Anfälle zu einem Verlust der inhibitorischen Interneuronen in der CA1-Region und im Gyrus dentatus sowie zu einer Umstrukturierung neuronaler Strukturen im Sinne einer Moosfasersprossung führen (Okazaki et al. 1999), und es ist möglich, diese Veränderungen mittels Timm-Färbung sichtbar zu machen (Kuo et al. 2008; Schulze et al. 2020).

#### 4.1 Der Effekt von Gabazin und Gabazin + XE991 auf naive Tiere und Kontrolltiere

Eine Testung an naiven Tieren und Kontrolltieren diente dazu, den Effekt der Pharmaka zunächst an nicht chronisch epileptischen Tieren zu untersuchen.

Dabei kam es bei Tieren, die keine Vorbehandlung mit Pilocarpin erhalten hatten, unter Einfluss der Substanzen zu einer Steigerung der Reizantwort, also eine zunehmende Amplitude. Der Effekt war besonders deutlich im Vergleich zwischen naiven Tieren und Kontrolltieren mit Gabazin + XE991. Eine Blockierung der GABA<sub>A</sub>-Kanäle lässt auf eine Steigerung des EPSP schließen. Es ist bekannt, dass die Blockade der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zu einer synaptischen Hemmung führt und daraus eine Anfallserregung resultiert (Swartzwelder et al. 1988). Da es sich bei Gabazin um einen GABA<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten handelt, war die Steigerung der Amplitude zu erwarten. Unsere Ergebnisse stimmen mit den Daten von Savrasova et al. (2010) überein; auch hier kommt es durch die Gabe von Gabazin zu einer Steigerung der neuronalen Aktivität.

In unseren Versuchen beobachten wir, dass die Hippocampusschnitte der Versuchsgruppe, die neben Gabazin auch noch XE991 erhalten haben, sowohl die größte Amplitude als auch eine Bahnung aufwiesen. Eine Korrelation zwischen Amplitude und Transmitterfreisetzung erscheint sinnvoll unter der Betrachtung der Ergebnisse von Sun und Kapur (2012). In ihren Versuchen stellten sie fest, dass es durch eine Blockade der K<sub>v</sub>7.2- bzw. K<sub>v</sub>7.3-Kanäle zu einer Depolarisierung der Pyramidenneuronen in der CA3-Region kommt. Dies geht mit einer Aktivierung präsynaptischer spannungsabhängiger P/Q- und N-Typ-Calciumkanäle einher und führt zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und einer erhöhten Glutamatfreisetzung. Die Tatsache, dass die Schnitte der Versuchsgruppe, die sowohl Gabazin als auch XE991 erhalten hat, als einzige ein konstantes Doppelpulsverhältnis zeigt, stützt die Annahme, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen K<sub>v</sub>7.2- bzw. K<sub>v</sub>7.3-Kanälen, Calciumangebot und Transmitterfreisetzung besteht.

## 4.2 Der Effekt von Gabazin und der Kombination aus Gabazin + XE991 auf chronisch epileptische Tiere im Vergleich mit Kontrolltieren

Mithilfe des Pilocarpinmodells ließ sich die Wirkung der Pharmaka auch an chronisch epileptischen Tieren untersuchen.

Unter Kontrollbedingungen wurde die Amplitude der Reizantwort durch Zugabe von XE991 größer, während sie bei Hippocampuschnitten von Pilotieren kleiner wurde. Interessant ist, dass die Amplitude unter der Zugabe von Gabazin bei Hippocampuschnitten der Pilotiere signifikant größer war als die Amplitude der Schnitte der Kontrollgruppe unter Gabazin. Die Tatsache, dass sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Hippocampuschnitte von Pilotieren mit Gabazin und Pilotieren mit zeigte, lässt die Deutung zu, dass es zu keiner Steigerung sondern möglicherweise sogar zur Senkung des EPSP kommt; diese Veränderung war jedoch nicht signifikant.

Pathogene Varianten des für  $K_v7.2$ -codierenden Gens  $KCNQ2$  resultieren in Entwicklungsverzögerungen mit oder ohne Anfälle (Dirkx et al. 2020). Sowohl  $KCNQ2$  als auch  $KCNQ3$ , welcher für  $K_v7.3$ -Kanäle codiert, werden mit gutartiger familiärer neonataler Epilepsie (BNFS) aber auch mit pharmakoresistenten Epilepsieformen in Verbindung gebracht (Lauritano et al. 2019; Weckhuysen et al. 2012). Jüngst zeigte Kartheus in ihrer Arbeit, dass es auf Ebene der Genexpression zu einer Reduktion der langsamen Nachhyperpolarisation kommt. Diese entsteht durch die Herunterregulierung der  $K_{ir6.2}$ - Untereinheit des  $KCNQ2$ -,  $KCNQ3$ - und Slick-Kanals (Kartheus 2021). Weitere Arbeiten beleuchten, dass es im Pilocarpinmodell auch zu Expressionsveränderungen anderer Kanäle kommt. Beispielhaft sei hier die Veränderung bei Kaliumkanälen des A-Typs genannt, die zu wiederkehrenden, spontanen Anfällen führt (Monaghan et al. 2008).

