Funktionelle und molekulare Charakterisierung von hyperpolarisations-aktivierten Kationenströmen im humanen epileptogenen Neokortex

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Stephan Wierschke

aus Brandenburg an der Havel

2011

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom 12.02.2007 bis 30.03.2011 am Institut für Zell- und Neurobiologie (Charité Universitätsmedizin Berlin) unter der Betreuung von Herrn PD Dr. Dr. habil R. A. Deisz angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Dr. habil R. A. Deisz (Charité Berlin)
2. Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Pflüger (Freie Universität Berlin)

Disputation am: 21.10.2011

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen 8

1. Einleitung 10

1.1 Epilepsien 10

1.1.1 Grundlagen 10

1.1.2 Therapeutische Strategien 11

1.1.3 Pathophysiologische Mechanismen fokaler Epilepsien 12

1.2 Spannungsgesteuerte Ionenkanäle in zentralen Neuronen 13

1.2.1 Aufbau der HCN-Kanäle 14

1.2.2 Molekularbiologie der HCN-Kanäle 16

1.2.3 Physiologische Funktionen des I_h 16

1.2.4 I_h und Epilepsie 18

1.3 Zielsetzung der Dissertation 20

2. Material und Methoden 22

2.1 Lösungen und Substanzen 22

2.1.1 Lösungen für Gewebetransport und elektrophysiologische Messungen 22

2.1.2 Lösungen für molekulare Untersuchungen 23

2.2 Humane Gewebe 23

2.2.1 Epilepsiechirurgische Resektate 23

2.2.2 Autopsiegewebe 25

2.3 Rattengewebe 25

2.4 Patch-clamp Ableitungen 25

2.5 Auswertung der Patch-clamp Daten 26

2.6 Reverse Transkription und quantitative PCR (RT-qPCR) 28

2.6.1 Extraktion von RNA 28

2.6.2 Reverse Transkription 29

2.6.3 Quantitative real-time PCR 30

2.6.4 Auswertung der RT-qPCR-Daten ... 31

2.6 Immunoblotting ... 32

2.6.1 Extraktion von Membranprotein ... 32

2.6.2 Gelelektrophorese und Immunoblotting ... 33

2.7 Histochemische Darstellung Biocytin-markierter Neurone ... 34

3. Ergebnisse ... 35

3.1 Funktionelle Charakterisierung des I_h ... 35

3.1.1 Morphologie und intrinsische Eigenschaften neokortikaler Neurone ... 35

3.1.2 Quantifizierung hyperpolarisations-aktivierter Ströme ... 38

3.1.3 Pharmakologische Charakterisierung ... 42

3.1.4 Biophysikalische Eigenschaften des I_h ... 45

3.1.4.1 Spannungsabhängigkeit ... 45

3.1.4.2 Umkehrpotential ... 46

3.1.5 Einflüsse auf die temporale Summation postsynaptischer Potentiale ... 47

3.1.6 Korrelation mit den klinischen Daten ... 49

3.2 Expression von HCN-Kanal-Untereinheiten ... 49

3.2.1 Evaluation von Referenzgenen in TLE Geweben ... 49

3.2.1.1 Deskriptive Statistik der Genexpressions-Daten ... 50

3.2.1.2 Validierung der Referenzgene mit dem geNorm-Algorithmus ... 52

3.2.1.3 Validierung der Referenzgene mit dem NormFinder-Algorithmus ... 53

3.2.1.4 Einfluss der Normalisierung auf Expressionswerte von Zielgenen ... 54

3.2.2 Expression der HCN-Untereinheiten in TLE Geweben ... 56

3.2.3 Expression von HCN1-Protein in humanen TLE-Geweben ... 57

4. Diskussion ... 59

4.1 Methodische Betrachtungen ... 59

4.1.1 Inhärente Einschränkungen bei der Untersuchung von Resektatgeweben ... 59

4.1.2 Untersuchung von Autopsie-Geweben ... 60

4.1.3 Beschränkung auf somatische Patch-clamp-Ableitungen ... 61

4.2 Eigenschaften des I_h in humanen epileptogenen Geweben ... 62

4.3 Zusammenhänge mit klinischen Daten 63
4.3.1 Unterschiede zwischen TLE und FLE 63
4.3.2 Korrelation mit der Schwere der Epilepsie 64
4.4 Molekulare Mechanismen der I_h-Verminderung bei TLE 64
4.5 Konsequenzen für die neuronale Erregbarkeit 66
4.6 Kausale Zusammenhänge und therapeutische Implikationen 67
5. Zusammenfassung 69
6. Summary 70
7. Literaturverzeichnis 72
8. Eidesstattliche Erklärung 88
9. Danksagung 89
10. Verzeichnis der Publikationen 90
10.1 Originalarbeiten 90
10.2 Konferenzbeiträge 90
11. Lebenslauf 91

Abkürzungen

a	Amplitude
ACSF	artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit
ACTB	β-Aktin
aEPSP	artifizielles EPSP
AP	Aktionspotential
B2M	β-2-Mikroglobulin
CA1	*Cornu ammonis* 1- Region des Hippokampus
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca_v	spannungsgesteuerte Ca^{2+}-Kanäle
C_m	Membrankapazität
C_T	*threshold cycle*; PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal die Detektionsschwelle erreicht
CNBD	Zyklonukleotid-Bindedomäne
CPS	komplex partielle Anfälle
CYP	Cyclophilin A
EEG	Elektroenzephalografie
EPSP	exzitatorisches (d. h. erregendes) postsynaptisches Potential
FK	frontaler Kortex
FLE	Frontallappenepilepsie
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GARα5	α_5-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors
GBP	Gabapentin
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GM	*grand mal* (d. h. tonisch-klonischer) Anfall
HCN-Kanäle	hyperpolarisations-aktivierte zyklonukleotid-gesteuerte Kationenkanäle
HCN1-4	Untereinheiten 1-4 der HCN-Kanäle
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HS	Hippokampussklerose
I_h	hyperpolarisations-aktivierter Kationenstrom
$I_{h\text{-fast}}$, $I_{h\text{-slow}}$	schnelle und langsame Komponente des I_h
I_T	transienter niederschwelliger Ca^{2+}-Strom
k	Anstieg der Aktivierungskurve
I_{Kir}	einwärtsgleichrichtender K^+-Strom
K_v	spannungsgesteuerte K^+-Kanäle

LTG	Lamotrigin
M	mittlere paarweise Variation der Expressionswerte
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MRPL	mitochondriales 39S ribosomales Protein L28
n	Anzahl der untersuchten Neurone
Na_v	spannungsgesteuerte Na^+-Kanäle
NF	Normalisierungsfaktor
NSE	neuronen-spezifische Enolase
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PMI	*post mortem* Intervall (Zeit zwischen Todeszeitpunkt und Probenentnahme)
Q	Effizienz-korrigierte Quantität einer bestimmten mRNA
r	Anzahl der untersuchten Resektatgewebe (d. h. Patienten)
R_n	neuronaler Eingangswiderstand
RT	Raumtemperatur
S1–S6	Transmembransegmente S1–S6
SDHA	α-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase
SE	*status epilepticus*
SK	sensomotorischer Kortex
SYP	Synaptophysin
τ	Zeitkonstante
TBP	TATA-Box-*binding*-Protein
TLE	Temporallappenepilepsie
TTX	Tetrodotoxin, Blocker von spannungsgesteuerten Na^+-Kanälen
UBC	Ubiquitin C
$V_{1/2}$	Potential der halb-maximalen Stromaktivierung
V	paarweise Variation verschieden zusammengesetzter NF
V_c	Kommandopotential
V_m	Ruhemembranpotential
V_{rev}	Umkehrpotential
ZD7288	4-(*N*-ethyl-*N*-phenylamino)-1,2-dimethyl-6-(methylamino) pyrimidiniumchlorid, Blocker von HCN-Kanälen
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Epilepsien

1.1.1 Grundlagen

Unter dem Begriff Epilepsie werden mehrere neurologische Leiden und Syndrome zusammengefasst, die durch wiederkehrende unprovozierte Anfälle gekennzeichnet sind. Etwa 0,5–1 % der Weltbevölkerung sind davon betroffen (Internationale Liga gegen Epilepsie, 1997; vgl. Forsgren *et al*., 2005). Epileptische Anfälle beruhen auf exzessiven oder hypersynchronen Entladungen von Neuronenverbänden und äußern sich je nach betroffener Hirnregion in unterschiedlicher Weise.

