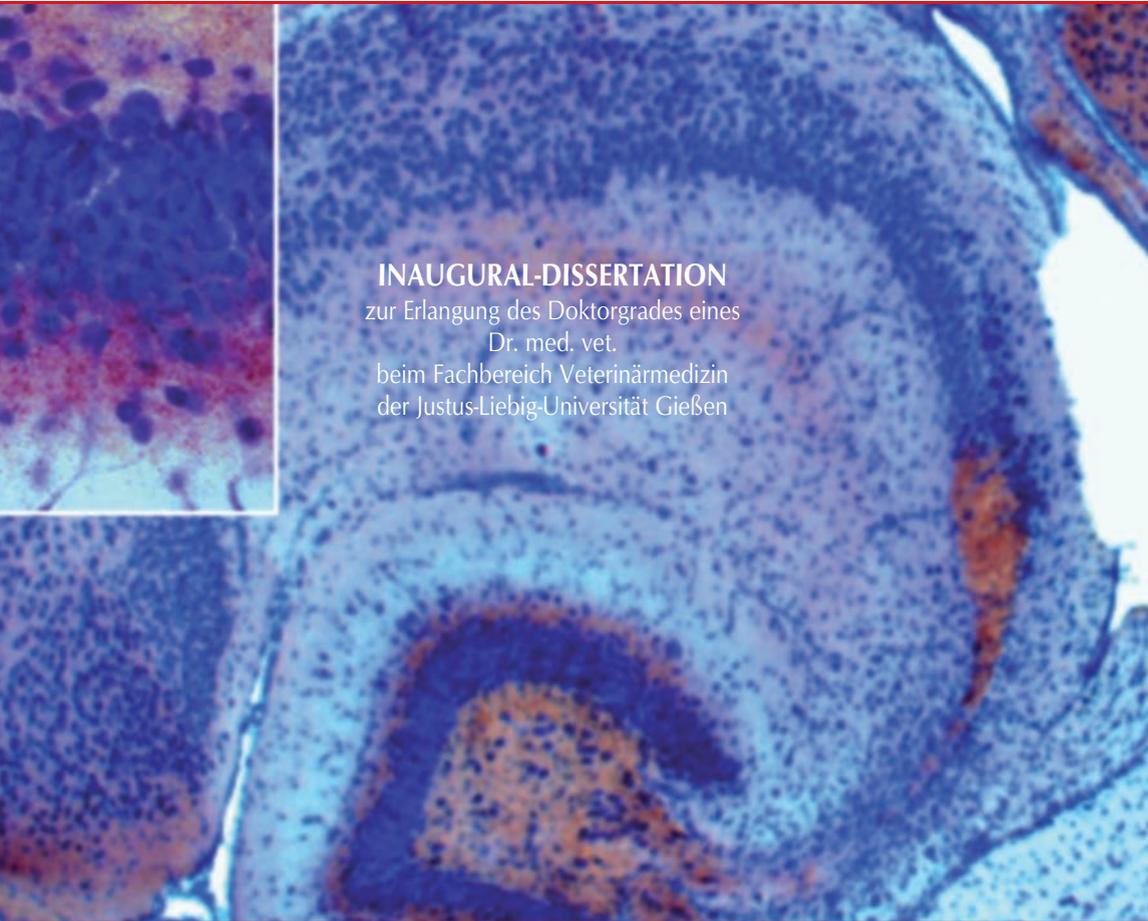


**UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONELLEN ROLLE
VERÄNDERTER EXPRESSION UND VERTEILUNG
VON IONENKANÄLEN UND NEUROTRANSMITTER-
REZEPTOREN BEI FOKALER EPILEPSIE
UNTER VERWENDUNG TRANSGENER TIERMODELLE**

JULIKA PITSCH



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
WVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

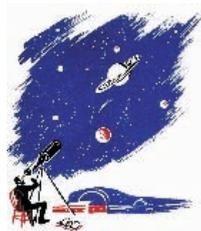
Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

und

dem Institut für Neuropathologie der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Betreuer: Prof. Dr. Albert Becker

**Untersuchungen zur funktionellen Rolle veränderter
Expression und Verteilung von Ionenkanälen und
Neurotransmitter-Rezeptoren bei fokaler Epilepsie unter
Verwendung transgener Tiermodelle**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Julika Pitsch

Tierärztin aus Dortmund

Gießen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. J. Roth
Prof. Dr. A. Becker

Tag der Disputation: 05. März 2008

Meinem Henning
Meiner Mutter und meinen Großeltern

1	EINLEITUNG	1
2	ÜBERSICHT	3
2.1	Epileptische Anfälle, Epilepsien und Status epilepticus	3
2.1.1	Epileptische Anfälle	3
2.1.2	Epilepsien	3
2.1.3	Status epilepticus	6
2.1.4	Temporallappenepilepsie	8
2.2	Hippokampus-Formation	10
2.2.1	Hippokampussklerose und TLE	12
2.3	Metabotrope Glutamatrezeptoren	14
2.4	Kalziumionenkanäle	21
2.5	Tiermodelle	26
2.5.1	Chemisch induzierte Epilepsiemodelle	28
2.5.1.1	Pilokarpin-Modell	29
2.6	Analyse spontaner Anfälle	31
3	ZIELSETZUNG	33
4	MATERIAL UND METHODIK	35
4.1	Material	35
4.1.1	Versuchstiere und Tierhaltung	35
4.1.2	Verwendete Substanzen	36
4.1.3	Stammlösungen	37
4.1.4	Material und Geräte	38
4.1.5	Bezugsfirmen	39
4.2	Methodik	40
4.2.1	Generierung der transgenen mGluR1-EGFP Mäuse	40
4.2.1.1	mGluR1-EGFP Vektor Konstruktion	40
4.2.1.2	Generierung einer mGluR1-EGFP Maus Linie	41
4.2.2	Genotypisierung	41
4.2.2.1	Extraktion genomischer DNA	41
4.2.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	42
4.2.2.3	Gelelektrophorese	44
4.2.3	Auswahl der Tiere und Versuchsdesign	44
4.2.4	Durchführung des Pilokarpin-Versuches	46
4.2.4.1	Krampfparameter	46

4.2.4.2	Induktion und Abbruch des Status epilepticus	47
4.2.5	Operationsverfahren	49
4.2.5.1	Narkose	49
4.2.5.2	Vorbereitung und Implantation	49
4.2.6	Analyse von spontan auftretenden Anfällen	51
4.2.6.1	Analyse des Status epilepticus der Cav3.2-Linie	53
4.2.6.2	EEG- und Videoaufzeichnungen während der chronischen Phase	54
4.2.6.3	Analyse der interiktalen Phase der Cav3.2-Linie	54
4.2.7	Gewebepräparation	54
4.2.7.1	Präparationen von Mäusegehirnen	54
4.2.7.2	Einfrieren von Gehirnpräparaten	55
4.2.7.3	Anfertigung horizontaler Gehirnschnitte für Timm-Färbung und Mikrodissektion	55
4.2.8	Histologische Methoden	56
4.2.8.1	Anfertigen von Präparatdünnchnitten	56
4.2.8.2	Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung	56
4.2.8.3	Immunhistochemie	56
4.2.8.4	Timm-Färbung	58
4.2.8.5	Histologische Analyse	59
4.2.9	Extraktion von RNA aus Gehirngewebe	60
4.2.9.1	Extraktion von mRNA	60
4.2.9.2	Reverse Transkription (cDNA Synthese)	61
4.2.9.3	Real Time-PCR	61
4.2.9.4	Auswertung der Real Time-PCR	63
4.2.10	Statistik	64
5	ERGEBNISSE	65
5.1	Generierung und Charakterisierung transgener mGluR1-EGFP Mäuse.....	65
5.2	EEG- und Video-Aufzeichnungen	68
5.2.1	Aufzeichnung normaler Verhaltensweisen.....	68
5.2.2	Aufzeichnung epileptischer Anfälle.....	70
5.3	Induktion des Status epilepticus.....	76
5.3.1	mGluR transgene Mäuse	77
5.3.1.1	Parameter im Pilocarpin-Modell	77
5.3.1.2	Status epilepticus	83
5.3.1.3	Allgemeinbefinden nach Status epilepticus	86
5.3.2	Cav3.2-KO-Mäuse	86
5.3.2.1	Parameter im Pilocarpin-Modell	86
5.3.2.2	Status epilepticus	91

5.3.2.3	Allgemeinbefinden nach Status epilepticus	95
5.3.2.4	Analyse des Status epilepticus.....	95
5.4	Chronische Neurodegeneration und spontane Anfälle	98
5.4.1	mGluR transgene Mäuse	98
5.4.1.1	Spontan auftretende Anfälle	98
5.4.1.2	Neuronaler Zellverlust	101
5.4.2	Cav3.2-KO-Mäuse	106
5.4.2.1	Spontan auftretende Anfälle	106
5.4.2.2	Neuronaler Zellverlust	108
5.4.2.3	Analyse der interiktalen Phase	112
5.5	Akute Neurodegeneration bei Cav3.2 transgenen Mäusen	114
5.6	Expressionsmuster verwandter Gene in Cav3.2-KO-Mäusen	118
6	DISKUSSION.....	124
6.1	Einleitung.....	124
6.2	Methodenkritik.....	125
6.2.1	Mausmodelle.....	125
6.2.2	EEG-und Videoanalyse	126
6.2.2.1	Analyse der EEG-Grundaktivität.....	128
6.2.2.2	Analyse epileptischer Anfälle.....	129
6.2.3	Pilokarpin-Modell.....	129
6.3	Einfluss von Neurotransmitter-Rezeptoren und Ionenkanälen auf die Temporallappenepilepsie	131
6.3.1	Die Rolle von mGluR1	131
6.3.1.1	mGluR1-EGFP-Maus	132
6.3.1.2	Status epilepticus	133
6.3.1.3	Spontane Anfälle und chronische Neurodegeneration.....	135
6.3.2	Rolle von mGluR4	139
6.3.2.1	mGluR4-KO-Maus.....	140
6.3.2.2	Status epilepticus	140
6.3.2.3	Spontane Anfälle und chronische Neurodegeneration.....	142
6.3.3	Rolle von Cav3.2.....	145
6.3.3.1	Cav3.2-KO-Maus	146
6.3.3.2	Status epilepticus.....	147
6.3.3.3	Analyse des Status epilepticus.....	147
6.3.3.4	Akute Neurodegeneration bei Cav3.2 transgenen Mäusen	148
6.3.3.5	Spontane Anfälle und chronische Neurodegeneration.....	148
6.3.3.6	Analyse der interiktalen Phase	149

6.3.3.7	Expressionsmuster verwandter Gene in Cav3.2-KO-Mäusen.....	149
6.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	151
7	ZUSAMMENFASSUNG	153
8	SUMMARY	155
9	ABKÜRZUNGEN.....	156
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	157
11	ANHANG	176
11.1	Publikationen	176
11.2	Danksagung	177
11.3	Erklärung	178

1 EINLEITUNG

Epilepsien sind häufige neurologische Erkrankungen. Insbesondere die fokalen Epilepsien, bei denen die Anfälle in einer umschriebenen Region des Gehirns entstehen, stellen eine klinisch und wissenschaftlich große Herausforderung dar. Bei den fokalen Epilepsien weist vielfach die sogenannte Hippokampus-Formation innerhalb des Schläfenlappens (Temporallappenepilepsie, TLE) pathologische Veränderungen auf. Häufig sind junge Menschen betroffen, bei welchen nach kindlichen Fieberkrämpfen oder einem einmaligen Status epilepticus (SE), sowie einer darauf folgenden jahrelangen anfallsfreien Latenz- oder Epileptogenese-phase, chronisch wiederkehrende epileptische Anfälle auftreten. Zahlreiche Patienten entwickeln im Laufe der Erkrankung eine Pharmakoresistenz, so dass sich epileptische Anfälle durch eine medikamentöse Therapie nur unzureichend beherrschen lassen. Diesen pharmakoresistenten Patienten bietet die neurochirurgische Entfernung des epileptogenen Herdes eine Therapieoption, die zumeist zu einer erfolgreichen Anfallskontrolle führt. Die dort gewonnenen bioptischen Präparate erlauben einen einzigartigen Zugang zu humanem Gehirngewebe, welches für neuropathologische, molekulare und elektrophysiologische Untersuchungen zur Verfügung steht. Neuropathologisch findet man ein charakteristisches Schädigungsmuster, welches unter dem Begriff der Ammonshornsklerose (AHS) zusammengefasst wird. Diese beinhaltet zelluläre und strukturelle Phänomene der Reorganisation in der Hippokampus-Formation und resultiert in eine Imbalance zwischen Hemmung und Erregung der entsprechenden Nervenzellpopulationen. Als wesentliche pathologische Veränderungen auf zellulärer Ebene haben sich innerhalb der Hippokampi mit AHS aberrierende Expressions- und Verteilungsmuster verschiedener Neurotransmitter-Rezeptoren und Ionenkanälen gezeigt, wobei insbesondere distinkte Kalziumionenkanäle und metabotrope Glutamatrezeptoren von einer funktionellen Relevanz sind. Chirurgisch gewonnene humane Hippokampus-Präparate von Patienten mit pharmakoresistenter TLE spiegeln naturgemäß ein Spätstadium der Erkrankung mit multiplen Sekundärphänomenen wider, welche von pathogenetisch relevanten Veränderungen zu unterscheiden sind. Humane Hippokampus-Präparate, die frühen Entwicklungsstadien der TLE entstammen, sind aus offensichtlichen Gründen nicht verfügbar. Daher erlauben Tiermodelle für

TLE einen Einblick in dieses pathogenetisch hochrelevante Epileptogenesestadium. Über die Verwendung transgener Mausmodelle bietet sich eine weitere Option, die funktionelle Bedeutung einzelner Ionenkanäle und Neurotransmitter-Rezeptoren für die TLE detailliert zu untersuchen. Entsprechende Ansätze erforderten die Entwicklung neuartiger Analysemethoden, welche in dieser Arbeit zur Anwendung kamen. Im Folgenden seien die klinischen, molekularpathologischen und tierexperimentellen Grundlagen dieser Ansätze dargestellt.

2 ÜBERSICHT

2.1 Epileptische Anfälle, Epilepsien und Status epilepticus

2.1.1 Epileptische Anfälle

Epileptische Anfälle stellen die klinische Manifestation einer abnormen und exzessiven Entladung von Neuronenverbänden im Gehirn dar. Sie haben ein sehr vielfältiges klinisches Erscheinungsbild mit den gemeinsamen Merkmalen: plötzliches Auftreten und eine zeitliche Begrenzung auf Sekunden bis Minuten (ILAE, 1989). Das Entstehen solcher abnormen Entladungsmuster kann durch erworbene pathologische Veränderungen oder genetische Faktoren bedingt sein, die zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Einflüssen auf die Neurone geführt haben. Im epileptischen Anfall können neben Bewusstseinsänderungen motorische, sensorische, autonome oder psychische Symptome auftreten. Bleibt die epileptische Aktivität auf eine Region des Gehirnes, einen sogenannten epileptischen Fokus begrenzt, werden die Anfälle als fokal bezeichnet. Klinisch äußert sich diese Art von Anfällen als unwillkürliche Bewegung einzelner Muskelgruppen. Kommen zu einem solchen Anfall Bewusstseinsstörungen hinzu, spricht man von einem komplex-fokalen Anfall. Dehnen sich die epileptogenen Entladungen über den Fokus hinaus auf das gesamte Gehirn aus, so wird dies als sekundäre Generalisierung bezeichnet. Für primär generalisierte Anfälle ist die von Beginn an diffuse Ausprägung der epileptischen Aktivität über beide Großhirnhemisphären kennzeichnend.

2.1.2 Epilepsien

Epilepsien und epileptische Syndrome, die durch das wiederholte Auftreten mindestens zweier spontaner Krampfanfälle gekennzeichnet sind, zählen zu den häufigsten Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie werden nach verschiedenen Ausprägungsformen im klinischen und elektroenzephalografischen Bild und nach ihrer Ätiologie eingeteilt. Die Internationale Liga gegen Epilepsie (ILAE) veröffentlichte hierzu 1989 einen Vorschlag zur Klassifizierung von Epilepsien und epileptischen Syndromen (ILAE, 1989). In dieser Klassifikation werden Epilepsien in lokalisationsbezogene und generalisierte Formen unterteilt. In jeder Gruppe wird weiterhin zwischen symptomatischen, idiopathischen und

kryptogenen Epilepsien differenziert. Neben fokalen und generalisierten Epilepsien kommen noch unklassifizierbare Epilepsien und spezielle Syndrome vor.

Bei nur etwa 25% aller Epilepsien kann eine Ursache in Form einer Erkrankung oder Läsion des Gehirnes festgestellt werden. Diese sind demnach symptomatisch, wobei offene Kopfverletzungen, Schlaganfälle, Schädel-Hirn-Traumen, degenerative Gehirnerkrankungen, Infektionen des ZNS und postnatale Komplikationen die häufigsten Auslöser sind (Hauser *et al.*, 1993; Herman, 2002). Mit zunehmender Schwere der Kopfverletzung steigt das Risiko, Monate oder Jahre nach dem Insult eine Epilepsie zu entwickeln (Annegers *et al.*, 1980). Als ein weiterer Epilepsie auslösender Faktor kommt auch epileptische Anfallsaktivität in Form eines Status epilepticus (SE) in Frage (s. S. 6). Auch einzelne, während der Kindheit vorkommende epileptische Anfälle, die aufgrund ihres einmaligen Auftretens nicht als Epilepsie definiert werden, begünstigen die Entwicklung einer Epilepsie in späteren Jahren (Annegers *et al.*, 1986; Rocca *et al.*, 1987; Shinnar *et al.*, 2002). Bei diesen Anfällen handelt es sich i. d. R. um Fieberkrämpfe (Bender *et al.*, 2004). Die Ätiologie und das Alter beim Auftreten des Anfalls sind hierbei entscheidend für die Prognose einer späteren Epilepsie (Ramos Lizana *et al.*, 2000). Eine Epilepsie wird als idiopathisch bezeichnet, wenn sie auf genetischen Faktoren basiert. Diese tritt meistens in Abhängigkeit vom Lebensalter auf. Befindet sich eine Mutation in Genen, die für Ionenkanäle kodieren, spricht man von einer Kanalopathie. Hierbei führen Mutationen zu einem veränderten Verhalten der Kanäle. Daraus resultiert eine geänderte Ionenleitfähigkeit und somit eine geänderte Erregbarkeit des betroffenen Gewebes zum Beispiel der Nervenzellen. Der Begriff kryptogen beschreibt eine Epilepsie, der zwar vermutlich eine organische Ursache zu Grunde liegt, diese jedoch unbekannt ist.

Es ist bekannt, dass innerhalb weniger Stunden nach einem induzierten Anfallsgeschehen zahlreiche Gene aktiviert werden, die ihrerseits über verschiedene Mechanismen zu langfristigen plastischen Veränderungen im Gehirn führen. Die Anzahl von Genen, die möglicherweise eine Bedeutung für die neuronale Plastizität haben, wird auf 500 - 1000 geschätzt (Nedivi *et al.*, 1993).

Die Prävalenz von Epilepsien variiert stark zwischen den einzelnen Studien, da diesen sehr unterschiedliche Populationen und Protokolle zugrunde liegen, so dass sie schwer zu bestimmen ist. Ca. 0,4 - 1% der Bevölkerung leiden an Epilepsien (Sander, 2003). Von allen Betroffenen zeigen ca. 30 - 50% fokale

Anfälle (Lavados *et al.*, 1992; Hauser *et al.*, 1993; Olafsson *et al.*, 1996; Prats *et al.*, 1999), so dass diese Art der Anfälle den am häufigsten vertretenen klassifizierbaren Anfallstyp darstellt.

Die Inzidenz der Epilepsie beträgt in industrialisierten Ländern 5 Neuerkrankungen auf 10000 Personen pro Jahr, wobei Männer häufiger erkranken als Frauen (Hauser *et al.*, 1993). Außerdem ist das Risiko an Epilepsie zu erkranken altersabhängig. So erkranken Kleinkinder und alte Menschen häufiger als Personen mittleren Alters (Hauser *et al.*, 1993).

Die Prognose für Epilepsie ist allgemein als gut zu bezeichnen. Mehr als zwei Drittel aller Patienten zeigen durch eine Medikation eine Remission, definiert als anfallsfreie Zeit über fünf Jahre (Annegers *et al.*, 1979; Shorvon *et al.*, 1982; Shinnar *et al.*, 2002). 10 – 20% der Betroffenen weisen eine ungewisse Prognose auf (Sander, 1993), da bei diesen Patienten nach Absetzen der Medikamente erneut epileptische Anfälle auftreten, so dass die medikamentöse Therapie lebenslang fortgesetzt werden muss. Die verbleibenden 20 – 30% der an Epilepsie erkrankten Menschen zeigen trotz einer entsprechenden medikamentösen Behandlung weiterhin spontane Anfälle, daher ist bei ihnen die Prognose als schlecht zu beurteilen (Elger *et al.*, 1993; Sander, 1993; Schmidt *et al.*, 2005). Dieser Zustand wird gemeinhin als pharmakoresistent bezeichnet, wobei es allerdings keine allgemein anerkannte Definition dieses Begriffes gibt. In der Regel wird dieser Begriff verwendet, wenn unter einer adäquaten Behandlung mit Antikonvulsiva, keine Verbesserung des Krankheitsbildes auftritt (Juul-Jensen *et al.*, 1983; Leppik, 1992; Alving, 1995). Von den Patienten mit komplex-fokalen Anfällen gelten bis zu 70% als pharmakoresistent (Juul-Jensen *et al.*, 1983; Schmidt, 1984; Leppik, 1992).

Ein Problem der medikamentösen Langzeittherapie sind die nicht erwünschten Wirkungen der Antikonvulsiva. Nahezu alle verfügbaren Wirkstoffe weisen mehr oder weniger schwerwiegende Nebenwirkungen auf (Leppik, 2001). Als besonders kritisch ist das teratogene Potenzial einiger Antikonvulsiva wie Valproat und Carbamazepin zu sehen. Ihr Einsatz bei schwangeren Frauen ist mit einem deutlich erhöhten Risiko für das Auftreten von kongenitalen Fehlbildungen verbunden (Samren *et al.*, 1997; Duncan, 2007).

Betrachtet auf die Grundbevölkerung, zeigen Epileptiker eine zwei- bis dreimal höhere Mortalitätsrate (Hauser *et al.*, 1980; Forsgren *et al.*, 2005), wobei zu den

häufigsten Todesursachen Neoplasien, Bronchopneumonien, Herz- und Gefäßerkrankungen sowie Unfälle, des Weiteren Ertrinken oder Selbstmord gehören (Annegers *et al.*, 1984).

In der Veterinärmedizin stellen Epilepsien die häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen des Gehirns bei Hund und Katze dar. Der Hund zeigt häufiger idiopathische als symptomatische Epilepsien, wobei Rassedispositionen auftreten und in der Mehrzahl Rüden betroffen sind (Löscher *et al.*, 1985). Zur medikamentösen Therapie kommen nur wenige Präparate aus der Humanmedizin in Frage, da die Pharmakokinetik beim Tier eine andere ist. Beim Hund erfolgt die Therapie mit Phenobarbital und Primidon und bei der Katze mit Phenobarbital und Diazepam (Löscher, 1994). Mit dieser Therapie werden jedoch nur etwa 40% der Hunde anfallsfrei, 20 - 40% der Tiere zeigen keinerlei Veränderung im Krankheitsbild und müssen daher als therapieresistent bezeichnet werden. Die übrigen Hunde zeigen zumindest eine Reduktion der Anfallsfrequenz.

Aufgrund der ungeklärten Pathophysiologie von Epilepsien, ihrem relativ häufigen Auftreten und der Problematik der medikamentösen Therapie ist der Forschungsbedarf einleuchtend, der hinsichtlich dieser Erkrankungen besteht. Da sich die komplexen Prozesse des Gehirns *in vitro* nur unvollständig darstellen lassen, spielen *in vivo* Tiermodelle in der Epilepsieforschung eine entscheidende Rolle.

2.1.3 Status epilepticus

Der SE wird definiert als ein anhaltender epileptischer Zustand oder eine Anfallsserie über einen längeren Zeitraum hinweg, zwischen denen der Patient das Bewusstsein nicht wiedererlangt (ILAE, 1989). Er stellt somit die schwerste Ausprägungsform eines epileptischen Anfalles dar, welche in jedem Anfallstyp auftreten kann. Bei einem SE versagen die Mechanismen, die bei einem „normalen“ Anfall nach einer begrenzten Zeitspanne zu einem spontanen Sistieren der epileptischen Aktivität führen. Es ist nicht genau bekannt, welche Mechanismen zu dieser verlängerten synchronen Entladung von Neuronenverbänden führen (Lowenstein *et al.*, 1998; Coulter *et al.*, 1999).

Die meisten Studien beziehen sich bei der Definition eines SE auf die 1993 von der ILAE veröffentlichten Richtlinien (ILAE, 1993), wobei Anfallsaktivität, die länger als 30 min andauert, als SE definiert wird (Shepherd, 1994; Coeytaux *et al.*, 2000;

Knake *et al.*, 2006). Da ein epileptischer Anfall normalerweise nach Überschreiten einer Dauer von wenigen Minuten nicht mehr spontan sistiert (Theodore *et al.*, 1994; Shinnar *et al.*, 2001), wird von einigen Autoren vorgeschlagen, dass die Behandlung eines länger anhaltenden untypischen Anfalls unverzüglich zu beginnen ist, um Komplikationen unter anderem in Form von Nervenzellverlusten zu vermeiden (Lowenstein *et al.*, 1999; Meldrum, 1999). Am häufigsten tritt ein SE assoziiert mit einem akuten Erkrankungsgeschehen im ZNS auf, was auf etwa 34 - 63% der SE-Patienten zutrifft. Hierbei handelt es sich um Schlaganfälle oder andere zerebrovaskulärer Störungen, Infektionen des Gehirns oder der Meningen, systemische metabolische Entgleisungen, Tumoren oder Traumata des Gehirns (Hesdorffer *et al.*, 1998; Coeytaux *et al.*, 2000; Knake *et al.*, 2001; Vignatelli *et al.*, 2003). Als weitere Ursache kommt bei etwa 40% ein zu niedriger Serumspiegel antikonvulsiver Substanzen bei vorbestehender Epilepsie in Frage, aber auch länger zurückliegende ZNS-Schäden werden ursächlich mit einem SE in Verbindung gebracht (DeLorenzo *et al.*, 1996). Bei 7 - 33% der Fälle tritt ein SE ohne erkennbare Grunderkrankung oder Ursache auf (Hesdorffer *et al.*, 1998; Coeytaux *et al.*, 2000; Knake *et al.*, 2001; Vignatelli *et al.*, 2003).

Die Inzidenz des SE liegt in Europa bei knapp 0,02 ‰, wobei Kinder unter einem Jahr und Personen über 60 Jahren häufiger betroffen sind (Hesdorffer *et al.*, 1998; Coeytaux *et al.*, 2000; Knake *et al.*, 2001; Vignatelli *et al.*, 2003). So stellt der SE in Deutschland mit ca. 14.000 Menschen jährlich einen der häufigsten Notfälle des neurologischen Fachgebietes dar, in welchem zwischen 9 und 39% der Patienten innerhalb von 30 Tagen versterben (DeLorenzo *et al.*, 1995; Coeytaux *et al.*, 2000; Knake *et al.*, 2001; Garzon *et al.*, 2003; Shneker *et al.*, 2003; Logroscino *et al.*, 2005). Der SE zieht häufig chronische funktionelle Defizite des Gehirnes nach sich; so treten neben Gedächtnisstörungen und Beeinträchtigungen der kognitiven Leistungsfähigkeit auch sensible und motorische Defizite auf (Aicardi *et al.*, 1970; Dodrill *et al.*, 1990; Krumholz *et al.*, 1995; Claassen *et al.*, 2002).

Inwieweit ein erlittener SE ursächlich zu der Entwicklung einer chronischen Epilepsie beiträgt, ist im Einzelfall schwierig zu beantworten, da häufig schon vor dem SE spontane Anfällen oder eine Schädigung des Gehirns vorliegen (Claassen *et al.*, 2002). Statistisch gehört die Entwicklung einer chronischen Epilepsie sicherlich zu den gravierendsten Folgen des Krankheitsbildes (Hesdorffer *et al.*, 1998). Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die

Wahrscheinlichkeit, nach einem SE eine Epilepsie zu entwickeln, erhöht ist (Wasterlain *et al.*, 1993; Krumholz, 1999). Zwischen 30% und 82% der Kinder mit einem konvulsiven SE entwickelten später spontane epileptische Anfälle (Aicardi *et al.*, 1970; Maytal *et al.*, 1989; Verity *et al.*, 1993). Studien bei Erwachsenen zeigten, dass nach einem konvulsiven SE 37% der Patienten im ersten Jahr und 56% 3 Jahre danach wiederholt spontane Anfälle zeigen (Hauser, 1990).

Beim Menschen ebenso wie beim Tier, führt kontinuierliche Anfallsaktivität, wie sie während eines SE entsteht, zu einer großen Anzahl an plastischen Veränderungen im Hippokampus und angrenzenden Gehirnregionen (Coulter *et al.*, 1999; Sloviter, 1999; Ben-Ari, 2001). So kann ein einziger SE eine Epileptogenese auslösen. Die Epileptogenese ist mit mannigfaltigen Veränderungen in der synaptischen Funktion, synaptische Plastizität genannt (McNamara, 1999) und mit passiven und aktiven Eigenschaften der Membran der Neurone vergesellschaftet, was man intrinsische Plastizität nennt (Yaari *et al.*, 2002). Die synaptische Plastizität ist zum größten Teil in anhaltende Veränderungen bei der Regulation oder Expression der Neurotransmitter-Rezeptoren verwickelt (Turner *et al.*, 1991; Lothman *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1999). Über die Mechanismen der intrinsischen Plastizität bei der Epileptogenese ist jedoch nur wenig bekannt.

Diese Darstellung verdeutlicht die Schwierigkeiten der methodischen Untersuchung der Entwicklung einer Epilepsie beim Menschen, da nicht unterschieden werden kann, ob die Epilepsie die Ursache des SE ist, oder ob der SE und die Epilepsie Symptome derselben Grunderkrankung sind.

2.1.4 Temporallappenepilepsie

Die Temporallappenepilepsie (TLE) stellt eine spezielle Form der Epilepsie dar, die durch fokale oder komplex-fokale Anfälle charakterisiert ist, die zum Teil sekundär generalisieren. Der Name Temporallappenepilepsie begründet sich auf dem epileptischen Fokus, der im Temporallappen liegt. Dies ist die häufigste vorkommende Form der Epilepsie beim Menschen (Engel, 1996; Sirven, 2002) und tritt bei etwa 70 - 85% der Menschen mit fokalen oder komplex-fokalen Anfällen auf (Dam, 1992). Vor allem bei der Temporallappenepilepsie wird als begünstigender Faktor eine schwere neurologische Erkrankung im Kindesalter angesehen, die noch nach Jahren eine solche auslösen kann. Bei ca. 70 - 80%

der Patienten wurde ein komplizierter Fieberkrampf, eine schwere ZNS-Infektion, ein Schädel-Hirn-Trauma oder ein SE in der Kindheit diagnostiziert (Falconer *et al.*, 1968; Mathern *et al.*, 1995). Innerhalb des Temporallappens liegt der epileptische Fokus meistens im Hippokampus, einer wichtigen Struktur des limbischen Systems (Spencer *et al.*, 1990; Van Roost *et al.*, 1998). Ihrer physiologischen Funktion entsprechend führen pathologische Veränderungen im Bereich der Hippokampus-Formation unter anderem zu Störungen der Gedächtnisleistung. Außerdem stellt die Generierung epileptischer Anfälle die wichtigste pathophysiologische Veränderung der Hippokampus-Formation dar. Kennzeichnend für die TLE ist eine hohe Pharmakoresistenz, die bei ca. 60 - 90% der Patienten auftritt, d.h. in diesem Fall kann eine Therapie mit den zur Verfügung stehenden Antikonvulsiva keine oder nur eine sehr unzureichende Reduzierung der Anfallsfrequenz erreichen (Schmidt, 1986; Leppik, 1992; Wiebe, 2004). Diesen pharmakoresistenten Patienten kann oft nur durch die chirurgische Entfernung des Krampfherdes, d.h. des Hippokampus und/oder der angrenzenden Regionen, eine dauerhafte Heilungschance geboten werden (Zentner *et al.*, 1995; Kral *et al.*, 2002). Eine Anfallsfreiheit ist nach einer Operation bei 60% der Patienten zu finden (Elger *et al.*, 1993). Weitere 15 – 20% profitieren von einer Operation in Form einer verminderten Anfallsfrequenz. Aus der Resektion des dominanten Temporallappens resultiert eine Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung bei ca. 20 – 30% der Patienten (Elger *et al.*, 1993).

Die der TLE unterliegenden molekularen Mechanismen sind noch weitgehend ungeklärt (Dalby *et al.*, 2001). Bekannt ist jedoch, dass sich bei der Epilepsie das Entladungsverhalten der hippokampalen Neurone aufgrund von veränderter Expression, Verteilung und Funktion von Ionenkanälen sowie von Neurotransmitter-Rezeptoren ändert (Blümcke *et al.*, 2000; Lie *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2002). Als ein wichtiger, der TLE unterliegender pathophysiologischer Prozess wurde die über ionotrope oder metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluRs) interagierende, durch Glutamat vermittelte, exzessive synaptische Erregbarkeit erkannt. Diese zellulären und strukturellen Veränderungen können Auswirkungen auf die Funktion des Hippokampus haben (Scheffler *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 2003).

2.2 Hippokampus-Formation

Die hippokampale Formation hat eine besondere Bedeutung für Lernvorgänge, Gedächtnisbildung, Motivationsverhalten und Bewusstsein (Eichenbaum *et al.*, 1992; Fernandez *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 1999). Ergebnisse neuerer Studien weisen darauf hin, dass die Hippokampus-Formation insbesondere für das Ortsgedächtnis und das episodische Gedächtnis von Bedeutung ist (Burgess *et al.*, 2002).

Die Hippokampus-Formation besteht aus einer Gruppe histoarchitektonisch definierter Regionen, welche den Gyrus dentatus, den Hippokampus, das Subikulum, das Prä- und das Parasubikulum und den Enthorinalen Kortex beinhalten (Johnston *et al.*, 1998). Sie ist paarig angelegt und liegt zum größten Teil im Temporallappen und stellt einen wichtigen Teil des limbischen Systems dar. Der Querschnitt des Hippokampus zeigt die Struktur des Ammonshorns (*Cornu ammonis*, CA) und des Gyrus dentatus, welche durch eine eingerollte Archikortexstruktur zustande kommen. Das Ammonshorn stellt den eigentlichen Hippokampus dar und besteht aus den Subregionen CA1-CA4, welche basierend auf Zellgröße und Aussehen eingeteilt werden können (Lorente de Nó, 1934). Es stellte sich heraus, dass die von Lorente de Nó bezeichnete CA4-Region zur polymorphen Zellschicht des DG gehört, weshalb dieser Terminus nicht länger benutzt wird (Johnston *et al.*, 1998). Die CA2-Region bildet eine schmale Zone zwischen CA3 und CA1. Diese Neurone besitzen große Zellkörper wie die Neurone in der CA3-Region, erhalten jedoch, wie die CA1-Neurone, keinen Input von den Moosfasern. Sie scheinen resistenter gegenüber Epilepsie bedingtem Zelltod zu sein als CA3- und CA1-Neurone, weshalb die CA2-Region auch als „resistenter Sektor“ bezeichnet wird (Corsellis *et al.*, 1983). Der Grund für die Zusammenfassung der verschiedenen Regionen der hippokampalen Formation unter einem einzigen Begriff liegt darin begründet, dass die wichtigsten Zellen dieses Gebietes höchst spezifisch sind und eine funktionelle Einheit bilden.

Innerhalb des Gyrus dentatus (DG) wird eine charakteristische dreischichtige Histoarchitektur, bestehend aus der Molekularschicht, der Körnerzellschicht und der polymorphen Zellschicht, welche Hilus genannt wird, beobachtet. Die Hauptzellen des Gyrus dentatus heißen Körnerzellen, deren Zellkörper dicht gepackt in der Körnerzellschicht liegen. CA3- sowie CA1-Neurone sind im Wesentlichen Pyramidenzellen, deren Zellkörper in der Pyramidenzellschicht

ebenfalls dicht gepackt liegen, umgeben von zahlreichen faserführenden Regionen, den Strata.

Die Dendriten der Körnerzellen reichen bis in die Molekularschicht, wo der DG die Hauptinformationen durch glutamaterge Signale aus dem Entorhinalen Kortex über den Tractus perforans (Enthorino-hippokampaler Fasertrakt) empfängt (Andersen *et al.*, 1966; Witter, 1993). Wie in Abbildung 1 dargestellt, projizieren diese Körnerzellen mit ihren Axonen, welche Moosfasern genannt werden, zum Hilus, zu den proximalen Dendriten der in der CA3-Region liegenden Pyramidenzellen und zu Interneuronen (Blackstad *et al.*, 1970; Gaarskjaer, 1978). Die Pyramidenzellen der CA3-Region wiederum vollführen eine starke glutamaterge Projektion zu den CA1-Neuronen (beim Menschen auch zur CA2-Region). Diese Verknüpfung heißt Schaffer-Kollateral-Bahn (Ishizuka *et al.*, 1990). Außerdem haben sie starke Verbindungen zu anderen CA3-Pyramidenzellen in anderen Schichten; diese nennt man zurückführende Kollateral-Fasern (MacVicar *et al.*, 1980; Miles *et al.*, 1986). Die CA1-Pyramidenzellen sind nicht stark mit

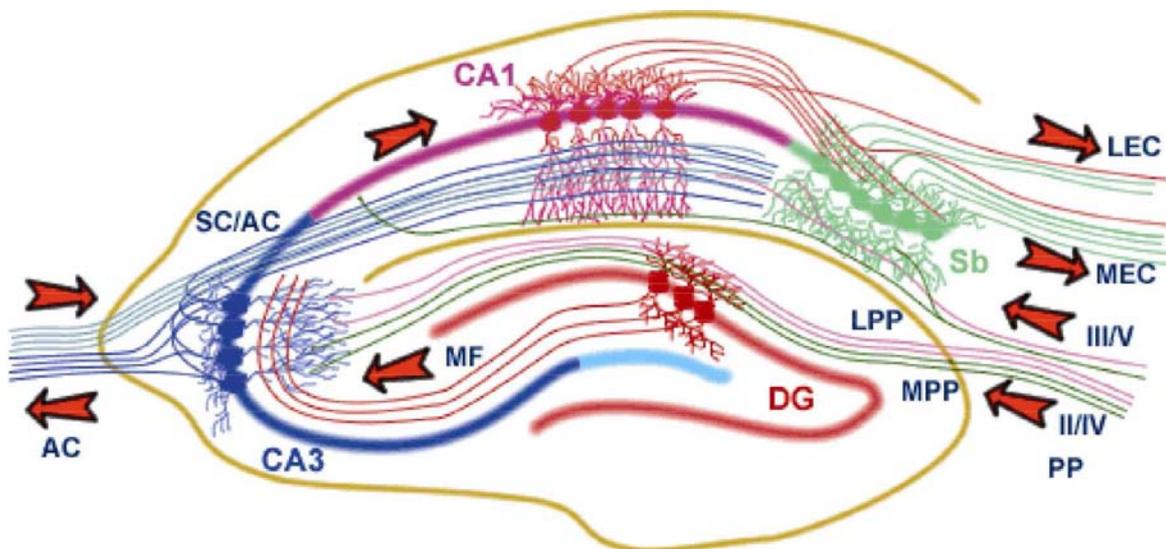


Abbildung 1: Schematische Darstellung des hippocampalen Netzwerkes. Der Gyrus dentatus erhält seine Hauptinformationen aus dem Entorhinalen Kortex (EC) über den Tractus perforans {PP: geteilt in lateralen (LPP) und medialen Anteil (MPP)}. Die Körnerzellen des Gyrus dentatus projizieren über Moosfasern (MF) zu den Pyramidenzellen in der CA3-Region. CA3-Pyramidenzellen projizieren wiederum über die Schaffer Kollateralbahn (SC) zur CA1-Region ebenso wie über die kommissurassoziierten Fasern (AC) in den contralateralen Hippokampus. Außerdem erhalten die CA1-Neurone einen direkten Input aus dem Tractus perforans und geben die Signale an das Subikulum (Sb) weiter. Diese Neurone wiederum senden das Hauptsignal des Hippokampus über laterale (LEC) und mediale Fasern (MEC) zum Entorhinalen Kortex zurück.
Aus: <http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/pathway/figs/hippocampus.gif>.

anderen CA1-Neuronen verbunden (Amaral *et al.*, 1991; Radpour *et al.*, 1991), sie projizieren überwiegend zum Subikulum (Finch *et al.*, 1983), während das Subikulum wiederum zum Prä- und Parasubikulum projiziert (Kohler, 1985). Eine geringe Anzahl inhibitorischer Interneurone vermittelt die vor- und rückwärtsgerichtete Inhibition der Erregung in all diesen Regionen. Daher ist die Verbreitung der Information im Hippokampus hauptsächlich nur in eine Richtung möglich.

Die hippokampale Formation spielt eine große Rolle in der Epilepsieforschung, da der Hippokampus im Gehirn die niedrigste Schwelle für das Auftreten epileptischer Entladungen besitzt (Green, 1964). Gerade im Bereich der CA3-Region des Hippokampus herrscht besonders große Bereitschaft zu spontaner, rhythmisch synchronisierter, pathologischer Entladung von Neuronen („intrinsic burst behavior“ (Johnston *et al.*, 1998)), so dass hier bereits kleine pathologische Prozesse zu einer Veränderung im Verhältnis von Exzitation und Inhibition führen und so epileptiforme Aktivität auslösen können (Traub *et al.*, 1991). Diese epileptiforme Aktivität in der CA3-Region kann sich über die CA1-Region dann weiter ausbreiten. Auf diese Weise entstehen viele epileptische Anfälle. Im Gegensatz zum Ammonshorn besitzt der Gyrus dentatus unter physiologischen Bedingungen eine hohe Schwelle für die Auslösung epileptischer Aktivität (Lothman, 1994). Diese erschwerte Erregbarkeit beruht zum Teil auf der starken inhibitorischen Kontrolle durch Interneurone sowie dem Fehlen rekurrenter exzitatorischer Verschaltungen. Daher wird postuliert, dass der Gyrus dentatus aufgrund seiner Lage die nachgeschalteten Areale wie die CA3-Region vor einer Übererregung schützt (Heinemann *et al.*, 1992; Lothman *et al.*, 1992).

2.2.1 Hippokampussklerose und TLE

Die neuropathologische Evaluation von chirurgisch entferntem Gewebe des Temporallappens von Patienten mit TLE zeigte, dass über 80% der Resektate neuropathologische Veränderungen aufweisen (Williamson *et al.*, 1993), wovon bei ca. 30 – 40% fokale Läsionen vorliegen, welche normalerweise nicht den Hippokampus involvieren (Crino *et al.*, 2002). 65% der Patienten mit TLE zeigen hingegen eine Hippokampussklerose (Blümcke *et al.*, 2002). Das Vorkommen eines massiven Nervenzellverlustes in den Hippokampi von TLE-Patienten wurde bereits vor über 100 Jahren beschrieben (Sommer, 1880). Später erst gelang eine

detailliertere Darstellung des typischen Musters der hippocampalen Sklerose (Bratz, 1899; Margerison *et al.*, 1966). Histopathologisch zeigt die Hippokampus-Formation einen segmentalen Neuronenverlust in CA1 und CA3 von über 40%, während die Körnerzellen des Gyrus dentatus resistenter sind, jedoch eine Dispersion aufweisen können (Blümcke *et al.*, 1999; Coulter, 1999; Sloviter, 1999; Blümcke *et al.*, 2002). Der entstandene Zellverlust wird durch eine Glia-Narbe ersetzt (Blümcke *et al.*, 2002), was durch eine reaktive Gliose sichtbar wird. Daher wird in diesem Zusammenhang auch häufig der Begriff Ammonshornsklerose (AHS) verwendet. Da bei anderen Epilepsieformen vergleichbare Nervenzellverluste im Hippokampus fehlen, wird ein direkter Zusammenhang zwischen der Temporallappenepilepsie und der Hippokampusklerose postuliert (Stauder, 1938; Margerison *et al.*, 1966; Cendes *et al.*, 1993; Blümcke *et al.*, 2002).

Neben Zellverlusten kommt es zu einer Umorganisation der neuronalen Verschaltungen im Hippokampus (Abbildung 2), unter anderem in Form einer erhöhten Neurogenese und einer Bildung anderer abnormaler Strukturen (Blümcke *et al.*, 2001; Blümcke *et al.*, 2002). Diese synaptische Reorganisation

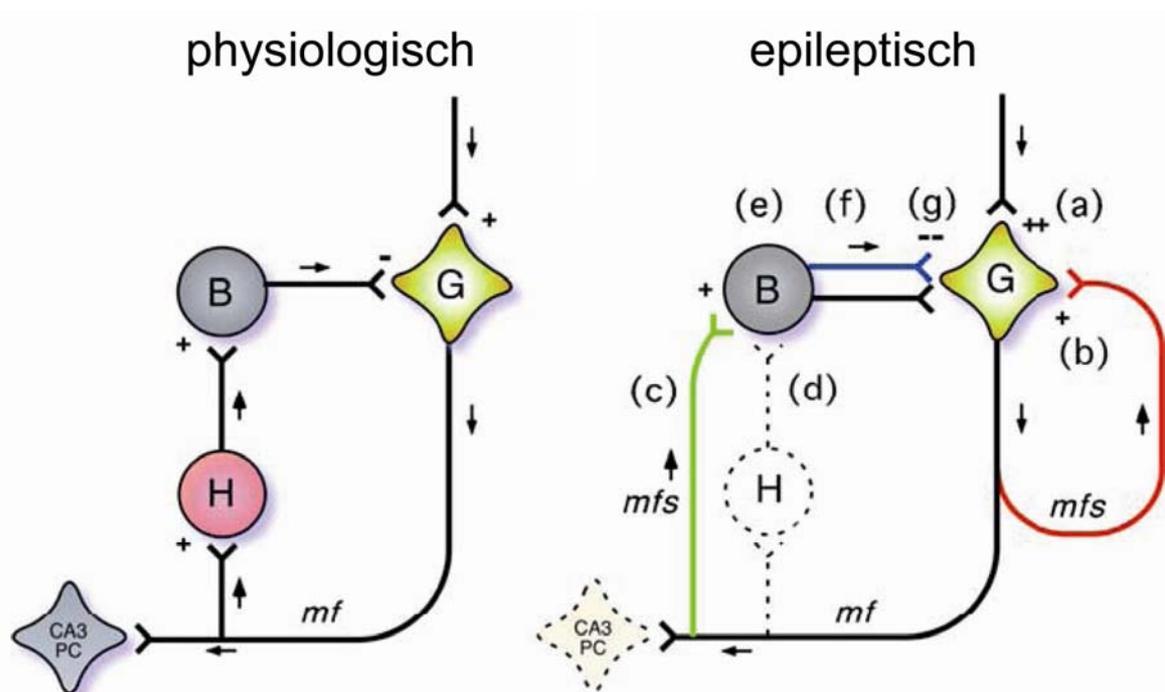


Abbildung 2: Die Moosfasersprossung als Beispiel für exzitatorische und inhibitorische synaptische Reorganisation im epileptischen Gyrus dentatus. G: Gyrus dentatus Körnerzelle, B: Korbzelle (Interneuron), H: Hilus-Moos-Zelle („exzitatorisches Neuron“), PC: Pyramidenzelle, mfs: Moosfaser-Sprossung. Nach Morimoto (Morimoto *et al.*, 2004).

des Hippokampus führt zu einer Potenzierung des Glutamates an den Synapsen, was zusätzlich eine Aktivierung der Neurone bedeutet (Abbildung 2 a) und eine rekurrente Moosfasersprossung (mfs) verursacht, welche auch ein morphologisches Charakteristikum des Krankheitsbildes der TLE ist (Mathern *et al.*, 1995). Diese neuen Moosfasern können neue exzitatorische (Abbildung 2 b) oder auch inhibitorische (Abbildung 2 c) Verbindungen formen, indem sie sich entweder mit einer Körnerzelle oder mit einem inhibitorischen Interneuron verbinden. Die synaptische Reorganisation kann zu einer Reduzierung der Exzitation an inhibitorischen Neuronen (Abbildung 2 d) oder auch zu einem selektiven Verlust von Interneuronen und dadurch zu einer reduzierten dendritischen Inhibition (Abbildung 2 e) führen (Morimoto *et al.*, 2004).

Es stellt sich die Frage, ob die Hippokampussklerose ein Epiphänomen, Folge oder Ursache für die Entwicklung einer Temporallappenepilepsie ist. Es liegt keine Korrelation zwischen Dauer der Epilepsie, Frequenz der Anfälle oder dem Alter der Patienten und dem Grad der Hippokampussklerose vor. Die Hippokampussklerose scheint daher die Ursache für die Anfälle zu sein (Cendes *et al.*, 1993; Cendes *et al.*, 1993; Cendes *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1996). Patienten mit einer langen Anfallsgeschichte weisen signifikant schwerere Hippokampus-Läsionen auf, so dass die epileptischen Anfälle die Neuronenverluste zumindest verstärken (Saukkonen *et al.*, 1994). Meldrum vermutet, dass durch einen auslösenden Insult die Neurodegeneration im Hippokampus induziert wird. Die Neuronenverluste aber werden, nachdem sich eine Epilepsie manifestiert hat, durch die spontanen epileptischen Anfälle noch verstärkt (Meldrum, 1991; Meldrum, 1997).

In dieser Arbeit wurde der Hippokampus neuropathologisch untersucht, da dessen Neurone besonders empfindlich gegenüber Anfällen sind (Green, 1964; Traub *et al.*, 1991).

2.3 Metabotrope Glutamatrezeptoren

Innerhalb des Nervensystems bilden Nervenzellen (Neurone) strukturell und funktionell selbständige Grundeinheiten, die untereinander über sogenannte Synapsen in Verbindung stehen. Dort ausgelöste Aktionspotenziale stellen das universelle Kommunikationsmittel innerhalb des Nervensystems dar. Die Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotenzialen nach chemischer oder elektrischer Erregung, beruht auf einer kurzfristigen Ladungsumkehr der

Zellmembran. Hierbei werden kurzfristig Kanäle in der Zellmembran geöffnet, die nur für Natrium durchlässig sind. Dadurch strömen Natrium-Ionen in die Zelle und führen an der Membran zu einem Überschuss an positiven Ionen. Das Membranpotenzial verändert sich von -60 mV (Ruhemembranpotenzial) auf über +20 mV. Diese Umkehr der Membranladung während eines AP nennt man eine Depolarisation. Die Na⁺-Kanäle inaktivieren nach kurzer Zeit wieder und es öffnen sich für kurze Zeit K⁺-Kanäle. Dadurch strömen Kalium-Ionen aus der Zelle und repolarisieren die Membran zum Ruhemembranpotenzial. Das Ruhemembranpotenzial wird unter Energieaufwand hauptsächlich durch die Na⁺/K⁺-ATPase aufrechterhalten. Diese Ionenaustauschpumpe entfernt Na⁺ aus der Zelle und reichert zeitgleich K⁺ in der Zelle an.

Die Erregungsübertragung vom Axon auf ein anderes Neuron erfolgt über Synapsen mithilfe von Neurotransmittern. Neurotransmitter werden in den synaptischen Endknöpfchen der Axone, die das Signal senden (präsynaptische Neurone), in kleinen membrangebundenen Vesikeln im Zytoplasma gespeichert. Elektrische Aktivität und damit verbundener Ca²⁺-Einstrom in das präsynaptische Neuron bedingen, nach Fusion des Vesikels mit der Membran, eine Neurotransmitter-Diffusion in den synaptischen Spalt zwischen dem präsynaptischen Neuron und dem das Signal empfangende postsynaptische Neuron. Die Transmitter binden an entsprechenden in der postsynaptischen Membran liegende Rezeptoren, was entweder zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran und damit zu einer Weiterleitung der Erregung (exzitatorische Synapse) oder zu einer Hyperpolarisation und damit zu einer Hemmung der Weiterleitung (inhibitorische Synapse) führt. An jeder Synapse kommen exzitatorische und inhibitorische Rezeptoren vor, die präsynaptisch oder postsynaptisch lokalisiert sind.

Die Aminosäure Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Hippokampus (Storm-Mathisen, 1977; Roberts *et al.*, 1981). Dort wird Glutamat vom Tractus perforans, von Moosfasern, von Kommissur assoziierten Fasern und von verschiedenen exzitatorischen Interneuronen freigesetzt. Das aus der Präsynapse freigesetzte Glutamat kann nun an speziellen Rezeptoren an der postsynaptischen, aber auch an der präsynaptischen Membran binden (Mennerick *et al.*, 2005). Bindet das Glutamat an postsynaptische Rezeptoren, verändert es den Fluss der Ionen entlang der Membran. Glutamat kann postsynaptisch ein

Aktionspotenzial auslösen und somit ein Signal an das nächste Neuron weitergeben (Pin *et al.*, 2002).

Glutamatrezeptoren werden in zwei Klassen eingeteilt (Hicks *et al.*, 1987); die ionotropen Glutamatrezeptoren, welche Ionenkanäle darstellen, die für die schnelle synaptische Übertragung zuständig sind, und die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs), welche langsame synaptische Übertragung vermitteln (Monaghan *et al.*, 1989; Nakanishi, 1992; Sommer *et al.*, 1992; Hollmann *et al.*, 1994; Pin *et al.*, 1995; Nakanishi *et al.*, 1998).

Metabotrope Glutamatrezeptoren sind sehr große (> 1000 Aminosäuren), aus einer einzelnen Polypeptid-Ketten bestehende Komplexe bestehend aus Proteineinheiten, die an Guanin-Nukleotid-Bindungsproteine (G-Proteine) gekoppelt sind (Nakanishi, 1992; Nakanishi, 1994), welche wiederum über sekundäre Botenstoffe verschiedene Signalwege stimulieren. Die mGluRs kommen im gesamten zentralen Nervensystem vor und sind bei spezifischen Neuronentypen in prä- und/oder postsynaptischen Membranen lokalisiert (Pin *et al.*, 1995; Conn *et al.*, 1997).

Die Funktionen dieser Rezeptoren sind sehr vielseitig und abhängig vom Subtyp des Rezeptors und der Lokalisation. Die mGluRs kontrollieren den Ausstrom des Glutamates ebenso wie die darauf folgende postsynaptische Antwort (Anwyl, 1999; Schoepp, 2001). Vor allem präsynaptisch aktivieren sie auch inhibitorische Mechanismen (Fiorillo *et al.*, 1998). Sie regulieren gemeinsam mit entsprechenden G-Proteinen verschiedene Ionenkanäle und ionotrope Glutamatrezeptoren in der prä- und postsynaptischen Membran (Swartz *et al.*, 1992; Sahara *et al.*, 1993; Guerineau *et al.*, 1995; Congar *et al.*, 1997; Snyder *et al.*, 2001). Es konnte ein Einfluss der mGluRs bei der Induktion von Langzeit-Potenzierung (LTP) und Langzeit-Depression (LTD) gezeigt werden (Bortolotto *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 2000; Manahan-Vaughan, 1997; Raymond *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2002; Volk *et al.*, 2006). Somit sind sie an der Entstehung des Gedächtnisses beteiligt (Aiba *et al.*, 1994; Pin *et al.*, 1995; Packard *et al.*, 2001).

Die durch G-Proteine vermittelte Signaltransduktion beginnt mit der Bindung des Agonisten, in diesem Fall Glutamat, an den Rezeptor, wodurch das G-Protein aktiviert wird. Basierend auf Sequenzähnlichkeiten, Signalwegen und Pharmakologie können die mGluRs in drei Gruppen eingeteilt werden (Nakanishi, 1994; Pin *et al.*, 1995). Die Aktivierung der Gruppe I mGluRs (mGluR1 und 5) führt

im Allgemeinen zu neuronaler Erregung, während die Aktivierung der Gruppe II (mGluR2 und 3) und III (mGluR4, 6, 7 und 8) mGluRs die synaptische Übertragung herabsetzt (Abbildung 3). In nachgeschalteten physiologischen Signalwegen unterscheiden sich die mGluRs der Gruppe I und III wie folgt. Die Aktivierung der hauptsächlich postsynaptisch lokalisierten Gruppe I mGluRs führt zu einer Aktivierung der spezifischen Phospholipase C (PLC). Diese ist wiederum

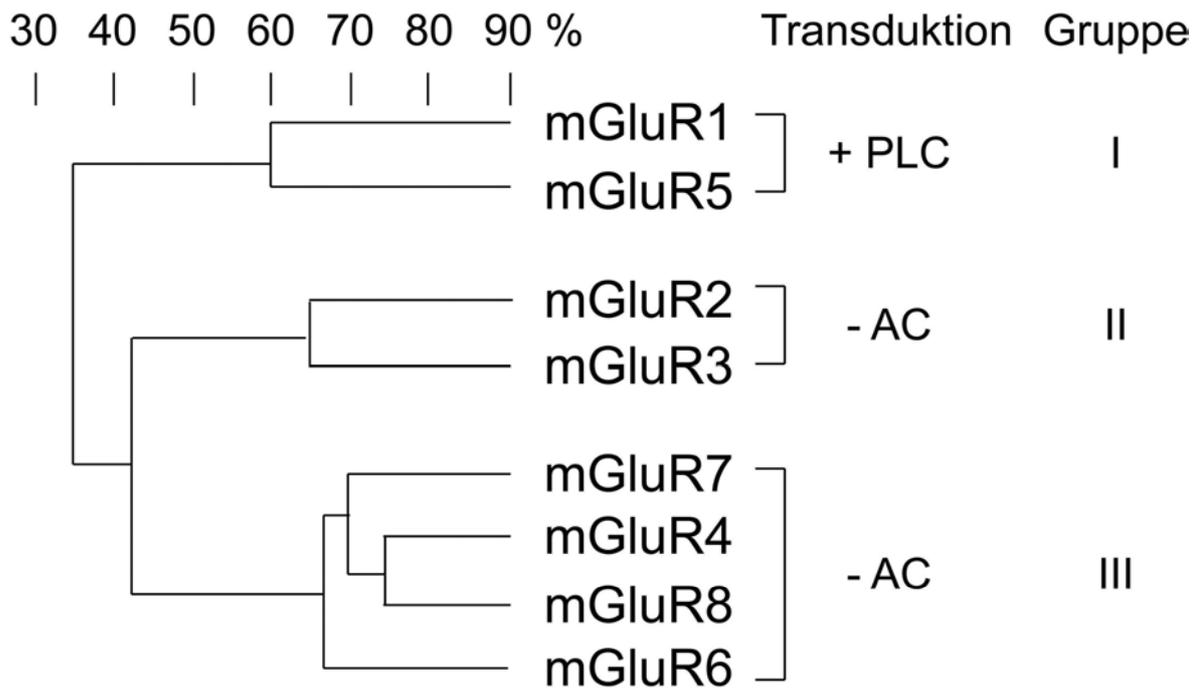


Abbildung 3: Verwandtschaftliche Beziehung der bisher bekannten Mitglieder der metabotropen Glutamaterezeptor-Familie. Transduktionsmechanismen: + PLC, Stimulation der Phospholipase C; - AC, Inhibition der Adenylatzyklase (Conn *et al.*, 1997).

an das Inositoltriphosphat-Diacylglycerol-System gekoppelt und bedingt daher durch die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) die Bildung der zwei Botenstoffe Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerin (DAG). Der Anstieg von IP₃ führt in Folge zu einer vermehrten Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern und verursacht so eine deutliche Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration. DAG und die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration führen zu einer Aktivierung der Proteinkinase C und damit zu einer Öffnung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle, die einen weiteren Einstrom von Ca²⁺ in die Zelle ermöglichen. Gruppe II und Gruppe III mGluRs, welche vor allem präsynaptisch lokalisiert sind, modulieren die synaptische Übertragung durch die Hemmung der Adenylatzyklase. Dies führt zu einem Abfall von cAMP (zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat), dadurch wird die synaptische Antwort über die

Inhibition des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Einstromes und der Glutamatausstrom gehemmt (Trombley *et al.*, 1992; Conn *et al.*, 1997; Shigemoto *et al.*, 1997; Corti *et al.*, 2002; Flor *et al.*, 2002). In Abbildung 4 ist der schematische Aufbau eines synaptischen Terminals mit verschiedenen Rezeptoren und Kanälen dargestellt. Aufgrund einer Vielzahl von spezifischen Agonisten und Antagonisten können die verschiedenen Rezeptoren gut charakterisiert werden.

Ebenso wie andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren besitzen die mGluRs sieben Transmembran-Domänen mit einem extrazellulären N-Terminus und einem großen intrazellulären C-Terminus. Die große extrazelluläre N-terminale Domäne stellt die Glutamat-Bindungsstelle dar (Knopfel *et al.*, 1995; Conn *et al.*, 1997; Jingami *et al.*, 2003). Zurzeit sind acht mGluR-Gene identifiziert (mGluR1 - 8), welche jedoch noch in weitere Spleißvarianten unterteilt werden können. So kodiert ein einziges Gen für bis zu vier verschiedene Rezeptoren mit langen oder kurzen C-terminalen Domänen. Dies wurde auch für mGluR1 und mGluR4 beschrieben (Flor *et al.*, 1995; Pin *et al.*, 1995; Laurie *et al.*, 1996; Thomsen *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1999). Die alternativen Spleißvarianten jedes Rezeptor-Subtyps haben unveränderte extrazelluläre N-terminale Domänen und besitzen daher die gleichen pharmakologischen Eigenschaften (Thomsen *et al.*, 1997; Corti *et al.*, 1998). Liegt nun ein C-Terminus in der vollen Länge vor, spricht man von der α -Einheit. Kommen kürzere Teilstücke dieser Sequenzen vor, handelt es sich um β - oder γ -Einheiten. Der C-Terminus aller bekannten mGluRs besitzt Proteinbindungsdomänen, an denen regulatorische Proteine, wie zum Beispiel Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) oder calmodulinabhängige Proteinkinase II (CamKII) binden können. Der Verlust großer Teile des C-Terminus kann somit zu fundamentalen Änderungen in der Regulation dieser Proteine führen.

In der adulten Ratte werden die mGluRs hauptsächlich in Neuronen exprimiert (Ohishi *et al.*, 1993; Tanabe *et al.*, 1993; Testa *et al.*, 1994; Makoff *et al.*, 1996; Petralia *et al.*, 1996; Mineff *et al.*, 1999). mGluR1 liegt im Gehirn weit verteilt vor (Martin *et al.*, 1992; Shigemoto *et al.*, 1992), während mGluR4 im normalen Gehirn ein spezifisches regionales und zelluläres Expressionsmuster aufweist und so eher auf bestimmte Gebiete beschränkt ist (Blümcke *et al.*, 1996; Shigemoto *et al.*, 1997; Corti *et al.*, 2002), wobei mGluR4 vor allem in bestimmten Strukturen

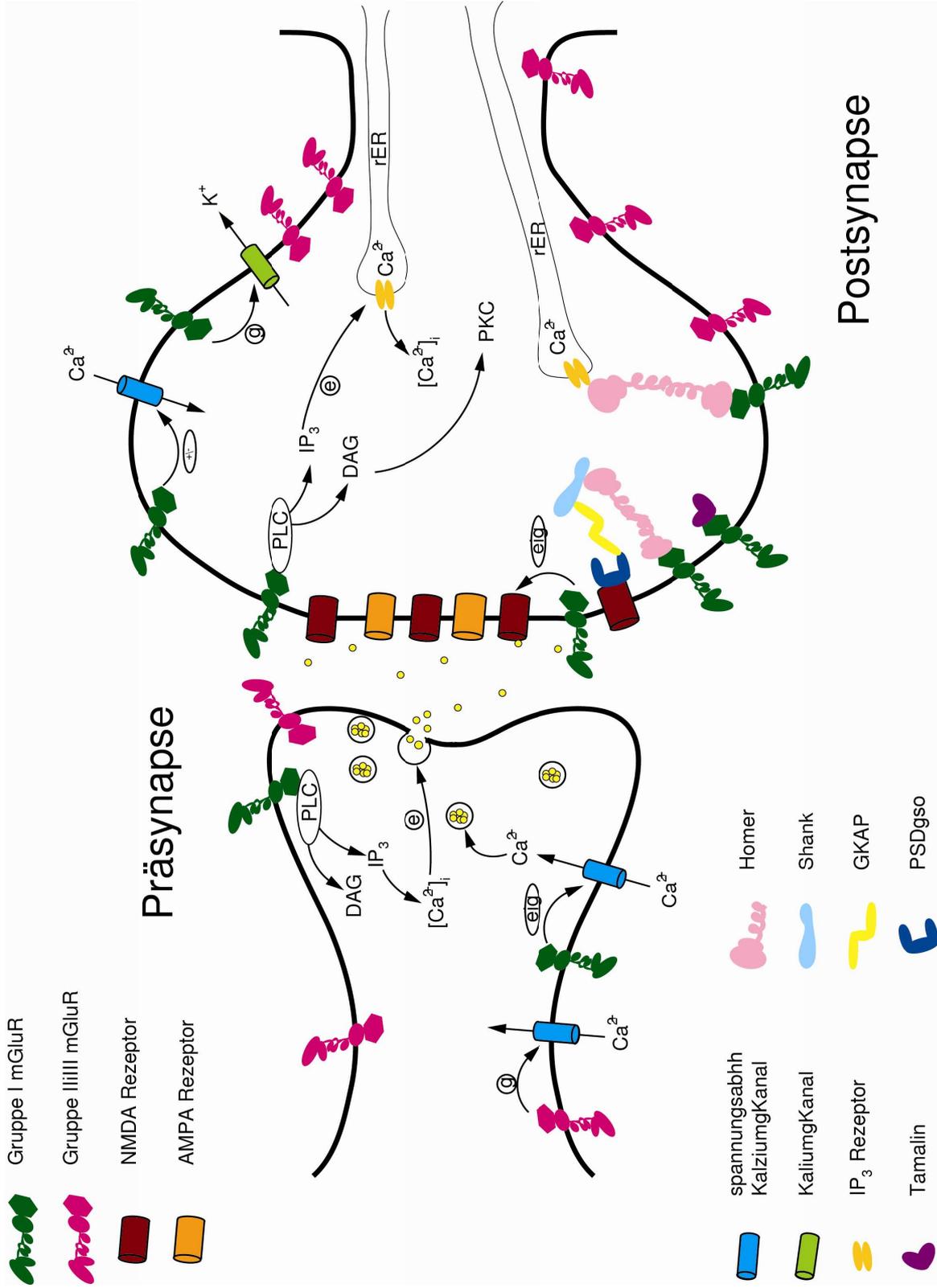


Abbildung 4: Schema des synaptischen Terminals.

wie zum Beispiel den Körnerzellen des Zerebellums und in einzelnen thalamischen oder pontinen Kernen auftritt (Ohishi *et al.*, 1995).