Unter der Annahme, dass Tiere, die mit Pilocarpin behandelt wurden, weniger  $K_v7.2$ -bzw.  $K_v7.3$ -Kanäle aufweisen, erscheinen unsere Ergebnisse konsistent. Akzentuiert man den Kaliumverlusts, mit der Vorstellung eines vollständigen Verlusts aller  $K_v7$ -Kanäle durch die Epilepsieerkrankung, dürfte ein  $K_v7$ -Antagonist gar keine Wirkung zeigen, und ein gleichbleibendes EPSP müsste resultieren. Auch wenn die Ergebnisse des Versuchs nicht bestätigen, dass es bei Pilotieren zu keiner Beeinflussung des EPSP durch XE991 kommt, so ist eine nicht signifikante Absenkung des EPSP mit einer Nullhypothese vereinbar. Möglicherweise blockiert XE991 noch weitere Kanäle. Denkbar ist auch, dass noch vorhandene  $K_v7$ -Kanäle mit einem fazitätierenden Effekt durch XE991 gehemmt werden und daraus ein reduziertes EPSP resultiert.

Eine rein postsynaptische Lokalisation der  $K_v7.2$ - bzw.  $K_v7.3$ -Kanäle lässt nicht erklären, warum das Doppelpulsverhältnis kleiner wird. Anhand der Ergebnisse vermuten wir eine präsynaptische Lokalisation der  $K_v7.2$ - bzw.  $K_v7.3$ -Kanäle. Eine Aussage darüber, welchen Einfluss der  $K_v7.2$ - bzw.  $K_v7.3$ -anal auf das präsynaptische Membranpotential hat, konnte anhand unserer Versuche nicht weiter geklärt werden, und eine Identifizierung der Präsynapse erscheint methodisch schwierig.

#### 4.3 Der Effekt von magnesiumhaltiger und magnesiumfreier Lösung auf Pilotiere und Kontrolltiere

Magnesium spielt im Stoffwechsel, in der Erregbarkeit und der neuroglialen Plastizität eine wichtige Rolle. Konzentrationsveränderungen im Liquor führen zu akuten oder sogar anhaltenden Störungen der Erregbarkeit der neuronalen Netzwerke (Toffa et al. 2018). Die Situation der menschlichen TLE kann durch den Einfluss von magnesiumfreiem ACSF im Tiermodell erzeugt werden. Es resultieren epileptiforme Entladungen (Punnakkal und Dominic 2018).

Im Versuch ergab sich, dass die Schnitte der Kontrolltiere unter magnesiumfreier Lösung eine größere Amplitude zeigten als unter magnesiumhaltiger Lösung. Hingegen war die Amplitude in den Hippocampuschnitten der Pilotiere in magnesiumhaltiger Lösung größer als unter magnesiumfreien Bedingungen. Sowohl die magnesiumfreie Lösung als auch die physiologische Magnesiumkonzentration zeigten sowohl bei Hippocampuschnitten von Pilotieren als auch von Kontrolltieren Veränderungen im Doppelpulsverhältnis; die Ergebnisse der Versuchsgruppen näherten sich bei hohen Stimulationsstärken einander an. Es ist wahrscheinlich, dass es durch magnesiumfreie Lösung zu einer Vordepolarisation der präsynaptischen Membran und zu einer Öffnung der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanäle kommt. Nowak et al. (1984) ermittelten, dass eine unphysiologisch niedrige Magnesiumkonzentration die NMDA Antwort potenziert. Es ist daher denkbar, dass durch die NMDA Rezeptoren die Senkung des EPSP stattfindet. Unsere Ergebnisse sind auf der anderen Seite auch durch die Erkenntnisse von Swartzwelder et al. (1988) erklärbar; eine größere Amplitude könnte aus dem Zusammenhang zwischen  $Mg^{2+}$ -Entfernung und einer Reduzierung der GABA-vermittelten Hemmung resultieren.

## 4.4 TBB

Derzeit führt die Rote Liste® in der Rubrik „Antiepileptika“ 28 unterschiedliche Wirkstoffe, die in Form von 89 Präparaten zur Verfügung stehen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, dämpfen oder unterdrücken diese Medikamente zwar die Symptome, führen jedoch nicht zu einer Heilung der Epilepsieerkrankung. Für Patienten, die nicht auf die Medikamente ansprechen, wie es häufig bei der Temporallappenepilepsie zu beobachten ist (Brehme et al. 2014), bedarf es vertiefter Erkenntnisse zu strukturellen und funktionellen Veränderungen im Zuge der Erkrankung.

Forschungen nach möglichen Ansatzpunkten zur Regulation der Epilepsieerkrankung und einer Reduktion der Krampfanfälle führten zu näherer Betrachtung der Casein-Kinase-2. In ihrer Probandengruppe, unter denen auch ein Patient mit myoklonischer Epilepsie war, ermittelten Poirier et al. (2017) zwei de novo Spleißvarianten für das CK2- $\beta$ -codierende Gen.

Sarno et al. (2001) zeigten, dass TBB ein selektiver Antagonist der Proteinkinase CK2 ist und diese, im Vergleich zu 33 anderen untersuchten Proteinkinasen, am effizientesten durch TBB gehemmt wird. Derzeit liegen unterschiedliche Erkenntnisse hinsichtlich einer Veränderung der Amplitude unter TBB Behandlung vor. So veröffentlichten Ye et al. (2011), dass die Behandlung mit TBB zu einer signifikanten Reduktion der Amplitude von NMDA-EPSC führt. Im Gegensatz dazu berichtete Brehme et al. (2014), dass eine langfristige Gabe von TBB zwar eine Verlängerung des Nachpotentials, nicht aber eine Änderung der Amplitude hervorruft.