Auf der Grundlage von elektroenzephalografischen (EEG)-Ableitungen kann man zwischen generalisierten und fokalen Anfällen unterscheiden (siehe Berg *et al*., 2010). Generalisierte Anfälle gehen von einem bilateralen (beide Großhirnhemisphären betreffenden) Netzwerk aus (siehe aber auch Holmes *et al*., 2004), an dem sowohl kortikale als auch subkortikale Strukturen (z. B. die Thalami) beteiligt sind. Ein klassisches Beispiel sind die Absencen (früher auch *Petit mal*-Anfälle genannt). Dabei handelt es sich um plötzlich auftretende aber vergleichsweise kurze (~10 s) Bewusstseinsstörungen mit Handlungsstillstand, die häufig im Kindesalter auftreten (zur Übersicht siehe Crunelli & Leresche, 2002). Im EEG treten bei Absencen meist typische bilateral synchrone *Spike-wave*-Entladungen mit einer Frequenz von 3 Hz auf. Diese entstehen durch rhythmische Aktivierung neokortikaler Bereiche im Rahmen von thalamokortikalen Oszillationen, wie sie in ähnlicher Weise auch in frühen Schlafphasen auftreten (zu Übersicht siehe Steriade, 2005; siehe auch Deisz, 1999).

Im Gegensatz zu den generalisierten Anfällen gehen fokale (partielle) Anfälle von eng umschriebenen Bereichen innerhalb einer Hemisphäre aus. Daran können sowohl kortikale als auch subkortikale Strukturen beteiligt sein. Bei der Temporallappen-Epilepsie (TLE) – der häufigsten Form von Epilepsie beim Menschen – geht die mit EEG erfassbare Anfallsaktivität von einem der beiden Temporallappen aus. Sind vergleichsweise kleine „nichtmotorische“ Areale davon betroffen, kommt es zu typischen epigastrischen, olfaktorischen, gustatorischen o. a. Auren. Dabei handelt es sich um subjektiv wahrgenommene Missempfindungen, die schwereren Anfällen vorausgehen oder auch isoliert auftreten können. Bei den sog. komplex partiellen Anfällen (CPS) sind größere Areale betroffen, so dass es zu Bewusstseinsstörungen und auch motorischen Automatismen (z. B. Kauen oder Schmatzen) kommt. Rekrutiert eine zunächst lokale Anfallsaktivität zunehmend größere

motorische Areale des Neokortex, führt dies zu Krämpfen der kontralateralen Körperhälfte. Während des Verlaufs der bei TLE häufigen *Grand mal*-Anfälle kommt es aufgrund einer sekundären Generalisierung der Anfallsaktivität zu Muskelversteifungen und bilateralen rhytmischen Zuckungen (tonisch-klonischer Anfall).

Im Gegensatz zu den kurzen Absencen, die rasch und ohne nachfolgende Verhaltensänderungen enden, dauern sekundär generalisierte tonisch-klonische Anfälle mehrere Minuten und ziehen oft lange Phasen von postiktalen Beeinträchtigungen nach sich (Rémy & Noachtar, 2010). In manchen Fällen persistiert das Anfallsgeschehen oder mehrere Anfälle folgen so kurz aufeinander, dass keine Erholung mehr möglich ist (*Status epilepticus*, SE). Dies ist ein lebensbedrohlicher Zustand. In Nagetieren können SE auch experimentell induziert werden (z. B. Shah *et al*., 2004).

1.1.2 Therapeutische Strategien

Einige Epilepsien mit vorwiegend generalisierten Anfällen wie die kindliche Absence-Epilepsie sind medikamentös gut behandelbar z. B. mit Ethosuximid oder Valproat, deren Wirkung u. a. auf einer Blockierung von T-Typ Ca^{2+}-Kanälen beruht (Coulter *et al*., 1989; Broicher *et al*., 2007). Die Behandlung von TLE erfordert dagegen meist eine Kombination verschiedenster Antikonvulsiva. Dazu gehören klassische Vertreter wie Carbamazepin, Phenytoin oder Oxcarbazepin. In den vergangenen Jahrzehnten wurden zahlreiche neue Antikonvulsiva entwickelt u. a. Lamotrigin (LTG), Levetiracetam und Gabapentin (GBP). Bei der Behandlung eines SE kommen auch Benzodiazepine (z. B. Clonazepam, Diazepam) und Barbiturate wie Phenobarbital zum Einsatz.

Die genauen Wirkungsmechanismen dieser Substanzen sind noch nicht vollständig verstanden. Neben der Blockierung von spannungsgesteuerten Na^{+}-Kanälen (Carbamazepin, Phenytoin) zielen viele Antikonvulsiva auf eine Verstärkung der hemmenden (inhibitorischen) synaptischen Übertragung ab (zur Übersicht siehe Kwan *et al*., 2001). Bei LTG und GBP wurde zudem eine Verstärkung von HCN-Kanal-vermittelten Kationenströmen (I_h, siehe unten) beobachtet (Poolos *et al*., 2002; Surges *et al*., 2003).

Trotz einer stetig steigenden Zahl von verfügbaren Medikamenten, sprechen etwa 30 % der Patienten mit fokalen Epilepsien nur unzureichend auf die Therapie an (Duncan *et al*., 2006). Die Ursachen dieser Pharmakoresistenz sind nur wenig verstanden. Zwei verschiedene Erklärungsansätze wurden diesbezüglich entwickelt. Die Transporter-Hypothese nimmt Veränderungen von bestimmten Transporter-Molekülen der Blut-Hirn-Schranke (z. B. ATP-*binding cassette proteins,* Dean *et al*., 2001) an, die zu einer verringerten und damit unzureichenden Gewebskonzentration applizierter Pharmaka

führen (Kwan & Brodie, 2005). Die Zielmolekül-Hypothese hingegen geht davon aus, dass pathologische Veränderungen von Ionenkanälen und Neurotransmitter-Rezeptoren neben epileptischer Übererregbarkeit auch zu einer verminderten Interaktion mit den entsprechenden Pharmaka führen können (z. B. Remy *et al*., 2003). Beide Konzepte stehen sich nicht notwendigerweise unvereinbar gegenüber und werden durch zahlreiche experimentelle Befunde gestützt. Dennoch sind bedeutende Fortschritte in der Therapie noch nicht erkennbar. Bisher blieb auch weitgehend unbeachtet, dass angesichts pathologisch invertierter (d. h. exzitatorischer) $GABA_A$-Rezeptor-vermittelter Antworten in einem Teil der Neurone (Deisz *et al*., 1998, 2011) von entsprechenden Antikonvulsiva nur geringe Nettoeffekte erwartet werden können (Deisz, 2002).

In ausgewählten Fällen können pharmakoresistente fokale Epilepsien durch chirurgische Entfernung (Resektion) anfallsauslösender Areale und struktureller Abnormalitäten (wie z. B. Tumoren) behandelt werden. TLE-Patienten können durch Resektion neokortikaler und ggf. auch archikortikaler Anteile des jeweils betroffenen Temporallappens komplette Anfallsfreiheit (ca. 70 % der Fälle) oder zumindest eine signifikante Reduktion der Anfälle (ca. 12 % der Fälle) erreichen (Engel *et al*., 1993). Extra-temporale Foci z. B. im Frontallappen (Frontallappen-Epilepsie, FLE) sind weitaus seltener, aber unter bestimmten Voraussetzungen ebenfalls operativ behandelbar. Im Gegensatz zu Temporallappen-Teilresektionen erfordert die Festlegung der Resektionsgrenzen in diesen Fällen jedoch eine umfangreichere prä- und intraoperative Diagnostik (z. B. mit Elektrokortikographie, zur Übersicht siehe Kellinghaus & Lüders, 2004).

