

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

DIREKTOR: PROF. DR. MED. RÜDIGER KÖHLING

PROTEINEXPRESSION DER KALIUMKANÄLE KIR6.1, KIR6.2 UND KCNQ2 IM TIERMODELL CHRONISCHER EPILEPSIE

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTORIN DER ZAHNMEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

ELISABETH ANNA HENDINGER | GEB. AM 10.07.1997 IN PLAUEN
AUS LEIPZIG

ROSTOCK | EINGEREICHT 03.2022 | VERTEIDGT 11/2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004334



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen
4.0 International Lizenz.

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

1. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Timo Kirschstein
Einrichtung: Oscar Langendorff Institut für Physiologie - Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Astrid Bertsche
Einrichtung: Klinik und Poliklinik für Kinder und Jugendmedizin

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Mittmann
Einrichtung: Institut für Physiologie und Pathophysiologie Universität Mainz

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
1.1	Hippocampus.....	1
1.2	Epilepsie	3
1.3	Mesiale Temporallappenepilepsie.....	4
1.4	Pilocarpin Modell	5
1.5	Kalium-Kanäle	6
1.5.1	Kir-Kanäle.....	7
1.5.2	Spannungsabhängige Kv-Kaliumkanäle	9
1.6	Zielstellung	10
II.	Material und Methoden	11
2.1	Material.....	11
2.2	Methoden	14
2.2.1	Pilocarpin-Injektion	14
2.2.2	Präparat-Entnahme und Fixierung.....	14
2.2.3	Histologische Schnittbilder	15
2.2.4	Antigen-Retrieval	15
2.2.5	Antikörper	16
2.2.6	Herstellung der Immunhistologischen Schnittbilder.....	16
2.2.7	Statistik.....	19
III.	Ergebnisse	21
3.1	Veränderung der Translation bei Temporallappenepilepsie	22
3.1.1	Kir6.1	22
3.1.2	Kir6.2.....	29
3.1.3	KCNQ2	34
3.2	Alterskorrelation.....	41
IV.	Diskussion	42
4.1	Translationale Veränderungen von Kaliumkanälen bei chronischer Epilepsie.....	42

4.1.1	Kir6.1 und Kir6.2.....	43
4.1.2	KCNQ2.....	45
4.2	Alterskorrelation.....	48
4.2.1	Kir6.1 und Kir6.2.....	48
4.2.2	KCNQ2.....	48
V.	Zusammenfassung.....	50
VI.	Thesen.....	52
VII.	Literaturverzeichnis.....	53
VIII.	Danksagung.....	60
IX.	Eidesstattliche Versicherung.....	61
X.	Lebenslauf.....	62

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Histologischer Aufbau Hippocampus	1
Abbildung 2: Einteilung der Kaliumkanäle.....	6
Abbildung 3: Beispiel Darstellung Pilocarpintier 799-17 Kir6.1 im Dapi-Kanal	17
Abbildung 4: Beispiel Darstellung Pilocarpintier 799-17 Kir6.1 in Cy3 Kanal.....	18
Abbildung 5: Beispiel Darstellung Pilocarpintier 650-29 KCNQ2 in Alexa488-Kanal	18
Abbildung 6: Beispiel Darstellung Pilocarpintier 799-17 in Dapi-Kanal (links) und Cy3- Kanal (rechts); Einteilung der ROIs	19
Abbildung 7: Experimentelles Vorgehen	21
Abbildung 8: Kir6.1 Vergleich von Kontrollgruppe (blau) und Pilocarpingruppe (rot).....	23
Abbildung 9: Gegenüberstellung Kontroll- (A und C) und Pilocarpintier (B und D) mit primären Antikörper Kir6.1 im Dapi-Kanal (blau) und Cy3 Kanal (grün).....	24
Abbildung 10: Darstellung aller Regionen des Hippocampus Kontrolltieres (blau) Kir 6.1	25
Abbildung 11: Darstellung aller Regionen des Hippocampus Pilocarpintieres (rot) Kir 6.1 ...	25
Abbildung 12: Kontrolltier (Nr. 650-34) Dapi-Aufteilung einzelner Regionen	26
Abbildung 13: Kontrolltier (Nr. 650-34) Cy3-Aufteilung einzelner Regionen	27
Abbildung 14: Pilocarpintier (Nr. 650-24) Dapi-Aufteilung einzelner Regionen	27
Abbildung 15: Pilocarpintier (Nr. 650-24) Cy3-Aufteilung einzelner Regionen	28
Abbildung 16: Kir6.2-Vergleich zwischen Kontrollgruppe (blau) und Pilocarpingruppe (rot) .	29
Abbildung 17: Gegenüberstellung Kontroll (A und C)- und Pilocarpintier (B und D) mit primärem Antikörper Kir 6.2 im Dapi-Kanal (blau) und Cy3-Kanal (grün).....	30
Abbildung 18: Darstellung der einzelnen Regionen des Hippocampus Kontrolltiers Kir6.2 ..	31
Abbildung 19: Darstellung der einzelnen Regionen des Hippocampus Pilocarpintiers (rot) Kir6.2	31
Abbildung 20: Kontrolltier (Nr. 650-34) Dapi Auftreilung einzelner Regionen	32
Abbildung 21: Kontrolltier (Nr.650-34) Cy3-Aufteilung der einzelnen Regionen	32
Abbildung 22: Pilocarpintier (Nr.799-12) Dapi-Aufteilung der einzelnen Regionen.....	33
Abbildung 23: Pilocarpintier (Nr.799-12) Cy3-Aufteilung der einzelnen Regionen.....	33
Abbildung 24: KCNQ2 Vergleich zwischen Kontrollgruppe (blau) mit Pilocarpingruppe (rot)	34

Abbildung 25: Gegenüberstellung Kontroll- (A und C) und Pilocarpintier (B und D) mit primärem Antikörper KCNQ2 im Dapi-Kanal (blau) und Alexa488-Kanal (rot)	35
Abbildung 26: Darstellung der einzelnen Regionen des Hippocampus Kontrolltiers KCNQ2	36
Abbildung 27: Vergleich Gyrus dentatus Stratum moleculare (rot) mit Gyrus dentatus Stratum granulosum (rot gestreift) Pilocarpintier KCNQ2-Kanal (links); Vergleich Stratum oriens (rot) und Gyrus dentatus Stratum granulosum (rot gestreift) Pilocarpintier KCNQ2-Kanal (rechts).....	37
Abbildung 28: Vergleich Cornu Ammonis 1 (rot) mit Gyrus dentatus Stratum granulosum (rot gestreift) Pilocarpintier KCNQ2-Kanal (links); Vergleich Cornu Ammonis 3 (rot) und Gyrus dentatus Stratum granulosum (rot gestreift) Pilocarpintier KCNQ2-Kanal (rechts).....	37
Abbildung 29: Vergleich Gyrus dentatus Stratum moleculare (rot) mit Stratum lacunosum (rot gestreift) Pilocarpintier KCNQ2-Kanal (links); Vergleich Stratum oriens (rot) und Stratum lacunosum (rot gestreift) Pilocarpintier KCNQ2-Kanal (rechts)	38
Abbildung 30: Vergleich Stratum radiatum mit Gyrus dentatus Stratum granulosum Pilocarpintier KCNQ2-Kanal	38
Abbildung 31: Kontrolltier (Nr. 799-44) Dapi-Aufteilung einzelner Regionen	39
Abbildung 32: Kontrolltier (Nr.799-44) Alexa488 Aufteilung der einzelnen Regionen	39
Abbildung 33: Pilocarpintier (Nr. 799-17) Dapi-Aufteilung der einzelnen Regionen.....	40
Abbildung 34: Pilocarpintier (Nr. 799-17) Alexa488-Aufteilung der einzelnen Regionen	40

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Fixierung der Präparate	11
Tabelle 2: Histologisches Schnittbild	11
Tabelle 3: Antigen Retrieval Citratpuffer	11
Tabelle 4: 10xPBS (Phosphate buffered saline) / 1l.....	11
Tabelle 5: Primärer Antikörper.....	12
Tabelle 6: Sekundäre Antikörper	12
Tabelle 7: Mikroskop	12
Tabelle 8: Allgemeine Materialien.....	13
Tabelle 9: Gruppeneinteilung.....	22

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Begriff
ADP	Adenosindiphosphat
Anova	engl. Analysis of Variance
ATP	Adenosintriphosphat
BFNC	gutartigen familiären Anfällen bei Neugeborenen (engl. benign familial neonatal convulsions)
BKCa	engl. large-conductance calcium- and voltage-activated potassium channel
CA	Cornu Ammonis
CMV	Cytomegalovirus
Cy3	engl. Sulfo-Cyanine 3
Dapi	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DEND	engl. developmental delay, epilepsy, and neonatal diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GD	Gyrus dentatus
IKCa	engl. Intermediate-conductance calcium- and voltage-activated potassium channel
ILAE	engl. „International League Against Epilepsy“
K2P	2-Poren-Domäne-Kaliumkanal (engl. two-pore domain potassium channel)
KCNJ11	engl. Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 11
KCNQ	engl. Potassium Channel, Voltage-Gated, KQT-like subfamily
KCO	engl. K ⁺ Channel Opener
Kir	engl. inward rectifier potassium channels
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
M-Strom	Muskarin abhängiger Strom
NDP	Nukleosiddiphosphate

NGS	engl. normal goat serum
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (engl.: Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
ROI	engl. region of interest
SKCa	engl. small-conductance calcium-activated potassium channel
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. Einleitung

1.1 Hippocampus

Die Hippocampusformation, bestehend aus Hippocampus und Gyrus parahippocampalis, ist Teil des limbischen Systems. Ebenfalls dazu zählen der Fornix, der Gyrus cinguli, das Corpus amygdaloideum und das Corpus mammillare (Trepel 2017). Der Hippocampus ist notwendig für die Gedächtnisbildung, für die Orientierung im Raum und Bestandteil zahlreicher endokriner, vegetativer und emotionaler Vorgänge (Trepel 2017). Er befindet sich bilateral an der medialen Wand des Seitenventrikelunterhorns innerhalb des Temporallappens. Der Gyrus parahippocampalis (mit Area entorhinalis und Subiculum) erstreckt sich medial des Hippocampus (Trepel 2017). Nach posterior verläuft der Hippocampus bogenförmig bis zum kaudalen Ende des Corpus callosum. Afferente Fasern erreichen ihn über die Area entorhinalis, den Gyrus cinguli, das Corpus amygdaloideum, den Thalamus und über das Septum (Trepel 2017). Efferente Fasern ziehen im Fornix zum Septum, Corpus amygdaloideum, Hypothalamus und zu den Corpora mammillaria unter Bildung des sogenannten Papez-Neuronenkreises (Trepel 2017).

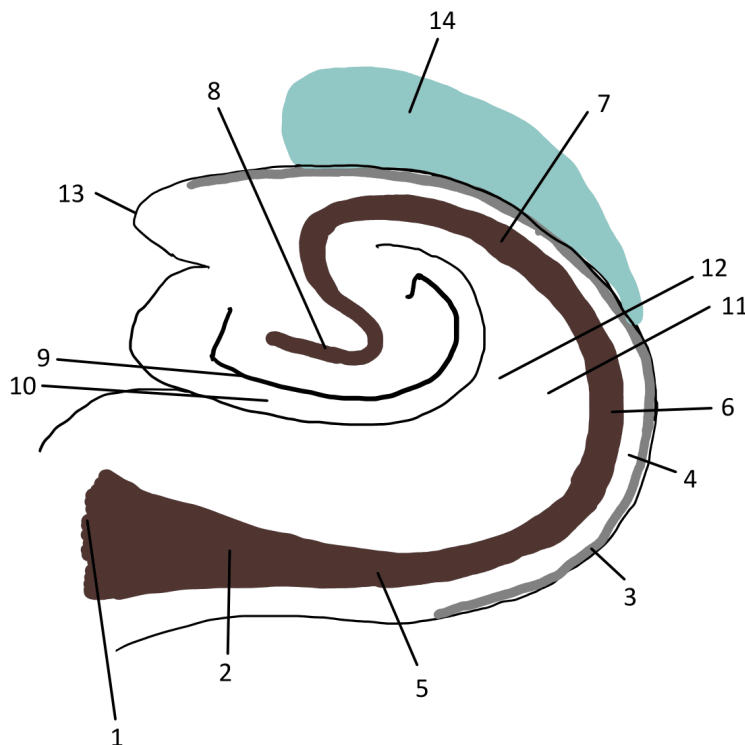


Abbildung 1: Histologischer Aufbau Hippocampus

Übergang Gyrus parahippocampalis 1, Subiculum 2, Alveolus 3, Stratum oriens 4, Cornu Ammonis 1 5, Cornu Ammonis 2 6, Cornu Ammonis 3 7, Cornu Ammonis 4 8, Gyrus dentatus

Stratum granulosum **9**, *Gyrus dentatus* *Stratum moleculare* **10**, *Stratum radiatum* **11**, *Stratum lacunosum* **12**, *Stratum moleculare* **11; 12**, *Fimbria hippocampalis* **13**, *Seitenventrikelunterhorn* **14**

Die äußerste Schicht, die dem Seitenventrikel aufliegt, bildet der Alveolus. Diese Struktur führt viele efferente und einige afferente Fasern über die Fimbria hippocampi in den Fornix (Trepel 2017). Nach innen schließt sich dem Alveolus das Stratum oriens (Korbzellen) an. Dem folgt das Stratum pyramidale des Cornu Ammonis, eine Schicht aus glutamergen Pyramidenzellen, die sich je nach Region in ihrer Dichte und Größe unterscheiden. Innerhalb der CA1-Region befinden sich vor allem kleine Pyramidenzellen von hoher Dichte (Trepel 2017). Im CA2 befinden sich große Pyramidenzellen hoher Dichte, die sich in Richtung CA3 sowie CA4 zunehmend lockerer anordnen. Ihre Fortsätze sind in den Alveolus gerichtet (Trepel 2017). Das Cornu Ammonis ist somit Teil des efferenten Systems. An den Stratum pyramidale grenzt das Stratum moleculare an (Trepel 2017). Dies ist eine zellarme Schicht, die zur interneuronalen Verschaltung zwischen Pyramiden- und Korbzellen beiträgt. Genauer betrachtet lässt es sich aufteilen in ein in Richtung Cornu Ammonis gerichtetes Stratum radiatum und ein in Richtung Gyrus dentatus gerichtetes Stratum lacunosum (Trepel 2017). Der Gyrus dentatus, als wichtigstes afferentes System des Hippocampus, ordnet sich bogenförmig um das Cornu Ammonis an (Trepel 2017). Er unterteilt sich in ein Stratum granulosum und ein Stratum moleculare. Das Stratum granulosum besteht aus kleinen Körnerzellen (Trepel 2017). Die funktionelle Projektion von Informationen erfolgt von den Pyramidenzellen der Area entorhinalis über den Tractus perforans zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus Stratum granulosum, weiter über deren Axone (Moosfasern) zu den Pyramidenzellen von CA3, weiter über CA2 und CA 1 zum Alveolus, der über die Fimbria hippocampalis alle efferenten Ziele erreicht (Trepel 2017). Zusätzlich bildet der Hippocampus über die Schaffer-Kollateralen einen wichtigen Teil der Gedächtnisbildung. Dabei erfolgt der Informationsfluss über die Area entorhinalis zum Gyrus dentatus Stratum granulosum, weiter zu CA3, anschließend über die Schaffer-Kollateralen zu CA1 und schließlich wieder zum Subiculum beziehungsweise zur Area entorhinalis (Trepel 2017).

1.2 Epilepsie

Die Internationale Liga gegen Epilepsie (ILAE) definiert Epilepsie als neuronale Erkrankung aus entweder mindestens zwei nicht provozierten (oder reflexartigen) Anfällen im Abstand von mehr als 24 Stunden oder einem nicht provozierten (oder reflexartigen) Anfall mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 60 % innerhalb der nächsten zehn Jahre für weitere Anfälle nach dem zweiten, nicht provozierten Anfall oder ein Epilepsiesyndrom (Fisher et al. 2014).

Im Jahr 2017 wurde eine neue Klassifikation für Epilepsie von der ILAE veröffentlicht, welche die Diagnostik von Epilepsie durch ein Drei-Stufen-Schema vereinfacht (Scheffer et al. 2017). Die erste Stufe bildet die Bestimmung der Anfallsform. Die Basisklassifikation der Anfallsformen von 2017 vergleicht nach der Art des Auftretens in einen fokalen, generalisierten und unbekanntem Beginn (Fisher et al. 2017). Des Weiteren werden alle drei Formen nach motorischen (z. B. tonisch-klonisch) und nicht motorischen (z. B. sensorisch) Eigenschaften untersucht (Fisher et al. 2017). Die fokale Form kann fakultativ nach „Anfall bei Bewusstsein“ und „Anfall nicht bei Bewusstsein“ eingeteilt werden (Fisher et al. 2017). Die zweite Stufe ist die Art der Epilepsie. Sie basiert auf den Anfallsformen. So kategorisiert das ILAE nach „fokaler Epilepsie“, „generalisierter Epilepsie“, „unklassifizierter Epilepsie“ und „kombinierte generalisierte und fokale Epilepsie“ (Scheffer et al. 2017). Einige Epilepsieformen können verschiedenen Gruppen zugeordnet werden (Scheffer et al. 2017). Die Diagnostik erfolgt mittels EEG. Die dritte und letzte Stufe ist die Einstufung der Erkrankung in ein Epilepsiesyndrom (Scheffer et al. 2017). Dieses wird gekennzeichnet durch verschiedene spezifische Merkmale der Anfallsform, des EEG und der Bildgebung (Scheffer et al. 2017). Es werden zwei grundlegende Gruppe unterschieden: die idiopathisch generalisierte Epilepsie und die selbstlimitierte fokale Epilepsie (Scheffer et al. 2017). Bei der idiopathisch generalisierten Epilepsie gibt es vier Epilepsiesyndrome: Absenceepilepsie des Kindesalters, die juvenile Absenceepilepsie, die juvenile myoklonische Epilepsie und die Epilepsie mit ausschließlich generalisierten tonisch-klonischen Anfällen (Scheffer et al. 2017). Die selbst limitierenden fokalen Epilepsien unterteilen sich in die häufige Epilepsie mit zentrotemporalen „spikes“, in die Okzipitallappenepilepsie der Kindheit, der Frontallappen- (BEAUMANOIR und NAHORY 1983), der Temporallappen- (Berkovic et al. 1996) und der Parietallappenepilepsie (Sveinbjornsdottir und Duncan 1993). Die Ätiologie basiert auf sechs Varianten: strukturell, genetisch, infektiös, metabolisch, immunvermittelt und unbekannt (Scheffer et al. 2017). Bei einem Patienten

beziehungsweise einem Epilepsiesyndrom können mehrere Ursachen zutreffen (Scheffer et al. 2017). Die strukturelle Ätiologie basiert auf einer anatomischen Veränderung des Gehirns, zum Beispiel nach einem Schlaganfall, Trauma, Infektion oder genetisch bedingten Fehlentwicklungen (Scheffer et al. 2017). Diese strukturelle Läsion löst eine Epilepsie aus, zum Beispiel die mesiale Temporallappenepilepsie aufgrund einer Hippocampusklerose (Scheffer et al. 2017). Die genetische Ätiologie basiert auf einer genetisch vererbten Mutation (Scheffer et al. 2017). Diese Ätiologie ist sehr selten beziehungsweise häufig noch unbekannt. Ein passendes Beispiel stellen die benignen familiären Neugeborenenkrämpfe (BFNC) dar. Die Position der Genmutationen für BFNC wurden dem Chromosom 20q13.3 (Leppert et al. 1989) und auf Chromosom 8q24 (Biervert et al. 1998) zugeordnet. Zudem wurde der KCNQ2-Kanal auf dem Chromosom 20q13.3 und der KCNQ3-Kanal auf dem menschlichen Chromosom 8q24 identifiziert (Biervert et al. 1998). Die dritte und weltweit häufigste Ätiologie ist die Infektion (Vezzani et al. 2016). Die Epilepsie ist eine Folge der Infektionserkrankung. Beispiele für eine solche Infektionserkrankung sind Tuberkulose, zerebrale Malaria, Neurozystizerkose oder auch kongenitale Infektionen (z. B. CMV-Infektionen) (Scheffer et al. 2017). Die Entstehung einer Epilepsie kann auch eine metabolische Ursache, wie zum Beispiel zerebralen Folsäuremangel, haben (Scheffer et al. 2017). Ein metabolisches Krankheitsbild führt dabei zu biochemischen Veränderungen im gesamten Organismus (Scheffer et al. 2017). Es wird vermutet, dass einige metabolische bedingte Epilepsien genetische Defekte aufweisen (Scheffer et al. 2017). Eine immunvermittelte Epilepsie basiert auf einem Defekt des Immunsystems (Scheffer et al. 2017). Ein Beispiel stellt die Autoimmunenzephalitis dar, eine autoimmune Entzündung des ZNS (Scheffer et al. 2017). Trotz aller technischer Möglichkeiten sind einige Epilepsieformen ätiologisch ungeklärt. Wissenschaftliches Arbeiten in diesen Bereichen ist weiterhin sehr wichtig.

1.3 Mesiale Temporallappenepilepsie

Die mesiale Temporallappenepilepsie ist eines der häufigsten Epilepsiesyndrome (Berkovic et al. 1996). Anatomisch umfasst die mesiale Temporallappenepilepsie den amygdalo-hippocampalen Komplex und den enterorhinalen Kortex (Tatum 2012). Dabei scheinen vor allem Funktionsstörungen des Hippocampus, die durch eine neuronale Übererregbarkeit entstehen, für fokale Anfälle veranlagt zu sein (Schwartzkroin 1986). Verschiedene Ursachen für mesiale Temporallappenepilepsie sind bekannt.

Die strukturelle Ätiologie, die Hippocampussklerose, tritt am häufigsten auf (Tatum 2012). Die Hippocampussklerose zeigt sich typischerweise durch eine Moosfasersprossung und eine Veränderung der Neuropeptid-Y (NPY)-Fasernetzwerke im Gyrus dentatus (Thom et al. 2009). Die Hippocampussklerose kann symmetrisch bilateral, asymmetrisch bilateral oder unilateral auftreten (Thom et al. 2009). Seltene strukturelle Ursachen sind Tumore, wie zum Beispiel Gliome und Angiome, Infektionen oder Traumata (Tatum 2012). Genetische Ursachen für mesiale Temporallappenepilepsie sind ebenfalls bekannt (Crompton et al. 2010). Ein einheitliches Vererbungsmuster kann nicht beschrieben werden (Crompton et al. 2010), oftmals handelt es sich jedoch um einen dominanten Erbgang (Crompton et al. 2010). Häufig auftretende Symptome bei mesialer Temporallappenepilepsie sind komplexe partielle Anfälle mit teilweise vorausgehenden epileptischen Auren (Serrano-Castro et al. 1998).

1.4 Pilocarpin Modell

Das Pilocarpin Modell ist ein wichtiger Motor zum Verständnis der Pathogenese von mesialer Temporallappenepilepsie (Curia et al. 2008). Es handelt sich um ein isomorphes Status-epilepticus-Modell, begründet von Turski im Jahr 1983 (Turski et al. 1983). Als isomorphes Modell zeigt es die Symptome und Folgen der chronischen Temporallappenepilepsie, nicht aber die grundlegende Ätiologie (Curia et al. 2008). Die systemische Injektion von Pilocarpin führt zu einer Aktivierung eines M1-Muscarinrezeptors (Nagao et al. 1996). Es entsteht ein Ungleichgewicht zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Informationen (Priel und Albuquerque 2002). Daraus resultieren Hypoaktivität, Tremor, Kratzen, Kopfwippen, myoklonische Bewegungen, erhöhter Speichelfluss und schließlich ein Status epilepticus (Turski et al. 1983). Im Gegensatz dazu kann der klassische Muscarin-Antagonist Atropin den Rezeptor blockieren (Clifford et al. 1987). Dem Status epilepticus folgen eine Latenzzeit und später weitere epileptische Anfälle (Leite et al. 1990). Durch Pilocarpin entstehen strukturelle Veränderungen des Hippocampus, wie zum Beispiel die Moosfasersprossung, der Verlust von Interneuronen und die ektopische Proliferation von Körnerzellen des Gyrus dentatus (Wieser 2004). Pilocarpin-induzierte Anfälle wirken ebenfalls sensibel auf die Amygdala, den Thalamus, den olfaktorischen Kortex, den Neocortex und die Substantia nigra (Turski et al. 1983). Das experimentelle Vorgehen, die Nagetierspezies, der Stamm, das Geschlecht, das Alter, die Dosis und die Art von Pilocarpin und eine gegebenenfalls andere zusätzliche Medikation beeinflussen die Versuchsergebnisse (Curia et al.

2008). Turski beobachtete bei seinen Versuchstieren (Ratten) die ersten Krampfanfälle im Alter von sieben bis zwölf Tagen (Turski et al. 1983). Mit zunehmendem Alter von über vier Wochen steigt die Anfälligkeit. Die möglichen Gehirnschädigungen sowie Verhaltensmuster zeigten sich bei einem Alter von 15 bis 21 Tagen und mit einer Verzögerung von ein bis zwei Wochen nach dem Status epilepticus (Turski et al. 1983). Pharmakologisch können Pilocarpin-induzierte Anfälle durch Antiepileptika wie zum Beispiel Diazepam gestoppt werden (Turski et al. 1983). Im Gegensatz dazu können Pharmaka wie zum Beispiel Lithium, Morphin, Aminophyllin, Ethosuximid und Acetazolamid die Anfälle verstärken (Turski et al. 1983).

1.5 Kalium-Kanäle

Kalium-Kanäle spielen in allen eukaryontischen und prokaryotischen Zellen eine entscheidende Rolle. Sie dienen als wichtiger Bestandteil im Nervengewebe bei der Regulation von Aktionspotenzialen beziehungsweise bei der Einstellung des Ruhemembranpotenzials (Lang et al. 2007).