Es existieren erste Ansätze bezüglich einer medikamentösen Anfallshemmung durch die orale Verabreichung des CK2-Inhibitors TBB. Aufgrund der Ergebnisse von Brehme et al. (2014) ist bekannt, dass eine verringerte Erregbarkeit in der CA1-Region des Hippocampus aus einer Applikation von TBB resultiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es durch orale Verabreichung von TBB zu einer Hochregulation des calciumabhängigen Kaliumkanals  $K_{Ca2.2}$  kommt, TBB jedoch keine akute Wirkung gegen Krampfanfälle zeigt (Bajorat et al. 2018). Die Nachforschungen von Brehme et al. (2014) weisen jedoch auf einen antiepileptogenen Effekt nach langfristiger Behandlung pilocarpinbehandelter Tiere mit TBB hin.

Die Hochregulation des calciumabhängigen Kaliumkanals  $K_{Ca2.2}$  und die Tatsache, dass Kartheus (2021) eine Reduktion des Slick Kanals belegen konnte, führten zu der Frage ob noch weitere Kanäle durch eine TBB Behandlung beeinflusst werden und diese Behandlung Einflüsse hinsichtlich Amplitude und Doppelpulsverhältnis hat. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer intraperitonealen Vorbehandlung mit TBB sowohl unter physiologischer als auch unter unphysiologischer ( $Mg^{2+}$ -freier) ACSF Lösung an pilocarpinbehandelten Tieren und Kontrolltieren auf funktioneller Ebene untersucht.

In der Gegenüberstellung der Versuchsgruppen wiesen die Schnitte von pilocarpinbehandelten Tieren, die mit TBB vorbehandelt wurden, unter magnesiumhaltiger Lösung die kleinste Amplitude auf. Es lässt sich daraus schließen, dass eine gesenkte Amplitude auch ohne Aktivierung des NMDA-Rezeptors resultiert und es daher wahrscheinlich ist, dass weitere Kanäle an einer Veränderung der Amplitude beteiligt sind.

Unter magnesiumfreier Situation kam es hinsichtlich der Amplitude zu einem angleichenden Effekt bei Hippocampuschnitten von Pilotieren ohne  $Mg^{2+}$  und TBB behandelten Pilotieren ohne  $Mg^{2+}$ . Die Amplitude war im Vergleich zu den Ergebnissen der Hippocampuschnitte der Kontrolltiere jedoch deutlich gesenkt. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse auf einen senkenden Effekt von TBB auf die Amplitude bei chronisch epileptischen Tieren hin. Betrachtet man zusätzlich das Doppelpulsverhältnis, ist lässt sich dieser Zustand möglicherweise damit erklären, dass es durch TBB zu einer geringeren Transmitterfreisetzung kommt. Es ist aber auch denkbar, dass eine verminderte postsynaptische Depolarisation oder die Aktivierung eines hyperpolarisierenden Stroms zu einer gesenkten Amplitude führen. Würde eine Hyperpolarisation durch Aktivierung des Kaliumkanals nur an der Postsynapse stattfinden und damit dem EPSP entgegenwirken, so wäre eine gesenkte Amplitude logisch. Aufgrund der Methodik darf jedoch auch ein präsynaptischer Einfluss nicht außer Acht gelassen werden. Limitierend ist hierbei, dass der Nettoeffekt eines Kaliumkanals an der Präsynapse nicht vorausgesagt werden kann, denn eine Hyperpolarisation an der Präsynapse würde die Schwelle für Calciumkanäle erhöhen aber gleichzeitig auch die Kanalverfügbarkeit erhöhen. In zukünftigen Arbeiten wäre eine Differenzierung der präsynaptischen bzw. postsynaptischen Situation mittels Patch clamp Verfahren oder über eine abgewandelte Untersuchung des Doppelpulsverhältnisses möglich.

## 4.5 Limitationen der Arbeit

In der Arbeit wurde das Pilocarpin Modell an männlichen Whistar Ratten verwendet. Dieses Modell hat sich für die Forschung zur mesialen Temporallappenepilepsie bereits in zahlreichen anderen Arbeiten bewährt (Brehme et al. 2014; Curia et al. 2008; Cavalheiro 1995). Durch die Arbeit mit Lebewesen sind physiologische Unterschiede zwischen den Ratten nicht auszuschließen. Die Tiere wurden entsprechend der Haltungsvorschriften gehalten und bekamen Futter und Wasser ad libitum. Die medikamentöse Behandlung der Tiergruppen wurde randomisiert. Es fand eine stressfreie Narkotisierung mit Diethylether und Sicherung der Narkosetiefe über Reflexüberprüfung statt. Im Zuge der Hippocampuspräparation wurde so schnell und gewissenhaft wie möglich und in einem standardisierte Verfahren gearbeitet, dennoch sind Varianzen durch zeitliche Faktoren, durch unterschiedliche Sauerstoffsättigung und Kühlung möglich. Diese Einflussfaktoren wurden durch Einhaltung der Präparationszeit von 60 bis maximal 90 Sekunden und ausreichende Begasung und Kühlung der Präparationsflüssigkeit vor und während der Präparation so minimal gehalten wie möglich.