Neben dem therapeutischen Nutzen liefern solche Eingriffe wertvolles Probenmaterial, an dem die Entstehung epileptischer Übererregbarkeit (Epileptogenese) untersucht werden kann. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse können wesentlich zur Entwicklung verbesserter Therapien beitragen.

1.1.3 Pathophysiologische Mechanismen fokaler Epilepsien

Die zellulären und molekularen Mechanismen der Epileptogenese sind bisher nur ansatzweise verstanden. In vielen Fällen von TLE können distinkte pathologische Veränderungen (z. B. strukturelle Störungen wie Läsionen, Tumore o. ä.) nachgewiesen werden (symptomatische TLE), die u. a. auch zur Klassifikation herangezogen werden (Berg *et al*., 2010). Häufig treten v. a. Hippokampus-Sklerosen (HS) auf. Dabei kommt es im Bereich der Hippokampus-Formation (unilateral zum Fokus) zum Untergang von Neuronen und zur Vermehrung von Gliazellen (Gliose) (Blümcke *et al*., 1999, 2002). Ob

HS jedoch die Ursache oder eher die Folge von epileptischen Anfällen sind, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Einige TLE-Patienten weisen wiederum fokale Dysplasien auf. Dabei handelt es sich um ontogenetische Fehlbildungen im laminaren Aufbau des Kortex mit morphologisch veränderten Neuronen. Warum diverse Veränderungen zur Entstehung von Epilepsien führen können, ist bisher nur unzureichend erforscht (Najm *et al*., 2007).

Die neuronale Übererregbarkeit in epileptogenen Geweben wird oft mit einem Ungleichgewicht zwischen erregender (glutamaterger) und inhibitorischer (GABAerger) synaptischer Transmission erklärt (Sherwin *et al*., 1988; Tasker & Dudek, 1991 u. a.). Dieses „klassische" Konzept wird von vielen experimentellen Befunden unterstützt. Im humanen epileptogenen Neokortex wurde beispielsweise eine Verminderung von paroxysmalen Depolarisationen (Form von Übererregbarkeit) durch Blockade von NMDA-Typ Glutamat-Rezeptoren gefunden (Avoli & Olivier, 1987). Allerdings konnten Wuarin *et al*. (1992) keinen Zusammenhang zwischen NMDA-Rezeptor-Antworten und Schwere der Epilepsie feststellen. Bezüglich der GABAergen Transmission wurden u. a. Verschiebungen des Umkehrpotentials der $GABA_A$-Rezeptor-vermittelten Hemmung (Deisz *et al*., 1998; Cohen *et al*., 2002; Deisz *et al*., 2011) und funktionelle Defizite prä- und postsynaptischer $GABA_B$-Rezeptoren beschrieben (Deisz, 1999; Teichgräber *et al*., 2009).

Neben Beeinträchtigungen der synaptischen Transmission können auch Veränderungen von spannungsgesteuerten Ionenkanälen zur Epileptogenese beitragen, da die von ihnen vermittelten Ionenströme die Erregbarkeit einzelner Neurone und in Folge auch die Erregbarkeit des Netzwerks kontrollieren (zur Übersicht siehe Deisz, 2009). Bisher wurden v. a. verstärkte Ca^{2+}- oder Na^+-Ströme (z. B. Beck *et al*., 1998; Vreugdenhil *et al*., 2004) und verminderte K^+-Ströme (z. B. Bernard *et al*., 2004) beschrieben. Gegenwärtig ist der hyperpolarisations-aktivierte K^+/Na^+-Strom (*h*-Strom, I_h) in den Vordergrund des Interesses gerückt. Dieser Strom wird von den K^+/Na^+-permeablen HCN-Kanälen vermittelt und hat einen erheblichen Einfluss auf die intrinsischen neuronalen Eigenschaften und damit auf die Erregbarkeit.

1.2 Spannungsgesteuerte Ionenkanäle in zentralen Neuronen

Ionenkanäle sind spezialisierte Membranproteine, die in der Zellmembran selektive Poren für die Passage bestimmter Ionen bilden. Neurone sind mit einem komplexen Repertoire von molekular und funktionell verschiedenen Ionenkanälen ausgestattet, die im Zusammenspiel deren Erregbarkeit bestimmen. Im Gegensatz zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen, wie den ionotropen Neurotransmitter-Rezeptoren (z. B. $GABA_A$- oder

NMDA-Typ Glutamat-Rezeptoren), verfügen die spannungsgesteuerten Ionenkanäle über einen Spannungssensor, der bei Membranpotentialänderungen Konformationsänderungen induziert und damit die Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle verändert (Tombola *et al.*, 2006).

Die *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels* (HCN-Kanäle) stellen eine Besonderheit unter den spannungsgesteuerten Ionenkanälen dar, da sie neben der Spannungsabhängigkeit auch durch intrazelluläre Liganden (v. a. Zyklonukleotide) modulierbar sind. Dennoch werden die HCN-Kanäle mit den spannungsgesteuerten Kanälen für Na^+, Ca^{2+} und K^+ (Na_v-, Ca_v- und K_v-Kanäle) zu einer Superfamilie zusammengefasst (Yu & Catterall, 2004).

1.2.1 Aufbau der HCN-Kanäle

Die HCN-Kanäle sind, wie die K_v-Kanäle, tetramere Arrangements von Untereinheiten, die eine zentrale ionenleitende Pore umschließen (Abb. 1). Dabei umfasst jede Kanaluntereinheit 6 α-helikale Transmembransegmente (S1–S6). Das Segment S4 ist reich an positiv geladenen Aminosäureresten (v. a. von Arginin und Lysin) und fungiert als Spannungssensor. Im Gegensatz zu den Na_v-, Ca_v- und K_v- Kanälen aktivieren die HCN-Kanäle bei Hyperpolarisation. Die Gründe für diese besondere Spannungsabhängigkeit sind bisher noch nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass neben dem S4-Segment selbst der intrazellulären Schleife zwischen den Segmenten S4 und S5 eine entscheidende Rolle dabei zukommt (Prole & Yellen, 2006). Die Segmente S5 und S6 einer jeweiligen Untereinheit sind durch eine längere Schleife mit einem kleinen helikalen Abschnitt (P-Helix) miteinander verbunden. Diese Strukturen sind an der Ausbildung der ionenleitenden Pore beteiligt. Dieser Bereich enthält auch einen Selektivitätsfilter, der eine für K_v-Kanäle typische Signatursequenz (Glycin-Tyrosin-Glycin) aufweist. Warum die HCN-Kanäle auch für Na^+ permeabel sind (Macri *et al.*, 2002), ist allerdings unklar. Auch eine geringe Ca^{2+}-Permeabilität wurde beschrieben (Yu *et al.*, 2004).

Vom Segment S6 ausgehend ragt eine lange und flexible C-terminale Schleife in das Cytosol, die eine Zyklonukleotid-Bindedomäne (CNBD) enthält. Diese Domäne vermittelt die cAMP-Abhängigkeit der HCN-Kanäle. Mit Hilfe von Deletions-Mutanten wurde gezeigt, dass die CNBD in Abwesenheit von Liganden einen hemmenden Einfluss auf das Öffnen der Kanalpore hat. Erst die Bindung von cAMP beseitigt diesen inhibitorischen Effekt durch eine entsprechende Konformationsänderung (Wainger *et al.*, 2001). Zagotta *et al.* ist 2003 die Kristallisation des C-terminalen Fragments einer HCN2-Untereinheit der Maus gelungen, und die gefundene Struktur spricht für einen solchen

Mechanismus. Kürzlich konnte auch die Struktur eines humanen HCN4-Fragments aufgeklärt werden (Xu *et al*., 2010). Die cAMP-Sensitivität ist Grundlage für die Modulierbarkeit des von den HCN-Kanälen vermittelten I_h durch Neurotransmitter wie z. B. bei der Modulation der Herzfrequenz (siehe 1.2.3; vgl. Frère & Lüthi, 2004).