In hippocampalen Neuronen wurde mGluR1 vor allem in der CA3-Region, im Gyrus dentatus, in Interneuronen und im Entorhinalen Kortex nachgewiesen (Shigemoto *et al.*, 1992; Fotuhi *et al.*, 1994; Hampson *et al.*, 1994; Berthele *et al.*, 1998).

Vergleichbar mit dem Gehirn der Ratten, zeigte der humane Hippokampus physiologisch niedrige Level an mGluR4-Expression, meistens auf das Ende der Moosfasern in CA3 beschränkt (Tanabe *et al.*, 1993; Fotuhi *et al.*, 1994; Ohishi *et al.*, 1995; Blümcke *et al.*, 1996; Aronica *et al.*, 1997; Shigemoto *et al.*, 1997), wurde jedoch auch im Entorhinalen Kortex, in den CA1-CA3 und im Hilus des Hippokampus, aber auch in somato-dendritischen Interneuronen gefunden (Fotuhi *et al.*, 1994; Bradley *et al.*, 1999; Corti *et al.*, 2002). mGluR1 zeigte vor allem eine postsynaptische Lokalisation in neuronalen Elementen der verschiedenen Gehirnregionen, wie auch im Hippokampus (Lujan *et al.*, 1996; Shigemoto *et al.*, 1997). mGluR4-Immunreaktivität ist in der präsynaptischen aktiven Zone in der Molekularschicht des DG zu finden (Kinoshita *et al.*, 1996; Shigemoto *et al.*, 1997; Mateos *et al.*, 1998).

Die Expression und die Funktion von einer Vielzahl von Neurotransmitter-Rezeptoren und Ionenkanälen sind im epileptischen Hippokampus verändert (Ben-Ari, 2001; Coulter, 2001; Su *et al.*, 2002). Liegt eine pathologische Expression oder Funktion der metabotropen Glutamaterezeptoren vor, so resultiert daraus eine plastische Veränderungen der synaptischen Übertragung und ein neuronaler Zelltod, wie es bei zahlreichen akuten und chronischen neurologischen Erkrankungen wie Anfallsleiden (Sansig *et al.*, 2001), Angst- und Stresserkrankungen (Linden *et al.*, 2002; Swanson *et al.*, 2005), Fragiles-X-Syndrom (Bear *et al.*, 2004), hypoxischer Gehirnschädigung (Poli *et al.*, 2003) und exzitotoxischem Neuronenzellverlust (Bruno *et al.*, 2000) zu finden sind. Veränderungen im Gleichgewicht der Neurotransmitter können zu einer Herabsetzung der Anfallsschwelle im Gehirn beitragen (Ben-Ari, 2001; Coulter, 2001; Su *et al.*, 2002).

Funktionell konnte gezeigt werden, dass Gruppe I mGluRs den neuronalen Zelltod in Gehirn-Insult-Modellen, wie bei Ischämie und Trauma, verstärken (Bruno *et al.*, 1995; Nicoletti *et al.*, 1999; Pellegrini-Giampietro, 2003; Ireland *et al.*, 2004;

Wong *et al.*, 2004). Aktivierung der Gruppe I mGluRs führt zu einer epileptiformen Aktivität im Hippokampus (Sayin *et al.*, 2003). Es wird jedoch auch eine neuroprotektive Wirkung dieser mGluRs der Gruppe I beobachtet (Koh *et al.*, 1991; Nicoletti *et al.*, 1999; Blaabjerg *et al.*, 2003). Über die Expression der mGluRs in humaner TLE ist bisher nur eine begrenzte Information vorhanden (Blümcke *et al.*, 2000; Lie *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2001). So wurde eine Zunahme der Expression von mGluR1 und mGluR5 in Epilepsie assoziierten fokalen kortikalen Dysplasien gefunden (Aronica *et al.*, 2003). Außerdem konnten erhöhte Level von mGluR1- und mGluR5-Expression in humanem Hippokampus-Gewebe von Patienten mit AHS beziehungsweise im Tiermodell für AHS gezeigt werden (Nicoletti *et al.*, 1987; Akbar *et al.*, 1996; Nicoletti *et al.*, 1996; Blümcke *et al.*, 2000; Notenboom *et al.*, 2006). In Hippokampi von TLE-Patienten scheinen sich die Regionen der mGluR4-Expression zu ändern. So wurde eine Hochregulation hauptsächlich in der Molekularschicht des Gyrus dentatus und in der CA2-Region gefunden und dort war mGluR4 in postsynaptischen Elementen der CA2-Pyramidenzellschicht und in der Molekularschicht des Gyrus dentatus lokalisiert (Tang *et al.*, 2001). Eine andere Studie zeigt einen Anstieg der mGluR4-Expression, der in humanen Proben von Patienten mit TLE nicht auf präsynaptische Abschnitte beschränkt ist, sondern auch dendritische Kompartimente der Körnerzellen und Pyramidenzellen umfasst (Lie *et al.*, 2000). Dieser Anstieg der Expression der inhibitorischen Gruppe III mGluRs wird im Zusammenhang mit Neuroprotektion gesehen (Bruno *et al.*, 2000).

Diese Erkenntnisse werfen die Frage auf, ob differenzierte Regulationsmechanismen von bestimmten mGluR-Subtypen zur Pathogenese der humanen TLE beitragen und ob die mGluRs als potenzieller Angriffspunkt für die medikamentöse Behandlung der chronischen pharmakoresistenten Epilepsie dienen könnten.

2.4 Kalziumionenkanäle

Der Fortschritt in Molekularbiologie hat in den letzten Jahren dazu geführt, dass die molekulare Grundlage der verschiedenen Klassen der Ca^{2+} -Kanäle besser verstanden wird. Die unterschiedliche Pharmakologie der verschiedenen Subtypen und das Vorhandensein von Maus-Knockout-Modellen machen es möglich, den Zusammenhang zwischen diesen Kanälen und der Epilepsie zu untersuchen.

Von allen exzitatorischen Zellen besitzen Neurone die größte Vielfalt an Ca^{2+} -Kanälen, von denen die meisten Funktionen bisher nur teilweise verstanden werden. Ca^{2+} -Kanäle sind Ionenkanäle, die eine kalziumselektive Pore durch die Plasmamembran formen. Bei einem großen Teil der Ca^{2+} -Kanäle wird das Öffnen und Schließen durch Spannung vermittelt (Abbildung 5; spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle; engl.: voltage gated Calcium Channels, Cav). Außerdem gibt es kalziumselektive Kanäle, die durch Ligandenbindung oder andere Mechanismen gesteuert werden. Spannungssensitive Ca^{2+} -Kanäle verstärken neuronale Signale und ermöglichen so die effiziente Weiterleitung des Signals zum Soma. Unter physiologischen Bedingungen sind diese nahezu selektiv für Ca^{2+} .

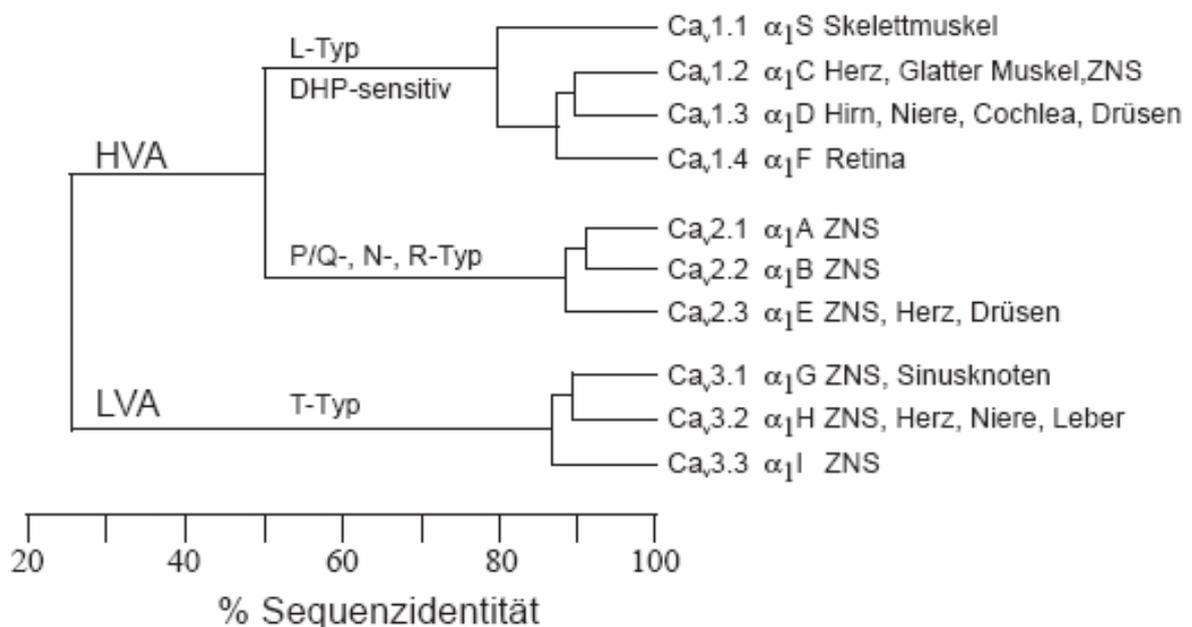


Abbildung 5: Nomenklatur und Grad der verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen. HVA: high voltage activated (durch hohe Spannung aktiviert); LVA low voltage activated (durch niedrige Spannung aktiviert). Neben der aktuellen Cav-Nomenklatur sind noch die früheren α_1 -Bezeichnungen, der Typ des erzeugten Stromes sowie die Gewebeverteilung aufgeführt (Ertel *et al.*, 2000).

Die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle kommen in allen exzitatorischen Zellen, wie zum Beispiel in Neuronen, Muskeln und endokrinen Zellen, aber auch in vielen anderen nicht-exzitatorischen Zellen, wie zum Beispiel in Fibroblasten, vor. Diese Kanäle haben zwei Hauptfunktionen. Sie übertragen in vielen exzitatorischen Zellen das elektrische Signal in Form eines Aktionspotenzials in ein intrazelluläres Signal durch den Anstieg von intrazellulärem freiem Ca^{2+} ; welches dann eine Vielzahl von intrazellulären Signaltransduktionen moduliert. Außerdem führen sie

durch die elektrische Ladung des Ca^{2+} zu einer weiteren Depolarisation des Membranpotenzials der Zelle. Beide Funktionen hängen von der jeweiligen spannungsabhängigen Öffnung der Kanäle ab. Bei einem normalen Ruhepotenzial (-90 bis -60 mV) sind sie geschlossen. Sie öffnen sich jedoch bei ausreichend hoher Depolarisation der Membran. Abhängig vom Subtyp des Ca^{2+} -Kanals öffnen sich diese bei Spannungen zwischen -65 und -20 mV.

Die Ca^{2+} -Kanäle können aufgrund verschiedener Spannungsabhängigkeit, Kinetik und ihrer Sensitivität für verschiedene Blocker unterschieden werden. Ein weiterer Unterschied ist der Grad der Depolarisation, der nötig ist, um den Kanal zu öffnen. Kanäle, die eine höhere Depolarisation benötigen, werden hochschwellige (engl.: high threshold) oder durch hohe Spannung aktivierte (engl.: high voltage activated, HVA) Kanäle genannt. Zu diesen Kanälen gehören die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle („lang anhaltend“), die N-Typ- Ca^{2+} -Kanäle („neuronal“), die P/Q-Typ- Ca^{2+} -Kanäle („Purkinje-Zelle“, Q, weil das der Buchstabe nach P ist) und die R-Typ- Ca^{2+} -Kanäle („resistent“). Kanäle, die eine niedrige Depolarisation (-60 bis -50 mV) benötigen, werden niedrighschwellige (engl.: low threshold) oder durch niedrige Spannung aktivierte (engl.: low voltage activated, LVA) Kanäle genannt (Fishman *et al.*, 1981; Nowycky *et al.*, 1985; Perez-Reyes, 2003). Zu diesen Kanälen gehören die sogenannten Cav3.1-, Cav3.2- und Cav3.3-Subtypen, welche auch T-Typ-Kanäle genannt werden, weil sie generell transiente und kleine („tiny“) Einzel-Kanal-Ströme aufweisen (Perez-Reyes, 2003).

Alle spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanäle sind große transmembrane Komplexe, die aus vier oder fünf verschiedenen Proteinen bestehen. Die α_1 -Untereinheit ist mit 190 - 200 kDa die größte und die wichtigste Einheit, da sie die kalziumsensitive Pore durch die Plasmamembran bildet. Bis heute wurden zehn verschiedene α_1 -Untereinheiten identifiziert (Ertel *et al.*, 2000). Diese Untereinheiten setzen sich aus 24 Transmembran-Segmenten zusammen, welche aus vier Pseudountereinheiten bestehen. Die α_1 -Untereinheit kann durch ihre elektrophysiologischen Eigenschaften und durch ihre Sensitivität gegenüber spezifischen Substanzen klassifiziert werden. Es sind bisher zehn Gene bekannt, die für verschiedene α_1 -Untereinheiten kodieren. Diese können in drei Unterfamilien eingeteilt werden (Cav1, Cav2 und Cav3). Die Cav3-Familie besteht aus drei Genen, von denen jedes für eine α_1 -Untereinheit eines T-Typ-Kanals kodiert, der niedrighschwellige Ströme verursacht (Perez-Reyes, 1999). Neben der

α_1 -Untereinheit existieren auch verschiedene kleinere zytoplasmatische regulatorische Untereinheiten. Hierzu zählen die $\alpha_2\delta$, γ , β_1 , β_2 , β_3 und β_4 -Untereinheiten, welche verschiedene biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften der α_1 -Untereinheit modifizieren (Abbildung 6). Die β -Untereinheit ist ein intrazelluläres Protein (Helton *et al.*, 2002), das die exakte Spannungssensitivität und die Kinetik der Kanäle zu modifizieren scheint (Sokolov *et al.*, 2000). Jeder Kanaltyp hat eine dominante β -Untereinheit, mit der er assoziiert ist (Arikkath *et al.*, 2003). Das $\alpha_2\delta$ Protein-Paar, welches durch eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden ist, besitzt ein einzelnes transmembranes Segment und scheint intrazelluläre Prozesse zu regulieren und die Expression des Kanals zu verbessern (Hofmann *et al.*, 1999). Für die hier untersuchten T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle sind Untereinheiten noch nicht bekannt.

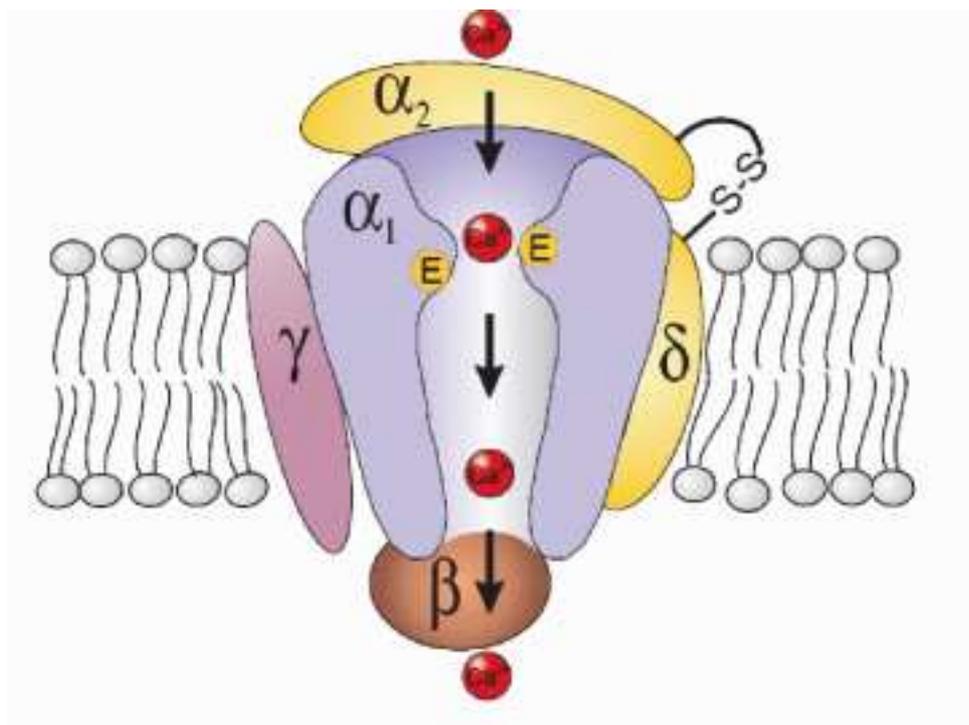


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals in der Plasmamembran. Er besteht aus der α_1 - und den akzessorischen β -, γ - und δ -Untereinheiten (Hofmann *et al.*, 1999).

Die T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle werden im ganzen Körper, einschließlich Nervengewebe, Herz, Niere, glatte Muskulatur, Sperma und in vielen endokrinen Organen exprimiert. Sie benötigen eine sehr niedrige Depolarisation, um geöffnet zu werden. Dies erklärt die Rolle dieser Kanäle bei der Entstehung von spontaner oder schrittmacher elektrischer Aktivität (Bean, 2001).

Aktiviert ein eingehendes exzitatorisches synaptisches Potenzial, welches die Zelle vom Ruhemembranpotenzial aus depolarisiert, die unterschwellig aktiven T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, so gelangen durch diese positiv geladene Kalzium-Ionen in die Zelle. Dadurch depolarisiert das Membranpotenzial weiter, was noch mehr Kanäle aktiviert und die Formation zu einem Aktionspotenzial führt. Obwohl diese Depolarisation Ca^{2+} -Kanäle aktiviert, führt eine anhaltende Depolarisation häufig zu einem abfallenden Strom. Dieser Prozess heißt Inaktivierung. Die T-Typ-Kanäle zeigen die schnellste Inaktivierung, welche typischerweise in einer Zwanzigstel-Millisekunde vonstatten geht. Diese spannungsabhängige Inaktivierung setzt umso schneller ein, je stärker die Depolarisation ist. Diese Inaktivierung stellt einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus dar, der sich bei einer lang anhaltenden Depolarisation in einem verminderten Ca^{2+} -Einstrom äußert. Unter pathophysiologischen Bedingungen stellt diese Inaktivierung einen wichtigen protektiven Mechanismus dar, da so zum Beispiel einem massiven Ca^{2+} -Einstrom, welcher Zellen zerstören kann, vorgebeugt wird.

Die Aktivierung der T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle in Neuronen führt über die Aktivierung anderer spannungsabhängiger Ionenkanäle zu einem sogenannten salvenartigen Feuern von Aktionspotenzialen („bursten“) (Huguenard, 1996; Su *et al.*, 2002). Cav3-Kanäle zeigen eine langsame Deaktivierung bis zur Repolarisation der Membran (Carbone *et al.*, 1984; Kozlov *et al.*, 1999). Die T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle sprechen auf keinen der bekannten organischen Ca^{2+} -Kanal-Blocker an. Jedoch sind sie unterschiedlich sensitiv gegenüber Nickel (Moolenaar *et al.*, 1978; Lee *et al.*, 1999; Satin *et al.*, 2000), was vor allem auf den Cav3.2-Kanal zutrifft (Lee *et al.*, 1999).

Über die Mechanismen der intrinsischen Plastizität bei der Epileptogenese ist jedoch nur wenig bekannt. Es gibt aber zahlreiche Studien die belegen, dass lang anhaltende Veränderungen bei der Expression der spannungs- und Ca^{2+} -abhängigen Ionenkanäle in der neuronalen Zellmembran hierzu beitragen. Eine Dysfunktion dieser Kanäle kann eine Reihe von neurologischen Funktionsstörungen wie zum Beispiel Epilepsie zur Folge haben (Shin *et al.*, 2006). Es konnten Mutationen im Cav3.2-Gen bei Kindern mit kindlicher Absenz-Epilepsie (CAE) gefunden werden (Chen *et al.*, 2003; Khosravani *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2006; Peloquin *et al.*, 2006). Bei der funktionellen Untersuchung wurde bei einigen dieser Mutationen bei physiologischer Aktivierung ein größerer

Ca²⁺-Einstrom gemessen oder eine Kanalöffnung bei niedrigeren Potenzialen nahe dem Ruhemembranpotenzial beobachtet. Dies führt zu einer gesteigerten Anfallsneigung bei Patienten mit CAE. Außerdem wurden Mutationen im Gen dieses T-Typ-Ca²⁺-Kanals bei Patienten mit idiopathischer generalisierter Epilepsie gefunden (Heron *et al.*, 2004). Diese Mutationen weisen funktionelle Veränderungen auf, die zu einer ständig erhöhten Kanalfunktion führen. Diese Daten implizieren gemeinsam mit vorherigen Untersuchungen, dass das Gen für Cav3.2 (CACNA1H) als ein empfängliches Gen im Komplex der idiopathischen generalisierten Epilepsie gelten kann. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass viele Mutationen in Bereichen der Cav-Gene letale Folgen haben (Gregg *et al.*, 1996; Beurg *et al.*, 1999; Ball *et al.*, 2002). Es sind einige Mutationen in Genen der akzessorischen Untereinheiten bekannt, die mit Krankheiten wie familiärer Epilepsie und Ataxie (Escayg *et al.*, 2000), Autoimmunerkrankungen (Raymond *et al.*, 1999) und Multipler Sklerose (Saarela *et al.*, 2002) einhergehen.

Obwohl ein Zusammenhang zwischen Cav3.2 und Epilepsie hergestellt werden konnte, ist die genaue funktionelle Rolle dieses Kanals und sein Einfluss auf die Epileptogenese noch nicht eindeutig geklärt.

2.5 Tiermodelle

In den vergangenen Jahrzehnten wurde in der Epilepsieforschung eine Vielzahl tierexperimenteller Modelle etabliert, um Einblicke in die pathophysiologischen Vorgänge zu gewinnen, die einem SE beziehungsweise den hieraus resultierenden rekurrenten epileptischen Anfällen zugrunde liegen. Der entscheidende Vorteil dieser Modelle liegt darin, dass sie dem Untersucher ermöglichen, strukturelle und funktionelle Veränderungen des Hirngewebes zu allen Zeitpunkten und in allen Hirnregionen im Verlauf der Epileptogenese zu analysieren. Das Gehirn kann dabei unter Verwendung physiologischer, pharmakologischer und histologischer Techniken detailliert untersucht werden (Coulter *et al.*, 2002). Ein großes Hindernis für jede Analyse von Gehirngewebe epileptischer Patienten stellen, neben ethischen Gründen, zum Vergleich notwendige Kontrollen dar. Außerdem wird die Analyse der Konsequenzen eines SE oder von Anfällen durch zahlreiche Einflussfaktoren erschwert. Hierzu zählen unter anderem die Ätiologie der Erkrankung, das Alter des Patienten, sowie die Einnahme antiepileptischer Medikamente. Tiermodelle bieten daher einen Vorteil bezüglich der Kontrollierbarkeit beziehungsweise der Standardisierbarkeit dieser

Variablen, daher können verschiedene Modelle durch Vergleiche von humanen und experimentellen Epilepsien hierbei von großem Nutzen sein. Am häufigsten in Tiermodellen eingesetzt werden Mäuse und Ratten. Grundsätzlich können menschliche Krankheitsbilder in Tiermodellen nicht in allen Aspekten übereinstimmend nachgeahmt werden. Dennoch sollte ein gutes Tiermodell einige Voraussetzungen erfüllen. Es sollte entweder die Symptome und/oder die Pathogenese der zu untersuchenden Krankheit zeigen. Bekannte Pharmaka zur Behandlung der entsprechenden Krankheit sollten im Tiermodell eine Wirkung haben, damit eine gewisse Sicherheit gegeben ist, dass die im Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse auch auf den Menschen übertragbar sind. Ist jedoch die Pathogenese einer Erkrankung nicht bekannt, so wie es bei der Epilepsie der Fall ist, kann man lediglich darauf achten, dass das Tiermodell der Epilepsie ähnliche Symptome aufweist. Kein Tiermodell erfüllt alle diese Kriterien, d.h. für jedes Forschungsvorhaben muss das am besten geeignete Modell ausgewählt werden.

Es gibt zwei Arten von Epilepsie-Modellen. Zum einen gibt es Tiere mit Spontanmutationen, d.h. genetischen Veränderungen, die mit Epilepsien einhergehen, zum anderen gibt es Modelle, bei denen durch bestimmte Manipulationen des Tieres die Symptome der Erkrankung erzeugt werden. Bei Letzterem können zwei Modelltypen unterschieden werden. Zum einen gibt es Anfallsmodelle, bei denen durch elektrische oder chemische Induktion ein epileptischer Anfall ausgelöst wird. Charakteristisch hierbei ist somit, dass das Tier ohne die Induktion auch keinen Anfall hat, d.h. das Tier hat keine Epilepsie. Dieser Modelltyp wird auch akutes Modell genannt. Zum anderen gibt es Epilepsie-Modelle, welche chronische Modelle darstellen. Die Tiere haben durch einen primären Insult, der chemisch oder elektrisch ausgelöst wird, nach einer gewissen Zeit (Latenzzeit) spontane epileptische Anfälle im Sinne einer chronischen Epilepsie. Dieses Epilepsie-Modell weist Vorteile auf, da hier die Situation simuliert wird, die beim Menschen, zum Beispiel nach einem Schädel-Hirn-Trauma oder einem SE mit anschließend auftretender Temporallappenepilepsie gegeben ist.

Bei den meisten verfügbaren Modellen handelt es sich eher um Anfalls- als um Epilepsiemodelle. Verglichen mit Anfallsmodellen ist der Einsatz von Epilepsiemodellen zeitintensiver und erfordert eine Haltung der Tiere. Die Latenzphase muss abgewartet werden, wobei die Länge abhängig vom gewählten

Modell, aber auch vom jeweiligen Verhalten des Tieres ist. Danach beginnt eine systematische Überwachung der Tiere, um das spontane Auftreten der Anfälle untersuchen zu können. Die geläufigsten Tiermodelle für fokale limbische Epilepsien sind durch Kainat, Pilocarpin oder Elektrostimulation induzierte (Kindling) chronische Anfälle. Transgene Mäuse mit gezielten Mutationen in Genen, deren Einfluss auf die Entstehung und Weiterentwicklung der Epilepsie untersucht werden soll, spielen eine wichtige Rolle.

Von den zahlreichen experimentellen Modellen, die für die Analyse epileptischer Aktivität und ihrer Folgen zur Verfügung stehen (Dichter, 1998), wird im Folgenden nur das in der vorliegenden Arbeit verwendete Pilocarpin-Modell vorgestellt.

2.5.1 Chemisch induzierte Epilepsiemodelle

Der Einsatz von konvulsiv wirkenden Substanzen wird häufig zur Erzeugung epilepsiekranker Tiere verwendet. Die am häufigsten benutzten Chemokonvulsiva sind Kainat und Pilocarpin (Morimoto *et al.*, 2004). Ein SE wird in der Regel durch einmalige fokale oder systemische Applikation induziert. Nach Verstreichen einer Latenzphase führt dies zu spontanen fokalen oder generalisierten Anfällen.

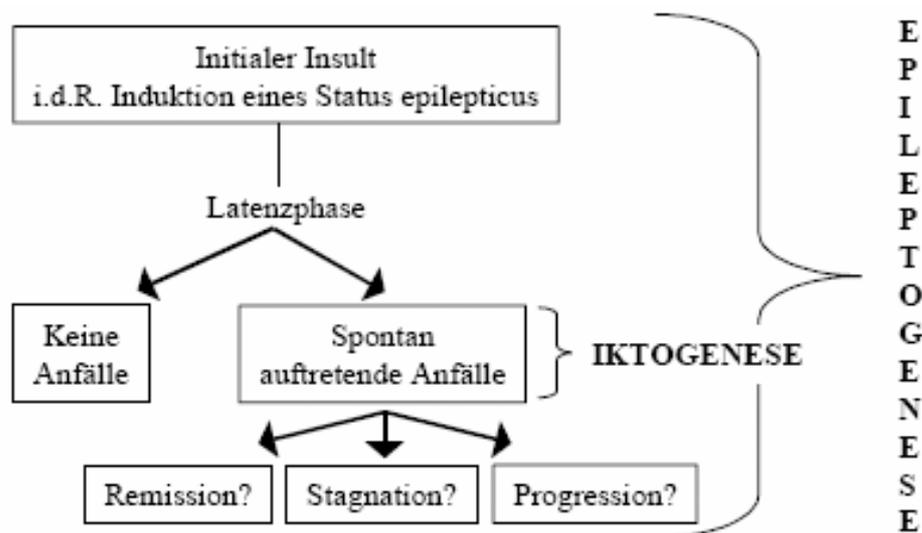


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Verlaufs induzierter Epilepsiemodelle nach Cole (Cole, 2000).

Verschiedene Phasen der Erkrankung sowie eine pharmakologische Beeinflussbarkeit können in einem solchen Tiermodell untersucht werden (Abbildung 7). Hierzu gehört 1) der akute SE sowie seine Bedeutung als initialer

Insult zur Induktion der Epileptogenese; 2) Prozesse, die in der Latenzphase ablaufen und schließlich zum Auftreten spontaner Anfälle führen; 3) die Analyse einzelner epileptischer Anfälle (Iktogenese); 4) die Pathomechanismen, die der Erkrankung zugrunde liegen (Epileptogenese) und schließlich 5) der möglicherweise progressive Verlauf von Epilepsien {Übersicht von (Cole, 2000)}.

2.5.1.1 Pilocarpin-Modell

Pilocarpin ist ein Agonist der muscarinergen Acetylcholinrezeptoren (Turski *et al.*, 1983), welcher die prokonvulsive Wirkung jedoch letztendlich durch eine sekundäre Glutamatfreisetzung erzielt (Savolainen *et al.*, 1994). Mitte der 80er Jahre führten Hinweise, dass cholinerge Bahnen im zentralen Nervensystem an der Ausbreitung von Krampfaktivität beteiligt sind (Olney *et al.*, 1983; Wasterlain *et al.*, 1983), zur Etablierung des Pilocarpin-Modells bei der Ratte (Turski *et al.*, 1983). Ratten entwickeln nach der systemischen Applikation von Pilocarpin fokale beziehungsweise komplex-fokale Anfälle mit sekundärer Generalisierung und einem SE (Turski *et al.*, 1983). Cavalheiro (Cavalheiro *et al.*, 1991) beobachtete, dass diese Ratten einige Wochen nach einem SE spontan auftretende epileptische Anfälle zeigten. Da die meisten transgenen Tiere Mäuse sind, wurde die Etablierung dieses Modells auch bei der Maus nötig. Erste Untersuchungen an Mäusen wurden 1984 veröffentlicht (Turski *et al.*, 1984). Es wurden verschiedene Mauslinien im Pilocarpin-Modell untersucht, zum Beispiel Albino-Mäuse, CD1-, C57BL/6- und FVB/N-Mäuse (Cavalheiro *et al.*, 1996; Berkeley *et al.*, 2002; Shibley *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005). In der Literatur wird die einmalige systemische Applikation von 272 bis 340 mg/kg KM i. p. oder s. c. zur Erreichung eines SE beschrieben (Cavalheiro *et al.*, 1996; Berkeley *et al.*, 2002; Shibley *et al.*, 2002; Winokur *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). Bei Ratten wird eine weitere Nachinjektion der Hälfte der Initialdosis beschrieben, wenn die Tiere eine Stunde nach der ersten Applikation keine generalisierte Krampfaktivität zeigen (Gibbs *et al.*, 1997). Aufgrund der starken cholinergen Wirkung des Pilocarpins, erhalten die Tiere 20 - 30 min vor der Pilocarpin-Applikation 1 mg/kg KM Methyl-Skopolamin (i. p. oder s. c.). Methyl-Skopolamin ist ein cholinerges Antagonist, der wegen seiner quartären Ammoniumgruppe nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren kann. Er hebt somit lediglich die peripheren cholinergen Wirkungen des Pilocarpins auf.

Nach der Pilocarpin-Injektion zeigen die Tiere zunächst eine Hypoaktivität, die in fokale Krampfaktivität, wie Kauen und stereotypes Kopfnicken, übergeht. Nach

ca. 20 – 60 min entwickeln ca. 40 – 100% der Tiere einen SE (Turski *et al.*, 1983; Clifford *et al.*, 1987; Covolan *et al.*, 2000). Dieser induzierte SE hält 5 bis 24 h an.

Es konnte gezeigt werden, dass die Länge des SE positiv mit der Mortalität korreliert (Goodman, 1998), so dass Sterblichkeitsraten von anfänglich 83 - 100% durch eine Reduzierung der Dosis, die Verabreichung von Methyl-Skopolamin und/oder die medikamentöse Unterbrechung des SE auf 25 - 45% verringert werden konnte (Turski *et al.*, 1984; Leite *et al.*, 1995). Für die Unterbrechung des SE kommen verschiedene Antikonvulsiva wie Diazepam (Benzodiazepin) und/oder Barbiturate in Frage. Zum Einsatz kommen hierfür einmalige oder wiederholte Applikationen, bei Diazepam mit einer Dosis von 4 – 10 mg/kg KM, (Clifford *et al.*, 1987; Leite *et al.*, 1995; Mello *et al.*, 1996; Gibbs *et al.*, 1997). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine SE Länge von 30 min nicht ausreichend ist, um in den Tieren spontane Anfälle in der chronischen Phase zu erzeugen (Lemos *et al.*, 1995; Klitgaard *et al.*, 2002). Nach einem SE weisen die Tiere häufig ein stark gestörtes Allgemeinbefinden auf, wodurch eine aufwendige Betreuung mit Flüssigkeitssubstitution und Verabreichung leichtverdaulicher Kost nötig wird, um die Überlebensrate zu erhöhen (Cavalheiro *et al.*, 1991; Mello *et al.*, 1993; Gibbs *et al.*, 1997). Es schließt sich eine Latenzphase an, in der die Tiere keine spontanen Anfälle zeigen. Diese Latenzzeit liegt bei durchschnittlich 14 Tagen (zwischen 3 und 50 Tagen). Nahezu alle Tiere, die einen SE hatten, bekamen nach dieser Latenzzeit spontane Anfälle (Cavalheiro *et al.*, 1991; Mello *et al.*, 1993; Mello *et al.*, 1996; Arida *et al.*, 1999). Zunächst treten bei den meisten Ratten fokale Anfälle auf, die mit der Zeit stärker werden und schließlich sekundär generalisieren. Wenn sekundär generalisierte Anfälle auftreten, sind die folgenden Anfälle meistens ebenfalls durch diesen Typ bestimmt (Cavalheiro *et al.*, 1991). Betrachtet man die Frequenz der auftretenden Anfälle, so ist ein Anstieg der Anfallszahlen zu beobachten, der dann konstant bleibt. Anfallsschwere und -dauer verändern sich nicht (Arida *et al.*, 1999). Bei einzelnen Tieren kann die Anfallsfrequenz variieren. Die Varianz bewegt sich zwischen wenigen Anfällen im Monat, bis hin zu mehreren Anfällen täglich. Es werden mehr Anfälle in der Hell- als in der Dunkelphase beobachtet. Bei zahlreichen Tieren treten sogenannte Anfalls-Cluster auf, wobei die Tiere mehrere spontane Anfälle innerhalb weniger Stunden erleiden, gefolgt von einer anfallsfreien Phase über einige Tage. Eine Spontanremission der Anfälle wird im Pilocarpin-Modell nicht beobachtet

(Cavalheiro *et al.*, 1991; Leite *et al.*, 1995; Arida *et al.*, 1999). Wichtig ist also eine lückenlose Erfassung dieser Krampfaktivität.

Das histologische Bild der Gehirne von chronisch epileptischen Ratten und Mäusen ist von degenerativen Veränderungen der hippokampalen Formation geprägt, so ist im Hilus des Hippokampus und bei den Pyramidenzellen ein Zellverlust zu erkennen. Außerdem ist im Hippokampus Astrogliose und Moosfasersprossung als Zeichen für synaptische Reorganisation zu finden (Cavalheiro *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2000). Insgesamt ist die Neuropathologie nach einem Pilocarpin-induziertem SE der Neuropathologie der menschlichen Temporallappenepilepsie ähnlich (Turski *et al.*, 1983; Clifford *et al.*, 1987). Auch elektroenzephalografische, pharmakologische und klinische Befunde sind vergleichbar mit denen der Temporallappenepilepsie beim Menschen (Turski *et al.*, 1983; Clifford *et al.*, 1987; Turski *et al.*, 1989; Löscher, 1999).

2.6 Analyse spontaner Anfälle

Die Untersuchung von Tieren in einem Epilepsie-Modell erfordert eine gute systematische Analyse, da ein Anfall jederzeit auftreten kann. In der Literatur sind hierzu verschiedene Vorgehensweisen beschrieben, die sich hinsichtlich des technischen, personellen und zeitlichen Aufwands unterscheiden. Da die Anfälle in induzierten Epilepsiemodellen hauptsächlich in der Inaktivitäts-, also in der Hellphase auftreten (Bertram *et al.*, 1994; Arida *et al.*, 1999; Hellier *et al.*, 1999; Nissinen *et al.*, 2000), stellt technisch die einfachste, aber auch die personal- und zeitaufwendigste Methode die direkte Beobachtung der Tiere dar. Nachteil dieser Methode ist jedoch die fehlende Dokumentation der Anfälle (Leite *et al.*, 1995). Eine Alternative ist die Videoüberwachung der Tiere. Der technische Aufwand ist vertretbar und die Aufnahme ist in der Hell- und in der Dunkelphase möglich {zum Beispiel von (Arida *et al.*, 1999) eingesetzt}. Als Vorteil ist die Zeitersparnis zu nennen, da die Videobänder im Schnelldurchlauf durchgesehen werden können. Außerdem ist eine dauerhafte Dokumentation der Anfälle gewährleistet. Es können jedoch leicht Anfälle übersehen werden, wenn Tiere eine ungünstige Position zur Kamera einnehmen, so dass ihr Verhalten nicht eindeutig beurteilbar ist oder die auswertende Person nimmt den Anfall im schnellen Vorlauf nicht wahr. Eine technisch anspruchsvolle und kostenintensive Methode ist die Kombination von EEG- und Videoüberwachung. Die von mehreren Tieren gleichzeitig abgeleiteten EEG-Signale können hinsichtlich der Anfallsfrequenz ausgewertet

werden. Anhand der Videoaufzeichnung ist eine visuelle Kontrolle und Klassifikation spontaner Anfälle möglich. Der entstehende Zeitaufwand wird bei einer 24 h Aufnahme von 15 Tieren mit 30 bis 90 min beziffert (Bertram *et al.*, 1997). Die Ableitung eines EEGs setzt allerdings die Implantation von Kortexschrauben oder Tiefenelektroden voraus, was bei chemisch induzierten Epilepsiemodellen eine weitere Belastung der Tiere darstellt. Als weitere Komplikation ist die Möglichkeit zu nennen, dass der Ableitungsaufbau, der die Elektroden am Schädel fixiert, verloren werden kann. Mumford (Mumford *et al.*, 2001) beschreibt eine neue Methode für EEG-Ableitungen, bei der die Anfallsdetektion bei Meerschweinchen über Oberflächenelektroden gemessen und telemetrisch übertragen wird. Bei Mäusen wurde ebenfalls mit Hilfe eines telemetrischen Systems intrazerebellares sowie kortikales EEG abgeleitet, wobei der Transmitter intraperitoneal implantiert wurde (Weiergraber *et al.*, 2005). In der Gesamtübersicht stellt das hier verwendete Verfahren die derzeit beste Lösung dar.

3 ZIELSETZUNG

Die Entwicklung der Temporallappenepilepsie (TLE) geht mit veränderter Expression und Verteilung verschiedener Moleküle einher. In epilepsiechirurgischen Biopsiepräparaten von Patienten mit pharmakoresistenter TLE ebenso wie in Tiermodellen für TLE sind Neurotransmitter-Rezeptoren sowie Ionenkanäle entsprechenden Veränderungen unterworfen. Tiermodelle für TLE erlaubten einen Einblick in die frühe Epileptogenese. Diese zeigten, dass der Status epilepticus (SE) als transiente Phase gesteigerter neuronaler Aktivität zu anhaltenden Veränderungen der Expression der hier zu untersuchenden metabotropen Glutamatrezeptoren und spannungsabhängigen Kalziumkanäle führt. In diesem Zusammenhang trägt die erworbene aberrierende Expression von mGluR1 und mGluR4 potenziell zu abnormer synaptischer Signalübertragung innerhalb der Hippokampus-Formation bei, während die modifizierte Transkription von Cav3.2 zu pathologischer intrinsischer Aktivität hippocampaler Neurone führt. Ungeklärt im Hinblick auf die Rolle von mGluR1 und mGluR4 sowie Cav3.2 bei der TLE ist, ob es sich bei den beobachteten hippocampalen Veränderungen der Expression und Verteilung um pro- oder antiepileptogene Mechanismen oder möglicherweise lediglich um Epiphänomene der TLE handelt.

Ziel dieser Arbeit war es, die funktionelle Relevanz der exzitatorischen mGluR1, der inhibitorischen mGluR4 sowie der für das intrinsische neuronale Entladungsverhalten relevanten Ca^{2+} -Kanal-Untereinheit Cav3.2 detailliert zu analysieren. In diesem Zusammenhang sollten transgene Tiermodelle Verwendung finden. Initiale Aufgabenstellungen stellten in diesem Zusammenhang die Generierung einer transgenen Mauslinie dar, die mGluR1 hippocampal überexprimiert, die Etablierung eines Modells für TLE in den verschiedenen transgenen Linien sowie der Aufbau einer permanenten telemetrischen EEG/Video-Aufnahmeeinheit zur Analyse spontaner epileptischer Anfälle. Diese Voraussetzungen erlaubten die Bearbeitung der Fragestellung, ob in entsprechenden transgenen Mäusen (a) die Empfindlichkeit gegenüber der Induktion eines SE durch Pilocarpin verändert und/oder (b) chronisch spontane Anfallsaktivität und -schwere moduliert waren. Eine weitere wesentliche Fragestellung dieser Arbeit war es, zu klären, inwiefern die Ammonshornsklerose als hippocampales Schädigungsmuster der TLE in mGluR1-überexprimierenden,

sowie mGluR4- und Cav3.2 defizienten Mäusen nach SE verändert war. Diesem Ziel diente die neuropathologische Untersuchung des neuronalen Zellunterganges sowie der rekurrenten Moosfasersprossung als Ausdruck struktureller Reorganisation. Die skizzierten Untersuchungen eröffneten die Perspektive eines verbesserten Verständnis der funktionellen Konsequenzen erworbener synaptischer und intrinsischer neuronaler Plastizität für die Pathogenese der TLE.

4 MATERIAL UND METHODIK

4.1 Material

4.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Versuche wurden ausschließlich männliche transgene Mäuse und die entsprechenden Wildtyp-Wurfgeschwister-Tiere (WT) verwendet, um durch den Hormonzyklus bedingte Varianzen auszuschließen. Die mGluR4-KO-Mauslinie (Pekhletski *et al.*, 1996; Bruno *et al.*, 2000) wurde freundlicher Weise von Dr. P. J. Flor und Dr. H. van der Putten, Novartis Institutes for Biomedical Research, Basel und die Cav3.2-KO-Linie (Joksovic *et al.*, 2006) von Prof. Campbell, Universität Iowa, zur Verfügung gestellt. Für die Züchtung der mGluR4 und der Cav3.2-KO-Mäuse wurden heterozygote Mäuse verpaart, um die entsprechenden WT- und KO-Tiere ("Knock out") zu erhalten. Die transgenen mGluR1-EGFP-Mäuse entstanden aus einer Verpaarung, bei der jeweils ein Elterntier heterozygot das transgene Konstrukt trug. Die Haltung erfolgte, bis zum Versuchsbeginn, in Gruppen von bis zu 5 Tieren in Käfigen aus Makrolon[®] des Typs M-2L. Als Einstreu diente Weichholzgranulat (lignocell, Rettenmaier und Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg). Die Mäuse erhielten ein kommerzielles pelletiertes Futter (ssniff R/M-H, 10 mm, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) sowie Leitungswasser *ad libidum*. Das Futter wurde einmal pro Woche und das Wasser zweimal pro Woche erneuert. Einmal in der Woche wurden die Mäuse in saubere Käfige umgesetzt. Das Umsetzen der Mäuse in die Versuchsräume erfolgte ca. 1 Woche vor den Versuchen, um eine Beunruhigung der Mäuse direkt vor dem Experiment zu vermeiden. Die Tiere wurden während der gesamten Zeit unter kontrollierten Umweltbedingungen, mit einem 12-h-Hell-Dunkel-Zyklus, einer Umgebungstemperatur von 22 - 24°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 - 60%, gehalten. Nach Induktion des Status epilepticus (SE) wurde auf Einzelhaltung umgestellt, um Verletzungen zu verhindern, die durch das zunehmende aggressive Verhalten der Tiere entstehen können (Persinger *et al.*, 1993). Die Tierversuche wurden mit Einverständnis der zuständigen Behörde (Aktenzeichen: 23.203.2-BN 28, 20/00 und 50.203.2-BN 59, 53/05) sowie nach Absprache mit dem Tierschutzbeauftragten der Universität Bonn durchgeführt.

4.1.2 Verwendete Substanzen

Substanz	Firma
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrachlorid (DAB)	Vector
6 x Ladepuffer-Agarose-Gelelektrophorese	Fermentas
AB Komplex	Vector
Agarose (peqGold Universalagarose)	Peqlab
Aqua ad iniectabilia	DeltaSelect
Borax	Sigma
Carprofen (Rimadyl [®])	Pfizer
Corbit-Balsam	Hecht, Kiel
Dexpanthenol-Augensalbe (Bepanthen [®])	Roche
Diazepam (Diazepam-ratiopharm [®])	ratiopharm
Dinatriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Enrofloxacin (Baytril [®])	Bayer
Eosin 1%	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid (EtBr)	Fluka
Fötales Kälberserum (FCS)	Seomed
GFP Antikörper	ab290, Abcam
Glucose	Sigma
Glutaraldehyd	Roth
Gum arabicum	Sigma
Hautdesinfizienz (Cutasept [®] F)	Bode
Hydrochinon	Merck
Isofluoran (Forene [®])	Abbott
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Ketamin (Ketavet [®])	Pharmacia-Upjohn
Kryo-Einbettmedium	Dako
Kunststoff, Kaltpolymerisat (Paladur [®])	Heraeus
Natriumcitrat	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumsulfit (Na ₂ S)	Sigma
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Sigma
Natronlauge	Sigma
NeuN-Antikörper	Chemicon
Papanicolau 1a)	Merck
PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	Biochrom
Pilokarpinhydrochlorid	Sigma
Ringer	Fresenius
Salzsäure	Sigma
Scopolaminmethylnitrat	Sigma
Silbernitrat (AgNO ₃)	Sigma
Saccharose	Sigma
SYBR [®] Green PCR Master Mix	Invitrogen
Toluidinblau	Fluka
Xylazin (Rompun [®])	Bayer
Xylol	Merck
Zitronensäure	Fluka

4.1.3 Stammlösungen

PBS

1,48 g Na₂HPO₄

0,43 g KH₂PO₄

7,2 g NaCl

Für die Timm-Färbung:

Phosphatpuffer 0,15 M:

Lösung A: 26,70 g Na₂HPO₄ auf 1 Liter auffüllen

Lösung B: 20,70 g Na₂HPO₄ auf 1 Liter auffüllen

Zusammengeben gleicher Mengen Lösung A und Lösung B, pH auf 7,4 einstellen (mit NaOH oder HCl)

Toluidinblaulösung:

1 g Toluidinblau + 4 g Borax in 400 ml A. dest. bei 60°C rühren

Lösung 1 = Reaktionslösung

1,19 g Na₂HPO₄ + 1,17 g Na₂S + 100 ml A. dest.

Lösung 2:

100 ml Phosphatpuffer 0,15 M + 1,2 ml Glutaraldehyd (25%)

Lösung 3 = Fixierungslösung

70%iger Ethanol

Saccharoselösung:

30 g Saccharose auf 100 ml Phosphatpuffer (0,15 M) auffüllen

Gum arabicum für Entwickler:

62,5 g Gum arabicum ad 125 ml A. dest.

Entwicklungslösung:

80 ml A. dest. + 120 ml Gum arabicum + 5,1 g Zitronensäure + 7,1 g Natriumcitrat + 3,4 g Hydrochinon + 0,19g AgNO₃ in 1 ml A. dest.

Stopplösung:

1g Na₂S₂O₃ ad 100 ml A. dest.

4.1.4 Material und Geräte

Material	Firma
384-well Platten	4titude
Autoklav	H + P, Varioklav 75T
Dynabeads™-Kits	Dynal
Mikroskop	Axiocam, Zeiss
Binokular	Zeiss
EEG-Überwachungs-Systeme	DSI
Feinwaage	BP210S, Sartorius
Fixierungsrahmen	Eigene Werkstatt
Gefrier-Microtom	Microm, HM 560
Glasobjektträger (Superfrost®)	Menzel Gläser
Homogenisator	Dremel 395 Type 5
Infrarot-Lampen	seetec
Makrolonkäfige	teciplast
cDNA-Synthese-KIT	RevertAid™H Minus First Strand, Fermentas
Mikro-Bohrer	FST
Objektträger	Engelbrecht
Auswertungsprogramm	Origin Pro 7.0, OriginLab
PCR Cycler	UNOII, Biometra
DNA Mini Kit	peqGOLD Tissue , peqlab
RT PCR Maschine (TaqMan)	ABI PRISM 7700, ABI
Transmitter (Model TA10EA-	DSI
Überwachungsprogramm	seetec
Rotlicht-Lampe	petra
Vibratom	Microm HM 560
Webcam	Axis, 2420 indoor Vario IR
Wundklammern	Wundklammern nach Michel, Lehnecke
Zählraster (Strichplatte)	MXE24021, Nikon

4.1.5 Bezugsfirmen

Firma	Firmensitz
4titude	4titude, Surrey, UK
Abbott	Abbott, Wiesbaden
Abcam	Abcam, Cambridge, UK
ABI	Applied Biosystems, Warrington, UK
Bayer	Bayer, Leverkusen
Biochrom	Biochrom AG, Berlin
Biometra	Biometra, Göttingen
Bode	Bode Chemie, Hamburg
Chemicon	Hampshire, UK
Clontech	Clontech Laboratories Inc., California, USA
Dako	Dako Cytomation GmbH, Hamburg
DeltaSelect	DeltaSelect GmbH, Dreieich
Dremel	Dremel, Leinfelden-Echterdingen
DSI	Data Science International, Minnesota, USA
Dynal	Dynal Biotech Inc., Oslo, Norway
Engelbrecht	Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Fluka	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fermentas	Fermentas, St. Leon-Rot
Fresenius	Fresenius AG, Bad Homburg
FST	Fine Science Tools Inc., Heidelberg
Heraeus	Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts
H & P	H & P Labortechnik AG, Oberschleißheim
Invitrogen	Invitrogen, Karlsruhe
Lehnecke	Tierärztebedarf J. Lehnecke GmbH, Schortens
Menzel	Menzel-Gläser, Braunschweig
Merck	Merck KG aA, Darmstadt
Microm	Microm International GmbH, Walldorf
Nikon	Nikon GmbH, Düsseldorf
OriginLab	OriginLab, Additive GmbH, Friedrichsdorf
petra	petra-electric, Peter Hohlfeldt GmbH & Co. KG, Burgau
Pfizer	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
Pharmacia-Upjohn	Pharmacia-Upjohn, Erlangen
ratiopharm	Ratiopharm GmbH, Ulm
Roche	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen
Sartorius	Sartorius AG, Göttingen
seetec	SeeTec Communications GmbH & Co. KG, Phillipsburg
Sigma	Sigma-Aldrich Corporation, Taufkirchen
Vector	Vector Laboratories Inc., California, USA
Zeiss	Carl Zeiss AG, Jena

4.2 Methodik

4.2.1 Generierung der transgenen mGluR1-EGFP Mäuse

4.2.1.1 mGluR1-EGFP Vektor Konstruktion

Für eine gehirnspezifische Überexpression des mGluR1 α -Rezeptors wurde die kodierende Sequenz aus muriner cDNA amplifiziert und unter Kontrolle eines humanen Cytomegalovirus-Promotors (pCMVIE) in die Vorkerne von befruchteten Maus-Oozyten von C57Bl/6-Weibchen eingebracht. Abbildung 8 zeigt das Konstrukt und Abbildung 9 zeigt den Vektor, in den das Konstrukt eingefügt wurde. Der Vektor stammt von Herrn Professor Dr. Becker und enthält die vollständige Sequenz des murinen mGluR1 α -Rezeptors (Pitsch *et al.*, 2007). Die transgenen Mäuse wurden am Karolinska Institutet in Stockholm, Schweden hergestellt. Die daraus entstandenen „Founder“-Mäuse (Gründer) wurden dann mit Hilfe der PCR analysiert. Das zu detektierende Amplikon war 290 bp groß (Abbildung 10).



Abbildung 8: Schematische Darstellung des Konstruktes bestehend aus einem CMV Promoter, dem mGluR1-Rezeptor, einem EGFP-Fragment und dem poly-A-Schwanz.

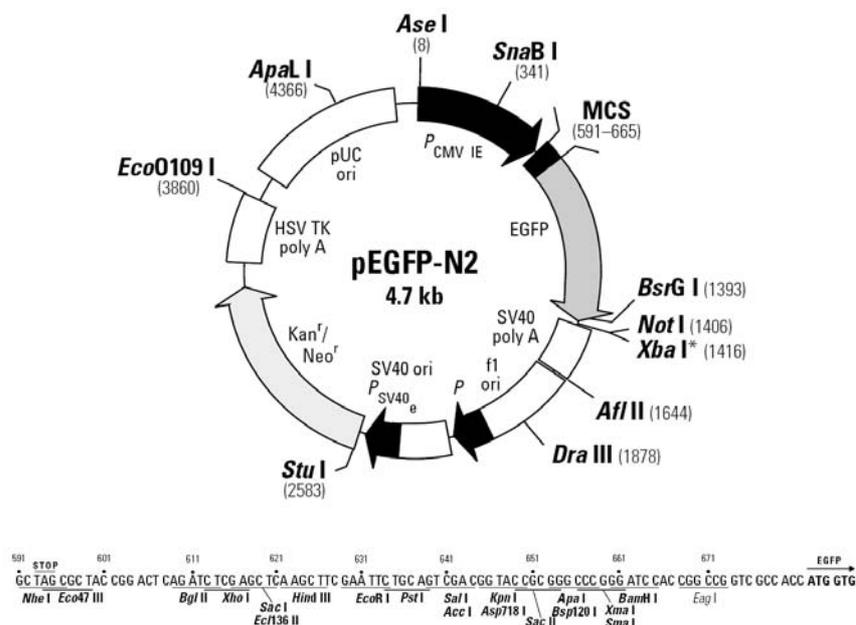


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Vektors pEGFP-N2 und der „Multi cloning site“ (MCS; vielfach klonierbare Stelle). Der Vektor enthält einen CMV-Promoter (pCMV_{IE}) und ein EGFP-Fragment (in Klammern: Basenpaare).

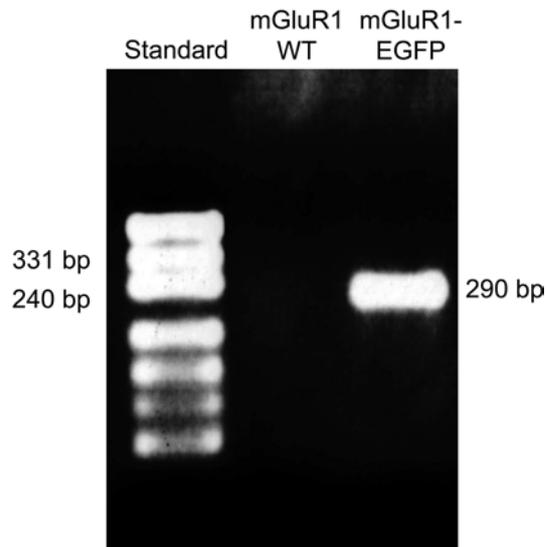


Abbildung 10: Genotypisierung aus Schwanzgewebe der transgenen mGluR1-Mauslinie nach elektrophoretischer Auftrennung der vervielfältigten DNA und Sichtbarmachen der Banden spezifisch für EGFP unter Ultraviolettstrahlung (bp = Basenpaare; Primer s. Kap. 4.2.2.2).

4.2.1.2 Generierung einer mGluR1-EGFP Maus Linie

Die positiv identifizierten Tiere dieser Mauslinie wurden dann durch gezielte Rückkreuzung der transgenen „Founder“ in BL6SJL/F1-Hybrid-Mäuse überführt. Jedes genotypisierte Tier wurde in einem Stammbaum erfasst. Bei der weiteren Verpaarung der Tiere wurde entweder ein Transgen positiver Mäusebock mit Wildtyp-Weibchen verpaart oder umgekehrt. Auf die Verpaarung von zwei transgenen Tieren wurde verzichtet, da eine genaue Lokalisation des Konstruktes im Genom nicht vorhergesagt werden kann. Durch die Verpaarung mit nur einem überexprimierenden Tier verhindert man, dass falls der Einbau des Konstruktes zum Beispiel in einem regulatorisch wirkenden Bereich des Genoms stattfand, welcher zu letalen Auswirkungen führen könnte, nicht homozygot vorliegt. Außerdem geht man so davon aus, dass Veränderungen nicht aufgrund von Veränderungen im Bereich der Regulation von anderen Genen zustande kommen, sondern an der Überexpression des Zielgens liegen.

4.2.2 Genotypisierung

4.2.2.1 Extraktion genomischer DNA

Den gezüchteten Jungtieren wurde zur Isolierung genomischer DNA ein ca. 3 mm langes Stück der Schwanzspitze reseziert und sie wurden gleichzeitig dauerhaft gekennzeichnet. Das resezierte Stück wurde bis zur weiteren

Verarbeitung in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen bei -20°C aufbewahrt. Zur Extraktion der DNA wurde ein DNA Mini Kit nach Anleitung des Herstellers benutzt. Die in 200 µl Puffer gelöste DNA wurde dann bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

4.2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Erzeugung vieler Kopien eines spezifischen DNA-Fragments. Hierbei müssen die Sequenzen vor und nach dem zu amplifizierenden Fragment bekannt sein. Auf diesen Sequenzen beruhend wurden für jedes Gen zwei Oligonukleotidprimer entworfen, die jeweils komplementär zum 5'-Ende des Vorwärts- und Revers-Stranges sind (v- und r-Primer). Zunächst wird die DNA durch Erhitzen in ihre beiden Einzelstränge getrennt (Denaturierung), dann hybridisieren die beiden Primer an den jeweils komplementären Basensträngen der DNA. Eine hitzebeständige DNA-Polymerase ergänzt die fehlenden Stücke komplementär zur Vorlage (Elongation). Das Ergebnis sind zwei identische DNA-Doppelstränge. Dieses Verfahren wird solange wiederholt bis genügend Kopien vorliegen. Für den Nachweis des mGluR1-EGFP-Konstruktes wurde die Sequenz der Primer so gewählt, dass das Amplikon über das (künstliche) Konstrukt geht, damit die WT-Mäuse, die das EGFP-Fragment nicht tragen, einwandfrei identifiziert werden konnten (Tabelle 1). Bei den beiden KO-Linien des mGluR4- beziehungsweise des Cav3.2-Gens, lag das Amplikon zur Identifizierung der KO-Tiere in der eingebauten neo-Kassette (Neomycin-Kassette), die bei WT nicht vorhanden ist. Über eine Kombination von Primern wurden DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge amplifiziert, so dass das WT-Allel jeweils von dem mutierten Allel unterschieden werden konnte (Tabelle 1). Für die Genotypisierung der einzelnen transgenen Tiere wurden einheitliche PCR-Bedingungen benutzt. Es wurde jeweils 1 µl DNA eingesetzt, auf die Konzentrationsbestimmung wurde verzichtet. Der Reaktionsansatz von 10 µl für die PCR enthielt folgende Komponenten:

Für mGluR-transgene Tiere:

1 µl DNA
 0,2 µl MgCl₂ (50 mM)
 1 µl 10 x PCR Puffer
 1 µl dNTPs (je 2 mM)
 Vorwärts-Primer 0,5 µl (10 pmol/µl)
 Revers-Primer 0,5 µl (10 pmol/µl)
 0,05 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
 5,75 µl H₂O (bzw. 4,75 µl für mGluR4)

Für Cav3.2-transgene Tiere:

1 µl DNA
 0,2 µl MgCl₂ (50 mM)
 2 µl 5 x PCR Puffer
 1 µl dNTPs (je 2 mM)
 Primer 1: 0,5 µl (10 pmol/µl)
 Primer 2: 0,5 µl (10 pmol/µl)
 Primer 3: 0,3 µl (10 pmol/µl)
 0,05 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
 4,45 µl H₂O

		Primer (5'-3'-Richtung)	GenBank Registrierungsnr.
Cav3.2		(v) ATT CAA GGG CTT CCA CAG GGT A	AF226868
	WT	(r) CAT CTC AGG GCC TCT GGA CCA C	
	neo	(r) GCT AAA GCG CAT GCT CCA GAC TG	
mGluR1	WT	(v) CAG CAG CGA GAG GTT CAA GC	NM_016976
	EGFP	(r) GAA CTT GTG GCC GTT TAC GTC	U57608
mGluR4	WT	(v) ATG CAG AGG TGT CTC ATA CCT G	NM_001013385
	WT	(r) GCC TGG GCT ACT GTC TGT CAT	
	neo	(v) CCA TTC GAC CAC CAA GCG AAA CAT C	
	neo	(r) CGG CCA CAG TCG ATG AAT CCA GAA A	

Tabelle 1: Sequenzen der Primer der verschiedenen Linien.

Die DNA wurde im Thermocycler nach folgendem PCR-Programm über 33 Zyklen amplifiziert, wobei initial ein 5 min Denaturierungsschritt bei 94°C stattfand:

40 s 94°C (Denaturierung)

50 s 60°C (Anlagerung)

60 s 72°C (Elongation)

Nach dem letzten Zyklus schloss sich ein weiterer Elongationsschritt von 10 min bei 72°C an.

4.2.2.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld. Agarose dient hierbei als interne Matrix, in der DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld wegen der negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA, zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch verschiedene Faktoren, wie Molekülgröße, Konformation der DNA, Agarosekonzentration und die angelegte Gleichspannung beeinflusst. Die eingesetzte Agarosekonzentration ist abhängig von dem DNA-Molekulargewichtsbereich, in dem eine effektive Auftrennung der Fragmente erfolgen soll. Mit dieser Methode ist es möglich, eine Auftrennung von DNA-Fragmenten von ca. 100 bp bis 25000 bp zu erreichen. Nach der Amplifikation wurde der gesamte Reaktionsansatz in einem 2%igen Agarosegel unter Zusatz von Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden wurden anschließend unter Ultraviolettstrahlung sichtbar gemacht und fotografiert. Die Größe der DNA-Fragmente der mGluR1-EGFP Mäuse betrug 372 bp. Bei den mGluR4-Tieren war die mGluR4-KO-Bande 240 bp und die der Wildtypen 1048 bp groß. Die Größe der Fragmente der Cav3.2-KO-Mäuse betrug 330 bp und die der Wildtypen 480 bp.