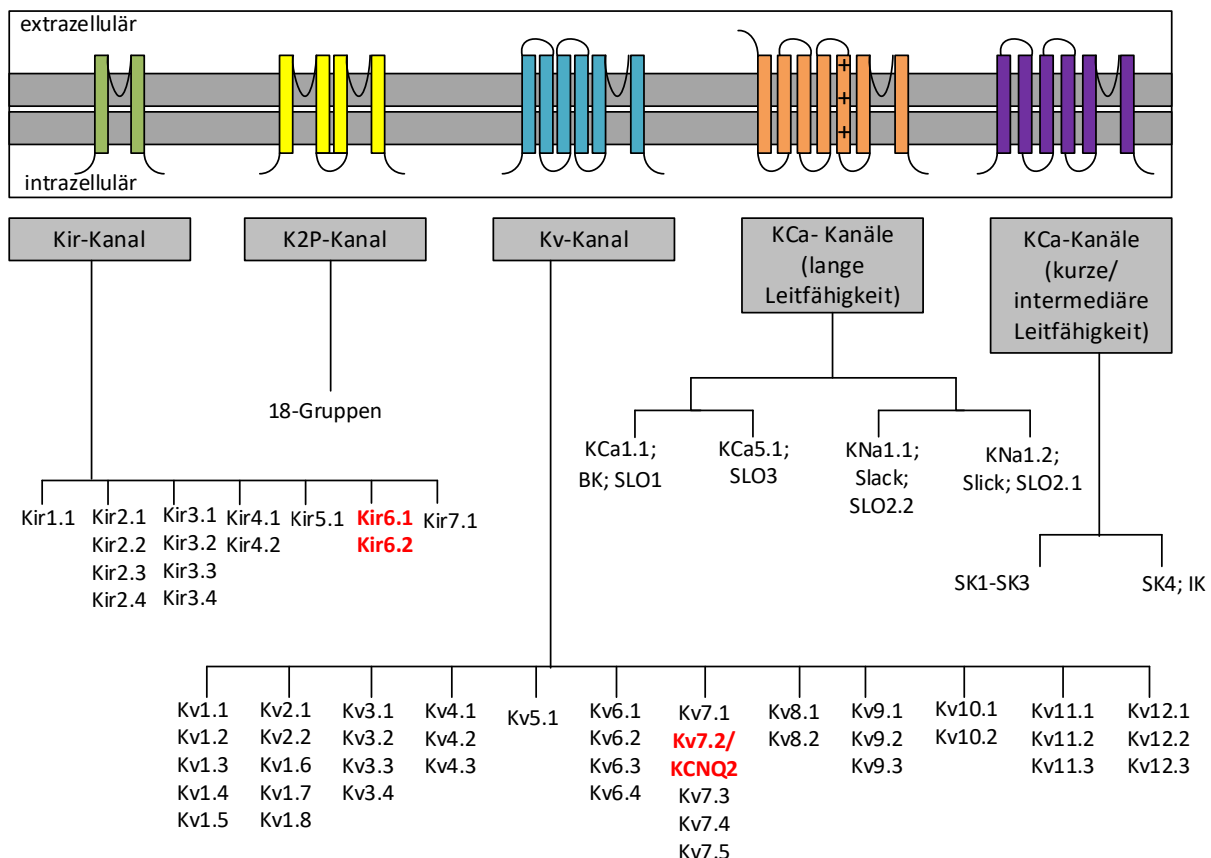


Abbildung 2: Einteilung der Kaliumkanäle

Kaliumkanäle bestehen aus vier unabhängigen Hauptuntereinheiten, die häufig als α -Untereinheit bezeichnet werden. Die vier Hauptuntereinheiten ordnen sich symmetrisch um eine Pore

(Coetzee et al. 1999). Zusätzlich variiert die Anzahl der Transmembran-Domänen je α -Untereinheit. Liegen 2-Transmembran-Domänen vor, handelt es sich um einen einwärtsgerichteten Kaliumkanal (Kir-Kanal) (Köhling und Wolfart 2016; Kubo et al. 2005). Bei vier Transmembrandomänen handelt es sich um einen 2-Poren-Domäne-Kaliumkanal (K2P) (Köhling und Wolfart 2016; Goldstein et al. 2005; Goldstein et al. 2001). Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv-Kanal) bestehen aus sechs Transmembrandomänen (Köhling und Wolfart 2016; Gutman et al. 2003). Bei der letzten Gruppe handelt es sich um die Calcium-abhängigen Kaliumkanäle, die ebenfalls entweder bei IKCa und SkCa aus sechs Transmembrandomänen oder bei BKCa aus sieben Transmembrandomänen aufgebaut sind (Guéguinou et al. 2014; Kaczmarek et al. 2017). Neben den α -Untereinheiten können sich Kaliumkanäle durch verschiedener β -Untereinheiten, Heteromeren und differenzielle Expression stark modifizieren (Coetzee et al. 1999; Köhling und Wolfart 2016). Die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle Kir6.1 und Kir6.2 (rot) sowie die spannungsabhängigen Kaliumkanäle Kv7.2/KCNQ2 (rot) wurden in nachfolgender Methode genauer untersucht und immunhistologisch dargestellt.

1.5.1 Kir-Kanäle

Bei den Kir-Kanälen handelt es sich um einwärtsgerichtete Kaliumkanäle. Kir-Kanäle wurden als Erstes in der Skelettmuskulatur entdeckt (Katz B, et al. 1949) und seitdem in verschiedensten Zelltypen aufgefunden (Hibino et al. 2010). Sie sind wichtig bei der Stabilisierung des Ruhemembranpotenzials und der Dauer des Aktionspotenzials (Sakmann und Trube 1984).

Die Fähigkeit des KaliumEinstroms ist abhängig von einem elektrochemischen Gradienten (Hibino et al. 2010). Der KaliumEinstrom erfolgt bei einem Membranpotenzial negativer als beim Kalium-Gleichgewichtspotenzial, bedeutet unter -90 mV (Sakmann und Trube 1984).

1.5.1.1 ATP-abhängige Kir-Kanäle

ATP-abhängige Kir6.x-Kanäle wurden als Erstes in Herzmuskelzellen (Noma 1983; Sakmann und Trube 1984), anschließend in Zellen des Pankreas (Ashcroft und Kakei 1989), in Skelettmuskelzellen (Noma 1983; Sakmann und Trube 1984), in glatter Muskulatur (Beech et al. 1993) und schließlich in Nervenzellen (Zawar et al. 1999; Karschin et al. 1997; Dunn-Meynell et al. 1998) gefunden.

Die ATP-abhängigen-einwärtsgerichteten Kaliumkanäle Kir6.x bestehen aus zwei Transmembrandomänen und zwei Hilfsproteinen, den sogenannten Sulfonylharnstoff-Rezeptoren (SUR) (Aguilar-Bryan et al. 1998).

Im Zuge des Aktionspotenzials erfolgt die Depolarisation durch ATP-abhängigen Natrium-Einstrom (Lang et al. 2007). Dieser intrazelluläre ATP-Verbrauch führt zu einer

Öffnung der Kir6.x-Kanäle (Tanner et al. 2011). Daraus lässt sich schließen, dass ATP die Kir6.x-Kanäle geschlossen hält (Hibino et al. 2010).

In nativen Bauchspeicheldrüsenzellen (Ashcroft und Kakei 1989) und in Muskelzellen der Pfortader (Nelson und Quayle 1995) wurde durch das Vorhandensein von Magnesiumionen die hemmende Wirkung von ATP reduziert. Neben der hemmenden Wirkung von Magnesiumionen ergaben Studien, dass NDPs, zum Beispiel ADP, zu einer Kanalöffnung beitragen (Dunne und Petersen 1986). Terzic und Tung formulierten zwei Bindungsstellen, eine hemmende ATP- und eine stimulierende NDP-Bindungsstelle (Terzic et al. 1994). NDP soll an beiden Bindungsstellen antagonistisch und agonistisch wirken (Terzic et al. 1994). Die Funktionsweise von NDP kann nur durch Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen gewährleistet werden, anderenfalls wird die inhibierende Wirkung von intrazellulären ATP verstärkt (Dunne und Petersen 1986; Findlay 1988a, 1988b).

Auf neuronaler Ebene beschrieben Ashford und Boden Wechselwirkungen zwischen extrazellulärer Glucosekonzentration und Kir6.x-Kanälen (Ashford et al. 1990). Dabei kam es zu einer Schließung der Kir6.x-Kanäle bei einem Anstieg der extrazellulären Glucosekonzentration. Des Weiteren erscheint kein ATP-Stoffwechsel für die Kanal Schließung notwendig zu sein. Die Schließung erfolgt ebenfalls durch das hydrolysierbare ATP-Analogon Adenylylimidodiphosphat (Ashford et al. 1990).

Neben den Glucose-abhängigen neuronalen Zellen wurden ATP-abhängige Kir6.x-Kanäle auch in anderen neuronalen Zellen aufgefunden (Zawar et al. 1999). Die Vermutung liegt nahe, dass diese Kanäle nur unter schweren metabolischen Zuständen wie zum Beispiel Anoxie und Ischämie geöffnet werden (Benndorf et al. 1991). Des Weiteren wird eine KCNJ11- Mutation, die für eine Kir6.2-Untereinheit codiert, in Verbindung mit dem DEND-Syndrom (Entwicklungsverzögerung, Epilepsie und Neugeborenen-Diabetes) gebracht (Slingerland und Hattersley 2005). Kir-Mutationen werden trotzdem selten mit Epilepsie verbunden (Köhling und Wolfart 2016).

Pharmakologische Wechselwirkungen zwischen ATP-abhängigen Kaliumkanälen bestehen bei Sulfonylharnstoffen und KCOs (Ashfield et al. 1999; Gribble und Reimann 2003). Alle Medikamente beeinflussen die Sulfonylharnstoff-Rezeptoren (SUR) (Hibino et al. 2010). Bei Sulfonylharnstoffen handelt es sich um Kir6.x-Kanalblocker (Hibino et al. 2010). Dadurch wird ein hypoglykämischer Zustand induziert (Patlak 2002), was sich wiederum positiv auf die Insulinsekretion auswirkt (Gribble und Reimann

2003). Sulfonylharnstoffe werden in der Behandlung von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 verwendet (Gribble und Reimann 2003). KCOs sind zum Beispiel Cromakalim, Pinacidil, Nicorandil und Diazoxid (Hibino et al. 2010). Pinacidil, Nicorandil und Diazoxid führen zu einer Vasodilatation der glatten Gefäßmuskulatur und zum Blutdruckabfall (Edwards und Weston 1990).

1.5.2 Spannungsabhängige Kv-Kaliumkanäle

Das allgemeine Funktionsprinzip der spannungsabhängigen Kaliumkanäle beruht darauf, dass eine Kanalöffnung unter Na-Einstrom und somit Depolarisation der Zelle stattfindet. Unter Repolarisation erfolgt die Kanalschließung (Kim und Nimigean 2016). Dieser Vorgang ermöglicht eine effektive Weiterleitung elektrischer Signale (Kim und Nimigean 2016). Zusätzlich kann eine Inaktivierung des Kanals vorgenommen werden. Dafür sind sogenannte „Kugel-Domänen“ notwendig, die entweder Bestandteil der α -Untereinheit oder Teil einer β -Domäne sein können (Rettig et al. 1992).

1.5.2.1 Spannungsabhängige Kv7-Kanäle

Gene, die für die Gruppe der Kv7-Kanäle bzw. KCNQ-Kanäle codieren, weisen gehäuft Mutationen auf, die mit schweren Erkrankungen assoziiert sind (Jentsch 2000). Zum Beispiel kann eine Mutation innerhalb einer Untereinheit des KCNQ1-Kanals zum Romano-Ward-Syndrom führen (Jentsch 2000). Bei Inaktivierung des KCNQ1-Kanals ist das rezessive Jervell- und Lange-Nielsen-Syndrom die Folge (Jentsch 2000). Patienten leiden bei diesen Krankheiten mitunter an Herzrhythmusstörungen und Taubheit (Jentsch 2000). Die KCNQ2/3-Kanäle interagieren mit dem M-Strom (Wang et al. 1998). Der M-Strom ist ein Kaliumleitwert, der sich langsam aktiviert und deaktiviert und zur Bestimmung unterschwelliger elektrischer Erregbarkeit von Neuronen beiträgt (Wang und McKinnon 1995). Eine Reduktion von 25 % des M-Stroms und damit ebenfalls des KCNQ2/KCNQ3-Stroms (Jentsch 2000) führt zu einer neonatalen Epilepsie (Schroeder et al. 1998). Ein Beispiel stellen die benignen familiären Neugeborenenkrämpfe (BFNC) dar (Singh et al. 1999). Die BFNC wird autosomal-dominant vererbt und charakterisiert sich durch unprovizierte partielle oder generalisierte klonische Krämpfe (Ronen et al. 1993). Ebenfalls möglich sind Sehstörungen oder Atemstillstand (Ronen et al. 1993). Die Positionen der Genmutationen für BFNC wurden dem Chromosom 20q13.3 (Leppert et al. 1989) und Chromosom 8q24 (Biervert et al. 1998) zugeordnet. Der KCNQ2-Kanal wurde auf dem Chromosom 20q13.3 und der KCNQ3-

Kanal auf dem menschlichen Chromosom 8q24 identifiziert (Biervert et al. 1998). Des Weiteren zeigten Beobachtungen, dass eine Störung der KCNQ2-Kanäle bei Mäusen zum Tod führte (Watanabe et al. 2000).

1.6 Zielstellung

Zahlreiche Arbeiten befassten sich mit der Diskrepanz zwischen glutamaterger und γ -Aminobuttersäure (GABA)-ergetischen Übertragungen (Madsen et al. 2010; Zhan et al. 2010; Rowley et al. 2012; Žiburkus et al. 2013) und der gesteigerten Genexpression des einwärtsgerichteten Na^+ - oder Ca^{2+} -Stroms (Keele et al. 2000; Su et al. 2002). Durch die Entdeckung, dass die Grundlage der benignen familiären Neugeborenenkrämpfe (BFNC) (Singh et al. 1999) durch eine Reduktion des KCNQ2/KCNQ3-Stroms (Jentsch 2000) entsteht, wurden Störungen der Kaliumleitfähigkeit mit der Epileptogenese in Verbindung gebracht. Demzufolge ist die weitere Erforschung zur Beteiligung der Kaliumkanäle bei der Epileptogenese von Relevanz.

Folgende Fragestellungen wurden in dieser Arbeit untersucht:

Findet eine Veränderung der Proteinexpression unter chronischer Epilepsie bei einwärtsgerichteten ATP-abhängigen Kaliumkanälen Kir6.1 und Kir6.2 sowie bei spannungsabhängigen KCNQ2 Kaliumkanälen statt?

Gibt es signifikante Unterschiede der Proteinexpression innerhalb der sieben untersuchten Regionen des Hippocampus unter chronischer Epilepsie?

Korreliert das Alter der Tiere mit der Proteinexpression unter chronischer Epilepsie?

II. Material und Methoden

2.1 Material**Tabelle 1: Fixierung der Präparate**

4 % PFA/1xPBS	Sigma-Aldrich GmbH	Chemie	Steinfeld, Deutschland
30 % Sucrose/1x PBS	Sigma-Aldrich GmbH	Chemie	Steinfeld, Deutschland
Metylbutan	Sigma-Aldrich GmbH	Chemie	Steinfeld, Deutschland

Tabelle 2: Histologisches Schnittbild

Kryostat Leica CM3050 S	Leica Biosystems		Wetzlar, Deutschland
Tissue Tek O.T. Compound containing	Sakura Finetek Europe B.V.		Alphen aan den Rijn, Niederland
Tissue Tek Cryomold Standard	Sakura Finetek Europe B.V.		Alphen aan den Rijn, Niederland

Tabelle 3: Antigen Retrieval Citratpuffer

Tri-Natriumcitrat 2,94 g	Merck KGaA		Darmstadt, Deutschland
Tween 20; 0,5 ml	Sigma-Aldrich GmbH	Chemie	Steinfeld, Deutschland

Tabelle 4: 10xPBS (Phosphate buffered saline) / 1l

1370 mM NaCl; 80 g	Carl Roth GmbH + co. KG		Karlsruhe, Deutschland
26,8 mM KCl; 2 g	Carl Roth GmbH + co. KG		Karlsruhe, Deutschland
100 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; 14,2 g	Carl Roth GmbH + co. KG		Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 5: Primärer Antikörper

0,1 % TritonX-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinfeld, Deutschland
Normal Goat Serum	Invitrogen	Waltham, USA
Anti-Kir 6.1 Antibody Lot: APC 105AN0402; Host: Rabbit; Type: Polyclonal; Form: Lyophilized	Alomone labs Jerusalem BioPark	Jersuaem, Israel
Anti-Kir 6.2 Antibody Lot: APC020AN0402; Host: Rabbit; Type: Polyclonal; Form: Lyophilized	Alomone labs Jerusalem BioPark	Jersuaem, Israel
Anti-KCNQ2 Antibody (ab22897) Host: Rabbit; Type: Polyclonal; Form: Lyophilized	Abcam plc	Cambridge, Vereinigtes Königreich

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper

Goat anti-Rabbit IgG, Cy3 Lot: 1891009	Invitrogen, ThermoFisher SCIENTIFIC	Waltham, USA
Goat anti-Rabbit Alexa488 Lot: 814817	Invitrogen, ThermoFisher SCIENTIFIC	Waltham, USA
ProLong Gold with Dapi Lot: P36931	Invitrogen, ThermoFisher SCIENTIFIC	Waltham, USA

Tabelle 7: Mikroskop

Mikroskop Leica CTR7000 HS Seriennummer: 302118	Leica Biosystems	Wetzlar, Deutschland
---	------------------	----------------------

Leica Application Suite X (LAS X) Software	Leica Biosystems	Wetzlar, Deutschland
---	------------------	----------------------

Tabelle 8: Allgemeine Materialien

Wistar Ratten (männlich)	Charles River Laborato- ries GmbH	Sulzfeld, Deutschland
Pipetten Spitzen 10 µm 100 µm 200 µm 1000 µm 5000 µm	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
pH-Meter CG840	Schott Instruments GmbH	Mainz, Deutschland
Pinsel 770	Leonhardy GmbH	Nürnberg, Deutschland
Schnellkochtopf perfect plus 4,5	WMF GmbH	Geislingen an der Steige, Deutschland
Eppendorfer Tubes 1,5 ml 2 ml 5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5415	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Menzel Gläser Superfrost Plus, Objektträger	ThermoFisher SCIENTI- FIC	Waltham, USA
Menzel Gläser, 24x24 mm, Objektträger	ThermoFisher SCIENTI- FIC	Waltham, USA

Grundlegende Laborutensilien wurden von der Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe verwendet.

2.2 Methoden

Für die Versuchsreihe wurden insgesamt 24 männliche Wistar-Ratten, Herkunft: Charles River, Sulzfeld, genutzt.

Die Tiere wurden nach den einwärtsgerichteten Kaliumkanälen Kir6.1 und Kir6.2 sowie dem spannungsabhängigen KCNQ2-Kanal in unterschiedlichen Regionen des Hippocampus untersucht. Dabei wurden sie aufgeteilt in eine Kontrollgruppe aus elf Tieren und eine pilocarpinisierte Gruppe aus zwölf Tieren bei den Kanälen Kir6.1 und Kir 6.2. Bei den KCNQ2-Kanälen gab es zwölf Tiere in der Kontrollgruppe und zwölf Tiere in der pilocarpinisierten Gruppe.

2.2.1 Pilocarpin-Injektion

Das methodische Vorgehen bei der Pilocarpin-Injektion der Versuchstiere entspricht dem Bohn-Jerusalem-Protokoll. Entsprechend den Vorgaben des Tierschutzgesetzes wurden sämtliche Behandlungen von Mitarbeitern des Institutes durchgeführt. Zunächst wurde N-Methyl-Scopolamin injiziert (1 mg/kg KG, 250 µl pro 100 g). Dabei handelt es sich um einen peripheren Muscarinrezeptor-Antagonisten, der spasmolytisch auf die glatte Muskulatur wirkt. Nach 30 Minuten erfolgt die Pilocarpin-Injektion (340 mg/kg KG, 250 µl pro 100 g KG). Ein Status epilepticus wird ausgelöst. Nach 40 Minuten wird der epileptische Anfall mittels Diazepam gestoppt.

2.2.2 Präparat-Entnahme und Fixierung

Das Präparat wurde von einem Institutsmitarbeiter entnommen und anschließend sofort fixiert. Dafür eignete sich neutral gepufferte 4 %-Paraformaldehydlösung/1xPBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung pH=7,4) (Hantschke und Palmedo). Dabei ist es wichtig darauf zu achten, dass das frisch präparierte Gewebe binnen 30 Minuten eingelegt wird und anschließend für mindestens sechs Stunden verweilt (Lang 2013). Wird dem nicht nachgegangen, kann es bei verspäteter oder zu kurzer Fixierung zu morphologischen Veränderungen, Empfindlichkeit auf die Reagenzien und/oder Temperaturschwankungen beim Einbettungsprozess kommen (Lang 2013). Ebenfalls kann eine zu lange Fixierung zu einer Verbindung von Epitopen führen (Lang 2013, S. 278).

Im Anschluss wurden die Präparate durch einen Institutsmitarbeiter in 30 %-Sucrose-Lösung /1 xPBS eingelegt. Ziel ist der Austausch von Wasser mit Sucrose im Präparat. Dies wird gekennzeichnet durch Absinken des Präparates in der Lösung. Das kann je

nach Größe des Präparates ein bis fünf Tage andauern. Mithilfe der Sucrose wird ein Gefrierbrand vermieden.

Die Präparate wurden vorsichtig abgetrocknet. Der Kryostat Leica CM3050 S wurde auf -40 °C gekühlt. Die Präparate wurden für eine Minute in sich im Kryostaten befindlichen Metylbutan eingelegt, anschließend abgetrocknet und in Aluminiumfolie verpackt. Die Präparate wurden im Anschluss bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Histologische Schnittbilder

Nacheinander wurden ganze Hirnpräparate mittels Tissue Tek O.T.C. Compound containing auf einen Objektträger im Kryostaten fixiert. Bei einigen Präparaten handelte es sich um 1000 µm dicke Schnitten. Diese wurden in Tissue Tek Cryomold Standard fixiert. Die Hirnpräparate wurden eingespannt und in 20 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Objektträgertemperatur betrug -21 °C und die Kammertemperatur -24 °C. Auf einen Objektträger (Thermo Scientific Superfrost Plus, USA) wurde mittels einer 2ml-Pipette ein Tropfen Aqua dest. appliziert. Der 20 µm dicke histologische Schnitt wurde mithilfe eines Pinsels aufgebracht und positioniert. Das Wasser wurde mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt und das Präparat anschließend über Nacht bei 4 °C getrocknet. Die histologischen Schnitte wurden in Kombination mit einer Mitarbeiterin des Instituts hergestellt.

Durch das Paraformaldehyd kommt es zu Bildung von Methylenbrückenbindung im Präparat. Dadurch kommt es zu einer Maskierung von Antigenen bzw. deren Epitope. Antikörper können unter diesen Umständen nicht an Antigene binden. Mithilfe eines Antigenretrievals können die Epitope demaskiert werden (Lang 2013, S. 280).

2.2.4 Antigen-Retrieval

Bei dem Antigen-Retrieval wurde nach einem ICH-Antigen-Abrufprotokoll der Firma abcam vorgegangen. Dabei wurde ein Citratpuffer (10mM Natriumcitrat, 0,05 % Tween20, pH 6,0) selbstständig hergestellt. Pro Durchgang benötigt man ca. drei Liter des Puffers. Dafür wurden 8,82 g Tri-Natriumcitrat zu drei Litern Aqua dest. gegeben. Anschließend wurde mit 5N HCl-Lösung ein pH-Wert von 6,0 eingestellt. Zuletzt wurden 1,5 ml Tween 20 beigemischt. Der Citratpuffer wurde in einen Schnellkochtopf gefüllt. Der Ständer mit den Objektträgern wurde ebenfalls in den Topf gestellt. Der Inhalt wurde unter Druck (ca. 1,8 bar) für zehn Minuten gekocht (120 °C) und anschließend auf Eis abgekühlt.

2.2.5 Antikörper

Im weiteren Ablauf wurde nach einem institutinternen Protokoll gearbeitet. Die Objektträger wurden auf Vollständigkeit geprüft und dreimal für zehn Minuten mit 1xPBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine zwanzigminütige Inkubation mit 0,1 % TritonX-100. TritonX-100 ermöglicht eine bessere Bindungskapazität für den Antikörper. Dieser Vorgang wird als Permeabilisierung der Zelle bezeichnet.

Es folgte ein Waschvorgang zweimal für zehn Minuten mit 1xPBS. Zur Blockade von unspezifischen Bindungsstellen erfolgte eine sechzigminütige Inkubation mit 10 % NGS (normal goat serum)/in 1xPBS).

Im darauffolgenden Schritt wurde eine neg. Kontrolle mit 1 % NGS/PBS hergestellt. Alle primären Antikörper wurden kurz vor Applikation für fünf Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Aus jedem Tier wurden drei Präparate angefertigt.

1. Präparat: 1:100 Kir6.1 in 1 % NGS/PBS
2. Präparat: 1:100 Kir6.2 in 1 % NGS/PBS
3. Präparat: 1:250 KCNQ2 in 1 % NGS/PBS

Die Präparate wurden bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger dreimal für zehn Minuten mit 1xPBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem fluoreszierenden sekundären Antikörper. Bei den Präparaten zur Detektion von Kir6.1 und Kir 6.2 wurde Goat anti-Rabbit IgG, Cy3; Lot: 1891009; 1:200 in 1 % NGS/PBS und bei KCNQ2 wurde Goat anti-Rabbit Alexa488; Lot: 814817; 1:200 in 1 % NGS/PBS genutzt. Es folgte eine Inkubation im Dunkeln für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurden alle Objektträger im Dunkeln dreimal für zehn Minuten mit 1xPBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Präparate mit ProLong Gold with Dapi angefärbt. Dabei handelt es sich um ein Gegenfärbemittel für DNA, wodurch eine blaue Fluoreszenz entsteht (sigmaaldrich). Die Präparate wurden mit einem Deckgläschen versehen und überschüssige Flüssigkeit vorsichtig entfernt. Die Präparate wurden im Dunkeln über Nacht bei 4 °C getrocknet.

2.2.6 Herstellung der Immunhistologischen Schnittbilder

Im darauffolgenden Schritt wurden die Daten mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops Leica CTR7000 HS und der Leica Application Suite X (LAS X) Software erarbeitet. Ein Präparat wurde sowohl in 10-facher und 20-facher als auch in 40-facher Vergrößerung

betrachtet. Für alle weiteren Präparate wurde sich zur klaren Differenzierung aller Regionen des Hippocampus für die 20-fache Vergrößerung entschieden. Es erfolgte die Aufnahme mehrerer einzelner Bilder, wodurch im Anschluss ein „Tile Scan“ des Hippocampus hergestellt werden konnte.