Im cytosolischen, C-terminalen Bereich (die CNBD ausgenommen) zeigen die verschiedenen Isoformen von HCN-Kanaluntereinheiten die größten Sequenzunterschiede. Demnach sind in diesem Bereich die Ursachen für isoform-spezifische Unterschiede in der Spannungs- und cAMP-Abhängigkeit zu suchen (Viscomi *et al*., 2001). Das (C-)terminale Aminosäuretriplett der HCN-Untereinheiten stellt eine Bindungsstelle für TRIP8b dar, einem cytosolischen Protein, das bei Mäusen (Santoro *et al*., 2009) und bei Ratten (Lewis *et al*., 2009) an der Regulation der Oberflächenexpression der Kanäle beteiligt ist.

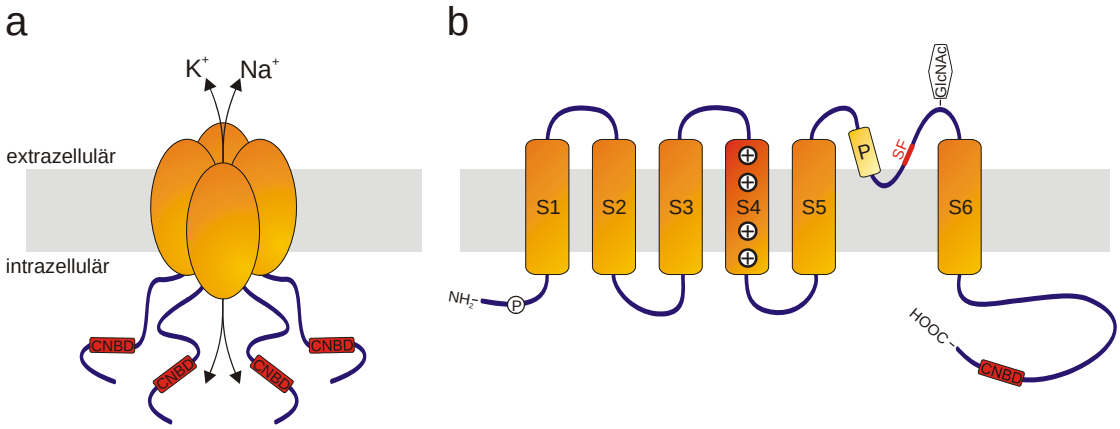

Abbildung 1. Aufbau der HCN-Kanäle
a) Quartärstruktur eines funktionellen HCN-Kanals (schematisch). Vier Untereinheiten umschließen eine zentrale für Kalium- und Natriumionen permeable Pore. Charakteristisch sind die langen intrazellulären Schleifen einer jeden Untereinheit, die mit ihrer Zyklonukleotid-Bindedomäne (CNBD) die Modulierbarkeit durch cAMP ermöglichen. b) Membrantopologie einer einzelnen Untereinheit. Ausgehend von einem cytosolischen N-Terminus durchzieht die Polypeptidkette in 6 α-helikalen Transmembransegmenten (S1-S6) die Zellmembran und endet in der cytosolischen C-terminalen Schleife mit der CNBD. Das Segment S4 enthält mehrere positiv geladene Aminosäure-Seitenketten und fungiert als Spannungssensor. Die Schleife zwischen den Segmenten S5 und S6 kleidet die ionenleitende Pore aus und enthält einen weiteren kurzen helikalen Abschnitt (P-Helix) sowie den Selektivitätsfilter (SF). Nahe dem N-Terminus wurden Phosphorylierungs-Stelle(n) (P) nachgewiesen, die eine zusätzliche Modulation ermöglichen. Die extrazelluläre Glycosylierungsstelle (GlcNAc) nahe dem S6 Segment wird mit der Untereinheiten-Assemblierung und dem Einbau in die Zellmembran in Verbindung gebracht.

1.2.2 Molekularbiologie der HCN-Kanäle

Bei Säugern wurden vier verschiedene Isoformen von Untereinheiten (HCN1–HCN4) gefunden, die nach heterologer Expression funktionelle Tetramere bilden und hyperpolarisations-aktivierte Ströme mit den charakteristischen Eigenschaften des I_h vermitteln können (Ludwig *et al.*, 1998; Santoro *et al.*, 1998; Stieber *et al.*, 2005). Diese vier Isoformen unterscheiden sich in ihrer Lokalisation im adulten Rattengehirn (Notomi & Shigemoto, 2004). So sind HCN1- neben HCN2-Untereinheiten vor allem in Neuronen des Hippokampus und Neokortex exprimiert (auf Proteinebene). Im Gegensatz zu HCN2-Untereinheiten fehlen HCN1-Untereinheiten aber weitgehend in subkortikalen Strukturen z. B. in Neuronen des Thalamus. Dort dominieren vor allem HCN2- und HCN4-Untereinheiten. Die Expression von HCN3-Untereinheiten scheint nur auf wenige Bereiche des Zentralnervensystems (ZNS) wie der Habenula oder dem olfaktorischen Kortex beschränkt (Notomi & Shigemoto, 2004).

Untersuchungen an heterolog exprimierten Homotetrameren haben gezeigt, dass HCN1-Kanäle einen I_h mit schneller Aktivierungskinetik vermitteln und kaum cAMP-Sensitivität aufweisen, während HCN2- und HCN4-Homotetramere langsam aktivieren und stark durch cAMP modulierbar sind (z. B. Stieber *et al.*, 2005). Diese Befunde korrespondieren mit den Strömen, die in Hirnstrukturen mit distinkten Expressionsmustern von HCN-Untereinheiten gemessen werden (Franz *et al.*, 2000) und sind offensichtlich auf humane HCN-Kanäle übertragbar (Stieber *et al.*, 2005).

Auch heterotetramere Kanäle vermitteln Ströme mit den charakteristischen Eigenschaften des I_h, wobei die beteiligten Isoformen unterschiedlich zu den Eigenschaften des gesamten Kanals beitragen (S. Chen *et al.*, 2001). HCN1/HCN2-Heterotetramere vermitteln beispielsweise einen schneller aktivierenden I_h mit hoher cAMP-Sensitivität. Derartige Heteromere wurden auch *in vivo* nachgewiesen (Much *et al.*, 2003; Notomi & Shigemoto, 2004).

1.2.3 Physiologische Funktionen des I_h

Die HCN-Kanäle vermitteln einen hyperpolarisations-aktivierten, von K^+ und Na^+ getragenen Einwärtsstrom, der als I_h bezeichnet wird (zur Übersicht siehe Pape, 1996). Ursprünglich wurde dieser Strom am Sinusknoten des Herzens entdeckt (Noma & Irisawa, 1976). Dort ist er in einem komplexen Zusammenspiel mit anderen spannungsabhängigen Ionenströmen an der Genese des Herzrhythmus beteiligt. Darüber hinaus kann durch die cAMP-abhängige Modulation über adrenerge und cholinerge Rezeptoren die Herzfrequenz an verschiedene Belastungen angepasst werden (zur Übersicht siehe Accili *et al.*, 2002).

Auch in bestimmten neuronalen Netzwerken findet oszillatorisches Verhalten statt, an dem der I_h maßgeblich beteiligt ist. In thalamokortikalen Neuronen kann durch eine I_h-vermittelte Depolarisation der transiente niederschwellige Ca^{2+}-Strom (I_T) aktiviert werden, der zur Auslösung von Na^+-Aktionspotentialen führt. Mit der Hyperpolarisation in Folge der Inaktivierung des I_T (McCormick & Pape, 1990) und durch $GABA_B$-Rezeptor-vermittelte Antworten (siehe Crunelli & Leresche, 1991; Deisz, 1999) wird dann schließlich wieder der I_h aktiviert. Dies führt zu einem rhythmischen *Burst*-Verhalten, das zur Entstehung von δ-Aktivität (< 4 Hz) im EEG während z. B. Tiefschlafphasen beiträgt (zur Übersicht siehe McCormick & Bal, 1997). Auch im Hippokampus ist der I_h an Netzwerk-Oszillationen beteiligt (z. B. Maccaferri & McBain, 1996).