4.2.3 Auswahl der Tiere und Versuchsdesign

Für die Versuche wurden ausschließlich männliche Mäuse eingesetzt. Alle Tiere wurden spätestens eine Woche vor Versuchsbeginn in den Versuchsraum verbracht, um eine gute Adaption an die neuen Bedingungen zu erreichen. Die Versuche wurden immer zwischen 9:00 und 11:00 Uhr begonnen, um zirkadiane Einflüsse möglichst gering zu halten (Stewart *et al.*, 2001). Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung waren die Tiere mindestens 60 Tage alt und wogen ≥ 20 g. Der Zeitpunkt der Pilocarpin-Applikation wurde als Tag 0 definiert. Zur Analyse des SE wurden den Mäusen 7 Tage vor der Induktion des SE der Transmitter implantiert und das EEG bis 7 Tage nach SE abgeleitet (Abbildung 11). Zur Analyse der chronischen Phase wurde der Transmitter 7 Tage nach SE implantiert und von Tag 9 bis Tag 28 nach SE das EEG abgeleitet (Abbildung 12). Zur Probengewinnung wurde das erforderliche Gewebe zum gewünschten Zeitpunkt nach SE entnommen (Abbildung 13).

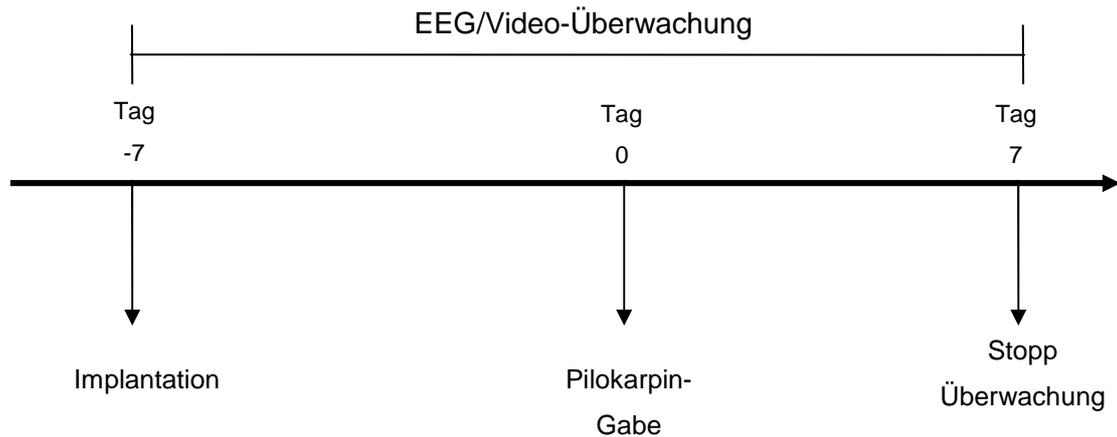


Abbildung 11: Schema zur Überwachung und Untersuchung des SE.

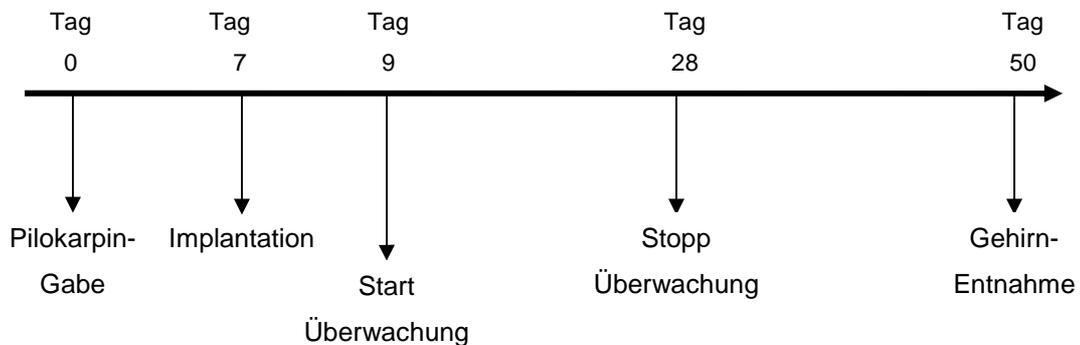


Abbildung 12: Schema der Vorgehensweise zur Untersuchung der chronischen Phase.

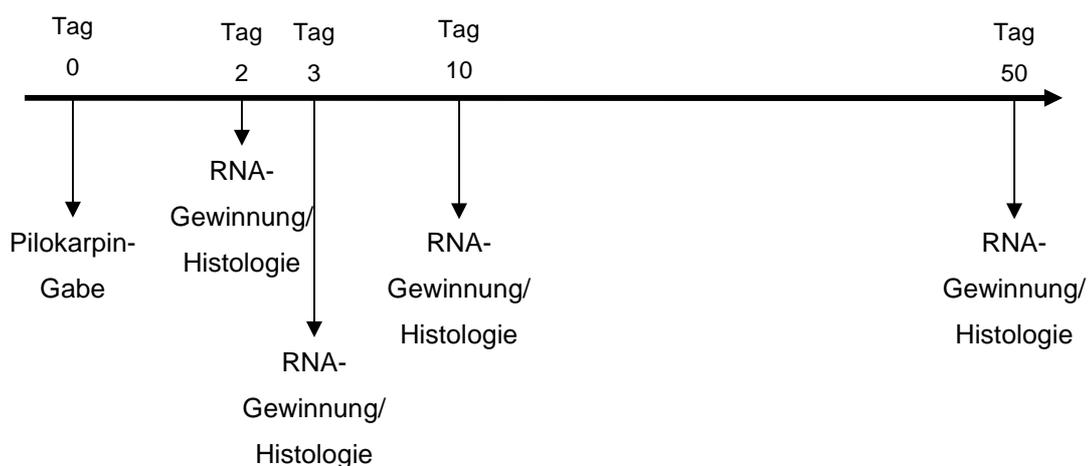


Abbildung 13: Zeitlicher Ablauf zur RNA-Gewinnung beziehungsweise histologischen Untersuchung zu verschiedenen Zeitpunkten nach SE.

4.2.4 Durchführung des Pilokarpin-Versuches

4.2.4.1 Krampfparameter

Während der akuten Induktion des SE und während der chronischen Überwachungsphase wurden epileptische Anfälle hinsichtlich Schwere, Häufigkeit und Dauer beurteilt. Die Einteilung der Krampfschwere basierte auf einer Skala von Racine (Racine, 1972), modifiziert nach Baran (Baran *et al.*, 1995), in welcher entsprechend der klinischen Symptomatik Anfälle in verschiedene Stadien eingeordnet wurden (Tabelle 2).

Krampfschwere	Anfallscharakteristika
Stadium I	Immobilität, schwacher Fazialklonus
Stadium II	Schwerer Fazialklonus
Stadium III	Uni- und bilaterale tonisch-klonische Anfälle mit Aufrichten ohne Umfallen
Stadium IV	Tonisch-klonische Anfälle mit Springen und/oder Umfallen
Stadium V	Generalisierter klonischer Anfall (SE)

Tabelle 2: Modifizierte Klassifikation der Anfallsstadien (Racine, 1972; Löscher *et al.*, 1988; Baran *et al.*, 1995).

Diese Einteilung wurde einer weiteren Modifikation unterzogen, da die beschriebene Einteilung sich auf Ratten bezieht, bei denen elektrisch induzierte Anfälle charakterisiert wurden beziehungsweise auf Mäuse, bei denen durch Kainat Epilepsie induziert wird und es daher nicht komplett auf das hier beschriebene Verfahren angewendet werden kann.

Stadium I war durch Immobilität der Mäuse gekennzeichnet und ging häufig mit einem Zittern der Tastaare einher. Schwere Fazialklonien in Form von klonischen Kaubewegungen oder stereotypes Nicken mit dem Kopf charakterisierten das Stadium II. Der bei Ratten beschriebene einseitige Vorderextremitätenklonus ist bei Mäusen schwer von einem bilateralen Klonus zu differenzieren, da diese sich häufig abwechseln. Daher wurden in dieser Studie uni- und bilaterale tonisch-klonische Anfälle im Stadium III zusammengefasst, in welchem es zu einem Aufrichten der Tiere kam. Dieses Stadium III konnte sich durch Verlust der Stellreflexe zu Stadium IV entwickeln, wobei die Tiere nach vorne oder zur Seite umfielen oder hochsprangen und generalisierte tonisch-klonische Krämpfe

zeigten. Diese werden im weiteren Verlauf als schwere Anfälle bezeichnet. Entwickelt sich diese Konvulsion zu stark, konnte es an diesem Punkt zu einem Atemstillstand kommen, wobei der Anfall in einen reinen tonischen Krampf überging. Bei Stadium V handelte es sich um generalisierte klonische Anfälle, bei denen die Tiere das „Bewusstsein“ nicht wiedererlangen. Dieses Stadium wird im Weiteren als SE bezeichnet. Im Gegensatz zu Stadium I und II, welche fokale Krampftätigkeit anzeigen, repräsentieren die Stadien III-V ein generalisiertes Krampfgeschehen (Löscher *et al.*, 1988). Als Anfallsdauer wurde der Zeitraum beschrieben, in dem motorische Krampftätigkeit morphologisch zu erkennen war. Wurden die Anfälle auch mittels EEG (Elektro-Enzephalo-Grafie) überwacht, bezeichnete die Anfallsdauer den Zeitraum von Beginn der ersten sichtbaren hochfrequenten Aktivität im EEG bis zu deren Ende.

4.2.4.2 Induktion und Abbruch des Status epilepticus

Den Mäusen wurde 25 min vor der ersten Pilokarpin-Applikation Methyl-Skopolamin in einer Dosierung von 1 mg/kg KM s. c. (gelöst in Ringer-Lösung) verabreicht, um die peripheren cholinergen Wirkungen des Pilokarpins zu antagonisieren. Die Dosis des Pilokarpins richtete sich unter anderem nach dem genetischen Hintergrund beziehungsweise Stamm der Mauslinie. Da hier mit verschiedenen Linien gearbeitet wurde, musste zunächst eine optimale Dosis für die jeweiligen Linien (WT und Transgen) ermittelt werden. Richtwerte für die Pilokarpin-Dosis wurden aus vorhandenen Publikationen entnommen (Cavalheiro *et al.*, 1996; Borges *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). Die daraus resultierenden benutzten Dosen waren wie folgt:

Linie	Dosis (mg/kg KM)
mGluR1	310
mGluR4	340
Cav3.2	330

Tabelle 3: Verwendete Dosen von Pilokarpin bei den verschiedenen Mauslinien.

Die in Tabelle 3 genannten Dosen wurden dann s. c. verabreicht (gelöst in Ringer-Lösung). Tiere, die einen SE entwickelten, erhielten keine weiteren Pilokarpin-Injektionen. Entwickelte sich im weiteren Verlauf jedoch kein SE, wurde

den Tieren, wenn bis dahin keine generalisierten Anfälle beobachtet wurden, 40 min nach erster Applikation die halbe Dosis erneut injiziert (bei Cav3.2: nach 70 min). Entwickelten die Tiere generalisierte Anfälle und es kam jedoch bis zur 60. min nicht zu einem SE und betrug die anfallsfreie Zeit mehr als 15 min, wurde ebenfalls die halbe Dosis nachgespritzt. Bei den Cav3.2-transgenen Tieren wurde in diesem Fall auf eine Nachinjektion verzichtet, da sie generell erst später Anfälle entwickelten. Auf weitere Nachinjektionen wurde verzichtet, wenn die Tiere keine anhaltende Krampfaktivität mehr zeigten, da in Vorversuchen weitere Pilokarpin-Injektionen keinen SE mehr hervorrief. Während der Versuche wurden die Mäuse bis zu 4 Stunden in offenen Käfigen beobachtet. Erreichten die Tiere den SE, so wurde dieser nach 40 min durch eine einmalige Injektion von Diazepam (4 mg/kg KM) unterbrochen. Injektionszeiten, Anzahl und Stärke auftretender generalisierter Anfälle, Beginn und Terminierung des SE wurden in einem Protokoll für jedes Tier festgehalten. Kontrolltiere wurden der gleichen Prozedur unterzogen, sie bekamen jedoch anstatt Pilokarpin nur Ringer-Lösung injiziert. Nach Abbruch des SE wurde jedes Tier einzeln gesetzt und mindestens stündlich kontrolliert und oral mit Glucose (5%) gefüttert. Außerdem erhielten die Mäuse am Tag des SE jeweils 1 ml Glucose (5%) s. c. gespritzt, um ein Dehydrieren zu verhindern und die entstandene Hypoglykämie auszugleichen (Sirven *et al.*, 2003; Santiago *et al.*, 2006). Dies wurde am Folgetag wiederholt, es sei denn, das Allgemeinbefinden der Tiere wurde als gut beurteilt. Zusätzlich erhielten die Tiere eingeweichtes Standard-Diät-Futter, bis eine adäquate Nahrungs- sowie Wasseraufnahme wieder vollständig gewährleistet war. In Tabelle 4 ist die Anzahl der eingesetzten Tiere aufgelistet.

Linie	Transgene Tiere	Kontrollen
mGluR1	19	32
mGluR4	29	24
Cav3.2	88	78

Tabelle 4: Anzahl eingesetzter Tierzahlen im Pilokarpin-Modell.

4.2.5 Operationsverfahren

4.2.5.1 Narkose

Zur Narkose wurde eine Xylazin/Ketamin-Mischung verwendet (6 mg/kg Xylazin + 120 mg/kg Ketamin). Die Narkosemittel wurden mit Ringer-Lösung verdünnt, so dass pro Maus mindestens ein Volumen von 100 µl benötigt wurde, was eine genauere Dosierung gewährleistete. Bei Bedarf wurde die Narkose mit einem Drittel der Anfangsdosis verlängert (40 mg/ kg Ketamin), wobei dieses Gemisch kein Xylazin mehr enthielt, da dies stark atemdepressiv wirkt (Hall *et al.*, 2000).

4.2.5.2 Vorbereitung und Implantation

Als initialer Schritt erfolgten die Elektroden- sowie die Transmitterimplantation. Hierzu wurde den narkotisierten Mäusen ein Maus-EEG-Transmitter (Model TA10EA-F20, DSI) unter die Haut implantiert. Die Transmitterimplantation und die Fixierung der Elektroden erfolgte bei den Tieren für die SE-Analyse der Cav3.2-Linie erst wenn die Tiere älter als 53 Tage und ein Gewicht von mindestens 21 g aufwiesen, da der Transmitter mit einem Gewicht von 3,9 g eine gewisse Mausgröße voraussetzt. Das Gewicht des Transmitters liegt im Bereich einer Trächtigkeit, womit sich diese zusätzliche Gewichtsbelastung in einem tolerierbaren Bereich befindet. Für die Untersuchungen in der chronischen Phase, wurden die Tiere 7 Tage nach SE implantiert. Für die Implantation wurde zunächst der Operationsbereich an der rechten Flanke und medial auf dem Schädel geschoren und anschließend mit Hautdesinfiziens behandelt. Zur Fixierung des Schädels wurden die Mäuse mit Hilfe zweier Ohr- und eines Schneidezahnbalkens in einen Rahmen eingespannt. Die Oberkieferhalterung wurde dabei abhängig von der Größe des Tieres eingestellt. Dadurch wurde ein Verrutschen des Kopfes bei der weiteren Präparation vermieden. Um ein Austrocknen der Augen, die während der Narkose geöffnet bleiben, zu verhindern, wurden sie mit Dexpanthenol-Augensalbe geschützt. Nach wiederholter Desinfektion wurde eine Inzision an der rechten Flanke von etwa 0,5 cm Länge in craniocaudaler Richtung gesetzt und stumpf eine subkutane Hauttasche in der Größe des Transmitters präpariert. Dann wurde mit Hilfe einer Knopfsonde subkutan der Weg bis über das Schädeldach sondiert. Dort wurde eine weitere Inzision gesetzt und die Haut in einem Areal von circa 1 cm Durchmesser entfernt. Faszien und Periost wurden in diesem Bereich mit Hilfe eines scharfen Löffels abgeschabt, um einen besseren Halt des

Zementes zu gewährleisten. Hierdurch wurde das Bregma, welches den Kreuzungspunkt zwischen der *Sutura sagittalis* (Sagittalnaht) und der *Sutura coronalis* (Koronarnaht) dargestellt, sichtbar.

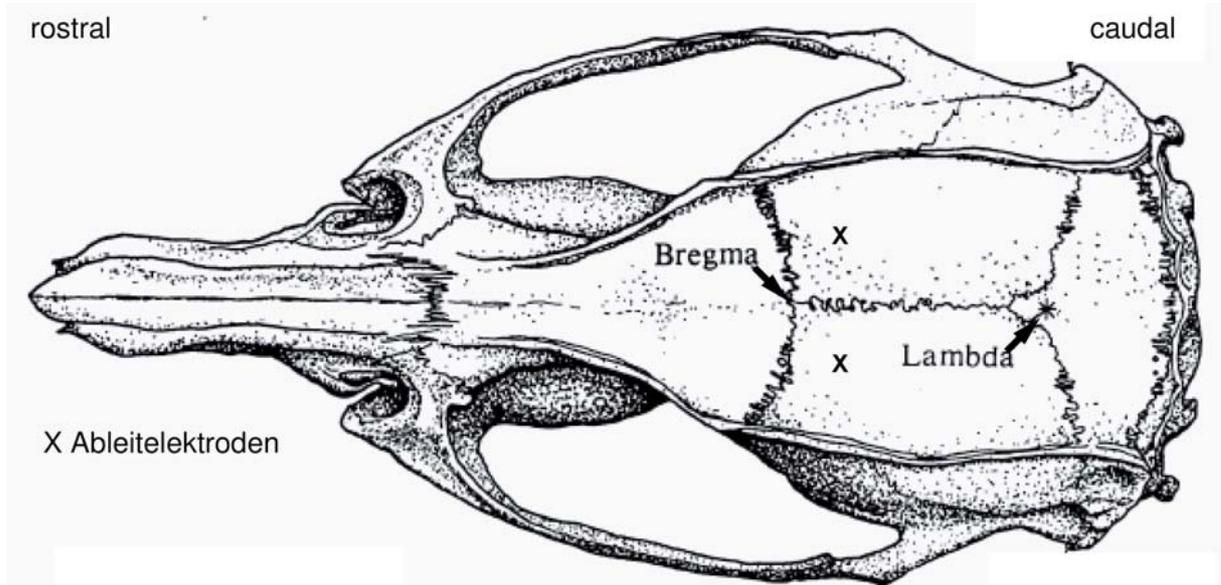


Abbildung 14: Aufsicht auf den knöchernen Schädel (Paxinos *et al.*, 2004) mit Darstellung der Lokalisation der Ableitelektroden.

Das Bregma ist nach dem Atlas von Paxinos und Franklin (Paxinos *et al.*, 2004) der Bezugspunkt für die Angabe der drei Raumkoordinaten des Schädels: rostrocaudal, lateral und ventral. Mit Hilfe eines Markierungszirkels wurden die Koordinaten zur Fixierung der Schrauben bestimmt (Abbildung 14; -1.5 mm rostrocaudal und -1.5 mm lateral) und entsprechend markiert. Auf die Angabe in die ventrale Richtung wurde in diesem Fall verzichtet, da die Ableitungen und somit die Platzierung der Elektroden kortikal durchgeführt worden sind. Mit einem 0,8 mm starken Mikro-Bohrer wurde die Schädeldecke unter Schonung der *Dura mater* an diesen beiden Stellen trepaniert. Die Elektrodenkabel wurden vorsichtig mit Hilfe einer schmalen Pinzette unter der Haut bis zum Schädel gezogen, so dass der Transmitter an der rechten Flanke zu liegen kam und in die vorgefertigte Tasche eingeführt werden konnte. Nun wurden ebenfalls mit Hilfe einer Pinzette die Schrauben in die gebohrten Löcher gedreht und die vorgefertigten Drahtösen der Elektroden um die Schrauben gelegt. Sobald die Schädeldecke abgetrocknet war, wurden die Elektroden mit einer Schicht kaltpolymerisierendem Kunststoff („Zahnzement“) an den Schrauben fixiert und die freiliegende Schädeldecke verschlossen. War der Kunststoff ausgehärtet, so dass ein Verrutschen der

Elektroden nicht mehr möglich war, wurde die seitliche Hauttasche mit Wundklammern adaptiert (Abbildung 15). Alle implantierten Mäuse bekamen eine analgetische Versorgung über zwei Tage (5 mg/kg Carprofen, s. c., zweimal täglich), wobei die initiale Injektion bereits *intra operationem* gegeben wurde, da sich so die beste analgetische Wirkung entfaltet. Zur Prophylaxe etwaiger Wundinfektion bekamen die Tiere zunächst initial subkutan und folgend oral 5 mg/kg Enrofloxacin pro Tag. Um Xylazin-induzierte Hypothermie (Rector *et al.*, 1996) zu vermeiden, wurden die Käfige bis zum Aufwachen vor eine Rotlicht-Lampe gestellt. Während der Wundheilung wurden die Tiere für 5 - 7 Tage in ihren Haltungskäfigen täglich kontrolliert.

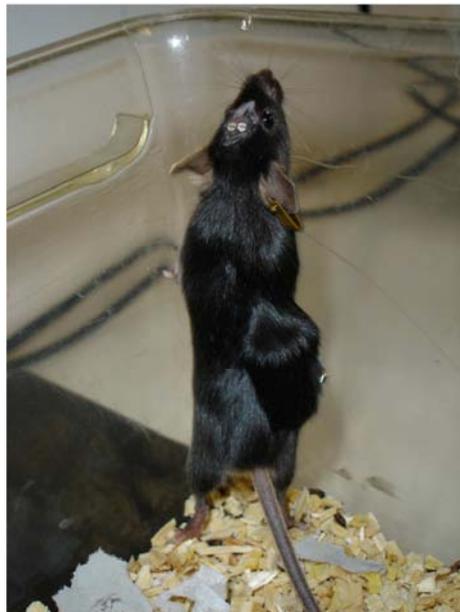


Abbildung 15: Maus mit einem implantierten Transmitter. Am Kopf sind die zwei mit Zahnzement überdeckten Schrauben zur Fixierung der Elektroden zu erkennen.

4.2.6 Analyse von spontan auftretenden Anfällen

In dieser Arbeit wurde die systematische Analyse von spontanen Anfällen mittels EEG-Ableitung mit zusätzlicher Video-Überwachung durchgeführt. Da pro Kamera das Verhalten von max. 4 Tieren beobachtet werden konnte und zwei Kameras zur Verfügung standen, konnten insgesamt nicht mehr als acht Mäuse zur selben Zeit überwacht werden (Abbildung 16). Die Käfige wurden so platziert, dass die Tiere immer zu sehen waren. Video-Aufzeichnungen erfolgten in der Hellphase und unter Zuhilfenahme zweier Infrarot-Strahler in der Dunkelphase und beliefen sich somit auf 24 h täglich. Die Aufnahme und Analyse des EEGs erfolgte mit Hilfe

eines telemetrischen EEG-Überwachungs-Systems. Hierbei wurde das EEG durch den implantierten Sender mit einer Frequenz von 1000 Hz abgetastet, welcher diese dann an den Empfänger sandte. Von dort wurden die Daten zum Computer geleitet und auf der Festplatte gespeichert. Mit Hilfe dieses Systems konnten die EEG-Daten betrachtet oder analysiert werden.



Abbildung 16: Telemetrische EEG-Ableitungs-Anlage. Insgesamt waren acht Beobachtungsplätze vorhanden.

Um spontane Anfallsaktivität in den transgenen Tieren und implantatinduzierte Anfallsaktivität ausschließen zu können, wurden zu Beginn einer Gruppe ($n = 5$) transgener Tiere (mGluR1-EGFP-, mGluR4-KO und CAV3.2-KO-Mäuse), die keinen SE hatten, ein Transmitter implantiert und über einen Zeitraum von 7 Tagen ein EEG abgeleitet und analysiert.

Zu Beginn der Pilocarpin-Versuchsreihen wurden die Aufzeichnungen von EEG und Video unabhängig voneinander ausgewertet. Hierbei wurde das Video zunächst im schnellen Vorlauf (ca. 10fache Geschwindigkeit) analysiert. Trat bei einem Tier anfallsähnliches Verhalten auf, wurde dieser Abschnitt erneut bei normaler Geschwindigkeit angeschaut. Als sichergestellt war, dass alle morphologisch sichtbaren Anfälle auch im EEG zu eindeutigen Veränderungen

führten, wurde auf die komplette Durchsicht der Video-Daten verzichtet und bei Veränderungen im EEG direkt die entsprechende Videosequenz analysiert. Handelte es sich bei der gezeigten EEG-Veränderung um einen Anfall, wurde Anfallsbeginn und Dauer erfasst. Die im EEG gefundenen Anfälle wurden in der Video-Aufzeichnung hinsichtlich des Schweregrades klassifiziert (s. Kap. 4.2.4.1).

4.2.6.1 Analyse des Status epilepticus der Cav3.2-Linie

Die Analyse des SE wurde in der Cav3.2-Linie durchgeführt. Hierfür wurde den mindestens 53 Tage alten und mindestens 21 g schweren Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Tieren der Transmitter eine Woche vor Induktion des SE implantiert. Um ein individuelles Basal-EEG jeden Tieres zu haben, wurden die Daten in der Woche vor der Induktion ebenfalls aufgezeichnet. Die Frequenzanalyse der Rohdaten wurde mittels Fourier-Transformation durchgeführt. Die Größe der einzelnen Frequenzbänder ist in Tabelle 5 dargestellt. Die Leistung in den einzelnen Frequenz-Bändern wurde dann in Abhängigkeit von der Zeit analysiert. Als Parameter zur Analyse des SE wurde dessen Stärke und Dauer gewählt. Zur Analyse der Stärke wurde die Zeit vom Beginn des konstanten pathologischen EEG-Bildes, durch den der SE gekennzeichnet ist, bis zu dem Zeitpunkt, an dem

Frequenzband	Frequenz in Hertz (Hz)
Delta	0,5 - 3,99
Theta	4 - 7,99
Alpha	8 - 12,99
Beta	13 - 30
Gamma	30 - 40

Tabelle 5: Frequenzen der einzelnen Bänder.

Diazepam appliziert wurde (nach 40 min) gewählt. Die Fläche unter der Kurve im SE wurde in allen Frequenz-Bändern jeden Tieres über 40 min bestimmt und mit der Kurve im Basal-EEG, was einen Tag vor der Induktion des SE zur gleichen Tageszeit aufgezeichnet wurde, verglichen. Es wurde die relative Erhöhung der Amplitude über die 40 min SE ebenfalls in jedem Frequenzband bestimmt und diese relative Erhöhung zwischen den Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Tieren verglichen. Zur Bestimmung der Dauer des SE wurde der Zeitpunkt der zu

erkennenden Amplituden-Spitze im SE bestimmt und eine Basislinie bei 10% der Höhe gelegt, welche immer über der physiologischen Aktivität lag. So konnte der Beginn und das Ende der hohen Aktivität im Kreuzungspunkt dieser Linie abgelesen werden und somit die Dauer bestimmt werden, bei der das EEG in diesem Frequenzband wieder auf dieses Niveau absank. Diese Bestimmung wurde nicht im niedrigfrequenten Delta-Band durchgeführt, da dort die Spitze nicht gut abgrenzbar war.

4.2.6.2 EEG- und Videoaufzeichnungen während der chronischen Phase

Untersucht wurden ausschließlich Mäuse, die einen SE erlitten hatten (s. Kap. 4.2.4.1.). Um Artefakte aufgrund der invasiven Operation und deren Einfluss auf die Krampfaktivität zu minimieren, wurde erst zwei Tage nach der Implantation mit der systematischen EEG- und Videoaufzeichnungen begonnen, somit begann die Überwachung an Tag 9 nach SE. EEG- und Video-Daten wurden 24 h pro Tag aufgezeichnet und ausgewertet. Von jedem Anfall wurde Datum, Uhrzeit, Anfallsdauer und -schwere protokolliert. Videodaten mit Anfällen wurden aus der Video-Datenbank gesichert. Die Aufzeichnungen endeten nach Tag 28 post SE.

4.2.6.3 Analyse der interiktalen Phase der Cav3.2-Linie

Zur Analyse der interiktalen Aktivität wurden die EEG-Rohdaten wie im Kap. 4.2.6.1 beschrieben in die einzelnen Frequenzbänder aufgesplittet und jeweils eine Stunde um 12 Uhr und eine Stunde um 0 Uhr an drei aufeinander folgenden Tagen zu einem frühen Zeitpunkt (Tag 12 - 14 post SE) und zu einem späten Zeitpunkt (Tag 21 - 23 post SE) analysiert. Hierfür wurde die Fläche unter der Kurve in den fünf verschiedenen Frequenzbändern berechnet und zwischen den beiden Gruppen verglichen. Außerdem wurde die Stärke der Amplituden im Zeitverlauf von drei Tagen zu den oben genannten Zeitpunkten untersucht.

4.2.7 Gewebepreparation

4.2.7.1 Präparationen von Mäusegehirnen

Die Maus wurde mit Hilfe einer großen Schere in einer tiefen Isofluorannarkose dekapitiert. Die Haut über dem Schädeldach wurde stumpf bis zu den Augenhöhlen frei präpariert und nach rostral gezogen, so dass das Schädeldach sichtbar wurde. Der Schädel wurde nun mit einer feinen Schere, die flach in das große Hinterhauptsloch eingeführt wurde, vorsichtig entlang der

longitudinalen Fissur des Kortex bis zwischen den Augen aufgeschnitten ohne das Gehirn zu verletzen. Bei Jungtieren war es nicht zwangsläufig notwendig zu schneiden, da diese noch über eine weiche Schädeldecke verfügen. In einem solchen Fall konnte der Knochen auch aufgebrochen werden. Es wurden zwei Verbindungsschnitte vom Bregma (Schnittpunkt zwischen Sutura sagittalis und Sutura coronalis) in Richtung Augenhöhle durchgeführt. Anschließend wurde mit einer starken und spitzen Splitter-Pinzette die Schädeldecke jeweils nach lateral weg gebrochen und das Gehirn freigelegt. Nun führte man einen abgerundeten, an der Spitze leicht nach oben gebogenen Spatel von lateral unter den Kortex und löst so das Gehirn vom Knochen ab, wobei die beiden Sehnerven sowie die übrigen Gehirnnerven durchtrennt werden mussten. Von dem freipräparierten Gehirn wurde das Zerebellum entfernt und die Hemisphären median getrennt.

4.2.7.2 Einfrieren von Gehirnpräparaten

Um koronare Schnitte anzufertigen, wurde eine Gehirnhälfte auf ein hierfür vorgesehenes Korkplättchen mit Einbettmedium in der entsprechenden Position aufgebracht. Dann wurde es ca. 4 cm über flüssigem Stickstoff ca. 2 min eingefroren und dann bei -80°C in einem Plastikgefäß aufbewahrt. Diese Methode verhindert ein zu schnelles Gefrieren der Probe und bewahrt somit die Ultrastruktur des Gewebes. Wenn das Gewebe ausschließlich zur Gewinnung von RNA genutzt wurde, trennte man das präparierte Gehirn vom Zerebellum und frof es in einem Eppendorf-Gefäß in flüssigem Stickstoff ein und lagerte es ebenfalls bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C.

4.2.7.3 Anfertigung horizontaler Gehirnschnitte für Timm-Färbung und Mikrodissektion

Die extrahierte Hemisphäre wurde direkt nach der Präparation in eiskalte PBS-Lösung überführt. Das Gehirn wurde mit schnell härtendem Acryl-Kleber auf den Objektisch des Vibratoms mit der ventralen Seite nach oben aufgeklebt. In die Schale des Objektisches wurde eiskaltes PBS gefüllt und von außen mit Eiswasser gekühlt. Das Gehirn wurde in 300 µm dicke Scheiben geschnitten. Mit Hilfe zweier gebogener Kanülen wurde der Hippokampus aus dem umgebenen Gewebe ausgeschnitten und direkt in gekühltes PBS überführt. Im Rahmen der Dissektion wurden die hippokampalen Schnitte unter dem Binokular erneut mit Hilfe zweier Kanülen durch fünf Schnitte in die Untersektionen Gyrus dentatus

(DG) und CA1 unterteilt. Die Sektionen wurden in RNase-freie Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die Fixierung der Schnitte zur Durchführung der Timm-Färbung wurden 400 µm dicke Schnitte präpariert, wonach dann 1 - 2 Schnitte pro Maus in Reaktionsgefäße mit Fixierungslösung (s. Kap. 4.2.8.4) überführt wurden.

4.2.8 Histologische Methoden

4.2.8.1 Anfertigen von Präparatdünnschnitten

Mit Hilfe eines Kryostaten wurden 12 µm dicke Schnitte aus dem koronar eingebetteten Gewebe und 20 µm dicke Schnitte aus den horizontalen, für die Timm-Färbung fixierten 400 µm Schnitten angefertigt. Die Schnitte wurden direkt vom Messer des Kryostaten auf einen beschichteten Objektträger (OT) übernommen und mindestens 30 min bei RT getrocknet.

4.2.8.2 Hämatoxilin-Eosin-Übersichtsfärbung

Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung stellt eine Routinefärbung in der konventionellen Histologie dar. Ziel ist die Darstellung von Gewebestrukturen im Organschnitt durch den Kernfarbstoff Hämatoxilin, der alle basophilen Zellbestandteile, wie zum Beispiel das Chromatin der Zellkerne, blau darstellt und die Kontrastierung durch den Farbstoff Eosin, welches Zytoplasma und Interzellulärsubstanz rosa darstellt. Für diese Färbung wurden die OT in Küvetten gestellt und für eine Minute in Mayers Hämalaun getaucht. Es folgte eine Bläuung für 5 min unter fließendem Leitungswasser. Der zweite Färbeschritt bestand aus einer 1 min Gegenfärbung mit Eosin. Hiernach wurden die Schnitte zweimal kurz in 100% Ethanol, dann kurz in Isopropanol und zuletzt zweimal für ca. 20 s in Xylol geschwenkt und anschließend mit Corbit-Balsam eingedeckt.

4.2.8.3 Immunhistochemie

Mittels geeigneter Antikörper lassen sich Proteine im histologischen Gewebe nachweisen. Soll nur ein Protein angefärbt werden, reicht eine einfache Färbung wie die DAB-Färbung, die bei sichtbarem Licht mit dem Mikroskop zu erkennen ist, aus. Neben dem Antikörpernachweis kam in dieser Arbeit die Avidin-Biotin-Methode zur Anwendung (Hsu *et al.*, 1981). In der vorliegenden Arbeit wurde sie verwendet, um die Zellkerne der Neurone mit einem Antikörper gegen Neuronal-Nuklei (NeuN) beziehungsweise um GFP in den Gehirnen transgener Mäuse

nachzuweisen. Dieser Nachweis basiert auf der Fähigkeit des Hühnereiweiß-Glykoproteins Avidin sich physiologisch an das Vitamin Biotin mit einer hohen Affinität zu binden. Bei der hier angewendeten indirekten Avidin-Biotin-Methode wird der an das Antigen gebundene Primärantikörper von einem Biotin-konjugierten Sekundärantikörper erkannt. Das Avidin des nun applizierten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (ABC-Komplex) bindet wiederum an den Biotin-markierten sekundären Antikörper. An jedes Avidin des Komplexes sind dabei vier Peroxydase-gekoppelte Biotin-Moleküle gebunden, wodurch sich eine hohe Sensitivität ergibt und Antigene auch in geringeren Konzentrationen gut nachgewiesen werden können. Das Enzym Peroxidase setzt die farblose DAB-Lösung unter Anwesenheit von H_2O_2 zu einem bräunlichen, unlöslichen Präzipitat um. So lässt sich die Färbereaktion leicht durch Spülen mit A. dest. unterbrechen und die Schnitte auf OT überführen, auf denen sie getrocknet und eingedeckt werden können. Für die GFP- beziehungsweise die Neuronal-Nuklei-(NeuN)-Immunfärbung wurden die Schnitte auf Superfrost[®] OT bei RT für 30 min getrocknet und anschließend in 4% PFA/ PBS Lösung (pH 7,4) für 10 min fixiert. Darauf folgte ein Waschschrift. Alle Waschschrift wurden 2 mal 5 min in PBS bei RT durchgeführt. Nach diesem Waschschrift schloss sich eine Prozedur an, welche die im Gewebe enthaltenen endogenen Peroxidasen deaktiviert. Hierfür wurden die Schnitte über 20 min in einer 1%igen Wasserstoffperoxidlösung inkubiert und anschließend gewaschen. Da das zur Fixierung des Gewebes eingesetzte Formaldehyd die Epitope der Rezeptoren vernetzt, müssen diese zur Steigerung ihrer Antigenität demaskiert werden. Dazu wurden die Schnitte für 3 mal 5 min in der Mikrowelle bei 560 Watt in vorgeheiztem 10 mM Zitratpuffer (pH 6,0) gekocht, während des Kochens verdunstete Flüssigkeit wurde mit A. dest. ersetzt, um eine Aufkonzentrierung der Zitratpufferlösung und gleichzeitig ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Die Schnitte wurden im Anschluss daran erneut gewaschen. Danach wurden die OT in eine feuchte Kammer gelegt und die noch anhaftende Restflüssigkeit abgesaugt. Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Gehirnschnitte für 2 h bei 37°C in PBS-Block-Puffer, bestehend aus 10% fötalem Kalbserum (fetal calf serum, FCS), 10% Milch (NFDM, normal fat dry milk), 1% spezifischem Serum (normal goat, Ziege), überschichtet. Um nun GFP enthaltende Neurone zu detektieren, wurden die Schnitte über Nacht bei RT mit einem polyklonalen Antikörper gegen GFP in der

Verdünnung 1:10000 beziehungsweise mit einem monoklonalen Antikörper gegen NeuN in einer Verdünnung von 1:1500 in einer 10% FCS enthaltenden PBS-Lösung inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Schnitte mit einem biotinylierten Anti-Kaninchen-Sekundär-Antikörper für 2 h bei 37°C inkubiert. Der Antikörper ist 1:200 in 10% FCS enthaltender PBS verdünnt. Die Schnitte wurden erneut gewaschen und mit dem ABC-Komplex für 2 h bei 37°C verdünnt in PBS (1:150), welches 10% FCS enthielt, inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde nun DAB appliziert (0,05 M Tris/HCl Puffer pH 7,4 mit DAB 1:50, H₂O₂ 1:2000). Diese Reaktion wurde durch die Spülung mit A. dest. gestoppt. Es folgte eine Hämatoxin-Färbung als Routine-Gegenfärbung und anschließender 5 min Bläuung unter Leitungswasser. Die Schnitte wurden dann mit Corbit-Balsam eingedeckt.

4.2.8.4 Timm-Färbung

Die Moosfasern stellen die Axone der Körnerzellen des Gyrus dentatus dar und verbinden diesen mit der CA3 Region des Hippokampus (s. Kap. 2.2). Das pathologische Wachstum von Moosfasern als Zeichen synaptischer Reorganisation, ist ein häufiger Befund bei Epilepsiepatienten und bei entsprechenden Versuchstieren, bei denen Epilepsie induziert wurde. Die hippocampalen Moosfasern wachsen dann vor allem in die Molekularzellschicht des Gyrus dentatus ein, wo zumindest einige von ihnen Körnerzellen innervieren. Das in den Moosfasern enthaltene Zink ist von besonderem Interesse für das Verständnis der induzierten oder natürlichen Epileptogenese. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass während wiederholten epileptischen Anfällen Zink von den Moosfasern freigesetzt wird, was oft mit starker elektrischer Aktivität einhergeht (Aniksztejn *et al.*, 1987). Zur Darstellung der Moosfasern dient die Timm-Färbung (Timm, 1958). Diese Silbersulfid-Färbetechnik, welche die Anwesenheit von Zink in den dendritischen Enden der Moosfasern nachweist, ermöglicht es, Orte mit erhöhtem Gehalt von Schwermetall-Ionen, in diesem Fall Zink, im Gehirngewebe zu bestimmen. Grundsätzlich lässt sich Zink in vielen Regionen des Nervensystems nachweisen. In bestimmten Regionen des Hippokampus kommt es jedoch in hohen Konzentrationen vor, dadurch hat sich diese Methode zur Analyse der Verteilung von zinkreichen Axonen, zum Beispiel im Hippokampus, etabliert. Für diese Methode wurden die wie in Kap. 4.2.7.3 präparierten Schnitte benutzt. Bei allen folgenden Schritten muss unbedingt darauf

geachtet werden, dass nur Plastik-Gefäße und kein Glas verwendet wird. Die Schnitte wurden für 10 min in Lösung 1 (Reaktionslösung), dann für 10 min in Lösung 2 (Fixierungslösung) gelegt und anschließend für 1 - 14 Tage in 70% Ethanol fixiert. Dann wurden die Schnitte in 30% Saccharoselösung überführt und ÜN bei 4°C inkubiert. Nun wurden aus den so behandelten Dickschnitten 20 µm dicke Kryoschnitte angefertigt und diese nach mindestens 1 h Trocknung für 15 min in Phosphatpuffer (0,15 M) gewaschen. Danach wurden die OT in eine Plastikküvette mit Entwicklerlösung gegeben und 30 - 50 min unter Lichtausschluss inkubiert, bis eine braune Anfärbung der Moosfasern sichtbar wurde. Die Schnitte wurden nun zunächst kurz mit Leitungswasser und dann mit A. dest. gewaschen. Jetzt wurde die Reaktion durch die Inkubation der OT für 1 min in Stopplösung beendet und die Schnitte erneut dreimal mit A. dest. gewaschen. Im Anschluss wurden durch 10 - 15 s Inkubation mit Toluidinblau selektiv die Zellkerne angefärbt. Nach einem anschließenden kurzen Waschschrift in A. dest. folgte sofort eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1x 50% EtOH, 1x 70% EtOH, 2x 100% EtOH, 1x 100% Isopropanol, 2x Xylol, jeweils 5 min). Der gefärbte Schnitt wurde mit Corbit-Balsam unter einem Deckgläschen eingedeckt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

4.2.8.5 Histologische Analyse

Zur Histologischen Auswertung wurden Gehirnschnitte von Tieren aus allen vier beschriebenen Gruppen (WT SE, WT kein SE, Transgen SE, Transgen kein SE) aller drei Linien von einem Untersucher untersucht, dem nicht bekannt war, aus welcher Gruppe ihm Schnitte vorlagen (blinder Untersucher).

Zur quantitativen Beurteilung des Nervenzellverlustes wurden Neurone in den verschiedenen hippokampalen Gehirnregionen aller drei Mauslinien ausgezählt. Hierfür wurde eine Strichplatte mit einem Raster benutzt. Neurone, die auf dem linken oder unteren Rand des Rasters lagen, wurden nicht mitgezählt. Aus allen mGluR-transgenen Gruppen wurden pro Tier insgesamt 3 koronare 12 µm dicke Schnitte ausgewertet. Die Schnittebene lag im dorsalen Hippokampus zwischen 1,82 und 2,46 mm posterior vom Bregma nach dem Atlas von Paxinos und Franklin (Paxinos *et al.*, 2004). Pro Schnitt wurde somit jeweils eine Fläche von 25000 µm² bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Bei den Cav3.2-Tiere wurden je 2 horizontale 20 µm dicke Schnitte aus dem ventralen Hippokampus {Interaural: 3,76 bis 4,96; Bregma: -6,24 bis -5,04; (Paxinos *et al.*, 2004)} ausgewertet.

Zur quantitativen Analyse der Moosfasersprossung wurden die Timm-gefärbten Gehirnschnitte zur Untersuchung herangezogen. Zur Bewertung wurde die rekurrente Moosfasersprossung im DG analysiert und ausgewertet. Dabei wurden vier Stärken voneinander unterschieden: starke MFS wurde definiert als zahlreiche ($n \geq 20$) gefärbte Punkte pro $2500 \mu\text{m}^2$, mittelstarke MFS durch einige ($n = 10 - 20$), schwache MFS durch ein paar ($n = 1 - 10$) und keine MFS, wenn gar keine gefärbten Punkte zu finden waren.

4.2.9 Extraktion von RNA aus Gehirngewebe

4.2.9.1 Extraktion von mRNA

Für die Extraktion von RNA wurden die in Kapitel 4.2.7.3 beschriebenen dissezierten hippokampalen Subregionen zunächst mit Hilfe eines Homogenisators in $100 \mu\text{l}$ eisgekühltem Lysispuffer zerkleinert. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Homogenisierungsschritte kurz ausfallen und die Proben dabei stets auf Eis stehen. Erschien die Probe nach dieser Prozedur zu viskös, wurden erneut $100 \mu\text{l}$ Lysispuffer hinzugefügt, da sonst die RNA nicht eluiert werden kann. In der gesamten RNA sind nur ca. 3% der zytoplasmatischen mRNA zuzuordnen, diese sollte von der restlichen RNA isoliert werden. Steht nur eine geringe Gewebemenge, wie nach der Mikrodissektion zur mRNA Extraktion als Material zur Verfügung, bietet sich die Verwendung des Dynabead-Kits an. Als Hilfsmittel dienen hier mit Desoxythymidin-Oligonukleotiden verbundene Dynabeads, um die mRNA aus dem Gewebe zu isolieren. Die sogenannten Dynabeads sind supermagnetische Kügelchen mit einem Durchmesser von $2,8 \mu\text{m}$ und einem Kern aus magnetischem Eisenoxid. Sie besitzen eine Polymerhülle, welche die zu bindenden mRNA-Moleküle vor direktem Kontakt mit dem Eisen schützt. An diese ist eine 25 Nukleotide lange Kette aus Desoxythymidin-Oligonukleotiden kovalent gebunden. Diese sogenannten „Beads“ (Perlen) können aufgrund des Eisenoxids mit Hilfe eines Magneten physikalisch aus den Lösungen separiert werden. Da die polyadenylierte mRNA an diese Oligonukleotide bindet, kann sie so von der Gesamt-RNA getrennt werden. Das Gewebe wurde nach Herstellerangaben verarbeitet und die gewonnene RNA in $10 - 20 \mu\text{l}$ A. ad iniectionem resuspendiert und bei -80°C gelagert. Die spätere Real Time-PCR wird nicht durch die vorhandenen Beads behindert.

4.2.9.2 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Für die cDNA-Synthese nutzt man die Reverse-Transkription. Hierbei wird die aus der Zelle isolierte polyadenylierte mRNA mittels eines Enzyms, der Reversen-Transkriptase, sowie eines Primers, d.h. eines Oligonukleotids, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die erhaltene cDNA dient als Ziel (template) für folgende PCR-Reaktionen. Als Enzym wird die „Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase“ (M-MLV RT) verwendet (Kotewicz *et al.*, 1985). Es wird die gesamte aus der Zelle isolierte polyadenylierte mRNA umgeschrieben. Es entsteht ein Gemisch aus einer Vielzahl von cDNA, in dem auch die cDNA der zu untersuchenden mRNA enthalten ist. Die mRNA wurde mit einem cDNA-Synthese-Kit (RevertAid™H Minus First Strand) nach Herstellerangaben umgeschrieben.

4.2.9.3 Real Time-PCR

Für die Untersuchung der Expression von mGluR1 und EGFP beziehungsweise der verschiedenen Ca²⁺-Kanal-Untereinheiten wurde das SYBR® Green PCR Master Mix Kit nach Angaben des Herstellers benutzt. SYBR-Green ist ein Farbstoff der sich unspezifisch an Doppelstrang-DNA anlagert. Dadurch kommt es mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg. Eine Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen Produkten erfolgt mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse. Bei der benutzten relativen Quantifizierung, der sogenannten $\Delta\Delta C_t$ -Methode wird die Expression des Zielgens relativ zu einem Referenzgen, dem sogenannten „Housekeeper“ gemessen (Chen *et al.*, 2001).

Gen	Primer (5'-3'-Richtung)	GenBank Registrierungsnr.
mGluR1	(v) GGC AGG GAA CGC CAA TTC	NM_016976
	(r) GGC GCC TGT CTT CCA CC	
EGFP	(v) CCG ACA ACC ACT ACC TGA GCA	U57608
	(r) GAA CTT GTG GCC GTT TAC GTC	
β-Aktin	(v) ACC GTG AAA AGA TGA CCC AGA	NM_007393
	(r) ATG GGC ACA GTG TGG GTG A	

Tabelle 6: Sequenzen der Primer der einzelnen Gene.

Spezies	Gen	Primer (5'-3'-Richtung)	GenBank Registrierungs-nr.
Maus	Synaptophysin	(f) TTC AGG ACT CAA CAC CTC GGT	NM_009305
		(r) CAC GAA CCA TAG GTT GCC AAC	
	Cav 1.2	(f) GGA GGA CTG GAA TTC GGT GAT	NM_009781
		(r) ACT AAC ATC CCT GGA AAA GAG GG	
	Cav 1.3	(f) TTT GAC AAT GTC CTT TCG GCT	NM_028981
		(r) GTT CTC ACC GTT TGA ATC AAT AGC T	
	Cav 2.1	(f) GTC GTG GTG CTA ACA GGC ATC	AB066608
		(r) ACG AAC CGC CCT CAG TGT C	
	Cav 2.2	(f) TCA TCG GCC TCG AGT TCT ATA TG	NM_007579
		(r) GGG ATC TTT GCC ACA GGG A	
	Cav 2.3	(f) GGA GTG GAT ACC CTT CAA TGA GTC	NM_009782
		(r) TCT GTT ACC ACC AGA GAT TGT TGT TC	
	Cav 3.1	(f) ACC CTG GCA AGC TTC TCT GA	NM_009783
		(r) TTT CGG AGG ATG TAC ACC AGG T	
	Cav 3.2	(f) TCA TCT TCG GCA TCG TTG G	NM_021415
		(r) CGC AAG AAG GTC AGG TTG TTG	
	Cav 3.3	(f) TCA TCC GTA TCA TGC GTG TTC	NM_001044308
		(r) GGC CCG CAT TCC TGT G	
	β_1	(f) AAG GTA CTG CAG AGG CTC ATC AA	NM_145121
		(r) TGG TTC TCG TCC AGG ATT ATG TC	
	β_2	(f) CAA TTG GTA GTC CTT GAC GCG	NM_023116
		(r) CCC TCG AGA TTT TAT CAA CCT TTG T	
	β_3	(f) AGG ATC TCC ATC ACA CGC GT	NM_007581
		(r) CAA TCT CAC TCT GCA CTT CAG CA	
$\alpha_2\delta$	(f) CTG TTC CAG GAT CTT TCA TGT AGA GA	NM_009784	
	(r) TGT CGC AAG GAT CTG GAC C		
Ratte	Synaptophysin	(f) TCA GGA CTC AAC ACC TCA GTG G	NM_012664
		(r) AAC ACG AAC CAT AAG TTG CCA A	
	Cav 3.2	(f) ATG TCA TCA CCA TGT CCA TGG A	NM_153814
		(r) ACG TAG TTG CAG TAC TTA AGG GCC	

Tabelle 7: Sequenzen der Primer der einzelnen Gene.

Zur Analyse der mGluR1- beziehungsweise EGFP-Expression wurden die CA1-Regionen von adulten Tieren (p 90) und das gesamte basale Vorderhirn von neugeborenen Mäusen (p 0) untersucht. Hier wurde als Referenzgen β -Aktin benutzt (Tabelle 6). Um die Expression der einzelnen Ca^{2+} -Kanal-Untereinheiten zu analysieren, wurde die hippokampale Subregion CA1 von adulten Tieren der entsprechenden Gruppen untersucht. Referenzgen war hierbei das gehirnspezifische Synaptophysin (Tabelle 7). Der Reaktionsansatz (Tabelle 8) wurde im 96-well-Plattenformat in Duplikaten durchgeführt, wobei die Referenzgene ebenfalls in demselben Ansatz analysiert wurden. Nach einer Präinkubation von 10 min bei 95°C, wurden 50 PCR Zyklen vollzogen (20 s bei 94°C gefolgt von 30 s bei 59°C und 40 s bei 72°C). Das SYBR[®] Green Fluoreszenz-Signal wurde in jedem Zyklus gemessen.

Reagenzien	Endkonzentration	μl / Reaktion
2 x SYBR Green Mastermix	1 x	6,25
Vorwärts-Primer (v)	0,3 μM	0,375
Revers-Primer (r)	0,3 μM	0,375
H ₂ O		3
Matrizen DNA		2,5
Gesamtvolumen		12,5

Tabelle 8: Zusammensetzung des Reaktionsvolumens für die Real Time-PCR.

4.2.9.4 Auswertung der Real Time-PCR

Zur Auswertung der Daten aus der Real Time-PCR wurde die sogenannte $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode benutzt (Chen *et al.*, 2001). Hierbei wurde die Expression des Zielgens relativ zu einem Referenzgen mit Hilfe dieser Formel berechnet (Fink *et al.*, 1998):

$$T_0/R_0 = K (1+E)^{(\text{Ct},\text{R}-\text{Ct},\text{T})}$$

- T₀: Initiale Anzahl der Zielgen-Kopien
- R₀: Initiale Anzahl der Referenzgen-Kopien
- E: Effizienz der Amplifikation (entspricht 1)
- Ct, T: Zyklus des Zielgens
- Ct, R: Zyklus des Referenzgens
- K: Konstante (entspricht 1)

Als Wert erhält man die relative Expression als Faktor für den Gehalt an mRNA. Die Expressionswerte der mGluR1-EGFP- beziehungsweise der Cav3.2-KO-Tiere wurden dann mit den Expressionswerten der Kontrolltiere verglichen.

4.2.10 Statistik

Alle abgebildeten Daten sind, wenn nicht anders beschrieben, als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Excel (Version 9.0.0.2719). Für jeden Gruppenvergleich wurde zunächst ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Normalverteilung wurde durch den Test nach Kolmogorov-Smirnov sichergestellt. Waren die Daten unverbunden und nicht normalverteilt kam der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz. Stellte sich eine Normalverteilung heraus, wurde nach Feststellung der Gleichheit der Varianzen mit einem F-Test, der Student's-T-Test angewendet. Ansonsten wurde, bei normalverteilten Daten mit ungleicher Varianz, ein T-Test für diesen Datentyp benutzt. Das Signifikanzniveau beträgt maximal 5%.

5 ERGEBNISSE

5.1 Generierung und Charakterisierung transgener mGluR1-EGFP Mäuse

Um die mGluR1-EGFP-Mäuse zu charakterisieren, wurde zunächst die Expression von mGluR1-EGFP in den Mausgehirnen mit Hilfe der Real Time-PCR zu zwei verschiedenen Entwicklungszeitpunkten untersucht. Zum einen wurde hierfür RNA aus dem Vorderhirn von Tieren am Tag der Geburt (p 0) und zum anderen RNA aus CA1-Pyramidenzellen bei Tieren im Alter von drei Monaten (p 90) gewählt. Mit Primern spezifisch für mGluR1 zeigten sich in den mGluR1-EGFP transgenen Tieren signifikant höhere Werte zu beiden Zeitpunkten der Entwicklung (Abbildung 17).

Zum Zeitpunkt p 0 lag der Wert der relativen mGluR1-Expression bei den mGluR1-EGFP-Tieren ca. 10mal höher als bei den mGluR1-WT (mGluR1-EGFP n = 11, mGluR1 WT n = 11; T-Test: $p < 0,001$) und zum Zeitpunkt p 90 ungefähr 2mal so hoch (mGluR1-EGFP n = 5, mGluR1 WT n = 6; T-Test: $p < 0,05$).

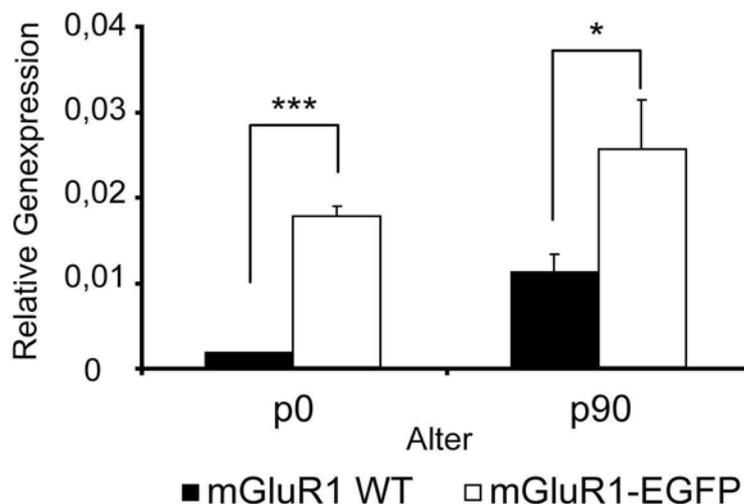


Abbildung 17: Relative Genexpression von mGluR1 an zwei verschiedenen Zeitpunkten. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Mit Primer spezifisch für EGFP wurden in den mGluR1-WT keine Signale detektiert, während ähnliche Expressionswerte für EGFP in den transgenen mGluR1-EGFP-Tieren gefunden wurden wie für mGluR1 (Abbildung 18; p 0: mGluR WT n = 11, mGluR1-EGFP n = 12, T-Test: $p < 0,002$; p 90: mGluR WT n = 6, mGluR1-EGFP n = 5; T-Test: $p < 0,05$).

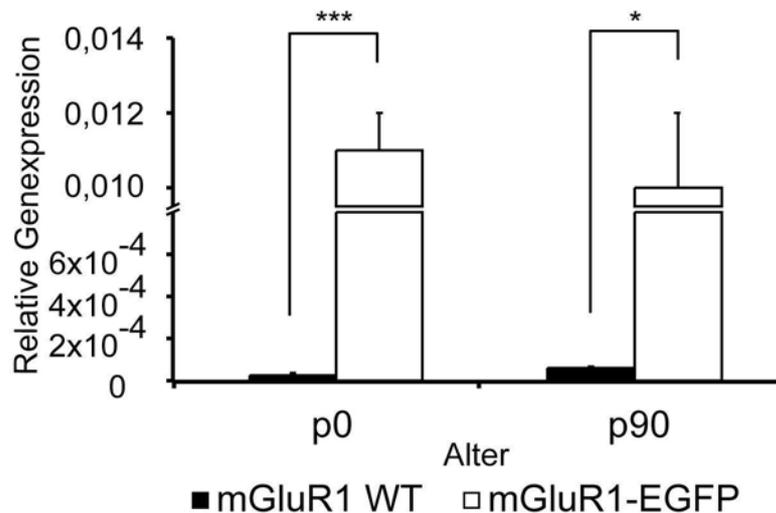


Abbildung 18: Relative Genexpression von EGFP an zwei verschiedenen Zeitpunkten. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Des Weiteren wurde die hippocampale Expression des mGluR1-EGFP-Fusions-Proteins in transgenen Mäusen mit Hilfe einer immunhistochemischen Antikörperfärbung bei mGluR1-WT- und mGluR1-EGFP-Mäuse an Tag p 0 und an Tag p 90 untersucht. Durch die Anwendung eines Antikörpers direkt gegen GFP wurde speziell die Expression und die Verteilung des mGluR1-EGFP-Fusions-Proteins unabhängig von der Expression des endogenen mGluR1 detektiert. In den mGluR1-EGFP-Tieren war eine deutliche Expression von mGluR1-EGFP im DG und in der hippocampalen Pyramidenzellschicht, sowie im Stratum lacunosum der CA1-Region bei p 90-Tieren zu erkennen, während die spezifische Expression in den hippocampalen Neuronen und im DG der mGluR1-WT wie erwartet komplett fehlte (Abbildung 19; mGluR1 WT p 0: n = 3; p 90: n = 2, mGluR1-EGFP p 0: n = 4; p 90: n = 2).

Die mGluR1-EGFP-Mäuse unterschieden sich nicht im Gewicht von den mGluR1-WT. Im Alter von 58 bis 67 Tagen betrug das Gewicht durchschnittlich $22,5 \pm 0,7$ g und bei den mGluR1-WT $23 \pm 0,3$ g (T-Test: $p = 0,39$). Die mGluR1-EGFP exprimierenden Mäuse erschienen gesund, waren fertil und zeigten keine

phänotypischen Verhaltensabnormalitäten. Die transgenen Mäuse zeigten ebenfalls keine pathologischen Veränderungen in der Gehirnentwicklung, bei der kortikalen Architektur oder der weißen Substanz. Im EEG zeigten sie weder spontane epileptische Aktivität noch Anfälle.

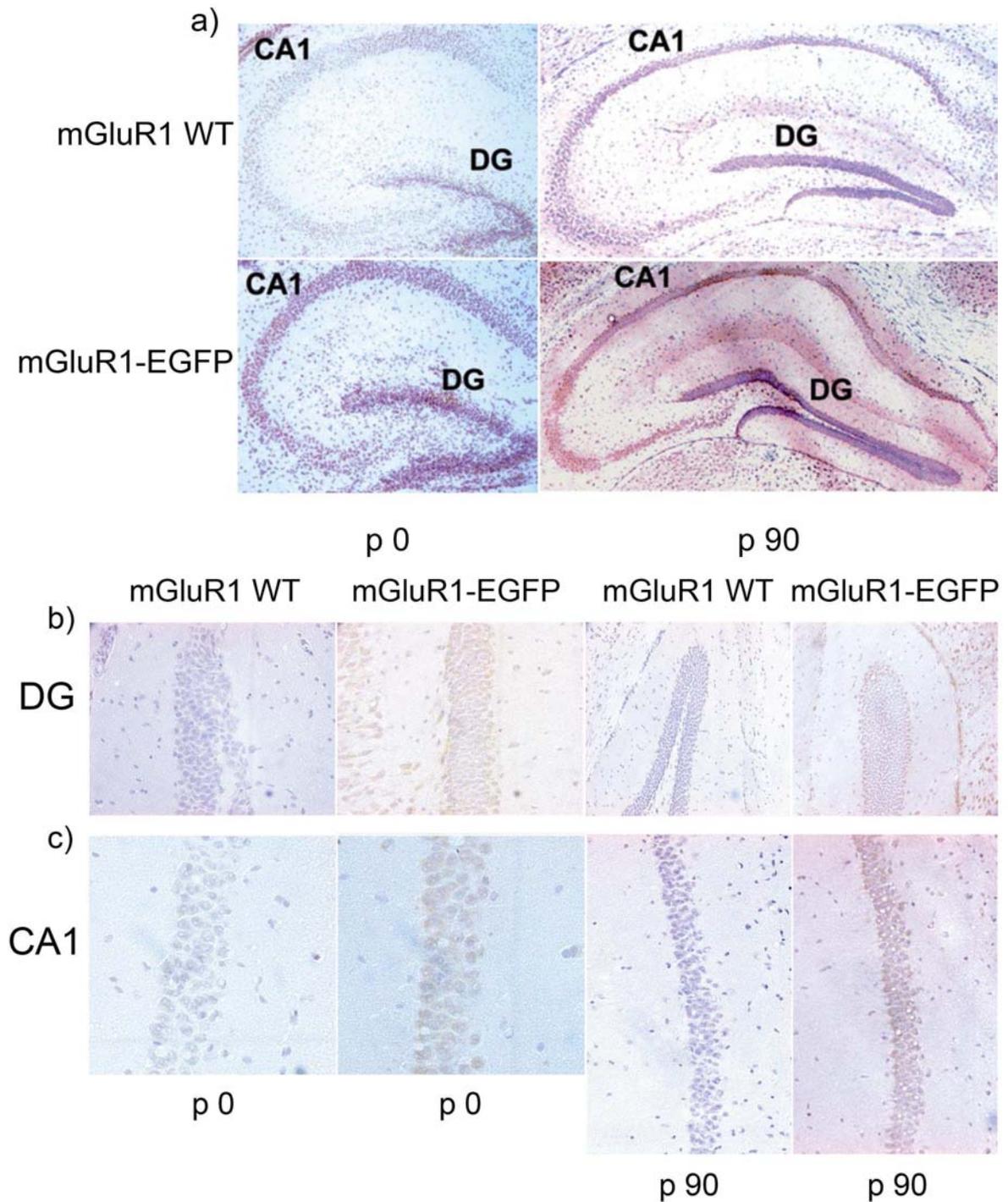


Abbildung 19: Darstellung der GFP-Immunhistochemie im Hippokampus von p 0 und p 90-Tieren. a) Gesamt-Hippokampus; b) Ausschnitt aus dem Gyrus dentatus (DG); c) Ausschnitt aus der CA1-Region (CA1). Die GFP-Expression stellt sich durch die braune Färbung dar. In blau ist die Hämatoxylin-Gegenfärbung zu erkennen.

5.2 EEG- und Video-Aufzeichnungen

Im Rahmen der Untersuchung dreier transgener Mauslinien in einem Tiermodell für TLE, welches unter anderem durch spontane epileptische Anfälle gekennzeichnet ist, sollte eine verbesserte Vorgehensweise der EEG-Aufzeichnung eingesetzt werden. Dieses Modell ermöglicht den Tieren, sich frei in ihrem Käfig zu bewegen, da die EEG-Sendeeinheit unter der Haut implantiert wurde.