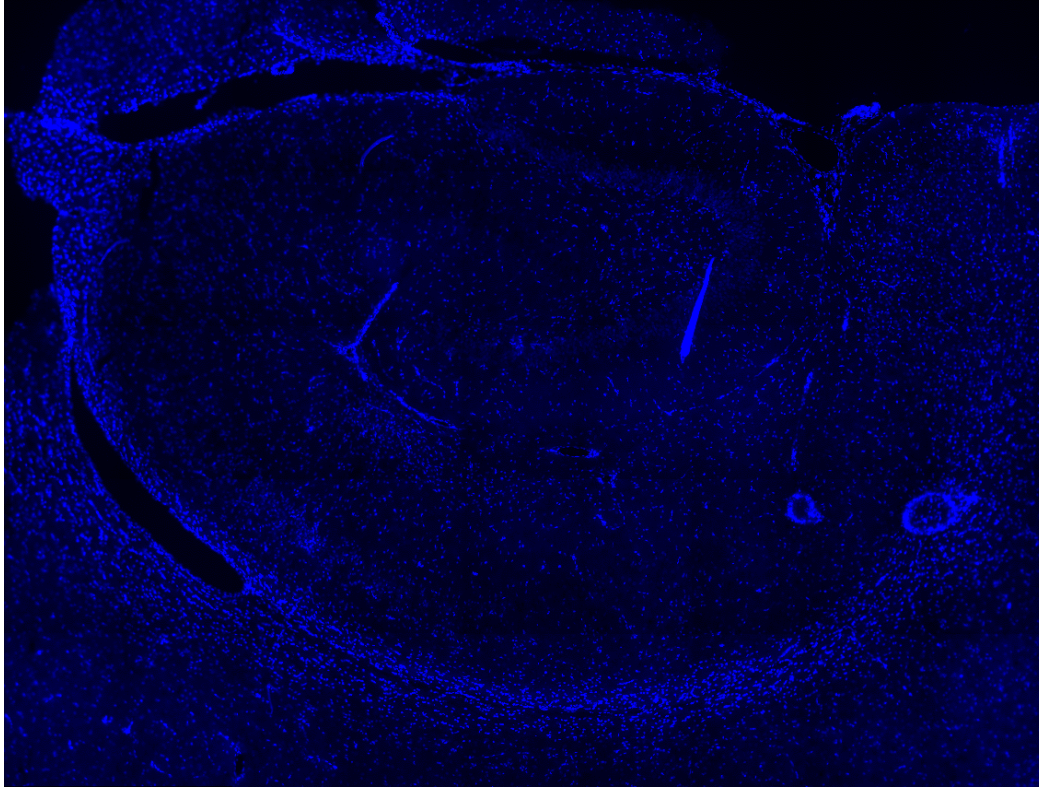


Abbildung 3: Beispiel Darstellung Pilocarpintier 799-17 Kir6.1 im Dapi-Kanal

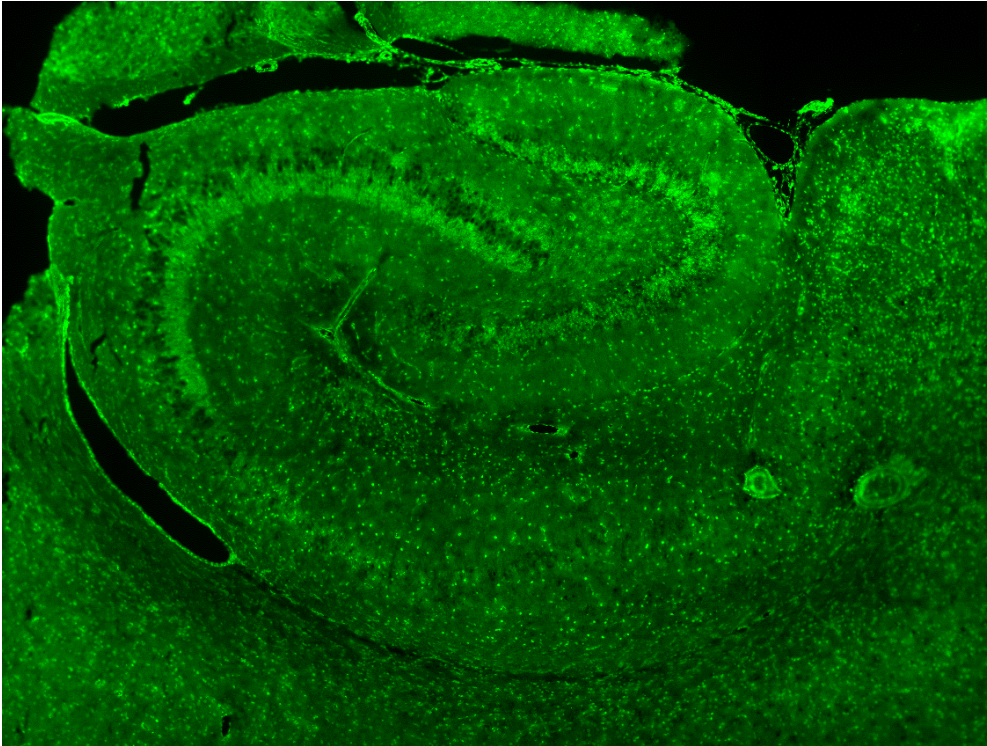


Abbildung 4: Beispiel Darstellung Pilocarpintier 799-17 Kir6.1 in Cy3 Kanal

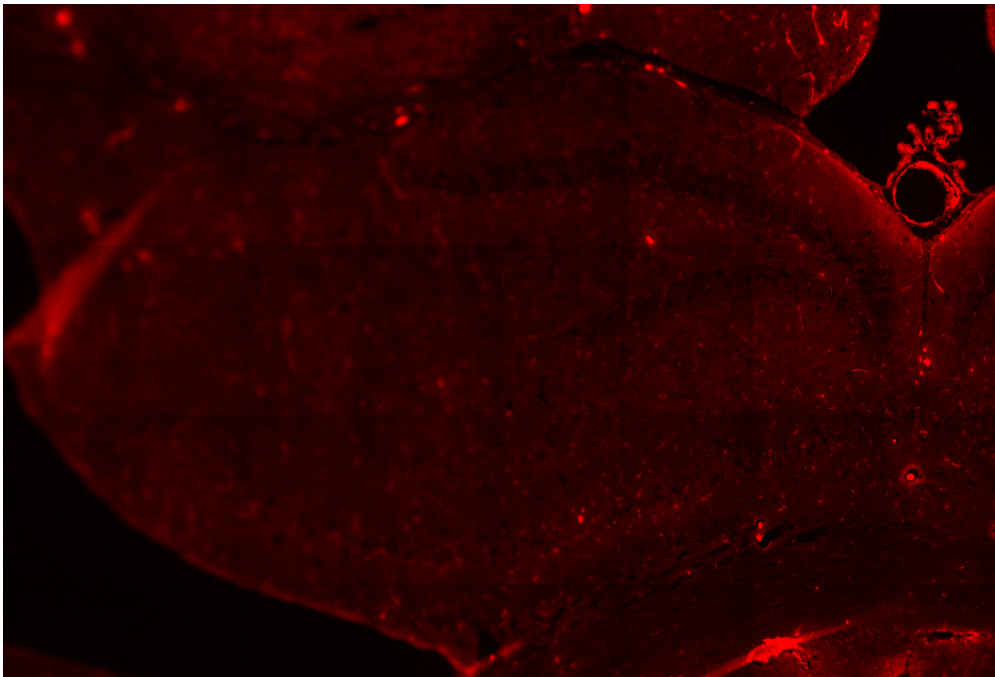


Abbildung 5: Beispiel Darstellung Pilocarpintier 650-29 KCNQ2 in Alexa488-Kanal

Es ergaben sich jeweils Bilder im Dapi-Kanal bei einer Exzitationswellenlänge von 340-380 nm und einer Emissionswellenlänge von 450-490 nm (Abbildung 3). Bei Kir6.1/ Kir6.2 wurde mit Cy3 als sekundärem Antikörper gearbeitet. Es ergab sich eine Exzitationswellenlänge von 540-552 nm und einer Emissionswellenlänge von 580-620 nm (Abbildung 4). Zur Darstellung der KCNQ2-Kanäle wurde mit Alexa488 gearbeitet. Es ergab sich eine Exzitationswellenlänge von 460-500 nm und eine Emissionswellenlänge von 512-542 nm (Abbildung 5).

Nach Herstellung der „Tile scans“ wurde eine quantitative Fluoreszenzauswertung vorgenommen. Dafür wurden in den Regionen Gyrus dentatus Stratum granulosum, Cornu Ammonis 3, Cornu Ammonis 1, Stratum radiatum, Stratum lacunosum, Stratum oriens und Gyrus dentatus Stratum moleculare Abschnitte, sogenannte ROIs, eingegrenzt. Es wurde für jedes ROI der Mittelwert der Fluoreszenz, die Pixelsumme, die Fläche des ROIs in Pixel und die Fläche des ROIs in μm^2 bestimmt. Anschließend wurde das Verhältnis zwischen Cy3 bzw. Alexa488 und Dapi berechnet, um die Fluoreszenz der Kanalproteine je Zelle zu bestimmen.

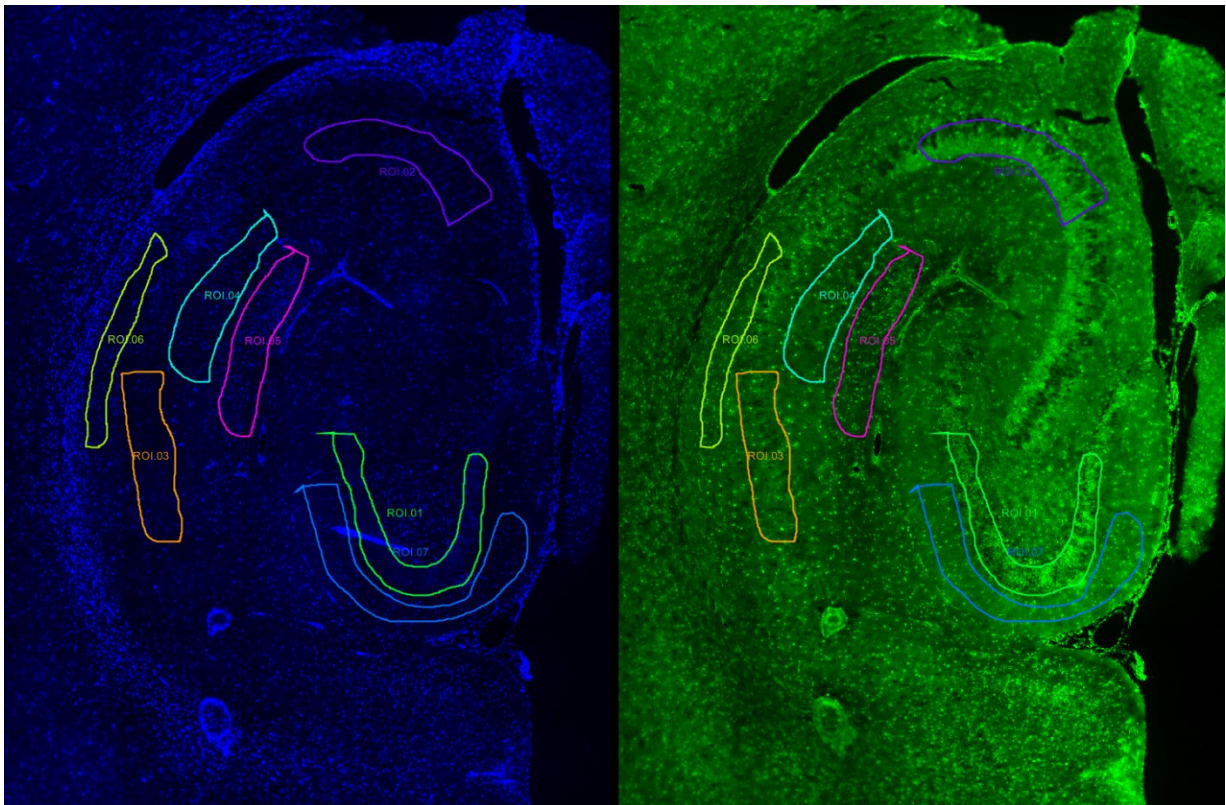


Abbildung 6: Beispiel Darstellung Pilocarpintier 799-17 in Dapi-Kanal (links) und Cy3-Kanal (rechts); Einteilung der ROIs

ROI1 stellt dabei Gyrus dentatus Stratum granulosum, ROI2 Cornu Ammonis, ROI3 Cornu Ammonis 1, ROI4 Stratum radiatum, ROI5 Stratum lacunosum, ROI6 Stratum oriens und ROI7 Gyrus dentatus Stratum moleculare dar.

2.2.7 Statistik

Bei den Messwerten handelt es sich um den Median, das erste Quartil, das zweite Quartil sowie die Darstellung von Maximum und Minimum aus n unabhängigen Experimenten. Das Signifikanzniveau für α liegt standardmäßig bei $P < 0,05$. Die Sternchen in den Abbildungen kennzeichnen * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, und *** $P < 0,001$. Zur zweifak-

toriiellen Varianzanalyse wurde die two way Variance of Analyse (Two way Anova) genutzt. Mit diesem Signifikanztest wurden Unterschiede zwischen der Pilocarpin- und der Kontrollgruppe allgemein sowie in Bezug auf die einzelnen Regionen des Hippocampus berechnet. Mit dem Kruskal Wallis Test zur Darstellung nicht normal verteilter Messwerte wurden signifikante Unterschiede je Gruppe, je Kanal und innerhalb aller Regionen untereinander berechnet. Mittels der Spearman-Korrelation wurde die Alterskorrelation ermittelt. Die Sternchen in den Abbildungen kennzeichnen die Signifikanz mit * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, und *** $P < 0,001$. Die statistische Auswertung und grafische Darstellung erfolgte mittels der SigmaPlot-Software (Version 13.0, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland).

III. Ergebnisse

Zunächst wurde die Auswirkung der Temporallappenepilepsie auf die Translation von Kaliumkanälen untersucht. Dafür wurden 24 männlicher Wistar Ratten in sieben verschiedenen Regionen des Hippocampus auf die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle Kir6.1 und Kir6.2, sowie auf die spannungsabhängigen KCNQ2 Kanäle untersucht.

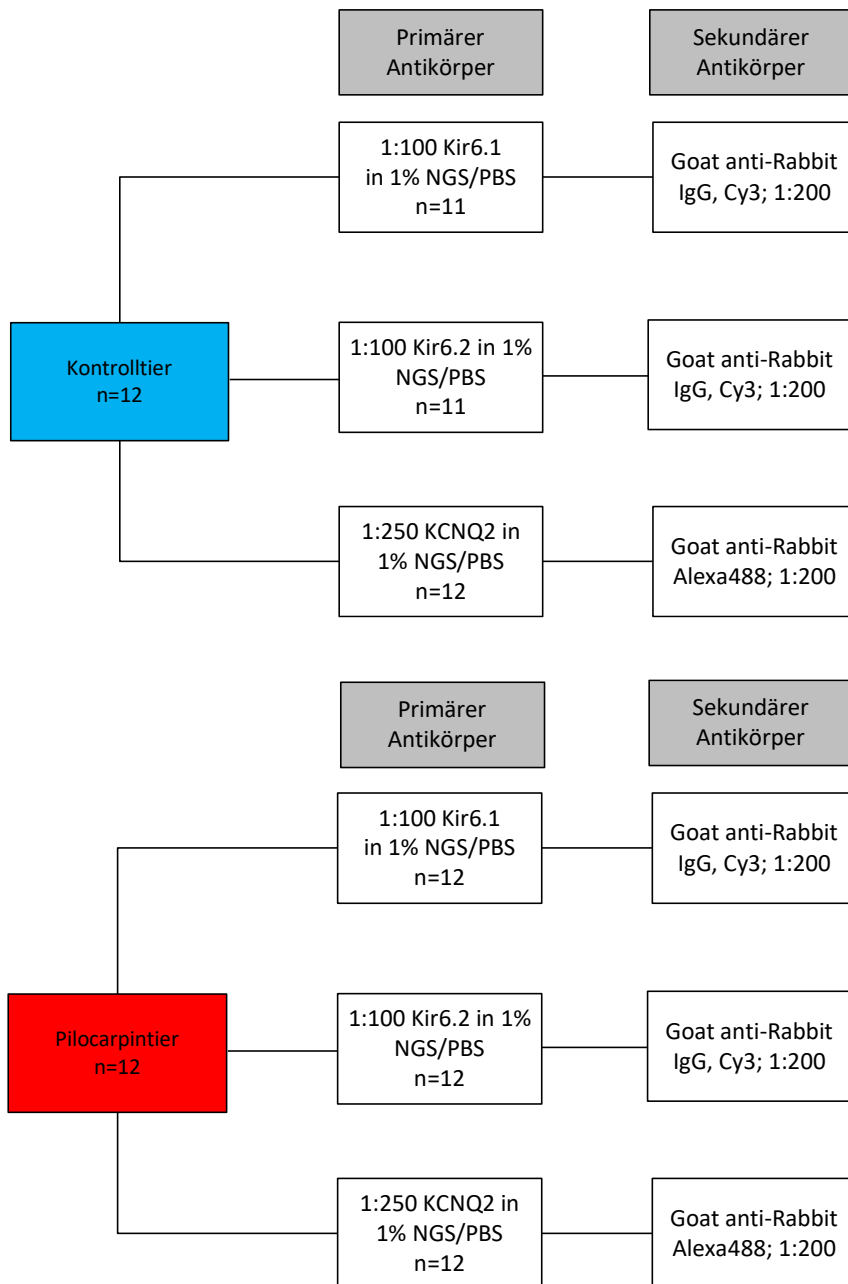


Abbildung 7: Experimentelles Vorgehen

Die Kontrollgruppe (blau) bestand aus insgesamt zwölf Tieren. Dabei wurden für Kir6.1 und Kir6.2 elf Tiere und für KCNQ2 zwölf Tiere benutzt. Jedes Präparat wurde mit einem primären und anschließend fluoreszierenden sekundären Antikörper versehen. Das Gleiche gilt für die Pilocarpintiere (rot). Es wurden ebenfalls die verwendeten Konzentrationen angegeben.

Zum Schluss ergaben sich insgesamt sechs Versuchsgruppen. Die **Tabelle 9** zeigt die Aufteilung der Versuchstiere in eine Kontrollgruppe (n=12) und in eine pilocarpinisierte Gruppe (n=12). Jedes Tier in jeder Gruppe wurde auf die drei Kaliumkanäle Kir6.1, Kir6.2 und KCNQ2 untersucht.

Tabelle 9: Gruppeneinteilung

Gruppe	Tier	Kanal
1. Gruppe	Kontrolltier	Kir6.1
2. Gruppe	Pilocarpintier	Kir6.1
3. Gruppe	Kontrolltier	Kir6.2
4. Gruppe	Pilocarpintier	Kir6.2
5. Gruppe	Kontrolltier	KCNQ2
6. Gruppe	Pilocarpintier	KCNQ2

Mithilfe der quantitativen Fluoreszenzbestimmung in der Immunhistochemie konnte die Veränderung der Translation der Kaliumkanäle dargestellt werden. Jedes Tier, unabhängig davon, ob Kontroll- oder Pilocarpintier, wurde in den sieben Regionen des Hippocampus untersucht: Gyrus dentatus Stratum granulosum (#1), Cornu Ammonis 3 (#2), Cornu Ammonis 1 (#3), Stratum radiatum (#4), Stratum lacunosum (#5), Stratum oriens (#6) und Gyrus dentatus Stratum moleculare (#7). Es ergaben sich Mittelwerte für die entstandene Fluoreszenz der Kanalproteine (Cy3 für Kir6.1 und Kir 6.2/ Alexa488 für KCNQ2) und Mittelwerte für die Fluoreszenz der DNA mithilfe von Dapi (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid). Daraufhin wurde das Verhältnis der Mittelwerte Cy3/Dapi bzw. Alexa488/Dapi errechnet.

3.1 Veränderung der Translation bei Temporallappenepilepsie

3.1.1 Kir6.1

In der ersten Versuchsreihe wurde die Veränderung der Translation der Kir6.1-Kanalproteine zwischen Kontrolltieren und Pilocarpintieren verglichen. Gleichzeitig wurden die sieben Regionen des Hippocampus nach signifikanten Unterschieden untersucht.

Die Temporallappenepilepsie führte zu einer signifikanten Minderung der Translation der Kanalproteine bei der Pilocarpingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($P < 0.001$; two way of Analysis of Variance, **Abbildung 8**). Der Median der Kontrollgruppe liegt bei 1,087 Fluoreszenz der Kanalproteine/ Zellkern ($n=77$; $P < 0,001$; two way Analysis of Variance; **Abbildung 8**). Das erste Quartil liegt bei 0,633 und das dritte Quartil bei 1,76 Fluoreszenz der Kanalproteine/ Zellkern. Im Vergleich dazu liegt der Median der Pilocarpingruppe bei ca. 0,813 Fluoreszenz der Kanalproteine/Zellkern ($n=84$; $P < 0,001$; two way Analysis of Variance; **Abbildung 8**). Das erste Quartil liegt bei 0,281 und das dritte Quartil bei 1,345 Fluoreszenz der Kanalproteine/Zellkern. Es konnte keine signifikante Auswirkung der Regionen innerhalb der Pilocarpin- oder der Kontrollgruppe festgestellt werden ($P=0,054$, two way Analysis of Variance).

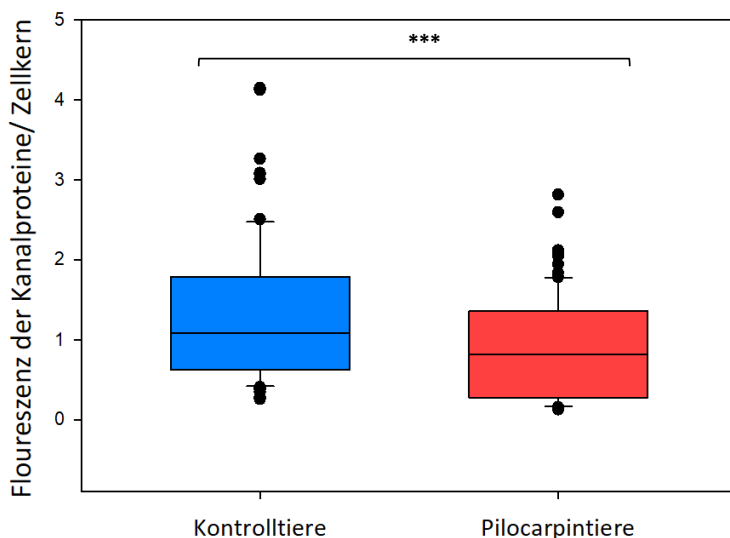


Abbildung 8: Kir6.1 Vergleich von Kontrollgruppe (blau) und Pilocarpingruppe (rot)

Es ergab eine signifikante Verminderung ($P < 0,001$) der Translation der Kir6.1-Kanäle bei den Kontrolltieren (blau) im Vergleich zu den epileptischen Pilocarpintieren (rot).

Im Zuge der chronischen Epilepsie entstehen strukturelle Veränderungen des Hippocampus, wie zum Beispiel die Moosfasersprossung, der Verlust von Interneuronen und die ektopische Proliferation von Körnerzellen (Wieser 2004). Dieser Zelluntergang wird im Dapi-Kanal verdeutlicht. Eine geringe Blaufärbung korreliert mit einem geringen DNA-Gehalt und somit einem Zelluntergang. Mit dem sekundären Antikörper Cy3 wird die Fluoreszenz der Kanalproteine von Kir6.1-Kanälen präsentiert. Eine geringe Grün-

färbung korreliert mit einer geringeren Konzentration an Kanalproteinen. Im immunhistologischen Schnittbild zeigt sich in der Pilocarpingruppe eine geringere Blau- und Grünfärbung als in der Kontrollgruppe.

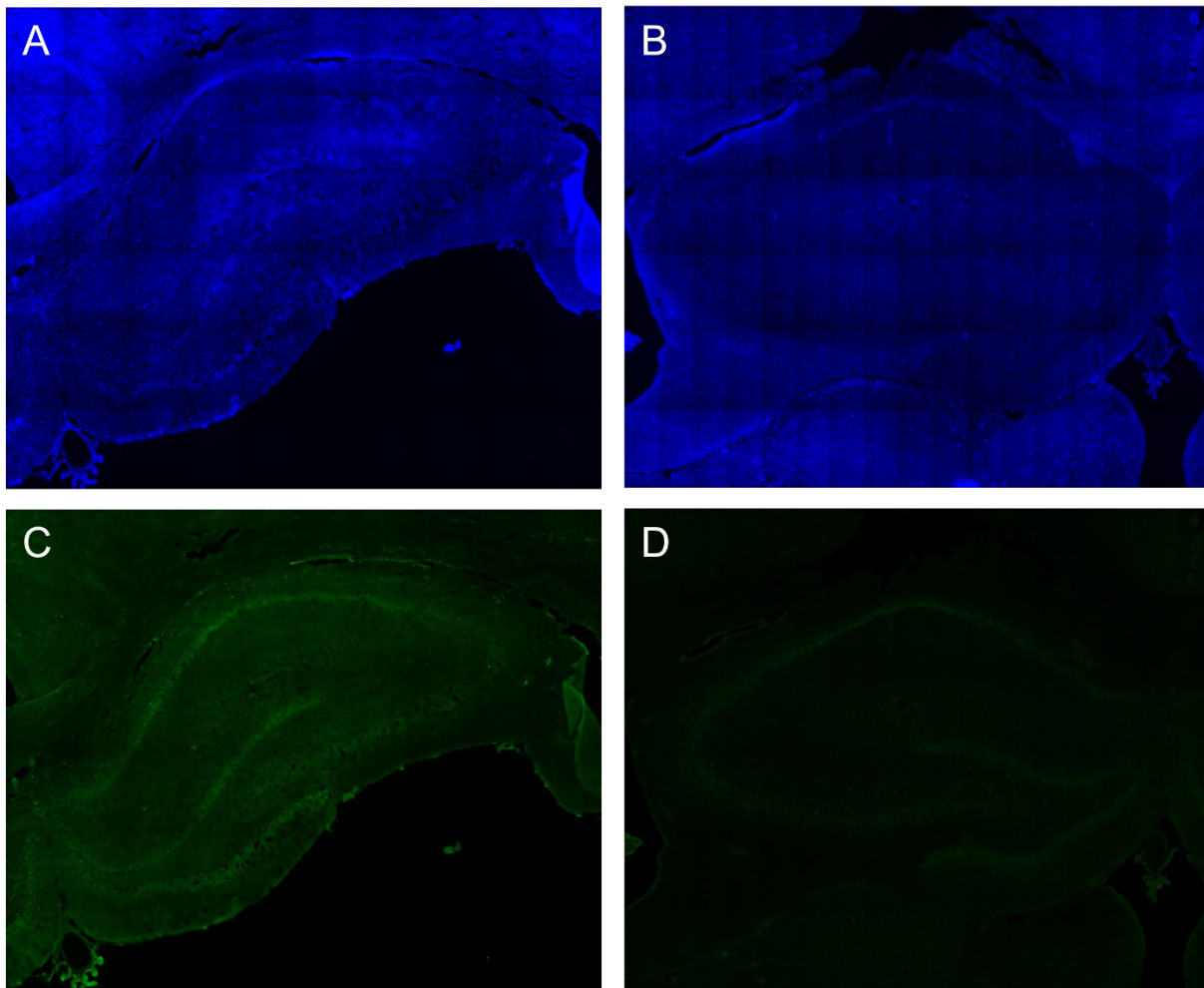


Abbildung 9: Gegenüberstellung Kontroll- (A und C) und Pilocarpintier (B und D) mit primären Antikörper Kir6.1 im Dapi-Kanal (blau) und Cy3 Kanal (grün)

Abbildung A zeigt den Hippocampus eines Kontrolltieres (Nr. 650-34) im Dapi-Kanal zur Darstellung von DNA. Abbildung B zeigt den Hippocampus eines pilocarpinisierten Tieres (Nr. 650-24) im Dapi-Kanal. In Abbildung B zeigt sich eine geringere durchschnittliche DNA-Konzentration als in Abbildung A. Besonders deutlich wird die DNA-Reduktion im Bereich des Gyrus dentatus Stratum granulosum und im Stratum lacunosum. Grund dafür ist die chronische Epilepsie, die zum Zelluntergang im Hippocampus führt (Wieser 2004). Demgegenüber steht in Abbildung C und D dargestellt die Fluoreszenz der Kanalproteine der Kir6.1-Kanäle des Kontrolltiers (Nr. 650-34) (Abbildung C) und des pilocarpinisierten Tieres (Nr. 650-24) (Abbildung D). Bei diesem Beispiel ist die Fluoreszenz der Kanalproteine der Kir6.1-Kanäle des Kontrolltiers durchschnittlich stärker als beim pilocarpinisierten Tier.