In neokortikalen Neuronen spielt v. a. der erhebliche Anteil des I_h an der Ruhemembranleitfähigkeit (~50%, Strauss *et al*., 2004) eine Rolle. Wegen der gemischten (K^+/ Na^+-) Leitfähigkeit der HCN-Kanäle (Umkehrpotential etwa -48 mV; Berger *et al*., 2001) führt diese zu einem depolarisierenden Beitrag am Ruhemembranpotential. Prinzipiell bewirkt die Aktivierung des Stroms bei Hyperpolarisation und das Abschalten bei Depolarisation zu einer Stabilisierung des Membranpotentials z. B. gegenüber exzitatorischen (Magee, 1999) und inhibitorischen synaptischen Eingängen (Gasparini & DiFrancesco, 1997). Tatsächlich beschleunigt der I_h das Abklingen von sowohl spontanen (Berger *et al*., 2001) als auch von evozierten exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP; Strauss *et al*., 2004) und dämpft damit deren temporale Summation. Grundlegende Arbeiten von Magee (1998, 1999) an Hippokampus-Neuronen (CA1, Ratte) zeigten in diesem Zusammenhang eine Zunahme des I_h entlang der somatodendritischen Achse. Dieser Gradient entspricht der später gezeigten subzellulären Verteilung von HCN-Kanälen (Lörincz *et al*., 2002; Notomi & Shigemoto, 2004) und gewährleistet eine Normalisierung synaptischer Eingänge, unabhängig von deren Lokalisation (siehe aber auch Bullis *et al*., 2007 oder Angelo *et al*., 2007). Entsprechendes wurde später auch für neokortikale Neurone (Schicht V) gezeigt (Williams & Stuart, 2000).

Diese besonderen Einflüsse des I_h (auch im Zusammenwirken mit anderen Ionenströmen) auf die Integration synaptischer Potentiale stellen eine spezielle Art von (nicht-synaptischer) Plastizität dar, die bei Lern- und Gedächtnisfunktionen des ZNS eine wichtige Rolle spielt. Bei Mäusen mit ausgeschalteter Expression (*knock-out*) von HCN1-Untereinheiten im Kleinhirn zeigten sich beispielsweise Defizite im Erlernen motorischer Fähigkeiten (Nolan *et al*., 2003). Ein ähnliches Modell, mit einem auf das Vorderhirn beschränkten HCN1-*knock-out,* zeigte jedoch ein verbessertes räumliches Lernen (Nolan *et al*., 2004). Auch Untersuchungen am präfrontalen Kortex lieferten Hinweise auf eine Beteiligung des I_h bei Lernprozessen. In diesem Bereich, in dem der I_h einen erheblichen Anteil an den neuronalen Eigenschaften hat (Day *et al*., 2005), führte sowohl die

Applikation des HCN-Kanal-Blockers ZD7288 als auch das Abschalten der Kanalexpression (mittels *short-hairpin*-RNA) zu verbesserten Leistungen in gedächtnisbezogenen Verhaltensexperimenten (Wang *et al*., 2007).

1.2.4 I_h und Epilepsie

Der I_h hat einen wesentlichen Einfluss auf die neuronalen Eigenschaften wie sich anhand des hohen Beitrags (~50 %, Strauss *et al*., 2004) an der Ruhemembranleitfähigkeit ermessen lässt. Dass Veränderungen von HCN-Kanälen oder des von ihnen vermittelten I_h zu pathologischer Übererregbarkeit bis hin zu Epilepsien führen können, ist daher naheliegend. Erste umfassende Untersuchungen über Fehlregulationen des I_h bei Epilepsien stammen von juvenilen Ratten mit induzierten Fieberkrämpfen. Chen *et al*. (2001) zeigten in diesem Modell eine Zunahme aber auch eine verlangsamte Aktivierung des I_h. Dieser Befund wurde später durch molekulare Daten ergänzt, die auf mRNA-Ebene eine verminderte Expression der schnell-aktivierenden HCN1- und eine erhöhte Expression der langsamer-aktivierenden HCN2-Untereinheiten zeigen (Brewster *et al*., 2002). Die gleichzeitig auftretende Verstärkung der $GABA_A$-Rezeptor-vermittelten Hemmung in diesem Modell (Chen *et al*., 1999) führte zur Annahme, dass der verstärkte I_h als "*inhibition-to-excitation converter*" fungiert, indem er von pathologisch verstärkten inhibitorischen postsynaptischen Potentialen aktiviert, schwellenüberschreitende *Rebound*-Depolarisationen auslöst (Chen *et al*., 2001). Weiterhin wurde in diesem Modell die Bildung von HCN1/HCN2-Heterotetrameren beschrieben (Brewster *et al*., 2005).

Das Fieberkrampfmodell lieferte erste Hinweise auf epilepsie-abhängige Veränderungen des I_h. Nager mit chemisch induziertem SE, die nach einer Latenzperiode spontane Anfälle entwickeln, scheinen die Schadensmechanismen der humanen TLE jedoch besser abzubilden. In solchen Modellen wurden vorwiegend Verminderungen des I_h beobachtet. Shah *et al*. (2004) finden in Ratten nach Kainat-induziertem SE reduzierte Mengen an HCN1- und HCN2-Protein sowie einen reduzierten I_h im entorhinalen Kortex. Eine andere Autorengruppe (Shin *et al*., 2008), die den Hippokampus (CA1) des Kainat-Modells untersucht, zeigte eine initial (akute Phase, 1–2 Tage nach SE) verstärkte Oberflächenexpression von HCN1 und eine Zunahme des I_h im Soma der Neurone. Nach etwa 4 Wochen, wenn wiederkehrende spontane Anfälle auftreten (chronische Phase), kommt es jedoch zu einer Abnahme der Oberflächenexpression von HCN1 und HCN2 und zu einer Verminderung des dendritischen I_h. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass abhängig vom zeitlichen Verlauf der Epileptogenese in verschiedenen subzellulären Strukturen (Soma *vs*. Dendriten) distinkte Veränderungen stattfinden können. Weiterhin konnten

Shin *et al*. (2008) zeigen, dass diese offensichtliche Mislokalisation von HCN1-Untereinheiten im Kainat-Modell mit einer verminderten Interaktion von HCN1 mit dem cytosolischen Protein TRIP8b einhergeht. TRIP8b liegt in verschiedenen *Splice*-Varianten vor, die auf verschiedene Weise an der Regulation der Oberflächenexpression von HCN-Kanälen beteiligt sind (Santoro *et al*., 2009; Lewis *et al*., 2009).

Im Hippokampus (CA1) von Ratten mit Pilokarpin-induziertem SE wurden in der akuten Phase Verminderungen von HCN1- und HCN2-Protein sowie eine verminderte Dichte, verlangsamte Aktivierung und eine veränderte Spannungsabhängigkeit (Verschiebung in Richtung negativerer Potentiale) des I_h gefunden (Jung *et al*., 2007). In der chronischen Phase kommt es zu einer weiteren Verstärkung der Effekte mit der Ausnahme, dass die Expression des HCN2-Proteins wieder Kontrollwerte erreicht. Kürzlich wurde in diesem Modell gezeigt, dass eine gestörte Phosphorylierung der Kanäle zu der veränderten Spannungsabhängigkeit führt. Als Ursache kommt sowohl eine reduzierte Aktivität der p38 MAP-Kinase als auch eine erhöhte Aktivität der Phosphatase Calcineurin in Frage (Jung *et al*., 2010).

Die Effekte im Neokortex dieser Modelle wurden bisher nicht untersucht. Strauss *et al*. (2004) haben zumindest in WAG/Rij-Ratten, einem genetischen Modell der Absence-Epilepsie (Coenen & Van Luijtelaar, 2002; siehe aber auch Meeren *et al*., 2002), einen selektiven Verlust von HCN1-Protein und einen reduzierten und langsamer aktivierenden I_h in neokortikalen Neuronen (Schicht II/III) beschrieben. Die Ähnlichkeit dieser Effekte mit den oben beschriebenen Befunden von Modellen mit pharmakologisch-induzierter TLE deutet auf ähnliche Mechanismen der Epileptogenese hin.