5.2.1 Aufzeichnung normaler Verhaltensweisen

Um die Auswirkung des normalen Verhaltens einer Maus auf die EEG-Daten zu ermitteln, wurden zur Kontrolle zunächst EEG-Daten bei Tieren, welche keinerlei SE induzierende Substanzen erhalten hatten, analysiert. Außerdem konnte so festgestellt werden, ob es eine Transgen bedingte epileptische Aktivität gibt. Bei normalen Bewegungsmustern, wie zum Beispiel Schnüffeln, Fressen, Putzen oder Kratzen, zeigten sich keine Veränderungen im EEG in Form von Bewegungsartefakten. Selbst bei stark ausgeprägten Bewegungsmustern, wie zum Beispiel Umherlaufen im Käfig, an der Decke hangeln, im Streu graben oder Kratzen am Kopf, waren ebenfalls keine Bewegungsartefakte zu erkennen (Abbildung 20). Grundsätzlich ist zu sagen, dass die Spannungsamplituden regelmäßig waren, jedoch bei den einzelnen Tieren individuelle Unterschiede aufwiesen. Zusammengefasst weist die Spannungsamplituden während normaler Verhaltensweisen innerhalb der Gruppen keine großen Differenzen ($0 \pm 0,11$ mV) auf.

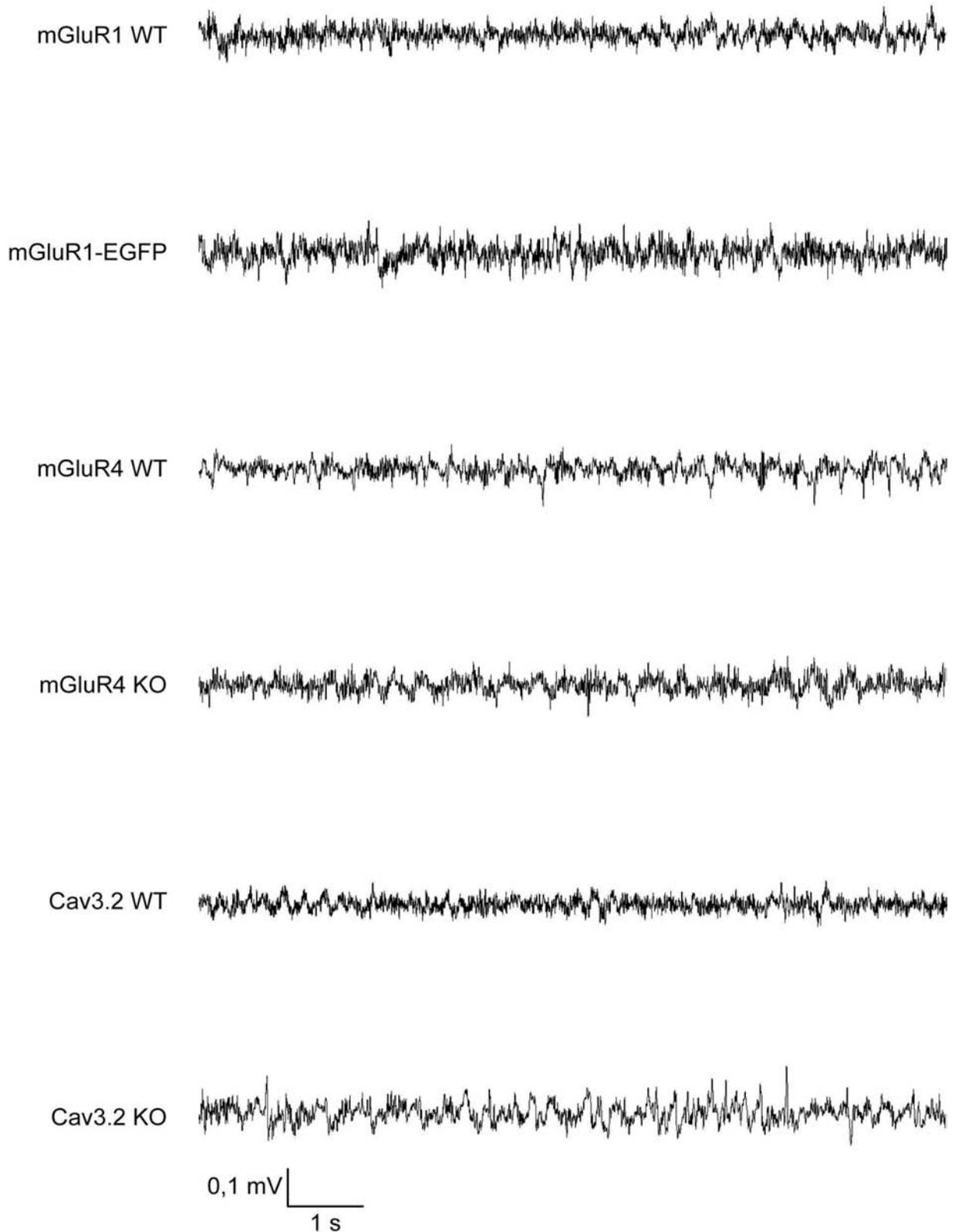


Abbildung 20: Spannungsamplituden der EEG-Aufzeichnung (Basal-EEG) während normaler Verhaltensweisen einer Maus der verschiedenen untersuchten Mauslinien (Dauer 10 s).

Bei den Mäusen, bei denen Status epilepticus (SE) induziert worden war, wurde ein Transmitter implantiert und ein unipolares EEG abgeleitet. Alle Aufzeichnungen wurden kontinuierlich über einen Zeitraum von circa drei Wochen bei freibeweglichen Mäusen angefertigt. Betrachtete man nun die EEG-Grundaktivität (Basal-EEG) in der interiktalen Phase (Abbildung 20), das heißt in einem anfallsfreien Intervall, so fielen individuelle Unterschiede auf, die jedoch nicht signifikant verschieden waren. Diese Unterschiede entstanden, da eine Positionierung der Elektroden mit genau gleichem Abstand zueinander nicht immer gegeben war. Das EEG setzte sich aus hoch- und niedrigfrequenten Wellen mit einer Frequenz von 0,5 bis 40 Hz zusammen. Die Einzelwerte der Standardabweichung der Amplitude lagen alle zwischen 0,01 und 0,13 mV mit einem Mittelwert von 0,04 (Tabelle 9).

Linie	Spannung (mV)	Gruppengröße
mGluR1 WT	$0 \pm 0,04$	12
mGluR1-EGFP	$0 \pm 0,03$	6
mGluR4 WT	$0 \pm 0,03$	6
mGluR4 KO	$0 \pm 0,04$	10
Cav3.2 WT	$0 \pm 0,04$	7
Cav3.2 KO	$0 \pm 0,04$	7

Tabelle 9: Spannungsamplitude (Mittelwert \pm SD) der untersuchten Linien (interiktale Phase).

5.2.2 Aufzeichnung epileptischer Anfälle

Bei einigen Tieren mit chronisch rekurrenten Anfällen wurde gelegentlich abnorme interiktale EEG-Tätigkeit beobachtet (Abbildung 21). Diese bestand aus einzelnen oder aus Gruppen von Spitzen (Spikes beziehungsweise Polyspikes), welche eine maximalen Amplitudenhöhe von etwa 2 mV aufwiesen und unregelmäßig über einen Zeitraum von einigen Minuten auftraten (Abbildung 21 b). Dieses Phänomen war hauptsächlich nach generalisierten Anfällen zu finden. Außerdem wurden nach generalisierten Anfällen spindelförmige epileptiforme Aktivitäten beobachtet, die sich über mehrere Minuten hinziehen konnten (Abbildung 21 c). Das Verhalten der Tiere war in diesen Phasen ohne phänotypischen Befund.

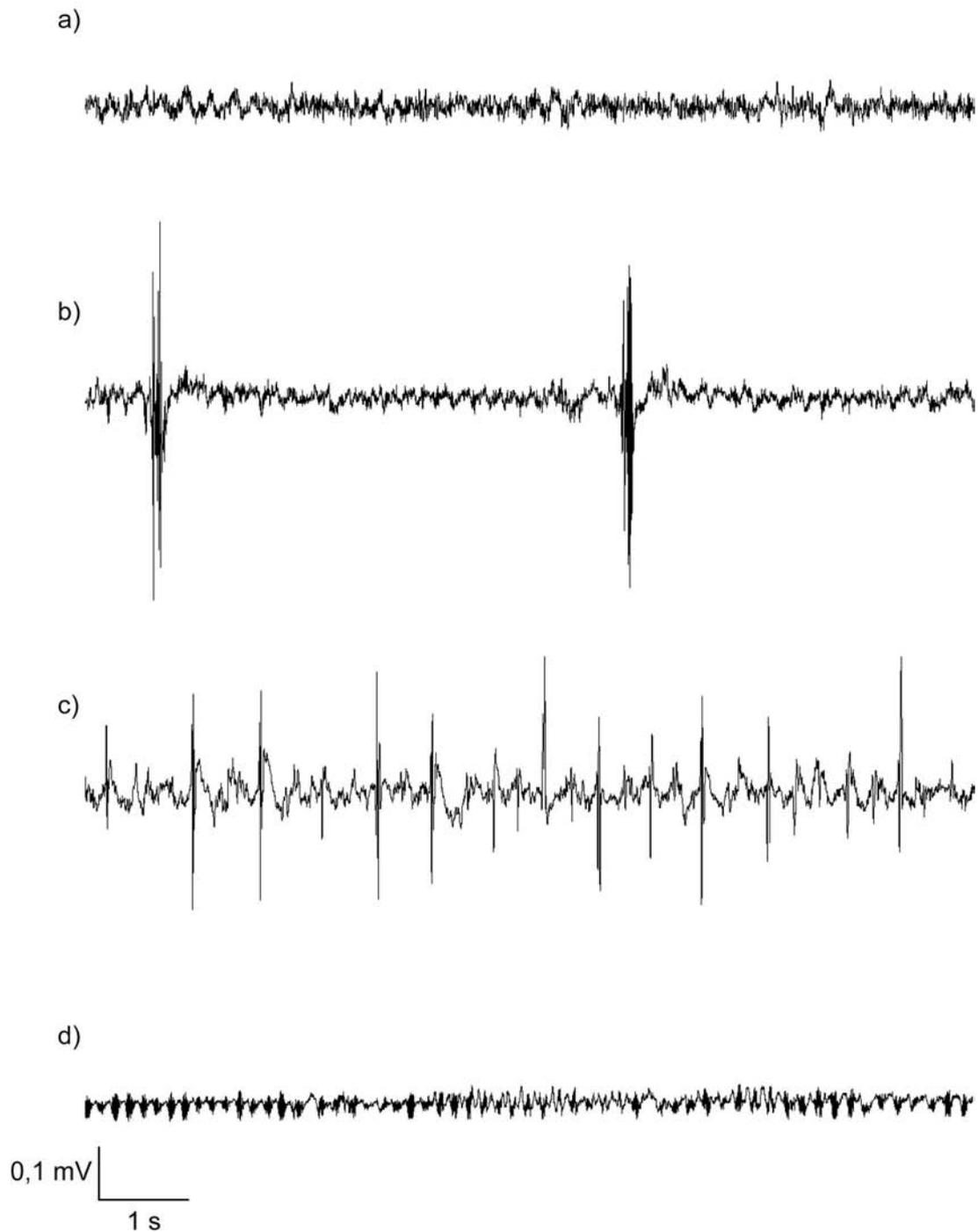


Abbildung 21: Darstellung verschiedener EEG-Aufzeichnungen von freibeweglichen Mäusen mit chronischer Epilepsie. a) EEG-Grundaktivität: regelmäßige Wellen mit geringer Amplitude; Interiktale epileptiforme Entladungen: b) einzeln oder gehäuft auftretende Spitzen mit hoher Amplitude c) Spike-Wave-Komplexe d) spindelförmige epileptiforme Aktivität.

Generalisierte epileptische Anfälle, die sich durch motorische Krampfaktivität des gesamten Körpers auszeichneten, konnten anhand der Aufzeichnungen der EEG-Daten erkannt und eindeutig von anderen Verhaltensmustern unterschieden werden. Es wurde auch in keinem Fall ein spontaner Anfall beobachtet, der nicht mit epileptiformen Entladungen im EEG einherging. Fokale Anfälle, die nicht sekundär generalisierten wurden nicht gefunden. Bei den Anfällen handelte es sich um zeitlich begrenzte, rhythmische Bewegungsmuster ohne Pausen. Sie entwickeln sich aus der normalen EEG-Grundtätigkeit. Die Anfallsstärke wurde hierbei in die schwächeren Stadium-III- und die stärkeren Stadium-IV-Anfälle eingeteilt. Bei beiden Anfallsstärken fiel zunächst eine Gruppe von dichten Ausschlägen mit relativ niedriger Amplitude, in Form von Spike-Wave-Komplexen auf, welche kennzeichnend für pathologische epileptiforme Entladungen sind (Abbildung 22). Diese Spitzen, gefolgt von einer Welle, wiesen eine Frequenz von ca. 8 Hz und eine zunehmenden Amplitude auf (maximale Amplitudenhöhe im Durchschnitt 0,5 mV). Hiernach folgt eine Sequenz, bei der die Amplitude wieder abnahm, während die Frequenz jedoch zunahm. Es traten dann vermehrt hochfrequente Spikes auf (ca. 18 Hz), deren Amplitude weiter zunahm. Kurz vor dem abrupt endenden Anfall waren wieder vermehrt Spike-Wave-Komplexe (etwa 9 Hz) zu erkennen. Der Verlust der Stellreflexe und das wiederholte unwillkürliche Umfallen des Tieres zeigten im elektroenzephalografischen Bild keine eindeutigen Unterschiede. Die EEG-Grundtätigkeit nach einem Anfall zeigte häufig eine postiktale Depression, welche durch vermehrt niedrigfrequente Wellen mit geringer Amplitude (Abbildung 21 a) gekennzeichnet war. Einige Sekunden nach einem Anfall konnten vereinzelt sekundäre Nachentladungen registriert werden (Abbildung 21 b). Diese bestanden aus Spikes, Polyspikes oder auch aus spindelförmigen Komplexen, die mit einer Frequenz von ca. 6 Hz auftraten. Diese Nachentladungen endeten oft erst nach einigen Minuten, wenn sich wieder die normale EEG- Grundaktivität einstellte. Die Analyse der Anfallsstärke war jedoch ohne Videokontrolle nur anhand der EEG-Daten nicht möglich, da sich die verschieden starken Anfälle weder in Amplitudenhöhe noch in Anfallsdauer signifikant unterschieden (Abbildung 23 und Tabelle 10). In Abbildung 24 ist jeweils das EEG eines generalisierten Anfalls des Stadiums III

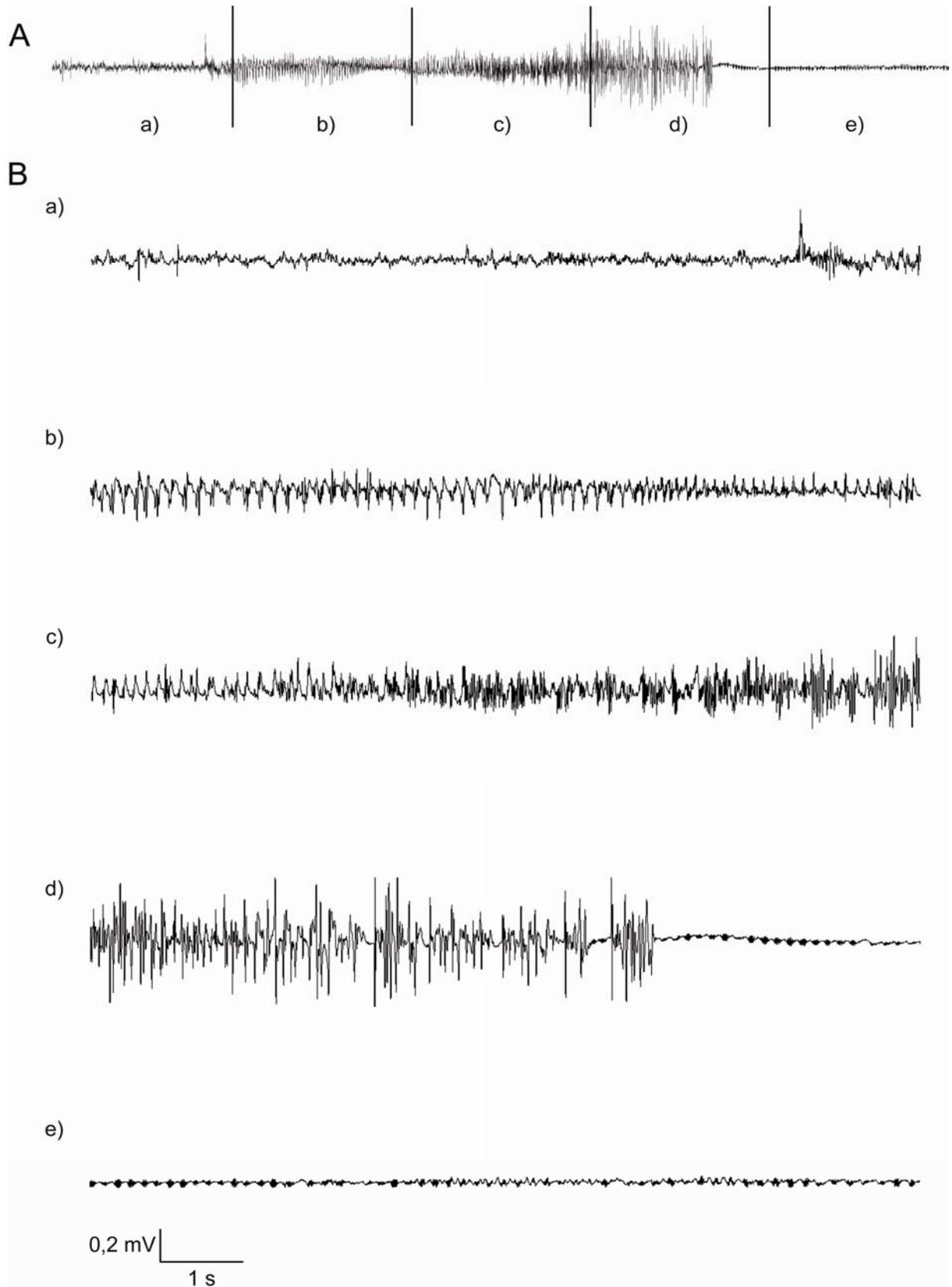


Abbildung 22: EEG-Aufzeichnung eines Anfalls des Stadiums IV mit klassischem Verlauf. A gesamter Anfall; B segmentale Vergrößerung des Anfalles.

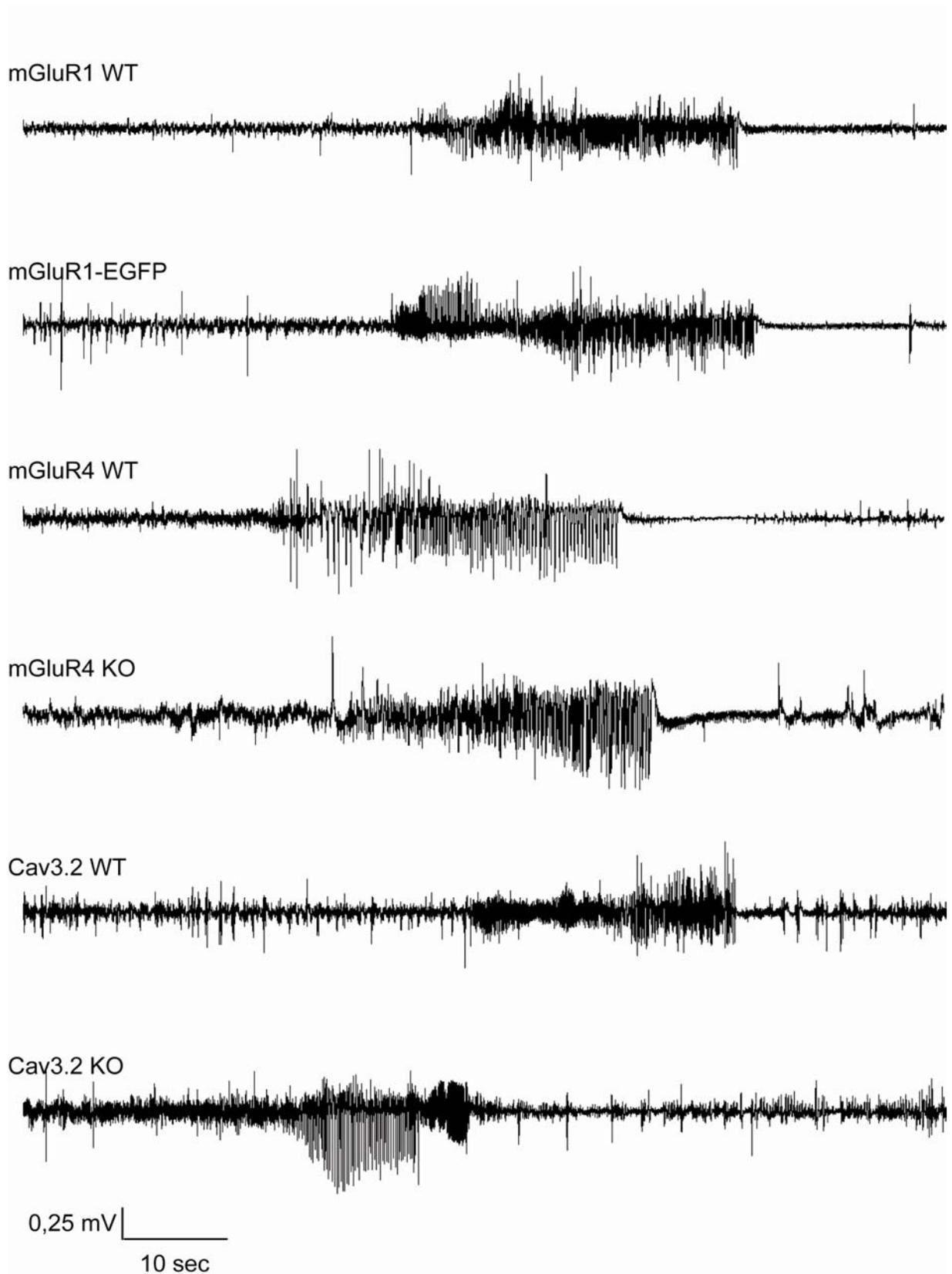


Abbildung 23: Exemplarische EEG-Aufzeichnungen von generalisierten Anfällen des Stadiums III jeder untersuchten Mauslinie.

Linie	Stadium-III-Anfälle		Stadium-IV-Anfälle		Gruppen- größe
	Spannung (mV)	Zeit (s)	Spannung (mV)	Zeit (s)	
mGluR1 WT	$0 \pm 0,07$	$32,5 \pm 2,3$	$0 \pm 0,10$	$31,1 \pm 0,6$	12
mGluR1-EGFP	$0 \pm 0,06$	$33,6 \pm 2,1$	$0 \pm 0,05$	$40,8 \pm 4,9$	6
mGluR4 WT	$0 \pm 0,04$	$27,0 \pm 4,8$	$0 \pm 0,07$	$30,8 \pm 1,3$	6
mGluR4 KO	$0 \pm 0,06$	$29,5 \pm 1,9$	$0 \pm 0,07$	$31,7 \pm 1,5$	9
Cav3.2 WT	$0 \pm 0,08$	$30,9 \pm 2,4$	$0 \pm 0,08$	$34,6 \pm 2,1$	7
Cav3.2 KO	$0 \pm 0,08$	$32,3 \pm 2,8$	$0 \pm 0,16^*$	$46,3 \pm 0^*$	5

Tabelle 10: Darstellung der Spannungsamplituden (Mittelwert \pm SD) und der Anfallslängen der beiden Anfallsstärken bei den untersuchten Linien.
* Daten von $n = 1$.

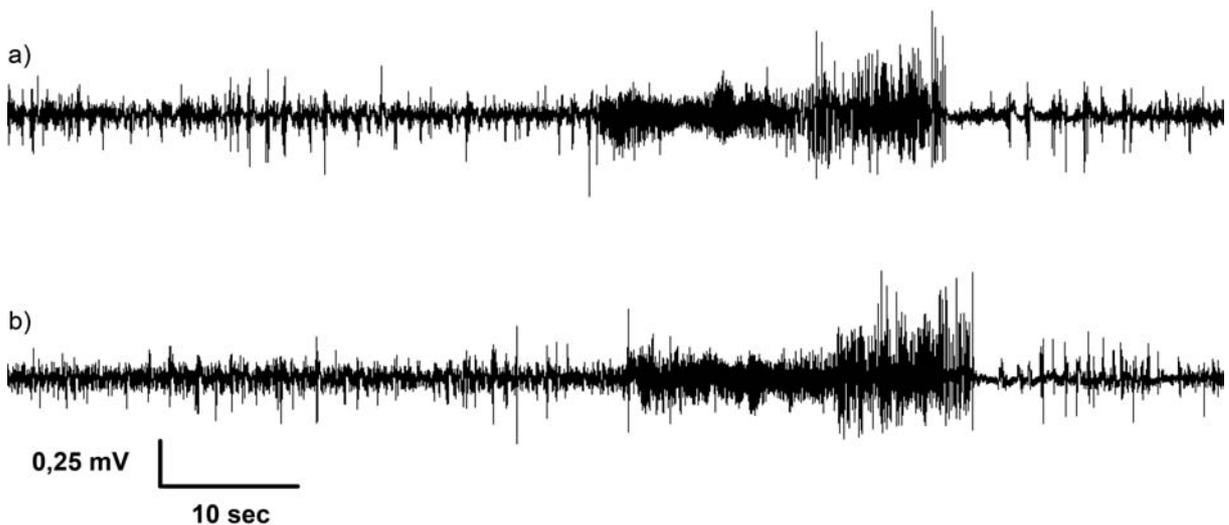


Abbildung 24: Exemplarische Darstellung der Spannungsamplitude des EEGs während spontaner epileptischer Anfälle eines Wildtyp-Tieres in der chronischen Phase nach Pilocarpin-induziertem SE. a) Anfall des Stadiums III b) Anfall des Stadiums IV.

und IV dargestellt. Die Amplitudenhöhe der Signale, die durch Anfälle des Stadiums III hervorgerufen wurden, war im Vergleich mit durchschnittlich $0 \pm 0,07$ mV nicht signifikant erhöht verglichen mit Stadium IV, bei welchen die durchschnittlichen Spannungen im Mittel bei $0 \pm 0,08$ mV lagen (Tabelle 10; U-Test: $p = 0,43$). Die Intensität der registrierten Signale während generalisierter Anfälle wies individuell eine große Variationsbreite mit durchschnittlichen Werten

von $\pm 0,02$ bis $\pm 0,26$ mV auf. Die Bestimmung der Anfallsdauer anhand der Signale der EEG-Aufzeichnung war geringfügig Krampfaktivität, da die hochfrequenten Signale im EEG bereits begannen, während visuell der Anfall noch nicht erkannt werden konnte. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die spontanen Anfälle im Pilocarpin-Modell in der Regel sekundär generalisierten. Daher war bei guter Positionierung des Tieres zur Kamera zwar das Verharren und die erste fokale Krampfaktivität visuell erkennbar, konnte jedoch schwer von normalem Verhalten abgegrenzt werden. Damit ist bereits ein Vorteil des EEG-Systems genannt. Im Mittel waren die Stadium-III-Anfälle im EEG 31,4 s lang, wohingegen die stärkeren Stadium-IV-Anfälle eine Dauer von 35,0 s (U-Test: $p = 0,11$) aufwiesen (Tabelle 10).

Der Einsatz von paralleler EEG-/Video-Aufnahme sollte den Zeitaufwand der Auswertung von Videobändern reduzieren, indem selektiv nur epileptische Ereignisse auf Video angesehen und hinsichtlich der Stärke dieser spontanen Anfälle ausgewertet werden konnten. Der Zeitaufwand zur Auswertung der EEG-Aufzeichnungen von 1 h betrug etwa 2 min, abhängig von der Anzahl der zu analysierenden Anfälle. Außerdem sollte die Beobachtung über einen Zeitraum von ca. drei Wochen 24 Stunden täglich mit minimalem Stress für die Tiere durchgeführt werden, dies wäre mit einer konventionellen Videoaufnahmetechnik nicht möglich gewesen. Ein weiterer Vorteil der EEG-Aufzeichnungen war es, dass die Anfälle nicht zu übersehen waren. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Einsatz von EEG-Aufzeichnungen zur Anfallsdetektion den Zeitaufwand der Videoauswertung durch das gezielte Anfahren bestimmter Sequenzen auf dem Videoband deutlich reduziert.

5.3 Induktion des Status epilepticus

Die Applikation von Skopolamin hatte in keinem Fall phänotypische oder elektroenzephalografische (s. Kap. 4.2.4) neurologische Veränderungen zur Folge.

Das Verhalten während des Versuches war bei allen Tieren gleich, unabhängig von der untersuchten Mauslinie. Der SE selbst unterschied sich phänotypisch nicht zwischen den Tieren. Einige Minuten nach der ersten, beziehungsweise einmaligen Pilocarpin-Injektion, war bei allen Tieren zunächst fokale Krampfaktivität (Kaubewegungen, Zittern der Tastaare, stereotypes Kopfnicken,

Immobilität) zu beobachten. Diese fokale Krampfaktivität ging bei den meisten Tieren nach einer Zeit in einzelne generalisierte Anfälle des Stadiums III oder IV über. Nach Anfällen des Stadiums III oder IV trat eine Pause auf, in der die Tiere geringgradige motorische Krampfaktivität zeigten. Aus einem solchen generalisierten Anfall konnte sich dann ein selbsterhaltender generalisierter SE entwickeln, der durch eine anhaltende geringgradige Krampfaktivität und den Verlust der Körperspannung gekennzeichnet war. Diese generalisierte motorische Krampfaktivität hielt bis zum Abbruch des SE mit Diazepam konstant an, wobei sich das Verhalten mit zunehmender Länge des SE nicht änderte. Der Abbruch des SE mit Diazepam führte innerhalb weniger Minuten zu einer Verminderung oder dem Erlöschen der sichtbaren motorischen Krampfaktivität. Am nächsten Morgen war phänotypisch keine motorische Krampfaktivität mehr zu erkennen.

5.3.1 mGluR transgene Mäuse

Im Rahmen dieses Modells wurden 51 männliche Tiere aus der mGluR1-Linie und 53 männliche Tiere aus der mGluR4-Linie mit einer Dosis von 310 mg/kg KM (mGluR1) beziehungsweise 340 mg/kg KM (mGluR4) Pilokarpin behandelt. Es galt festzustellen, ob Unterschiede in Bezug auf die Empfindlichkeit der einzelnen Genotypen in der akuten Phase nach Pilokarpin-Gabe vorlagen. Hierfür wurden die Daten der transgenen Mäuse mit denen der entsprechenden Wildtyp-Wurfgeschwister-Tiere (WT) verglichen.

5.3.1.1 Parameter im Pilokarpin-Modell

Insgesamt wurden 104 Tiere der mGluR-Mauslinien mit Pilokarpin behandelt (s. Kap. 4.2.4). War die erste Pilokarpin-Dosis nicht ausreichend, um generalisierte Anfälle auszulösen, so wurde erneut Pilokarpin injiziert und zwar die halbe Dosis. Entsprechend der sichtbaren motorischen Aktivität wurden die Tiere nach Beendigung des Versuches in Gruppen eingeteilt. Aus Tabelle 11 sind die Gesamtzahl der Tiere und die Zuordnung in die verschiedenen Gruppen ersichtlich. Nach der Pilokarpin-Applikation entwickelten 42 von 104 (40,4%) Tiere einen selbsterhaltenden generalisierten SE, den sie auch überlebten. Etwa 40% gingen als Sham-Tiere aus diesem Versuch hervor. Das sind Tiere, die keinen SE entwickelten und auch nicht starben. Von diesen Sham-Tieren entwickelte die Hälfte keine Anfälle, die andere Hälfte entwickelte zwar Anfälle, diese Tiere

bekamen jedoch keinen SE. Die Mortalität lag bei etwa einem Fünftel, wobei die Mortalität im SE mit durchschnittlich ca. 7% jedoch die Ausnahme darstellte.

Von den 51 mGluR1-Tieren entwickelten 8 transgene mGluR1-EGFP- (42%) und 14 mGluR1-WT (44%) einen erfolgreichen SE (Tabelle 11). Bei den transgenen mGluR1-EGFP-Tieren gab es 10 Sham-Tiere, von denen 4 (21%) gar keine Anfälle bekamen und 6 Tiere (32%) generalisierte Anfälle zeigten. 44% der mGluR1-WT wurden der Sham-Gruppe zugeordnet (jeweils 22% ohne Anfälle und 22% mit Anfällen). In der mGluR1-EGFP-Linie starb ein Tier und zwar im SE. Bei den mGluR1-WT starben 12%, davon 9% in einem generalisierten Anfall und 1 Tier im SE.

	Gruppen- größe	Linie			
		mGluR1 WT	mGluR1- EGFP	mGluR4 WT	mGluR4 KO
Gruppen- größe	104	32	19	24	29
SE (erfolgreich)	42 (40,4%)	14 (44%)	8 (42%)	8 (33%)	12 (41%)
keine Anfälle	20 (19,2%)	7 (22%)	4 (21%)	6 (25%)	3 (10%)
Anfälle, aber kein SE	20 (19,2%)	7 (22%)	6 (32%)	6 (25%)	1 (3%)
Mortalität in einem Anfall	15 (14,4%)	3 (9%)	0	3 (13%)	9 (31%)
Mortalität im SE	7 (6,7%)	1 (3%)	1 (5%)	1 (4%)	4 (14%)

Tabelle 11: Effekt der Pilocarpin-Gabe in mGluR1-EGFP- und mGluR4-KO-Mäusen und Kontroll-Tieren. Es sind die absoluten und relativen Zahlen für die gesamte Gruppe und nach Linie getrennt dargestellt.

Aus der mGluR4-Linie entwickelten 12 mGluR4-KO- (41%) und 8 mGluR4-WT (33%) einen SE. Etwa 13% der mGluR4-KO-Tiere waren Sham-Tiere, wobei 1 Tier Anfälle entwickelte und 3 Tiere (10%) gar keine Anfälle bekamen. Bei den

mGluR4-WT fielen auf diese Gruppe insgesamt 50%, wobei die Hälfte Anfälle hatte und die andere Hälfte nicht. Somit waren in der mGluR4-WT-Gruppe wesentlich mehr Sham-Tiere zu verzeichnen. Die Mortalität war bei den mGluR4-KO-Tieren mit insgesamt 45% deutlich höher, als bei den mGluR4-WT (17%). Wobei in beiden Gruppen der größere Teil auf die Tiere fiel, die in einem Anfall verstarben (mGluR4 KO: 31%; mGluR4 WT: 13%), als die Tiere, die im SE verstarben (mGluR4 KO: 14%; mGluR4 WT: 4%).

Verglich man nun die Anzahl der Überlebenden mit der Anzahl der Gestorbenen, so zeigten sich bei den mGluR1-Tieren zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,34$). Auch in der Gruppe der überlebenden Tiere fanden sich bei den mGluR1-EGFP-Tieren keine signifikanten Unterschiede (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,72$). Betrachtet man die Anzahl der Tiere dieser Gruppe die verstarben (im Anfall oder im SE), so konnte aufgrund der niedrigen Anzahl keine Aussage getroffen werden.

Bei den mGluR4-Tieren fanden sich im Bezug auf überlebende und gestorbene Tiere signifikante Unterschiede. So überlebten bei den mGluR4-KO-Tieren signifikant weniger Tiere, als bei den mGluR4-WT (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$). Innerhalb der Gruppe der überlebenden Tiere gab es bei den mGluR4-KO-Tieren signifikant mehr Tiere mit SE als bei den mGluR4-WT (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,05$). In Bezug auf die Anzahl der verstorbenen Tiere waren keine Unterschiede zu erkennen (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,89$).

Die Stärke der Anfälle wurde, wie in der chronischen Phase, in zwei Stadien eingeteilt. Untersucht wurden zum Einen die generalisierten Stadium-III-Anfälle und zum Anderen die stärkeren generalisierten Anfälle des Stadiums IV. Betrachtet man die Stärke des ersten auftretenden Anfalls, so zeigten die transgenen mGluR1-EGFP-Tiere ($n = 15$) verglichen mit mGluR1-WT ($n = 25$) keine Unterschiede (Abbildung 25; Chi-Quadrat-Test: $p = 0,91$). Es zeigten jedoch weder die mGluR1-EGFP- noch die mGluR1-WT signifikant häufiger stärkere (Stadium IV) als schwächere Anfälle des Stadiums III (mGluR1-EGFP: Stadium III: 33%; Stadium IV: 67%; Chi-Quadrat-Test: $p = 0,16$; mGluR1 WT: Stadium III: 32%; Stadium IV: 68% (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,20$). Die mGluR4-KO-Mäuse ($n = 26$) hingegen zeigten signifikant häufiger stärkere Anfälle als die mGluR4-WT ($n = 18$; Abbildung 25; Stadium III: 31%; Stadium IV: 69%; mGluR4 WT: Stadium III: 56%; Stadium IV: 44%; Chi-Quadrat-Test: $p < 0,05$). Vergleich man die

Häufigkeit der Stärke innerhalb der Gruppe, so zeigten die mGluR4-KO-Tiere häufiger stärkere als schwächere Anfälle (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,05$). Bei den mGluR4-WT fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,57$).

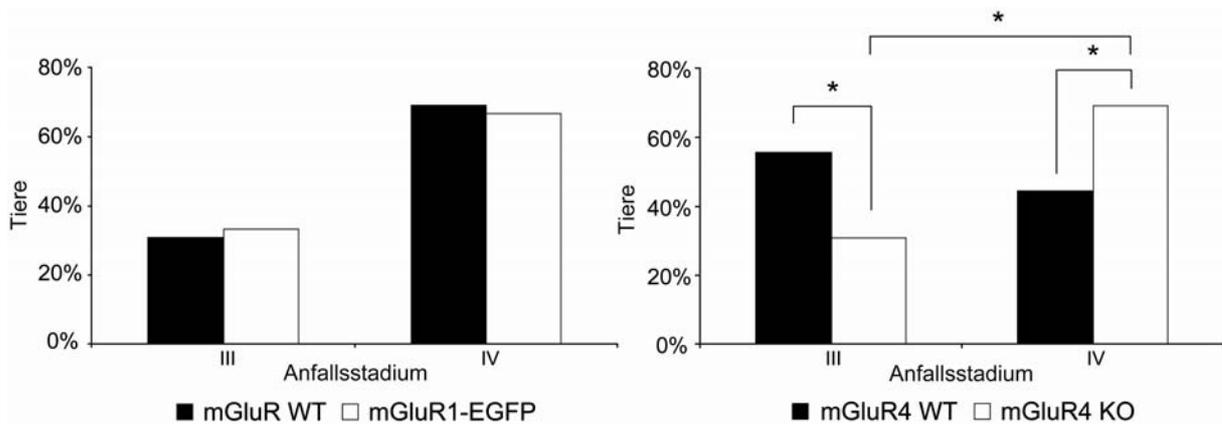


Abbildung 25: Prozentuale Anteile des Stadiums des ersten Anfalls von mGluR1-EGFP- und mGluR4-KO-Mäusen mit spontanen epileptischen Anfällen nach Pilokarpin-Applikation verglichen mit WT. * $p < 0,05$.

Während des Pilokarpin-Versuches wurden die Parameter „Latenz in Minuten bis zum ersten generalisierten Anfall nach Pilokarpin-Gabe“, „Latenz in Minuten bis zum selbsterhaltenden SE“ sowie „Latenz in Minuten bis zur Letalität“ in Abhängigkeit von der Mauslinie ausgewertet (Tabelle 12). Die Zeiten bis zum ersten Auftreten von Anfällen, bis zum SE und bis zum *Exitus letalis* wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Signifikanzniveau des T-Testes s. p-Werte in Tabelle 12), wobei die Signifikanz bei den verstorbenen Tiere der mGluR1-Linie wegen geringer Anzahl nicht auswertbar war. Bei mGluR1-EGFP-Tieren trat der erste Anfall ebenso wie der SE durchschnittlich 2 min früher auf als bei den mGluR1-WT. Bei den mGluR4-KO- Mäusen und mGluR4-WT lag die Zeit bis zum ersten Anfall jeweils bei 23 min.

In der mGluR4-Linie entwickelten mGluR4-KO-Tiere ca. 6 min später einen SE als mGluR4-WT. Jedes Tier hatte zuvor mindestens einen isolierten generalisierten Anfall gezeigt. Führte die Pilokarpin-Applikation zum *Exitus letalis*, geschah dies bei beiden transgenen Linien nach durchschnittlich 36 min. Bei beiden Kontrollgruppen dauerte dies länger.

Parameter während des Pilocarpin-Modells	Linie			
	mGluR1 WT	mGluR1-EGFP	mGluR4 WT	mGluR4 KO
Latenz (min) bis zum 1. generalisierter Anfall nach der Pilo-Gabe				
Mittelwert	29	27	23	23
SEM	3	4	2	2
min.-max.	12-54	8-49	7-41	3-55
Gruppengröße	20	9	15	29
Signifikanzniveau	p = 0,63		p = 0,83	
Zeit (min) bis SE				
Mittelwert	46	44	39	45
SEM	5	6	2	2
min.-max.	24-71	14-71	26-50	33-65
Gruppengröße	15	8	9	14
Signifikanzniveau	p = 0,88		p = 0,24	
Zeit (min) bis zur Letalität				
Mittelwert	57	36	41	36
SEM	3	0	4	3
min.-max.	44-64	36	26-53	20-75
Gruppengröße	3	1	4	11
Signifikanzniveau	n. A.		p = 0,58	

Tabelle 12: Latenzzeiten im Verlauf des Pilocarpin-Versuches. Angegeben ist der Zeitpunkt des Auftretens des ersten generalisierten Anfalls nach der Pilocarpin-Gabe, die Zeit bis SE und die Zeit bis zur Letalität jeweils in Minuten.

Die Anzahl generalisierter Anfälle, die während des Versuches beobachtet werden konnte, lag pro Tier in einem Bereich zwischen 0 und 7 Anfällen. Von den 21 Tieren, die keinen SE entwickelten, aber generalisierte Anfälle hatten, lag die Anfallszahl zwischen 1 Anfall bis hin zu 6 Anfällen. Insgesamt erlitten 19 Tiere gar keine generalisierten Anfälle nach Pilokarpin-Applikation. Die mittleren Anfallszahlen nach Pilokarpin-Injektion betragen bei den mGluR1-EGFP-Tieren 2,16 (n = 19) und bei den mGluR1-WT 2,72 (n = 32) und waren nicht signifikant verschieden (Tabelle 13; T-Test: p = 0,29). Auch bei den mGluR4-KO-Tieren waren keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf Anfallsanzahl nach Pilokarpin-Gabe zu erkennen (Tabelle 13; mGluR4 KO: 2,66; n = 29; mGluR4 WT: 2,5; n = 24; U-Test: p = 0,78).

Anzahl generalisierter Anfälle nach der Pilo-Gabe	Linie			
	mGluR1 WT	mGluR1-EGFP	mGluR4 WT	mGluR4 KO
Gruppengröße	32	19	24	29
Mittelwert	2,72	2,16	2,50	2,66
SEM	0,35	0,38	0,37	0,26
min.-max.	0-7	0-6	0-6	0-6
Signifikanzniveau	p = 0,29		p = 0,78	

Tabelle 13: Anzahl generalisierter Anfälle nach Pilokarpin-Gabe in den verschiedenen Tiergruppen.

Entwickelten die Tiere Anfälle und untersuchte man die Stärke dieser Anfälle, so zeigten die mGluR1-EGFP-Tiere seltener schwächere Anfälle (47%; n = 15) als die mGluR1-WT (Abbildung 26; 63%, n = 25; Chi-Quadrat-Test: p < 0,001). Die mGluR1-WT zeigten signifikant seltener schwere Anfälle als schwache (Stadium III: 63%, Stadium IV: 37%; U-Test: p < 0,01). Der Anteil der Anfälle beider Stärken war bei den mGluR1-EGFP-Mäusen relativ ausgeglichen (Stadium III: 47%, Stadium IV: 53%, U-Test: p = 0,94).

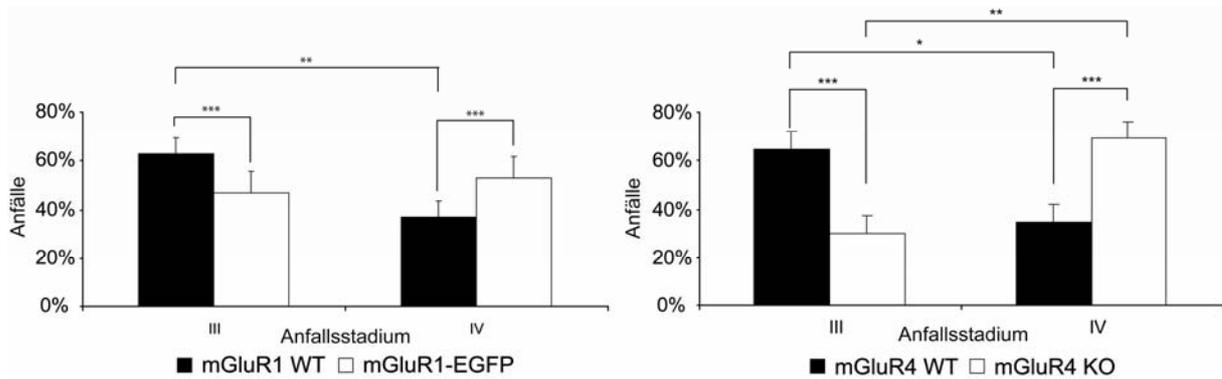


Abbildung 26: Prozentuale Verteilung der Stärke aller beobachteten generalisierten Anfälle bei mGluR1-EGFP- und mGluR4-KO-Mäusen verglichen mit WT. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die mGluR4-KO-Tiere zeigten signifikant weniger Stadium-III-Anfälle (Abbildung 26; 30%, $n = 25$) als die mGluR4-WT (65%, $n = 18$) und signifikant mehr Stadium-IV-Anfälle. (mGluR4 KO: 70%; mGluR4 WT: 35%, Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$). Die mGluR4-KO-Tieren erlitten signifikant weniger schwächere Stadium-III-Anfälle als stärkere Stadium-IV-Anfälle (U-Test: $p < 0,01$). Bei den mGluR4-WT verhielt es sich genau umgekehrt (T-Test: $p < 0,05$).

5.3.1.2 Status epilepticus

Der Pilocarpin-induzierte SE wurde nach 40 min mit Diazepam unterbrochen. Diese Zeit ist ausreichend, um in den Tieren in der chronischen Phase Eigenschaften der TLE zu erzeugen. Außerdem führt diese frühe Diazepam-Gabe zu einer Herabsetzung der Letalität im Pilocarpin-Modell. Alle Mäuse mit induziertem SE entwickelten später spontane Anfälle. Diese Ergebnisse werden ausführlich in Kapitel 5.4 beschrieben. Nach mehreren generalisierten Anfällen des Stadiums III und/oder IV konnte sich ein selbsterhaltender generalisierter SE entwickeln, gekennzeichnet durch eine anhaltende geringgradige Krampfaktivität und den Verlust der Körperspannung. Diese vorwiegend generalisierte motorische Krampfaktivität hielt bis zur Unterbrechung des SE mit Diazepam konstant an, wobei sich das Verhalten der Tiere mit zunehmender Länge des SE nicht änderte.

Die Latenzzeiten bis zum Erreichen eines erfolgreichen SE wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Wie in Tabelle 14 ersichtlich, zeigten mGluR1-EGFP-Mäuse ebenso wie die mGluR1-WT nach durchschnittlich 29 min erste generalisierte Anfälle (U-Test: $p = 0,97$). Nach 45 min zeigten mGluR1-EGFP-Tiere und 3 min später mGluR1-WT einen generalisierten SE (U-Test: $p = 0,76$).

Parameter bis zum Erreichen eines erfolgreichen SE	Linie			
	mGluR1 WT	mGluR1-EGFP	mGluR4 WT	mGluR4 KO
Gruppengröße	14	8	8	12
Latenz (min) bis zum 1. generalisierter Anfall				
Mittelwert	29	29	27	25
SEM	2,2	4,1	3,1	3,1
min.-max.	10-44	8-49	15-40	11-40
Signifikanzniveau	p = 0,97		p = 0,62	
Zeit (min) bis SE				
Mittelwert	48	45	42	43
SEM	6,2	4,4	2,5	3,1
min.-max.	14-81	24-71	26-50	28-62
Signifikanzniveau	p = 0,76		p = 0,97	
Zeit (min) vom 1. generalisierten Anfall bis SE				
Mittelwert	19	16	15	18
SEM	2,8	3,6	2,4	3,2
min.-max.	3-37	2-37	7-26	8-25
Signifikanzniveau	p = 0,57		p = 0,38	

Tabelle 14: Latenzzeiten bis zum Entwickeln generalisierter Anfälle und bis zum Erreichen eines erfolgreichen SE in min.

mGluR4-KO-Tiere zeigten nach durchschnittlich 25 min erste generalisierte Anfälle, wohingegen die mGluR4-WT diese 2 min später entwickelten (U-Test: $p = 0,62$). SE erreichten die mGluR4-KO-Tiere nach durchschnittlich 43 min und die mGluR4-WT 1 min früher (U-Test: $p = 0,97$).

Die Zeit zwischen erstem generalisiertem Anfall und Beginn des SE wies ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf, verglich man die transgenen Tiere mit ihren Kontrollen. Bei mGluR1-EGFP-Mäusen lag diese Zeit bei 16 min und bei den mGluR1-WT bei 19 min (U-Test: $p = 0,57$). Die mGluR4-KO-Tiere bekamen durchschnittlich 18 min nach dem ersten Anfall einen SE und die mGluR4-WT nach ca. 15 min (U-Test: $p = 0,38$). Am frühesten wurde ein SE bei einzelnen Tieren schon 3 min nach auftreten des ersten durch Pilocarpin induzierten Anfalls beobachtet.

Die Anzahl aller generalisierter Anfälle bis zum Erreichen eines SE war weder bei den mGluR1-EGFP-Tieren noch bei den mGluR4-KO-Tieren signifikant verschieden (Tabelle 15; U-Test: mGluR1: $p = 0,15$; mGluR4: $p = 0,79$).

Anzahl der beobachteten Anfälle	Linie			
	mGluR1 WT	mGluR1-EGFP	mGluR4 WT	mGluR4 KO
Gruppengröße	14	8	8	12
Mittelwert	4,3	3,5	3,8	3,6
SEM	0,29	0,47	0,42	0,30
Signifikanzniveau	$p = 0,15$		$p = 0,79$	

Tabelle 15: Anzahl generalisierter Anfälle bis zum Erreichen eines erfolgreichen SE bei den verschiedenen Gruppen.

Im Gruppenvergleich (Abbildung 27) zeigten die transgenen mGluR1-EGFP-Mäuse signifikant mehr stärkere und weniger schwache Anfälle bis zum Erreichen eines erfolgreichen SE (Stadium III: 49%; Stadium IV: 51%) als mGluR1-WT (Stadium III: 74%; Stadium IV: 26%; Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$). Die mGluR1-WT zeigten signifikant mehr schwächere als stärkere Anfälle (U-Test: $p < 0,001$), wohingegen die mGluR1-EGFP-Tiere keine Unterschiede aufwiesen (U-Test: $p = 0,95$). Betrachtete man die Stärke der Anfälle bei den mGluR4-KO-Tieren

(Abbildung 27), so war zu erkennen, dass diese signifikant mehr stärkere Anfälle (Stadium III: 36%; Stadium IV: 64%) im Gegensatz zu mGluR4-WT (Stadium III: 55%; Stadium IV: 45%) bekamen (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,05$). Innerhalb der Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (U-Test: mGluR4 WT: $p = 0,48$; mGluR4 KO: $p = 0,12$).

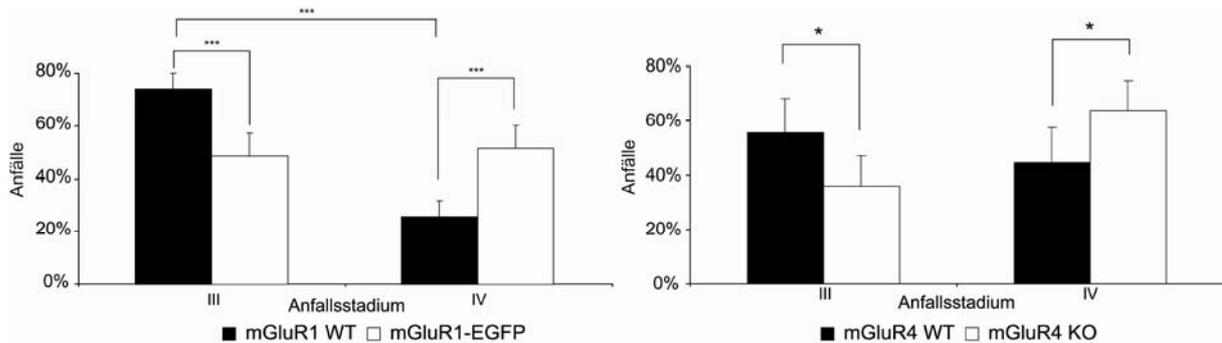


Abbildung 27: Prozentualer Anteil der Anfallsstärke der mGluR1-EGFP-Mäuse und mGluR4-KO-Mäuse bis zum Erreichen des erfolgreichen SE verglichen mit WT. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

5.3.1.3 Allgemeinbefinden nach Status epilepticus

Das Allgemeinbefinden aller Mäuse, die einen durch Pilokarpin-induzierten SE überlebten, war an den folgenden Tagen erheblich gestört. Die Mäuse waren entweder apathisch oder hypomotorisch. Nach einem bis fünf Tagen entwickelten sie eine Hyperexzitabilität, d.h. sie reagierten hochgradig empfindlich auf jede Form von Geräuschen oder Berührung. Dieses Verhalten hielt auch in der chronischen Phase an. Bis wieder eine normale Futteraufnahme gewährleistet war, wurden die Tiere individuell gefüttert (s. Kap. 4.2.4). Diese Fütterung war, je nach Tier, zwischen einem und vier Tagen nötig.

5.3.2 Cav3.2-KO-Mäuse

Es wurden insgesamt 166 männliche Tiere aus der Cav3.2-Linie mit einer Dosis von 330 mg/kg KM Pilokarpin behandelt. Ziel dieser Untersuchungen war es, festzustellen, ob sich die Cav3.2-KO-Mäuse in diesem Modell anders verhalten als Cav3.2-WT.

5.3.2.1 Parameter im Pilokarpin-Modell

Insgesamt wurden 166 Tiere mit Pilokarpin behandelt. War die erste Pilokarpin-Dosis nicht ausreichend, um generalisierte Anfälle auszulösen, so wurde die halbe Pilokarpin-Dosis nach dem Protokoll in Kap. 4.2.4 erneut injiziert. Die Einteilung in

die verschiedenen Gruppen entsprechend der sichtbaren motorischen Aktivität erfolgte wie in Kap. 5.3.1.1 für die mGluR-transgenen Tiere beschrieben. In Tabelle 16 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Nach der Pilocarpin-Applikation entwickelten 52 (31%) Tiere einen selbsterhaltenden generalisierten SE. Etwa 32% gingen als Sham-Tiere aus diesem Versuch hervor. Von diesen Sham-Tieren entwickelte die Hälfte gar keine Anfälle und bei der anderen Hälfte waren zwar Anfälle zu erkennen, diese Tiere entwickelten jedoch keinen SE. Die Mortalität lag bei insgesamt 37%, wobei die Mortalität im SE mit durchschnittlich ca. 1% jedoch die Ausnahme darstellte. Es entwickelten 23 transgene Cav3.2-KO- (29%) und 29 Cav3.2-WT (33%) einen erfolgreichen SE. Bei den transgenen Cav3.2-KO-Tieren gab es 29 Sham-Tiere, von denen 14 (18%) gar keine Anfälle bekamen und 15 Tiere (19%) generalisierte Anfälle zeigten. Insgesamt 24% der Cav3.2-WT waren der Sham-Gruppe zuzuordnen (15% ohne Anfälle und 13% mit Anfällen). Die Mortalität lag bei den Cav3.2-KO-Tieren bei 32% und bei den Cav3.2-WT bei 40%.

	Linie		
	gesamt	Cav3.2 WT	Cav3.2 KO
Gruppengröße	166	88	78
SE (erfolgreich)	52 (31%)	29 (33%)	23 (29%)
keine Anfälle	27 (16%)	13 (15%)	14 (18%)
Anfälle, aber kein SE	26 (16%)	11 (13%)	15 (19%)
Mortalität in einem Anfall	60 (36%)	35 (40%)	25 (32%)
Mortalität im SE	1 (1%)	0	1 (1%)

Tabelle 16: Effekt der Pilocarpin-Gabe in Cav3.2-KO-Mäusen. Es sind die absoluten und relativen Zahlen für die gesamte Gruppe und nach Genotyp getrennt dargestellt.

Lediglich in der Cav3.2-KO-Linie starb ein Tier im SE. Vergleich man nun die Anzahl der überlebenden mit der Anzahl der gestorbenen Tiere, so zeigten sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,23$). Auch in der Gruppe der überlebenden Tiere fanden sich bei den Cav3.2-KO-Tieren keine signifikanten Unterschiede (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,27$). Betrachtet man die Anzahl der Tiere dieser Gruppe die verstarben (im Anfall oder im SE), so konnte aufgrund der niedrigen Anzahl keine Aussage getroffen werden.

Die Stärke der Anfälle wurde, wie bei den mGluR-transgenen Tieren in zwei Gruppen eingeteilt, und zwar in schwächere Stadium-III- und stärkere Stadium-IV-Anfälle. Betrachtet man die Stärke des ersten auftretenden Anfalls, so zeigten die Cav3.2-KO-Tiere, verglichen mit den Cav3.2-WT, keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 28; Chi-Quadrat-Test: $p = 0,20$). Verglich man die Häufigkeit der Stärke innerhalb der Gruppe, so zeigten weder die Cav3.2-KO- noch die Cav3.2-WT signifikante Unterschiede (Cav3.2-KO: Stadium III: 47%; Stadium IV: 53%, $n = 62$, Chi-Quadrat-Test: $p = 0,45$; Cav3.2 WT: Stadium III: 55%; Stadium IV: 45%, $n = 73$; Chi-Quadrat-Test: $p = 0,10$).

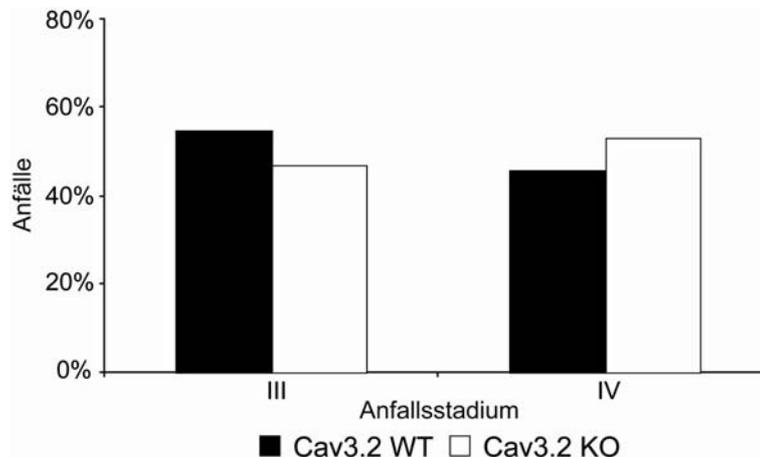


Abbildung 28: Prozentuale Anteile des Stadiums des ersten Anfalls der Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Mäuse mit spontanen epileptischen Anfällen nach Pilokarpin-Applikation.

Außerdem wurden auch in dieser Gruppe die verschiedenen Latenzzeiten untersucht (Tabelle 17). Die Cav3.2-KO-Tiere bekamen ebenso wie die Cav3.2-WT nach durchschnittlich 36 min den ersten generalisierten Anfall. (Cav3.2 KO $n = 62$; Cav3.2 WT $n = 72$). Der SE begann bei den Cav3.2-KO-Mäusen im Mittel 55 min ($n = 24$) nach der Pilokarpin-Applikation, bei den Cav3.2-WT ca. 4 min früher ($n = 28$). Jedes Tier hatte zuvor mindestens einen isolierten generalisierten Anfall gezeigt. Führt die Applikation zum *Exitus letalis* dauerte dies bei den Cav3.2-KO-

Parameter während des Pilocarpin-Modells	Linie	
	Cav3.2 WT	Cav3.2 KO
Latenz (min) bis zum 1. generalisierter Anfall nach der Pilo-Gabe		
Mittelwert	36	36
SEM	4	5
min.-max.	9-68	10-69
Gruppengröße	73	62
Signifikanzniveau	p = 0,90	
Zeit (min) bis SE		
Mittelwert	51	55
SEM	9	11
min.-max.	24-93	28-92
Gruppengröße	28	24
Signifikanzniveau	p = 0,64	
Zeit (min) bis zur Letalität		
Mittelwert	46	45
SEM	8	9
min.-max.	12-72	10-69
Gruppengröße	35	26
Signifikanzniveau	p = 0,95	

Tabelle 17: Latenzzeiten im Verlauf des Pilocarpin-Versuches. Angegeben ist der Zeitpunkt des Auftretens des ersten generalisierten Anfalls nach der Pilocarpin-Gabe, die Zeit bis SE und die Zeit bis zur Letalität jeweils in Minuten.

Tieren ca. 45 min (n = 26) und bei den Cav3.2-WT 46 min (n = 35). Die Zeiten bis zum ersten Auftreten von Anfällen, bis zum SE und bis zum *Exitus letalis* wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Signifikanzniveau des T-Testes s. p-Werte in Tabelle 17). Die Anzahl generalisierter Anfälle, die während des Versuches beobachtet werden konnten, lag in einem Bereich zwischen 0 und 12 Anfällen pro Tier. Von den 26 Tieren, die keinen SE entwickelten, aber generalisierte Anfälle hatten, lag die Anfallszahl zwischen 1 Anfall bis hin zu 5 Anfällen. Insgesamt erlitten 30 Tiere keine generalisierten Anfälle nach der Pilocarpin-Applikation, wovon jedoch 3 Tiere ohne generalisierte Anfälle an Asphyxie verstarben. Die mittleren Anfallszahlen nach Pilocarpin-Injektion betragen bei den Cav3.2-KO-Tieren 2,46 (n = 78) und bei den Cav3.2-WT 2,56 (n = 88) und waren nicht signifikant verschieden (Tabelle 18; U-Test: p = 0,50).

Anzahl generalisierter Anfälle nach der Pilo-Gabe	Linie	
	Cav3.2 WT	Cav3.2 KO
Gruppengröße	88	78
Mittelwert	2,56	2,46
SEM	0,21	0,25
min.-max.	0-8	0-12
Signifikanzniveau	p = 0,50	

Tabelle 18: Übersicht über die Anzahl generalisierter Anfälle nach Pilocarpin-Gabe der beiden Gruppen.

Entwickelten die Tiere Anfälle und verglich man die Stärke dieser Anfälle zwischen den Gruppen, so verhielten sich die Cav3.2-KO-Tiere wie die Cav3.2-WT (Abbildung 29; Stadium-III-Anfälle: Cav3.2 KO: 65%, Cav3.2 WT: 62%, Stadium-IV-Anfälle: Cav3.2 KO: 35%, Cav3.2 WT: 38%; Chi-Quadrat-Test: $p = 0,72$). Die Cav3.2-KO-Tieren erlitten signifikant mehr schwächere Stadium-III-Anfälle als stärkere Stadium-IV-Anfälle (U-Test: $p < 0,001$), ebenso wie die Cav3.2-WT (U-Test: $p < 0,001$).

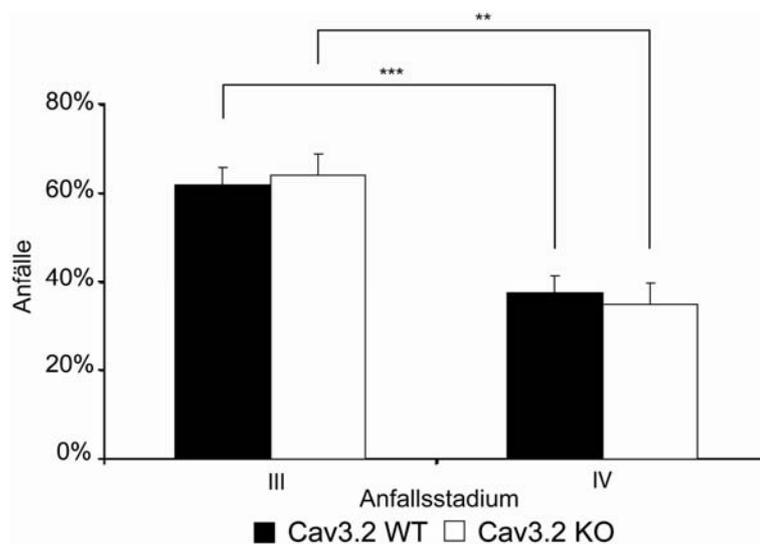


Abbildung 29: Prozentuale Verteilung der Stärke aller beobachteten generalisierten Anfälle bei Cav3.2-KO-Mäusen verglichen mit Cav3.2-WT. *** $p < 0,001$.