In der vorliegenden Arbeit fand die Methode der Feldpotentialmessung Anwendung. Dazu wurden die präparierten Hippocampuschnitte nach einer Äquilibrationsphase in einer Messkammer ausgerichtet und anschließend die Silberelektroden im Gyrus dentatus bzw. in der CA1-Region platziert. Obwohl die ausgewählten Hippocampuschnitte vor dem eigentlichen Messprotokoll auf Reaktionsfähigkeit getestet wurden, ist auch hier nicht auszuschließen, dass die Tiere eine Varianz in der Anzahl reaktionsfähiger Synapsen haben. Die Zeit zwischen Präparation und Strom-Spannungsmessungen war nicht konstant. Diesem Problem wurde durch Ermittlung der Mittelwerte Rechnung getragen. Die Auswertung sowie der statistische und grafische Vergleich zwischen den Versuchsgruppen erfolgte anhand dieser Mittelwerte.

## 5 Zusammenfassung

Epilepsie ist eine Erkrankung, bei der es zu Anfällen kommt. Dabei handelt es sich um kurzfristige paroxysmale Veränderungen, die zu einer übermäßigen, hypersynchronen Entladung von Neuronen im Gehirn führen. Medikamentös werden die Symptome mittels Antikonvulsiva therapiert. Eine besondere, häufig therapierefraktäre Form ist die mesiale Temporallappenepilepsie (MTLE). Ein Zusammenhang zwischen Epilepsie und Veränderung von Ionenkanälen, im Besonderen von spannungsabhängigen Kaliumkanälen, konnte bereits festgestellt werden.

Als Tiermodell wurde in dieser Arbeit das Pilocarpinmodell gewählt. Dieses ist bekannt dafür, pathophysiologische und elektrophysiologische Veränderungen aufzuweisen, wie sie bei Patienten mit MTLE gefunden werden können. Histopathologisch können neuronale Umstrukturierungen in Form von Moosfasersprossung mittels Timm-Färbung besonders in der CA1-Region und im Gyrus dentatus nachgewiesen werden. Um Informationen über funktionelle Veränderungen hinsichtlich Amplitude und Doppelpulsverhältnis zu erhalten, erfolgten Feldpotentialableitungen im Gyrus dentatus und in der CA1-Region an Hippocampusschnitten von männlichen Wistar-Ratten. In den Versuchen wurden die Pharmaka XE991, Gabazin und TBB genutzt.

Zunächst wurde untersucht, welchen Effekt die Pharmaka an nicht chronisch epileptischen Tieren haben, da bereits bekannt war, dass die Blockade der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zu einer synaptischen Hemmung führt und eine Anfallserregung resultiert. Auch war bekannt, dass es bei einer Blockade der K<sub>v</sub>7.2- bzw. K<sub>v</sub>7.3-Kanäle zu einer Depolarisierung der Pyramidenneuronen in der CA3-Region kommt. Die Versuche zeigten, dass es sowohl unter Gabazin als auch unter der Kombination aus Gabazin + XE991 zu einer Steigerung der Amplitude kam. Zusätzliche Betrachtungen des Doppelpulsverhältnisses zeigten nur in Hippocampusschnitten, die sowohl Gabazin als auch XE991 erhalten haben, ein konstantes Doppelpulsverhältnis. Die Ergebnisse stützen die Annahme, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen K<sub>v</sub>7.2- bzw. K<sub>v</sub>7.3-Kanälen, Calciumangebot und Transmitterfreisetzung besteht.

Im Anschluss wurden die Auswirkungen der Pharmaka auf die Amplitude und das Doppelpulsverhältnis von chronisch epileptischen Tieren untersucht. Es war bekannt, dass es im Pilocarpinmodell zu einer verringerten Genexpression von K<sub>v</sub>7.2- und K<sub>v</sub>7.3-Kanälen kommt. Unter der Annahme eines vollständigen Kaliumverlusts wurde erwartet, dass XE991 keinen Einfluss auf die Amplitude und das Doppelpulsverhältnis hat. Diese Erwartungen wurden nicht bestätigt, aber es erscheint möglich, dass XE991 noch weitere Kanäle blockiert

oder noch vorhandene  $K_v7$ -Kanäle mit einem faszilitierenden Effekt durch XE991 gehemmt werden und ein reduziertes EPSP resultiert.

Des Weiteren wurde sowohl an Hippocampusschnitten von chronisch epileptischen Tieren als auch nicht chronisch epileptischen Tieren erforscht, welche Veränderungen der Amplitude und des Doppelpulsverhältnisses aus einer Behandlung mit magnesiumfreier ACSF resultieren. Grundlage dieser Fragestellung war die Kenntnis darüber, dass Konzentrationsveränderungen im Liquor zu akuten oder sogar anhaltenden Störungen der Erregbarkeit der neuronalen Netzwerke führen. Die Untersuchungen zeigten, dass die Hippocampusschnitte von Kontrolltieren andere Veränderungen der Amplitude und des Doppelpulsverhältnisses aufzeigten als die Schnitte der Pilotiere. Anhand der Daten ist es denkbar, dass es zu einer Vordepolarisation der präsynaptischen Membran und zu einer Öffnung der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanäle kommt.