Weiterhin sind bei HCN2-*knock-out*-Mäusen generalisierte Anfälle (Ludwig *et al*., 2003) beschrieben worden. Ein HCN1-*knock-out* zeigt überraschenderweise (neben den kognitiven Defiziten, siehe 1.2.3) keinen epileptischen Phänotyp (Nolan *et al*., 2003). Spätere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass sich bei diesen Mäusen ein SE mit niedrigeren Dosen von Kainat induzieren lässt als in Wildtyp-Mäusen (Huang *et al*., 2009). Kürzlich wurde eine verstärkte tonische $GABA_A$-Rezeptor-vermittelte Hemmung in diesen HCN1-*knock-out* Mäusen beschrieben, an der v. a. α_5-Untereinheiten beteiligt sind (Chen *et al*., 2010). Nach Meinung dieser Autoren könnte sich diese tonische Leitfähigkeit kompensatorisch auswirken und spontane Anfälle verhindern. Schließlich kann auch die Verstärkung des I_h durch die Antikonvulsiva LTG (Poolos *et al*., 2002) und GBP (Surges *et al*., 2003) im Hippokampus (CA1) von Ratten als Hinweis auf pathophysiologische I_h-Verminderungen bei Epilepsien angesehen werden.

Über die biophysikalischen Eigenschaften und mögliche pathophysiologische Veränderungen des I_h bzw. der HCN-Kanäle bei humanen Epilepsien ist wenig bekannt. Hinweise auf die Anwesenheit einer I_h-artigen Leitfähigkeit im humanen epileptogenen

Kortex gibt es schon relativ lange (Avoli & Olivier, 1989; Foehring & Waters, 1991), aber ein möglicher Zusammenhang mit der Pathologie wurde bisher nicht untersucht. Bender *et al*. (2003) fanden im *Gyrus dentatus* von TLE-Patienten mit HS erhöhte Mengen von HCN1-mRNA. Jedoch blieb unklar, ob sich damit tatsächlich die Zahl funktioneller Kanäle erhöht. Außerdem steht diese Hochregulation im Widerspruch zu den Befunden mehrerer Tiermodelle (Bräuer *et al*., 2001; Powell *et al*., 2008).

Schließlich wurden bei genetischen Untersuchungen an Patienten mit idiopathischen generalisierten Epilepsien vereinzelt Mutationen in HCN1- und HCN2-kodierenden Genen gefunden, die zu einem veränderten I_h beitragen könnten (Tang *et al*., 2008). In einer weiteren Untersuchung an Patienten mit Fieberkrämpfen sowie an Patienten mit „genetischer Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus“ wurden Deletionen im HCN2-kodierenden Gen gefunden, die offensichtlich zu einer, dem Rattenmodell entsprechenden Verstärkung des I_h (Chen *et al*., 2001) führen können (Dibbens *et al*., 2010). TLE-Patienten wurden diesbezüglich noch nicht untersucht.

1.3 Zielsetzung der Dissertation

Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen haben gezeigt, dass Veränderungen von HCN-Kanälen und den von ihnen vermittelten I_h neuronale Übererregbarkeit auslösen und damit entscheidend zur Epileptogenese beitragen können. Dennoch beschränkten sich die bisher veröffentlichten Untersuchungen an epilepsiechirurgischen Resektaten hauptsächlich auf Veränderungen der synaptische Transmission sowie auf Veränderungen von Na_v-, Ca_v- und K_v- Kanälen und den von ihnen vermittelten Strömen (siehe 1.1.3).

Der erste Hinweis auf eine Beeinträchtigung des I_h in humanen epileptogenen Neokortex ergab sich aus Mikroelektroden-Ableitungen von Neuronen in resezierten TLE-Geweben, die (im Vergleich zu Neuronen der Ratte) eine schwächere Einwärtsgleichrichtung zeigten (Deisz, 1999). Bei ersten *Patch-clamp*-Ableitungen an einer relativ kleinen Anzahl von Resektaten wurde dann tatsächlich ein relativ kleiner I_h beobachtet (Kole *et al*., 1999). Dennoch blieben viele grundsätzliche Fragen hinsichtlich der biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften des I_h im humanen Epilepsiegewebe unbeantwortet. Bezüglich der molekularen Mechanismen und funktionellen Konsequenzen möglicher Veränderungen des I_h bei humaner Epilepsie ist bisher gar nichts bekannt. Hier setzt die vorliegende Arbeit an und will insbesondere folgende Fragen klären:

1.) Bestehen in humanen Resektatgeweben im Vergleich zu etablierten Daten von Nagetieren grundsätzliche Unterschiede hinsichtlich der biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften des I_h?

2.) Gibt es quantitative Unterschiede zwischen verschiedenen Resektatgeweben (z. B. in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung), die eine Verminderung des I_h bei humaner Epilepsie eindeutiger belegen, als der bisher oft verwendete Vergleich mit Rattengeweben? Bestehen quantitative Unterschiede zwischen TLE-Geweben und den weitaus selteneren Fällen von FLE?

3.) Welche funktionellen Konsequenzen könnten sich aus einem in humanen Epilepsiegeweben möglicherweise verminderten I_h ergeben, z. B. bezüglich der temporalen Summation von EPSP?

4.) Gibt es auf mRNA- und/ oder Proteinebene Unterschiede in der Expression der verschiedenen HCN-Kanal-Untereinheiten? In welchem Zusammenhang stehen diese zu den beobachteten biophysikalischen Eigenschaften der gemessenen Ströme?

2. Material und Methoden

2.1 Lösungen und Substanzen

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Substanzen von Merck (Darmstadt, Deutschland) in *pro analysi* Qualität bezogen. Für alle Lösungen wurde Reinstwasser aus entsprechenden Anlagen (Milli-Q Academic oder Milli-Q Synthesis; Millipore, Billerica, USA) verwendet.

2.1.1 Lösungen für Gewebetransport und elektrophysiologische Messungen

Artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF) enthält: 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $MgSO_4$, 26 mM $NaHCO_3$, 1,25 mM NaH_2PO_4, 10 mM D(+)Glucose und 2 mM $CaCl_2$ in H_2O. Der pH-Wert von 7,4 stellte sich durch die Begasung mit Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2) ein. Wenn divalente Kationen (Ba^{2+}, Ni^{2+}) verwendet wurden (siehe unten), wurde $MgSO_4$ äquimolar durch $MgCl_2$ ersetzt und NaH_2PO_4 weggelassen. ACSF wurde bei 4 °C gelagert und bis zu 7 Tage nach Ansetzen verwendet.

Zum Transport der humanen Gewebe wurde eine modifizierte ACSF (Transportlösung) verwendet, diese wurde jeweils einen Tag vor der OP angesetzt und enthält: 70 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 7 mM $MgSO_4$, 26 mM $NaHCO_3$, 1,25 mM NaH_2PO_4, 25 mM D(+)Glucose, 75 mM Saccharose und 0,5 mM $CaCl_2$ in H_2O (pH 7,4 mit Carbogen).

Elektrodenlösung enthält: 120 mM K^+-Gluconat, 10 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM Mg^{2+}-ATP und 0,4 mM Na^+-GTP (pH mit KOH auf 7,2 eingestellt, 290 mOsm), wurde bei -20 °C gelagert und bis zu 6 Monate verwendet.

Zur pharmakologischen Isolierung des I_h wurden 1 mM $BaCl_2$, 200 µM $NiCl_2$ sowie 0,1–0,5 µM Tetrodotoxin (TTX) (alle Sigma, Taufkirchen, Deutschland) appliziert. Der HCN-Kanal-Blocker 4-(*N*-Ethyl-*N*-Phenylamino)-1,2-Dimethyl-6-(Methylamino)-Pyrimidinium-chlorid (ZD7288; Tocris, Bristol oder Ascent Scientific, Weston-Super-Mare, UK) wurde in einer Konzentration von 50 µM appliziert.