Zusätzlich wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests eine einfaktorische Varianzanalyse vorgenommen. Es konnte keine signifikante Veränderung der Translation der Kir6.1-

Kanalproteine zwischen den einzelnen Regionen innerhalb der Kontrollgruppe festgestellt werden ($n=11$; $P=0,401$; Kruskal-Wallis-test; **Abbildung 10**). Ebenfalls konnte keine signifikante Veränderung der Translation der Kir6.1-Kanalproteine zwischen den einzelnen Regionen innerhalb der Pilocarpingruppe festgestellt werden ($n=12$; $P=0,815$; Kruskal-Wallis-Test; **Abbildung 11**).

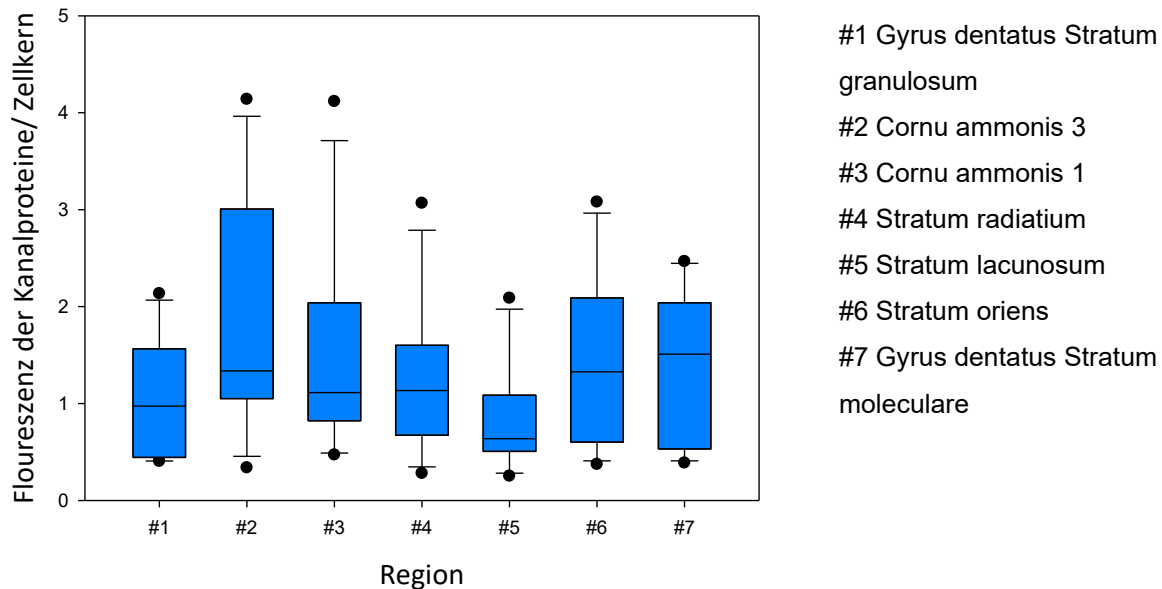


Abbildung 10: Darstellung aller Regionen des Hippocampus Kontrolltieres (blau) Kir 6.1
Es liegt keine signifikante Veränderung der Translation der Kir6.1-Kanalproteine zwischen den einzelnen Regionen innerhalb der Kontrollgruppe (blau) vor ($n=11$; $P=0,401$).

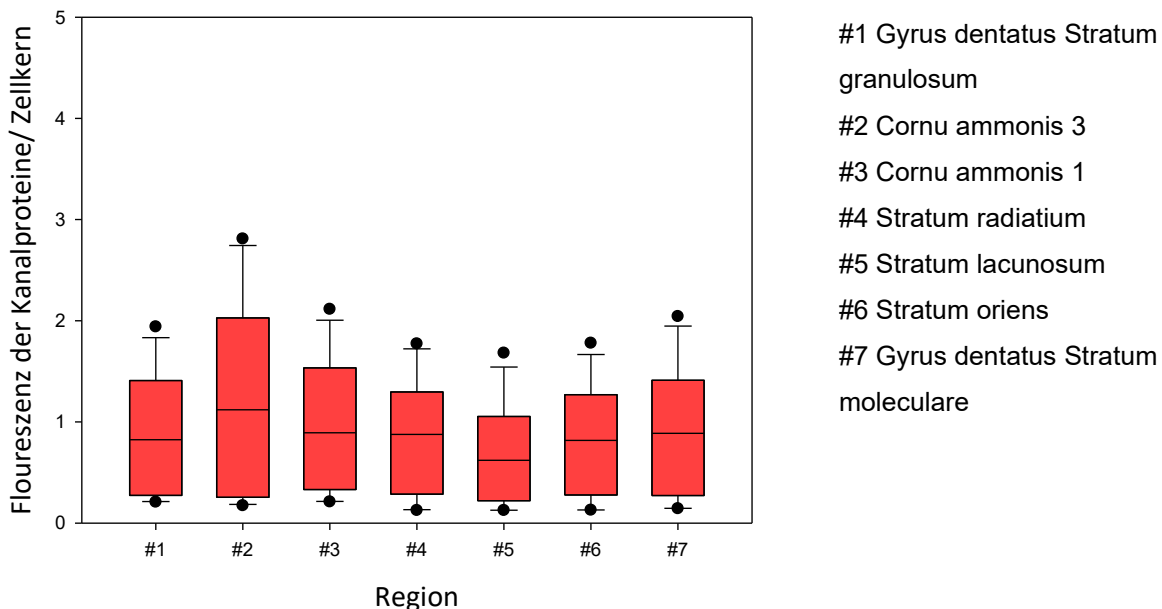


Abbildung 11: Darstellung aller Regionen des Hippocampus Pilocarpintieres (rot) Kir 6.1
Es liegt keine signifikante Veränderung der Translation der Kir6.1-Kanalproteine zwischen den einzelnen Regionen innerhalb der Pilocarpingruppe (rot) vor ($n=12$; $P=0,815$).

Innerhalb der Regionen Cornu Ammonis 3, Cornu Ammonis 1 und Stratum oriens traten die stärksten Unterschiede zwischen Kontrolltieren und Pilocarpintieren auf. Der Mittelwert des Verhältnisses von Cy3/Dapi ist in diesen drei Regionen bei den Pilocarpintieren niedriger als bei den Kontrolltieren.

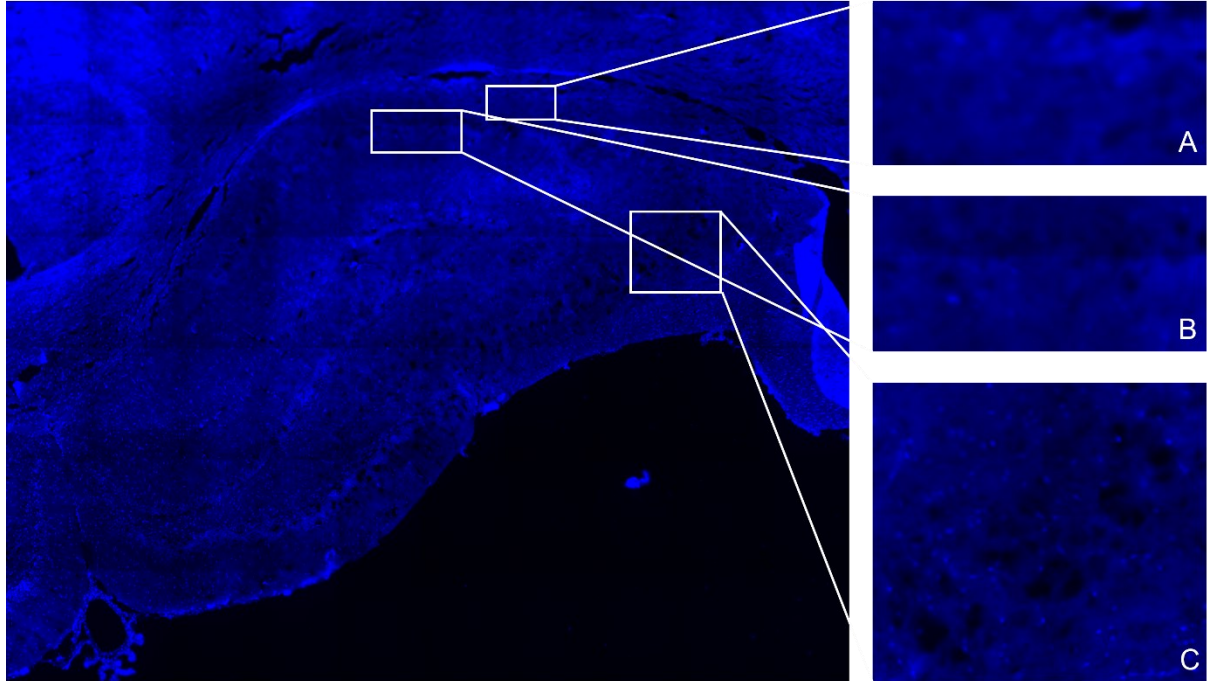


Abbildung 12: Kontrolltier (Nr. 650-34) Dapi-Aufteilung einzelner Regionen

Repräsentatives Beispiel für die Kontrollgruppe der Kir6.1-Kanäle im Dapi-Kanal. Die Regionen Stratum oriens (Abbildung A), Cornu Ammonis 1 (Abbildung B) und Cornu Ammonis 3 (Abbildung C) der Kontrollgruppe zeigen eine höhere DNA-Konzentration als in der Pilocarpin-Gruppe.

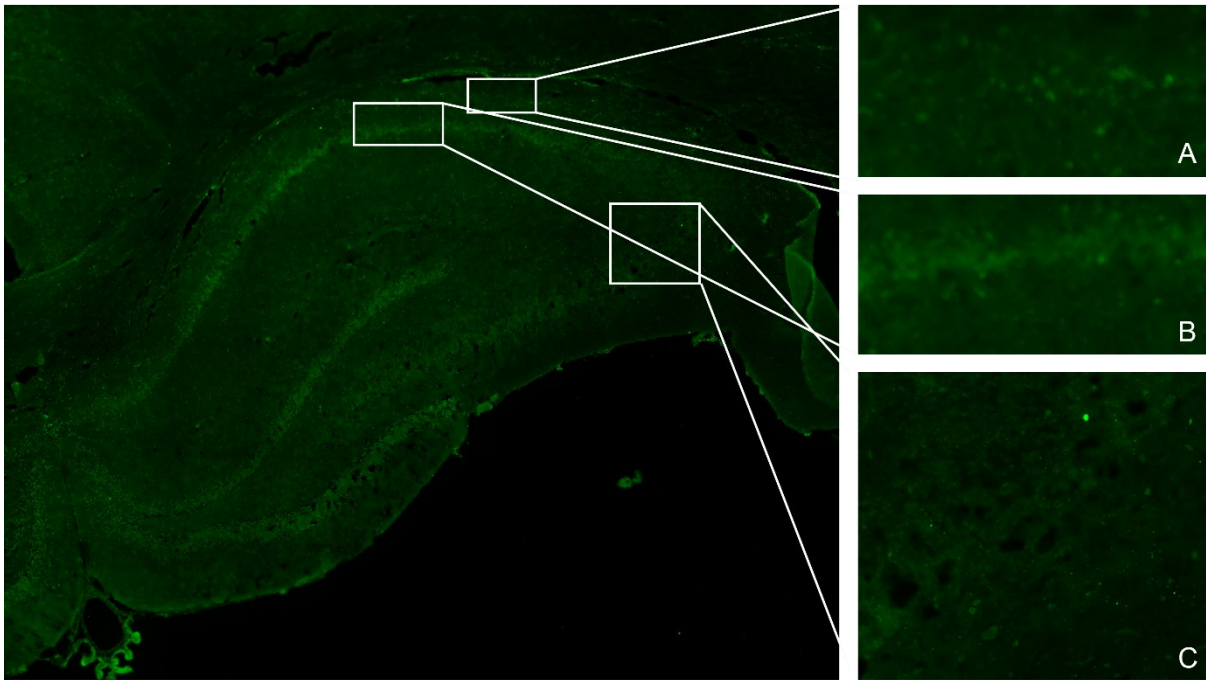


Abbildung 13: Kontrolltier (Nr. 650-34) Cy3-Aufteilung einzelner Regionen

Repräsentatives Beispiel für die Kontrollgruppe der Kir6.1-Kanäle im Cy3-Kanal. Die Regionen Stratum oriens (Abbildung A), Cornu Ammonis 1 (Abbildung B) und Cornu Ammonis 3 (Abbildung C) der Kontrollgruppe zeigen eine stärkere Fluoreszenz der Kanalproteine als in der Pilocarpingruppe.

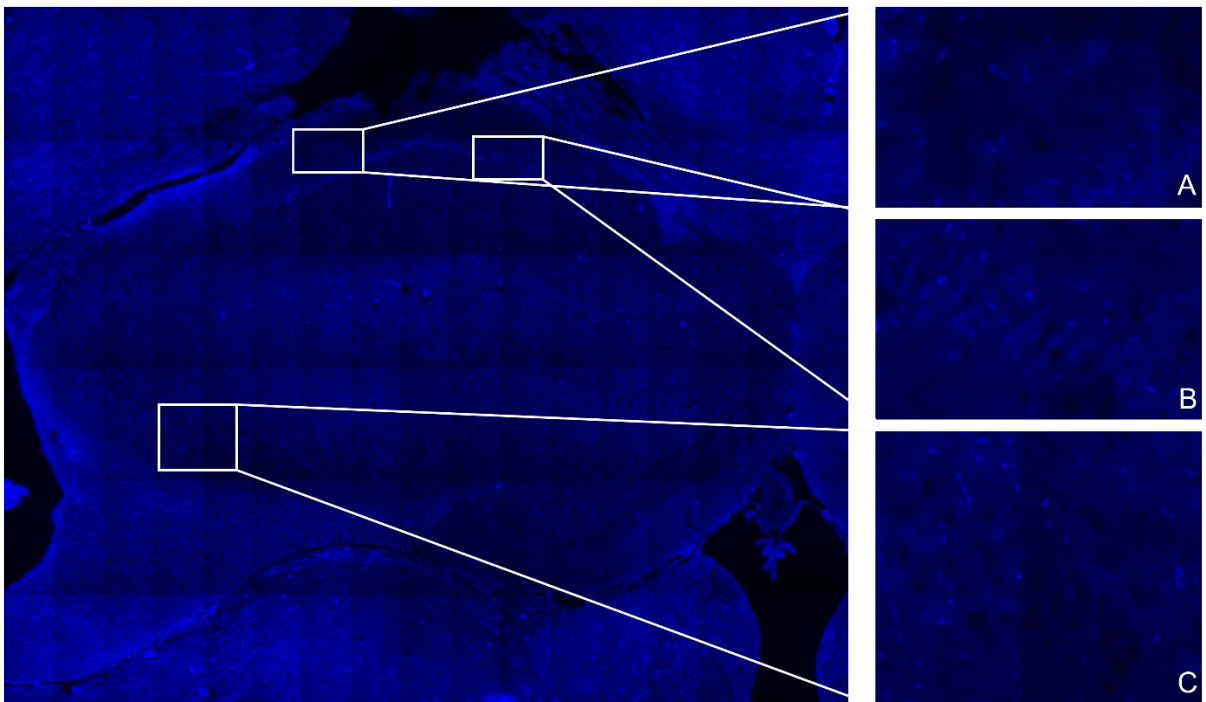


Abbildung 14: Pilocarpintier (Nr. 650-24) Dapi-Aufteilung einzelner Regionen

Repräsentatives Beispiel für die Pilocarpingruppe der Kir6.1-Kanäle im Dapi-Kanal. Die Regionen Stratum oriens (Abbildung A), Cornu Ammonis 1 (Abbildung B) und Cornu Ammonis 3 (Abbildung C) der Pilocarpingruppe zeigen eine geringere DNA-Konzentration als in der Kontrollgruppe.

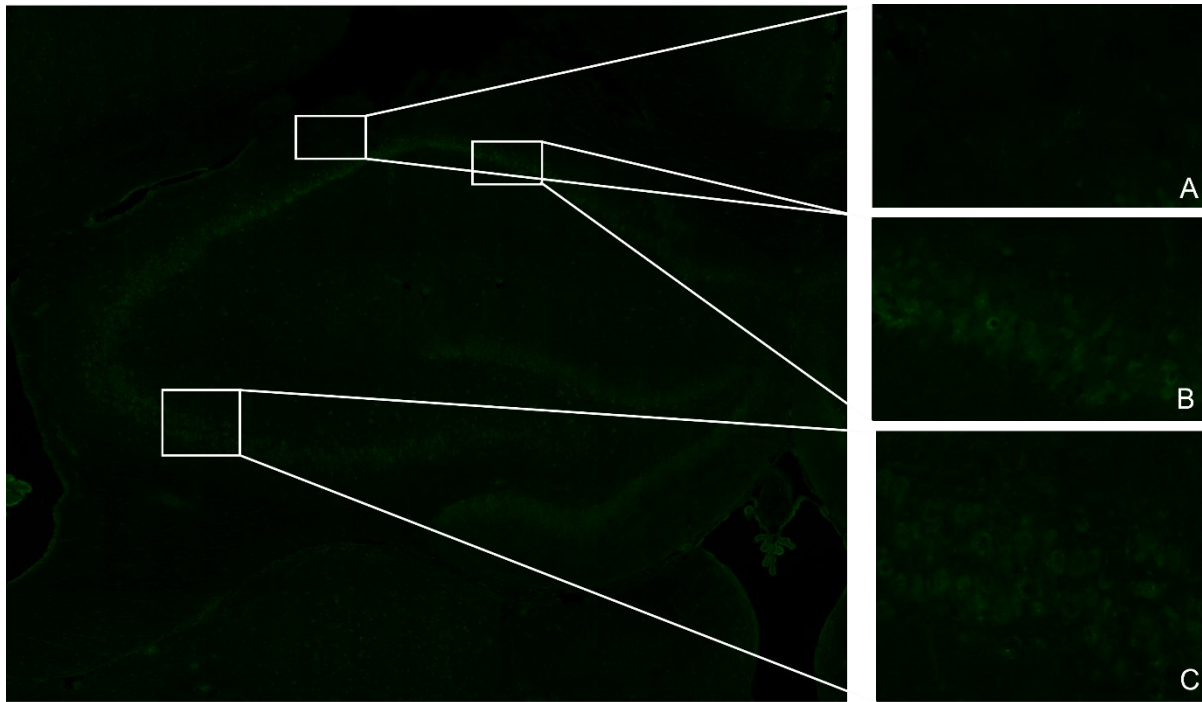


Abbildung 15: Pilocarpintier (Nr. 650-24) Cy3-Aufteilung einzelner Regionen

Repräsentatives Beispiel für die Pilocarpingruppe der Kir6.1-Kanäle im Cy3-Kanal. Die Regionen Stratum oriens (Abbildung A), Cornu Ammonis 1 (Abbildung B) und Cornu Ammonis 3 (Abbildung C) der Pilocarpingruppe zeigen eine geringere Fluoreszenz der Kanalproteine als in der Kontrollgruppe.

3.1.2 Kir6.2

Die Temporallappenepilepsie führte zu einer signifikanten Minderung der Translation der Kir6.2-Kanalproteine ($P < 0,004$; two way Analysis of Variance; **Abbildung 16**). Der Median der Kontrollgruppe liegt bei 0,247 Fluoreszenz der Kanalproteine/Zellkern ($n=77$; $P < 0,004$; two way Analysis of Variance; **Abbildung 16**). Das erste Quartil liegt bei 0,183 und das dritte Quartil bei 0,324 Fluoreszenz der Kanalproteine/Zellkern. Im Vergleich dazu liegt der Median der Pilocarpingruppe bei ca. 0,258 Fluoreszenz der Kanalproteine/ Zellkern ($n=84$; $P < 0,004$; two way Analysis of Variance; **Abbildung 16**). Das erste Quartil liegt bei 0,138 und das dritte Quartil bei 0,312 Fluoreszenz der Kanalproteine/Zellkern. Es konnte keine signifikante Auswirkung der Regionen auf die Pilocarpin- oder die Kontrollgruppe festgestellt werden ($P=0,778$, two way Analysis of Variance).

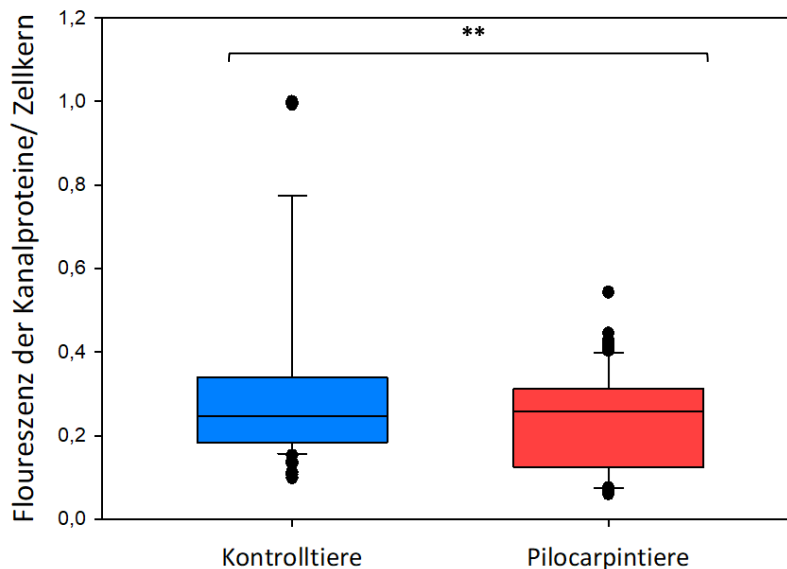


Abbildung 16: Kir6.2-Vergleich zwischen Kontrollgruppe (blau) und Pilocarpingruppe (rot)

Es ergab eine signifikante Verminderung ($P=0,004$) der Translation der Kir6.2-Kanäle bei den Kontrolltieren (blau) im Vergleich zu den epileptischen Pilocarpintieren (rot).

Im immunhistologischen Schnittbild zeigt sich in der Pilocarpingruppe eine geringere Blau- und Grünfärbung als in der Kontrollgruppe.

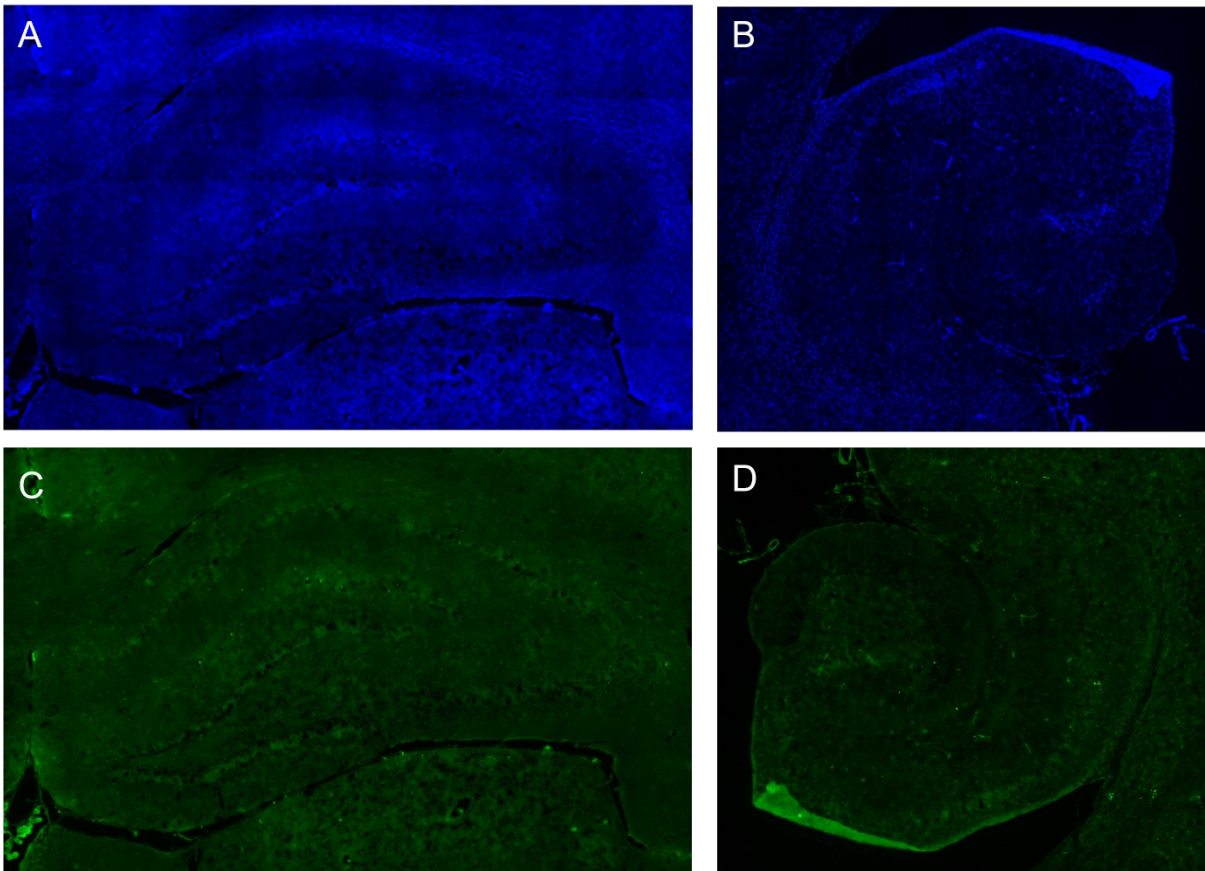


Abbildung 17: Gegenüberstellung Kontroll (A und C)- und Pilocarpintier (B und D) mit primärem Antikörper Kir6.2 im Dapi-Kanal (blau) und Cy3-Kanal (grün)

Abbildung A zeigt den Hippocampus eines Kontrolltieres (Nr. 650-34) im Dapi-Kanal zur Darstellung von DNA. Abbildung B zeigt den Hippocampus eines pilocarpinisierten Tieres (Nr. 799-12) im Dapi-Kanal. In Abbildung B zeigt sich eine geringere durchschnittliche DNA-Konzentration als in Abbildung A. Besonders deutlich wird die DNA-Reduktion im Bereich des Gyrus dentatus Stratum granulosum und im Stratum lacunosum. Grund dafür ist die chronische Epilepsie, die zum Zelluntergang im Hippocampus führt. Demgegenüber steht in Abbildung C und D dargestellt die Fluoreszenz der Kanalproteine der Kir6.2-Kanäle des Kontrolltiers (Nr. 650-34) (Abbildung C) und des pilocarpinisierten Tieres (Nr. 799-12) (Abbildung D). Bei diesem Beispiel ist die Fluoreszenz der Kanalproteine der Kir6.2-Kanäle des Kontrolltiers durchschnittlich stärker als beim pilocarpinisierten Tier.