Da bereits anfallshemmende Eigenschaften des Casein-Kinase-2-Inhibitors 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazole (TBB) veröffentlicht wurden, untersuchten wir in einer abschließend Versuchsreihe, ob eine frühe TBB Behandlung nach dem Status epilepticus Einfluss auf die Funktion der Kaliumkanäle  $K_v7.2$  und  $K_v7.3$  bezogen auf Veränderungen der Amplitude und des Doppelpulsverhältnisses hat. Diese Annahme bestätigte sich, gleichzeitig ließ sich jedoch nicht ausschließen, dass weitere Ionenkanäle an dem Effekt- einer reduzierten Amplitude-beteiligt waren. Dies könnte in zukünftigen Forschungsarbeiten untersucht werden.

## 6 Thesen

1. Epilepsie ist eine der häufigsten Hirnerkrankungen, weltweit sind mehr als 70 Millionen Menschen betroffen; Temporallappenepilepsie ist die häufigste lokalisationsbedingte Epilepsieform bei Erwachsenen, sie ist häufig therapierefraktär.
2. Das Pilocarpinmodell eignet sich als Tiermodell, da Pilocarpin akut zu einem Status epilepticus und langfristig zu einer Hippocampussklerose führt. Diese Effekte von Pilocarpin sind mit Veränderungen der MTLLE vergleichbar.
3. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Epileptogenese und einer Veränderung in verschiedenen Kaliumkanälen. Im Hippocampus sind besonders  $K_v7$ -Kanäle der Untereinheiten 2 und 3 vertreten, diese werden durch XE991 gehemmt.
4. In dem neuronalen Netzwerk existieren gabaerge Interneurone, deren Transmitter (GABA) hemmend wirkt. Gabazin ist ein selektiver  $GABA_A$ -Antagonist.
5. Die Kombination aus einer Behandlung mit Gabazin + XE991 führt zur einer ausgeprägten Steigerung der Amplitude in Hippocampusschnitten von Kontrolltieren.
6. Es ist wahrscheinlich, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen  $K_v7.2$ - bzw.  $K_v7.3$ -Kanälen, Calciumangebot und Transmitterfreisetzung besteht.
7. Die Ergebnisse unserer Versuche lassen eine präsynaptische Lokalisation der  $K_v7.2$ - bzw.  $K_v7.3$ -Kanäle vermuten.
8. Eine Veränderung der Amplitude wurde durch magnesiumfreies ACSF nur in Hippocampusschnitten der Kontrollgruppe, nicht aber in den Schnitten der pilocarpinbehandelten Tiere sichtbar.
9. Wahrscheinlich führt magnesiumfreie Lösung zu einer Vordepolarisation der präsynaptischen Membran und zu einer Öffnung der spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanäle.
10. Eine Behandlung mit TBB führt sowohl in Hippocampusschnitten von Pilotieren als auch von Kontrolltieren zu einer verringerten Amplitude; TBB ist ein selektiver Antagonist der Proteinkinase CK2. Aus einer Applikation von TBB resultiert eine verringerte Erregbarkeit in der CA1-Region des Hippocampus. Möglicherweise kommt es durch TBB zu einer geringeren Transmitterfreisetzung.

## 7 Literaturverzeichnis

- Schulze-Bonhage, A. (2020): Epilepsien: Medikamentöse Therapie. *Springer Medizin Verlag GmbH & Springer Verlag GmbH, Teile von SpringerNature*, 10.02.2020. Online verfügbar unter [https://www.springermedizin.de/emedpedia/klinische-neurologie/epilepsien-medikamentose-therapie?epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-44768-0\\_119](https://www.springermedizin.de/emedpedia/klinische-neurologie/epilepsien-medikamentose-therapie?epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-44768-0_119), zuletzt geprüft am 27.10.2021.109Z.
- Bajorat, R.; Porath, K.; Kuhn, J; Goßla, E.; Goerss, D.; Sellmann, T. et al. (2018): Oral administration of the casein kinase 2 inhibitor TBB leads to persistent KCa2.2 channel up-regulation in the epileptic CA1 area and cortex, but lacks anti-seizure efficacy in the pilocarpine epilepsy model. *Epilepsy Research* 147, S. 42–50. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2018.08.012.
- Barhanin, J.; Lesage, F.; Guillemare, E.; Fink, M.; Lazdunski, M.; Romey, G. (1996): K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384 (6604), S. 78–80. DOI: 10.1038/384078a0.
- Barnwell, S., Forbes L.; Lugo, J., Lee, W.; Willis, S.; Gertz, S.; Hrachovy, R.; Anderson, A. (2009): Kv4.2 knockout mice demonstrate increased susceptibility to convulsant stimulation. *Epilepsia* 50 (7), S. 1741–1751. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2009.02086.x.
- Beghi, E.; Giussani, G.; Sander, J. (2015): The natural history and prognosis of epilepsy. *Epileptic Disorders* 17 (3), S. 243–253. DOI: 10.1684/epd.2015.0751.
- Schroeder, B.; Kubisch, C., Stein, V.; Jentsch, T. (1998): Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K<sup>+</sup> channels causes epilepsy. *Nature* 396 (6712), S. 687–690. DOI: 10.1038/25367.
- Borgo, C.; D'Amore, C.; Sarno, S.; Salvi, M.; Ruzzene, M. (2021): Protein kinase CK2: a potential therapeutic target for diverse human diseases. *Sig Transduct Target Ther* 6 (1), S. 183. DOI: 10.1038/s41392-021-00567-7.
- 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 (1), S. 175–183. DOI: 10.1111/epi.12474.
- Brown, D.; Passmore, G. (2009): Neural KCNQ (Kv7) channels. *British journal of pharmacology* 156 (8), S. 1185–1195. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00111.x.
- Camfield, P.; Camfield, C. (2015): Incidence, prevalence and aetiology of seizures and epilepsy in children. *Epileptic Disorders* 17 (2), S. 117–123. DOI: 10.1684/epd.2015.0736.
- Cavalheiro, E. (1995): The pilocarpine model of epilepsy. *Italian journal of neurological sciences* 16 (1-2), S. 33–37. DOI: 10.1007/BF02229072.
- Chakir, A.; Fabene, P. F.; Ouazzani, R.; Bentivoglio, M. (2006): Drug resistance and hippocampal damage after delayed treatment of pilocarpine-induced epilepsy in the rat. *Brain research bulletin* 71 (1-3), S. 127–138. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2006.08.009.
- Curia, G.; Longo, D.; Biagini, G.; Jones, R.; Avoli, M.(2008): The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods* 172 (2), S. 143–157. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2008.04.019.