2.1.2 Lösungen für molekulare Untersuchungen

Phosphatpuffer (PB) enthält 100 mM NaH_2PO_4 in H_2O. Der pH-Wert 7,4 wurde mit NaOH-Lösung eingestellt.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) enthält: 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,5 mM NaH_2PO_4 und 1,8 mM KH_2PO_4 in H_2O (pH 7,4 mit HCl eingestellt) und wurde als 10fach-konzentrierte Stammlösung hergestellt und bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Tris-Puffer enthält 20 mM Tris (Base) in H_2O (pH 7,5 mit HCl eingestellt).

Lysis-Puffer (für die Proteinextraktion) enthält: 0,25 mM Saccharose, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA, 50 mM β-Mercaptoethanol, 25 µg/ml Leupeptin, 10 U DNase I, 10 U RNase A, 250 µg/ml Lysozym und 1 mM PMSF in Tris-Puffer. Vor der Verwendung wurde noch 1 % "Complete Protease Inhibitor Cocktail" (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) zugegeben.

Proben-Puffer (3fach, für die Denaturierung der Proteinproben und deren elektrophoretische Auftrennung) enthält: 60 mM Tris, 10 % (w/v) Saccharose, 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat und Bromphenolblau (0,5 mg/ml) in H_2O.

Elektrophoresepuffer (für die Protein-Elektrophorese) enthält: 25 mM Tris (Base), 192 mM Glycin und 3,5 mM Natriumdodecylsulfat in H_2O (Lagerung bei RT als 10fach-konzentrierte Stammlösung).

Blotting-Puffer enthält 25 mM Tris (Base) und 192 mM Glycin in 20 % Methanol.

2.2 Humane Gewebe

2.2.1 Epilepsiechirurgische Resektate

Die untersuchten humanen Gewebe sind Teile von epilepsiechirurgischen Resektaten, die Patienten mit pharmakoresistenten Epilepsien aus therapeutischen Gründen entfernt wurden (Operateur: Dr. T.-N. Lehmann oder PD Dr. P. Horn, Neurochirurgische Klinik der Charité Universitätsmedizin Berlin). Diese Resektate umfassen anfallsauslösende (fokale) Areale des Temporallappens (n = 104 Resektate (r)) oder des Frontallappens (r = 10). Die prächirurgische Diagnostik (Video-EEG-Monitoring, neuropsychologische Begutachtung,

tomographische Verfahren u. a.) wurde im Epilepsie-Zentrum Berlin-Brandenburg (Leitung: Prof. H.-J. Meencke) durchgeführt.

Nach den dominierenden Symptomen können die TLE-Patienten (53 weiblich, 51 männlich; Alter: 38,5 ± 14,5 Jahre; Dauer der Epilepsie: 20,9 ± 14,4 Jahre) in folgende Gruppen eingeteilt werden: TLE mit HS (r = 49), TLE ohne HS (r = 28), Tumor-assoziierte Epilepsie (r = 5), kortikale Dysplasie (r = 11) und Epilepsie mit Läsion (r = 11). Die FLE-Patienten (4 weiblich, 6 männlich; Alter: 24,1 ± 11,5 Jahre; Dauer der Epilepsie: 14,3 ± 10,9 Jahre) hatten: Dysplasien (r = 4), Gliosen (r = 2) oder keines dieser Symptome (r = 4). Diese Daten entsprechen im Wesentlichen den Daten aus anderen europäischen Epilepsie-Zentren (siehe Blümcke *et al.*, 2002). Bezüglich des Geschlechts, des Alters und den o.g. Symptomen gab es keine Unterschiede in den neuronalen Eigenschaften und dem I_h, deswegen wurden die jeweiligen Daten gepoolt.

Die Untersuchungen an diesen Geweben erfolgte nach den geltenden ethischen Richtlinien (Deklaration von Helsinki; siehe Rickham, 1964) und wurde von der Ethikkommission der Charité genehmigt (30.7.97). Jeder Patient wurde vor der Operation über die wissenschaftliche Verwendung des Gewebes aufgeklärt und erklärte schriftlich sein Einverständnis.

Die im Operationssaal empfangenen Gewebe (1–2 g) wurden in gekühlte (4–7 °C) begaste Transportlösung überführt und schnellstmöglich ins Labor transportiert (< 30 min Transportzeit). Um exzitotoxische Effekte während des Transports zu minimieren, ist in der Transportlösung (im Vergleich zur ACSF) ein Teil des NaCl isoosmolar durch Saccharose substituiert (siehe Aghajanian & Rasmussen, 1989) und das Ca^{2+}/Mg^{2+}-Verhältnis verringert. Kleinere Gewebeblöcke wurden mit Cyanoacrylat-Kleber (Histoacryl®, B.Braun, Tuttlingen, Deutschland) auf dem Probenteller eines Vibratoms (HM650V, MICROM International, Walldorf, Deutschland) fixiert und in begaster ACSF (4 °C) geschnitten (nominelle Schnittdicke: 400 µm). Bis zur Verwendung wurden die Hirnschnitte bei Raumtemperatur (RT) in begaster ACSF gelagert.

Für spätere molekularbiologische und histochemische Untersuchungen wurden parallel dickere Schnitte (mind. 800 µm) oder kleine Blöckchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert bzw. für 22–24 h (4 °C) in 4 % (w/v) Paraformaldehyd, 15 % Pikrinsäure und 0,5 % Glutaraldehyd in PB fixiert.

2.2.2 Autopsiegewebe

Für RNA- und Proteinanalysen geeignete neokortikale Autopsiegewebe (siehe Durrenberger *et al*., 2010) wurden vom BrainNet Europe Consortium zur Verfügung gestellt. Die Körperspender (2 weiblich, 5 männlich; Alter: 37,6 ± 11,6 Jahre) waren ohne neurologischen Befund, und das durchschnittliche *post mortem*-Intervall (PMI) betrug 7,9 h (Bereich: 2,5–14 h). Die Methoden und ethischen Richtlinien sind bei Bell *et al*. (2008) detailliert beschrieben.

2.3 Rattengewebe

Männliche Wistar-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) in einem Altersbereich von 30–65 d wurden, wie vom Landesamt für Arbeit und Soziales Berlin genehmigt (T0046/2), mit Diethylether (Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande) anästhesiert und dekapitiert. Hirnblöcke, die entweder den sensomotorischen Kortex (Bregma -2,8 bis 0, Paxinos & Watson, 2005) oder den frontalen Kortex (Bregma 1,7 bis 3,2) enthielten, wurden schnellstmöglich aber schonend entnommen und kurz in eiskalte begaste ACSF getaucht (ca. 1 min). Dann wurden die Hirnblöcke mit Histoacryl ®-Kleber auf dem Teller des Vibratoms fixiert (siehe humane Resektatgewebe) und in 400 µm dicke koronale Schnitte geschnitten.

Ein Teil der Rattenhirnschnitte wurde für eine schnellere Erholung nach dem Schneiden für 30 min in warmer (32 °C) begaster ACSF inkubiert (Moyer & Brown, 1998). Anschließend wurden die Schnitte bis zur Verwendung in begaster ACSF (RT) gelagert. Der oben angegebene Altersbereich (> 4 Wochen) wurde gewählt, weil nach der dritten *postnatalen* Woche keine entwicklungsabhängigen Änderungen im Expressionsmuster von HCN-Untereinheiten mehr zu erwarten sind (z. B. Bender *et al*., 2001).

2.4 Patch-clamp Ableitungen

Einzelne humane Hirnschnitte oder Rattenhirnschnitte wurden in die Messkammer (*submerged*-Typ, ca. 1 ml Volumen) eines *Patch-clamp*-Messplatzes (Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) überführt und darin kontinuierlich mit begaster ACSF (32 °C) umspült (1–2 ml/min). Dieser Kammertyp ermöglicht eine schnelle Verteilung der über die Perfusion applizierten Substanzen im Hirnschnitt (Deisz, 1999). Der Messplatz ist mit einem aufrechten Mikroskop (Axioskop, Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit Wasser-Immersionsobjektiven ausgestattet. Zur Visualisierung von Neuronen im nativen

Hirnschnitt wurde ein Infrarot-Filter zwischen der Lichtquelle und dem Präparat sowie eine Infrarot-Kamera (Hamamatsu C2400, Herrsching, Deutschland; siehe Dodt & Zieglgänsberger, 1990) verwendet.