Zusätzlich wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests eine einfaktorielles Varianzanalyse vorgenommen. Es konnte keine signifikante Veränderung der Translation der Kir6.2-Kanalproteine zwischen den einzelnen Regionen innerhalb der Kontrollgruppe festgestellt werden ($n=11$; $P=0,27$; Kruskal-Wallis-test; **Abbildung 18**). Ebenfalls konnte keine signifikante Veränderung der Translation der Kir6.2-Kanalproteine zwischen den

einzelnen Regionen innerhalb der Pilocarpingruppe festgestellt werden (n=12; P=0,623; Kruskal-Wallis-Test; **Abbildung 19**).

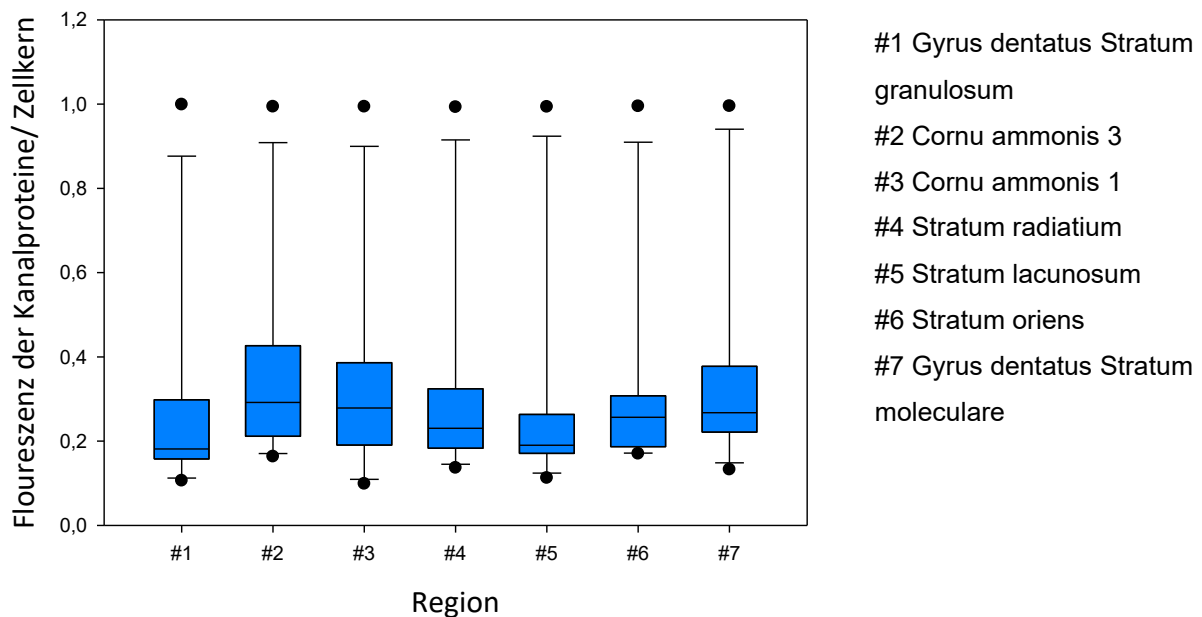


Abbildung 18: Darstellung der einzelnen Regionen des Hippocampus Kontrolltiers Kir6.2

Es liegt keine signifikante Veränderung der Translation der Kir6.2-Kanalproteine zwischen den einzelnen Regionen innerhalb der Kontrollgruppe (blau) vor (n=11; P=0,27).

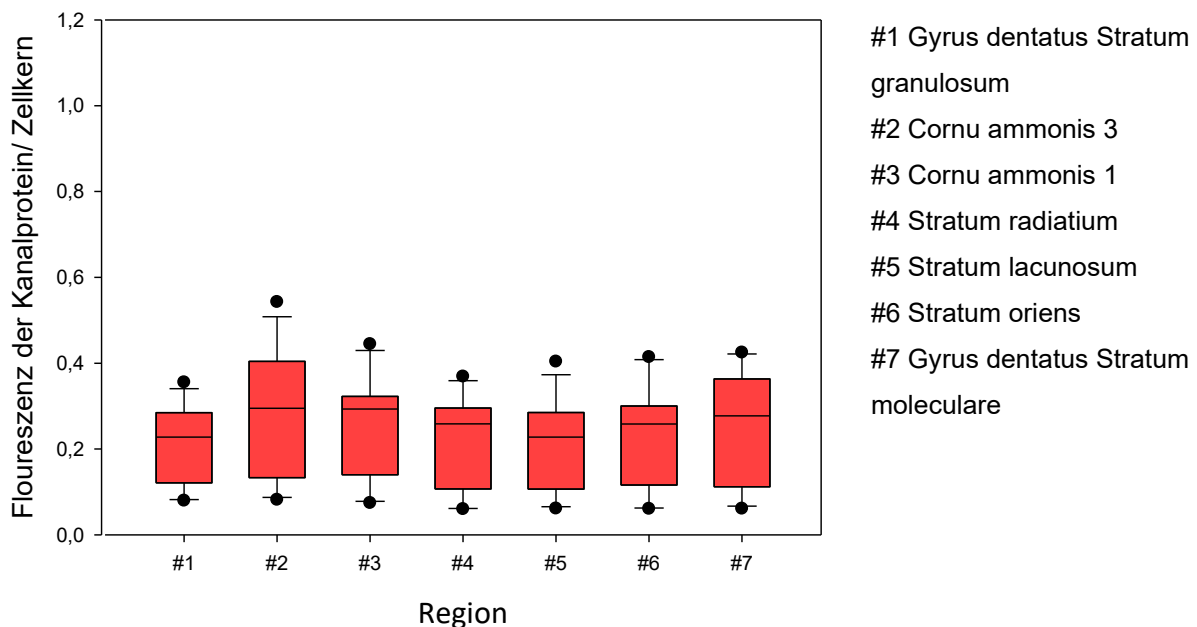


Abbildung 19: Darstellung der einzelnen Regionen des Hippocampus Pilocarpintiers (rot) Kir6.2

Es liegt keine signifikante Veränderung der Translation der Kir6.2-Kanalproteine zwischen den einzelnen Regionen innerhalb der Pilocarpingruppe (rot) vor (n=12; P=0,623)

Innerhalb der Regionen Stratum radiatum und Gyrus dentatus Stratum moleculare traten die stärksten Unterschiede zwischen Kontrolltieren und Pilocarpintieren auf. Der Mittelwert des Verhältnisses Cy3/Dapi ist in diesen zwei Regionen bei den Pilocarpintieren niedriger als bei den Kontrolltieren.

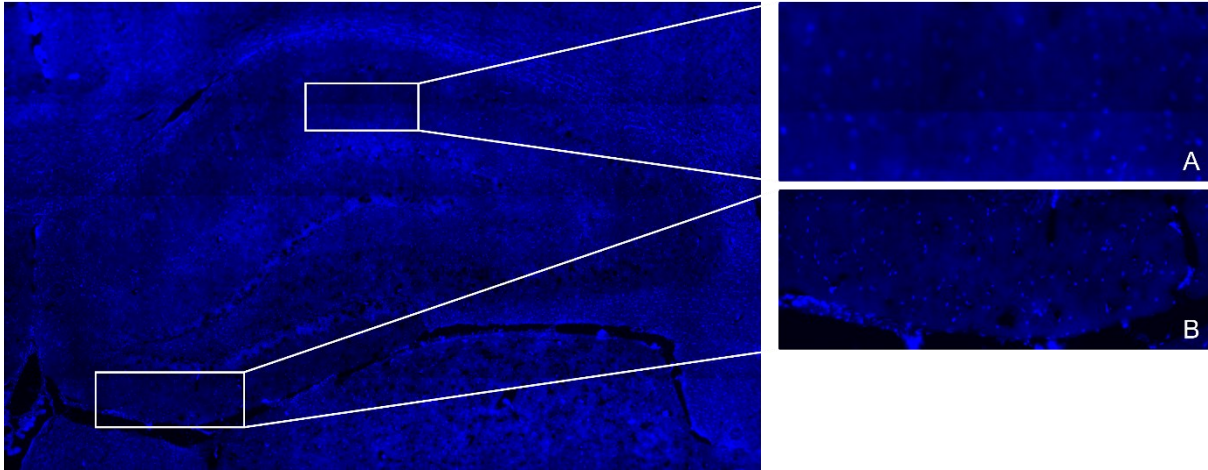


Abbildung 20: Kontrolltier (Nr. 650-34) Dapi Auftreibung einzelner Regionen

Repräsentatives Beispiel für die Kontrollgruppe der Kir6.2-Kanäle im Dapi-Kanal. Die Regionen Stratum radiatum (Abbildung A) und Gyrus dentatus Stratum moleculare (Abbildung B) der Kontrollgruppe zeigen eine höhere DNA-Konzentration als in der Pilocarpingruppe.

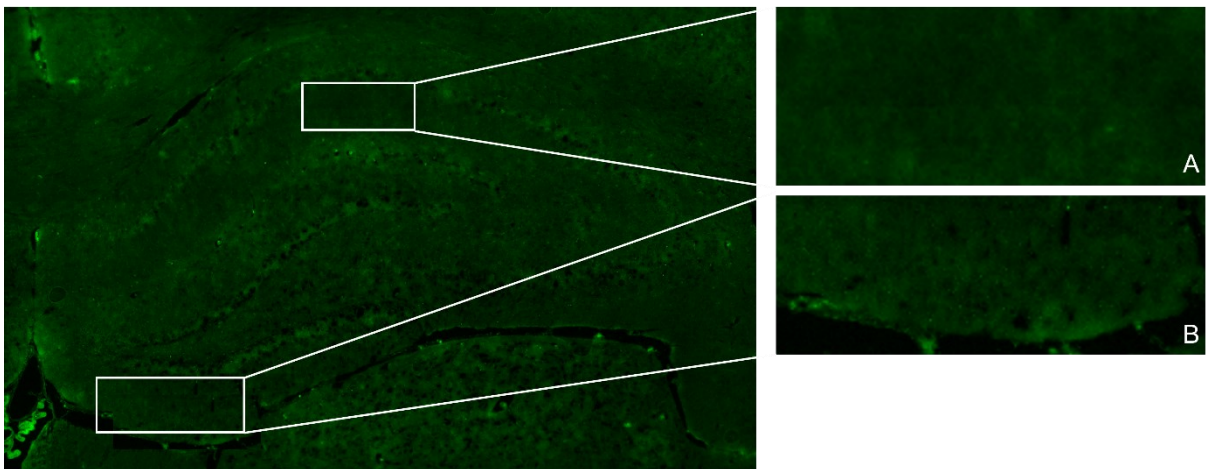


Abbildung 21: Kontrolltier (Nr.650-34) Cy3-Auftreibung der einzelnen Regionen

Repräsentatives Beispiel für die Kontrollgruppe der Kir6.1-Kanäle im Cy3-Kanal. Die Regionen Stratum radiatum (Abbildung A) und Gyrus dentatus Stratum moleculare (Abbildung B) der Kontrollgruppe zeigen eine stärkere Fluoreszenz der Kanalproteine als in der Pilocarpingruppe.

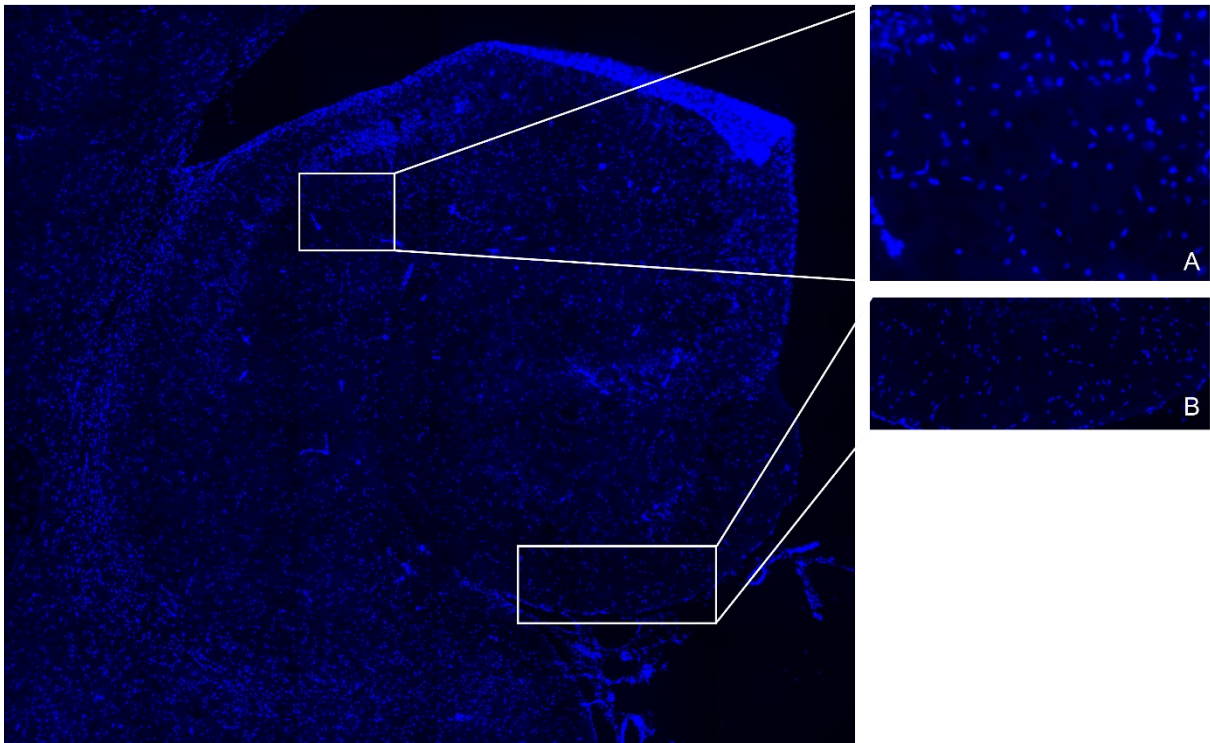


Abbildung 22: Pilocarpintier (Nr.799-12) Dapi-Aufteilung der einzelnen Regionen

Repräsentatives Beispiel für die Pilocarpingruppe der Kir6.2-Kanäle im Dapi-Kanal. Die Regionen Stratum radiatum (Abbildung A) und Gyrus dentatus Stratum moleculare (Abbildung B) der Pilocarpingruppe zeigen eine geringere DNA-Konzentration als in der Kontrollgruppe.

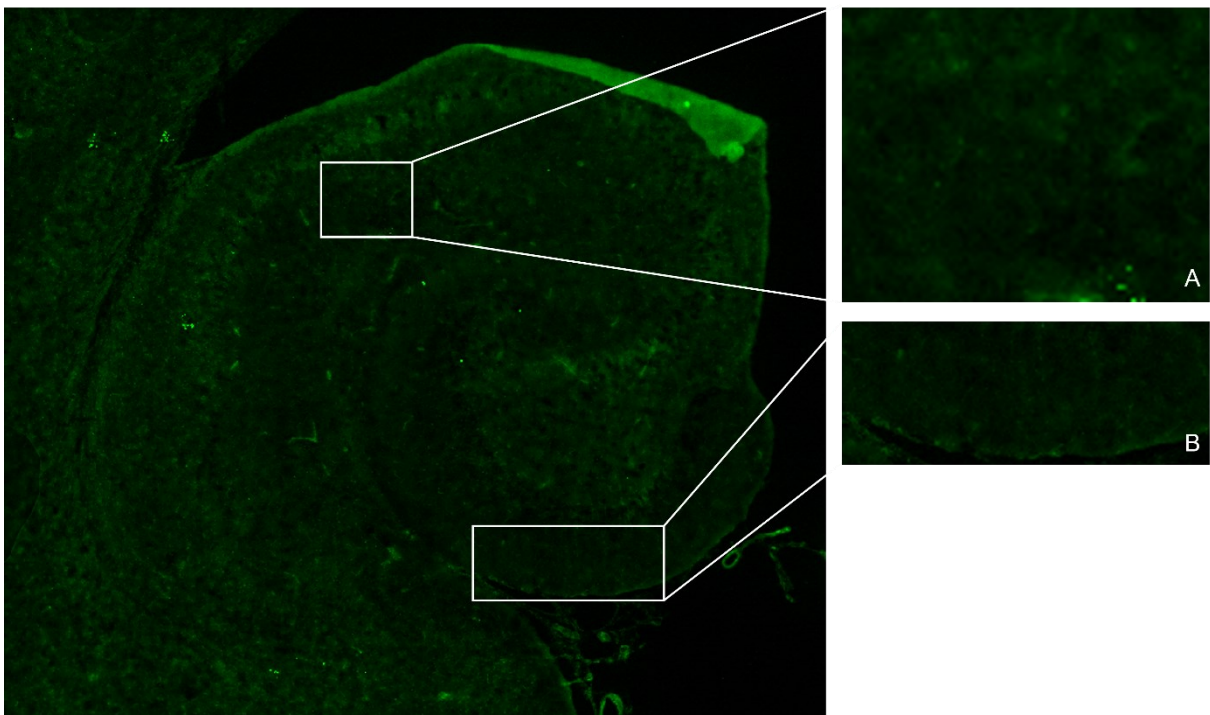


Abbildung 23: Pilocarpintier (Nr.799-12) Cy3-Aufteilung der einzelnen Regionen

Repräsentatives Beispiel für die Pilocarpingruppe der Kir6.2-Kanäle im Cy3-Kanal. Die Regionen Stratum radiatum (Abbildung A) und Gyrus dentatus Stratum moleculare (Abbildung B) der Pilocarpingruppe zeigen eine geringere Fluoreszenz der Kanalproteine als in der Kontrollgruppe.

3.1.3 KCNQ2

Die Temporallappenepilepsie führte zu einer signifikanten Minderung der Translation der KCNQ2-Kanalproteine. Der Median der Kontrollgruppe liegt bei 0,076 Fluoreszenz der Kanalproteine/Zellkern (n=84; P; $P < 0,001$; two way Analysis of Variance; **Abbildung 24**). Das erste Quartil liegt bei 0,056 und das dritte Quartil bei 0,253 Fluoreszenz der Kanalproteine/Zellkern. Im Vergleich dazu liegt der Median der Pilocarpingruppe bei ca. 0,065 Fluoreszenz der Kanalproteine/Zellkern (n=84; $P < 0,001$; two way Analysis of Variance; **Abbildung 24**). Das erste Quartil liegt bei 0,056 und das dritte Quartil bei 0,072 Fluoreszenz der Kanalproteine/Zellkern. Es konnte keine signifikante Auswirkung der Regionen auf die Kontroll- oder Pilocarpingruppe festgestellt werden ($P = 0,487$, two way Analysis of Variance).

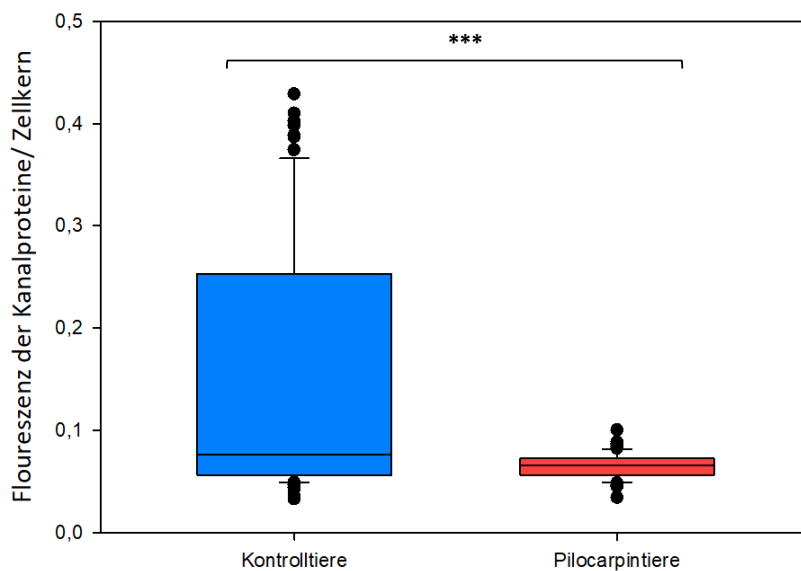


Abbildung 24: KCNQ2 Vergleich zwischen Kontrollgruppe (blau) mit Pilocarpingruppe (rot)

Es ergab eine signifikante Verminderung ($P < 0,001$) der Translation der KCNQ2-Kanäle bei den Kontrolltieren (blau) im Vergleich zu den epileptischen Pilocarpintieren (rot).

Im immunhistologischen Schnittbild zeigt sich in der Pilocarpingruppe eine geringere Blau- und Rotfärbung als in der Kontrollgruppe.

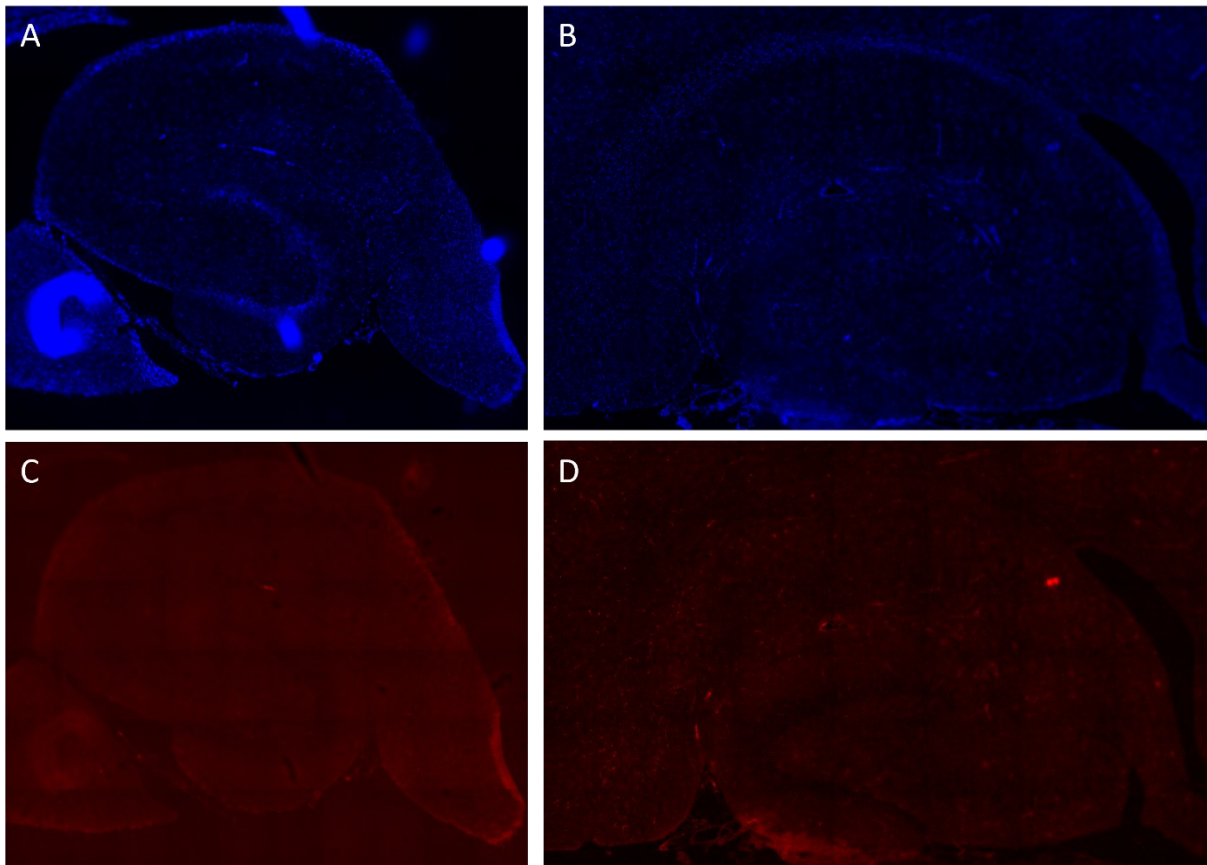


Abbildung 25: Gegenüberstellung Kontroll- (A und C) und Pilocarpintier (B und D) mit primärem Antikörper KCNQ2 im Dapi-Kanal (blau) und Alexa488-Kanal (rot)

Abbildung A zeigt den Hippocampus eines Kontrolltiers (Nr. 799-44) im Dapi-Kanal zur Darstellung von DNA. Abbildung B zeigt den Hippocampus eines pilocarpinisierten Tiers (Nr. 799-17) im Dapi-Kanal. In Abbildung B zeigt sich eine geringere durchschnittliche DNA-Konzentration als in Abbildung A. Besonders deutlich wird die DNA-Reduktion im Bereich des Gyrus dentatus Stratum granulosum. Grund dafür ist die chronische Epilepsie, die zum Zelluntergang im Hippocampus führt. Demgegenüber steht in Abbildung C und D dargestellt die Fluoreszenz der Kanalproteine der KCNQ2-Kanäle des Kontrolltiers (Nr. 799-44) (Abbildung C) und des pilocarpinisierten Tiers (Nr. 799-17) (Abbildung D). Bei diesem Beispiel geht aus dem Bildern nicht hervor, ob das Kontrolltier oder das Pilocarpintier eine stärkere Fluoreszenz der Kanalproteine der KCNQ2-Kanäle besitzt.

Zusätzlich wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests eine einfaktorische Varianzanalyse vorgenommen. Es konnte keine signifikante Veränderung der Translation der KCNQ2-Kanalproteine zwischen den einzelnen Regionen innerhalb der Kontrollgruppe festgestellt werden ($n=12$; $P=0,202$; Kruskal-Wallis-Test; **Abbildung 26**). Dafür konnte eine signifikante Auswirkung der Regionen innerhalb der Pilocarpingruppe ermittelt werden.

Es erfolgte eine signifikante Hochregulation der Translation der KCNQ2-Kanalproteine im Gyrus dentatus Stratum moleculare (n=12; P<0,001; one way Analysis of Variance; **Abbildung 27**), im Stratum oriens (n=12; P<0,001; one way Analysis of Variance; **Abbildung 27**), im Cornu Ammonis 1 (n=12; P=0,001; one way Analysis of Variance; **Abbildung 28**), im Cornu Ammonis 3 (n=12; P=0,002; one way Analysis of Variance; **Abbildung 28**) und im Stratum radiatum (n=12; P=0,006; one way Analysis of Variance; **Abbildung 30**) im Vergleich zum Gyrus dentatus Stratum granulosum. Die Translation von KCNQ2-Kanalproteinen des Gyrus dentatus Stratum moleculare ist signifikant höher als im Stratum lacunosum (n=12; P<0,001; one way Analysis of Variance; **Abbildung 29**). Es erfolgte eine signifikante Hochregulation der Translation der KCNQ2-Kanalproteine im Stratum oriens im Vergleich zum Stratum lacunosum (n=12; P=0,045; one way Analysis of Variance; **Abbildung 29**).