5.3.2.2 Status epilepticus

In dieser Gruppe entwickelten ebenfalls alle Mäuse mit induziertem SE später spontane Anfälle. Diese Ergebnisse werden ausführlich in Kapitel 5.4.2.2 beschrieben. Auch bei diesen Tieren änderte sich das beobachtete Verhalten mit zunehmender Länge des SE nicht.

Analysierte man die Stärke des ersten Anfalls bei diesen Tieren, so zeigten die transgenen Tiere signifikant häufiger stärkere Stadium-IV-Anfälle (Abbildung 30; Chi-Quadrat-Test: $p < 0,05$) wohingegen die Cav3.2-WT gleich häufig Stadium-III- und Stadium-IV-Anfälle bekamen (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,62$). Cav3.2-KO-Tiere hatten 26% Stadium-III- und 74% Stadium-IV-Anfälle. Die Cav3.2-WT zeigten hingegen zu 55% Stadium-III-Anfälle und nur zu 45% Stadium-IV-Anfälle. Im Gruppenvergleich zeigten die transgenen Mäuse signifikante Unterschiede in Bezug auf diesen Parameter (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$).

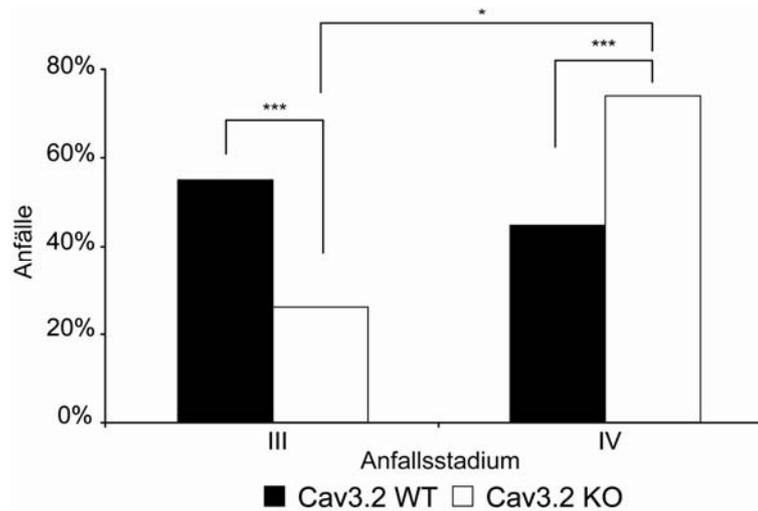


Abbildung 30: Prozentuale Anteile des Stadiums des ersten Anfalls von Cav3.2-KO-Mäusen bis zum SE verglichen mit Cav3.2-WT. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Die Latenzzeiten bis zum Erreichen eines SE wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Wie in Tabelle 19 ersichtlich zeigten Cav3.2-KO-Mäuse ebenso wie die Cav3.2-WT nach durchschnittlich 33 min erste generalisierte Anfälle (T-Test: $p = 0,91$). Nach durchschnittlich 56 min zeigten Cav3.2-KO-Tiere und nach 51 min Cav3.2-WT einen generalisierten SE (T-Test: $p = 0,50$). Die Zeit zwischen erstem generalisiertem Anfall und Beginn des SE wies ebenfalls keine Unterschiede auf, verglich man die transgenen Tiere mit ihren Kontrollen. Bei Cav3.2-KO-Tieren dauerte es ca. 23 min und bei den Cav3.2-WT ca. 18 min (T-Test: $p = 0,41$).

Parameter bis zum Erreichen eines erfolgreichen SE	Linie	
	Cav3.2 WT	Cav3.2 KO
Gruppengröße	29	23
Latenz (min) bis zum 1. generalisierter Anfall		
Mittelwert	33	33
SEM	2,1	3,1
min.-max.	18-64	11-69
Signifikanzniveau	p = 0,91	
Zeit (min) bis SE		
Mittelwert	51	56
SEM	3,0	4,1
min.-max.	24-93	31-92
Signifikanzniveau	p = 0,50	
Zeit (min) vom 1. generalisierten Anfall bis SE		
Mittelwert	18	23
SEM	2,5	3,0
min.-max.	7-41	9-64
Signifikanzniveau	p = 0,41	

Tabelle 19: Latenzzeiten bis zum entwickeln generalisierter Anfälle und bis zum Erreichen eines erfolgreichen SE.

Die Anzahl aller generalisierten Anfälle bis zum Erreichen eines SE war nicht signifikant verschieden (Tabelle 20). Die KO-Tiere bekamen durchschnittlich 5 Anfälle und die Cav3.2-WT 4,2 (U-Test: $p = 0,38$).

Anzahl der beobachteten Anfälle	Linie	
	Cav3.2 WT	Cav3.2 KO
Gruppengröße	29	23
Mittelwert	4,2	5
SEM	0,3	0,4
Signifikanzniveau	$p = 0,94$	

Tabelle 20: Anfallsanzahlen bis zum Erreichen eines erfolgreichen SE bei Cav3.2-Tieren.

Betrachtet man die Stärke dieser Anfälle, so zeigten die transgenen Cav3.2-KO-Mäuse im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 31; Cav3.2 WT: Stadium III: 65%; Stadium IV: 35%; Cav3.2 KO: Stadium III: 68%; Stadium IV: 32%; Chi-Quadrat-Test: $p = 0,94$). Beide Gruppen zeigten weniger starke und mehr schwache Anfälle bis zum Erreichen eines erfolgreichen SE (T-Test: Cav3.2 WT $p < 0,001$, Cav3.2 KO $p < 0,01$).

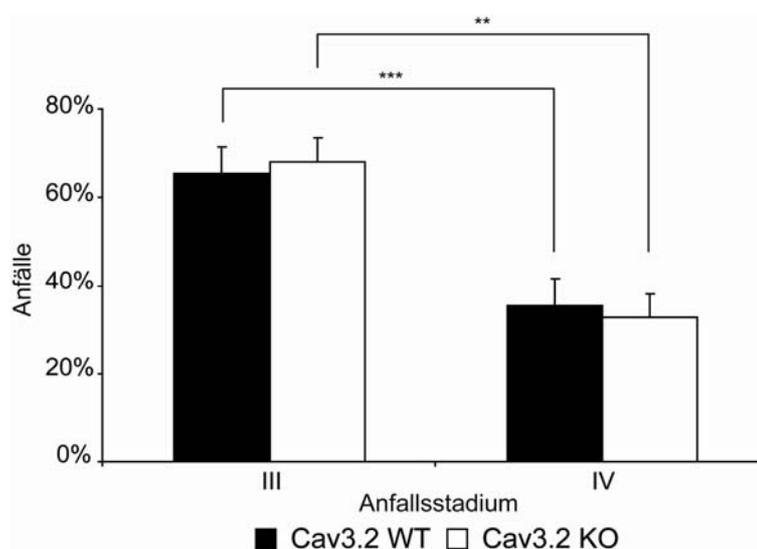


Abbildung 31: Prozentualer Anteil der Anfallsstärke der Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Mäuse bis zum Erreichen des erfolgreichen SE. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.3.2.3 Allgemeinbefinden nach Status epilepticus

Das Allgemeinbefinden der Cav3.2-Tiere nach SE war dem der mGluR-Tiere sehr ähnlich. Es war an den folgenden Tagen erheblich gestört. Die Mäuse waren entweder apathisch oder hypomotorisch. Die Hyperexzitabilität war ebenfalls nach ein paar Tagen auffällig. Die Dauer der nötigen individuellen Fütterung variierte von Tier zu Tier und lag zwischen einem und vier Tagen.

5.3.2.4 Analyse des Status epilepticus

Da die phänotypische und die elektroenzephalografische Untersuchung (Beispiel siehe Abbildung 32) des SE keine Unterschiede zwischen den Gruppen darlegte, eine quantitative Analyse mit diesem Datenformat jedoch nicht möglich war, wurden Parameter in den einzelnen Frequenzbändern zur genaueren Untersuchung herangezogen.

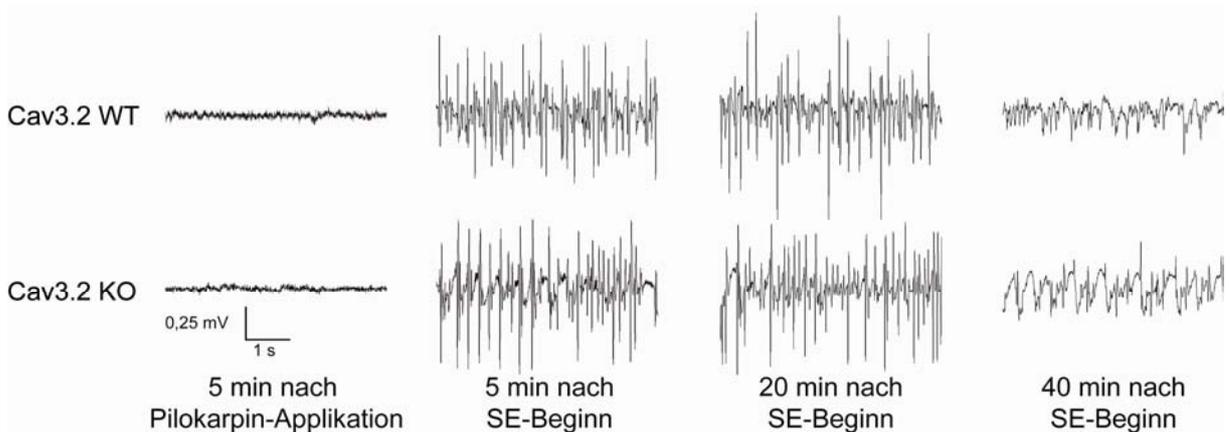


Abbildung 32: Repräsentatives EEG eines Cav3.2-WT- und eines Cav3.2-KO-Tieres. 5 min nach Pilokarpin-Applikation, 5 min, 20 min und 40 min nach SE-Beginn.

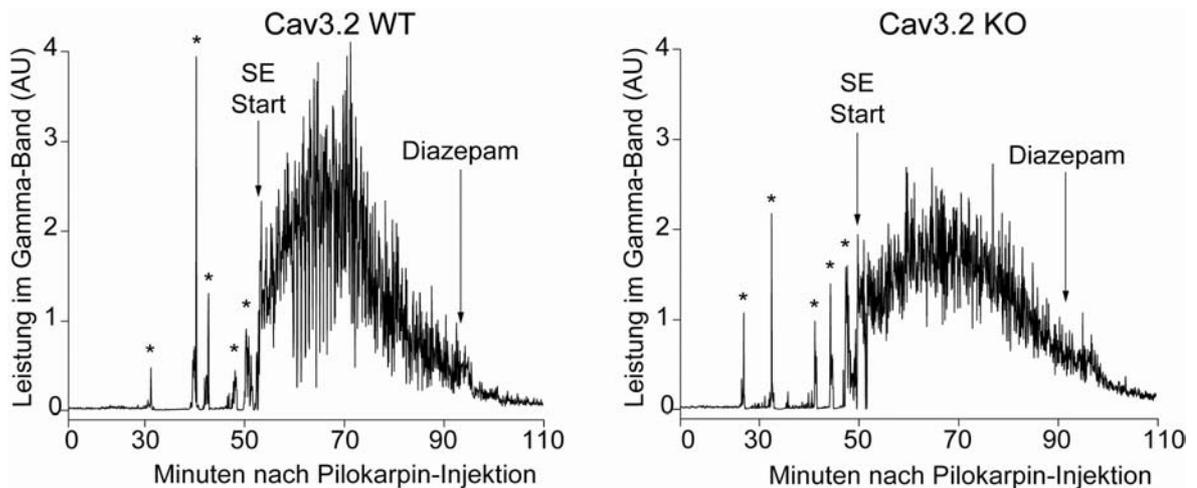


Abbildung 33: Leistung im Gamma-Band während des SE eines Cav3.2-WT und eines Cav3.2-KO-Tier. * = Anfälle vor dem SE. AU = arbitrary Units (arbiträre Einheit).

In Abbildung 33 ist beispielhaft das hochfrequente Gamma-Frequenzband eines Cav3.2-WT- und eines Cav3.2-KO-Tieres dargestellt. Beide Tiere erlitten vor dem Erreichen eines SE fünf generalisierte Anfälle (in Abbildung 33 gekennzeichnet durch *). Der Beginn des SE wurde definiert als Beginn des konstanten pathologischen EEG-Bildes (Abbildung 32).

Zur genaueren Analyse des SE wurden als Parameter die Stärke und die Dauer in den einzelnen Frequenzbändern mit Hilfe der Fourier-Analyse ausgewertet und die Cav3.2-KO-Tiere mit den Cav3.2-WT verglichen. Um die Stärke des SE zu untersuchen, wurde die relative Erhöhung der Amplitude (Bandstärke) in allen untersuchten Frequenzbändern im SE gegenüber dem Basal-EEG ermittelt. Hierbei zeigten beide Linien eine signifikante Erhöhung während des SE in allen Frequenzbändern gegenüber dem Basal-EEG (Tabelle 21; U-Test: jeweils $p < 0,05$).

Frequenzband	Linie	
	Cav3.2 WT	Cav3.2 KO
Delta (0,5 - 3,99 Hz)	15*	16*
Theta (4 - 7,99 Hz)	31*	30*
Alpha (8 - 12,99 Hz)	141*	88*
Beta (13 – 30 Hz)	188*	178*
Gamma (30 – 40 Hz)	77*	110*

Tabelle 21: Relative Erhöhung der Bandstärke im SE in allen Frequenzbändern. U-Test: * $p < 0,05$.

Verglich man nun die Stärke des SE der beiden Mauslinien, so fanden sich in keinem Frequenzband signifikante Unterschiede zwischen den Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Tieren (Abbildung 34; jeweils $n = 5$).

Um die Dauer des SE zu bestimmen, wurde die Zeit vom Beginn bis zum Ende der pathologischen Amplitude ermittelt. In keinem der analysierten Frequenzbänder war ein signifikanter Unterschied bezüglich der Dauer zu ermitteln (Abbildung 35).

Im Theta-Band war die Aktivität bei den Cav3.2-WT nach 43 min und bei den Cav3.2-KO-Tieren nach 42,5 min auf das Anfangsniveau abgefallen (T-Test: $p = 0,82$). Im Alpha-Band dauerte dies bei den Cav3.2-WT 47,8 min und bei den Cav3.2-KO-Tieren 44,6 min (T-Test: $p = 0,52$). Diese Zeitspanne war im Beta-Band am längsten und dauerte bei den Cav3.2-WT 61,4 min und bei den Cav3.2-KO-Tieren 59,1 min (T-Test: $p = 0,85$). Im hochfrequenten Gamma-Band wiederum dauerte es bei den Cav3.2-WT 54,4 min und bei den Cav3.2-KO-Tieren 56,5 min (T-Test: $p = 0,84$).

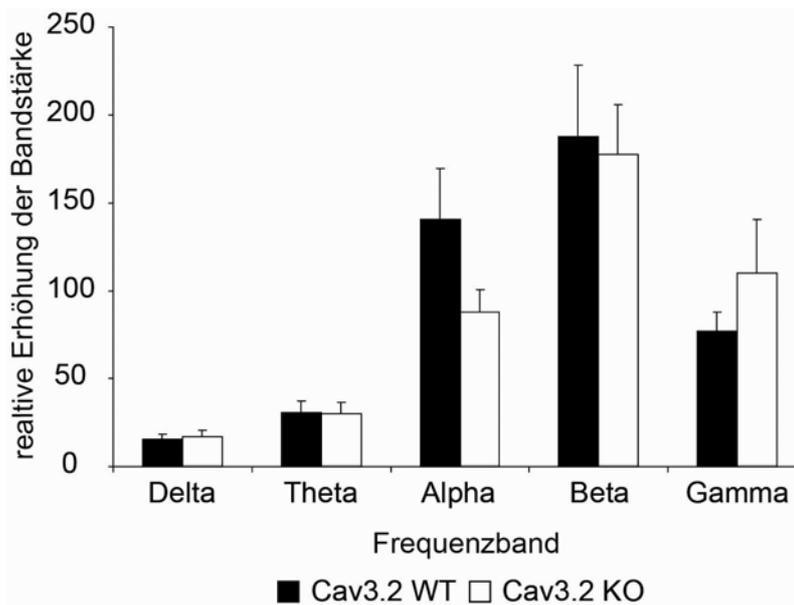


Abbildung 34: Relative Erhöhung der Bandstärke im SE zum Basal-EEG bei Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Tieren.

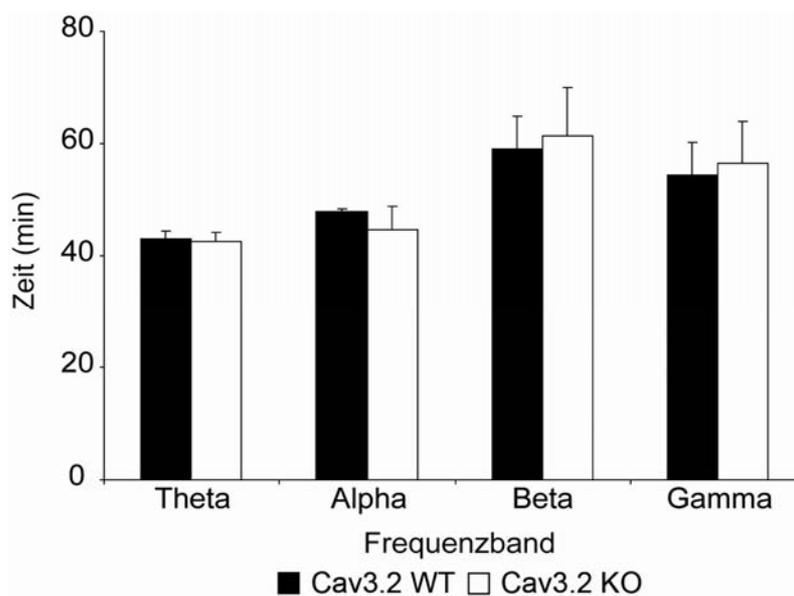


Abbildung 35: Dauer des SE in den einzelnen Frequenzbändern bei Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Tieren.

5.4 Chronische Neurodegeneration und spontane Anfälle

Um Frequenz und Stärke der spontan auftretenden Anfälle in den verschiedenen Mauslinien zu analysieren, wurde eine telemetrische EEG/Video-Aufnahmeeinheit genutzt. Dieses permanente Beobachten ist notwendig, um alle Anfälle detektieren und analysieren zu können. Anfallsaktivität tritt über den Tag verteilt häufig sehr unregelmäßig auf und geht oft mit sogenannten „Anfallsclustern“ (gehäuftes Auftreten von Anfällen innerhalb kürzester Zeit) einher, die bei einer zeitweilig aussetzenden Aufnahmetechnik verpasst werden könnten. Alle WT der untersuchten Linien zeigten tonisch-klonische Anfälle nach Pilocarpin-induziertem SE. In dem EEG von Tieren, die keinen SE bekamen war keine Anfallsaktivität zu detektieren. Wie in der akuten Phase wurden in der chronischen Phase die Anfälle in zwei Stadien unterteilt. Typischerweise begannen die spontanen Anfälle mit Verharren, klonischen Bewegungsmustern der Vorderbeine und Aufrichten des Oberkörpers (limbische Anfälle Stadium III), gefolgt von einem kurzen ca. 10 s langem generalisierten motorischen Anfall. Gelegentlich waren die Anfälle charakterisiert durch Aufrichten, Umfallen und/oder Springen (limbische Anfälle Stadium IV). Der zweite wichtige Parameter in Bezug auf den epileptischen Phänotyp in der chronischen Phase ist die Anfallsfrequenz. Hierfür wurde die Anfallsfrequenz zwischen dem 9. und 28. Tag nach SE analysiert. Wie in der akuten Phase wurden Anfallsfrequenz und Anfallsschwere zwischen den transgenen Mäusen und entsprechenden WT verglichen.

5.4.1 mGluR transgene Mäuse

5.4.1.1 Spontan auftretende Anfälle

Betrachtet man nun die Anfallsfrequenz, so fanden sich bei den mGluR1-EGFP-Mäusen signifikant mehr schwere chronisch wiederkehrende Anfälle als bei den mGluR1-WT (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$). Bei diesen Tieren waren 25% der beobachteten Anfälle Stadium IV zuzuordnen, während mGluR1-WT nur zu 5% Anfälle dieses Stadiums zeigten (Abbildung 36). Es wurden weniger schwächere Stadium-III-Anfälle in den transgenen mGluR1-EGFP-Mäusen gesehen (75%) im Vergleich zu mGluR1-WT (95%; mGluR1-EGFP $n = 5$, mGluR1 WT $n = 10$). Innerhalb der Gruppen zeigten die mGluR1-WT signifikant weniger Stadium-IV-Anfälle (U-Test: $p < 0,001$). Die mGluR1-EGFP-Mäuse erhielten nicht signifikant weniger Stadium-IV-Anfälle (U-Test: $p = 0,15$).

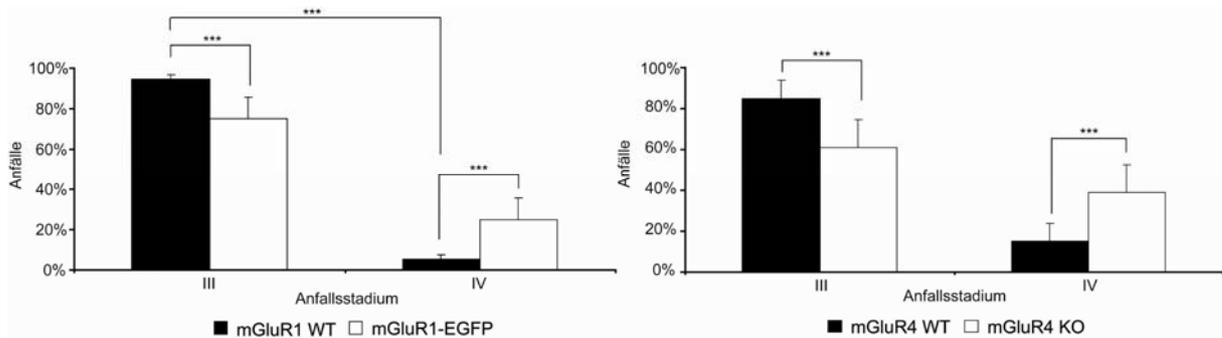


Abbildung 36: Prozentualer Anteil der Anfallsstärke der mGluR1-EGFP- und mGluR4-KO-Mäuse in der chronischen Phase nach Pilokarpin-induziertem SE verglichen mit WT. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Die mGluR4-KO-Mäuse bekamen ebenfalls mehr stärkere Anfälle des Stadiums IV (39%; mGluR4 KO $n = 8$), während die mGluR4-WT weniger starke Anfälle erlitten (15%; mGluR4 WT $n = 6$). Die transgenen mGluR4-KO-Tiere bekamen weniger Stadium-III-Anfälle (61%) verglichen mit mGluR4-WT (Abbildung 36; 85%; Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$). Die Anfallsstärke war weder bei den mGluR4-WT- noch bei den mGluR4-KO-Tieren signifikant verschieden (U-Test: mGluR4 WT $p = 0,06$, mGluR4 KO: $p = 0,72$).

In Abbildung 37 ist zu erkennen, dass die mGluR1-EGFP-Mäuse ($n = 5$) in der dritten und in der vierten Woche nach SE signifikant mehr Anfälle am Tag bekamen als mGluR1-WT ($n = 10$; U-Test: 3. Woche: $p < 0,05$, 4. Woche: $p < 0,001$). Dieser Unterschied war am größten an Tag 26 nach SE (mGluR1-EGFP: 1,7 Anfälle pro Tag; mGluR1 WT: 0,3 Anfälle pro Tag; U-Test: $p < 0,05$).

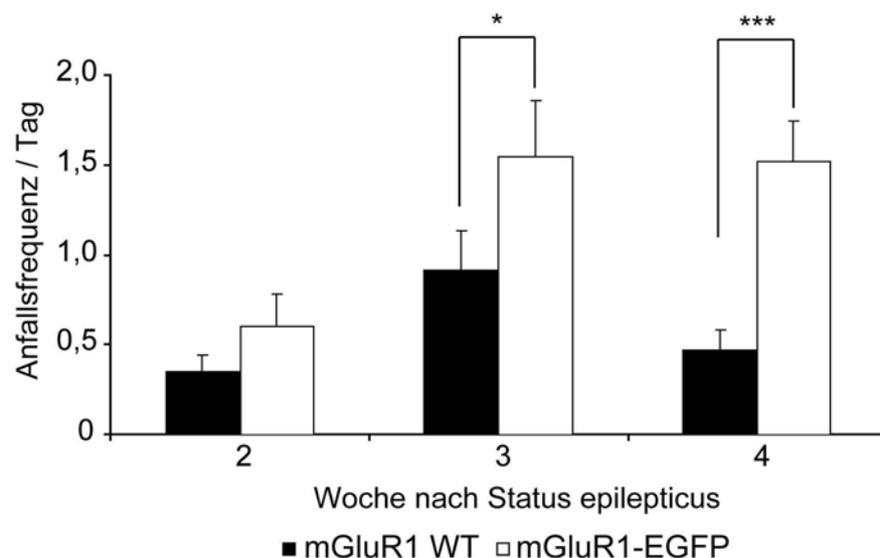


Abbildung 37: Anzahl der Anfälle der mGluR1-WT- und mGluR1-EGFP-Tiere in der chronischen Phase. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Die Anfallsfrequenz der mGluR4-Linie nach SE ist in Abbildung 38 dargestellt. Es wurden keine Unterschiede zwischen mGluR4-KO- (n = 8) und mGluR4-WT (n = 6) im Hinblick auf Anfallsfrequenz beobachtet (U-Test: 2. Woche: p = 0,19, 3. Woche: p = 0,9, 4. Woche: p = 0,35). Insgesamt zeigten die Mäuse der mGluR4-Linie eine sehr niedrige Anfallsfrequenz.

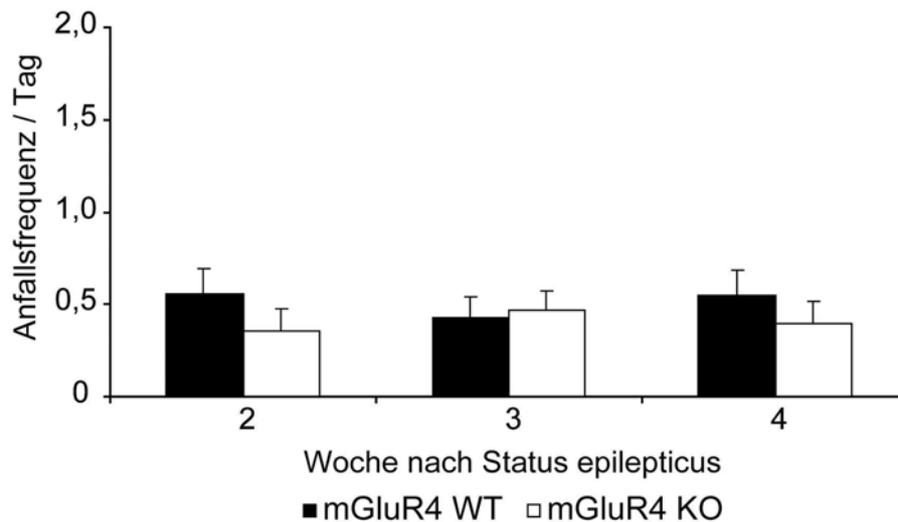


Abbildung 38: Anzahl der Anfälle der mGluR4-WT- und mGluR4-KO-Tiere in der chronischen Phase.

Linie	mGluR1 WT	mGluR1-EGFP	mGluR4 WT	mGluR4 KO
Gruppengröße	10	5	6	8
Spannungsamplitude der Anfälle in mV	$0 \pm 0,07$	$0 \pm 0,06$	$0 \pm 0,07$	$0 \pm 0,07$
Signifikanzniveau	p = 0,7		p = 1	
Dauer der Anfälle in s	$32,7 \pm 2,9$	$33,1 \pm 1,9$	$27,3 \pm 2,4$	$29,1 \pm 1,4$
Signifikanzniveau	p = 0,90		p = 0,58	

Tabelle 22: Dauer der chronischen Anfälle und Amplitudenhöhe der mGluR-transgenen Tiere.

Des Weiteren wurde die Aktivität der epileptischen Anfälle der individuellen Gruppen beurteilt. Typische chronische spontane Anfälle hatten eine durchschnittliche Länge von ungefähr 31 s und eine Amplitudenhöhe von ca. $0 \pm 0,07$ mV (Tabelle 22). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen

mGluR1-EGFP- oder mGluR4-KO-Mäusen und entsprechenden Kontrollgruppen bei der Länge oder Amplitudenhöhe der chronischen wiederkehrenden spontanen Anfälle gefunden (Abbildung 39; Signifikanzniveau T-Test: s. Tabelle 22).

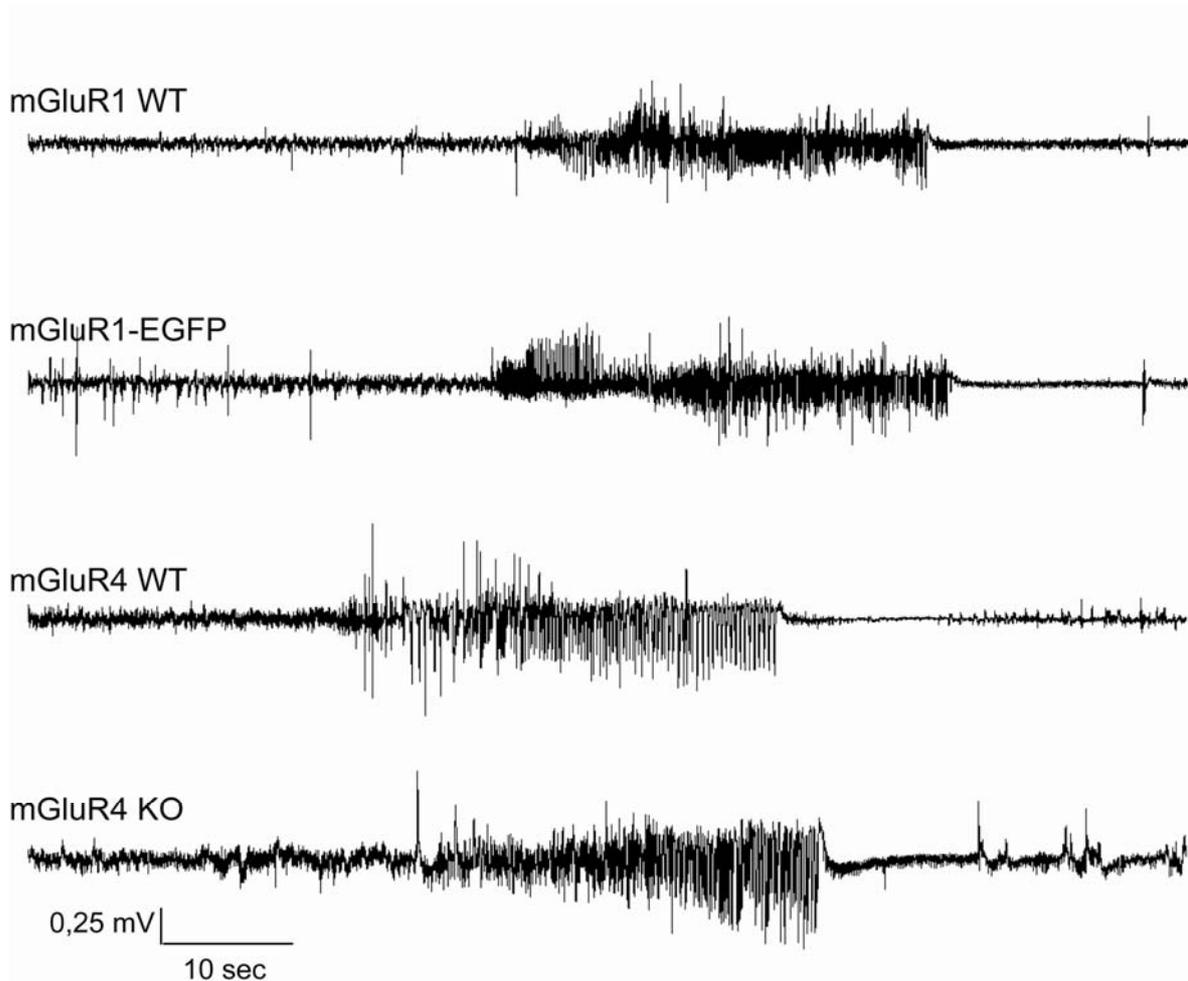


Abbildung 39: Repräsentative EEG-Aufzeichnung von Anfällen des Stadiums III von chronisch epileptischen mGluR1-EGFP-, mGluR4-KO und Kontrolltieren.

5.4.1.2 Neuronaler Zellverlust

mGluR4-KO- und mGluR1-EGFP-Mäuse ebenso wie entsprechende Kontrolltiere zeigten ohne induzierten SE keinerlei substantielle neuropathologische Veränderungen in der hippocampalen Formation (Abbildung 40 und 41). Um strukturelle Veränderungen, die durch epileptogene Prozesse entstehen, zu beurteilen, wurde eine detaillierte neuropathologische Analyse der Gehirne von transgenen Mäusen in der Phase der chronisch wiederkehrenden Anfälle durchgeführt. Die neuropathologischen Untersuchungen wurden an Hämatoxylin-Eosin (H. & E.) oder NeuN-gefärbten Schnitten durchgeführt.

Verglichen wurde zunächst die Dichte der hippocampalen Neurone in Gehirnen von mGluR1-EGFP-, mGluR4-KO-Mäuse und Kontrollen, die keinen SE erlitten, mit Tieren der gleichen Linien, welche jedoch chronische Epilepsie nach SE bekommen hatten. mGluR1-EGFP- und mGluR4-KO-Mäuse, ebenso wie deren Kontrollen (mGluR1-WT- und mGluR4-WT), zeigten Anzeichen von Ammonshornsklerose (AHS) nach Pilocarpin-induziertem SE (Abbildung 42; mGluR1 WT ohne SE: n = 6, mGluR1-EGFP ohne SE: n = 5, mGluR1 WT mit SE: n = 10, mGluR1-EGFP mit SE: n = 7; mGluR4 WT ohne SE: n = 6, mGluR4 KO ohne SE: n = 5, mGluR4 WT mit SE: n = 5, mGluR4 KO mit SE: n = 16). Vergleich man nun quantitativ die Dichte der Neurone der Tiere die einen SE erlitten haben, mit der Neuronendichte von Tieren, die keinen SE hatten, zeigten alle Tiere in der chronischen Phase einen segmentalen Nervenzellverlust. Dieser war besonders stark in CA1 (T-Test: mGluR1 WT $p < 0,01$, mGluR1-EGFP $p < 0,01$; mGluR4 WT $p < 0,01$ und mGluR4 KO $p < 0,001$) und CA3 (Abbildung 43; T-Test: mGluR1 WT und mGluR1-EGFP $p < 0,001$; mGluR4 WT $p < 0,05$, mGluR4 KO $p < 0,001$) zu finden.

Es war kein signifikanter Zellverlust im DG bei den mGluR4-WT zu erkennen (T-Test: $p = 0,15$), wohingegen die anderen Gruppen auch hier signifikanten Zellverlust aufwiesen (T-Test: mGluR1 WT $p < 0,01$, mGluR1-EGFP $p < 0,001$; mGluR4 KO $p < 0,001$).

In Bezug auf Zellverlust nach SE zeigten die mGluR1-WT, verglichen mit mGluR1-EGFP-Mäusen, keine signifikanten Unterschiede in der hippocampalen Formation (Abbildung 42; T-Test: DG: $p = 0,80$, CA1: $p = 0,76$, CA3: $p = 0,08$). Die Hippokampi der epilepsiekranken mGluR4-KO-Mäuse wiesen jedoch einen signifikant höheren Neuronenverlust auf als mGluR4-WT. Dieser ausgeprägte Phänotyp war im DG mit 27% Zellverlust zu erkennen (T-Test: $p < 0,001$). In der CA1-Region betrug der Zellverlust sogar 62% (T-Test: $p < 0,01$) und in der CA3-Region 61% (Abbildung 43; T-Test: $p < 0,05$).

Das charakteristische Muster der AHS, neben dem neuronalen Zellverlust, umfasst eine reaktive Astrogliose und Moosfasersprossung, welche in dieser Gruppe sichtbar waren, aber keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

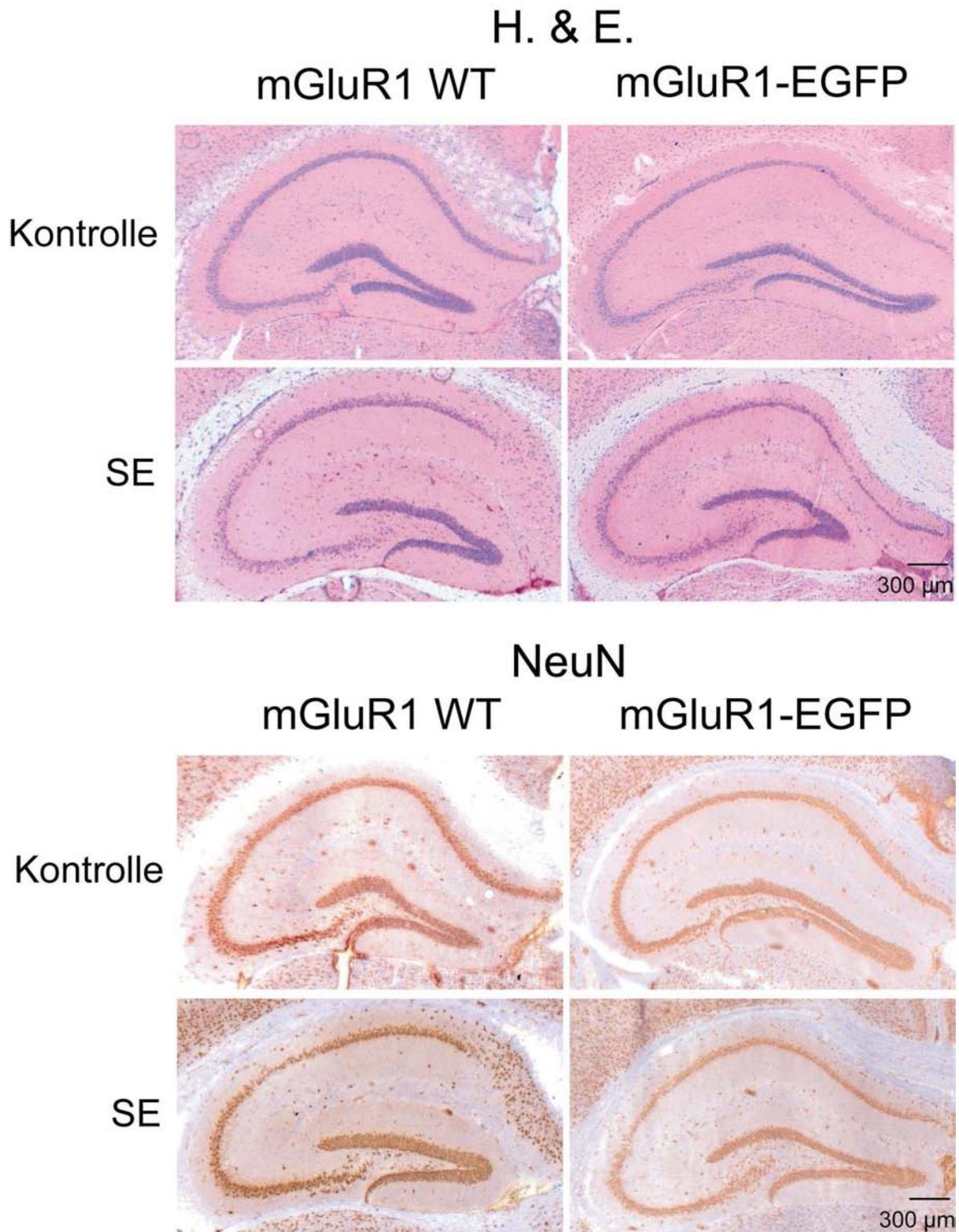


Abbildung 40: Repräsentative koronare Querschnitte durch den Hippokampus von Kontrolltieren ohne SE und von chronisch epileptischen mGluR1-WT- und mGluR1-EGFP-Mäusen mit repräsentativer hippocampaler Schädigung (H. & E. - Hämatoxylin-Eosin-Färbung; NeuN – Neuronal-Nuklei-Immunfärbung).

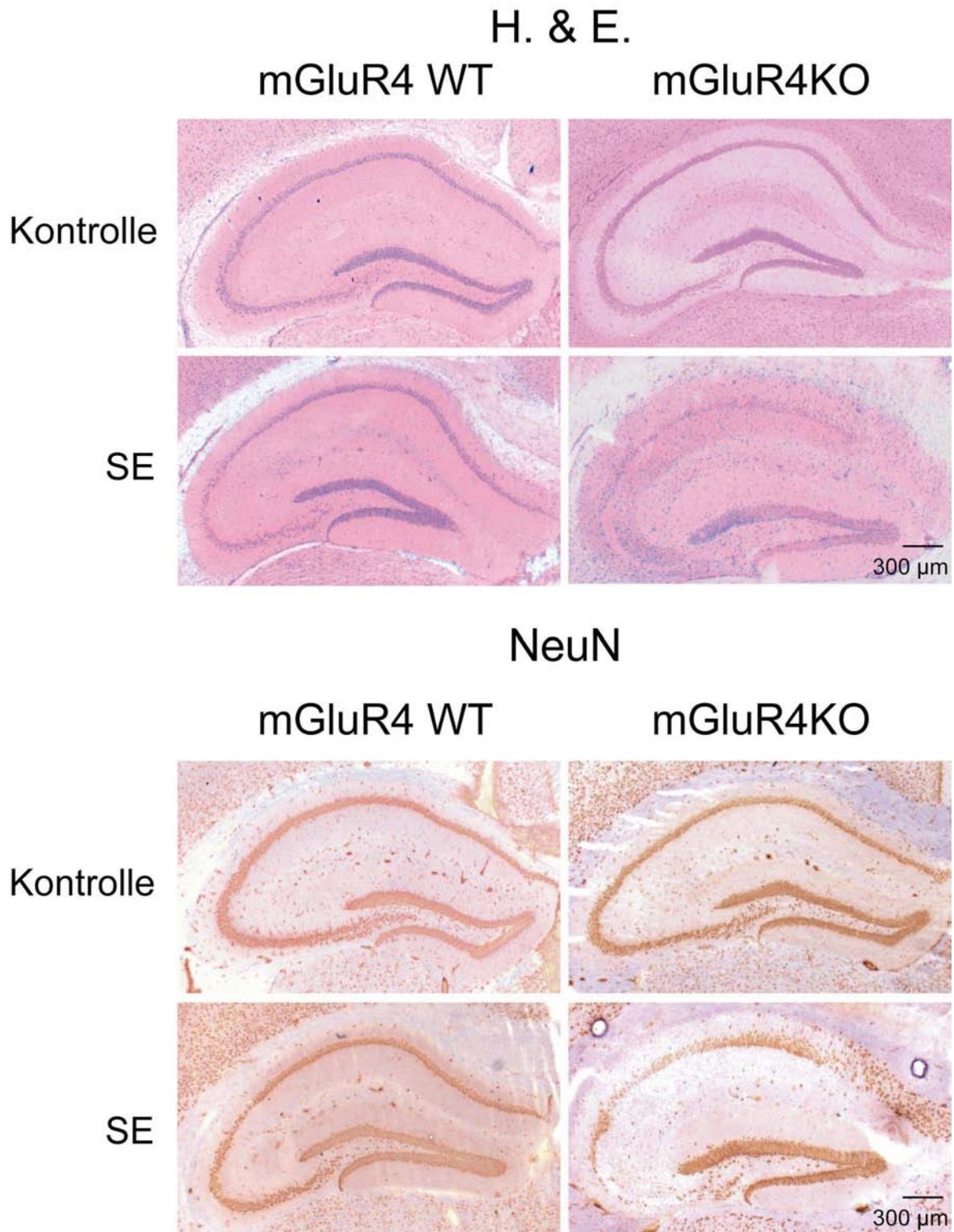


Abbildung 41: Repräsentative koronare Querschnitte durch den Hippokampus von Kontrolltieren ohne SE und von chronisch epileptischen mGluR4-WT- und mGluR4-KO-Mäusen mit repräsentativer hippocampaler Schädigung (H. & E. - Hämatoxylin-Eosin-Färbung; NeuN – Neuronal-Nuklei-Immundefärbung).

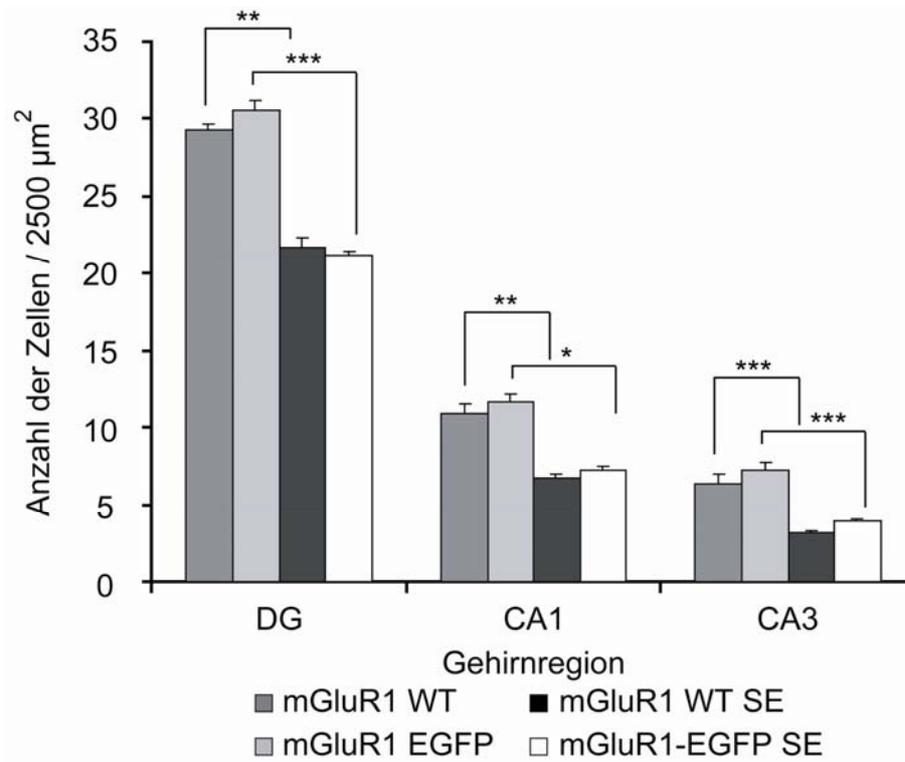


Abbildung 42: Zellverlust in der chronischen Phase: Quantitativer Vergleich der mGluR1-WT- mGluR1-EGFP-Tiere mit Kontrollen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

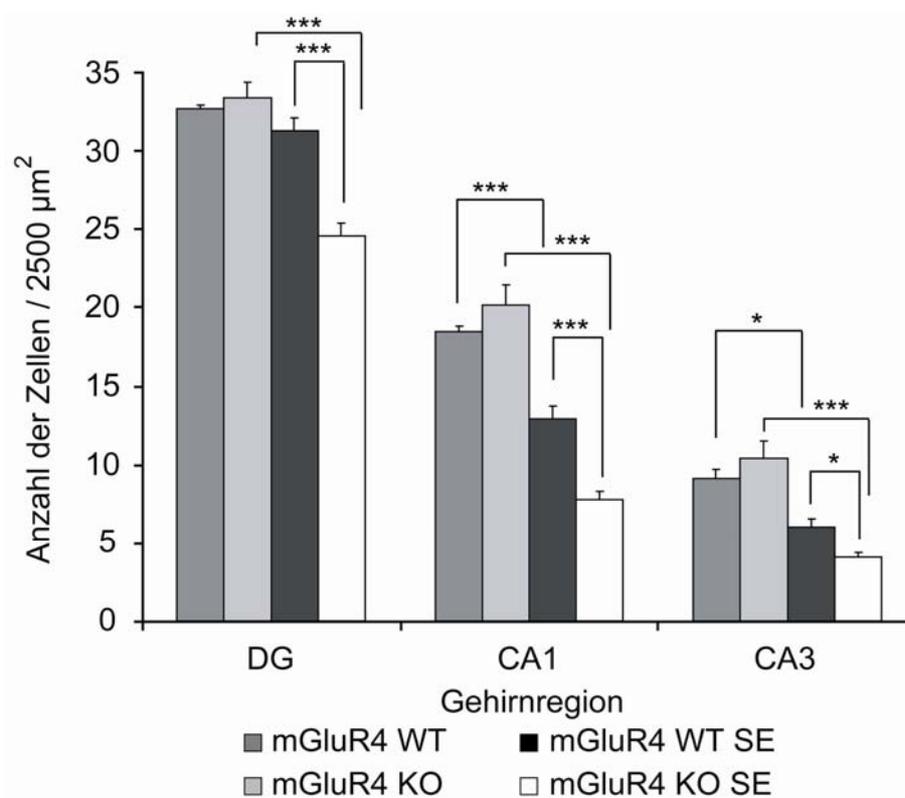


Abbildung 43: Zellverlust in der chronischen Phase bei mGluR4-WT und mGluR4-KO-Tieren. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.4.2 Cav3.2-KO-Mäuse

5.4.2.1 Spontan auftretende Anfälle

Betrachtet man nun die Anfallsstärke bei den Cav3.2-KO-Tieren, so fanden sich fast ausschließlich schwächere Anfälle des Stadiums III (U-Test: $p < 0,05$; 98%; $n = 7$). Auch in der Cav3.2-WT-Linie wurden mehr schwächere Stadium-III-Anfälle gesehen, jedoch nur zu 74% ($n = 7$). So waren 26% der bei den Cav3.2-WT beobachteten Anfälle Stadium IV zuzuordnen, während die Cav3.2-KO-Tiere nur zu 2% Anfälle dieses Stadiums zeigten (Abbildung 44; Chi-Quadrat-Test: $p < 0,001$).

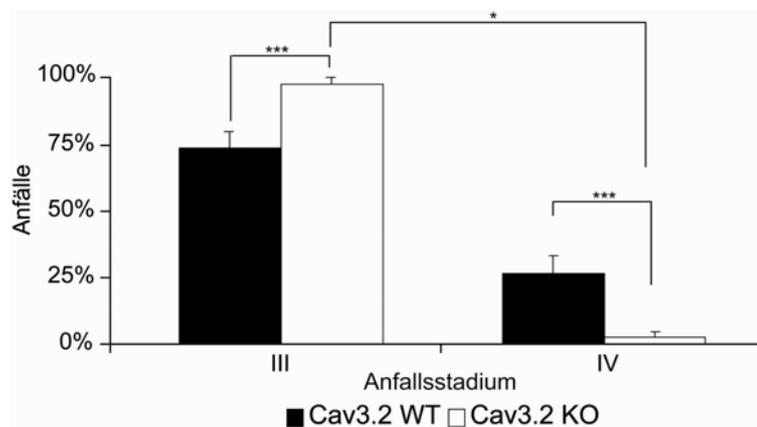


Abbildung 44: Prozentualer Anteil der Anfallsstärke der Cav3.2-Mäuse in der chronischen Phase nach Pilocarpin-induziertem SE. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

In Abbildung 45 ist zu erkennen, dass die Cav3.2-KO-Mäuse ($n = 7$) in Bezug auf die Anfallsfrequenz bemerkenswerter Weise eine erheblich niedrigere Anzahl von wiederkehrenden Anfällen bekamen als die Cav3.2-WT ($n = 7$), wobei zwei der Cav3.2-KO-Tiere gar keine Anfälle entwickelten. In der dritten Woche nach SE zeigten die Cav3.2-KO-Tiere durchschnittlich 0,4 Anfälle pro Tag und in der vierten Woche sogar nur 0,2 Anfälle pro Tag, wohingegen die Cav3.2-WT in dieser Zeit durchschnittlich 1,3 Anfälle erlitten (U-Test: $p < 0,001$). Dieser Unterschied war am deutlichsten an Tag 24 nach SE (Cav3.2 WT: 2,43 Anfälle pro Tag; Cav3.2 KO: keine Anfälle pro Tag; U-Test: $p < 0,05$). Betrachtet man nun die Aktivität der epileptischen Anfälle der Tiere der Cav3.2-Linie, so zeigten sie ebenfalls eine durchschnittliche Länge von ungefähr 30 s (Tabelle 23) und eine SD der Amplitude von ca. 0,07 mV (Abbildung 46). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Tieren im Hinblick auf Amplitudenhöhe oder Länge der chronisch wiederkehrenden spontanen Anfälle gefunden (T-Test: Länge: $p = 0,67$; Amplitude: $p = 0,80$).

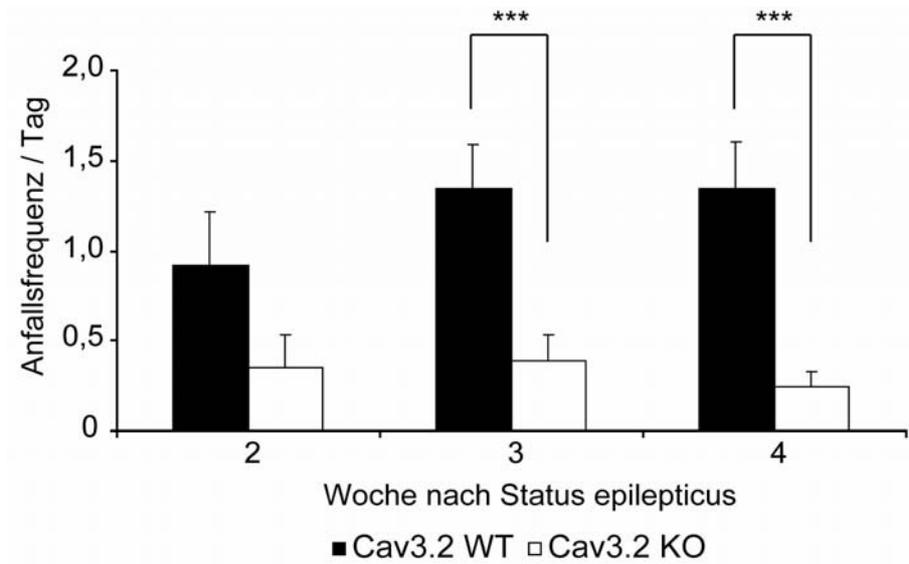


Abbildung 45: Anzahl der Anfälle der Cav3.2-Tiere in der chronischen Phase. *** $p < 0,001$.

Cav3.2 WT



Cav3.2 KO



0,25 mV
10 s

Abbildung 46: Repräsentative EEG-Aufzeichnung von Anfällen der chronisch epileptischen Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Tiere.

Linie	Cav3.2 WT	Cav3.2 KO
Gruppengröße	7	7
SD der Spannungsamplitude der Anfälle in mV	0,08	0,07
Signifikanzniveau	p = 0,80	
Dauer der Anfälle in s	30,9 ± 2,4	32,7 ± 2,9
Signifikanzniveau	p = 0,67	

Tabelle 23: Dauer der chronischen Anfälle und Amplitudenhöhe der Cav3.2-transgenen Tiere.

5.4.2.2 Neuronaler Zellverlust

Cav3.2-WT- ebenso wie Cav3.2-KO-Tiere zeigten ohne die Induktion eines SE keinerlei substantiellen neuropathologischen Veränderungen in der hippocampalen Formation (Abbildung 47). Ebenso wie bei den mGluR-transgenen Tieren wurde der Zellverlust in Gehirnschnitten in der chronischen Phase analysiert. Die Cav3.2-WT zeigten, wie erwartet, Anzeichen von AHS nach Pilocarpin-induziertem SE (Cav3.2 WT ohne SE: n = 6, Cav3.2 WT mit SE: n = 7; DG: p < 0,05, CA1: p < 0,001, CA3: p < 0,05). Im Gegensatz dazu war bei den Cav3.2-KO-Tiere kein signifikanter Nervenzellverlust in den hippocampalen Subregionen zu finden (Cav3.2 KO ohne SE: n = 5, Cav3.2 KO mit SE: n = 9; DG: p = 0,09, CA1: p = 0,23, CA3: p = 0,29). Vergleich man nun die Zellzahlen der Cav3.2-WT mit denen der Cav3.2-KO-Tiere, so fand sich signifikant weniger Zellverlust in allen Subregionen (Abbildung 48; T-Test: DG: p < 0,05, CA1: p < 0,001, CA3: p < 0,05). Der Zellverlust war mit 65% in der CA3-Subregion der Cav3.2-WT am deutlichsten ausgeprägt, gefolgt von der CA1-Subregion mit 45% und im DG immerhin noch mit 19% zu sehen. Bei den Cav3.2-KO-Tiere war der Zellverlust im DG mit 3% am niedrigsten, in der CA1-Region betrug er 9% und in der CA3-Region immerhin 12%.

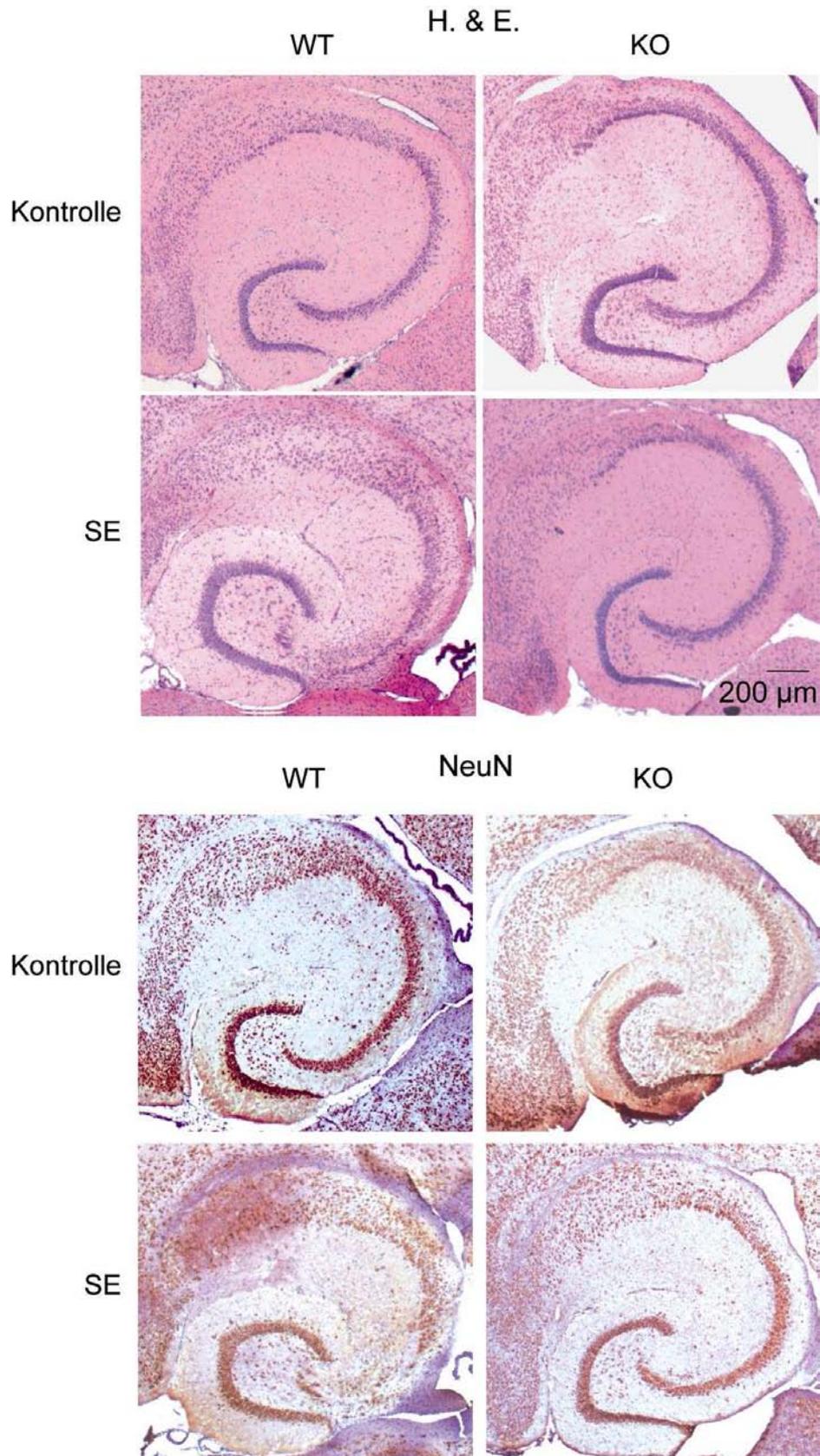


Abbildung 47: Repräsentative horizontale Querschnitte durch den Hippokampus von Kontrolltieren ohne SE und von chronisch epileptischen Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Mäusen mit repräsentativer hippocampaler Schädigung (H. & E. - Hämatoxylin-Eosin-Färbung; NeuN – Neuronal-Nuklei-Immundefärbung).

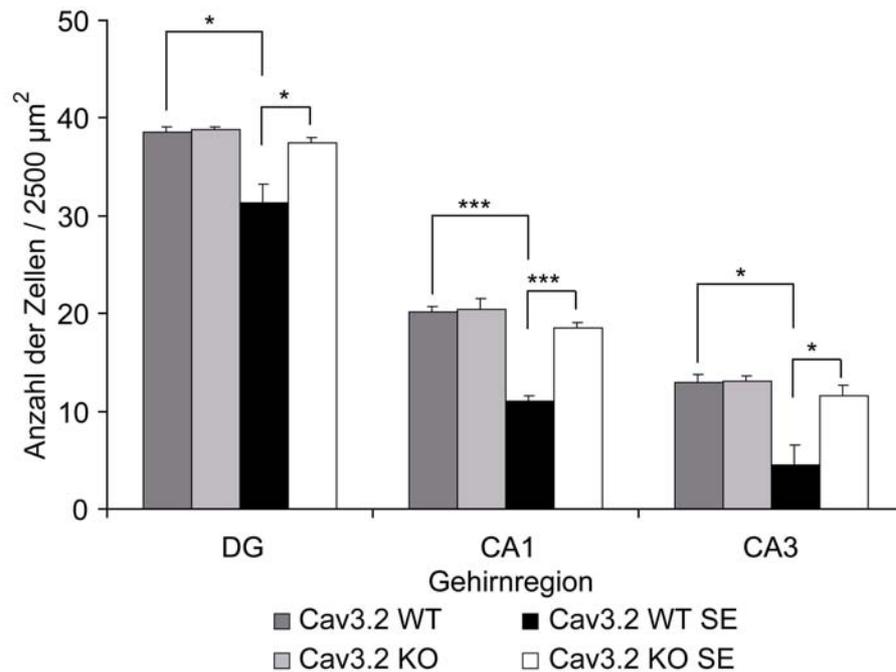


Abbildung 48: Zellverlust in der chronischen Phase: Quantitativer Vergleich der Cav3.2-KO-Tiere mit Kontrollen. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Betrachtet man nun als weiteres Zeichen der Ammonshornsklerose die rekurrente Moosfasersprossung, so zeigte sich in der Cav3.2-KO-Gruppe eine erhebliche Reduktion dieses Parameters. Zu Erkennen ist in Abbildung 49 eine stark ausgeprägte Moosfasersprossung im DG der Cav3.2-WT nach SE in der chronischen Phase, welche bei den Cav3.2-KO-Tieren fehlt. Die Hippokampi der Kontrolltiere ohne SE sind nicht von den Hippokampi der Cav3.2-KO-Tiere zu unterscheiden. Aufgrund des starken Zellverlustes im Bereich CA3 ist die physiologische Moosfasersprossung entlang der Zellkerne unterbrochen. Quantifiziert man die rekurrente Moosfasersprossung, so zeigten Cav3.2-KO-Tiere signifikant weniger Moosfasersprossung als Cav3.2-WT (Chi-Quadrat-Test: $p < 0,05$). Bei 60% der Cav3.2-KO-Tiere ($n = 8$) war eine solche zu erkennen, welche bei 40% der Tiere sehr leicht, bei 10% mittelstark und bei weiteren 10% stark ausfiel. Im Gegensatz dazu zeigten 88% der Cav3.2-WT ($n = 10$) eine Moosfasersprossung, die zu 25% leicht, zu 38% mittelstark und zu weiteren 25% schwer ausfiel. Von den Kontrolltieren ohne SE war bei keinen Tieren rekurrente Moosfasersprossung im DG zu erkennen (Abbildung 50; jeweils $n = 5$). Außerdem waren in den Hippokampi dieser Tiere die Moosfasern als Verknüpfung zur CA3-Region vollständig erhalten (Abbildung 49).