- Dirkx, N.; Miceli, F.; Taglialatela, M.; Weckhuysen, S. (2020): The Role of Kv7.2 in Neurodevelopment: Insights and Gaps in Our Understanding. *Frontiers in Physiology* 11. DOI: 10.3389/fphys.2020.570588.
- Englot, D.; Morgan, V.; Chang, C. (2020): Impaired vigilance networks in temporal lobe epilepsy: Mechanisms and clinical implications. *Epilepsia* 61 (2), S. 189–202. DOI: 10.1111/epi.16423.
- Epilepsy (2021.000Z). Online verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>, zuletzt aktualisiert am 26.10.2021.000Z, zuletzt geprüft am 26.10.2021.126Z.
- Ermolinsky, B.; Arshadmansab, M. F.; Pacheco, Otorora L. F.; Zarei, M. M.; Garrido-Sanabria, E. R. (2008): Deficit of Kcnma1 mRNA expression in the dentate gyrus of epileptic rats. *Neuroreport* 19 (13). DOI: 10.1097/WNR.0b013e3283094bb6.
- Fiest, K.; Sauro, K.; Wiebe, S.; Patten, S.; Kwon, C.; Dykeman, J. et al. (2017): Prevalence and incidence of epilepsy. *Neurology* 88 (3), S. 296–303. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003509.
- Fisher, R.; Acevedo, C.; Arzimanoglou, A.; Bogacz, A., Cross, J.; Elger, C. et al. (2014): ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55 (4), S. 475–482. DOI: 10.1111/epi.12550.
- Goddard, G.; McIntyre, D.; Leech, C. (1969): A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Experimental Neurology* 25 (3), S. 295–330. DOI: 10.1016/0014-4886(69)90128-9.
- Goldman, A.; Glasscock, E.; Yoo, J.; Chen, T.; Klassen, T.; Noebels, J. (2009): Arrhythmia in heart and brain: KCNQ1 mutations link epilepsy and sudden unexplained death. *Science translational medicine* 1 (2), 2ra6. DOI: 10.1126/scitranslmed.3000289.
- Gross, C.; Yao, X.; Engel, T.; Tiwari, D.; Xing, L.; Rowley, S. et al. (2016): MicroRNA-Mediated Downregulation of the Potassium Channel Kv4.2 Contributes to Seizure Onset. *Cell reports* 17 (1). DOI: 10.1016/j.celrep.2016.08.074.
- Hellier, J.; Patrylo, P.; Buckmaster, P.; Dudek, F. (1998): Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 31 (1), S. 73–84. DOI: 10.1016/S0920-1211(98)00017-5.
- Jorge, B.; Campbell, C.; Miller, A.; Rutter, E.; Gurnett, C.; Vanoye, C. et al. (2011): Voltage-gated potassium channel KCNV2 (Kv8.2) contributes to epilepsy susceptibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (13), S. 5443–5448. DOI: 10.1073/pnas.1017539108.
- Kartheus, M. (2021): Differentielle Transkriptionsveränderungen von Kaliumkanälen bei chronischer Epilepsie.
- Köhling, R.; Wolfart, J. (2016): Potassium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6 (5). DOI: 10.1101/cshperspect.a022871.
- Kuo, L.; Lee, C.; Chen, J.; Wedeen, V.; Chen, C.; Liou, H.; Tseng, W. (2008): Mossy fiber sprouting in pilocarpine-induced status epilepticus rat hippocampus: a correlative study of

diffusion spectrum imaging and histology. *NeuroImage* 41 (3). DOI: 10.1016/j.neuroimage.2008.03.013.

Lauritano, A.; Moutton, S.; Longobardi, E.; Tran Mau-Them, F.; Laudati, G.; Nappi, P. et al. (2019): A novel homozygous KCNQ3 loss-of-function variant causes non-syndromic intellectual disability and neonatal-onset pharmacodependent epilepsy. *Epilepsia open* 4 (3), S. 464–475. DOI: 10.1002/epi4.12353.

Leite, J.; Bortolotto, Z.; Cavaleiro, E. (1990): Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 14 (4), S. 511–517. DOI: 10.1016/S0149-7634(05)80076-4.

Leite, J.; Cavaleiro, E. (1995): Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. *Epilepsy Research* 20 (2), S. 93–104. DOI: 10.1016/0920-1211(94)00070-D.

Lévesque, M.; Avoli, M. (2013): The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 37 (10), S. 2887–2899. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2013.10.011.