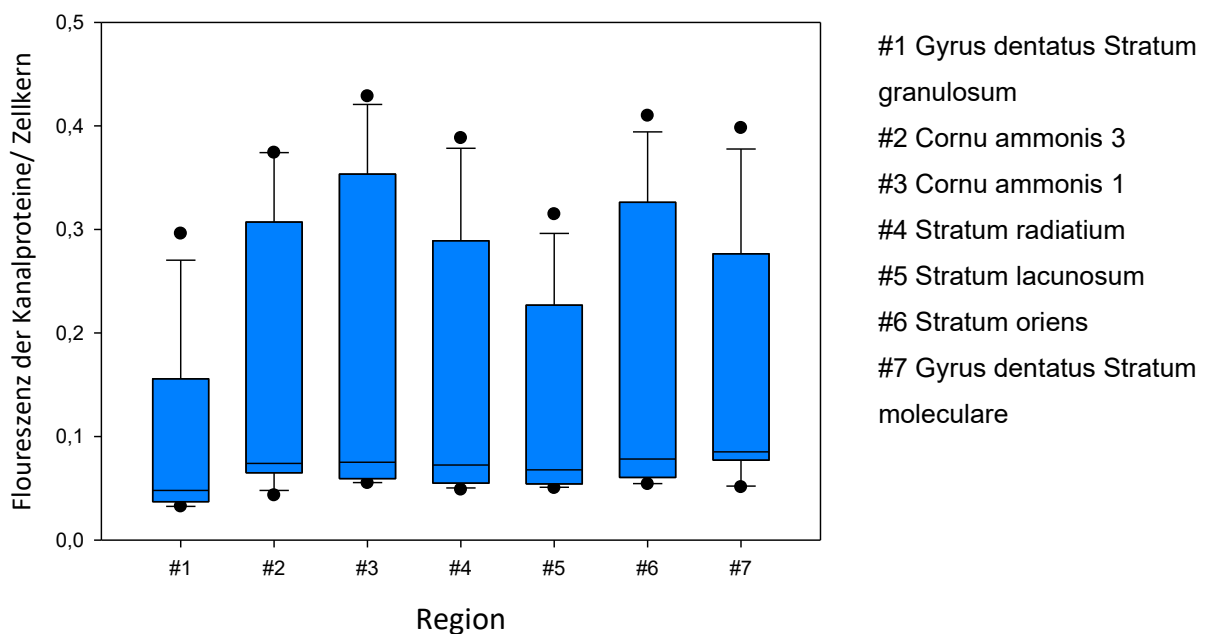


Abbildung 26: Darstellung der einzelnen Regionen des Hippocampus Kontrolltiers KCNQ2

Es liegt keine signifikante Veränderung der Translation der KCNQ2-Kanalproteine zwischen den einzelnen Regionen innerhalb der Kontrollgruppe (blau) vor (n=12; P=0,202).

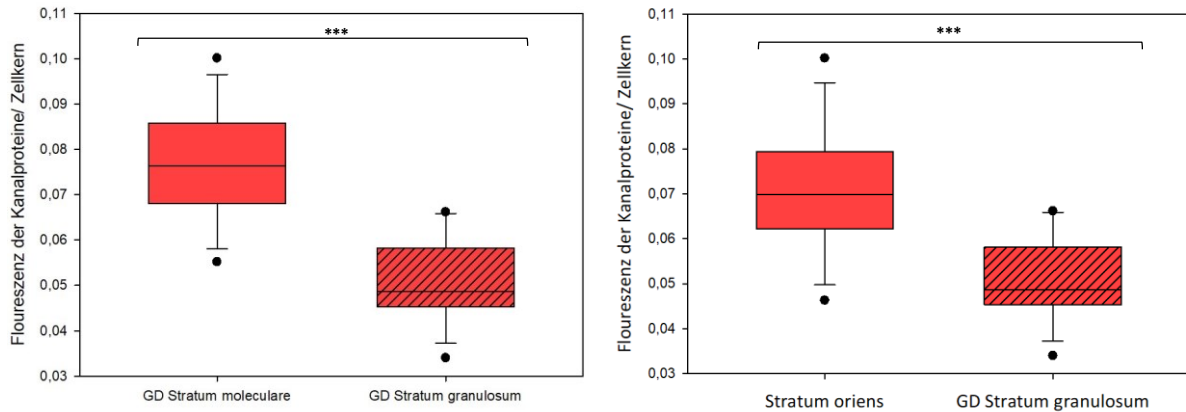


Abbildung 27:

Vergleich Gyrus dentatus Stratum moleculare (rot) mit Gyrus dentatus Stratum granulosum (rot gestreift) Pilocarpintier KCNQ2-Kanal (links)

Es ergab eine signifikante Vermehrung ($P < 0,001$) der Translation der KCNQ2-Kanäle der Pilocarpintiere im Gyrus dentatus Stratum moleculare (rot) im Vergleich zum Gyrus dentatus Stratum granulosum (rot gestreift) (links).

Vergleich Stratum oriens (rot) und Gyrus dentatus Stratum granulosum (rot gestreift) Pilocarpintier KCNQ2-Kanal (rechts)

Es ergab eine signifikante Vermehrung ($P < 0,001$) der Translation der KCNQ2-Kanäle der Pilocarpintiere im Stratum oriens (rot) im Vergleich zum Gyrus dentatus Stratum granulosum (rot gestreift) (rechts).

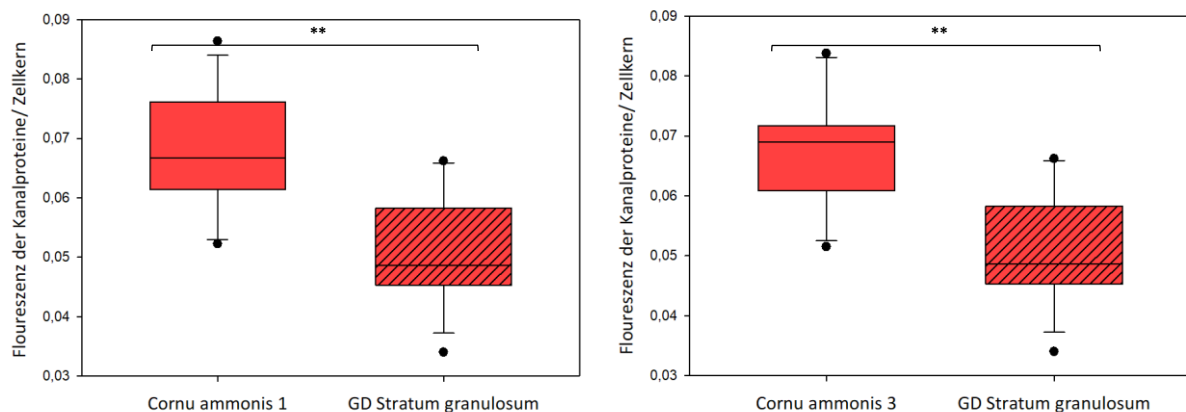


Abbildung 28:

Vergleich Cornu Ammonis 1 (rot) mit Gyrus dentatus Stratum granulosum (rot gestreift) Pilocarpintier KCNQ2-Kanal (links)

Es ergab eine signifikante Vermehrung ($P = 0,001$) der Translation der KCNQ2-Kanäle der Pilocarpintiere im Cornu Ammonis 1 (rot) im Vergleich zum Gyrus dentatus Stratum granulosum (rot gestreift) (links).

Vergleich Cornu Ammonis 3 (rot) und Gyrus dentatus Stratum granulosum (rot gestreift) Pilocarpintier KCNQ2-Kanal (rechts)

Es ergab eine signifikante Vermehrung ($P = 0,002$) der Translation der KCNQ2-Kanäle der Pilocarpintiere im Cornu Ammonis 3 (rot) im Vergleich zum Gyrus dentatus Stratum granulosum (rot gestreift) (rechts).

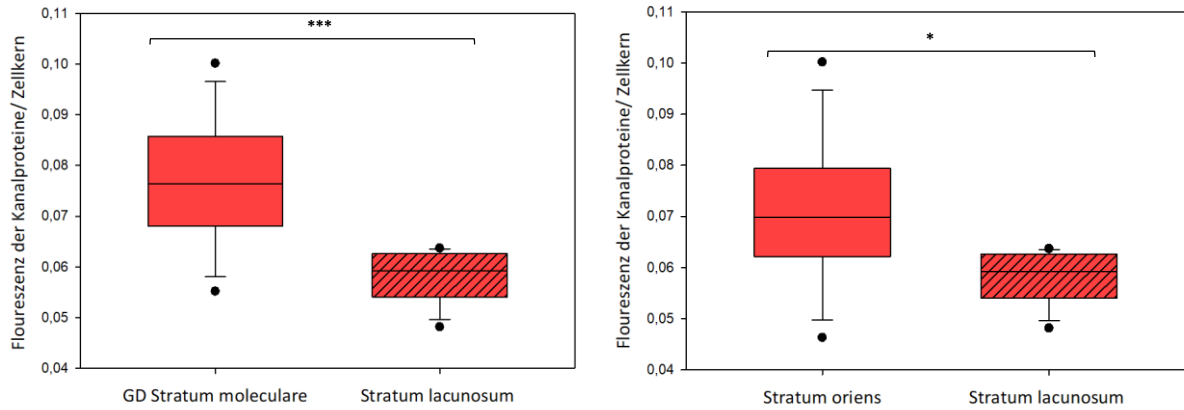


Abbildung 29:

Vergleich Gyrus dentatus Stratum moleculare (rot) mit Stratum lacunosum (rot gestreift) Pilocarpintier KCNQ2-Kanal (links)

Es ergab eine signifikante Vermehrung ($P < 0,001$) der Translation der KCNQ2-Kanäle der Pilocarpintiere im Gyrus dentatus Stratum moleculare (rot) im Vergleich zum Stratum lacunosum (rot gestreift) (links).

Vergleich Stratum oriens (rot) und Stratum lacunosum (rot gestreift) Pilocarpintier KCNQ2-Kanal (rechts)

Es ergab eine signifikante Vermehrung ($P = 0,045$) der Translation der KCNQ2-Kanäle der Pilocarpintiere im Stratum oriens (rot) im Vergleich zum Stratum lacunosum (rot gestreift) (rechts).

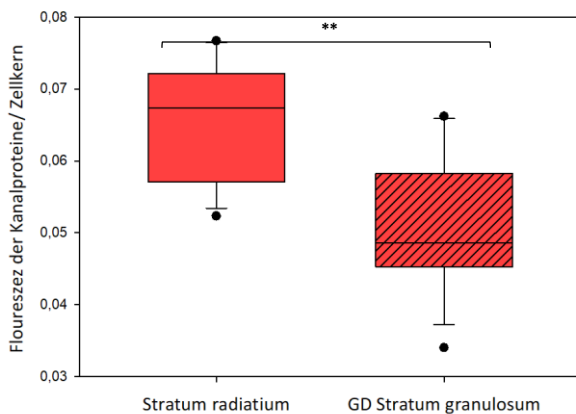


Abbildung 30: Vergleich Stratum radiatum mit Gyrus dentatus Stratum granulosum Pilocarpintier KCNQ2-Kanal

Es ergab eine signifikante Vermehrung ($P = 0,006$) der Translation der KCNQ2-Kanäle der Pilocarpintiere im Stratum radiatum (rot) im Vergleich zum Gyrus dentatus Stratum granulosum (rot gestreift).

Innerhalb der Regionen Stratum radiatum, Cornu Ammonis 3 und Cornu Ammonis 1 traten die stärksten Unterschiede zwischen Kontrolltieren und Pilocarpintieren auf. Der Mittelwert des Verhältnisses Alexa488/Dapi ist in diesen zwei Regionen bei den Pilocarpintieren niedriger als bei den Kontrolltieren. Es liegt keine Signifikanz vor.

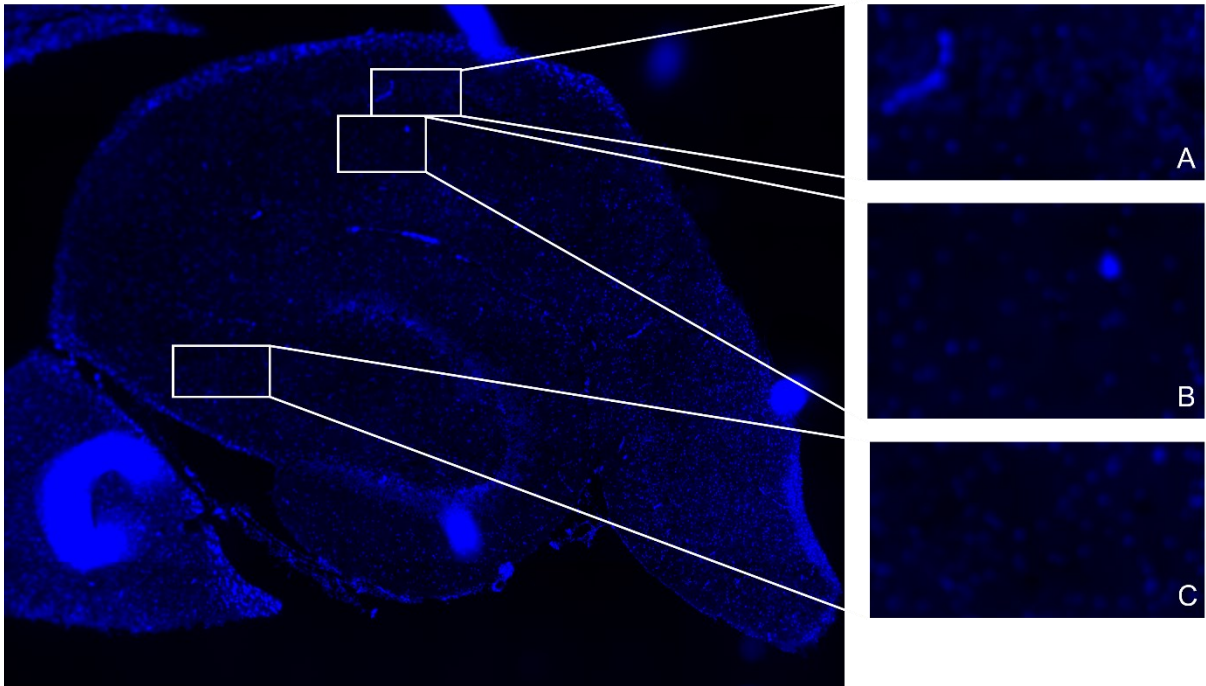


Abbildung 31: Kontrolltier (Nr. 799-44) Dapi-Aufteilung einzelner Regionen

Repräsentatives Beispiel für die Kontrollgruppe der KCNQ2-Kanäle im Dapi-Kanal. Die Regionen Cornu Ammonis 1 (Abbildung A), Stratum radiatum (Abbildung B) und Cornu Ammonis 3 (Abbildung C) der Kontrollgruppe zeigen eine höhere DNA-Konzentration als in der Pilocarpingruppe.

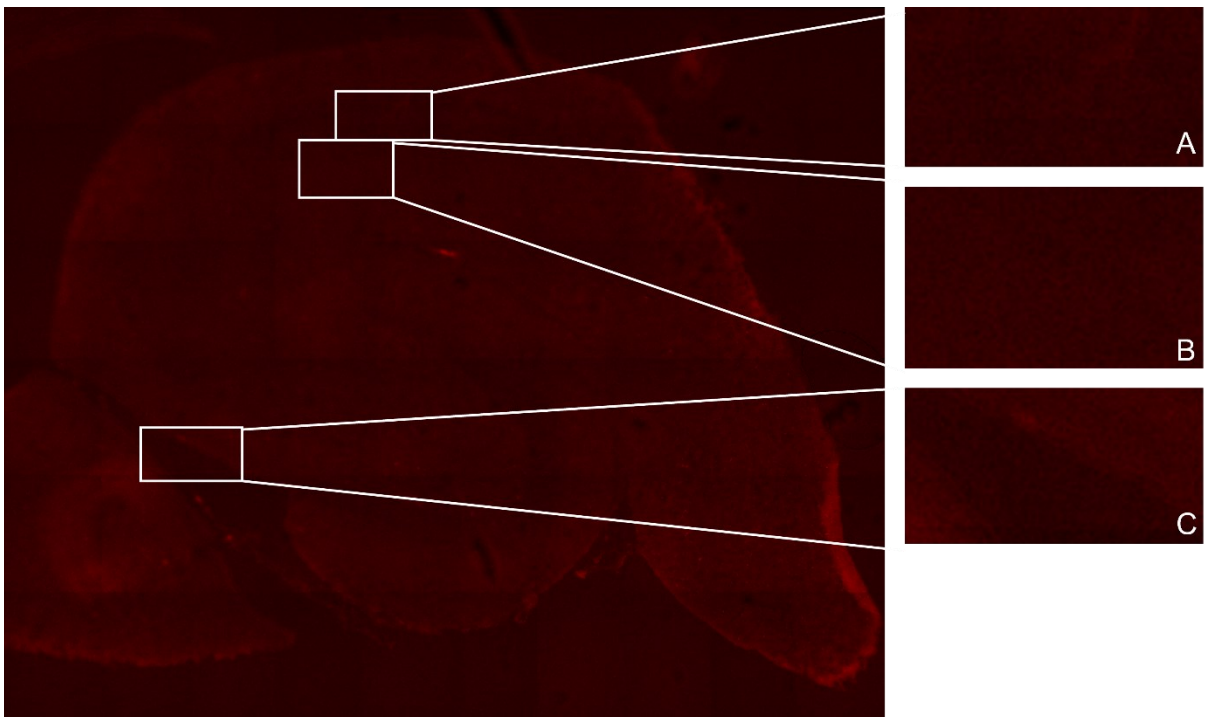


Abbildung 32: Kontrolltier (Nr.799-44) Alexa488 Aufteilung der einzelnen Regionen

Repräsentatives Beispiel für die Kontrollgruppe der KCNQ2-Kanäle im Alexa 488-Kanal. Die Regionen Cornu Ammonis 1 (Abbildung A), Stratum radiatum (Abbildung B) und Cornu Ammonis 3 (Abbildung C) der Kontrollgruppe zeigen eine stärkere Fluoreszenz der Kanalproteine als in der Pilocarpingruppe.

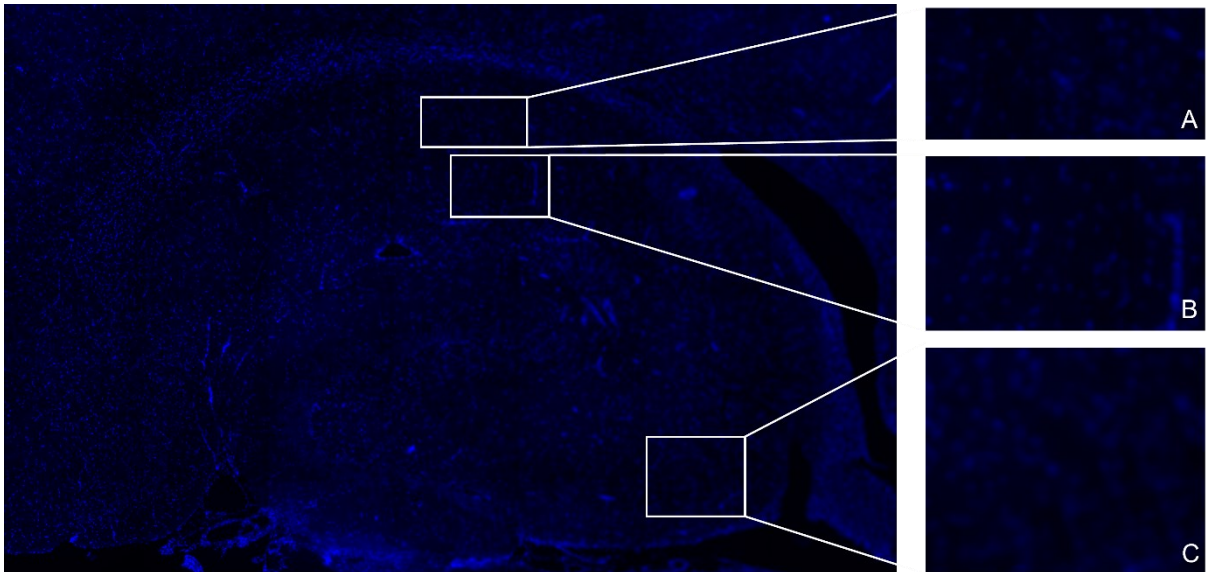


Abbildung 33: Pilocarpintier (Nr. 799-17) Dapi-Aufteilung der einzelnen Regionen

Repräsentatives Beispiel für die Pilocarpingruppe der KCNQ2-Kanäle im Dapi-Kanal. Die Regionen Cornu Ammonis 1 (Abbildung A), Stratum radiatum (Abbildung B) und Cornu Ammonis 3 (Abbildung C) der Pilocarpingruppe zeigen eine niedrigere DNA-Konzentration als in der Kontrollgruppe.

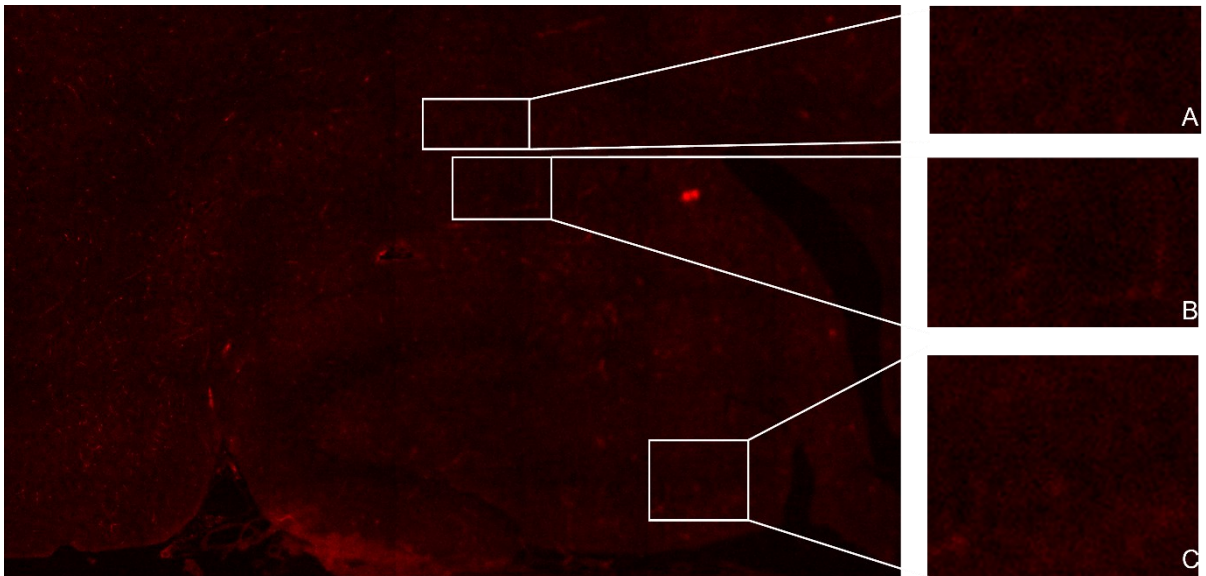


Abbildung 34: Pilocarpintier (Nr. 799-17) Alexa488-Aufteilung der einzelnen Regionen

Repräsentatives Beispiel für die Pilocarpingruppe der KCNQ2 Kanäle im Alexa 488-Kanal. Die Regionen Cornu Ammonis 1 (Abbildung A), Stratum radiatum (Abbildung B) und Cornu Ammonis 3 (Abbildung C) der Pilocarpingruppe zeigen eine geringere Fluoreszenz der Kanalproteine als in der Kontrollgruppe.

3.2 Alterskorrelation

In **Tabelle 10** dargestellt ist die Korrelation zwischen dem Alter der Tiere und dem Verhältnis aus Fluoreszenz der Kanalproteine/ Zellkern. Dabei wurde die Spearman Korrelation für nicht normalverteilte Datensätze genutzt. Eine signifikante Alterskorrelation besteht innerhalb aller Regionen bei den Kaliumkanälen Kir6.1 und Kir6.2 bei den Pilocarpintieren, innerhalb aller Regionen bei den Kaliumkanälen KCNQ2 von Kontrolltieren und bei den Kaliumkanälen KCNQ2 der Pilocarpintiere im Gyrus dentatus Stratum granulosum und moleculare.

	Kir6.1		Kir6.2		KCNQ2	
	Kontrolltier	Pilocarpintier	Kontrolltier	Pilocarpintier	Kontrolltier	Pilocarpintier
Gyrus dentatus Stratum granulosum	0,037	-0,950***	0,449	-0,602*	-0,622*	0,870***
Cornu Ammonis 3	-0,293	-0,921***	-0,060	-0,624*	-0,756**	0,181
Cornu Ammonis 1	-0,110	-0,906***	-0,009	-0,595*	-0,696*	0,029
Stratum radiatum	0	-0,805***	-0,009	-0,587*	-0,763**	-0,044
Stratum lacunosum	-0,146	-0,848***	0,270	-0,631*	-0,837***	0,058
Stratum oriens	-0,375	-0,812***	-0,334	-0,761**	-0,717**	-0,087
Gyrus dentatus Stratum moleculare	-0,087	-0,928***	0,352	-0,573*	-0,749**	0,616*

Tabelle 10: Alterskorrelation von Kir6.1; Kir6.2; KCNQ2

Die Fluoreszenz der Kanalproteine von Kir6.1 je Zellkern aller untersuchten Pilocarpintiere sinkt mit zunehmendem Alter in allen untersuchten Regionen hoch signifikant ($P < 0,001$). Die Fluoreszenz der Kanalproteine von Kir6.2 je Zellkern aller untersuchten Pilocarpintiere sinkt mit zunehmendem Alter im Stratum oriens ($P < 0,01$) und in den sechs weiteren Regionen ($P < 0,05$) signifikant.

Die Fluoreszenz der Kanalproteine von KCNQ2 je Zellkern aller untersuchten Kontrolltiere sinkt mit zunehmendem Alter im Gyrus dentatus Stratum granulosum und Cornu Ammonis 1 ($P < 0,05$), im Cornu Ammonis 3, Stratum radiatum, Stratum oriens und Gyrus dentatus Stratum moleculare ($P < 0,01$) und im Stratum lacunosum ($P < 0,001$) signifikant. Die Fluoreszenz der Kanalproteine von KCNQ2 je Zellkern aller untersuchten Tiere steigt mit zunehmendem Alter im Gyrus dentatus Stratum granulosum ($P < 0,001$) und im Gyrus dentatus Stratum moleculare ($P < 0,05$) signifikant.