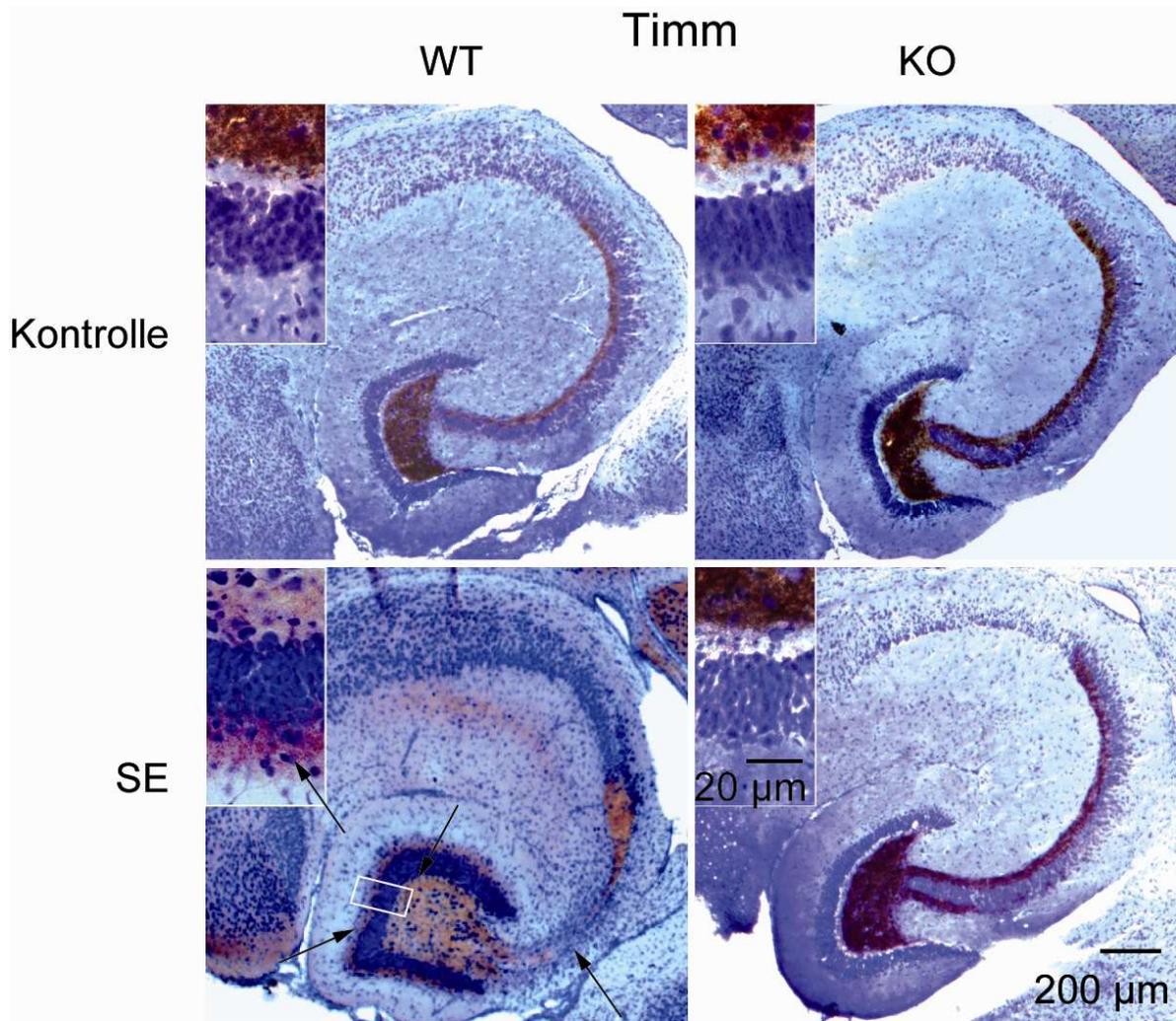


Abbildung 49: Repräsentative horizontale Querschnitte durch den Hippokampus von Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Tieren ohne und mit SE in der Timm-Färbung (gesamter Hippokampus-Querschnitt, weißer Kasten: Vergrößerung des Gyrus dentatus).

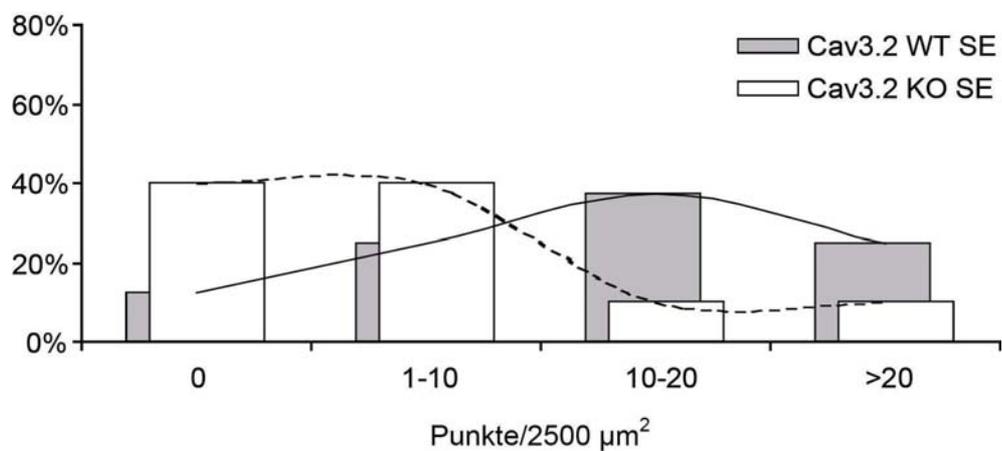


Abbildung 50: Quantifizierung der rekurrenten Moosfasersprossung in der chronischen Phase von Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Tieren. $p < 0,05$.

5.4.2.3 Analyse der interiktalen Phase

Betrachtete man nun die interiktale Phase bei den Cav3.2-Tieren, d.h. die Zeit zwischen den Anfällen, so fanden sich Unterschiede zwischen den Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Tieren. Im basalen EEG waren bei den Cav3.2-WT ($n = 7$) in der interiktalen Phase vermehrt auftretende Spikes zu erkennen (Abbildung 51), wohingegen diese bei den Cav3.2-KO-Tieren ($n = 6$) signifikant seltener auftraten. So waren im EEG der Cav3.2-KO-Tieren im Durchschnitt 27 ± 6 Polyspikes pro Stunde zu erkennen, wohingegen die Cav3.2-WT 95 ± 21 Polyspikes zeigten (Abbildung 52; T-Test: $p < 0,05$).

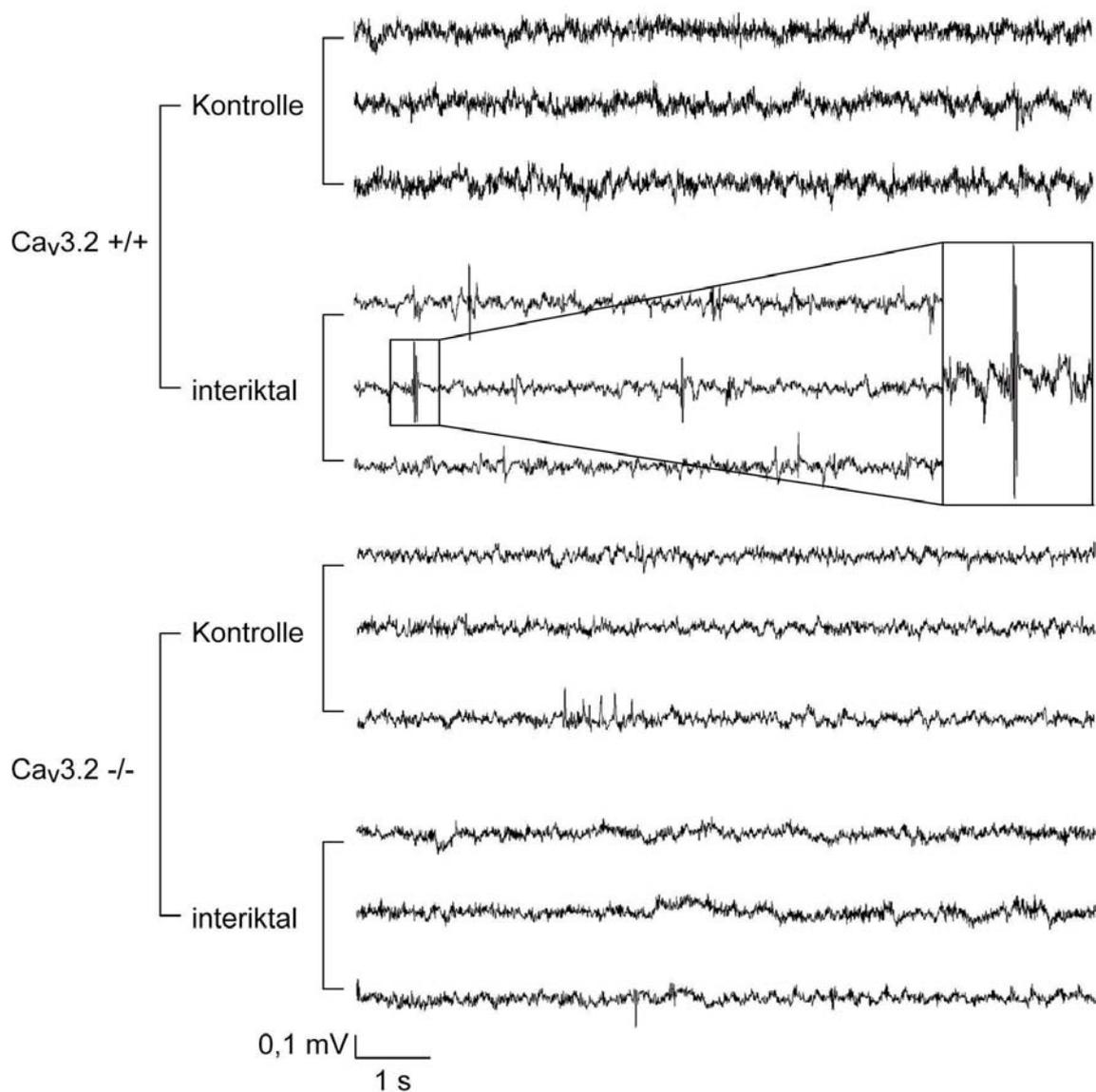


Abbildung 51: Vergleich des basalen EEG vor SE mit dem Basal-EEG in der interiktalen Phase bei Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Tieren. In der Vergrößerung ein repräsentativer Polyspike.

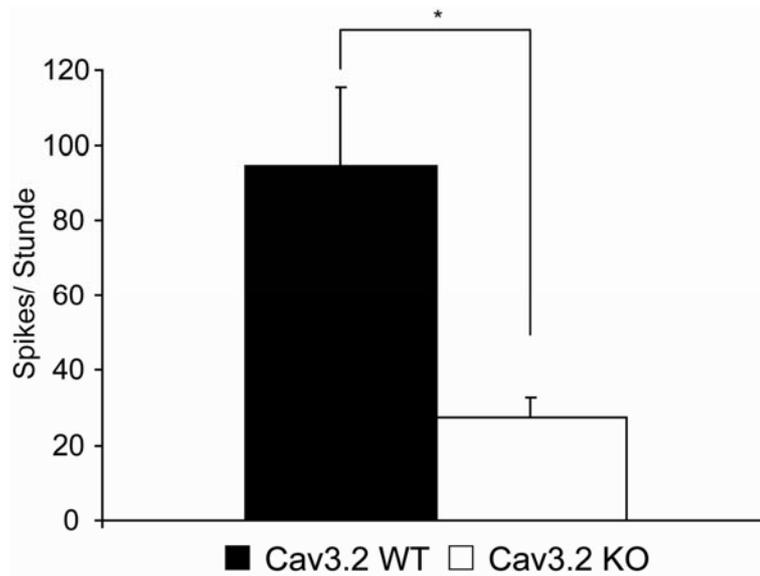


Abbildung 52: Anzahl der Polyspikes pro Stunde in der interiktalen Phase. * $p < 0,05$.

Um die interiktale Aktivität der transgenen Tiere zu bestimmen, wurden zur Analyse ein früher Zeitpunkt nach SE (Tag 12 - 14) und ein späterer Zeitpunkt (Tag 21 - 23) gewählt. Zum frühen Zeitpunkt zeigten die Cav3.2-KO-Mäuse in allen fünf analysierten Frequenzbändern eine signifikante Erhöhung der Fläche unter der Kurve (Abbildung 53; T-Test: Delta: $p < 0,001$; Theta: $p < 0,01$; Alpha: $p < 0,001$; Beta: $p < 0,01$; Gamma: $p < 0,05$). Im Delta-Band war diese Erhöhung bei den Cav3.2-KO-Tieren fast doppelt so hoch wie bei den Cav3.2-WT. Zu dem analysierten späten Zeitpunkt, der Tag 21 bis 23 berücksichtigt, war diese Erhöhung immer noch da, jedoch lediglich im Theta-Band signifikant erhöht (Abbildung 54; T-Test: Theta: $p < 0,05$).

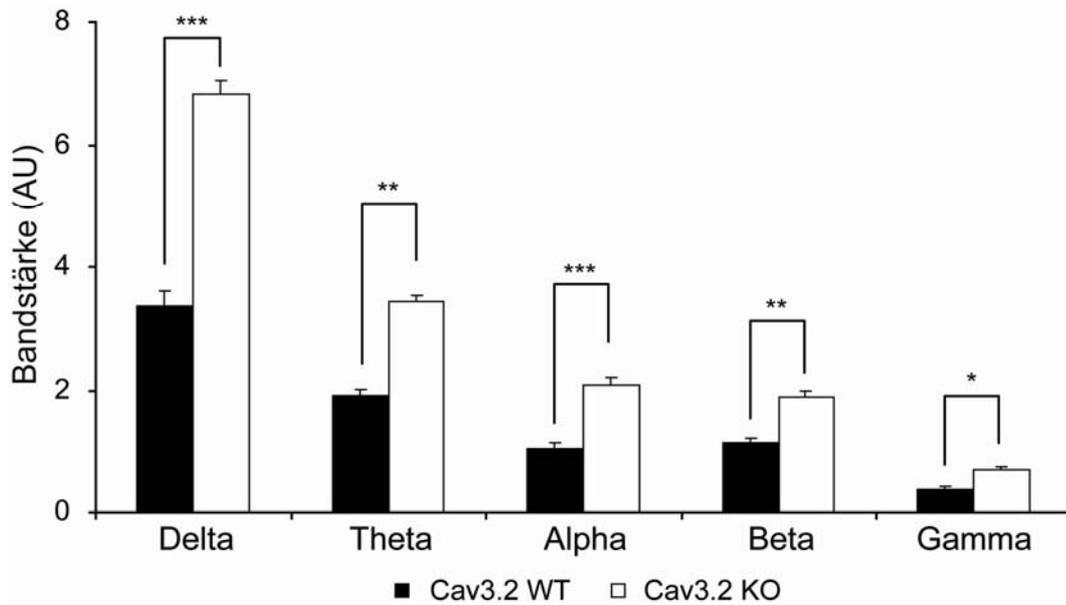


Abbildung 53: Analyse der Frequenzbänder in der frühen interiktalen Phase (Tag 12 - 14 post SE). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

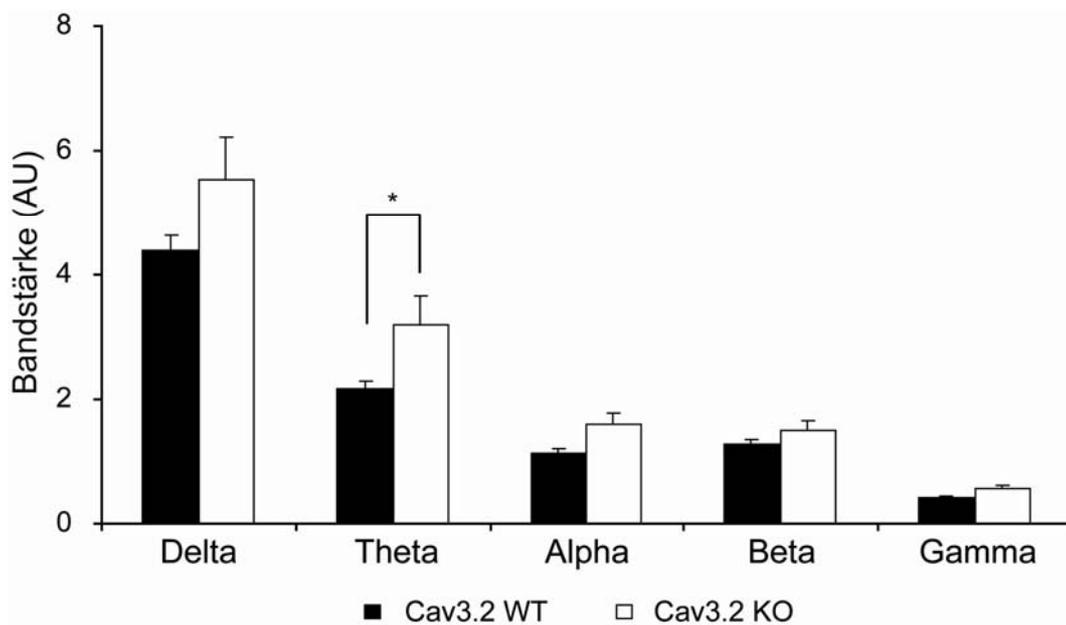


Abbildung 54: Analyse der Frequenzbänder in der späten interiktalen Phase (Tag 21 - 23 post SE). * $p < 0,05$.

5.5 Akute Neurodegeneration bei Cav3.2 transgenen Mäusen

Um den Einfluss des SE auf den in der chronischen Phase vorhandenen Unterschied in Bezug auf Neurodegeneration zu untersuchen, wurden in der Cav3.2-Linie auch frühere Zeitpunkte zur Analyse gewählt. Analysiert wurde hierfür Tag 2 als ein früher Zeitpunkt nach SE und Tag 10. Bei den Cav3.2-WT

wurde außerdem noch Tag 3 analysiert. An Tag 2 nach SE zeigten die Cav3.2-WT- und die Cav3.2-KO-Tiere einen signifikanten Nervenzellverlust im DG (T-Test: Cav3.2 WT und Cav3.2 KO $p < 0,05$), aber nicht in den Subregionen CA1 und CA3 (Abbildung 55; T-Test: CA1: Cav3.2 WT $p = 0,13$, Cav3.2 KO $p = 1$; CA3: Cav3.2 WT $p = 0,77$, Cav3.2 KO $p = 0,36$). An Tag 3 nach SE war noch kein signifikanter Zellverlust bei den Cav3.2-WT nach SE zu erkennen (Abbildung 56; T-Test: DG: $p = 0,10$, CA1: $p = 0,16$, CA3: $p = 0,15$). Untersucht man die verschiedenen Subregionen des Hippokampus an Tag 10 nach SE, so wiesen CA1 und CA3 der Cav3.2-WT bereits einen signifikanten Zellverlust auf (T-Test: CA1 und CA3: $p < 0,05$), während im DG noch kein signifikanter Zellverlust zu erkennen war (T-Test: $p = 0,06$). Bei den Cav3.2-KO-Tieren war kein signifikanter Zellverlust zu erkennen (Abbildung 57; T-Test: DG: $p = 0,55$, CA1: $p = 0,95$, CA3: $p = 0,16$).

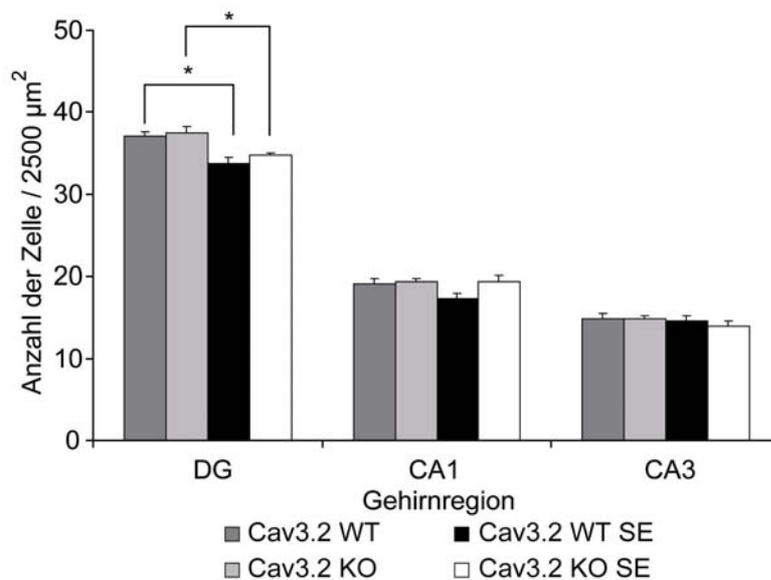


Abbildung 55: Tag 2 nach SE: Absolute Zellzahlen in den verschiedenen hippocampalen Subregionen der einzelnen. * $p < 0,05$.

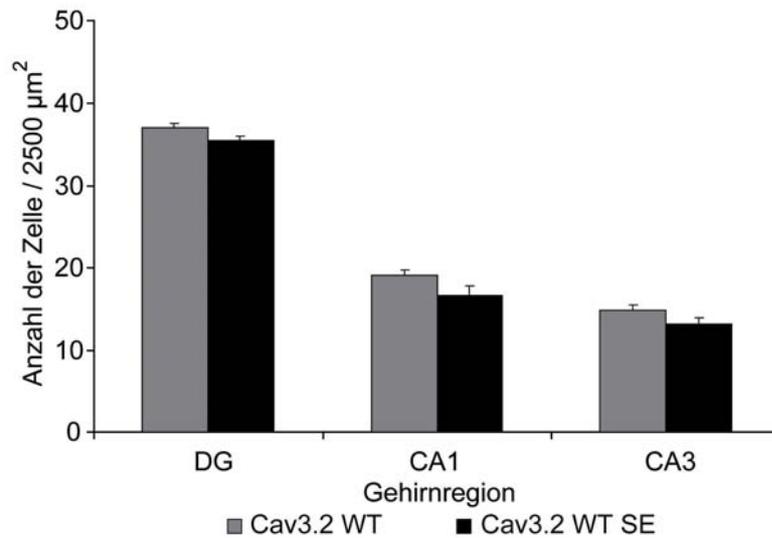


Abbildung 56: Tag 3 nach SE: Absolute Zellzahlen in den verschiedenen hippocampalen Subregionen der Cav3.2-WT.

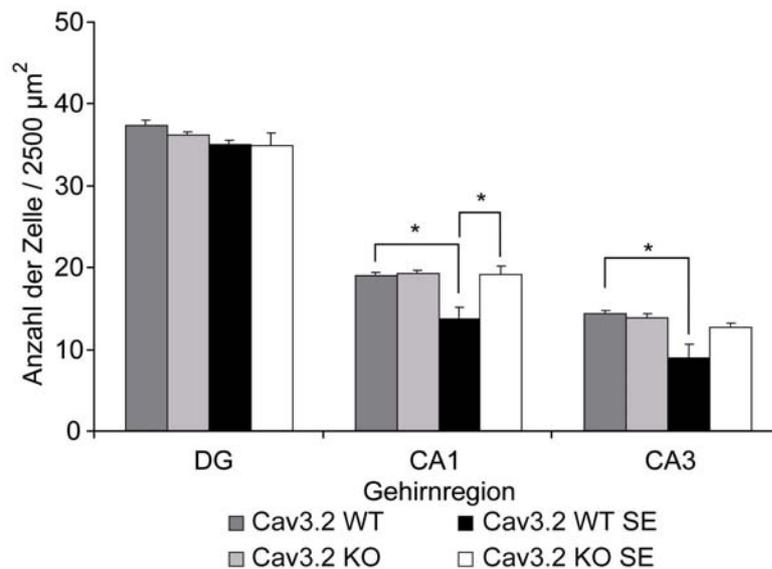


Abbildung 57: Tag 10 nach SE: Absolute Zellzahlen in den verschiedenen hippocampalen Subregionen der einzelnen Gruppen. *p < 0,05.

Im direkten Vergleich von Cav3.2-WT und Cav3.2-KO-Tieren nach SE, waren an Tag 2 nach SE keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Signifikanzniveau des T-Testes s. Tabelle 24). Vergleicht man die Cav3.2-WT- mit den Cav3.2-KO-Tieren an Tag 10 nach SE, so zeigten die Cav3.2-WT nur in der CA1-Region einen signifikanten Unterschied (Tabelle 24). Auffällig war, dass die Cav3.2-KO-

Tiere in der CA1-Region weder zwei noch zehn Tage nach SE einen Zellverlust aufwiesen.

Tag nach SE	Tag 2		Tag 3		Tag 10	
Linie	Cav3.2 WT	Cav3.2 KO	Cav3.2 WT	Cav3.2 KO	Cav3.2 WT	Cav3.2 KO
Zellverlust DG	9%	7%	4%	-	6%	3%
Signifikanzniveau	p = 0,30				p = 0,74	
Zellverlust CA1	9%	0	13%	-	28%*	0
Signifikanzniveau	p = 0,80				p < 0,05	
Zellverlust CA3	2%	6%	11%	-	38%	8%
Signifikanzniveau	p = 0,80				p = 0,15	

Tabelle 24: Vergleich des Zellverlustes von Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Mäuse nach SE.
*p < 0,05.

An Tag 2 beziehungsweise bei den Cav3.2-WT auch an Tag 3 war bei keinem Tier Moosfasersprossung zu erkennen, weder bei den Kontrolltieren ohne SE noch nach SE (Cav3.2 WT ohne SE n = 5; Cav3.2 KO ohne SE n = 6; Cav3.2 WT mit SE Tag 2 n = 5; Cav3.2 WT mit SE Tag 3 n = 5, Cav3.2 KO mit SE Tag 2 n = 5).

Bei der Quantifikation der rekurrenten Moosfasersprossung an Tag 10 nach SE zeigten die Cav3.2-KO-Tiere noch keine signifikant veränderte Moosfasersprossung (Chi-Quadrat-Test: p = 0,09). Bei 71% der Cav3.2-KO-Tiere (n = 7) war eine leichte Moosfasersprossung zu erkennen (Abbildung 58). Eine mittelstarke oder starke Moosfasersprossung lag in dieser Gruppe nicht vor. Im Gegensatz dazu zeigten 88% der Cav3.2-WT (n = 8) eine Moosfasersprossung, die zu 50% leicht und zu 38% mittelstark ausfiel. Starke Moosfasersprossung lag auch in dieser Gruppe an Tag 10 nach SE nicht vor. Von den Kontrolltieren ohne SE war bei keinem Tier rekurrente Moosfasersprossung im DG zu erkennen (Cav3.2 WT n = 6, Cav3.2 KO n = 5).

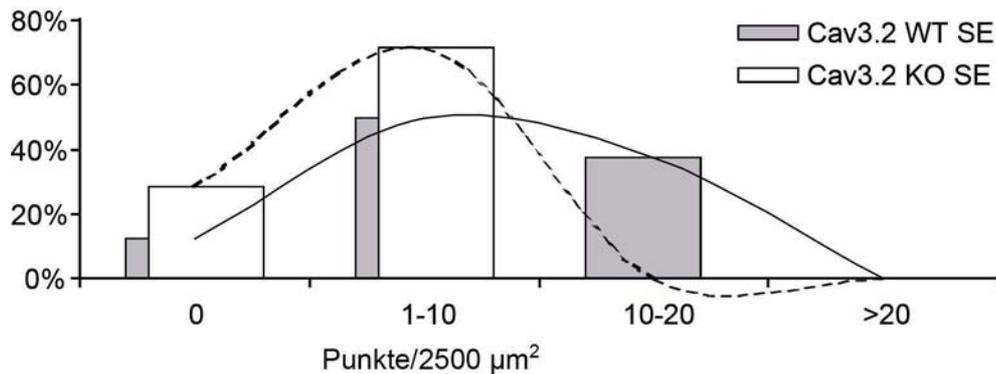


Abbildung 58: Tag 10 nach SE: Rekurrente Moosfasersprossung bei Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Tieren.

5.6 Expressionsmuster verwandter Gene in Cav3.2-KO-Mäusen

Zunächst wurde die Regulation der porenformenden α_1 -Untereinheit in der mikrodisssezierten hippocampalen CA1-Region zu verschiedenen Zeitpunkten nach Pilokarpin-induziertem SE in Cav3.2-WT und Kontrolltieren ohne SE mit Hilfe der Real Time-PCR analysiert. Beim Vergleich von Cav3.2-KO- mit Cav3.2-WT-Kontrolltieren ohne SE wurden zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikante Unterschiede der Expression der T- und R-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Cav3.1, 3.3 oder 2.3) in der CA1-Region des Hippokampus gefunden.

Im Pilokarpin-Modell war in Cav3.2-WT, von den drei α_1 -Untereinheiten die T-Typ-Ströme vermitteln (Cav3.1, 3.2 und 3.3), nur die mRNA-Expression von Cav3.2 an Tag 2 nach SE signifikant erhöht (Abbildung 59; Cav3.2: Tag 2 nach SE 1,8fache Zunahme, je n = 5; T-Test: p < 0,05). Diese Hochregulation war nicht andauernd, sondern fiel an Tag 10 nach SE wieder auf Normallevel ab. Die Menge an Cav2.3-mRNA, welche R-Typ-Ströme verursachen, war unverändert.

Die Cav3.2-KO-Tiere zeigten, wie erwartet, keine Expression des Cav3.2-Transkriptes. Vergleicht man nun Cav3.2-KO-Tiere ohne SE mit Cav3.2-KO-Tieren nach SE, so findet man auch hier keinen signifikanten Unterschied bei der mRNA-Expression von Cav3.1, 3.3 und 2.3 (Abbildung 60).

Diese transiente Erhöhung der Cav3.2-Expression in der CA1-Region wurde bei Ratten an Tag 3 nach SE gemessen. Hier zeigte sich eine etwa 4fache Hochregulation gegenüber Kontrolltieren (Abbildung 61; Daten von J. Chen (2004); je n = 5, T-Test: p < 0,05).

Bei der Expression der akzessorischen β_{1-3} - und $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten, welche biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften der meisten

α_1 -Untereinheiten modifizieren, fanden sich einige signifikante Unterschiede. So zeigte die Expression der β_1 - und β_2 -Untereinheiten in CA1-Neuronen eine transiente Zunahme bei Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Mäusen nach SE (Abbildung 62). An Tag 2 nach SE wurde für β_1 bei den Cav3.2-WT eine 1,4fache Erhöhung und an Tag 10 nach SE eine 1,3fache Erhöhung gefunden (je $n = 5$; T-Test: $p < 0,05$). Bei den Cav3.2-KO-Tieren verhielt es sich ähnlich. Bei ihnen fand sich an Tag 2 nach SE eine 1,3fache Erhöhung und an Tag 10 nach SE eine 1,5fache Erhöhung (Abbildung 62; Cav3.2 KO $n = 5$; Kontrollen $n = 6$; Tag 2: T-Test: $p < 0,01$). Für β_2 ergab sich an Tag 2 nach SE bei den Cav3.2-WT eine 1,2fache Erhöhung (je $n = 5$; T-Test: $p < 0,05$) und bei den KO an Tag 10 nach SE ebenfalls eine 1,5fache Erhöhung ($n = 7$; Kontrollen $n = 6$; T-Test: $p < 0,01$). Im Gegensatz dazu war die Expression von β_3 in der chronischen Phase in Cav3.2-WT signifikant reduziert (Cav3.2 WT SE $n = 9$, Cav3.2 WT Kontrollen $n = 8$, T-Test: $p < 0,05$).

Es wurden keine signifikanten Änderungen bei der $\alpha_2\delta$ -Expression zwischen Tieren nach SE und Kontrolltieren gefunden.

Die mRNA-Expression der porenformenden α_1 -Untereinheiten der hochschwelligen Ca^{2+} -Kanäle, Cav1.2, 1,3, 2,1 und 2,2, welche die P/Q-, N-, und L-Typ- Ca^{2+} -Ströme bilden, waren zu keinem Zeitpunkt bei den Cav3.2-WT- oder bei den Cav3.2-KO-Tieren nach SE verändert (Abbildung 63, je $n = 5$).

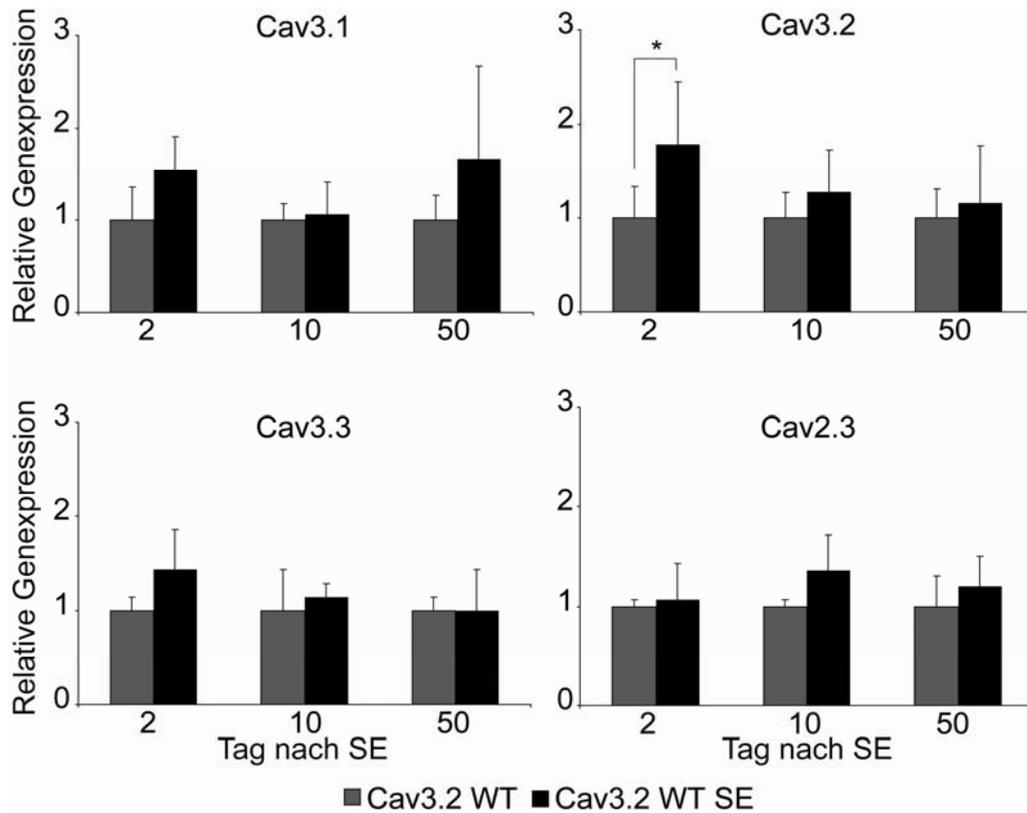


Abbildung 59: Expression der R-/T-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Untereinheiten in CA1-Neuronen von Cav3.2-WT nach Pilokarpin-induziertem SE. * $p < 0,05$. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

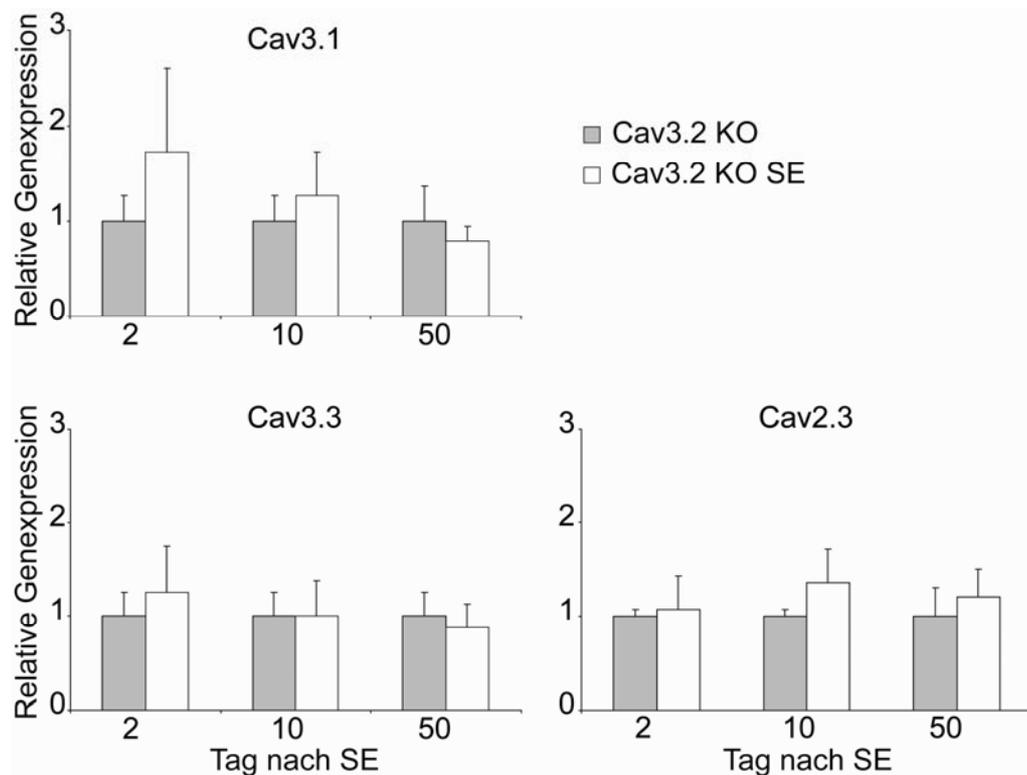


Abbildung 60: Expression der R-/T-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Untereinheiten in CA1-Neuronen von Cav3.2-KO-Mäusen nach Pilokarpin-induziertem SE. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

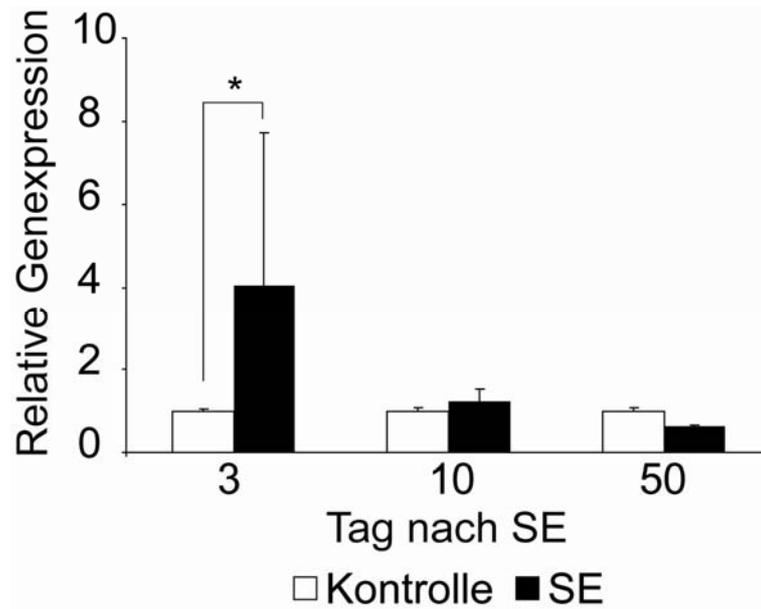


Abbildung 61: Expression der T-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Untereinheiten Cav3.2 in CA1-Neuronen von Ratten nach Pilocarpin-induziertem SE. * $p < 0,05$. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Modifiziert nach (Chen, 2004).

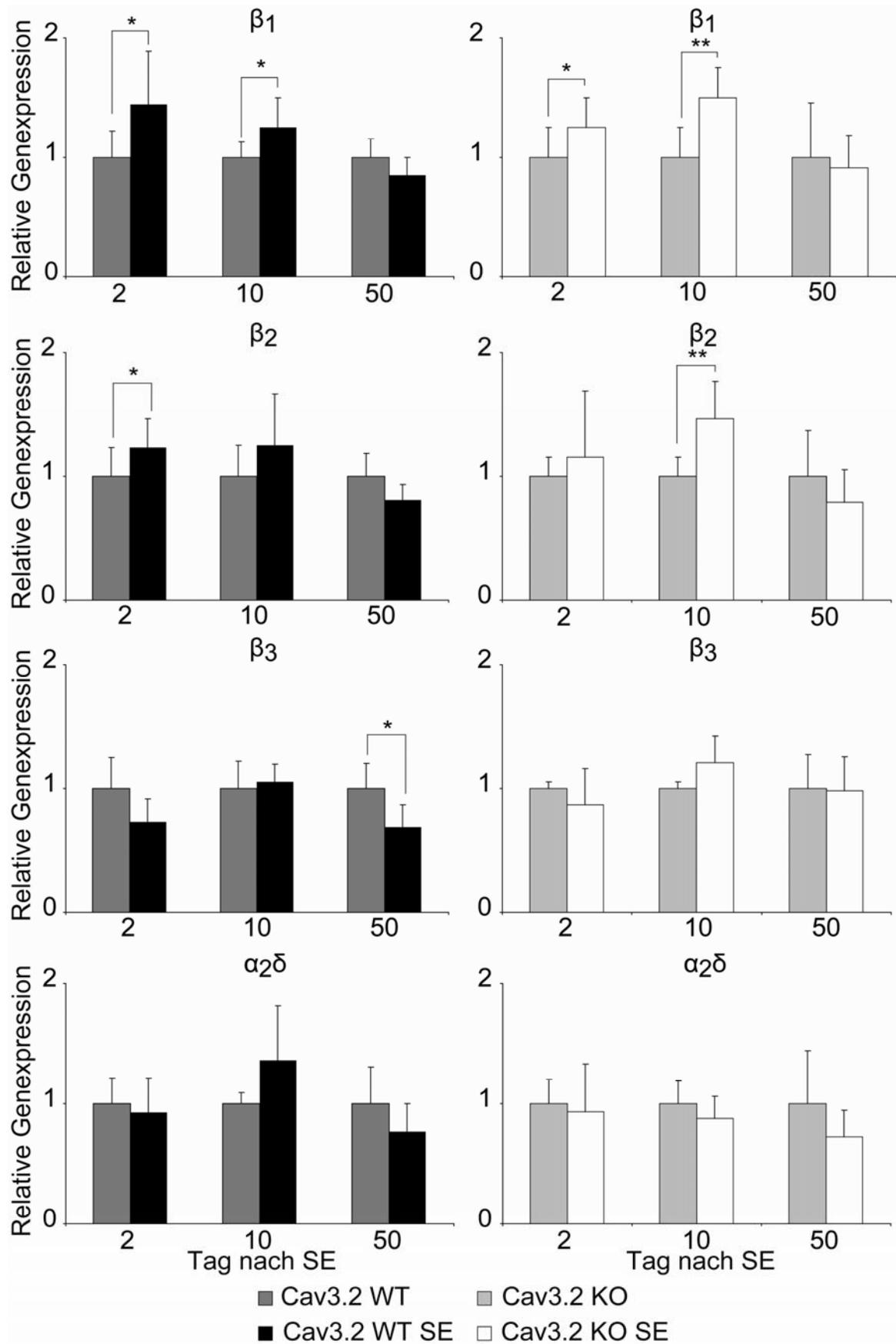


Abbildung 62: Veränderungen der Expression der akzessorischen Ca^{2+} -Kanal-Untereinheiten an Tag 2 bis 50 in CA1-Neuronen von Cav3.2-WT- und Cav3.2-KO-Mäusen nach Pilokarpin-induziertem SE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

6 DISKUSSION

6.1 Einleitung

Die medikamentöse Behandlung der Temporallappenepilepsie (TLE) stellt in der modernen Medizin noch immer eine große Herausforderung dar. Wesentliche Ursache ist die im Vergleich mit anderen Epilepsieformen erheblich höhere Resistenz gegenüber antiepileptischen Medikamenten (Pharmakoresistenz). So zeigen ca. 60 - 70% der Patienten mit TLE eine fehlende oder unzureichende Reduktion der Anfallsfrequenz durch die Behandlung mit vorhandenen Antiepileptika (Schmidt, 1986; Leppik, 1992). Bei chirurgischer Entfernung des Krampfherdes, d.h. des Hippokampus und/oder der angrenzenden Regionen, kann bei ca. 60 - 90% dieser Patienten eine dauerhafte Anfallsfreiheit erreicht werden (Elger *et al.*, 1993; Wiebe, 2004). Aus der Resektion des dominanten Temporallappens resultiert jedoch eine Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung bei ca. 20 - 30% der Patienten (Elger *et al.*, 1993). Die der TLE zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und die mit dieser Form der Epilepsie häufig vergesellschaftete Pharmakoresistenz sind noch weitestgehend ungeklärt.

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss von Neurotransmitter-Rezeptoren beziehungsweise Kalziumkanälen, welche mit der Epileptogenese im Zusammenhang zu stehen scheinen, auf neuroprotektive Eigenschaften beziehungsweise Erzeugung erhöhter epileptischer Aktivität zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der Einfluss der metabotropen Glutamatrezeptoren mGluR1 und mGluR4 und des spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanals Cav3.2 unter Verwendung von transgenen Mauslinien analysiert werden. Die Tiere wurden hierzu in einem experimentellen Modell für TLE untersucht. Hierbei wurde durch die Gabe von Pilocarpin ein Status epilepticus (SE) *in vivo* induziert und im Anschluss die Auswirkungen in der akuten/frühen chronischen beziehungsweise in der späten chronischen Phase im Hinblick auf Anfallseigenschaften, -frequenz und neuropathologischer Veränderungen analysiert. Der Einsatz eines solchen Epilepsiemodells bedingt eine systematische Überwachung der Tiere, da die epileptischen Anfälle spontan auftreten und nicht gezielt durch den Experimentator ausgelöst werden. Als Methoden zur

Anfallsdetektion sind bisher die direkte visuelle Überwachung, Video- und/oder EEG-Aufzeichnungen beschrieben.

6.2 Methodenkritik

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen beruhen auf einem direkten Vergleich von transgenen Mäusen mit Wildtyp-Wurfgeschwister-Tieren (WT) der jeweiligen Linie. WT verschiedener Linien konnten nicht miteinander verglichen werden, da die Protokolle in Abhängigkeit von der verwendeten Linie variierten.

6.2.1 Mausmodelle

Ein großes Hindernis für jede Analyse von Gehirngewebe epileptischer Patienten stellt ein Mangel an gesundem Kontrollgewebe gleichen Alters dar. Die Verfügbarkeit von gesundem Gewebe ist sehr gering, da Proben nur im Rahmen einer für den Patienten notwendigen Operation gewonnen werden können. Um dieses Problem zu umgehen, wurden experimentelle Modelle entwickelt. Diese Tiermodelle ermöglichen weiterhin auch eine Untersuchung im Zeitverlauf und gewährleisten eine unbegrenzte Verfügbarkeit von Gewebe. Außerdem unterliegt das Gehirn während der Epileptogenese zahlreichen anatomischen, biochemischen und funktionellen Veränderungen. So ist es unabdingbar, eventuell zugrunde liegende Mechanismen nicht nur in Zellen oder Gehirngewebe, sondern in komplexen Tiermodellen zu untersuchen. Die geläufigsten Tiermodelle für fokale limbische Epilepsien sind durch Kainatsäure, Pilocarpin und Elektrostimulation (Kindling) induzierte chronische Anfälle. Mit der ansteigenden Nutzbarkeit von transgenen Mäusen mit gezielten Mutationen in Genen, die mit Epilepsie im Zusammenhang stehen, spielen diese Tiere mittlerweile eine wichtige Rolle bei der Analyse experimentell erzeugter Epileptogenese. Es sollte jedoch immer bedacht werden, dass ein Modell nie alle Aspekte der menschlichen Erkrankung widerspiegelt und daher ist die Übertragbarkeit der im Modell erhobenen Daten auf den Menschen stets zu relativieren und wenn möglich zu prüfen. Es ist bekannt, dass innerhalb weniger Stunden nach einem induzierten Anfallsgeschehen zahlreiche Gene aktiviert werden, die ihrerseits über verschiedene Mechanismen zu langfristigen plastischen Veränderungen im Gehirn führen. Die Anzahl von Genen, die möglicherweise eine Bedeutung für diese neuronale Plastizität haben, wird auf 500 - 1000 geschätzt (Nedivi *et al.*, 1993).

Durch die Verwendung tierexperimenteller Modelle konnten in den vergangenen Jahrzehnten zahlreiche Erkenntnisse über funktionelle und morphologische Veränderungen des neuronalen Netzwerkes nach SE gewonnen und mit dem Auftreten spontaner Anfälle in Beziehung gesetzt werden (Lothman, 1990; Mello *et al.*, 1993; Mazarati *et al.*, 2002). Es ist aus diesem Grund von großem Interesse, die Wirkung einzelner Proteine im Hinblick auf Iktogenese und Epileptogenese gezielt zu untersuchen, um zugrunde liegende Mechanismen aufzudecken, zu analysieren und verstehen zu können, so dass zum Beispiel eine Progression verhindert oder im besten Falle die Entstehung einer Epilepsie gänzlich verhindert werden könnte. Um diese molekularen Mechanismen besser untersuchen zu können, bietet sich die Verwendung von transgenen Mäusen an. Hierbei hat man die Möglichkeit gezielt den Einfluss eines oder mehrerer Proteine auf verschiedene Mechanismen zu betrachten, indem ein bestimmtes Gen ausgeschaltet (KO-Maus) oder hochreguliert (Überexpressionsmutante) wird, wobei bei letzterer zum einen eine ubiquitäre oder eine regionenspezifische Regulation je nach Wahl des Promotors erzeugt werden kann. Weiterhin können gezielt Mutationen, die zum Beispiel im Zusammenhang mit einer menschlichen Erkrankung identifiziert wurden, untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Beobachtungen und die erhobenen Daten der transgenen Tiere mit denen der WT aus derselben Linie verglichen, um eventuell auftretende Einflüsse des genetischen Hintergrundes auf die Ergebnisse ausschließen zu können.

6.2.2 EEG-und Videoanalyse

Die Untersuchung von Tieren in einem Epilepsie-Modell erfordert eine ausgefeilte, systematische Analyse, da ein Anfall jederzeit spontan auftreten kann. In der Literatur werden verschiedenste Methoden beschrieben, die sich hinsichtlich technischen, personellen und zeitlichen Aufwands unterscheiden.

Im Rahmen der Untersuchung der in dieser Arbeit verwandten transgenen Mauslinien in einem Tiermodell für TLE, welches unter anderem durch spontane epileptische Anfälle gekennzeichnet ist, sollte eine verbesserte Vorgehensweise der EEG-Aufzeichnung eingesetzt werden. Bei der „klassischen“ Überwachungsmethode mittels konventioneller EEG-Aufzeichnung werden die Elektroden über Kabel an der Käfigdecke fixiert, da diese direkt mit dem Aufnahmegerät verbunden sein müssen {zum Beispiel (Bertram *et al.*, 1997)}.

Dies lässt eine artgerechte Bewegungsfreiheit nicht zu. Außerdem wird bei dieser Methode das EEG häufig durch Bewegungsartefakte überlagert, was eine genaue Analyse erschwert. Um eine zuverlässige Analyse der Anfälle zu gewährleisten, wurde hier eine telemetrische EEG-Ableitung gewählt, die es den Tieren ermöglicht, sich frei in ihrem Käfig zu bewegen, da sich die EEG-Sendeeinheit unter der Haut befindet. Außerdem kann bei diesem System der Transmitter zur EEG-Aufnahme problemlos mittels eines Magneten von außerhalb des Käfigs beziehungsweise ausgeschaltet werden, so dass ein Berühren der Tiere nicht notwendig ist, was eine weitere Stressreduktion für die Tiere bedeutet. Da bei dieser Methode die Verbindung zwischen Elektroden und Transmitter ebenfalls unter der Haut verläuft, gewährleistet dies eine artefaktarme Übertragung der abgetasteten EEG-Daten. Dieser Versuchsaufbau wurde bereits in ähnlicher Form beim Meerschweinchen und bei der Maus beschrieben (Mumford *et al.*, 2001; Weiergraber *et al.*, 2005). Zunächst wurde das EEG von Kontrolltieren abgeleitet und analysiert, um sicherzustellen, dass normales Verhalten der Tiere zu keinen Artefakten im EEG führte und die relativ invasive Operation keine Anfallsaktivität im elektroenzephalografischen Bild verursachte. Außerdem zeigte eine zu Beginn durchgeführte unabhängige Analyse der aufgezeichneten EEG- und Video-Daten, dass alle morphologisch sichtbaren Anfälle auch im EEG zu eindeutigen Veränderungen führten. Eine Analyse der EEG-Daten macht somit ein Übersehen von Anfällen, wie es bei der reinen Videoanalyse vorkommt, unmöglich. Die Kopplung dieser Sendeeinheiten an ein infrarotgestütztes Videosystem ermöglicht eine kontinuierliche Beobachtung der Tiere in der Hell- und in der Dunkelphase, so dass Anfälle, die oft gehäuft als sogenannte „Anfallscluster“ auftreten, nicht übersehen werden konnten. Der zeitliche Aufwand der Analyse der Daten steigt linear zur Anzahl der gefundenen zu analysierenden Ereignisse (Anfälle). Grundsätzlich ist zu sagen, dass durch diese Methode der zeitliche Aufwand auf ein Minimum reduziert werden konnten. Neben der zuverlässigen Erkennung von Anfällen und der zeitlich effizienten Auswertung der Daten, kann mit diesem System außerdem hervorragend eine morphologische Klassifikation der Anfälle durchgeführt werden. Als weiterer Vorteil dieses Systems ist die Archivierbarkeit der Daten zu nennen. Die EEG-Daten werden elektronisch gespeichert und sind somit jederzeit verfügbar. Genauso verhält es sich mit den Videodaten, die in Sequenzen gesichert wurden. Mit der Größe des Transmitters von 2 x 1 x 0,7 cm

und einem Gewicht von 3,9 g stellt der Transmitter eine vertretbare Beeinträchtigung dar. Diese ist zwar nicht unerheblich, bewegt sich von dem Gewicht jedoch im Rahmen einer Schwangerschaft. Bereits zwei Tage *post operationem* bewegen sich die Tiere wieder völlig uneingeschränkt, inkl. Hangeln an der Käfigdecke. Bei der Wahl dieser Methode sollte jedoch bedacht werden, dass es sich um einen neurochirurgischen Eingriff handelt und daher nicht ausgeschlossen werden kann, dass Prozesse initiiert werden, welche die Morphologie oder Funktionalität des Gehirns der Maus im postoperativen Verlauf beeinflussen könnten. Durch die Verwendung von Oberflächen-Elektroden werden Komplikationen in Form von anhaltender Irritation des Gehirngewebes, die bei der Implantation von Tiefenelektroden auftreten können, unwahrscheinlich. Die Analyse von Kontrolltieren parallel zu den Tieren mit chronischer Epilepsie minimiert Fehldeutungen möglicher Auswirkungen der Implantation. Als ein Nachteil ist die Tatsache zu nennen, dass es trotz einer gut optimierten Anästhesie zu Narkosezwischenfällen kommen kann, so dass gerade die Tiere, die bereits einen SE durchlitten haben, bei der Operation versterben. Als ein weiterer Nachteil dieser Methode ist der relativ hohe Kostenaufwand für die Anschaffung eines komplexen EEG-/Video-Ableitungs-Systems zu nennen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Einsatz eines gekoppelten EEG-/Video-Systems bei entsprechender Fragestellung eine äußerst sinnvolle Methode darstellt, um zuverlässig und dauerhaft Daten aufzuzeichnen und zu analysieren.

6.2.2.1 Analyse der EEG-Grundaktivität

Bei der Analyse der EEG-Grundaktivität (Basal-EEG) von Tieren, die keinerlei anfallsinduzierende Substanzen erhalten haben, beziehungsweise vor der Pilokarpin-Applikation, waren keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Standardabweichung der Spannungsamplitude zwischen den transgenen Tieren, verglichen mit entsprechenden Kontrolltieren, zu erkennen. Dieses einheitliche Bild des EEGs und das minimale Vorkommen von Bewegungsartefakten in der Grundaktivität lässt die Aussage zu, dass diese Methode der Ableitung gut anwendbar ist.

6.2.2.2 Analyse epileptischer Anfälle

Epileptiforme Aktivitäten in Form von Spikes, Polyspikes, Spike-Wave-Komplexen oder spindelförmigen Aktivitäten als Zeichen für epileptische Entladungen, stellen einen pathologischen Befund des EEGs dar, der bei den beobachteten Tieren, die keinen SE erlitten haben gänzlich fehlte. Bei Tieren, die durch Pilocarpin eine chronische Epilepsie entwickelten, zeigten sich diese pathologischen Ereignisse im EEG in der interiktalen Phase. Das Verhalten der Tiere war in diesen Phasen jedoch ohne phänotypischen Befund. Diese pathologischen Ereignisse kommen durch abnorme Entladungen der Neurone zustande, deren Ursache jedoch weitestgehend ungeklärt ist. Generalisierte epileptische Anfälle, die sich durch motorische Krampfaktivität des gesamten Körpers auszeichneten, konnten anhand der Aufzeichnungen der EEG-Daten erkannt und eindeutig von anderen Verhaltensmustern unterschieden werden. Es wurde auch in keinem Fall ein spontaner Anfall beobachtet, der nicht mit epileptiformen Entladungen im EEG einherging. Die Analyse der Anfälle des Stadiums III und des Stadiums IV konnten anhand der EEG-Analyse nicht unterschieden werden, da sich diese weder hinsichtlich Dauer noch der Standardabweichung der Spannungsamplitude unterschieden.

Somit ist das dural abgeleitete Oberflächen-EEG für die hier analysierten Parameter nicht gut genug aufgelöst. Die alleinige Analyse der Anfälle im dural abgeleiteten EEG ist nicht ausreichend, da daraus die Morphologie nicht ersichtlich ist. Deshalb bildet die EEG-Aufzeichnung zusammen mit der Videoanalyse eine sinnvolle Einheit zur Detektion und Charakterisierung epileptischer Anfälle.

6.2.3 Pilocarpin-Modell

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Tiermodell modifiziert verwendet und charakterisiert, bei dem Epilepsie in transgenen Mäusen und WT durch einen generalisierten SE ausgelöst wurde (Turski *et al.*, 1984). Der SE und seine Folgen sind in der Humanmedizin von großer klinischer Relevanz, da er die extremste Erscheinungsform des epileptischen Anfalls darstellt und mit einer hohen Mortalität einhergeht (DeLorenzo *et al.*, 1995; Coeytaux *et al.*, 2000; Garzon *et al.*, 2003). Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass auch die Entwicklung einer chronischen Epilepsie zu den ernstzunehmenden Folgen dieses Krankheitsbildes

gehört (Hesdorffer *et al.*, 1998). Einige Aspekte der TLE können in diesem Epilepsiemodell reproduziert werden. So stellt der induzierte konvulsive SE im Pilokarpin-Modell den Epilepsie auslösenden Insult dar. Bei Mäusen mit Pilokarpin-induziertem SE konnte gezeigt werden, dass eine SE Länge von 30 min nicht ausreichend ist, um in den Tieren spontane Anfälle in der chronischen Phase zu erzeugen (Lemos *et al.*, 1995; Klitgaard *et al.*, 2002), was den Ergebnissen in der Humanmedizin ähnelt. Dazu wurde ein Protokoll genutzt, bei dem der SE erst nach 40 min durch die Gabe von Diazepam abgebrochen wurde, was in allen WT chronisch rezurrenente Anfälle nach dem Verstreichen einer Latenzzeit hervorrief. Auf eine längere Dauer des SE wurde verzichtet, da die Mortalität proportional zur Dauer des SE steigt (Goodman, 1998) und ein länger andauernder SE für die vorliegende Fragestellung nicht relevant war. Im Gegensatz zu Epilepsiemodellen, bei denen die Latenzzeit mit durchschnittlich 2 Wochen beziffert wird (Cavalheiro *et al.*, 1991; Mello *et al.*, 1993), dauert die Latenzphase beim Menschen meist einige Jahre (French *et al.*, 1993; Mathern *et al.*, 1995; Mathern *et al.*, 1995), wobei die Länge dieser Phase abhängig ist von der Art des initialen Insults und dem Alter des Patienten zu diesem Zeitpunkt. Es konnte gezeigt werden, dass bereits in der Latenzphase neuronale Schäden sowie axonale und dendritische Veränderungen auftreten (Mello *et al.*, 1993; Magloczky *et al.*, 1995; Spigelman *et al.*, 1998). Als ein Nachteil bei der Anwendung des Pilokarpin-Modells gemeinsam mit der telemetrischen EEG-Ableitung ist zu nennen, dass aufgrund der hohen Mortalität im Pilokarpin-Versuch die Implantation des Transmitters in der Regel erst nach dem SE und der folgenden Rekonvaleszenz stattfinden kann. So musste auf die Analyse der Latenzzeit verzichtet werden.

Der neuronale Zellverlust, sowie die Moosfasersprossung als Zeichen für synaptische Reorganisation, treten sowohl im Hippokampus von Patienten mit TLE (Mathern *et al.*, 1995) als auch bei Mäusen mit spontanen epileptischen Anfällen auf (Cavalheiro *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2000). Insgesamt ähnelte somit die Neuropathologie nach einem Pilokarpin-induziertem SE der Neuropathologie der menschlichen TLE (Turski *et al.*, 1983; Clifford *et al.*, 1987). In der vorliegenden Studie konnten diese Befunde bestätigt werden. So waren ca. 4 Wochen nach SE in der hippocampalen Formation von WT deutliche Anzeichen für Ammonshornsklerose, gekennzeichnet durch ausgeprägten neuronalen Zellverlust, Astroglie und Moosfasersprossung, zu erkennen. Bereits 10 Tage

nach SE zeigten WT bereits einen signifikanten Zellverlust im Ammonshorn und eine dezente Moosfasersprossung.

Als grundsätzlicher Nachteil aller chemisch induzierten Epilepsiemodelle sind die neurotoxischen Wirkungen zu nennen. Außerdem weist ein Chemokonvulsivum nach Applikation eine andauernde Präsenz auf, die über das Erreichen des SE hinaus reicht. Dies ist vor allem bei der Untersuchung potenziell antikonvulsiver Substanzen ungünstig, da eventuelle Wechselwirkungen nicht vorhersehbar sind und die Ergebnisse verfälschen könnten. Des Weiteren weist Pilocarpin aufgrund seiner systemischen cholinergen Wirkungen eine stark beeinträchtigende Wirkung auf den Allgemeinzustand der Versuchstiere auf, so dass das Allgemeinbefinden der Tiere über einige Tage nach der Behandlung stark gestört ist (Cavalheiro *et al.*, 1991; Mello *et al.*, 1993; Gibbs *et al.*, 1997).

Aufgrund der starken Nebenwirkungen, die in allen untersuchten Mauslinien auftraten, war eine intensive Nachbetreuung erforderlich. Eine mögliche Beeinflussung der Gehirnfunktion durch die allgemeinkörperliche Stoffwechsellage war hierbei nicht auszuschließen. Da jedoch alle Tiere der gleichen Prozedur unterzogen wurden, sind diese Bedenken in dieser Studie zu vernachlässigen.

Zusammenfassend spiegelt das Pilocarpin-Modell die meisten Charakteristika der menschlichen TLE wider. Daher stellt es ein geeignetes Modell zur Charakterisierung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dar.

6.3 Einfluss von Neurotransmitter-Rezeptoren und Ionenkanälen auf die Temporallappenepilepsie

6.3.1 Die Rolle von mGluR1

Gruppe I mGluRs (mGluR1 und mGluR5) sind an die Phosphatidylinositol-Hydrolyse gekoppelt (Nakanishi, 1994; Pin *et al.*, 1995). Dies stellt einen metabolischen Prozess dar, der zur Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} und über die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) zur Bildung von IP3 und DAG führt. Bei der Erhöhung von freiem zytosolischem Ca^{2+} und der Aktivierung der PKC-Komponenten handelt es sich um intrazelluläre Mechanismen, die zu neuronalem Zelltod führen können (Choi, 1992). Es konnte gezeigt werden, dass Gruppe I mGluRs an der postsynaptischen Membran der glutamatergen Synapsen eine charakteristische perisynaptische Lokalisation zeigen (Lujan *et al.*, 1996), wo

sie neuronale Erregbarkeit über eine Vielzahl von K^+ -Kanälen, spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und ionotropen Glutamatrezeptoren der NMDA- und AMPA-Gruppe regulieren (Ikeda *et al.*, 1995; Pin *et al.*, 1995). Es wurde daher vermutet, dass mGluR1 und mGluR5 potenziell neurotoxisch sind und eine exzessive Aktivierung den neuronalen Zelltod verstärken sollte. Diese Hypothese jedoch lässt einige Aspekte unberücksichtigt. So wird die Rolle der Gruppe I mGluRs vor allem in Bezug auf Neurodegeneration nach wie vor äußerst kontrovers diskutiert. Während Antagonisten dieser Rezeptoren stets neuroprotektiv sind, verursachen Agonisten entweder einen verstärkten oder einen verminderten exzitotoxischen neuronalen Zelltod (Nicoletti *et al.*, 1999). Zwar haben verschiedene Studien gezeigt, dass die hippocampale Gruppe I mGluRs eine zentrale Rolle bei der Epileptogenese spielen (Bordi *et al.*, 1999; Merlin, 1999; Merlin, 2002), die genaue funktionelle Rolle der mGluR1 bei der Epileptogenese, insbesondere der Anfallsempfindlichkeit und/oder Vulnerabilität der hippocampalen Neurone, ist jedoch nur unzureichend geklärt. Darum wurde hier die Rolle dieses Rezeptors in Bezug auf die Epileptogenese und Neuroprotektion mit Hilfe einer mGluR1-überexprimierenden Mausmutante in experimentell erzeugter TLE untersucht.