Main, M.; Cryan, J.; Dupere, J.; Cox, B.; Clare, J.; Burbidge, S. (2000): Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine. *Molecular pharmacology* 58 (2). DOI: 10.1124/mol.58.2.253.

Maslarova, A.; Salar, S.; Lapilover, E.; Friedman, A.; Veh, R.; Heinemann, U. (2013): Increased susceptibility to acetylcholine in the entorhinal cortex of pilocarpine-treated rats involves alterations in KCNQ channels. *Neurobiology of disease* 56, S. 14–24. DOI: 10.1016/j.nbd.2013.02.016.

Monaghan, M.; Menegola, M.; Vacher, H.; Rhodes, K.; Trimmer, J. (2008): Altered expression and localization of hippocampal A-type potassium channel subunits in the pilocarpine-induced model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 156 (3). DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.07.057.

N'Gouemo, P. (2011): Targeting BK (big potassium) Channels in Epilepsy. *Expert opinion on therapeutic targets* 15 (11), S. 1283–1295. DOI: 10.1517/14728222.2011.620607.

Niday, Z.; Tzingounis, A. (2018): Potassium Channel Gain of Function in Epilepsy: An Unresolved Paradox. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 24 (4). DOI: 10.1177/1073858418763752.

Nowak, L.; Bregestovski, P.; Ascher, P.; Herbet, A.; Prochiantz, A. (1984): Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307 (5950), S. 462–465. DOI: 10.1038/307462a0.

Okazaki, M.; Molnár, P.; Nadler, J. (1999): Recurrent mossy fiber pathway in rat dentate gyrus: synaptic currents evoked in presence and absence of seizure-induced growth. *Journal of neurophysiology* 81 (4), S. 1645–1660. DOI: 10.1152/jn.1999.81.4.1645.

Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. Online verfügbar unter [https://core.ac.uk/reader/195302650?utm\\_source=linkout](https://core.ac.uk/reader/195302650?utm_source=linkout).

- Pan, Z.; Kao, T.; Horvath, Z.; Lemos, J.; Sul, J.; Cranstoun, S. et al. (2006): A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26 (10), S. 2599–2613. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4314-05.2006.
- Poirier, K.; Hubert, L.; Viot, G.; Rio, M.; Billuart, P.; Besmond, C.; Bienvenu, T. (2017): CSNK2B splice site mutations in patients cause intellectual disability with or without myoclonic epilepsy. *Human mutation* 38 (8), S. 932–941. DOI: 10.1002/humu.23270.
- Punnakkal, P.; Dominic, D. (2018): NMDA Receptor GluN2 Subtypes Control Epileptiform Events in the Hippocampus. *Neuromol Med* 20 (1), S. 90–96. DOI: 10.1007/s12017-018-8477-y.
- Qi, Y.; Wang, J.; Bomben, V.; Li, D.; Chen, S.; Sun, H. et al. (2014): Hyper-SUMOylation of the Kv7 potassium channel diminishes the M-current leading to seizures and sudden death. *Neuron* 83 (5), S. 1159–1171. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.07.042.
- Rosenow, F.; Klein, K.; Hamer, H. (2015): Non-invasive EEG evaluation in epilepsy diagnosis. *Expert review of neurotherapeutics* 15 (4), S. 425–444. DOI: 10.1586/14737175.2015.1025382.
- Rudy, B. (1988): Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 25 (3), S. 729–749. DOI: 10.1016/0306-4522(88)90033-4.
- Sarno, S.; Reddy, H.; Meggio, F.; Ruzzene, M.; Davies, S.; Donella-Deana, A. et al. (2001): Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Letters* 496 (1), S. 44–48. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02404-8.
- Savrasova, A.; Lushnikova, I.; Isaeva, E.; Skibo, G.; Isaev, D.; Kostyuk, P. (2010): The effect of neuraminidase blocker on gabazine-induced seizures in rat hippocampus. *Fiziologichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine : 1994)* 56 (4), S. 14–18.
- 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. *Neurobiology of disease* 45 (1), S. 337–347. DOI: 10.1016/j.nbd.2011.08.019.
- Schulze, F.; Müller, S.; Guli, X.; Schumann, L.; Brehme, H.; Riffert, T. et al. (2020): CK2 Inhibition Prior to Status Epilepticus Persistently Enhances K Ca 2 Function in CA1 Which Slows Down Disease Progression. *Frontiers in cellular neuroscience* 14. DOI: 10.3389/fncel.2020.00033.
- Shah, M.; Huang, Z.; Martinello, K. (2013): HCN and KV7 (M-) channels as targets for epilepsy treatment. *Neuropharmacology* 69, S. 75–81. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.03.005.
- Sharma, A.; Reams, R.; Jordan, W.; Miller, M.; Thacker, H.; Snyder, P. (2007): Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Pathogenesis, Induced Rodent Models and Lesions. *Toxicol Pathol* 35 (7), S. 984–999. DOI: 10.1080/01926230701748305.