IV. Diskussion

4.1 Translationale Veränderungen von Kaliumkanälen bei chronischer Epilepsie

Die mesiale Temporallappenepilepsie ist eines der häufigsten Epilepsiesyndrome (Berkovic et al. 1996). Ätiologisch scheinen vor allem Funktionsstörungen des Hippocampus, die durch eine neuronale Übererregbarkeit entstehen, für fokale Anfälle veranlagt zu sein (Schwartzkroin 1986). Andere Ursachen für eine mesiale Temporallappenepilepsie sind zum Beispiel genetische Faktoren (Crompton et al. 2010), Tumore, Infektionen, Traumata und die Hippocampussklerose (Tatum 2012). Die Hippocampussklerose zeigt sich typischerweise durch eine Moosfasersprossung und eine Veränderung der Neuropeptid-Y (NPY)-Fasernetzwerke im Gyrus dentatus (Thom et al. 2009). Zahlreiche Arbeiten befassten sich mit der Diskrepanz zwischen glutamaterger und γ -Aminobuttersäure (GABA)-ergetischen Übertragungen (Madsen et al. 2010; Zhan et al. 2010; Rowley et al. 2012; Žiburkus et al. 2013) und der gesteigerten Genexpression des einwärtsgerichteten Na^+ - oder Ca^{2+} -Stroms (Keele et al. 2000; Su et al. 2002). Durch die Entdeckung, dass die Grundlage der benignen familiären Neugeborenenkrämpfe (BFNC) durch eine Reduktion des KCNQ2/KCNQ3 -Stroms (Singh et al. 1999) entstehen, wurden Störungen der Kaliumleitfähigkeit mit der Epileptogenese in Verbindung gebracht.

Experimentell ist das Pilocarpin-Tiermodell für die Rekapitulation der chronischen mesialen Temporallappenepilepsie geeignet (Curia et al. 2008). Durch Pilocarpin entstehen strukturelle Veränderungen des Hippocampus wie zum Beispiel die Moosfasersprossung, der Verlust von Interneuronen und die ektopische Proliferation von Körnerzellen des Gyrus dentatus (Wieser 2004).

Kaliumkanäle sind wichtig bei der Stabilisierung des Ruhemembranpotenzials und der Dauer des Aktionspotenzials (Sakmann und Trube 1984) und ein Bestandteil der Epileptogenese (Singh et al. 1999). Aus diesem Grund wurden die Proteinexpression der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle Kir6.1 und Kir6.2 sowie der spannungsabhängige KCNQ2 -Kanal untersucht. Es wurden insgesamt 24 Wistar-Ratten (zwölf Pilocarpintiere, zwölf Kontrolltiere) innerhalb der sieben verschiedenen Regionen des Hippocampus (Gyrus dentatus Stratum granulosum, Cornu Ammonis 3, Cornu Ammonis 1, Stratum radiatum, Stratum lacunosum, Stratum oriens und Gyrus dentatus Stratum moleculare) immunhistologisch betrachtet. Dabei wurde das Verhältnis aus dem se-

kundären Antikörper Cy3/Dapi für Kir6.1- und Kir6.2-Kanäle bzw. dem sekundären Antikörper Alexa488/Dapi für KCNQ2-Kanäle berechnet. Dapi (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) ist ein Gegenfärbemittel für DNA (sigmaaldrich). Mittels dieser Methode wurde der Zelluntergang durch die chronische Epilepsie herausgerechnet.

4.1.1 Kir6.1 und Kir6.2

Einwärtsgerichtete Kaliumkanäle sind in zentralen Neuronen vorhanden (Karschin et al. 1997; Dunn-Meynell et al. 1998; Zawar et al. 1999). Da ATP die Kir6.x-Kanäle geschlossen hält (Hibino et al. 2010), führt der ATP-Verbrauch durch die Depolarisation der Zelle während des Aktionspotenzials zu einer Öffnung der Kir6.x-Kanäle (Tanner et al. 2011). Allerdings besteht die Vermutung, dass diese Kanäle nur unter schweren metabolischen Zuständen wie zum Beispiel Anoxie und Ischämie geöffnet werden (Benndorf et al. 1991). In dieser Arbeit wurden die Kir6.1- und Kir6.2-Kanäle untersucht. Die Ergebnisse entsprechen der aktuellen Studienlage. Es ergab eine signifikante Herunterregulation der Proteinexpression der Kir6.1- und Kir6.2-Kanäle unter chronischer Epilepsie. Die einzelnen Regionen des Hippocampus weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Ein Vergleich ist somit nicht notwendig. Unterstützend beschrieb Ruiz 2011 eine Herunterregulation des mRNA-Spiegels der SUR1-Untereinheit *Abcc8* der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle unter chronischer Epilepsie (Ruiz et al. 2011). Die mRNA wurde unbeachtet der Regionen des Hippocampus vollständig entnommen und mittels PCR entschlüsselt. Im Vergleich zu dieser Arbeit wurden Sprague–Dawley-Ratten und keine Wistar-Ratten genutzt.

Es stellt sich die Frage, welche Auswirkungen die Herunterregulation der einwärtsgerichteten ATP-abhängigen Kaliumkanäle mit sich bringt. Tanner stellte fest, dass einwärtsgerichtete ATP-abhängige Kaliumkanäle an der langsamen Nachhyperpolarisation beteiligt sind (Tanner et al. 2011). Das ist interessant, weil die Herunterregulation der Kir6.x-Kanäle zu einer kürzeren langsamen Nachhyperpolarisation und schlussfolgernd zu einem verlängerten Erregungszustand der Zellen führen könnte.

Henze formulierte eine Frequenzabhängigkeit für die Spike-Übertragung von Körnerzellen des Gyrus dentatus zu den Pyramidenzellen der Cornu Ammonis 3 (Henze et al. 2002). Er erläuterte, dass einzelne Spikes der Körnerzellen keine Spikes in Pyramidenzellen induzieren können, aber hochfrequente Spikes, die möglicherweise bei Anfallsepisoden vorliegen könnten, dazu in der Lage seien (Henze et al. 2002). Tanner

beschrieb eine durch Spikes induzierte anhaltende Öffnung von einwärtsgerichteten Kaliumkanälen (Tanner et al. 2011). Diese könnten zu einer Begrenzung der Erregungsausbreitung im Gyrus dentatus dienen (Tanner et al. 2011). Folglich könnte die in dieser Arbeit ermittelte Herunterregulation der Proteinexpression von Kir6.1- und Kir6.2-Kanälen unter chronischer Epilepsie einen Bestandteil der Erregungsausbreitung von den Körnerzellen zu den Pyramidenzellen darstellen.

Mutationen von Genen, codierend für Kir6.2 oder SUR1, stehen in Verbindung zu neonatalem Diabetes mellitus (Flanagan et al. 2006). Mutationsbedingt erfolgt eine Herabregulation der Sensitivität gegenüber ATP bei ATP-abhängigen einwärtsgerichteten Kaliumkanälen in den β -Zellen des Pankreas (Gloyn et al. 2004). Daraus folgt, dass trotz eines hohen Glucosespiegels beziehungsweise daraus resultierendem hohen ATP-Spiegels die Kaliumkanäle geöffnet bleiben und eine Insulinfreisetzung verhindert wird (Gloyn et al. 2004). Parallel tritt bei bis zu 30 % der Patienten ein leichtes DEND-Syndrom auf, geprägt durch Entwicklungsverzögerung, Muskelhypotonie, Autismus, Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung und dem bereits erläuterten neonatalen Diabetes mellitus (Franco et al. 2015). Ein schweres DEND-Syndrom beschränkte sich auf weniger als 5 % der Erkrankten (Pipatpolkai et al. 2020). Patienten mit dieser Form leiden zusätzlich an Epilepsie (Slingerland und Hattersley 2005). Die Therapie bei neonatalem Diabetes mellitus besteht aus Sulfonylharnstoffen oder Gliniden (Pipatpolkai et al. 2020). Dabei handelt es sich um ATP-abhängige Kaliumkanal-Blocker, die durch eine Schließung der Kaliumkanäle zu einem Anstieg der Insulinsekretion führen (Pipatpolkai et al. 2020). In dieser Arbeit wurde eine Herabregulation von Kir6.1- und Kir6.2-Kanälen unter chronischer Epilepsie beobachtet. Die Vermutung wurde aufgestellt, dass durch eine Herabregulation bedingte verringerte Hyperpolarisation zu einer stärkeren Erregbarkeit der Zellen führt. Schlussfolgernd könnte die Verwendung eines Kaliumkanal-Blockers zu einer Unterbindung der Kir6.1- und Kir6.2-bedingten Hyperpolarisation führen und damit den Erregungszustand weiter erhöhen. Ein negativer Einfluss von Sulfonylharnstoffen in der Epilepsieforschung erfolgte mittels Glibenclamid. Shafaroodi und Mitarbeiter untersuchten die antikonvulsive Wirkung des Diuretika Triamteren (Shafaroodi et al. 2016). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Triamteren in hohen Konzentrationen (10, 20 und 40 mg/kg) zu einer Verlängerung der Latenzzeit zwischen klonischen Anfällen sowie zu einer allgemeinen Reduktion von Anfällen führt (Shafaroodi et al. 2016). Die Untersuchung erfolgte am intraperitonealen

Pentylentetrazol (PTZ)-Modell (Shafaroodi et al. 2016). Anschließend injizierten sie am sechsten Tag 60 Minuten vor intravenöser Pentylentetrazol-Gabe Glibenclamid (Shafaroodi et al. 2016). Dieses blockierte die antikonvulsive Wirkungen von Triamteren (Shafaroodi et al. 2016). Shafaroodi und Mitarbeiter vermuten, dass die antikonvulsive Wirkung von Triamteren mit ATP-abhängigen Kaliumkanälen in Verbindung steht (Shafaroodi et al. 2016). Inwiefern allerdings Glibenclamid neuronal direkt ATP-abhängige Kaliumkanäle blockiert, ist nicht bekannt. Lediglich Pipatpolkai und Mitarbeiter beschrieben den Fortbestand der neurologischen Defizite bei einer Langzeittherapie mit Sulfonylharnstoffen (Pipatpolkai et al. 2020). Möglicherweise haben Sulfonylharnstoffe eine fehlende oder sehr geringe Liquordurchgängigkeit, wodurch es zu keiner Veränderung der Epilepsie kommt.

4.1.2 KCNQ2

Die Ergebnisse dieser Arbeit entsprechen der aktuellen Studienlage. Cooper und Mitarbeiter ermittelten 2001 somatische KCNQ2-Kanäle auf zahlreichen Zellen des Hippocampus (Cooper et al. 2001). Dabei war die Konzentration der KCNQ2-Kanäle von Interneuronen höher als in Pyramiden- bzw. Körnerzellen (Cooper et al. 2001). Grigorov und Mitarbeiter unterstützten diese Aussage durch einen PCR-Nachweis von KCNQ2-Kanälen bei Ratten in allen inhibitorischen Interneuronen des Hippocampus (Grigorov et al. 2014). In dieser Arbeit konnte eine hoch signifikante starke Herunterregulation der KCNQ2-Kanäle unter chronischer Epilepsie in allen sieben beschriebenen Regionen des Hippocampus festgestellt werden. Dieses Ergebnis erweitert die Überlegungen von Maslarova und Mitarbeiter. Sie beschrieb eine Herunterregulation der Proteinexpression von KCNQ2-Kanälen mittels Immunhistochemie an Wistar-Ratten im entorhinalen Cortex (Maslarova et al. 2013). Sie vermutete, dass die Grundlage für die Herunterregulation von KCNQ2-Kanälen auf den durch chronische Epilepsie bedingten starken Neuronenuntergang zurückzuführen sei (Maslarova et al. 2013). In dieser Arbeit kann für die sieben untersuchten Regionen des Hippocampus diese Hypothese verneint werden, da durch die Ermittlung des Verhältnisses aus der Fluoreszenz der Kanalproteine je Zellkern der Faktor des Zelluntergangs rechnerisch eliminiert wurde. Auch interessant sind die Ergebnisse von Bievert und Mitarbeiter 1998. Er beschreibt die durch eine Mutation des Chromosoms 20q13.3 des KCNQ2-Kanals ausgelösten autosomal-dominant vererbten benignen familiären Neugeborenenkrämpfe

(BFNC) (Biervert et al. 1998). Die Mutation des Chromosoms 20q13.3 führten zu einem Funktionsverlust des KCNQ2-Kanals (Biervert et al. 1998).

Was ist jedoch die Folge aus der Herunterregulation von KCNQ2-Kanälen im Hippocampus? Durch eine Herunterregulation kann ein verminderter Kaliumausstrom und somit eine geringe Hyperpolarisation der Zelle vermutet werden (Grunnet et al. 2014; Maslarova et al. 2013). Daraus folgt eine leichte Depolarisation der Zellen und damit eine erhöhte Erregbarkeit mit steigender Anfallsbereitschaft (Grunnet et al. 2014; Maslarova et al. 2013). Des Weiteren ist bewiesen, dass die KCNQ2-Kanäle mit dem M-Strom interagieren (Wang et al. 1998). Der M-Strom ist ein Kaliumleitwert, der sich langsam aktiviert und deaktiviert und zur Bestimmung unterschwelliger elektrischer Erregbarkeit von Neuronen beiträgt (Wang und McKinnon 1995). Der M-Kanal kann das wiederholte Auftreten von neuronalen Aktionspotenzialen verhindern (Munro und Dalby-Brown 2007). Eine Reduktion von 25 % des Stroms und damit ebenfalls des KCNQ2-Stroms (Jentsch 2000) führt zu einer neonatalen Epilepsie (Schroeder et al. 1998). Den vorliegenden Ergebnissen stehen verschiedene Varianten gegenüber, bei denen es zu einer Zunahme des Kaliumstroms durch verzögerte Schließung des KCNQ2-Kanals kommt (Mulkey et al. 2017; Niday und Tzingounis 2018). Diese Mutationen sind zunächst in ihrer Funktionsweise unverständlich, da das Antikonvulsivum Retigabin ein KCNQ2-Kanalöffner ist und somit therapeutisch den Kaliumausstrom verstärkt (Rostock et al. 1996). Das Medikament wurde letztendlich wegen zu starker Nebenwirkungen zurückgezogen (Daniluk et al. 2016). Miceli formulierte die Hypothese, dass eine durch KCNQ2-Kanal bedingte verstärkte Hyperpolarisation von Interneuronen des Hippocampus zu einer stärkeren Erregbarkeit der nachfolgenden Hauptzelle führt (Miceli et al. 2015), denn bei der Kontrollgruppe zeigte sich eine Blockade von nachfolgenden Aktionspotenzialen durch bestehende Interneuronenaktivität (Miceli et al. 2015). Der Fakt, dass, wie bereits zu Beginn erwähnt, KCNQ2-Kanäle in inhibitorischen Interneuronen des Hippocampus vorkommen, unterstützt diese Hypothese (Grigorov et al. 2014; Cooper et al. 2001).

Ergaben sich signifikante Veränderungen der Proteinexpression von KCNQ2-Kanälen unter chronischer Epilepsie innerhalb der sieben untersuchten Regionen des Hippocampus? Ja, es konnten signifikante Veränderungen wahrgenommen werden. Festzustellen ist eine signifikant höhere Konzentration an KCNQ2-Kanalproteinen im Gyrus dentatus Stratum moleculare, im Stratum oriens, im Cornu Ammonis 1 und im Cornu

Ammonis 3 im Vergleich zum Gyrus dentatus Stratum granulosum. Das bedeutet, es liegen signifikant weniger KCNQ2-Kanalproteine in Körnerzellen als in Pyramidenzellen und Interneuronen vor. Cooper und Mitarbeiter wiesen an zehn männlichen C5736-Mäusen mittels Immunhistochemie unterschiedliche Konzentrationen an KCNQ2-Kanalproteinen nach (Cooper et al. 2001). Diese Tiere könnten als Kontrolltiere deklariert werden. Cooper und Mitarbeiter ermittelten eine insgesamt mäßige Konzentration an KCNQ2-Kanalproteinen im Stratum oriens, im Stratum radiatum, im Stratum lacunosum und im Gyrus dentatus Stratum molculare (Cooper et al. 2001). Diese Konzentrationen waren höher als im Gyrus dentatus Stratum granulosum und im Stratum pyramidale (Cornu Ammonis 1-3) (Cooper et al. 2001). Das ist interessant, weil in dieser Arbeit unter chronischer Epilepsie ebenfalls eine signifikant höhere Konzentration an Interneuronen besteht als an Körnerzellen. Ein möglicher Verdacht, dass lediglich der Zelluntergang durch chronische Epilepsie zu diesen Verhältnissen führt, ist zu verneinen, da zur Erhebung der statistischen Daten das Verhältnis aus der Fluoreszenz der Kanalproteine je Zellkern ermittelt wurde. Der Faktor des Zelluntergangs kann somit eliminiert werden. Weitere Arbeiten, in denen die einzelnen Regionen des Hippocampus aufgeschlüsselt wurden, konnten nicht gefunden werden.

4.2 Alterskorrelation

4.2.1 Kir6.1 und Kir6.2

In dieser Arbeit wurde eine signifikante Reduktion der Kir6.1- und Kir6.2-Kanalproteine mit zunehmendem Alter der Wistar-Ratten festgestellt. Folglich müsste es mit zunehmendem Alter zu einer weiteren Abnahme der Hyperpolarisation und somit zu einer Zunahme des Erregungszustands kommen. Entsprechende Vordaten sind nicht bekannt. Eine weitere Untersuchung auf diesem Gebiet ist ratsam.

4.2.2 KCNQ2

Epileptische Anfälle treten mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 bis 4 von 1000 Neugeborenen in den ersten Lebenstagen auf (Shellhaas 2019; Pisani et al. 2018; Glass et al. 2016). Unterschiedliche Ursachen werden vermutet. Katsarou und Mitarbeiter beschreiben altersspezifische Unterschiede des neuronalen Netzwerks, der synaptischen Reife, dem Grad der Myelinisierung, der Ionenhomöostase, der glialen Entwicklung und der Expressions- und Signalmuster gängiger Neurotransmitter und deren Signalwege im Gehirn als potenzielle Ursache (Spoto et al. 2021; Katsarou et al. 2018). Präziser formulierten Bender und Mitarbeiter als mögliche Ursachen altersspezifische KCNQ-Isoformen, alternatives Spleißen oder Interaktion mit den metabotropen GABA-Rezeptoren (Bender und Baram 2008; Katsarou et al. 2018). Die GABA_A-Rezeptoren führen in adulten Zellen mithilfe eines Na-K-Cl-Kotransporters durch einen Chloridionen-Einstrom zur Hyperpolarisation der Zellen (Galanopoulou 2010, 2008; Briggs und Galanopoulou 2011). In juvenilen Zellen ist ein K-Cl-Kotransporter vorherrschend, der durch Chloridionen-Ausstrom zu einer Depolarisation der Zelle führt (Galanopoulou 2010, 2008; Briggs und Galanopoulou 2011). Des Weiteren zeigt das Gehirn Neugeborener ständige Entwicklungsveränderungen, die zu einer Übererregbarkeit des Gehirns und folglich zu einer höheren Anfallbereitschaft führen (Katsarou et al. 2018). Ein Beispiel für genetisch bedingte Neugeborenenepilepsie sind die benignen familiären Neugeborenenkrämpfe (BFNC) (Jentsch 2000). Die BFNC wird autosomal-dominant vererbt und charakterisiert sich durch unprovokierte partielle oder generalisierte klonische Krämpfe (Ronen et al. 1993). Die Position der Genmutationen für BFNC wurden dem Chromosom 20q13.3 (Leppert et al. 1989) und Chromosom 8q24 (Biervert et al. 1998) zugeordnet. Der KCNQ2-Kanal wurde auf dem Chromosom

20q13.3 und der KCNQ3-Kanal auf dem menschlichen Chromosom 8q24 identifiziert (Biervert et al. 1998).

In dieser Arbeit konnte eine Zunahme der KCNQ2-Kanalproteine mit zunehmendem Alter der Wistar-Ratten im Gyrus dentatus Stratum granulosum und Gyrus dentatus Stratum moleculare beobachtet werden. Folglich kommt es zu einer Zunahme von KCNQ2-Kanalproteinen in Körnerzellen und Gyrus dentatus Interneuronen. Die ältesten Tiere in dieser Arbeit waren 229 Tage (7,6 Monate) alt. Eine mögliche Folge dieser Zunahme könnte eine Reduktion von epileptischen Anfällen mit zunehmendem Alter sein, da die Hyperpolarisation der Zelle verstärkt wird und die Erregbarkeit sinken könnte. Die von Bender und Mitarbeiter formulierten altersspezifischen KCNQ-Isoformen (Bender und Baram 2008) könnten deshalb infrage gestellt werden. Des Weiteren konnte eine Abnahme der Proteinexpression von KCNQ2-Kanälen innerhalb aller Regionen bei den Kontrolltieren festgestellt werden, was wiederum ihre Notwendigkeit für die adulte neuronale Erregungsweiterleitung infrage stellen könnte. Die genauen Ursachen sind noch nicht geklärt und bedürfen weiterer Forschung.

V. Zusammenfassung

Die mesiale Temporallappenepilepsie ist eines der häufigsten Epilepsiesyndrome (Berkovic et al. 1996). Besonders Funktionsstörungen des Hippocampus, die durch eine neuronale Übererregbarkeit entstehen, scheinen für fokale Anfälle veranlagt zu sein (Schwartzkroin 1986). Bis heute sind noch nicht alle funktionellen Veränderungen, die zu einer mesialen Temporallappenepilepsie führen können, geklärt. Deshalb werden in dieser Arbeit die sieben Regionen (Gyrus dentatus Stratum granulosum, Cornu Ammonis 3, Cornu Ammonis 1, Stratum radiatum, Stratum lacunosum, Stratum oriens und Gyrus dentatus Stratum moleculare) des Hippocampus untersucht. Das Pilocarpin-Modell ist ein wichtiger Motor zum Verständnis der Pathogenese von mesialer Temporallappenepilepsie (Curia et al. 2008). Es zeigt die Symptome und Folgen der chronischen Epilepsie (Curia et al. 2008) und wurde in dieser Arbeit genutzt. Zahlreiche Arbeiten beschäftigten sich mit der ätiologischen Beteiligung von Kaliumkanälen bei Epilepsie. Zum Beispiel führt eine KCNQ2-Mutation auf dem Chromosom 20q13 zu benignen familiären Neugeborenenkrämpfen (BFNC) (Singh et al. 1999; Biervert et al. 1998). Des Weiteren wird eine KCNJ11-Mutation, die für eine Kir6.2-Untereinheit codiert, in Verbindung mit DEND-Syndrom (Entwicklungsverzögerung, Epilepsie und Neugeborenen-Diabetes) gebracht (Slingerland und Hattersley 2005).

In dieser Arbeit wurden die Veränderungen der Proteinexpression von den einwärtsgerichteten ATP-abhängigen Kaliumkanälen Kir6.1 und Kir6.2 und von dem spannungsabhängigen KCNQ2-Kanal unter chronischer Epilepsie untersucht. Es fand eine signifikante Herunterregulation der Proteinexpression bei allen drei Kanälen unter chronischer Epilepsie statt. Dieses Ergebnis entspricht der aktuellen Studienlage. Zusätzlich zeigten sich beim KCNQ2-Kanal signifikante Unterschiede innerhalb der untersuchten Regionen unter chronischer Epilepsie. Festzustellen ist eine signifikant höhere Konzentration an KCNQ2-Kanalproteinen im Gyrus dentatus Stratum moleculare, im Stratum oriens, im Cornu Ammonis 1 und im Cornu Ammonis 3 im Vergleich zum Gyrus dentatus Stratum granulosum. Das bedeutet, es liegen signifikant weniger KCNQ2-Kanalproteine in Körnerzellen als in Pyramidenzellen und Interneuronen vor. Weitere Studien, die regionale Veränderungen der Kaliumkanäle des Hippocampus unter chronischer Epilepsie registrierten, wurden nicht gefunden.

Im Anschluss wurde eine Alterskorrelation innerhalb der Kanäle unter chronischer Epilepsie und Kontrolltier untersucht. Eine signifikante Alterskorrelation besteht innerhalb aller Regionen bei den Kaliumkanälen Kir6.1 und Kir6.2 unter chronischer Epilepsie,

innerhalb aller Regionen bei den Kaliumkanälen KCNQ2 von Kontrolltieren und bei den Kaliumkanälen KCNQ2 unter chronischer Epilepsie im Gyrus dentatus Stratum granulosum und moleculare. Entsprechende Vordaten zur Alterskorrelation sind bei Kir6.1 und Kir6.2 nicht bekannt. Die Zunahme des KCNQ2-Kanals unter chronischer Epilepsie kann eine mögliche Ursache für die Altersspezifität der Neugeborenenepilepsie darstellen.

VI. Thesen

1. Die mesiale Temporallappenepilepsie ist eines der häufigsten Epilepsiesyn-
drome.
2. Bis heute sind noch nicht alle funktionellen Veränderungen, die zu einer mesi-
alen Temporallappenepilepsie führen können, geklärt.
3. Mithilfe des Pilocarpin-Modells können Symptome und Folgen der chronischen
Epilepsie dargestellt werden. Sie erleichtern das Verständnis der Pathogenese
von mesialer Temporallappenepilepsie.
4. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikante Herunterregulation der
Proteinexpression bei Kir6.1, Kir6.2 und KCNQ2 Kanälen unter chronischer Epi-
lepsie.
5. Der KCNQ2-Kanal zeigt signifikante Unterschiede innerhalb der untersuchten
Regionen unter chronischer Epilepsie. Festzustellen ist eine signifikant höhere
Konzentration an KCNQ2-Kanalproteinen im Gyrus dentatus Stratum molecu-
lare, im Stratum oriens, im Cornu Ammonis 1 und im Cornu Ammonis 3 im Ver-
gleich zum Gyrus dentatus Stratum granulosum.
6. Durch eine Herunterregulation kann ein verminderter Kaliumausstrom und so-
mit eine geringe Hyperpolarisation der Zelle vermutet werden. Daraus folgt eine
leichte Depolarisation der Zellen und damit eine erhöhte Erregbarkeit mit stei-
gender Anfallsbereitschaft.
7. Mit zunehmenden Alter sinkt die Konzentration an Kir6.1- und Kir6.2-Kanälen
in allen untersuchten Regionen signifikant.
8. Entsprechende Vordaten zur Alterskorrelation sind bei Kir6.1 und Kir6.2 nicht
bekannt.
9. Mit zunehmenden Alter steigt die Konzentration an KCNQ2-Kanälen im Gyrus
dentatus Stratum granulosum und im Gyrus dentatus Stratum moleculare sig-
nifikant.
10. Die Zunahme des KCNQ2-Kanals unter chronischer Epilepsie kann eine mög-
liche Ursache für die Altersspezifität der Neugeborenenepilepsie darstellen.