6.3.1.1 mGluR1-EGFP-Maus

In humaner und experimentell erzeugter AHS war eine veränderte Regulation von mGluR1 auf Ebene der mRNA und des Proteins gezeigt worden (Blümcke *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005). Aufgrund der gefundenen Hochregulation in Hippokampus-Gewebe von Patienten mit TLE stellt das Modell einer gehirnspezifischen Überexpression von mGluR1-EGFP in transgenen Mäusen eine adäquate Basis dar, um die funktionelle Rolle dieses Glutamatrezeptors zu untersuchen.

So wurde zunächst eine transgene Maus generiert, die mGluR1-Rezeptoren als Fusionsproteine mit EGFP überexprimiert. Zu den untersuchten Zeitpunkten p 0 und p 90 zeigten die mGluR1-EGFP-transgenen Tiere eine signifikante Erhöhung sowohl der EGFP- als auch der mGluR1-Expression. Die Anwendung eines Antikörpers gegen GFP verstärkte das visuelle Signal. Die Expression und die Verteilung des mGluR1-EGFP-Fusions-Proteins konnte dadurch unabhängig von der Expression des endogenen mGluR1 im DG und in der Pyramidenzellschicht der hippocampalen Formation festgestellt werden. So zeigten die transgenen

Tiere auf mRNA- ebenso wie auf Protein-Ebene die Expression von an EGFP gekoppeltes mGluR1.

Die mGluR1-EGFP-transgenen Tiere zeigten weder phänotypische Verhaltensabnormalitäten, noch Veränderungen bezüglich des Körpergewichtes und waren fertil. Es waren ebenfalls keine pathologischen Veränderungen in der Gehirnentwicklung, in der kortikalen Architektur oder der weißen Substanz zu finden. Im aufgezeichneten EEG von mGluR1-EGFP-Kontrolltieren, die keine SE induzierende Substanz erhalten hatten, waren weder spontane epileptische Aktivität noch Anfälle zu erkennen (Pitsch *et al.*, 2007). Außerdem war die Spannungs-Amplitude weder im basalen EEG noch während der Anfälle verschieden. So hat die Überexpression der mGluR1 primär in keinem untersuchten Parameter einen erkennbaren Einfluss auf das elektroenzephalografische Bild und verursacht ohne Aktivierung keine epileptiforme Aktivität.

6.3.1.2 Status epilepticus

Weder in Häufigkeit noch im Zeitverlauf des Anfallsauftretens konnten Unterschiede zwischen mGluR1-EGFP-Mäusen und mGluR1-WT festgestellt werden. Auch die Sterblichkeit war unbeeinflusst vom Genotyp. Bei Betrachtung der Anfallsstärke aller Anfälle in der akuten Phase, traten bei den mGluR1-EGFP-Mäusen signifikant mehr schwere generalisierte Anfälle mit Verlust der Stellreflexe auf. Daraus resultiert, dass mGluR1-transgene Tiere in Bezug auf die Anfallsstärke eine gering erhöhte Anfälligkeit gegenüber Pilokarpin besitzen. Bei der Entstehung von Pilokarpin-induzierten akuten Verhaltenseffekten oder bei der direkten Entstehung eines SE scheint mGluR1 jedoch keine substantielle Rolle zu spielen.

Zahlreiche mGluR-Liganden wurden in Tiermodellen getestet. Hierbei zeigten Gruppe-I-mGluR-Antagonisten stets antikonvulsive und Agonisten konvulsive Wirkungen (Thomsen *et al.*, 1998; Chapman *et al.*, 1999; Yip *et al.*, 2001). Die selektive Blockade von mGluR1 zeigte ebenfalls eine antikonvulsive Wirkung bei konvulsiv-generalisierten und bei Absenz-Anfällen (Chapman *et al.*, 1999). In neonatalen und adulten Ratten löst die Aktivierung von Gruppe I mGluRs in akuten Anfallsmodellen Anfälle und Gehirnschädigungen aus (Sacaan *et al.*, 1992; McDonald *et al.*, 1993). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Gruppe I mGluRs eine Rolle bei der Entstehung epileptiformer Aktivität spielen (Aronica *et*

al., 1997; Merlin, 1999; Galoyan *et al.*, 2000). Nicht geklärt ist jedoch, welche Wirkung eine experimentell erzeugte Hochregulation des mGluR1 besitzt. Im Gegensatz zu oben genannten Studien konnte gezeigt werden, dass eine artifizielle Hochregulation von mGluR1 keinen Einfluss auf die Entstehung der generalisierten Anfälle in der akuten Phase hat. Ist die Schwelle zur Entstehung von Anfällen jedoch überschritten, treten die Anfälle mit einem stärkeren Phänotyp in Form des Verlustes der Stellreflexe auf. So ist in der akuten Phase eine konvulsive Wirkung durch eine vermehrte mGluR1-Aktivierung zu bestätigen. Die Wirkung der Aktivierung auf die Anfälle scheint daher sekundär durch den exzitatorischen mGluR1 verstärkt zu werden. Außerdem verursachen konvulsive Elektroschock induzierte Anfälle einen akuten Anstieg an mGluR1-Immunreaktivität in der CA3-Region. Dies spricht für eine akute Hochregulation, verursacht durch pathologische Prozesse in Form von Anfällen. Diese exzessive pathologische Hochregulation entspricht der hier experimentell erzeugten Überexpression. Beides führt zu einer erhöhten Erregbarkeit, die jedoch verschiedene Ausprägungen haben kann. Während epileptischer Anfallsaktivität kommt es zu einer exzessiven Glutamatfreisetzung aus exzitatorischen Synapsen. Da mGluR1 vor allem postsynaptisch lokalisiert ist, verursacht die Aktivierung einer höheren Anzahl mGluR1 sekundär eine erhöhte Erregbarkeit.

Hippokampale Gruppe I mGluRs vermitteln durch eine Autopotenzierung eine Verstärkung der synaptischen Antwort. Dies trägt zur Entstehung von synchronisierten Entladungen und somit zur Epileptogenese bei (Merlin *et al.*, 1997). Diese sekundär potenzierende Wirkung könnte auch in diesem Falle die erhöhte Stärke verursachen, die jedoch nicht ausreichend zu sein scheint, um auch zu einer erhöhten Anfallszahl zu führen.

Bei Betrachtung der Tiere, die einen SE erlitten, zeigten die mGluR1-EGFP-Tiere weder bei den Latenzzeiten noch bei der Anfallszahl bis zum Erreichen eines SE signifikante Unterschiede. Jedoch traten auch in dieser Teilgruppe gehäufte stärkere Anfälle auf als bei mGluR1-WT. So haben die Tiere mit einer erhöhten Anzahl an mGluR1 auch in der Gruppe der Pilocarpin-sensitiven Tiere eine gering erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem experimentell erzeugten Insult. Insofern trifft bei der Gruppe der Tiere, die einen SE erlitten, dasselbe zu: Die Entstehung eines SE ist von der Anzahl der mGluR1 unabhängig, wohingegen jedoch auch hier der Einfluss von mGluR1 die Anfälle verstärkt.

Es konnte zwar gezeigt werden, dass die Aktivierung von mGluR1 zu einer hippocampalen epileptiformen Aktivität und sogar zur Entwicklung von generalisierten Anfällen führt (Sacaan *et al.*, 1992; McDonald *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1995; Chuang *et al.*, 2001; Sayin *et al.*, 2003), jedoch konnte hier nicht bestätigt werden, dass mGluR1 einen Einfluss auf die Entstehung von Pilokarpin-induzierten Anfällen, eines SE oder auf die Anfallsfrequenz in der akuten Phase hat. Ist die Schwelle zum Entstehen von Anfällen jedoch überschritten, verstärkt mGluR1 den Phänotyp des Anfalles indem die Stellreflexe des Tieres verloren gehen. Die Ursache für diesen Reflexverlust ist jedoch noch unbekannt.

6.3.1.3 Spontane Anfälle und chronische Neurodegeneration

In der chronischen Phase, die von rekurrenten Anfällen gekennzeichnet ist, zeigten die mGluR1-EGFP-Tiere signifikant mehr Anfälle. Ebenso wie in der akuten Phase waren die Anfälle phänotypisch stärker. Es wurde jedoch kein Unterschied in der Standardabweichung der Amplitude, also der elektroenzephalografischen Stärke, oder der Anfallslänge gefunden. Daraus resultiert, dass mGluR1 eine große Rolle bei der Epileptogenese zu spielen scheint. *In vitro* und *in vivo* Studien haben gezeigt, dass hippocampale Gruppe I mGluRs eine zentrale Rolle bei der Epileptogenese spielen (Bordi *et al.*, 1999; Merlin, 1999; Merlin, 2002). Wie bereits erwähnt, führt die Aktivierung von mGluR1 zu einer pathologischen hippocampalen epileptiformen Aktivität (Taylor *et al.*, 1995; Chuang *et al.*, 2001; Sayin *et al.*, 2003). Außerdem konnte den Gruppe I mGluRs die Kontrolle der „Burst-Frequenz“, bei der es sich um Frequenzen von Aktionspotenzial-Salven handelt, nachgewiesen werden, indem die Applikation eines Agonisten einen rapiden Anstieg des Auftretens dieser salvenartigen Entladungen verursachte (Merlin *et al.*, 1997; Rutecki *et al.*, 1997; Keele *et al.*, 1999; Galoyan *et al.*, 2000). Untersuchungen an mGluR1- oder mGluR5-defizienten Mäusen, lassen vermuten, dass es einen interaktiven Mechanismus zwischen mGluR1 und mGluR5 bei der Modulation von epileptiformen salvenartigen Entladungen gibt, was potenziell einen gemeinsamen Signalmechanismus oder eine direkte Interaktion zwischen diesen beiden Rezeptoren vermuten lässt (Stoop *et al.*, 2003). Bei diesen Mechanismen stellt die mGluR5-Aktivierung einen kritischen Faktor dar, welcher die Zellen veranlasst, salvenartige Entladungen zu generieren, wohingegen die mGluR1-Aktivierung eine größere Rolle in der Aufrechterhaltung dieses Phänotyps spielt (Merlin,

2002). Diese Hypothese wurde bestätigt, da die Induktion von persistentem „Bursten“ und synaptischer Modifikation nicht bei mGluR5 KO Mäusen durch einen Insult ausgelöst werden konnte (Stoop *et al.*, 2003). Diese zentrale Rolle der mGluR1 bei der Epileptogenese wird durch der vorliegenden Studie bestärkt, da ein vermehrtes Auftreten von Anfällen, die sich zudem im Phänotyp als stärker erwiesen, in mGluR1-EGFP-Tieren zu finden waren. So konnten hier ein direkter Zusammenhang zwischen mGluR1 und einer verstärkten Epileptogenese dargestellt werden, welche auch konstant über den analysierten Zeitraum anhielt. Eine andere Studie legt dar, dass die Toxizität der mGluR1 erst sekundär zu der Entstehung von Anfällen führt (Merlin *et al.*, 1997), indem die salvenartigen Entladungen bestehen bleiben und die Zellen nicht zum physiologischen Feuern von Aktionspotenzialen zurückkehren (Burke *et al.*, 1996). Die Ergebnisse dieser Studie deuten ebenfalls daraufhin, da mGluR1 bei der Entstehung der epileptischen Anfälle keine Rolle zu spielen scheint, sondern erst im späteren Verlauf einen Einfluss auf die Epileptogenese hat.

In der vorliegenden Studie zeigten die mGluR1-EGFP-Tiere zwar in der hippocampalen Formation einen segmentalen Zellverlust nach SE in allen untersuchten Regionen, dieser unterschied sich nicht von dem, der bei den mGluR1-WT zu finden war. Die von uns erzeugte Überexpression von mGluR1 zeigte somit in diesem Tiermodell für TLE, weder eine neurotoxische noch einen neuroprotektive Wirkung im Hippokampus, da der Zellverlust in den transgenen Tieren dem der mGluR1-WT entsprach. Wie bereits erwähnt, wurde die Rolle der Gruppe I mGluRs bezüglich der Neuroprotektion kontrovers diskutiert. Da jedoch gezeigt wurde, dass mGluR1 und mGluR5 mit zahlreichen potentiell schädlichen Ereignissen assoziiert sind, ist eine detaillierte Analyse ihrer Rolle in der Epileptogenese von großem Interesse.

In zwei Studien konnte kein Zusammenhang zwischen mGluR1-Überexpression und erhöhter hippocampaler Schädigung nach SE hergestellt werden (Aronica *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). Es gibt jedoch auch zahlreiche Belege für einen Zusammenhang zwischen erhöhter mGluR1-Expression und neuronalem Zelltod. Sie sind in die Mechanismen verwickelt, die in Gehirn-Insult-Modellen, wie bei Ischämie und Trauma, den neuronalen Zelltod verstärken und somit zu Neurodegeneration führen (Bruno *et al.*, 1995; Bordi *et al.*, 1999; Nicoletti *et al.*, 1999; Bruno *et al.*, 2001; Faden *et al.*, 2001; Lyeth *et al.*, 2001; Pellegrini-

Giampietro, 2003; Ireland *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2004). Es wurden jedoch auch neuroprotektive Aktionen bei der Aktivierung der Gruppe I mGluRs beschrieben, wobei vor allem eine verminderte NMDA vermittelte Toxizität beschrieben wird (Koh *et al.*, 1991; Blaabjerg *et al.*, 2003).

Dass die in den oben genannten Tiermodellen beziehungsweise in *in vitro*-Studien gefundenen neuroprotektiven oder neurotoxischen Effekte bei der Aktivierung der Gruppe I mGluRs in diesem Modell nicht bestätigt werden konnten, kann verschiedene Ursachen haben. So stellt ein *in vivo*-Modell ein komplexes System dar, das mit Experimenten in Kulturen nur schwer zu vergleichen ist. Die Applikation von mGluR-Liganden *in vivo* ist häufig durch eine fehlende Penetration durch die Blut-Hirn-Schranke erschwert, was sich negativ auf die Ergebnisse auswirken kann. Außerdem stellt die experimentelle Überexpression von mGluR1 bereits vor der Pilocarpin-Gabe eine andere Ausgangsposition dar, die mit anderen Effekten verknüpft sein könnte, selbst wenn die Anfälligkeit nicht wesentlich verschieden war. Es kann im Tier zu einer Kompensation kommen, welche die Auswirkungen des mGluR1 verändert. Gerade bei chemisch induzierten Insulten können auch Nebeneffekte des Konvulsivums Veränderungen mit sich ziehen. Selbst in Kulturen kann nicht gewährleistet werden, dass die angewandten Agonisten nicht auch bisher unidentifizierte Rezeptoren aktivieren und dadurch die Ergebnisse verfälschen (Nicoletti *et al.*, 1999).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung der Gruppe I mGluRs Veränderungen der NMDA-Rezeptor-Funktion verursachen, welche häufig eine Toxizität vermitteln (Chandler *et al.*, 1998). Eine weitere Hypothese für die oben genannten unterschiedlichen Ergebnisse ist eine PKC-abhängige funktionelle Änderung dieser Rezeptoren nach Aktivierung von einem "neurotoxischem" zu einem "neuroprotektivem" Modus (Bruno *et al.*, 2001). Auch ein solcher Mechanismus kann zu unterschiedlichem neuronalen Zelltod führen, da hierbei die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht genau geklärt werden konnten.

Es gibt aber auch einige Hinweise dafür, dass Anfallsaktivität die Expression der Gruppe I mGluRs beeinflusst. So konnte bereits ein direkter Zusammenhang zwischen einer veränderten Expression der Gruppe I mGluRs und Epilepsie hergestellt werden. Bei mit Epilepsie assoziierter fokaler kortikaler Dysplasie wurde eine gesteigerte Expression von mGluR1 und mGluR5 gefunden. Hierbei

lässt die erhöhte Expression der Gruppe I mGluRs in dysplastischen Neuronen eine mögliche Beteiligung bei der intrinsischen und verstärkten Epileptogenität der dysplastischen kortikalen Regionen vermuten (Aronica *et al.*, 2003). In Hippokampus-Gewebe von Patienten mit AHS konnte eine selektive Hochregulation von mGluR1 gezeigt werden (Blümcke *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2001).

Die Untersuchung von humanem Gewebe ist jedoch insofern kritisch, als dass nicht eindeutig geklärt werden kann, zu welchem Zeitpunkt nach dem auslösenden Insult die Probenentnahme stattgefunden hat. Es kann jedoch immer von einem späten chronischen Zeitpunkt ausgegangen werden. Die erhöhte Expression könnte daher auch eine kompensatorische Ursache haben.

Zumindest die Hochregulation von mGluR1 stimmt jedoch mit Studien in Tiermodellen für AHS überein. Verschiedene chronische Modelle belegen, dass die Expression und Funktion von mGluR1 während der Epileptogenese stark verändert ist (Akbar *et al.*, 1996; Aronica *et al.*, 1997; Bajkowska *et al.*, 1999; Klapstein *et al.*, 1999; Doherty *et al.*, 2001). Eine mit Epilepsie assoziierte Hochregulation von mGluR1 im Tiermodell ist mittlerweile gut belegt (Akbar *et al.*, 1996; Al-Ghoul *et al.*, 1998; Blümcke *et al.*, 2000). Diese stellt möglicherweise eine Reaktion des Organismus zur Dämpfung der epileptogenen Hypererregbarkeit dar (Doherty *et al.*, 2002). In Hippokampi von Mäusen mit Pilocarpin-induzierter Epilepsie wurde jedoch eine verminderte Expression des exzitatorischen mGluR1 und mGluR5 in der chronischen Phase nachgewiesen (Chen *et al.*, 2005). Tang *et al.* untersuchten ebenfalls die mGluR-Expression im Hippokampus nach Pilocarpin-induziertem SE in postsynaptischen Bereichen der Interneurone und fanden in der akuten Phase initial eine verminderte Expression von mGluR1, die in der chronischen Phase wieder anstieg (Tang *et al.*, 2001). Die unterschiedlichen, teilweise gegensächlichen Ergebnisse der Expression von mGluR1 könnten ihre Ursache bei den verwendeten Modellen und Organismen haben. So sind die Daten in verschiedenen Tiermodellen für TLE erhoben worden, doch erfüllt nicht jedes Modell dieselben Kriterien.

Nimmt man nun an, dass mGluR1 in GABAergen Interneuronen im Hippokampus exprimiert wird (Blümcke *et al.*, 1996; Shigemoto *et al.*, 1996), würde eine veränderte Regulation während der Epileptogenese einen wichtigen Einfluss auf die glutamaterge Modulation inhibitorischer Neurone besitzen. Die

oben genannten Daten deuten daraufhin, dass mGluR1 regional und zeitlich spezifisch reguliert wird, so dass eventuell eine Hochregulation von mGluR1 in Bereichen stattfindet, in denen mGluR1 an inhibitorische Rezeptoren gekoppelt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde experimentell eine mGluR1-Hochregulation erzeugt, um deren Einfluss auf die Epileptogenese zu untersuchen. Hier konnte gezeigt werden, dass die initiale Überexpression von mGluR1 bei der AHS im Zusammenhang mit einer Hypererregbarkeit steht, welche den chronischen epileptischen Phänotyp im Hinblick auf Anfallsstärke und -frequenz verstärkt, jedoch keinen Einfluss auf den neuronalen Zelltod zu haben scheint. Die Wirkung dieser initialen mGluR1-Aktivierung stimmt mit Daten überein, die eine Kopplung von mGluR1 an hemmende GABA-Rezeptoren nahe legen.

Da Antagonisten der Gruppe I-mGluRs ohne Ausnahme stets eine neuroprotektive Wirkung zeigten und die Daten dieser Studie eine durch mGluR1 vermittelte erhöhte Anfallsempfänglichkeit aufwiesen, sollte geprüft werden, ob die prophylaktische Gabe eines mGluR1-Antagonisten nach einem Insult zu einer verminderten Ausprägung der Epilepsie beitragen könnte.

Zusammenfassend sprechen die vorliegenden Daten dafür, dass Antagonisten der Gruppe I mGluRs interessante Zielmoleküle zur Suppression von exzessiver synaptischer Aktivierung bei der TLE darstellen.

6.3.2 Rolle von mGluR4

Die vor allem präsynaptisch lokalisierte Gruppe III mGluRs (mGluR4, 6, 7, und 8) (Kinoshita *et al.*, 1996; Shigemoto *et al.*, 1997; Bradley *et al.*, 1999) inhibieren die Adenylatzyklase und reduzieren über die Inhibition des Glutamat- und GABA-Ausstromes die synaptische Übertragung (Pin *et al.*, 1995; Nicoletti *et al.*, 1996; Conn *et al.*, 1997; Cartmell *et al.*, 2000; Corti *et al.*, 2002; Flor *et al.*, 2002). Gerade mGluR4 scheint den Ca^{2+} -Einstrom über die Inaktivierung von G-Protein-gekoppelten Ca^{2+} -Kanälen zu regulieren, wobei diese Inhibition der Ca^{2+} -Kanäle auch postsynaptisch vermittelt wird (Trombley *et al.*, 1992; Conn *et al.*, 1997). Verschiedene Studien zeigten, dass die mGluRs in pathophysiologische Ereignisse verwickelt sind, bei denen ein Übermaß an glutamaterger Aktivität vorkommt, wie es bei epileptischen Anfällen der Fall ist. Die Gruppe III mGluRs, insbesondere mGluR4, werden direkt mit Neuroprotektion in Zusammenhang gebracht (Bruno *et al.*, 1996; Bruno *et al.*, 2000). Ziel dieser Arbeit war es,

genauere Untersuchungen zur funktionellen Rolle von mGluR4 bei der Epileptogenese und Neuroprotektion in einem Modell für TLE zu untersuchen.

6.3.2.1 mGluR4-KO-Maus

Bei der humanen TLE liegt ein verändertes Expressionsverhalten von mGluR4 in Form einer Hochregulation vor (Lie *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005). Der funktionelle Einfluss dieses inhibitorischen mGluRs auf die Epileptogenese wurde mit Hilfe einer transgenen mGluR4-KO-Maus untersucht (Pekhletski *et al.*, 1996), welche den metabotropen Glutamatrezeptor 4 nicht exprimiert (Corti *et al.*, 2002). Es sollte die Hypothese untersucht werden, ob sich auf der Grundlage der Abwesenheit eines inhibitorischen Neurotransmitter-Rezeptors bei diesen Mäusen die Epilepsie aufgrund der fehlenden inhibitorischen Funktion verstärkt.

Das EEG bei Tieren, die keinerlei SE induzierende Substanzen erhalten hatten, zeigte bei den untersuchten Parametern keine pathologischen Veränderungen und wies im Vergleich mit WT keine Unterschiede auf. Das Fehlen des mGluR4 hat daher ohne Induktion eines SE keinen Einfluss auf das elektroenzephalografische Bild.

6.3.2.2 Status epilepticus

Der erste generalisierte Anfall nach der Pilokarpin-Gabe ging bei den mGluR4-KO-Tieren signifikant häufiger mit dem Verlust der Stellreflexe einher, wodurch die recht schweren Stadium-IV-Anfälle gekennzeichnet sind. Dies weist auf eine stärkere Wirkung des Pilokarpins bei Fehlen des inhibitorischen mGluR4 hin und zwar schon bei der Induktion einer Epilepsie beziehungsweise während des Insultes. Außerdem verstarben mehr mGluR4-KO- als mGluR4-WT. Innerhalb der Gruppe der überlebenden Tiere zeigten die mGluR4-KO-Tiere signifikant häufiger einen SE. Daraus resultiert, dass mGluR4-KO-Tiere eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Pilokarpin besitzen und das Fehlen dieses Rezeptors die Entwicklung eines SE begünstigt. Dies spricht also dafür, dass der inhibitorische mGluR4 zur Verhinderung des Auftretens eines SE direkt beiträgt; er wirkt somit in diesem Modell für TLE protektiv. Dies stimmt mit bisherigen Studien überein, in denen dargelegt wurde, dass die Aktivierung der Gruppe III mGluRs die synaptische Übertragung über präsynaptische Mechanismen inhibiert (Baskys *et al.*, 1991), was eine verminderte Erregbarkeit zur Folge hat. Auch *in vivo* Untersuchungen zeigten, dass eine selektive Aktivierung der Gruppe III mGluRs

epileptiforme Aktivität im Ratten-Neokortex und im Hippokampus abschwächt (Burke *et al.*, 1994; Tizzano *et al.*, 1995; Abdul-Ghani *et al.*, 1997). Fällt diese inhibitorische Wirkung jedoch wie in dem vorliegenden Modell weg, ist die Schwelle zur Entstehung eines SE herabgesetzt.

Betrachtete man die Latenzzeiten bis zum Erreichen des ersten generalisierten Anfalls, bis zum SE und bis zur Letalität, so zeigten die mGluR4-KO-Tiere keine signifikanten Veränderungen. Die Anfallszahlen nach Pilocarpin-Gabe unterschieden sich ebenfalls nicht. Auf die zeitliche Entwicklung eines Anfalls beziehungsweise auf den SE hat das Fehlen des mGluR4 somit keinerlei Wirkung, ebenso wenig auf die Entwicklung einer erhöhten Anfallsfrequenz. In der akuten epileptischen Phase nach Pilocarpin-Applikation zeigten mGluR4-KO-Mäuse jedoch häufiger schwere epileptische Anfallsaktivität als mGluR4-WT. Innerhalb der Gruppe wiesen die mGluR4-KO-Tiere signifikant weniger schwächere Stadium-III-Anfälle auf. Während epileptischer Anfallsaktivität kommt es zu einer exzessiven Glutamatfreisetzung aus exzitatorischen Synapsen, was zu einer intrazellulär erhöhten Ca^{2+} -Konzentration führt. Bei fehlender beziehungsweise mangelnder Inhibition durch Gruppe III mGluRs kann es, durch diesen intrazellulären Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration, zu einer Übererregbarkeit der Neurone kommen, die wiederum eine erhöhte Anfälligkeit im Pilocarpin-Modell hinsichtlich Anfallsschwere und Induktion eines SE verursachen. Somit hat mGluR4 auch einen direkten positiven Einfluss auf die phänotypische Schwere der entstandenen akuten Anfälle. In der akuten Phase hat das Fehlen des mGluR4 einen stark fördernden Einfluss auf die Iktogenese ebenso wie auf die Epileptogenese, da zum einen die Entstehung eines SE und zum anderen die Entstehung von phänotypisch stärkeren Anfällen begünstigt werden. Außerdem ist bei den mGluR4-KO-Tieren die Letalität in der akuten Phase erhöht, da der antikonvulsive Effekt der mGluR4-Aktivierung wegfällt. Dies stimmt mit Untersuchungen von mGluR4-Liganden überein, die in verschiedenen Modellen belegen, dass mGluR4-Agonisten insgesamt antikonvulsiv und Antagonisten konvulsiv wirken (Abdul-Ghani *et al.*, 1997; Thomsen *et al.*, 1998; Chapman *et al.*, 2001; Yip *et al.*, 2001). Betrachtet man nun die Tiere die einen SE erlitten, zeigten die mGluR4-KO-Tiere weder bei den Latenzzeiten, noch bei der Anfallszahl bis zum Erreichen eines SE, signifikante Unterschiede. Jedoch traten auch in dieser Teilgruppe gehäuftere stärkere Anfälle auf als bei mGluR4-WT. So haben die Tiere

ohne mGlu4-Rezeptoren auch in der Gruppe der Pilocarpin-sensitiven Tiere lediglich eine gering erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem experimentell erzeugten Insult. Die Entstehung eines SE ist von dem Vorhandensein des mGlu4-Rezeptors unabhängig, wohingegen jedoch auch hier der Wegfall von mGluR4 die Anfälle verstärkt. Obwohl *in vivo* Studien eine antikonvulsive und neuroprotektive Rolle der Gruppe III mGluRs belegen konnten (Chapman *et al.*, 1999; Gasparini *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1999), löste das Fehlen von mGluR4 interessanterweise keine erhöhte Anfallsanfälligkeit in den meisten getesteten Modellen aus (Doherty *et al.*, 2002). So verursacht der Verlust von mGluR4 sogar eine Resistenz gegenüber Absenz-Anfällen (Snead *et al.*, 2000). Dies mag als Widerspruch zu den vorliegenden Daten scheinen, die belegen, dass das Fehlen des mGluR4 die Entstehung eines SE begünstigt, indem die vorher erlittenen Anfälle stärker ausfallen. Allerdings sind die molekularen Mechanismen entsprechend differenter Tiermodelle insgesamt durch deutliche Unterschiede gekennzeichnet, so dass die entsprechenden Ergebnisse sich dem unmittelbaren Vergleich entziehen. Beitragen mag die Tatsache, dass mGluR4-KO-Tiere eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Pilocarpin aufweisen, die durch eine höhere akute Letalität gekennzeichnet ist.

6.3.2.3 Spontane Anfälle und chronische Neurodegeneration

Es wurde beobachtet, dass die mGluR4-KO-Tiere keine signifikant erhöhte Anfallsfrequenz in der chronischen epileptischen Phase zeigten. Sie bekamen in der chronischen Phase jedoch vermehrt schwere epileptische Anfälle. Diese chronischen wiederkehrenden spontanen Anfälle unterschieden sich jedoch nicht hinsichtlich der Standardabweichung der Amplitude, also der elektroenzephalografischen Stärke, oder der Anfallslänge. So werden diese Erkenntnisse von vorherigen Studien auch in der chronischen Phase bestätigt, die bereits einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung der Gruppe III mGluRs und einer antikonvulsiven Wirkungen *in vivo* herstellen konnten (Gasparini *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1999). Das Fehlen von mGluR4 hat zwar nach Entstehung einer Epilepsie in diesem Modell weder einen positiven noch einen negativen Effekt auf die Anfallsfrequenz, die erlittenen Anfälle fielen jedoch wesentlich häufiger stärker aus. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte eine andere Gruppe, die eine herabgesetzte Anfallsschwelle bei mGluR7-KO-Mäusen nach Applikation eines Konvulsivums gefunden haben (Sansig *et al.*, 2001). Außerdem bekommt

die mGluR7-KO-Maus nach Stressexposition spontan Anfälle (Masugi *et al.*, 1999; Sansig *et al.*, 2001).

Es gibt verschiedene Studien, die sich mit der veränderten Expression von mGluR4 bei der Epileptogenese auseinandersetzen. Im Gegensatz zum normalen Hippokampus ist mGluR4 interessanterweise im Hippokampus von TLE-Patienten vor allem im Gyrus dentatus stark hochreguliert (Blümcke *et al.*, 1996; Lie *et al.*, 2000). Die Induktion und der Anstieg der mGluR4-Expression im Hippokampus von Patienten mit TLE, insbesondere innerhalb der anfallsresistenten hippokampalen Neurone, wie zum Beispiel der Körnerzellen des DG, scheint eine adaptive Regulation des hippokampalen Netzwerkes zu sein, was der ikталen Exzitotoxizität entgegenwirkt (Lie *et al.*, 2000). Diese Annahme wird durch weitere Beobachtungen bestärkt, da mGluR4 im Hippokampus unter pathophysiologischen Bedingungen, wie experimentell erzeugte Ischämie, aber auch nach Pilocarpin-induziertem SE, ebenfalls hochreguliert wird (Iversen *et al.*, 1994; Rosdahl *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2005).

Diese mGluR4-Hochregulation weist darauf hin, dass mGluR4 eine Rolle bei dem kompensatorischen Mechanismus spielt, um hippokampaler Übererregbarkeit entgegenzuwirken. Diese Erkenntnisse zeigen, dass Neurone, die einem hohen extrazellulären Gehalt an Glutamat ausgesetzt sind, differenziert über prä- und postsynaptisch lokalisierte mGluRs reagieren können (Rosdahl *et al.*, 1994). Aktivitätsabhängige Regulation von mGluR4 wurde ebenfalls in anderen neuronalen Zell-Populationen beobachtet. So kann auch in diesem Modell aufgrund der erhöhten Glutamatfreisetzung eine funktionelle Umorganisation der Gruppe III mGluRs vonstatten gegangen sein, so dass der Grund für eine fehlende Protektion an einer kompensatorischen Hochregulation anderer Gruppe III mGluRs liegen könnte. Entweder hat mGluR4 überhaupt keinen Einfluss auf die Anfallsfrequenz oder es kommt zur kompensatorisch geänderten Expression der anderen mGluRs. Es konnte gezeigt werden, dass Gruppe III mGluRs an GABA-Rezeptoren gekoppelt sind (Cartmell *et al.*, 2000). Bisher konnte jedoch noch keine mGluR-vermittelte Änderung des GABA-Ausstromes in experimentell erzeugter Epilepsie bewiesen werden. Eine solche Aktivierung könnte jedoch ein weiterer Mechanismus sein, welcher die Pathogenese der Epilepsie unterliegt.

In Untersuchungen dieser Studie zeigten mGluR4-KO-Mäuse einen signifikant stärkeren neuronalen Zellverlust in der gesamten hippokampalen Formation nach

Pilokarpin-induziertem SE als die mGluR4-WT. Dies bestätigt vorherige Daten, in denen gezeigt werden konnte, dass die Gruppe III mGluRs *in vivo* und *in vitro* eine neuroprotektive Wirkung haben, welche hauptsächlich von mGluR4 vermittelt wird (Bruno *et al.*, 2000). Verschiedene Studien belegen einen protektiven Effekt der mGluR4 gegenüber Exzitotoxizität, was in verschiedenen Tiermodellen für experimentell erzeugte Ischämie oder Trauma untersucht wurde (Faden *et al.*, 1997; Henrich-Noack *et al.*, 2000). Auch die Aktivierung von mGluR4 ist protektiv gegenüber exzitotoxischem neuronalen Zelltod, indem sie neuronales Überleben fördert und der Apoptose vorbeugt (Copani *et al.*, 1995; Bruno *et al.*, 1996; Borodezt *et al.*, 1998; Bruno *et al.*, 2000).

Die oben beschriebene Hochregulation von mGluR4 im Hippokampus von Patienten mit TLE scheint jedoch im direkten Widerspruch zu den Ergebnissen von Dietrich *et al.* (Dietrich *et al.*, 1999) zu stehen (Doherty *et al.*, 2002). Diese Studie konnte nämlich belegen, dass die präsynaptische Inhibition der Gruppe III mGluRs, welche einen wichtigen negativen Feedback-Mechanismus darstellt, der den synaptischen Ausstrom von Glutamat im Hippokampus kontrolliert, bei AHS verloren geht (Dietrich *et al.*, 1999). Dies wird in dieser Studie bestätigt, da das Fehlen dieses Rezeptor-Gens, was eine Expression unmöglich macht, zu einem massiv erhöhten neuronalen Zelltod führt. Da es während epileptischer Anfallsaktivität zu einer exzessiven Glutamatfreisetzung aus exzitatorischen Synapsen kommt, die über einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einem starken neuronalen Zellverlust führt (Choi, 1988), können im Hippokampus lokalisierte mGluR4 funktionell einem exzessiven Ca^{2+} -Einstrom in diese Neurone entgegenwirken. Dies spricht wiederum für eine funktionelle Hochregulation von mGluR4, da dadurch eine Wirkung verstärkt wurde. Zusammen mit den vorherigen Untersuchungen unterstreichen diese Daten die Hypothese für einen substantiellen neuroprotektiven Effekt von mGluR4 bei der TLE. In dieser Studie konnte ein antikonvulsiver Effekt jedoch lediglich in Bezug auf die Anfallsstärke beobachtet werden.

Die Hochregulation des mGluR4 stellt daher einen interessanten Mechanismus für die Prävention vor exzitotoxischer neuronaler Zellschädigung dar (Copani *et al.*, 1995; Bruno *et al.*, 1996; Borodezt *et al.*, 1998). Eine weitere interessante Erkenntnis ist, dass sich das humane mGluR4-Gen innerhalb eines Lokus für juvenile myoklone Epilepsie befindet (Wong *et al.*, 2001). Dies weist darauf hin,

dass die Induktion von mGluR4 eine wichtige Rolle bei der Kompensation der mit Epilepsie assoziierten Hyperexzitabilität spielt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mGluR4 nicht bei der Entstehung, jedoch bei der Ausprägung der chronisch rekurrenten Anfälle eine Rolle spielt. Außerdem hat mGluR4 starke Auswirkungen auf den Nervenzellverlust.

Da die mGluRs eine zentrale Rolle bei der Regulation der neuronalen Exzitabilität spielen, könnten Veränderungen in deren Expression während der Epileptogenese ein Versuch des ZNS sein, die neuronale Hyperexzitabilität, die mit epileptischen Anfällen assoziiert ist, zu kompensieren. Es bleibt jedoch eine unbeantwortete Frage, ob solche Veränderungen wirklich kompensatorisch zu sehen sind und wie effektiv solch eine Kompensation sein mag. Es zeigte sich, dass, eher noch als kompensatorische Effekte, Veränderungen bei der Expression der mGluRs zur Pathophysiologie der Epileptogenese beitragen. So sprechen diese Daten dafür, dass Gruppe-III-mGluR-Agonisten interessante Zielmoleküle zur Suppression von exzessiver synaptischer Aktivierung und Neurotoxizität bei der TLE darstellen.

6.3.3 Rolle von Cav3.2

Cav3.2 gehört zu den spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, die sich schon bei einer niedrigen Depolarisation öffnen und zusammen mit Cav3.1 und 3.3 den T-Typ-Strom erzeugen. In dieser Gruppe zeichnet sich Cav3.2 durch seine Nickel-Sensitivität aus. Wird die Zelle beispielsweise durch ein exzitatorisches synaptisches Potenzial depolarisiert, öffnen sich die T-Typ-Kanäle und Ca^{2+} strömt in die Zelle. Dies depolarisiert die Zelle weiter, wodurch sich andere spannungsabhängige Kanäle öffnen und die Formation zu einem Aktionspotential geführt wird. Beim Menschen ebenso wie beim Tier, führt eine kontinuierliche Anfallsaktivität, wie sie während eines SE entsteht, zu einer großen Anzahl an plastischen Veränderungen im Hippokampus und in angrenzenden Gehirnregionen (Coulter *et al.*, 1999; Sloviter, 1999; Ben-Ari, 2001). So kann ein einziger SE eine Epileptogenese auslösen, welche mit mannigfaltigen Veränderungen in der synaptischen (McNamara, 1999) und in der intrinsischen Plastizität (Yaari *et al.*, 2002) vergesellschaftet sind. Die synaptische Plastizität geht zum größten Teil mit anhaltenden Veränderungen bei der Regulation oder Expression der Neurotransmitter-Rezeptoren einher (Turner *et al.*, 1991; Lothman

et al., 1995; Chen *et al.*, 1999). Über die Mechanismen der intrinsischen Plastizität bei der Epileptogenese ist hingegen nur wenig bekannt. Zahlreiche Studien belegen jedoch, dass lang anhaltende Veränderungen bei der Expression der spannungs- und Ca^{2+} -abhängigen Ionenkanäle in der neuronalen Zellmembran hierzu beitragen. Obwohl fast alle pyramidalen Neurone in der hippocampalen CA1-Region unter normalen Bedingungen regulär feuern, stellen Zellen (Jensen *et al.*, 1994), sind Pyramidenzellen in hippocampalem Gewebe von Ratten, die einen SE hatten, intrinsisch „burstende“ Zellen, welche spontane, salvenartige, pathologische Entladungen zeigten. In einer kürzlich erschienenen Studie im Pilocarpin-Modell wurde eine deutliche Hochregulation dieser intrinsischen neuronalen „Burster“ gefunden, welche mit der Entwicklung einer TLE assoziiert sind (Sanabria *et al.*, 2001). Außerdem scheint diese Hochregulation von intrinsischen salvenartigen Entladungen aus einem *de novo* Auftreten Ca^{2+} -abhängigen „Burstens“ zu resultieren, welche bei dieser Gruppe hippocampaler Neurone normalerweise nicht zu finden sind (Azouz *et al.*, 1996). Des Weiteren wurde beobachtet, dass ein Teil dieser neu geformten „Burster“, nämlich die spontan feuern Pyramidenzellen, als Schrittmacher für spontane interiktal-ähnliche epileptiforme salvenartige Entladungen dienen, welche die ganze CA1-Population der Pyramidenzellen, „nicht-Burster“ und „Burster“ gleichsam, zu synchronisierten Entladungen rekrutieren (Sanabria *et al.*, 2001). Diese gezeigten Veränderungen könnten durch alle T-Typ-Kanäle vermittelt werden. Es wurden jedoch bisher kaum Untereinheiten spezifisch untersucht. Obwohl bereits Mutationen im Cav3.2-Gen bei verschiedenen Formen der Epilepsie gefunden werden konnten (Chen *et al.*, 2003; Heron *et al.*, 2004; Khosravani *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2006; Peloquin *et al.*, 2006), ist die genaue funktionelle Rolle dieses Kanals und sein Einfluss auf die Epileptogenese noch nicht eindeutig geklärt. Aufgrund dieser Befunde lag es nahe, die spezifische Rolle von Cav3.2 im KO-Modell zu untersuchen.

6.3.3.1 Cav3.2-KO-Maus

In einem Modell für TLE, bei dem durch die Gabe von Pilocarpin ein SE induziert wurde, konnte ein Zusammenhang zwischen der deutlichen Hochregulation von intrinsischen neuronalen „Burstern“ und der Entstehung von TLE festgestellt werden (Sanabria *et al.*, 2001). Pharmakologische Untersuchungen belegten, dass der spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanal, Cav3.2, die Neurone dazu veranlasst,

Aktionspotenzial-Salven zu generieren („bursten“) (Su *et al.*, 2002). Um den Einfluss dieses Kanals auf die Epileptogenese und den neuronalen Zelltod zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie eine KO-Mauslinie genutzt, in der dieser Kanal nicht exprimiert wird (Chen *et al.*, 2003). Zu Beginn konnte sichergestellt werden, dass diese Tiere keine pathologischen elektroenzephalografischen Veränderungen aufwiesen. Da das basale EEG vor Induktion eines SE keine Unterschiede aufwies, ist davon auszugehen, dass die Abwesenheit des Cav3.2 primär keinen Einfluss auf die Aktivität im normalen EEG aufwies.

6.3.3.2 Status epilepticus

Die Cav3.2-KO-Tiere zeigten im Vergleich mit entsprechenden Kontrollen in der gesamten Gruppe bei keinem der untersuchten Parameter der akuten Phase signifikante Unterschiede. In der Teilgruppe der Tiere, die einen SE erlitten hatten, war lediglich ein einziger analysierter Parameter signifikant verschieden. So zeigten die Cav3.2-KO-Tiere den ersten generalisierten Anfall nach Pilocarpin-Applikation häufiger in der starken Ausprägungsform eines Stadium-IV-Anfalles. Da der stärkere Phänotyp des ersten generalisierten Anfalles nicht zu Veränderungen des SE führte, ist diesem Befund eine geringe Relevanz zuzuschreiben. Der Wegfall des T-Typ- Ca^{2+} -Kanals Cav3.2 hat somit keinen großen Einfluss auf die Entstehung eines SE, die initialen Ereignisse während der Epileptogenese beziehungsweise die Anfälligkeit gegenüber Pilocarpin.

6.3.3.3 Analyse des Status epilepticus

Um neben der Auswertung der morphologischen und elektroenzephalografischen Daten noch eine quantitative Analyse des SE durchzuführen, wurden zwei weitere Parameter, die Stärke und die Dauer des SE, mit Hilfe der Fourier-Analyse untersucht. Der SE führte in beiden Gruppen zu einer signifikanten Erhöhung der Bandstärke in allen Frequenzbändern, welche in den drei hochfrequenten Alpha-, Beta- und Gamma-Bändern am stärksten ausgeprägt war. Die Cav3.2-KO-Tiere zeigten also weder bei der Stärke noch bei der Dauer des SE Unterschiede zu den Cav3.2-WT. So war der SE zwischen Cav3.2-KO-Tieren und Cav3.2-WT gleich. Da weder in der akuten Phase der Epileptogenese, noch während des SE relevante Unterschiede bei den Cav3.2-KO-Tieren zu finden waren, ist davon auszugehen, dass in der chronischen Phase auftretende

Unterschiede nicht im Zusammenhang mit Ereignissen in der akuten Phase zu erklären sind. Cav3.2 hat somit initial keinen Einfluss auf die Entstehung oder die Ausprägung eines SE.

6.3.3.4 Akute Neurodegeneration bei Cav3.2 transgenen Mäusen

Der Zellverlust wurde zu frühen Zeitpunkten nach SE untersucht, und zwar an Tag 2, Tag 3 und Tag 10. So ist in der frühen Phase der Epileptogenese an Tag 2 nach SE als einziger pathologischer Prozess in beiden Gruppen eine verminderte Zellzahl wahrscheinlich bedingt durch eine Zelldispersion, im Gyrus dentatus zu erkennen, der jedoch an Tag 3 nicht mehr zu finden war. Die Cav3.2-WT zeigten ab Tag 10 einen signifikanten Zellverlust in der CA1- und CA3-Region, der in der CA1-Region auch gegenüber den Cav3.2-KO-Tieren signifikant stärker vorlag. Dieser Zellverlust ist mit dem in anderen Mauslinien vergleichbar. Bei den Cav3.2-KO-Tieren war zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Zellverlust in der CA1- oder CA3-Region zu erkennen. An Tag 2 und Tag 3 nach SE war bei keinem Tier Moosfasersprossung (MFS) zu erkennen. Die Quantifizierung der MFS an Tag 10 ergab eine Tendenz der Cav3.2-WT hin zu einer stärkeren MFS als bei Cav3.2-KO-Tieren, die jedoch nicht signifikant war. Diese neuropathologischen Daten im Hippokampus aus der frühen Phase der Epilepsie sprechen bereits für einen neurotoxischen Beitrag des T-Typ- Ca^{2+} -Kanals Cav3.2, da in den Hippokampi der Cav3.2-KO-Tiere kein signifikanter Zellverlust und eine deutlich abgeschwächte MFS zu erkennen war. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt noch kein signifikanter Zellverlust oder eine MFS vorlag. Daher lässt sich vermuten, dass der Zellverlust mit der Hochregulation von Cav3.2 in direktem Zusammenhang steht.

6.3.3.5 Spontane Anfälle und chronische Neurodegeneration

Die Cav3.2-KO-Tiere wiesen in der chronischen Phase erheblich seltener Anfälle als die Cav3.2-WT auf, wobei zwei der Cav3.2-KO-Tiere sogar keinen einzigen Anfall entwickelten. Außerdem fielen, bis auf zwei Anfälle eines Tieres, alle Anfälle in die Kategorie der Stadium-III-Anfälle, die keinen Übergang zum Verlust der Stellreflexe zeigten. Im Hinblick auf Amplitudenhöhe oder Länge der chronischen Anfälle im EEG wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Cav3.2-WT und Cav3.2-KO-Tieren gefunden. Die Auswertung des Zellverlustes nach Pilokarpin-induzierter Epilepsie in der chronischen Phase zeigte in der

hippokampalen Formation der Cav3.2-WT, wie erwartet, einen deutlich ausgeprägten Zellverlust. Im Gegensatz dazu fehlte dieser bei den Cav3.2-KO-Tieren bei manchen Tieren komplett und lag insgesamt in allen Regionen signifikant vermindert vor. Auch bei der Beurteilung eines weiteren Parameters für die Ammonshornsklerose, der Moosfasersprossung, zeigte sich in den Hippokampi der Cav3.2-KO-Tiere in der chronischen Phase eine erheblich verminderte Ausprägung dieser Form der synaptischen Reorganisation.

Cav3.2 hat somit einen großen Einfluss auf die Epileptogenese, obwohl die Stärke des SE in beiden Gruppen identisch war. So führt die fehlende Hochregulation von Cav3.2 und die dadurch ausbleibende Erholung der neuronalen Erregbarkeit der CA1-Pyramidenzellen zu einer Neuroprotektion und einer verminderten Anfallsfrequenz und peripheren Anfallsstärke nach induziertem SE.

6.3.3.6 Analyse der interiktalen Phase

Zum frühen analysierten Zeitpunkt in der interiktalen Phase zeigten die Cav3.2-KO-Mäuse verglichen mit Cav3.2-WT in allen fünf analysierten Frequenzbändern eine signifikante Erhöhung der Bandstärke, welche zum späteren analysierten Zeitpunkt lediglich noch im Theta-Band signifikant erhöht war. Diese erhöhte Aktivität führt aber nicht zu generalisierten Anfällen. Als Erklärung warum diese unterschwelligen pathologischen Aktivitäten in den Cav3.2-WT nicht so stark zu beobachten ist, könnte man vermuten, dass in Folge von Anfällen diese Aktivität in Cav3.2-WT ausbleibt beziehungsweise gedämpft auftritt. Eine verstärkt pathologische Aktivität in Form von Spikes war im basalen EEG bei den Cav3.2-WT signifikant häufiger als bei den Cav3.2-KO-Tieren zu finden, was ein Kennzeichen pathologischer Entladungs-Aktivität darstellt. Das verminderte Auftreten von Spikes im EEG der interiktalen Phase bei den Cav3.2-KO-Tieren weist auf einen weiteren pathologischen Prozess des Cav3.2 bei der Epileptogenese hin.

6.3.3.7 Expressionsmuster verwandter Gene in Cav3.2-KO-Mäusen

Bei Ratten mit Pilocarpin-induzierter chronischer Epilepsie, zeigt sich eine erhöhte Dichte der T-Typ-Kanal-Ströme (Su *et al.*, 2002). Pharmakologische Untersuchungen mit speziellen Blockern für andere Untereinheiten spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle legen nahe, dass Ni²⁺-sensitive T- und/oder R-

Typ- Ca^{2+} -Ströme in Neuronen über die Aktivierung anderer spannungsabhängiger Ionenkanäle zu einem salvenartigen Feuern von Aktionspotenzialen führen (Huguenard, 1996; Su *et al.*, 2002). Genauer deuten Aufzeichnungen von Ni^{2+} -sensitiven Ca^{2+} -Strömen in CA1-Pyramidenzellen darauf hin, dass der Ca^{2+} -T-Typ-Strom 3fach hochreguliert ist. Dahingegen bleibt der R-Typ- Ca^{2+} -Strom unverändert (Su *et al.*, 2002). Da diese Untereinheit sensitiver gegenüber Ni^{2+} ist als die Cav3.1- oder die Cav3.3-Untereinheiten sprechen diese Daten für eine Beteiligung der Cav3.2-Untereinheit bei der Hochregulation der Ca^{2+} -T-Typ-Ströme und den damit assoziierten salvenartigen Entladungen (Lee *et al.*, 1999). Dies legt eine transkriptionelle Hochregulation porenformender α_1 -Untereinheiten, welchen die T-Typ-Ströme unterliegen, nahe.

Um diese Hypothese zu testen, wurde hier zunächst mit Hilfe der Real Time-PCR die mRNA-Expression dieser Ca^{2+} -Kanäle in CA1-Pyramidenzellen von Mäusen analysiert.

Von diesen drei Untereinheiten zeigte sich in den Cav3.2-WT an Tag 2 nach SE eine signifikante Zunahme der Cav3.2-Expression. Eine solche transiente Hochregulation fand sich auch in CA1-Pyramidenzellen von Ratten an Tag 3 nach SE. Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die hier beobachtete transkriptionelle Hochregulation von Cav3.2 über eine Erhöhung des T-Typ-Stromes ein gehäuftes Auftreten von salvenartigen Entladungen bedingt.

Der T-Typ-Strom war in Kontrolltieren beider Genotypen jedoch unverändert (unveröffentlichte Resultate). Dies spricht entweder für einen geringen Beitrag von Cav3.2 zum T-Typ-Strom unter physiologischen Bedingungen oder für eine Kompensation durch eine andere Ca^{2+} -Kanal-Untereinheit in den Cav3.2-KO-Tieren. Auf Ebene der mRNA konnte keine kompensatorische Hochregulation einer anderen T-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Untereinheit (Cav3.1, 3.3 und 2.3) in Cav3.2-KO-Tieren nachgewiesen werden. Da jedoch nach SE bei den Cav3.2-WT eine 3fache Hochregulation des T-Typ-Stroms vorlag, die bei Cav3.2-KO-Tiere fehlte, ist aufgrund dieser Ergebnisse insgesamt davon auszugehen, dass unter pathophysiologischen Bedingungen der erhöhte T-Typ-Strom durch eine transkriptionelle Hochregulation von Cav3.2 bedingt ist.

Um kompensatorische Effekte weiterer α_1 -Untereinheiten auszuschließen, wurden auch die mRNA-Level der verbleibenden porenformenden α_1 -Untereinheiten der hochschwelligeren Ca^{2+} -Kanäle analysiert, nämlich Cav1.2, 1.3,

2.1 und 2.2, welchen die P/Q-, N-, und L-Typ- Ca^{2+} -Ströme unterliegen. Hierbei konnte zu allen analysierten Zeitpunkten eine kompensatorische Hochregulation ausgeschlossen werden.

Die Analyse der mRNA-Expression der akzessorischen Untereinheiten ergab für die β_1 - und β_2 -Untereinheiten in den CA1-Pyramidenzellen der Cav3.2-WT und Cav3.2-KO-Tieren an Tag 2 und Tag 10 nach SE eine erhöhte mRNA-Abundanz. Für β_2 ergab sich an Tag 2 nach SE bei Cav3.2-WT ebenfalls eine Erhöhung, die bei den Cav3.2-KO-Tieren an Tag 10 nach SE vorhanden war. Diese weisen darauf hin, dass ähnliche transkriptionelle Aktivierungssignale nach SE in Cav3.2-WT und Cav3.2-KO-Tieren wirksam sein können. Die Hochregulation dieser akzessorischen Untereinheiten ist möglicherweise für die Membran-Verankerung der porenformenden Untereinheit von Bedeutung (Arikath *et al.*, 2003).

Es wurden keine signifikanten Änderungen bei der Expression zwischen Tieren nach SE und Kontrolltieren für die akzessorische $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten gefunden. Das Fehlen einer geänderten Regulation von $\alpha_2\delta$ deutet jedoch darauf hin, dass die Expression dieser Untereinheit nicht mit Cav3.2 korreliert ist.

Die vorliegenden Daten legen nahe, dass der SE zu einer Veränderung der hippokampalen Genexpression führt, was eine Hochregulation der Cav3.2-mRNA einschließt. Durch diese Daten wird die Hypothese bestärkt, dass diese Hochregulation von Cav3.2 eine Induktion des T-Typ-Stromes bedingt, was wiederum CA1-Pyramidenzellen dazu veranlasst, eine erhöhte Neigung zu salvenartigen Entladungen zu zeigen. Dieser Mechanismus kann in der Folge zu einer erhöhten Anfallsneigung und Neurodegeneration beitragen. Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, dass sowohl der Zellverlust, als auch die Moosfasersprossung in Tieren ohne Cav3.2 signifikant reduziert war.

Die Hochregulation von Cav3.2 in der Epileptogenese mit in Folge gesteigerter Anfallsanfälligkeit und neuronaler Vulnerabilität legt Cav3.2 als potenziellen Angriffspunkt nahe, um die Epileptogenese ebenso wie die Entwicklung der hippokampalen Schädigung und die Anfallsaktivität bei der TLE zu antagonisieren.

6.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die veränderte Regulation und Expression verschiedener Rezeptoren und Kanäle in Neuronen spielen eine entscheidende Rolle für die Entwicklung und Ausprägung der chronischen Epilepsie. So wird in Zukunft weiterhin die

Notwendigkeit bestehen, die genauen Verknüpfungen und Interaktionen der Neurone unter pathophysiologischen, aber auch unter physiologischen Bedingungen, genauer zu untersuchen, da es ohne dieses Wissen äußerst schwierig ist, die Konsequenz einer veränderten Regulation oder Expression vorherzusagen. Für einen völlig neuartigen Therapieansatz ist die Beobachtung wesentlich, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Moleküle erworbene, transkriptionelle Veränderungen in der Epileptogenese aufweisen. Es wird daher die Entwicklung eines Antiepileptogenese-Therapieansatzes angestrebt. Dazu sollen die Promoterstrukturen der hier untersuchten Neurotransmitter-Rezeptoren und Ionenkanäle detailliert charakterisiert und relevante Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Durch die Verwendung sogenannter „Small Molecules“ und von RNA-Interferenz bietet sich die Möglichkeit entscheidende transkriptionelle Aktivierungsmechanismen sowie pathogenetisch relevante Transkripte während der Epileptogenese zu antagonisieren. Übergeordnetes Ziel dieses Ansatzes ist es, durch Hemmung der Epileptogenesekaskade die Entstehung chronisch rekurrenter Anfälle zu verhindern. Zum Gelingen dieses neuartigen Therapiekonzepts wird ein umfassender, interdisziplinärer Ansatz Voraussetzung sein.

Vor dem Hintergrund der häufigen Pharmakoresistenz bei Patienten mit TLE können die hier beobachteten, für die Pathogenese relevanten Veränderungen in Zukunft als Basis zur Entwicklung neuartiger Therapiekonzepte dienen. In diesem Zusammenhang bieten die metabotrope Glutamatrezeptoren sowie die Cav3.2-Untereinheit wichtige Zielstrukturen für die künftige Entwicklung hochspezifischer Pharmaka.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die hier dargestellten molekularpathologischen und phänotypischen Untersuchungen an transgenen Mäusen in einem Epilepsiemodel für TLE verdeutlichen die funktionelle Relevanz erworbener Veränderungen der Verteilung und Expression der (a) mGluR1 und mGluR4 Neurotransmitter-Rezeptoren sowie (b) des spannungsabhängigen T-Typ- Ca^{2+} -Kanals Cav3.2 für mehrere pathogenetisch zentrale Aspekte der TLE. Eine elementare Voraussetzung für die Untersuchung der Unterschiede von Anfallsstärke und -frequenz der transgenen Tiere war die im Rahmen dieser Arbeit etablierte permanente EEG- und Video-Analyse von Mäusen.

Für die mGluR1-Untereinheit zeigte sich, dass eine hippocampal verstärkte Expression mit einer vermehrten chronischen Anfallsneigung vergesellschaftet ist. Die Expression von mGluR4 hingegen vermittelt sowohl einen antiepileptischen Effekt im akuten Anfallsstadium nach Status epilepticus als auch eine neuroprotektive Wirkung. Diese Prozesse stellen sich als aberrierende, erworbene synaptische Plastizität nach Status epilepticus dar.

In Cav3.2-defizienten Mäusen waren fundamentale Effekte im Hinblick auf hippocampale Schädigung sowie chronisches Anfallsgeschehen zu beobachten. Das grundlegend veränderte Entladungsverhalten hippocampaler Nervenzellen mit erhöhter Neigung zu salvenartigen Entladungen basierend auf vermehrter Transkription von Cav3.2 ist mit einer verstärkten Frequenz und Schwere chronisch rekurrenter Anfälle sowie erheblich ausgeprägterem hippocampalem Nervenzellverlust verbunden. Durch die benannte Veränderung ihres Entladungsverhaltens können die entsprechenden CA1-Neurone zu spontanen Schrittmachern epileptischer Netzwerkentladung werden. Solche Veränderungen spiegeln wesentliche funktionelle Konsequenzen einer erworbenen intrinsischen Ionenkanalopathie in der Epileptogenese wider.

Die veränderte Regulation und Expression verschiedener Rezeptoren und Kanäle in neuronalen Verschaltungen scheinen eine entscheidende Rolle für die Entwicklung und Ausprägung der chronischen Epilepsie zu spielen. Initiale Fehlregulationen im Rahmen eines SE oder in der frühen Epileptogenese führen im Gehirn zu massiven irreversiblen Prozessen. Kompensatorische Mechanismen können dabei möglicherweise nicht mehr adäquat aktiviert werden, was unter

Umständen zu einer Progression epileptogener Prozesse führen kann. In diesem Zusammenhang stellen die metabotropen Glutamatrezeptoren sowie die Cav3.2-Untereinheit wichtige Zielstrukturen für die künftige Entwicklung hochspezifischer Pharmaka dar.

8 SUMMARY

The results of the molecular and physiological analysis of transgenic mice in a model of temporal lobe epilepsy presented in this thesis show the functional importance of acquired alterations in the distribution and expression of (a) the metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR4 as well as (b) of the Cav3.2 subunit of the voltage dependent T-type calcium channel for several key aspects of TLE. The characterization of seizure severity and frequency of transgenic mice in a TLE model made the establishment of a permanent EEG and video monitoring unit an essential part of this thesis.

This study showed that an increased hippocampal expression of mGluR1 is associated with a propensity to seizures in the chronic phase. On contrast, expression of mGluR4 mediates anti-epileptic and neuroprotective effects in the acute phase after status epilepticus. These processes can be described as aberrant acquired synaptic plasticity after SE.

Mice deficient for Cav3.2 exhibited profound effects in regard to hippocampal damage and to the characteristics of the chronic phase. Neurons with a higher levels of Cav3.2 mRNA show a fundamentally altered firing behaviour with an increase in the propensity to burst and thereby can function as spontaneous pacemakers of epileptic networks. This results in an increase in the frequency and severity of recurrent chronic seizures as well as in a dramatic neuronal cell loss in the hippocampus. These changes represent the functional consequences of an acquired ion channelopathy during epileptogenesis.

Alterations in expression and distribution of various receptors and channels in neuronal networks seem to play an essential role in the development of chronic epilepsy. Initial disregulations as a consequence of SE or during early epileptogenesis can cause massive irreversible damage within the brain. Compensatory mechanisms might not be activated adequately and as a result epileptogenic processes might progress.

In this respect, metabotropic glutamate receptors and the Cav3.2 subunit of voltage gated calcium channels might represent valuable targets for the future development of highly targeted pharmaca.

9 ABKÜRZUNGEN

Abkürzung	Bedeutung
A. ad iniect.	Aqua ad inieciabilia
A. dest.	Aqua destillata
AHS	Ammonhornsklerose
Bl6SJ	= ein bestimmter Mausstamm (Black6SJ)
bp	Basenpaare
CA1	Cornu ammonis Subregion 1
CA3	Cornu ammonis Subregion 3
Cav	Voltage dependent Ca ²⁺ -channel, spannungsabh. Ca ²⁺ -Kanal
cDNA	kopierte DNA
CMV	Cytomegalovirus
DG	Gyrus dentatus
DNA	Desoxy-Ribonuklein-Säure
EEG	Elektro-Encephalo-Grafie
EGFP	enhanced green fluorescent protein
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HC	Hippokampus
Hz	Hertz
ILAE	International League against Epilepsy
i. p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
KO	Knock out
min	Minute
mg	Milligramm
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
mm	Millimeter
mRNA	(messenger RNA)
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
OT	Objektträger
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pmol	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s. c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SE	Status epilepticus
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TLE	Temporallappenepilepsie
U	Unit, Einheit
ÜN	übernacht
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp-Wurfgeschwister-Tiere

10 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdul-Ghani, A. S., Attwell, P. J., Singh Kent, N., Bradford, H. F. et al. (1997). Anti-epileptogenic and anticonvulsant activity of L-2-amino-4-phosphonobutyrate, a presynaptic glutamate receptor agonist. *Brain Res* **755**, 202-212.
- Aiba, A., Chen, C., Herrup, K., Rosenmund, C. et al. (1994). Reduced hippocampal long-term potentiation and context-specific deficit in associative learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* **79**, 365-375.
- Aicardi, J., Chevrie, J. J. (1970). Convulsive status epilepticus in infants and children. A study of 239 cases. *Epilepsia* **11**, 187-197.
- Akbar, M. T., Rattray, M., Powell, J. F., Meldrum, B. S. (1996). Altered expression of group I metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of amygdala-kindled rats. *Mol Brain Res* **43**, 105-116.
- Al-Ghoul, W. M., Meeker, R. B., Greenwood, R. S. (1998). Kindled seizures increase metabotropic glutamate receptor expression and function in the rat supraoptic nucleus. *J Neurosci Res* **54**, 412-423.
- Alving, J. (1995). What is intractable epilepsy? Petersfield: Wrightson Biomedical Publishing. 1-12.
- Amaral, D. G., Dolorfo, C., Alvarez-Royo, P. (1991). Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus* **1**, 415-435.
- Andersen, P., Holmqvist, B., Voorhoeve, P. E. (1966). Entorhinal activation of dentate granule cells. *Acta Physiol Scand* **66**, 448-460.
- Aniksztejn, L., Charton, G., Ben-Ari, Y. (1987). Selective release of endogenous zinc from the hippocampal mossy fibers in situ. *Brain Res* **404**, 58-64.
- Annegers, J. F., Grabow, J. D., Groover, R. V., Laws, E. R., Jr. et al. (1980). Seizures after head trauma: a population study. *Neurology* **30**, 683-689.
- Annegers, J. F., Hauser, W. A., Elveback, L. R. (1979). Remission of seizures and relapse in patients with epilepsy. *Epilepsia* **20**, 729-737.
- Annegers, J. F., Hauser, W. A., Shirts, S. B. (1984). Heart disease mortality and morbidity in patients with epilepsy. *Epilepsia* **25**, 699-704.
- Annegers, J. F., Shirts, S. B., Hauser, W. A., Kurland, L. T. (1986). Risk of recurrence after an initial unprovoked seizure. *Epilepsia* **27**, 43-50.
- Anwyl, R. (1999). Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* **29**, 83-120.
- Arida, R. M., Scorza, F. A., Peres, C. A., Cavalheiro, E. A. (1999). The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res* **34**, 99-107.
- Arikkath, J., Campbell, K. P. (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 298-307.
- Aronica, E., Gorter, J. A., Jansen, G. H., van Veelen, C. W. et al. (2003). Expression and cell distribution of group I and group II metabotropic glutamate receptor subtypes in taylor-type focal cortical dysplasia. *Epilepsia* **44**, 785-795.
- Aronica, E. M., Gorter, J. A., Paupard, M. C., Grooms, S. Y. et al. (1997). Status epilepticus-induced alterations in metabotropic glutamate receptor expression in young and adult rats. *J Neurosci* **17**, 8588-8595.