- Stanfield, P.; Nakajima, S.; Nakajima, Y. (2002): Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier K<sup>+</sup> channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 145, S. 47–179. DOI: 10.1007/BFb0116431.
- Stegen, M.; Kirchheim, F.; Hanuschkin, A.; Staszewski, O.; Veh, R.; Wolfart, J. (2012): Adaptive intrinsic plasticity in human dentate gyrus granule cells during temporal lobe epilepsy. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 22 (9). DOI: 10.1093/cercor/bhr294.
- Sun, J.; Liu, Y.; Baudry, M.; Bi, X. (2020): SK2 channel regulation of neuronal excitability, synaptic transmission, and brain rhythmic activity in health and diseases. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1867 (12), S. 118834. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2020.118834.
- Sun, J.; Kapur, J. (2012): M-type potassium channels modulate Schaffer collateral–CA1 glutamatergic synaptic transmission. *The Journal of physiology* 590 (Pt 16), S. 3953–3964. DOI: 10.1113/jphysiol.2012.235820.
- Swartzwelder, H.; Anderson, W.; Wilson, W. (1988): Mechanism of electrographic seizure generation in the hippocampal slice in Mg<sup>2+</sup>-free medium: the role of GABA<sub>A</sub> inhibition. *Epilepsy Research* 2 (4), S. 239–245. DOI: 10.1016/0920-1211(88)90014-9.
- Tatum, W. (2012): Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Clinical Neurophysiology* 29 (5), S. 356–365. DOI: 10.1097/WNP.0b013e31826b3ab7.
- Thijs, R.; Surges, R.; O'Brien, T.; Sander, J. (2019): Epilepsy in adults. *The Lancet* 393 (10172), S. 689–701. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32596-0.
- Thom, M. (2014): Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40 (5), S. 520–543. DOI: 10.1111/nan.12150.
- Todt, H. (2019): Epilepsie. In: Christian Speer, Manfred Gahr und Jörg Dötsch (Hg.): Pädiatrie. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer eBook Collection Medicine), S. 169–177.
- Toffa, D.; Kpadonou, C.; Gams M.; Ouedraogo, M.; Sow, A.; Ndiaye, M.; Samb, A. (2018): Le magnésium et le calcium réduisent la sévérité des troubles de la mémoire spatiale pour le modèle kaïnique d'épilepsie mésiale temporale chez la souris. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 96 (11), S. 1132–1144. DOI: 10.1139/cjpp-2018-0020.
- Trepel, M. (2022): Epilepsie. In: Neuroanatomie. Struktur und Funktion. 8. Auflage. München: Elsevier.
- Turski, W.; Cavalheiro, E.; Schwarz, M.; Czuczwar, S.; Kleinrok, Z.; Turski, L. (1983): Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioural Brain Research* 9 (3), S. 315–335. DOI: 10.1016/0166-4328(83)90136-5.
- Wang, Q.; Curran, M.; Splawski, I.; Burn, T.; Millholland, J.; VanRaay, T. et al. (1996): Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature genetics* 12 (1), S. 17–23. DOI: 10.1038/ng0196-17.

Waschke, J.; Böckers, T.; Paulsen, F. (2015): Hippocampus. In: Anatomie. Das Lehrbuch : Sobotta. Unter Mitarbeit von Wolfgang H. Arnold. München: Elsevier Urban & Fischer. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=5553761>.

Weckhuysen, S.; Mandelstam, S.; Suls, A.; Audenaert, D.; Deconinck, T.; Claes, L. et al. (2012): KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Annals of neurology* 71 (1), S. 15–25. DOI: 10.1002/ana.22644.

Welsch, U.; Deller, T. (2018): Regionen und Schichten des Hippocampus. In: Histologie und mikroskopische Anatomie: das Lehrbuch. Urban-&-Fischer-Verlag. 5. Auflage. München: Elsevier.

Wieser, H. (2004): ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 45 (6), S. 695–714. DOI: 10.1111/j.0013-9580.2004.09004.x.

Ye, Z.; Li, D.; Li, L.; Pan, H. (2011): Protein kinase CK2 increases glutamatergic input in the hypothalamus and sympathetic vasomotor tone in hypertension. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (22), S. 8271–8279. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1147-11.2011.

Young, C.; Stegen, M.; Bernard, R.; Müller, M.; Bischofberger, J.; Veh, R. et al. (2009): Upregulation of inward rectifier K<sup>+</sup> (Kir2) channels in dentate gyrus granule cells in temporal lobe epilepsy. *The Journal of physiology* 587 (Pt 17), S. 4213–4233. DOI: 10.1113/jphysiol.2009.170746.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die vorliegende Dissertation wird der Hochschule erstmalig vorgelegt. Ich habe bisher weder ein anderes Promotionsverfahren eröffnet, noch ein Promotionsverfahren erfolglos beendet.

Bielefeld,

Ricarda Benz

## **Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling und Herrn Prof. Dr. med. Timo Kirschstein für die Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie für die umfassende Betreuung und Unterstützung während dieser Dissertation bedanken. Auch Frau Prof. Dr. med. Astrid Bertsche danke ich für die konstruktive Diskussion der Daten.

Ich danke den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Physiologie Rostock für die kompetente Unterstützung, die Beantwortung meiner Fragen und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Mein Dank gilt dabei besonders Dr. rer. nat. Steffen Müller.

Besonders möchte ich mich bei meinen Mitdotorandinnen Ella Nissen und Dora Hübner für die intensive Freundschaft, die gemeinsame Zeit im Labor und die gegenseitige Motivation bedanken.

Abschließend möchte ich auch meinen Eltern und Geschwistern für interessiertem Zuhören und Nachfragen, Korrekturlesen und vielfältige Unterstützung während meines gesamten Studiums danken.