VII. Literaturverzeichnis

- Aguilar-Bryan, L.; Clement, J. P.; Gonzalez, G.; Kunjilwar, K.; Babenko, A.; Bryan, J. (1998): Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. In: *Physiological reviews* 78 (1), S. 227–245. DOI: 10.1152/physrev.1998.78.1.227.
- Ashcroft, F. M.; Kakei, M. (1989): ATP-sensitive K⁺ channels in rat pancreatic beta-cells: modulation by ATP and Mg²⁺ ions. In: *The Journal of physiology* 416, S. 349–367. DOI: 10.1113/jphysiol.1989.sp017765.
- Ashfield, R.; Gribble, F. M.; Ashcroft, S. J.; Ashcroft, F. M. (1999): Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K(ATP) channel. In: *Diabetes* 48 (6), S. 1341–1347. DOI: 10.2337/diabetes.48.6.1341.
- Ashford, M. L.; Boden, P. R.; Treherne, J. M. (1990): Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 415 (4), S. 479–483. DOI: 10.1007/BF00373626.
- BEAUMANOIR, A.; NAHORY, A. (1983): Les epilepsies benignes partielles: 11 cas d'epilepsie partielle frontale a evolution favorable. In: *Revue d'Electroencéphalographie et de Neurophysiologie Clinique* 13 (3), S. 207–211. DOI: 10.1016/s0370-4475(83)80029-x.
- Beech, D. J.; Zhang, H.; Nakao, K.; Bolton, T. B. (1993): K channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. In: *British journal of pharmacology* 110 (2), S. 573–582. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb13849.x.
- Bender, Roland A.; Baram, Tallie Z. (2008): Hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated (HCN) channels in developing neuronal networks. In: *Progress in neurobiology* 86 (3), S. 129–140. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2008.09.007.
- Benndorf, K.; Friedrich, M.; Hirche, H. (1991): Anoxia opens ATP regulated K channels in isolated heart cells of the guinea pig. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 419 (1), S. 108–110. DOI: 10.1007/BF00373754.
- Berkovic, S. F.; McIntosh, A.; Howell, R. A.; Mitchell, A.; Sheffield, L. J.; Hopper, J. L. (1996): Familial temporal lobe epilepsy: a common disorder identified in twins. In: *Annals of neurology* 40 (2), S. 227–235. DOI: 10.1002/ana.410400214.
- Biervert, C.; Schroeder, B. C.; Kubisch, C.; Berkovic, S. F.; Propping, P.; Jentsch, T. J.; Steinlein, O. K. (1998): A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. In: *Science (New York, N. Y.)* 279 (5349), S. 403–406. DOI: 10.1126/science.279.5349.403.
- Briggs, Stephen W.; Galanopoulou, Aristeia S. (2011): Altered GABA signaling in early life epilepsies. In: *Neural plasticity* 2011, S. 527605. DOI: 10.1155/2011/527605.
- Clifford, D. B.; Olney, J. W.; Maniotis, A.; Collins, R. C.; Zorumski, C. F. (1987): The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. In: *Neuroscience* 23 (3), S. 953–968. DOI: 10.1016/0306-4522(87)90171-0.
- Coetzee, W. A.; Amarillo, Y.; Chiu, J.; Chow, A.; Lau, D.; McCormack, T. et al. (1999): Molecular diversity of K⁺ channels. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 868, S. 233–285. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb11293.x.
- Cooper, Edward C.; Harrington, Emily; Jan, Yuh Nung; Jan, Lily Y. (2001): M Channel KCNQ2 Subunits Are Localized to Key Sites for Control of Neuronal Network Oscillations and Synchronization in Mouse Brain. In: *J. Neurosci.* 21 (24), S. 9529–9540. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-24-09529.2001.
-

- Crompton, Douglas E.; Scheffer, Ingrid E.; Taylor, Isabella; Cook, Mark J.; McKelvie, Penelope A.; Vears, Danya F. et al. (2010): Familial mesial temporal lobe epilepsy: a benign epilepsy syndrome showing complex inheritance. In: *Brain : a journal of neurology* 133 (11), S. 3221–3231. DOI: 10.1093/brain/awq251.
- Curia, Giulia; Longo, Daniela; Biagini, Giuseppe; Jones, Roland S. G.; Avoli, Massimo (2008): The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. In: *Journal of neuroscience methods* 172 (2), S. 143–157. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2008.04.019.
- Daniluk, Jerzy; Cooper, James A.; Stender, Monika; Kowalczyk, Anna (2016): Survey of Physicians' Understanding of Specific Risks Associated with Retigabine. In: *Drugs - real world outcomes* 3 (2), S. 155–163. DOI: 10.1007/s40801-016-0068-3.
- Dunne, Mark J.; Petersen, Ole H. (1986): Intracellular ADP activates K⁺ channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. In: *FEBS Letters* 208 (1), S. 59–62. DOI: 10.1016/0014-5793(86)81532-0.
- Dunn-Meynell, Ambrose A.; Rawson, Nancy E.; Levin, Barry E. (1998): Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K⁺ channel in rat brain. In: *Brain Research* 814 (1-2), S. 41–54. DOI: 10.1016/s0006-8993(98)00956-1.
- Edwards, G.; Weston, A. H. (1990): Potassium channel openers and vascular smooth muscle relaxation. In: *Pharmacology & Therapeutics* 48 (2), S. 237–258. DOI: 10.1016/0163-7258(90)90082-d.
- Findlay, I. (1988a): ATP⁴⁻ and ATP.Mg inhibit the ATP-sensitive K⁺ channel of rat ventricular myocytes. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 412 (1-2), S. 37–41. DOI: 10.1007/BF00583729.
- Findlay, I. (1988b): Effects of ADP upon the ATP-sensitive K⁺ channel in rat ventricular myocytes. In: *The Journal of membrane biology* 101 (1), S. 83–92. DOI: 10.1007/BF01872823.
- Fisher, Robert S.; Acevedo, Carlos; Arzimanoglou, Alexis; Bogacz, Alicia; Cross, J. Helen; Elger, Christian E. et al. (2014): ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. In: *Epilepsia* 55 (4), S. 475–482. DOI: 10.1111/epi.12550.
- Fisher, Robert S.; Cross, J. Helen; D'Souza, Carol; French, Jacqueline A.; Haut, Sheryl R.; Higurashi, Norimichi et al. (2017): Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. In: *Epilepsia* 58 (4), S. 531–542. DOI: 10.1111/epi.13671.
- Flanagan, S. E.; Edghill, E. L.; Gloyn, A. L.; Ellard, S.; Hattersley, A. T. (2006): Mutations in KCNJ11, which encodes Kir6.2, are a common cause of diabetes diagnosed in the first 6 months of life, with the phenotype determined by genotype. In: *Diabetologia* 49 (6), S. 1190–1197. DOI: 10.1007/s00125-006-0246-z.
- Franco, Elisa de; Flanagan, Sarah E.; Houghton, Jayne A. L.; Allen, Hana Lango; Mackay, Deborah J. G.; Temple, I. Karen et al. (2015): The effect of early, comprehensive genomic testing on clinical care in neonatal diabetes: an international cohort study. In: *The Lancet* 386 (9997), S. 957–963. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60098-8.
- Galanopoulou, Aristeia S. (2008): Sexually dimorphic expression of KCC2 and GABA function. In: *Epilepsy Research* 80 (2-3), S. 99–113. DOI: 10.1016/j.epilepsyres.2008.04.013.
- Galanopoulou, Aristeia S. (2010): Mutations affecting GABAergic signaling in seizures and epilepsy. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 460 (2), S. 505–523. DOI: 10.1007/s00424-010-0816-2.
-

- Giulia Curia (2008): The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. Unter Mitarbeit von Giulia Curia, Daniela Longo, Giuseppe Biagini, Roland S.G. Jones, Massimo Avolia. Hg. v. J Neurosci Methods.
- Glass, Hannah C.; Shellhaas, Renée A.; Wusthoff, Courtney J.; Chang, Taeun; Abend, Nicholas S.; Chu, Catherine J. et al. (2016): Contemporary Profile of Seizures in Neonates: A Prospective Cohort Study. In: *The Journal of pediatrics* 174, 98-103.e1. DOI: 10.1016/j.jpeds.2016.03.035.
- Gloyn, Anna L.; Pearson, Ewan R.; Antcliff, Jennifer F.; Proks, Peter; Bruining, G. Jan; Slingerland, Annabelle S. et al. (2004): Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. In: *The New England journal of medicine* 350 (18), S. 1838–1849. DOI: 10.1056/NEJMoa032922.
- Goldstein, S. A.; Bockenhauer, D.; O'Kelly, I.; Zilberberg, N. (2001): Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. In: *Nature reviews. Neuroscience* 2 (3), S. 175–184. DOI: 10.1038/35058574.
- Goldstein, Steve A. N.; Bayliss, Douglas A.; Kim, Donghee; Lesage, Florian; Plant, Leigh Daniel; Rajan, Sindhu (2005): International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. In: *Pharmacological reviews* 57 (4), S. 527–540. DOI: 10.1124/pr.57.4.12.
- Gribble, F. M.; Reimann, F. (2003): Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. In: *Diabetologia* 46 (7), S. 875–891. DOI: 10.1007/s00125-003-1143-3.
- Grigorov, Alexej; Moskalyuk, Anastasia; Kravchenko, Mykola; Veselovsky, Nikolai; Verkhatsky, Alexei; Fedulova, Svetlana (2014): Kv7 potassium channel subunits and M currents in cultured hippocampal interneurons. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 466 (9), S. 1747–1758. DOI: 10.1007/s00424-013-1406-x.
- Grunnet, Morten; Strøbæk, Dorte; Hougaard, Charlotte; Christophersen, Palle (2014): Kv7 channels as targets for anti-epileptic and psychiatric drug-development. In: *European journal of pharmacology* 726, S. 133–137. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.01.017.
- Guéguinou, Maxime; Chantôme, Aurélie; Fromont, Gaëlle; Bougnoux, Philippe; Vandier, Christophe; Potier-Cartereau, Marie (2014): KCa and Ca(2+) channels: the complex thought. In: *Biochimica et biophysica acta* 1843 (10), S. 2322–2333. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.02.019.
- Gutman, George A.; Chandy, K. George; Adelman, John P.; Aiyar, Jayashree; Bayliss, Douglas A.; Clapham, David E. et al. (2003): International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. In: *Pharmacological reviews* 55 (4), S. 583–586. DOI: 10.1124/pr.55.4.9.
- Hantschke, Markus; Palmedo, Gabriele: Immunhistologische Techniken. Hg. v. Springer Medizin. Online verfügbar unter https://www.springermedizin.de/emedpedia/histopathologie-derhaut/immunhistologische-techniken?epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-44367-5_2, zuletzt geprüft am 02.11.2021.
- Henze, Darrell A.; Wittner, Lucia; Buzsáki, György (2002): Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. In: *Nature neuroscience* 5 (8), S. 790–795. DOI: 10.1038/nn887.
- Hibino, Hiroshi; Inanobe, Atsushi; Furutani, Kazuharu; Murakami, Shingo; Findlay, Ian; Kurachi, Yoshihisa (2010): Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function,

and physiological roles. In: *Physiological reviews* 90 (1), S. 291–366. DOI: 10.1152/physrev.00021.2009.

Jentsch, T. J. (2000): Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. In: *Nature reviews. Neuroscience* 1 (1), S. 21–30. DOI: 10.1038/35036198.

Kaczmarek, Leonard K.; Aldrich, Richard W.; Chandy, K. George; Grissmer, Stephan; Wei, Aguan D.; Wulff, Heike (2017): International Union of Basic and Clinical Pharmacology. C. Nomenclature and Properties of Calcium-Activated and Sodium-Activated Potassium Channels. In: *Pharmacological reviews* 69 (1), S. 1–11. DOI: 10.1124/pr.116.012864.

Karschin, Christine; Ecke, Claudia; Ashcroft, Frances M.; Karschin, Andreas (1997): Overlapping distribution of K ATP channel-forming Kir6.2 subunit and the sulfonylurea receptor SUR1 in rodent brain. In: *FEBS Letters* 401 (1), S. 59–64. DOI: 10.1016/s0014-5793(96)01438-x.

Katsarou, Anna-Maria; Galanopoulou, Aristeia S.; Moshé, Solomon L. (2018): Epileptogenesis in neonatal brain. In: *Seminars in fetal & neonatal medicine* 23 (3), S. 159–167. DOI: 10.1016/j.siny.2017.12.004.

Keele, N. B.; Zinebi, F.; Neugebauer, V.; Shinnick-Gallagher, P. (2000): Epileptogenesis up-regulates metabotropic glutamate receptor activation of sodium-calcium exchange current in the amygdala. In: *Journal of neurophysiology* 83 (4), S. 2458–2462. DOI: 10.1152/jn.2000.83.4.2458.

Kim, Dorothy M.; Nimigean, Crina M. (2016): Voltage-Gated Potassium Channels: A Structural Examination of Selectivity and Gating. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8 (5). DOI: 10.1101/cshperspect.a029231.

Köhling, Rüdiger; Wolfart, Jakob (2016): Potassium Channels in Epilepsy. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6 (5). DOI: 10.1101/cshperspect.a022871.

Kubo, Yoshihiro; Adelman, John P.; Clapham, David E.; Jan, Lily Y.; Karschin, Andreas; Kurachi, Yoshihisa et al. (2005): International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. In: *Pharmacological reviews* 57 (4), S. 509–526. DOI: 10.1124/pr.57.4.11.

Lang, Florian; Föllner, Michael; Lang, Karl; Lang, Philipp; Ritter, Markus; Vereninov, Alexey et al. (2007): Cell Volume Regulatory Ion Channels in Cell Proliferation and Cell Death. In: *Osmosensing and Osmosignaling*, Bd. 428: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 209–225.

Lang, Gudrun (2013): *Histotechnik*. Vienna: Springer Vienna.

Leite, J. P.; Bortolotto, Z. A.; Cavalheiro, E. A. (1990): Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. In: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 14 (4), S. 511–517. DOI: 10.1016/s0149-7634(05)80076-4.

Leppert, M.; Anderson, V. E.; Quattlebaum, T.; Stauffer, D.; O'Connell, P.; Nakamura, Y. et al. (1989): Benign familial neonatal convulsions linked to genetic markers on chromosome 20. In: *Nature* 337 (6208), S. 647–648. DOI: 10.1038/337647a0.

Madsen, Karsten K.; White, H. Steve; Schousboe, Arne (2010): Neuronal and non-neuronal GABA transporters as targets for antiepileptic drugs. In: *Pharmacology & Therapeutics* 125 (3), S. 394–401. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2009.11.007.

Maslarova, Anna; Salar, Seda; Lapolover, Ezequiel; Friedman, Alon; Veh, Rüdiger W.; Heinemann, Uwe (2013): Increased susceptibility to acetylcholine in the entorhinal cortex of pilocarpine-treated rats involves alterations in KCNQ channels. In: *Neurobiology of disease* 56, S. 14–24. DOI: 10.1016/j.nbd.2013.02.016.

- Miceli, Francesco; Soldovieri, Maria Virginia; Ambrosino, Paolo; Maria, Michela de; Migliore, Michele; Migliore, Rosanna; Tagliatela, Maurizio (2015): Early-onset epileptic encephalopathy caused by gain-of-function mutations in the voltage sensor of Kv7.2 and Kv7.3 potassium channel subunits. In: *J. Neurosci.* 35 (9), S. 3782–3793. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4423-14.2015.
- Mulkey, Sarah B.; Ben-Zeev, Bruria; Nicolai, Joost; Carroll, John L.; Grønborg, Sabine; Ji-ang, Yong-Hui et al. (2017): Neonatal nonepileptic myoclonus is a prominent clinical feature of KCNQ2 gain-of-function variants R201C and R201H. In: *Epilepsia* 58 (3), S. 436–445. DOI: 10.1111/epi.13676.
- Munro, Gordon; Dalby-Brown, William (2007): Kv7 (KCNQ) channel modulators and neuropathic pain. In: *Journal of medicinal chemistry* 50 (11), S. 2576–2582. DOI: 10.1021/jm060989l.
- Nagao, T.; Alonso, A.; Avoli, M. (1996): Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. In: *Neuroscience* 72 (2), S. 399–408. DOI: 10.1016/0306-4522(95)00534-x.
- Nelson, M. T.; Quayle, J. M. (1995): Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. In: *The American journal of physiology* 268 (4 Pt 1), C799–822. DOI: 10.1152/ajpcell.1995.268.4.C799.
- Niday, Zachary; Tzingounis, Anastasios V. (2018): Potassium Channel Gain of Function in Epilepsy: An Unresolved Paradox. In: *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 24 (4), S. 368–380. DOI: 10.1177/1073858418763752.
- Noma, A. (1983): ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. In: *Nature* 305 (5930), S. 147–148. DOI: 10.1038/305147a0.
- Patlak, Margie (2002): New weapons to combat an ancient disease: treating diabetes. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (14), S. 1853.
- Pipatpolkai, Tanadet; Usher, Samuel; Stansfeld, Phillip J.; Ashcroft, Frances M. (2020): New insights into KATP channel gene mutations and neonatal diabetes mellitus. In: *Nature reviews. Endocrinology* 16 (7), S. 378–393. DOI: 10.1038/s41574-020-0351-y.
- Pisani, Francesco; Percesepe, Antonio; Spagnoli, Carlotta (2018): Genetic diagnosis in neonatal-onset epilepsies: Back to the future. In: *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society* 22 (3), S. 354–357. DOI: 10.1016/j.ejpn.2018.02.006.
- Priel, M. R.; Albuquerque, E. X. (2002): Short-term effects of pilocarpine on rat hippocampal neurons in culture. In: *Epilepsia* 43 Suppl 5, S. 40–46. DOI: 10.1046/j.1528-1157.43.s.5.18.x.
- Rettig, J.; Wunder, F.; Stocker, M.; Lichtinghagen, R.; Mastiaux, F.; Beckh, S. et al. (1992): Characterization of a Shaw-related potassium channel family in rat brain. In: *The EMBO Journal* 11 (7), S. 2473–2486.
- Ronen, G. M.; Rosales, T. O.; Connolly, M.; Anderson, V. E.; Leppert, M. (1993): Seizure characteristics in chromosome 20 benign familial neonatal convulsions. In: *Neurology* 43 (7), S. 1355–1360. DOI: 10.1212/wnl.43.7.1355.
- Rostock, Angelika; Tober, Christine; Rundfeldt, Chris; Bartsch, Reni; Engel, Jürgen; Polymeropoulos, Emanuele E. et al. (1996): D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures. In: *Epilepsy Research* 23 (3), S. 211–223. DOI: 10.1016/0920-1211(95)00101-8.
-

- Rowley, Nicole M.; Madsen, Karsten K.; Schousboe, Arne; Steve White, H. (2012): Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. In: *Neurochemistry international* 61 (4), S. 546–558. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.02.013.
- Ruiz, Nicole; Pacheco, Luis F.; Farrell, Bianca; Cox, Cody B.; Ermolinsky, Boris S.; Garrido-Sanabria, Emilio R.; Nair, Saraswathy (2011): Metabolic gene expression changes in the hippocampus of obese epileptic male rats in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. In: *Brain Research* 1426, S. 86–95. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.10.006.
- Sakmann, B.; Trube, G. (1984): Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. In: *The Journal of physiology* 347, S. 641–657. DOI: 10.1113/jphysiol.1984.sp015088.
- Scheffer, Ingrid E.; Berkovic, Samuel; Capovilla, Giuseppe; Connolly, Mary B.; French, Jacqueline; Guilhoto, Laura et al. (2017): ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. In: *Epilepsia* 58 (4), S. 512–521. DOI: 10.1111/epi.13709.
- Schroeder, B. C.; Kubisch, C.; Stein, V.; Jentsch, T. J. (1998): Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. In: *Nature* 396 (6712), S. 687–690. DOI: 10.1038/25367.
- Schwartzkroin, P. A. (1986): Hippocampal slices in experimental and human epilepsy. In: *Advances in neurology* 44, S. 991–1010.
- Serrano-Castro, P. J.; Sánchez-Alvarez, J. C.; García-Gómez, T. (1998): Esclerosis temporal mesial (II): manifestaciones clínicas y estudios complementarios. In: *Revista de neurología* 26 (152), S. 592–597.
- Shafaroodi, Hamed; Barati, Saghar; Ghasemi, Mehdi; Almasirad, Ali; Moezi, Leila (2016): A role for ATP-sensitive potassium channels in the anticonvulsant effects of triamterene in mice. In: *Epilepsy Research* 121, S. 8–13. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2016.01.003.
- Shellhaas, Renée A. (2019): Seizure classification, etiology, and management. In: *Handbook of clinical neurology* 162, S. 347–361. DOI: 10.1016/B978-0-444-64029-1.00017-5.
- Singh, N.; Charlier, C.; Peiffer, A.; Stauffer, D.; Melis, R.; Enoch, M. A. et al. (1999): Genes for rare idiopathic generalized epilepsies: BFNC. In: *Advances in neurology* 79, S. 341–350.
- Slingerland, Annabelle S.; Hattersley, Andrew T. (2005): Mutations in the Kir6.2 subunit of the KATP channel and permanent neonatal diabetes: new insights and new treatment. In: *Annals of medicine* 37 (3), S. 186–195. DOI: 10.1080/07853890510007287.
- Spoto, Giulia; Saia, Maria Concetta; Amore, Greta; Gitto, Eloisa; Loddo, Giuseppe; Mainieri, Greta et al. (2021): Neonatal Seizures: An Overview of Genetic Causes and Treatment Options. In: *Brain sciences* 11 (10). DOI: 10.3390/brainsci11101295.
- Su, Hailing; Sochivko, Dmitry; Becker, Albert; Chen, Jian; Jiang, Yanwen; Yaari, Yoel; Beck, Heinz (2002): Upregulation of a T-Type Ca²⁺ Channel Causes a Long-Lasting Modification of Neuronal Firing Mode after Status Epilepticus. In: *J. Neurosci.* 22 (9), S. 3645–3655. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-09-03645.2002.
- Sveinbjornsdottir, S.; Duncan, J. S. (1993): Parietal and occipital lobe epilepsy: a review. In: *Epilepsia* 34 (3), S. 493–521. DOI: 10.1111/j.1528-1157.1993.tb02590.x.
- Tanner, Geoffrey R.; Lutas, Andrew; Martínez-François, Juan Ramón; Yellen, Gary (2011): Single K ATP channel opening in response to action potential firing in mouse dentate granule neurons. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (23), S. 8689–8696. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5951-10.2011.
-

- Tatum, William O. (2012): Mesial temporal lobe epilepsy. In: *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society* 29 (5), S. 356–365. DOI: 10.1097/WNP.0b013e31826b3ab7.
- Terzic, Andre; Tung, Robert T.; Inanobe, Atsushi; Katada, Toshiaki; Kurachi, Yoshihisa (1994): G proteins activate ATP-sensitive K⁺ channels by antagonizing ATP-dependent gating. In: *Neuron* 12 (4), S. 885–893. DOI: 10.1016/0896-6273(94)90340-9.
- Thom, M.; Martinian, L.; Catarino, C.; Yogarajah, M.; Koepp, M. J.; Caboclo, L.; Sisodiya, S. M. (2009): Bilateral reorganization of the dentate gyrus in hippocampal sclerosis: a postmortem study. In: *Neurology* 73 (13), S. 1033–1040. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181b99a07.
- Trepel, Martin (2017): Neuroanatomie. Struktur und Funktion. 7. Auflage. München: Elsevier.
- Turski, Waldemar A.; Cavalheiro, Esper A.; Schwarz, Michael; Czuczwar, Stanisław J.; Kleinrok, Zdzisław; Turski, Lechosław (1983): Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. In: *Behavioural Brain Research* 9 (3), S. 315–335. DOI: 10.1016/0166-4328(83)90136-5.
- Vezzani, Annamaria; Fujinami, Robert S.; White, H. Steve; Preux, Pierre-Marie; Blümcke, Ingmar; Sander, Josemir W.; Löscher, Wolfgang (2016): Infections, inflammation and epilepsy. In: *Acta neuropathologica* 131 (2), S. 211–234. DOI: 10.1007/s00401-015-1481-5.
- Wang, H. S.; McKinnon, D. (1995): Potassium currents in rat prevertebral and paravertebral sympathetic neurones: control of firing properties. In: *The Journal of physiology* 485 (Pt 2), S. 319–335. DOI: 10.1113/jphysiol.1995.sp020732.
- Wang, H. S.; Pan, Z.; Shi, W.; Brown, B. S.; Wymore, R. S.; Cohen, I. S. et al. (1998): KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. In: *Science (New York, N.Y.)* 282 (5395), S. 1890–1893. DOI: 10.1126/science.282.5395.1890.
- Watanabe, H.; Nagata, E.; Kosakai, A.; Nakamura, M.; Yokoyama, M.; Tanaka, K.; Sasai, H. (2000): Disruption of the epilepsy KCNQ2 gene results in neural hyperexcitability. In: *Journal of neurochemistry* 75 (1), S. 28–33. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.0750028.x.
- Wieser, Heinz-Gregor (2004): ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. In: *Epilepsia* 45 (6), S. 695–714. DOI: 10.1111/j.0013-9580.2004.09004.x.
- Zawar, C.; Plant, T. D.; Schirra, C.; Konnerth, A.; Neumcke, B. (1999): Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. In: *The Journal of physiology* 514 (Pt 2), S. 327–341. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1999.315ae.x.
- Zhan, Ren-Zhi; Timofeeva, Olga; Nadler, J. Victor (2010): High ratio of synaptic excitation to synaptic inhibition in hilar ectopic granule cells of pilocarpine-treated rats. In: *Journal of neurophysiology* 104 (6), S. 3293–3304. DOI: 10.1152/jn.00663.2010.
- Žiburkus, Jokubas; Cressman, John R.; Schiff, Steven J. (2013): Seizures as imbalanced up states: excitatory and inhibitory conductances during seizure-like events. In: *Journal of neurophysiology* 109 (5), S. 1296–1306. DOI: 10.1152/jn.00232.2012.
- https://www.abcam.com/protocols/immunocytochemistry-immunofluorescence-protocol_gesichtet am 05.01.2022
- https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/f6057?gclid=EAlaIQobChMIg5rxsvOA9AIVTAKLCh1q4gPeEAAYASAAEgJ18fD_BwE_gesichtet am 05.01.2022
-

VIII. Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Univ. Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling und Herrn Prof. Dr. med. Timo Kirschstein für das Thema meiner Dissertation, die Bereitstellung der technischen Hilfsmittel, der umfangreichen Betreuung und für die Unterstützung.

Mein Dank geht außerdem an allen wissenschaftlichen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Oscar-Langendorff-Instituts für Physiologie. Ich danke vor allem Simone Rackow für die Einarbeitung in die Methoden und die Unterstützung beim Versuchsaufbau, der Probenherstellung und für die große Hilfsbereitschaft bei jeglichen Problemen und Fragen.

Natürlich danke ich auch meiner Familie, meinem Partner und meinen Freunde. Herzlichen Dank für die Unterstützung während dieser Zeit.

IX. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

X. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Elisabeth Anna Hendinger
geb.: 10.07.1997
Geburtsort: Plauen

Beruflicher Werdegang

02/2022 Praxis für Zahngesundheit, Leipzig

Universitärer Werdegang

2016-2021 Universität Rostock, Zahnmedizin
2020-2022 Dissertation am Oscar Langendorff Institut für
Physiologie - Universität Rostock

Schulischer Werdegang

2014-2016 Peter-Breuer-Gymnasium Zwickau
2013-2014 Lycée Jean Dautet La Rochelle, Frankreich
2008-2013 Christoph-Graupner-Gymnasium
Kirchberg
2004-2008 Grundschule Hartmannsdorf