- Azouz, R., Jensen, M. S., Yaari, Y. (1996). Ionic basis of spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Physiol* **492 (Pt 1)**, 211-223.
- Bajkowska, M., Branski, P., Smialowska, M., Pilc, A. (1999). Effect of chronic antidepressant or electroconvulsive shock treatment on mGluR1a immunoreactivity expression in the rat hippocampus. *Pol J Pharmacol* **51**, 539-541.
- Ball, S. L., Powers, P. A., Shin, H. S., Morgans, C. W. et al. (2002). Role of the beta(2) subunit of voltage-dependent calcium channels in the retinal outer plexiform layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 1595-1603.
- Baran, H., Gramer, M., Honack, D., Löscher, W. (1995). Systemic administration of kainate induces marked increases of endogenous kynurenic acid in various brain regions and plasma of rats. *Eur J Pharmacol* **286**, 167-175.
- Baskys, A., Malenka, R. C. (1991). Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus. *J Physiol* **444**, 687-701.
- Bean, B. P. (2001). Calcium Channels. John Wiley & Sons, Ltd.
- Bear, M. F., Huber, K. M., Warren, S. T. (2004). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci* **27**, 370-377.
- Becker, A. J., Chen, J., Zien, A., Sochivko, D. et al. (2003). Correlated stage- and subfield-associated hippocampal gene expression patterns in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* **18**, 2792-2802.
- Ben-Ari, Y. (2001). Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia* **42 Suppl 3**, 5-7.
- Bender, R. A., Dube, C., Baram, T. Z. (2004). Febrile seizures and mechanisms of epileptogenesis: insights from an animal model. *Adv Exp Med Biol* **548**, 213-225.
- Berkeley, J. L., Decker, M. J., Levey, A. I. (2002). The role of muscarinic acetylcholine receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in pilocarpine-induced seizures. *J Neurochem* **82**, 192-201.
- Berthele, A., Laurie, D. J., Platzer, S., Zieglgansberger, W. et al. (1998). Differential expression of rat and human type I metabotropic glutamate receptor splice variant messenger RNAs. *Neuroscience* **85**, 733-749.
- Bertram, E. H., Cornett, J. F. (1994). The evolution of a rat model of chronic spontaneous limbic seizures. *Brain Res* **661**, 157-162.
- Bertram, E. H., Williamson, J. M., Cornett, J. F., Spradlin, S. et al. (1997). Design and construction of a long-term continuous video-EEG monitoring unit for simultaneous recording of multiple small animals. *Brain Res Brain Res Protoc* **2**, 85-97.
- Beurg, M., Sukhareva, M., Ahern, C. A., Conklin, M. W. et al. (1999). Differential regulation of skeletal muscle L-type Ca²⁺ current and excitation-contraction coupling by the dihydropyridine receptor beta subunit. *Biophys J* **76**, 1744-1756.
- Blaabjerg, M., Fang, L., Zimmer, J., Baskys, A. (2003). Neuroprotection against NMDA excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors is associated with reduction of NMDA stimulated currents. *Exp Neurol* **183**, 573-580.
- Blackstad, T. W., Brink, K., Hem, J., Jeune, B. (1970). Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J Comp Neurol* **138**, 433-449.
- Blümcke, I., Becker, A. J., Klein, C., Scheiwe, C. et al. (2000). Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. *J Neuropathol Exp Neurol* **59**, 1-10.

- Blümcke, I., Behle, K., Malitschek, B., Kuhn, R. et al. (1996). Immunohistochemical distribution of metabotropic glutamate receptor subtypes mGluR1b, mGluR2/3, mGluR4a and mGluR5 in human hippocampus. *Brain Res* **736**, 217-226.
- Blümcke, I., Schewe, J. C., Normann, S., Brüstle, O. et al. (2001). Increase of nestin-immunoreactive neuronal precursor cells in the dentate gyrus of pediatric patients with early-onset temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* **11**, 311-321.
- Blümcke, I., Thom, M., Wiestler, O. D. (2002). Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* **12**, 199-211.
- Blümcke, I., Zuschratter, W., Schewe, J. C., Suter, B. et al. (1999). Cellular pathology of hilar neurons in Ammon's horn sclerosis. *J Comp Neurol* **414**, 437-453.
- Bordi, F., Ugolini, A. (1999). Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. *Prog Neurobiol* **59**, 55-79.
- Borges, K., Gearing, M., McDermott, D. L., Smith, A. B. et al. (2003). Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp Neurol* **182**, 21-34.
- Borodezt, K., D'Mello, S. R. (1998). Decreased expression of the metabotropic glutamate receptor-4 gene is associated with neuronal apoptosis. *J Neurosci Res* **53**, 531-541.
- Bortolotto, Z. A., Collingridge, G. L. (1993). Characterisation of LTP induced by the activation of glutamate metabotropic receptors in area CA1 of the hippocampus. *Neuropharmacology* **32**, 1-9.
- Bradley, S. R., Standaert, D. G., Rhodes, K. J., Rees, H. D. et al. (1999). Immunohistochemical localization of subtype 4a metabotropic glutamate receptors in the rat and mouse basal ganglia. *J Comp Neurol* **407**, 33-46.
- Bratz, E. (1899). Ammonshornbefunde bei Epileptikern. *Arch.Psychiatr.Nervenkr.* **32**, 820-835.
- Bruno, V., Battaglia, G., Copani, A., Cespedes, V. M. et al. (2001). An activity-dependent switch from facilitation to inhibition in the control of excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors. *Eur J Neurosci* **13**, 1469-1478.
- Bruno, V., Battaglia, G., Copani, A., D'Onofrio, M. et al. (2001). Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 1013-1033.
- Bruno, V., Battaglia, G., Copani, A., Giffard, R. G. et al. (1995). Activation of class II or III metabotropic glutamate receptors protects cultured cortical neurons against excitotoxic degeneration. *Eur J Neurosci* **7**, 1906-1913.
- Bruno, V., Battaglia, G., Ksiazek, I., van der Putten, H. et al. (2000). Selective activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors is protective against excitotoxic neuronal death. *J Neurosci* **20**, 6413-6420.
- Bruno, V., Copani, A., Bonanno, L., Knoepfel, T. et al. (1996). Activation of group III metabotropic glutamate receptors is neuroprotective in cortical cultures. *Eur J Pharmacol* **310**, 61-66.
- Burgess, N., Maguire, E. A., O'Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* **35**, 625-641.
- Burke, J. P., Hablitz, J. J. (1994). Metabotropic glutamate receptor activation decreases epileptiform activity in rat neocortex. *Neurosci Lett* **174**, 29-33.

- Burke, J. P., Hablitz, J. J. (1996). G-protein activation by metabotropic glutamate receptors reduces spike frequency adaptation in neocortical neurons. *Neuroscience* **75**, 123-131.
- Carbone, E., Lux, H. D. (1984). A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* **310**, 501-502.
- Cartmell, J., Schoepp, D. D. (2000). Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem* **75**, 889-907.
- Cavalheiro, E. A., Leite, J. P., Bortolotto, Z. A., Turski, W. A. et al. (1991). Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* **32**, 778-782.
- Cavalheiro, E. A., Santos, N. F., Priel, M. R. (1996). The pilocarpine model of epilepsy in mice. *Epilepsia* **37**, 1015-1019.
- Cendes, F., Andermann, F., Dubeau, F., Gloor, P. et al. (1993). Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology* **43**, 1083-1087.
- Cendes, F., Andermann, F., Gloor, P., Lopes, C. I. et al. (1993). Atrophy of mesial structures in patients with temporal lobe epilepsy: cause or consequence of repeated seizures? *Ann Neurol* **34**, 795-801.
- Cendes, F., Leproux, F., Melanson, D., Ethier, R. et al. (1993). MRI of amygdala and hippocampus in temporal lobe epilepsy. *J Comput Assist Tomogr* **17**, 206-210.
- Chandler, L. J., Harris, R. A., Crews, F. T. (1998). Ethanol tolerance and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* **19**, 491-495.
- Chapman, A. G., Nanan, K., Yip, P., Meldrum, B. S. (1999). Anticonvulsant activity of a metabotropic glutamate receptor 8 preferential agonist, (R,S)-4-phosphonophenylglycine. *Eur J Pharmacol* **383**, 23-27.
- Chapman, A. G., Talebi, A., Yip, P. K., Meldrum, B. S. (2001). Anticonvulsant activity of a mGlu(4 α) receptor selective agonist, (1S,3R,4S)-1-aminocyclopentane-1,2,4-tricarboxylic acid. *Eur J Pharmacol* **424**, 107-113.
- Chapman, A. G., Yip, P. K., Yap, J. S., Quinn, L. P. et al. (1999). Anticonvulsant actions of LY 367385 ((+)-2-methyl-4-carboxyphenylglycine) and AIDA ((RS)-1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid). *Eur J Pharmacol* **368**, 17-24.
- Chen, C. C., Lamping, K. G., Nuno, D. W., Barresi, R. et al. (2003). Abnormal coronary function in mice deficient in α 1H T-type Ca²⁺ channels. *Science* **302**, 1416-1418.
- Chen, J. 2004. Activity-Dependent Regulation Of Neuronal Ionchannel Expression During Epileptogenesis [Dissertation]. Bonn: Universität Bonn.
- Chen, J., Larionov, S., Pitsch, J., Hoerold, N. et al. (2005). Expression analysis of metabotropic glutamate receptors I and III in mouse strains with different susceptibility to experimental temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett* **375**, 192-197.
- Chen, J., Sochivko, D., Beck, H., Marechal, D. et al. (2001). Activity-induced expression of common reference genes in individual cns neurons. *Lab Invest* **81**, 913-916.
- Chen, N., Luo, T., Raymond, L. A. (1999). Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *J Neurosci* **19**, 6844-6854.
- Chen, Y., Lu, J., Pan, H., Zhang, Y. et al. (2003). Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann Neurol* **54**, 239-243.
- Choi, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623-634.

- Choi, D. W. (1992). Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* **23**, 1261-1276.
- Chuang, S. C., Bianchi, R., Kim, D., Shin, H. S. et al. (2001). Group I metabotropic glutamate receptors elicit epileptiform discharges in the hippocampus through PLCbeta1 signaling. *J Neurosci* **21**, 6387-6394.
- Claassen, J., Lokin, J. K., Fitzsimmons, B. F., Mendelsohn, F. A. et al. (2002). Predictors of functional disability and mortality after status epilepticus. *Neurology* **58**, 139-142.
- Clifford, D. B., Olney, J. W., Maniotis, A., Collins, R. C. et al. (1987). The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high- dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* **23**, 953-968.
- Coeytaux, A., Jallon, P., Galobardes, B., Morabia, A. (2000). Incidence of status epilepticus in French-speaking Switzerland: (EPISTAR). *Neurology* **55**, 693-697.
- Cole, A. J. (2000). Is epilepsy a progressive disease? The neurobiological consequences of epilepsy. *Epilepsia* **41 Suppl 2**, S13-22.
- Congar, P., Leinekugel, X., Ben-Ari, Y., Crepel, V. (1997). A long-lasting calcium-activated nonselective cationic current is generated by synaptic stimulation or exogenous activation of group I metabotropic glutamate receptors in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **17**, 5366-5379.
- Conn, P. J., Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 205-237.
- Copani, A., Bruno, V., Battaglia, G., Leanza, G. et al. (1995). Activation of metabotropic glutamate receptors protects cultured neurons against apoptosis induced by beta-amyloid peptide. *Mol Pharmacol* **47**, 890-897.
- Corsellis, J. A., Bruton, C. J. (1983). Neuropathology of status epilepticus in humans. *Adv Neurol* **34**, 129-139.
- Corti, C., Aldegheri, L., Somogyi, P., Ferraguti, F. (2002). Distribution and synaptic localisation of the metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) in the rodent CNS. *Neuroscience* **110**, 403-420.
- Corti, C., Restituito, S., Rimland, J. M., Brabet, I. et al. (1998). Cloning and characterization of alternative mRNA forms for the rat metabotropic glutamate receptors mGluR7 and mGluR8. *Eur J Neurosci* **10**, 3629-3641.
- Coulter, D. A. (1999). Chronic epileptogenic cellular alterations in the limbic system after status epilepticus. *Epilepsia* **40 Suppl 1**, 23-33.
- Coulter, D. A. (2001). Epilepsy-associated plasticity in gamma-aminobutyric acid receptor expression, function, and inhibitory synaptic properties. *Int Rev Neurobiol* **45**, 237-252.
- Coulter, D. A., DeLorenzo, R. J. (1999). Basic mechanisms of status epilepticus. *Adv Neurol* **79**, 725-733.
- Coulter, D. A., McIntyre, D. C., Löscher, W. (2002). Animal models of limbic epilepsies: what can they tell us? *Brain Pathol* **12**, 240-256.
- Covolán, L., Mello, L. E. (2000). Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res* **39**, 133-152.
- Crino, P. B., Miyata, H., Vinters, H. V. (2002). Neurodevelopmental disorders as a cause of seizures: neuropathologic, genetic, and mechanistic considerations. *Brain Pathol* **12**, 212-233.
- Dalby, N. O., Mody, I. (2001). The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach. *Curr Opin Neurol* **14**, 187-192.

- Dam, M. (1992). Quantitative neuropathology in epilepsy. *Acta Neurol Scand Suppl* **137**, 51-54.
- Davies, K. G., Hermann, B. P., Dohan, F. C., Foley, K. T. et al. (1996). Relationship of hippocampal sclerosis to duration and age of onset of epilepsy, and childhood febrile seizures in temporal lobectomy patients. *Epilepsy Res* **24**, 119-126.
- DeLorenzo, R. J., Hauser, W. A., Towne, A. R., Boggs, J. G. et al. (1996). A prospective, population-based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia. *Neurology* **46**, 1029-1035.
- DeLorenzo, R. J., Pellock, J. M., Towne, A. R., Boggs, J. G. (1995). Epidemiology of status epilepticus. *J Clin Neurophysiol* **12**, 316-325.
- Dichter, M. A. (1998). *The Neurobiology of Epilepsy*. Lippincott-Raven. 233-499.
- Dietrich, D., Kral, T., Clusmann, H., Friedl, M. et al. (1999). Reduced function of L-AP4-sensitive metabotropic glutamate receptors in human epileptic sclerotic hippocampus. *Eur J Neurosci* **11**, 1109-1113.
- Dodrill, C. B., Wilensky, A. J. (1990). Intellectual impairment as an outcome of status epilepticus. *Neurology* **40**, 23-27.
- Doherty, J., Dingledine, R. (2001). Reduced excitatory drive onto interneurons in the dentate gyrus after status epilepticus. *J Neurosci* **21**, 2048-2057.
- Doherty, J., Dingledine, R. (2002). The roles of metabotropic glutamate receptors in seizures and epilepsy. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **1**, 251-260.
- Duncan, S. (2007). Teratogenesis of sodium valproate. *Curr Opin Neurol* **20**, 175-180.
- Eichenbaum, H., Otto, T., Cohen, N. J. (1992). The hippocampus--what does it do? *Behav Neural Biol* **57**, 2-36.
- Elger, C. E., Schramm, J. (1993). [The surgical treatment of epilepsy]. *Radiologe* **33**, 165-171.
- Engel, J., Jr. (1996). Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* **26**, 141-150.
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F. et al. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**, 533-535.
- Escayg, A., De Waard, M., Lee, D. D., Bichet, D. et al. (2000). Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet* **66**, 1531-1539.
- Faden, A. I., Ivanova, S. A., Yakovlev, A. G., Mukhin, A. G. (1997). Neuroprotective effects of group III mGluR in traumatic neuronal injury. *J Neurotrauma* **14**, 885-895.
- Faden, A. I., O'Leary, D. M., Fan, L., Bao, W. et al. (2001). Selective blockade of the mGluR1 receptor reduces traumatic neuronal injury in vitro and improves Outcome after brain trauma. *Exp Neurol* **167**, 435-444.
- Falconer, M. A., Taylor, D. C. (1968). Surgical treatment of drug-resistant epilepsy due to mesial temporal sclerosis. Etiology and significance. *Arch Neurol* **19**, 353-361.
- Fernandez, G., Effenberger, O., Vinz, B., Steinlein, O. et al. (1998). Hippocampal malformation as a cause of familial febrile convulsions and subsequent hippocampal sclerosis. *Neurology* **50**, 909-917.
- Fernandez, G., Effern, A., Grunwald, T., Pezer, N. et al. (1999). Real-time tracking of memory formation in the human rhinal cortex and hippocampus. *Science* **285**, 1582-1585.

- Finch, D. M., Nowlin, N. L., Babb, T. L. (1983). Demonstration of axonal projections of neurons in the rat hippocampus and subiculum by intracellular injection of HRP. *Brain Res* **271**, 201-216.
- Fink, L., Seeger, W., Ermert, L., Hanze, J. et al. (1998). Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* **4**, 1329-1333.
- Fiorillo, C. D., Williams, J. T. (1998). Glutamate mediates an inhibitory postsynaptic potential in dopamine neurons. *Nature* **394**, 78-82.
- Fishman, M. C., Spector, I. (1981). Potassium current suppression by quinidine reveals additional calcium currents in neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5245-5249.
- Flor, P. J., Battaglia, G., Nicoletti, F., Gasparini, F. et al. (2002). Neuroprotective activity of metabotropic glutamate receptor ligands. *Adv Exp Med Biol* **513**, 197-223.
- Flor, P. J., Lukic, S., Ruegg, D., Leonhardt, T. et al. (1995). Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of the human metabotropic glutamate receptor type 4. *Neuropharmacology* **34**, 149-155.
- Forsgren, L., Hauser, W. A., Olafsson, E., Sander, J. W. et al. (2005). Mortality of epilepsy in developed countries: a review. *Epilepsia* **46 Suppl 11**, 18-27.
- Fotuhi, M., Standaert, D. G., Testa, C. M., Penney, J. J. et al. (1994). Differential expression of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus and entorhinal cortex of the rat. *Mol Brain Res* **21**, 283-292.
- French, J. A., Williamson, P. D., Thadani, V. M., Darcey, T. M. et al. (1993). Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol* **34**, 774-780.
- Gaarskjaer, F. B. (1978). Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. I. Terminal area related to number of granule and pyramidal cells. *J Comp Neurol* **178**, 49-72.
- Galoyan, S. M., Merlin, L. R. (2000). Long-lasting potentiation of epileptiform bursts by group I mGluRs is NMDA receptor independent. *J Neurophysiol* **83**, 2463-2467.
- Garzon, E., Fernandes, R. M., Sakamoto, A. C. (2003). Analysis of clinical characteristics and risk factors for mortality in human status epilepticus. *Seizure* **12**, 337-345.
- Gasparini, F., Bruno, V., Battaglia, G., Lukic, S. et al. (1999). (R,S)-4-phosphonophenylglycine, a potent and selective group III metabotropic glutamate receptor agonist, is anticonvulsive and neuroprotective in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **289**, 1678-1687.
- Gibbs, J. W., 3rd, Shumate, M. D., Coulter, D. A. (1997). Differential epilepsy-associated alterations in postsynaptic GABA(A) receptor function in dentate granule and CA1 neurons. *J Neurophysiol* **77**, 1924-1938.
- Goodman, J. H. (1998). Experimental models of status epilepticus. Boca Raton: CRC Press. 95-124.
- Green, J. D. (1964). The Hippocampus. *Physiol Rev* **44**, 561-608.
- Gregg, R. G., Messing, A., Strube, C., Beurg, M. et al. (1996). Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13961-13966.
- Guerineau, N. C., Bossu, J. L., Gahwiler, B. H., Gerber, U. (1995). Activation of a nonselective cationic conductance by metabotropic glutamatergic and muscarinic agonists in CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *J Neurosci* **15**, 4395-4407.

- Hall, L., Clarke, K., Trim, C. (2000). Veterinary Anaesthesia. 75-112.
- Hampson, D. R., Theriault, E., Huang, X. P., Kristensen, P. et al. (1994). Characterization of two alternatively spliced forms of a metabotropic glutamate receptor in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* **60**, 325-336.
- Hauser, W. A. (1990). Status epilepticus: epidemiologic considerations. *Neurology* **40**, 9-13.
- Hauser, W. A., Annegers, J. F., Elveback, L. R. (1980). Mortality in patients with epilepsy. *Epilepsia* **21**, 399-412.
- Hauser, W. A., Annegers, J. F., Kurland, L. T. (1993). Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia* **34**, 453-468.
- Heinemann, U., Beck, H., Dreier, J. P., Ficker, E. et al. (1992). The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptiform activity. *Epilepsy Res Suppl* **7**, 273-280.
- Hellier, J. L., Dudek, F. E. (1999). Spontaneous motor seizures of rats with kainate-induced epilepsy: effect of time of day and activity state. *Epilepsy Res* **35**, 47-57.
- Helton, T. D., Horne, W. A. (2002). Alternative splicing of the beta 4 subunit has alpha1 subunit subtype-specific effects on Ca²⁺ channel gating. *J Neurosci* **22**, 1573-1582.
- Henrich-Noack, P., Flor, P. J., Sabelhaus, C. F., Prass, K. et al. (2000). Distinct influence of the group III metabotropic glutamate receptor agonist (R,S)-4-phosphonophenylglycine [(R,S)-PPG] on different forms of neuronal damage. *Neuropharmacology* **39**, 911-917.
- Herman, S. T. (2002). Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis. *Neurology* **59**, S21-26.
- Heron, S. E., Phillips, H. A., Mulley, J. C., Mazarib, A. et al. (2004). Genetic variation of CACNA1H in idiopathic generalized epilepsy. *Ann Neurol* **55**, 595-596.
- Hesdorffer, D. C., Logroscino, G., Cascino, G., Annegers, J. F. et al. (1998). Incidence of status epilepticus in Rochester, Minnesota, 1965-1984. *Neurology* **50**, 735-741.
- Hesdorffer, D. C., Logroscino, G., Cascino, G., Annegers, J. F. et al. (1998). Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: effect of status epilepticus. *Ann Neurol* **44**, 908-912.
- Hicks, T. P., Lodge, D., McLennan, H. (1987). Excitatory Amino Acid Transmission. New York: Alan R. Liss. 1268-1284.
- Hofmann, F., Lacinova, L., Klugbauer, N. (1999). Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **139**, 33-87.
- Hollmann, M., Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* **17**, 31-108.
- Hsu, S. M., Raine, L., Fanger, H. (1981). The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* **75**, 816-821.
- Huguenard, J. R. (1996). Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu Rev Physiol* **58**, 329-348.
- Ikeda, S. R., Lovinger, D. M., McCool, B. A., Lewis, D. L. (1995). Heterologous expression of metabotropic glutamate receptors in adult rat sympathetic neurons: subtype-specific coupling to ion channels. *Neuron* **14**, 1029-1038.
- ILAE (1989). Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* **30**, 389-399.

- ILAE (1993). Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. Commission on Epidemiology and Prognosis, International League Against Epilepsy. *Epilepsia* **34**, 592-596.
- Ireland, D. R., Guevremont, D., Williams, J. M., Abraham, W. C. (2004). Metabotropic glutamate receptor-mediated depression of the slow afterhyperpolarization is gated by tyrosine phosphatases in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **92**, 2811-2819.
- Ishizuka, N., Weber, J., Amaral, D. G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* **295**, 580-623.
- Iversen, L., Mulvihill, E., Haldeman, B., Diemer, N. H. et al. (1994). Changes in metabotropic glutamate receptor mRNA levels following global ischemia: increase of a putative presynaptic subtype (mGluR4) in highly vulnerable rat brain areas. *J Neurochem* **63**, 625-633.
- Jensen, M. S., Azouz, R., Yaari, Y. (1994). Variant firing patterns in rat hippocampal pyramidal cells modulated by extracellular potassium. *J Neurophysiol* **71**, 831-839.
- Jingami, H., Nakanishi, S., Morikawa, K. (2003). Structure of the metabotropic glutamate receptor. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 271-278.
- Johnston, D., Amaral, D. G. (1998). Hippocampus. New York, Oxford: Oxford University Press. 417-458.
- Joksovic, P., Nelson, M., Jevtovic-Todorovic, V., Patel, M. et al. (2006). CaV3.2 is the major molecular substrate for redox regulation of T-type Ca²⁺ channels in the rat and mouse thalamus. *J Physiol* **574**, 415-430
- Juul-Jensen, P., Foldspang, A. (1983). Natural history of epileptic seizures. *Epilepsia* **24**, 297-312.
- Keele, N. B., Neugebauer, V., Shinnick-Gallagher, P. (1999). Differential effects of metabotropic glutamate receptor antagonists on bursting activity in the amygdala. *J Neurophysiol* **81**, 2056-2065.
- Khosravani, H., Altier, C., Simms, B., Hamming, K. S. et al. (2004). Gating effects of mutations in the Cav3.2 T-type calcium channel associated with childhood absence epilepsy. *J Biol Chem* **279**, 9681-9684.
- Kinoshita, A., Ohishi, H., Neki, A., Nomura, S. et al. (1996). Presynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR8, in the rhinencephalic areas: A light and electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett* **207**, 61-64.
- Kinoshita, A., Ohishi, H., Nomura, S., Shigemoto, R. et al. (1996). Presynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR4a, in the cerebellar cortex: A light and electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett* **207**, 199-202.
- Klapstein, G. J., Meldrum, B. S., Mody, I. (1999). Decreased sensitivity to Group III mGluR agonists in the lateral perforant path following kindling. *Neuropharmacology* **38**, 927-933.
- Klitgaard, H., Matagne, A., Vanneste-Goemaere, J., Margineanu, D. G. (2002). Pilocarpine-induced epileptogenesis in the rat: impact of initial duration of status epilepticus on electrophysiological and neuropathological alterations. *Epilepsy Res* **51**, 93-107.
- Knake, S., Rochon, J., Fleischer, S., Katsarou, N. et al. (2006). Status epilepticus after stroke is associated with increased long-term case fatality. *Epilepsia* **47**, 2020-2026.
- Knake, S., Rosenow, F., Vescovi, M., Oertel, W. H. et al. (2001). Incidence of status epilepticus in adults in Germany: a prospective, population-based study. *Epilepsia* **42**, 714-718.

- Knopfel, T., Kuhn, R., Allgeier, H. (1995). Metabotropic glutamate receptors: novel targets for drug development. *J Med Chem* **38**, 1417-1426.
- Koh, J. Y., Palmer, E., Cotman, C. W. (1991). Activation of the metabotropic glutamate receptor attenuates N-methyl-D-aspartate neurotoxicity in cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9431-9435.
- Kohler, C. (1985). A projection from the deep layers of the entorhinal area to the hippocampal formation in the rat brain. *Neurosci Lett* **56**, 13-19.
- Kotewicz, M. L., D'Alessio, J. M., Driftmier, K. M., Blodgett, K. P. et al. (1985). Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* **35**, 249-258.
- Kozlov, A. S., McKenna, F., Lee, J. H., Cribbs, L. L. et al. (1999). Distinct kinetics of cloned T-type Ca²⁺ channels lead to differential Ca²⁺ entry and frequency-dependence during mock action potentials. *Eur J Neurosci* **11**, 4149-4158.
- Kral, T., Clusmann, H., Urbach, J., Schramm, J. et al. (2002). Preoperative evaluation for epilepsy surgery (Bonn Algorithm). *Zentralbl Neurochir* **63**, 106-110.
- Krumholz, A. (1999). Epidemiology and evidence for morbidity of nonconvulsive status epilepticus. *J Clin Neurophysiol* **16**, 314-322; discussion 353.
- Krumholz, A., Sung, G. Y., Fisher, R. S., Barry, E. et al. (1995). Complex partial status epilepticus accompanied by serious morbidity and mortality. *Neurology* **45**, 1499-1504.
- Laurie, D. J., Boddeke, H. W., Hiltcher, R., Sommer, B. (1996). HmGlu1d, a novel splice variant of the human type I metabotropic glutamate receptor. *Eur J Pharmacol* **296**, R1-R3.
- Lavados, J., Germain, L., Morales, A., Campero, M. et al. (1992). A descriptive study of epilepsy in the district of El Salvador, Chile, 1984-1988. *Acta Neurol Scand* **85**, 249-256.
- Lee, J. H., Gomora, J. C., Cribbs, L. L., Perez-Reyes, E. (1999). Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys J* **77**, 3034-3042.
- Leite, J. P., Cavalheiro, E. A. (1995). Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. *Epilepsy Res* **20**, 93-104.
- Lemos, T., Cavalheiro, E. A. (1995). Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Exp Brain Res* **102**, 423-428.
- Leppik, I. E. (1992). Intractable epilepsy in adults. *Epilepsy Res Suppl* **5**, 7-11.
- Leppik, I. E. (1992). Metabolism of antiepileptic medication: newborn to elderly. *Epilepsia* **33 Suppl 4**, S32-40.
- Leppik, I. E. (2001). Issues in the treatment of epilepsy. *Epilepsia* **42 Suppl 4**, 1-6.
- Liang, J., Zhang, Y., Wang, J., Pan, H. et al. (2006). New variants in the CACNA1H gene identified in childhood absence epilepsy. *Neurosci Lett* **406**, 27-32.
- Lie, A. A., Becker, A., Behle, K., Beck, H. et al. (2000). Up-regulation of the metabotropic glutamate receptor mGluR4 in hippocampal neurons with reduced seizure vulnerability. *Ann Neurol* **47**, 26-35.
- Lin, H. C., Wang, S. J., Luo, M. Z., Gean, P. W. (2000). Activation of group II metabotropic glutamate receptors induces long-term depression of synaptic transmission in the rat amygdala. *J Neurosci* **20**, 9017-9024.

- Linden, A. M., Johnson, B. G., Peters, S. C., Shannon, H. E. et al. (2002). Increased anxiety-related behavior in mice deficient for metabotropic glutamate 8 (mGlu8) receptor. *Neuropharmacology* **43**, 251-259.
- Logroscino, G., Hesdorffer, D. C., Cascino, G., Hauser, W. A. et al. (2005). Mortality after a first episode of status epilepticus in the United States and Europe. *Epilepsia* **46 Suppl 11**, 46-48.
- Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* **46**, 113-177.
- Löscher, C., Schwartz-Porsche, D., Frey, H. H., Schmidt, D. (1985). Evaluation of epileptic dogs as an animal model of human epilepsy. *Arzneim.-Forsch.* **35**, 82-87.
- Löscher, W. (1994). Neue Antiepileptika - ein Fortschritt für die Behandlung epileptischer Tiere? *Kleintierpraxis* **2**, 325-342.
- Löscher, W. (1999). Animal models of epilepsy and epileptic seizures. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 19-62.
- Löscher, W., Schmidt, D. (1988). Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res* **2**, 145-181.
- Lothman, E. (1990). The biochemical basis and pathophysiology of status epilepticus. *Neurology* **40**, 13-23.
- Lothman, E. W. (1994). Seizure circuits in the hippocampus and associated structures. *Hippocampus* **4**, 286-290.
- Lothman, E. W., Rempe, D. A., Mangan, P. S. (1995). Changes in excitatory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol* **74**, 841-848.
- Lothman, E. W., Stringer, J. L., Bertram, E. H. (1992). The dentate gyrus as a control point for seizures in the hippocampus and beyond. *Epilepsy Res Suppl* **7**, 301-313.
- Lowenstein, D. H., Alldredge, B. K. (1998). Status epilepticus. *N Engl J Med* **338**, 970-976.
- Lowenstein, D. H., Bleck, T., Macdonald, R. L. (1999). It's time to revise the definition of status epilepticus. *Epilepsia* **40**, 120-122.
- Lujan, R., Nusser, Z., Roberts, J., Shigemoto, R. et al. (1996). Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **8**, 1488-1500.
- Lyeth, B. G., Gong, Q. Z., Shields, S., Muizelaar, J. P. et al. (2001). Group I metabotropic glutamate antagonist reduces acute neuronal degeneration and behavioral deficits after traumatic brain injury in rats. *Exp Neurol* **169**, 191-199.
- MacVicar, B. A., Dudek, F. E. (1980). Local synaptic circuits in rat hippocampus: interactions between pyramidal cells. *Brain Res* **184**, 220-223.
- Magloczky, Z., Freund, T. F. (1995). Delayed cell death in the contralateral hippocampus following kainate injection into the CA3 subfield. *Neuroscience* **66**, 847-860.
- Makoff, A., Lelchuk, R., Oxer, M., Harrington, K. et al. (1996). Molecular characterization and localization of human metabotropic glutamate receptor type 4. *Mol Brain Res* **37**, 239-248.
- Margerison, J. H., Corsellis, J. A. (1966). Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain* **89**, 499-530.
- Martin, L. J., Blackstone, C. D., Haganir, R. L., Price, D. L. (1992). Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron* **9**, 259-270.

- Masugi, M., Yokoi, M., Shigemoto, R., Muguruma, K. et al. (1999). Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response and conditioned taste aversion. *J Neurosci* **19**, 955-963.
- Mateos, J. M., Azkue, J., Sarria, R., Kuhn, R. et al. (1998). Localization of the mGlu4a metabotropic glutamate receptor in rat cerebellar cortex. *Histochem Cell Biol* **109**, 135-139.
- Mathern, G. W., Babb, T. L., Vickrey, B. G., Melendez, M. et al. (1995). The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain* **118**, 105-118.
- Mathern, G. W., Pretorius, J. K., Babb, T. L. (1995). Influence of the type of initial precipitating injury and at what age it occurs on course and outcome in patients with temporal lobe seizures. *J Neurosurg* **82**, 220-227.
- Mathern, G. W., Pretorius, J. K., Babb, T. L. (1995). Quantified patterns of mossy fiber sprouting and neuron densities in hippocampal and lesional seizures. *J Neurosurg* **82**, 211-219.
- Maytal, J., Shinnar, S., Moshe, S. L., Alvarez, L. A. (1989). Low morbidity and mortality of status epilepticus in children. *Pediatrics* **83**, 323-331.
- Mazarati, A., Bragin, A., Baldwin, R., Shin, D. et al. (2002). Epileptogenesis after self-sustaining status epilepticus. *Epilepsia* **43 Suppl 5**, 74-80.
- McDonald, J. W., Fix, A. S., Tizzano, J. P., Schoepp, D. D. (1993). Seizures and brain injury in neonatal rats induced by 1S,3R-ACPD, a metabotropic glutamate receptor agonist. *J Neurosci* **13**, 4445-4455.
- McNamara, J. O. (1999). Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* **399**, A15-22.
- Meldrum, B. (1991). Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res* **10**, 55-61.
- Meldrum, B. S. (1997). Epileptic brain damage: a consequence and a cause of seizures. *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**, 185-202.
- Meldrum, B. S. (1999). The revised operational definition of generalised tonic-clonic (TC) status epilepticus in adults. *Epilepsia* **40**, 123-124.
- Mello, L. E., Cavalheiro, E. A., Tan, A. M., Kupfer, W. R. et al. (1993). Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* **34**, 985-995.
- Mello, L. E., Covolan, L. (1996). Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the pilocarpine model of chronic spontaneous seizures. *Epilepsy Res* **26**, 123-129.
- Mennerick, S., Zorumski, C. F. (2005). Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons.
- Merlin, L. R. (1999). Group I mGluR-mediated silent induction of long-lasting epileptiform discharges. *J Neurophysiol* **82**, 1078-1081.
- Merlin, L. R. (2002). Differential roles for mGluR1 and mGluR5 in the persistent prolongation of epileptiform bursts. *J Neurophysiol* **87**, 621-625.
- Merlin, L. R., Wong, R. K. (1997). Role of group I metabotropic glutamate receptors in the patterning of epileptiform activities in vitro. *J Neurophysiol* **78**, 539-544.
- Miles, R., Wong, R. K. (1986). Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol* **373**, 397-418.
- Mineff, E., Valtschanoff, J. (1999). Metabotropic glutamate receptors 2 and 3 expressed by astrocytes in rat ventrobasal thalamus. *Neurosci Lett* **270**, 95-98.

- Miura, M., Watanabe, M., Offermanns, S., Simon, M. I. et al. (2002). Group I metabotropic glutamate receptor signaling via Galpha q/Galpha 11 secures the induction of long-term potentiation in the hippocampal area CA1. *J Neurosci* **22**, 8379-8390.
- Monaghan, D. T., Bridges, R. J., Cotman, C. W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **29**, 365-402.
- Moolenaar, W. H., Spector, I. (1978). Ionic currents in cultured mouse neuroblastoma cells under voltage-clamp conditions. *J Physiol* **278**, 265-286.
- Morimoto, K., Fahnstock, M., Racine, R. J. (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* **73**, 1-60.
- Mumford, H., Wetherell, J. R. (2001). A simple method for measuring EEG in freely moving guinea pigs. *J Neurosci Methods* **107**, 125-130.
- Nakanishi, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* **258**, 597-603.
- Nakanishi, S. (1994). Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* **13**, 1031-1037.
- Nakanishi, S., Nakajima, Y., Masu, M., Ueda, Y. et al. (1998). Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev* **26**, 230-235.
- Nedivi, E., Hevroni, D., Naot, D., Israeli, D. et al. (1993). Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning. *Nature* **363**, 718-722.
- Nicoletti, F., Bruno, V., Catania, M. V., Battaglia, G. et al. (1999). Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection. *Neuropharmacology* **38**, 1477-1484.
- Nicoletti, F., Bruno, V., Copani, A., Casabona, G. et al. (1996). Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci* **19**, 267-271.
- Nicoletti, F., Wroblewski, J. T., Alho, H., Eva, C. et al. (1987). Lesions of putative glutamatergic pathways potentiate the increase of inositol phospholipid hydrolysis elicited by excitatory amino acids. *Brain Res* **436**, 103-112.
- Nissinen, J., Halonen, T., Koivisto, E., Pitkanen, A. (2000). A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat. *Epilepsy Res* **38**, 177-205.
- Notenboom, R. G., Hampson, D. R., Jansen, G. H., van Rijen, P. C. et al. (2006). Up-regulation of hippocampal metabotropic glutamate receptor 5 in temporal lobe epilepsy patients. *Brain* **129**, 96-107.
- Nowycky, M. C., Fox, A. P., Tsien, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**, 440-443.
- Ohishi, H., Akazawa, C., Shigemoto, R., Nakanishi, S. et al. (1995). Distributions of the mRNAs for L-2-amino-4-phosphonobutyrate-sensitive metabotropic glutamate receptors, mGluR4 and mGluR7, in the rat brain. *J Comp Neurol* **360**, 555-570.
- Ohishi, H., Shigemoto, R., Nakanishi, S., Mizuno, N. (1993). Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR3) in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* **335**, 252-266.
- Olafsson, E., Hauser, W. A., Ludvigsson, P., Gudmundsson, G. (1996). Incidence of epilepsy in rural Iceland: a population-based study. *Epilepsia* **37**, 951-955.

- Olney, J. W., deGubareff, T., Sloviter, R. S. (1983). "Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. II. Ultrastructural analysis of acute hippocampal pathology. *Brain Res Bull* **10**, 699-712.
- Packard, M. G., Vecchioli, S. F., Schroeder, J. P., Gasbarri, A. (2001). Task-dependent role for dorsal striatum metabotropic glutamate receptors in memory. *Learn Mem* **8**, 96-103.
- Paxinos, G., Franklin, K. (2004). *The Mouse Brain*.
- Pekhletski, R., Gerlai, R., Overstreet, L. S., Huang, X. P. et al. (1996). Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J Neurosci* **16**, 6364-6373.
- Pellegrini-Giampietro, D. E. (2003). The distinct role of mGlu1 receptors in post-ischemic neuronal death. *Trends Pharmacol Sci* **24**, 461-470.
- Peloquin, J. B., Khosravani, H., Barr, W., Bladen, C. et al. (2006). Functional Analysis of Ca_v3.2 T-type Calcium Channel Mutations Linked to Childhood Absence Epilepsy. *Epilepsia* **47**, 655-658.
- Perez-Reyes, E. (1999). Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family. *Cell Mol Life Sci* **56**, 660-669.
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* **83**, 117-161.
- Persinger, M. A., Bureau, Y. R., Kostakos, M., Peredery, O. et al. (1993). Behaviors of rats with insidious, multifocal brain damage induced by seizures following single peripheral injections of lithium and pilocarpine. *Physiol Behav* **53**, 849-866.
- Petralia, R. S., Wang, Y. X., Niedzielski, A. S., Wenthold, R. J. (1996). The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience* **71**, 949-976.
- Pin, J. P., Acher, F. (2002). The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **1**, 297-317.
- Pin, J. P., Duvoisin, R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* **34**, 1-26.
- Pitsch, J., Schoch, S., Gueler, N., Flor, P. J. et al. (2007). Functional role of mGluR1 and mGluR4 in pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* **26**, 623-633.
- Poli, A., Beraudi, A., Villani, L., Storto, M. et al. (2003). Group II metabotropic glutamate receptors regulate the vulnerability to hypoxic brain damage. *J Neurosci* **23**, 6023-6029.
- Prats, J. M., Garaizar, C. (1999). [Etiology of epilepsy in adolescents]. *Rev Neurol* **28**, 32-35.
- Racine, R. J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **32**, 281-294.
- Radpour, S., Thomson, A. M. (1991). Coactivation of Local Circuit NMDA Receptor Mediated epsps Induces Lasting Enhancement of Minimal Schaffer Collateral epsps in Slices of Rat Hippocampus. *Eur J Neurosci* **3**, 602-613.
- Ramos Lizana, J., Cassinello Garcia, E., Carrasco Marina, L. L., Vazquez Lopez, M. et al. (2000). Seizure recurrence after a first unprovoked seizure in childhood: a prospective study. *Epilepsia* **41**, 1005-1013.
- Raymond, C., Walker, D., Bichet, D., Iborra, C. et al. (1999). Antibodies against the beta subunit of voltage-dependent calcium channels in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neuroscience* **90**, 269-277.

- Raymond, C. R., Thompson, V. L., Tate, W. P., Abraham, W. C. (2000). Metabotropic glutamate receptors trigger homosynaptic protein synthesis to prolong long-term potentiation. *J Neurosci* **20**, 969-976.
- Rector, E., Otto, K., Kietzmann, M., Nolte, I. et al. (1996). [Pharmacokinetics and effects of xylazine (Rompun) in dogs]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **109**, 18-22.
- Roberts, P. J., Storm-Mathisen, J., Johnston, G. A. R. (1981). Glutamate Transmission in the Central Nervous System. Chichester: John Wiley & Sons.
- Rocca, W. A., Sharbrough, F. W., Hauser, W. A., Annegers, J. F. et al. (1987). Risk factors for generalized tonic-clonic seizures: a population-based case-control study in Rochester, Minnesota. *Neurology* **37**, 1315-1322.
- Rosdahl, D., Seitzberg, D. A., Christensen, T., Balchen, T. et al. (1994). Changes in mRNA for metabotropic glutamate receptors after transient cerebral ischaemia. *Neuroreport* **5**, 593-596.
- Rutecki, P. A., Yang, Y. (1997). Metabotropic glutamate receptor activation modulates epileptiform activity in the hippocampus. *Neuroscience* **81**, 927-935.
- Saarela, J., Schoenberg Fejzo, M., Chen, D., Finnila, S. et al. (2002). Fine mapping of a multiple sclerosis locus to 2.5 Mb on chromosome 17q22-q24. *Hum Mol Genet* **11**, 2257-2267.
- Sacaan, A. I., Schoepp, D. D. (1992). Activation of hippocampal metabotropic excitatory amino acid receptors leads to seizures and neuronal damage. *Neurosci Lett* **139**, 77-82.
- Sahara, Y., Westbrook, G. L. (1993). Modulation of calcium currents by a metabotropic glutamate receptor involves fast and slow kinetic components in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **13**, 3041-3050.
- Samren, E. B., van Duijn, C. M., Koch, S., Hiilesmaa, V. K. et al. (1997). Maternal use of antiepileptic drugs and the risk of major congenital malformations: a joint European prospective study of human teratogenesis associated with maternal epilepsy. *Epilepsia* **38**, 981-990.
- Sanabria, E. R., Su, H., Yaari, Y. (2001). Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol* **532**, 205-216.
- Sander, J. W. (1993). Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia* **34**, 1007-1016.
- Sander, J. W. (2003). The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol* **16**, 165-170.
- Sansig, G., Bushell, T. J., Clarke, V. R., Rozov, A. et al. (2001). Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7. *J Neurosci* **21**, 8734-8745.
- Santiago, J. F., Carvalho, F. F., Perosa, S. R., Siliano, M. R. et al. (2006). Effect of glycemic state in rats submitted to status epilepticus during development. *Arq Neuropsiquiatr* **64**, 233-239.
- Satin, J., Cribbs, L. L. (2000). Identification of a T-type Ca(2+) channel isoform in murine atrial myocytes (AT-1 cells). *Circ Res* **86**, 636-642.
- Saukkonen, A., Kalviainen, R., Partanen, K., Vainio, P. et al. (1994). Do seizures cause neuronal damage? A MRI study in newly diagnosed and chronic epilepsy. *Neuroreport* **6**, 219-223.
- Savolainen, K., Hirvonen, M. R., Naarala, J. (1994). Phosphoinositide second messengers in cholinergic excitotoxicity. *Neurotoxicology* **15**, 493-502.

- Sayin, U., Rutecki, P. A. (2003). Group I metabotropic glutamate receptor activation produces prolonged epileptiform neuronal synchronization and alters evoked population responses in the hippocampus. *Epilepsy Res* **53**, 186-195.
- Scheffler, B., Faissner, A., Beck, H., Behle, K. et al. (1997). Hippocampal loss of tenascin boundaries in Ammon's horn sclerosis. *Glia* **19**, 35-46.
- Schmidt, D. (1984). Prognosis of chronic epilepsy with complex partial seizures. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **47**, 1274-1278.
- Schmidt, D. (1986). Diagnostics and therapeutic management of intractable epilepsy. New York: Raven Press.
- Schmidt, D., Löscher, W. (2005). Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia* **46**, 858-877.
- Schoepp, D. D. (2001). Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 12-20.
- Shepherd, S. M. (1994). Management of status epilepticus. *Emerg Med Clin North Am* **12**, 941-961.
- Shibley, H., Smith, B. N. (2002). Pilocarpine-induced status epilepticus results in mossy fiber sprouting and spontaneous seizures in C57BL/6 and CD-1 mice. *Epilepsy Res* **49**, 109-120.
- Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S. et al. (1997). Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci* **17**, 7503-7522.
- Shigemoto, R., Kulik, A., Roberts, J., Ohishi, H. et al. (1996). Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* **381**, 523-525.
- Shigemoto, R., Nakanishi, S., Mizuno, N. (1992). Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an in situ hybridization study in adult and developing rat. *J Comp Neurol* **322**, 121-135.
- Shin, H. S., Lee, J., Song, I. (2006). Genetic studies on the role of T-type Ca²⁺ channels in sleep and absence epilepsy. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **5**, 629-638.
- Shinnar, S., Berg, A. T., Moshe, S. L., Shinnar, R. (2001). How long do new-onset seizures in children last? *Ann Neurol* **49**, 659-664.
- Shinnar, S., Pellock, J. M. (2002). Update on the epidemiology and prognosis of pediatric epilepsy. *J Child Neurol* **17**, 4-17.
- Shneker, B. F., Fountain, N. B. (2003). Assessment of acute morbidity and mortality in nonconvulsive status epilepticus. *Neurology* **61**, 1066-1073.
- Shorvon, S. D., Reynolds, E. H. (1982). Early prognosis of epilepsy. *Br Med J (Clin Res Ed)* **285**, 1699-1701.
- Silva, J. G., Mello, L. E. (2000). The role of mossy cell death and activation of protein synthesis in the sprouting of dentate mossy fibers: evidence from calretinin and neo-timm staining in pilocarpine-epileptic mice. *Epilepsia* **41 Suppl 6**, S18-23.
- Sirven, J. I. (2002). Classifying seizures and epilepsy: a synopsis. *Semin Neurol* **22**, 237-246.
- Sirven, J. I., Waterhouse, E. (2003). Management of status epilepticus. *Am Fam Physician* **68**, 469-476.
- Sloviter, R. S. (1999). Status epilepticus-induced neuronal injury and network reorganization. *Epilepsia* **40 Suppl 1**, S34-39; discussion S40-31.

- Snead, O. C., 3rd, Banerjee, P. K., Burnham, M., Hampson, D. (2000). Modulation of absence seizures by the GABA(A) receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J Neurosci* **20**, 6218-6224.
- Snyder, E. M., Philpot, B. D., Huber, K. M., Dong, X. et al. (2001). Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nat Neurosci* **4**, 1079-1085.
- Sokolov, S., Weiss, R. G., Timin, E. N., Hering, S. (2000). Modulation of slow inactivation in class A Ca²⁺ channels by beta-subunits. *J Physiol* **527 Pt 3**, 445-454.
- Sommer, B., Seeburg, P. H. (1992). Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends Pharmacol Sci* **13**, 291-296.
- Sommer, W. (1880). Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches Moment der Epilepsie. *Arch.Psychiatr.Nervenkr.* **10**, 631-675.
- Spencer, S. S., Spencer, D. D., Williamson, P. D., Mattson, R. (1990). Combined depth and subdural electrode investigation in uncontrolled epilepsy. *Neurology* **40**, 74-79.
- Spigelman, I., Yan, X. X., Obenaus, A., Lee, E. Y. et al. (1998). Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **86**, 109-120.
- Stauder, K. H. (1938). Epilepsie und Schläfenlappen. *Arch.Psychiatr.Nervenkr.* **104**, 181-211.
- Stewart, L. S., Leung, L. S., Persinger, M. A. (2001). Diurnal variation in pilocarpine-induced generalized tonic-clonic seizure activity. *Epilepsy Res* **44**, 207-212.
- Stoop, R., Conquet, F., Pralong, E. (2003). Determination of group I metabotropic glutamate receptor subtypes involved in the frequency of epileptiform activity in vitro using mGluR1 and mGluR5 mutant mice. *Neuropharmacology* **44**, 157-162.
- Stoop, R., Conquet, F., Zuber, B., Voronin, L. L. et al. (2003). Activation of metabotropic glutamate 5 and NMDA receptors underlies the induction of persistent bursting and associated long-lasting changes in CA3 recurrent connections. *J Neurosci* **23**, 5634-5644.
- Storm-Mathisen, J. (1977). Localization of transmitter candidates in the brain: the hippocampal formation as a model. *Prog Neurobiol* **8**, 119-181.
- Su, H., Sochivko, D., Becker, A., Chen, J. et al. (2002). Upregulation of a T-type Ca²⁺ channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. *J Neurosci* **22**, 3645-3655.
- Swanson, C. J., Bures, M., Johnson, M. P., Linden, A. M. et al. (2005). Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 131-144.
- Swartz, K. J., Bean, B. P. (1992). Inhibition of calcium channels in rat CA3 pyramidal neurons by a metabotropic glutamate receptor. *J Neurosci* **12**, 4358-4371.
- Tanabe, Y., Nomura, A., Masu, M., Shigemoto, R. et al. (1993). Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J Neurosci* **13**, 1372-1378.
- Tang, F. R., Lee, W. L. (2001). Expression of the group II and III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurocytol* **30**, 137-143.
- Tang, F. R., Lee, W. L., Yang, J., Sim, M. K. et al. (2001). Expression of metabotropic glutamate receptor 1alpha in the hippocampus of rat pilocarpine model of status epilepticus. *Epilepsy Res* **46**, 179-189.

- Tang, F. R., Lee, W. L., Yeo, T. T. (2001). Expression of the group I metabotropic glutamate receptor in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurocytol* **30**, 403-411.
- Taylor, G. W., Merlin, L. R., Wong, R. K. (1995). Synchronized oscillations in hippocampal CA3 neurons induced by metabotropic glutamate receptor activation. *J Neurosci* **15**, 8039-8052.
- Testa, C. M., Standaert, D. G., Young, A. B., Penney, J. J. (1994). Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in the basal ganglia of the rat. *J Neurosci* **14**, 3005-3018
- Theodore, W. H., Porter, R. J., Albert, P., Kelley, K. et al. (1994). The secondarily generalized tonic-clonic seizure: a videotape analysis. *Neurology* **44**, 1403-1407.
- Thomsen, C., Dalby, N. O. (1998). Roles of metabotropic glutamate receptor subtypes in modulation of pentylenetetrazole-induced seizure activity in mice. *Neuropharmacology* **37**, 1465-1473.
- Thomsen, C., Pekhletski, R., Haldeman, B., Gilbert, T. A. et al. (1997). Cloning and characterization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR4b. *Neuropharmacology* **36**, 21-30.
- Timm, F. (1958). Zur Histochemie der Schwermetalle, Das Sulfid-Silberverfahren. *Dtsch.Z. ges. gerichtl. Med.* **46**, 706-711.
- Tizzano, J. P., Griffey, K. I., Schoepp, D. D. (1995). Induction or protection of limbic seizures in mice by mGluR subtype selective agonists. *Neuropharmacology* **34**, 1063-1067.
- Traub, R. D., Miles, R. (1991). *Neuronal Networks of the Hippocampus*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Trombley, P. Q., Westbrook, G. L. (1992). L-AP4 inhibits calcium currents and synaptic transmission via a G-protein-coupled glutamate receptor. *J Neurosci* **12**, 2043-2050.
- Turner, D. A., Wheal, H. V. (1991). Excitatory synaptic potentials in kainic acid-denervated rat CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **11**, 2786-2794.
- Turski, L., Ikonomidou, C., Turski, W. A., Bortolotto, Z. A. et al. (1989). Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse* **3**, 154-171.
- Turski, W. A., Cavalheiro, E. A., Bortolotto, Z. A., Mello, L. M. et al. (1984). Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. *Brain Res* **321**, 237-253.
- Turski, W. A., Cavalheiro, E. A., Schwarz, M., Czuczwar, S. J. et al. (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* **9**, 315-335.
- Turski, W. A., Czuczwar, S. J., Kleinrok, Z., Turski, L. (1983). Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia* **39**, 1408-1411.
- Van Roost, D., Solymosi, L., Schramm, J., van Oosterwyck, B. et al. (1998). Depth electrode implantation in the length axis of the hippocampus for the presurgical evaluation of medial temporal lobe epilepsy: a computed tomography-based stereotactic insertion technique and its accuracy. *Neurosurgery* **43**, 819-826.
- Verity, C. M., Ross, E. M., Golding, J. (1993). Outcome of childhood status epilepticus and lengthy febrile convulsions: findings of national cohort study. *Bmj* **307**, 225-228.
- Vignatelli, L., Tonon, C., D'Alessandro, R. (2003). Incidence and short-term prognosis of status epilepticus in adults in Bologna, Italy. *Epilepsia* **44**, 964-968.

- Volk, L. J., Daly, C. A., Huber, K. M. (2006). Differential roles for group 1 mGluR subtypes in induction and expression of chemically induced hippocampal long-term depression. *J Neurophysiol* **95**, 2427-2438.
- Wasterlain, C. G., Fujikawa, D. G., Penix, L., Sankar, R. (1993). Pathophysiological mechanisms of brain damage from status epilepticus. *Epilepsia* **34 Suppl 1**, S37-53.
- Wasterlain, C. G., Jonec, V. (1983). Chemical kindling by muscarinic amygdaloid stimulation in the rat. *Brain Res* **271**, 311-323.
- Weiergraber, M., Henry, M., Hescheler, J., Smyth, N. et al. (2005). Electrocorticographic and deep intracerebral EEG recording in mice using a telemetry system. *Brain Res Brain Res Protoc* **14**, 154-164.
- Wiebe, S. (2004). Effectiveness and Safety of Epilepsy Surgery: What is the Evidence? *CNS Spectr* **9**, 120-122.
- Williamson, P. D., French, J. A., Thadani, V. M., Kim, J. H. et al. (1993). Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: II. Interictal and ictal scalp electroencephalography, neuropsychological testing, neuroimaging, surgical results, and pathology. *Ann Neurol* **34**, 781-787.
- Winokur, R. S., Kubal, T., Liu, D., Davis, S. F. et al. (2004). Recurrent excitation in the dentate gyrus of a murine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* **58**, 93-105.
- Witter, M. P. (1993). Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus* **3**, 33-44.
- Wong, C. G., Scherer, S. W., Snead, O. C., 3rd, Hampson, D. R. (2001). Localization of the human mGluR4 gene within an epilepsy susceptibility locus(1). *Brain Res Mol Brain Res* **87**, 109-116.
- Wong, R. K., Bianchi, R., Taylor, G. W., Merlin, L. R. (1999). Role of metabotropic glutamate receptors in epilepsy. *Adv Neurol* **79**, 685-698.
- Wong, R. K., Chuang, S. C., Bianchi, R. (2004). Plasticity mechanisms underlying mGluR-induced epileptogenesis. *Adv Exp Med Biol* **548**, 69-75.
- Yaari, Y., Beck, H. (2002). "Epileptic neurons" in temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* **12**, 234-239.
- Yip, P. K., Meldrum, B. S., Rattray, M. (2001). Elevated levels of group-III metabotropic glutamate receptors in the inferior colliculus of genetically epilepsy-prone rats following intracollicular administration of L-serine-O-phosphate. *J Neurochem* **78**, 13-23.
- Zentner, J., Hufnagel, A., Wolf, H. K., Ostertun, B. et al. (1995). Surgical treatment of temporal lobe epilepsy: clinical, radiological, and histopathological findings in 178 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **58**, 666-673.
- Zhu, H., Ryan, K., Chen, S. (1999). Cloning of novel splice variants of mouse mGluR1. *Brain Res Mol Brain Res* **73**, 93-103.

11 ANHANG

11.1 Publikationen

Schulte, J. H., Pitsch, J. & Becker, A. J. (2004). Functional genomics and target gene validation in experimental and human disease. *Drug Discovery Today: Technologies* **1**, 105-111.

Chen, J., Larionov, S., Pitsch, J., Hoerold, N., Ullmann, C., Elger, C. E., Schramm, J. & Becker, A. J. (2005). Expression analysis of metabotropic glutamate receptors I and III in mouse strains with different susceptibility to experimental temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett* **375**, 192-197.

Pitsch, J., Schoch, S., Gueler, N., Flor, P. J., van der Putten, H. & Becker, A. J. (2007). Functional role of mGluR1 and mGluR4 in pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* **26**, 623-633.

Eckhardt, M., Hedayati, K. K., Pitsch, J., Lullmann-Rauch, R., Beck, H., Fewou, S. N. & Gieselmann, V. (2007). Sulfatide storage in neurons causes hyperexcitability and axonal degeneration in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *J Neurosci* **27**, 9009-9021.

11.2 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt *Herrn Prof. Dr. Albert Becker* für die Ermöglichung dieser Arbeit, die Überlassung des Themas sowie für die überaus freundliche und engagierte Betreuung und Unterstützung in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit. Insbesondere bedanke ich mich auch für die finanzielle Unterstützung, die die Erstellung dieser Arbeit erst ermöglicht hat.

Herrn Prof. Dr. Joachim Roth, Institut für Veterinär-Physiologie an der Universität Gießen, danke ich für die freundliche und unkomplizierte Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin und für die Begutachtung dieser Dissertation.

Frau Dr. Schoch-McGovern danke ich ganz besonders für die freundliche Betreuung, die jederzeit gewährte Unterstützung und Hilfe sowie ihre Diskussionsbereitschaft und die vielen konstruktiven Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Heinz Beck und *Herrn Prof. Dr. Dirk Dietrich* danke ich für ihre anregenden Diskussionen und die vielen konstruktiven Ratschläge.

Sabine Normann für die Einweisung in experimentelle Methoden und die ständige Hilfsbereitschaft in allen Phasen der Arbeit.

Michel Bauer danke ich für die stets gewährte Hilfsbereitschaft und die Beantwortung unzähliger Fragen, für die große Hilfe bei vielen, vielen Versuchen, die so manchen trüben Versuchstag etwas freundlicher gemacht hat.

Matt Staniek danke ich für die erfolgreiche „physikalische“ Berechnung der FFT-Analysen.

Den *Arbeitsgruppen Becker, Schoch* und *Beck* danke ich für die wunderbare Zeit in Bonn und die effektive und überaus bereichernde Zusammenarbeit. Speziell meiner Kollegin *Jana Fassunke* danke ich für das ständig offene Ohr und den anhaltenden Nachschub an Süßigkeiten. Und *Tobi Mittelstaedt* für die „Rund-um-die-Uhr-Betreuung“ bei allen Computerfragen. *Natalie Hörold, Margit Reitze* und *Esther Stüttgen* danke ich für die professionelle fachliche Hilfe bei der Durchführung von Versuchen und Färbungen.

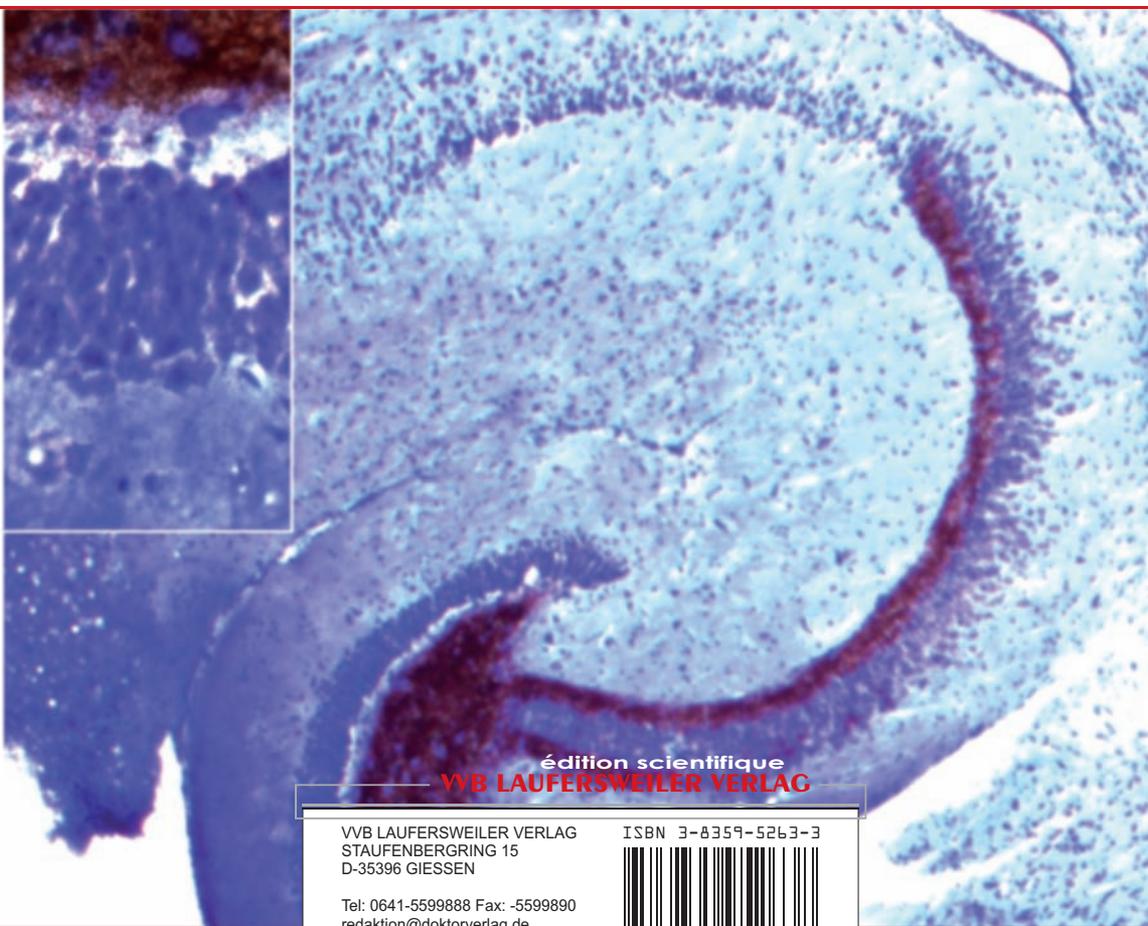
Außerdem danke ich *Sylke* und *Dr. Peter Linger* dafür, dass sie mir ständig mit Rat und Tat zu Hilfe eilten und mir dadurch Kraft gaben. Meiner Schwiegermutter *Sonja Pitsch* für die professionelle Korrektur dieses Manuskripts.

Danken möchte ich von Herzen auch meiner Mutter und meinen Großeltern Gerd und Irma, die mich während meiner gesamten Ausbildung stets bedingungslos unterstützt haben und mir in jeder Hinsicht fürsorglich zur Seite standen.

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank Henning, der mich in den letzten Jahren in allen Lebenslagen liebevoll unterstützt hat.

11.3 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlicher Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5263-3



9 783835 952638