Die Elektroden für die somatischen *whole-cell*-Ableitungen wurden mit einem Elektroden-Ziehgerät (DMZ Universal-Puller, Zeitz Instrumente, München, Deutschland) aus Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament (Außen-Durchmesser: 1,5 mm; Wandstärke: 0,25 mm) der Fa. Hilgenberg (Malsfeld, Deutschland) gezogen. Mit 'intrazellulärer' Elektrodenlösung gefüllt hatten diese Elektroden einen Widerstand von 3–6 MΩ. Die freie Ca^{2+}-Konzentration in dieser Lösung beträgt etwa 11 nM (berechnet, siehe Portzehl *et al*., 1964). Velumian *et al*. (1997) haben in Hippokampus-Neuronen der Ratte eine Verminderung des I_h durch K^+-Gluconat gezeigt, weshalb zunehmend mehr Autoren K^+-Methylsulfat verwenden. Aus Konsistenzgründen wurde jedoch an der Verwendung von K^+-Gluconat festgehalten. Exemplarisch wurden einige Ableitungen mit 1 % (w/v) Biocytin (Sigma) in der Pipettenlösung durchgeführt. Dies ermöglicht eine anschließende histochemische Darstellung der abgeleiteten Neurone (siehe Horikawa & Armstrong, 1988; Abb. 2). Effekte von Biocytin auf intrinsische neuronale Eigenschaften wie z. B. von Eckert *et al*. (2001) beschrieben, wurden nicht beobachtet. Deshalb wurden die Daten gepoolt.

Zur Bestimmung intrinsischer neuronaler Eigenschaften wie dem Ruhemembranpotential (V_m), der Aktionspotential (AP) -Amplitude und dem Eingangswiderstand (R_n) wurden in sog. *Current-clamp*-Ableitungen Potentialspuren bei verschiedenen Strominjektionen gemessen (siehe z. B. Abb. 2). Hyperpolarisations-aktivierte Einwärtsströme wurden mit sog. *Voltage-clamp*-Ableitungen gemessen, bei denen ausgehend von einem Haltepotential von -60 mV negativere Kommandopotentiale (d. h. Hyperpolarisationen) angelegt wurden (siehe z. B. Abb. 4). Ableitungen mit Pipettenwiderständen über 6 MΩ, *Seal*-Widerständen unter 1 GΩ und Serienwiderständen über 15 MΩ wurden verworfen.

2.5 Auswertung der Patch-clamp Daten

Die Ableitungen wurden gespeichert und im Anschluss der Messungen mit entsprechender Software (HEKA, Lambrecht, Deutschland) *off-line* ausgewertet. Nur Neurone mit einem V_m negativer als -60 mV, AP-Amplituden von mindestens 80 mV und einem R_n von mindestens 20 MΩ wurden für die Auswertung verwendet.

Der R_n wurde über die Änderung des Membranpotentials durch eine gegebene Strominjektion (-100 pA; 400 ms) bestimmt. Zur Bestimmung der Membrankapazität (C_m)

wurden die Neurone bei *Voltage-clamp*-Ableitungen vom V_m ausgehend um 10 mV hyperpolarisiert. Die C_m ergab sich dann aus dem Zeitintegral des kapazitiven Stroms.

Folgen (20 Hz und 50 Hz) von 5 artifiziellen erregenden postsynaptischen Potentialen (aEPSP) wurden durch entsprechende exponentielle Strominjektionen der Form:

$$I = I_{\max}(t/\alpha)e^{-\alpha t}$$

ausgelöst. Die Werte für I_{max} (86 ± 19 pA) und $\alpha = 0{,}4$ wurden dabei so gewählt, dass die Amplitude und die *time-to-peak* des ersten aEPSP < 5 mV bzw. ca. 10 ms betrugen (vgl. Shin *et al*., 2008). Als Maß für die temporale Summation wurde die Erhöhung des 5. aEPSP gegenüber dem ersten angegeben.

Zur Quantifizierung hyperpolarisations-aktivierter Einwärtsströme (I_{Kir} und I_h) wurden Exponentialfunktionen der 3. Ordnung:

$$f(t) = a_0\left(1 - e^{-t/\tau_0}\right) + a_1\left(1 - e^{-t/\tau_1}\right) + a_2\left(1 - e^{-t/\tau_2}\right)$$

an die entsprechenden Stromspuren angenähert (siehe Abb. 4b). Dabei sind a_0 und τ_0 die Amplitude bzw. die Zeitkonstante des apparenten einwärtsgleichrichtenden K^+-Stroms (I_{Kir}). Die übrigen Parameter entsprechen den Amplituden und Zeitkonstanten der schnellen (a_1, τ_1) und der langsamen (a_2, τ_2) Komponente des I_h. Diese Quantifizierung stellt eine Modifizierung des ursprünglich von Sciancalepore & Constanti (1999) beschriebenen Rückextrapolationsverfahrens dar und wurde mit pharmakologischen Tests verifiziert (siehe Wierschke *et al*., 2010a).

In den Aktivierungskurven zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit des pharmakologisch isolierten I_h (1 mM $BaCl_2$, 200 µM $NiCl_2$ und 0,1–0,5 µM TTX) wurden die *tail*-Strom-Amplituden (normalisiert gegen die maximale Amplitude bei -140 mV) gegen das vorangegangene Kommandopotential (V_c) aufgetragen. Zur Quantifizierung wurden Boltzmann-Funktionen:

$$I_{(V_c)} = \frac{(a_1 - a_2)}{1 + e^{(V_c - V_{1/2})/k} + a_2}$$

angenähert (siehe Abb. 7d). Dabei ist $V_{1/2}$ das Potential der halb-maximalen Aktivierung und *k* der Anstieg der Aktivierungskurve.

Für die Bestimmung des Umkehrpotentials (V_{rev}) des pharmakologisch isolierten I_h wurden *tail*-Ströme durch Sprünge zu verschiedenen Kommandopotentialen (-140 mV bis -50 mV) nach vollständiger Aktivierung (-140 mV) ausgelöst (siehe Abb. 8). Lineare Regressionen in den *I*-*V*-Auftragungen mit Extrapolarisation zum Abzissenabschnitt ($I = 0$) ergeben das Umkehrpotential. Zur Berechnung des Na^+/K^+-Permeabilitätsverhältnisses aus dem V_{rev} wurde die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung wie folgt umgestellt:

$$\frac{P_{Na^+}}{P_{K^+}} = \frac{-([K^+]_e - [K^+]_i e^{\frac{V_{rev}F}{RT}})}{([Na^+]_e - [Na^+]_i e^{\frac{V_{rev}F}{RT}})}$$

Dabei sind $[K^+]_e$ und $[Na^+]_e$ die extrazellulären Konzentrationen bzw. $[K^+]_i$ und $[Na^+]_i$ die intrazellulären Konzentrationen von K^+ und Na^+. F ist die Faraday'sche Konstante, R ist die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur in Kelvin.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Daten als Mittelwert ± Standardabweichung mit der Anzahl der untersuchten Neurone (n) und Resektate (r) angegeben. Nicht immer wurden in jedem Neuron alle Parameter gemessen (z. B. C_m, $a(I_{h\text{-slow}})$ und $\tau(I_{h\text{-slow}})$), deshalb kann sich die Anzahl der Beobachtungen zwischen verschiedenen Parametern unterscheiden. Die Fehlerbalken in den Diagrammen repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes. Die statistische Verteilung der Messwerte wurde mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test (PASW Statistics Software V.18, SPSS Inc., Chicago, USA) untersucht. Die Signifikanz von Unterschieden wurde mit dem Student's *t*-Test (bei normal-verteilten Werten) oder dem Mann-Whitney U-Test (bei nicht-normalverteilten Werten) überprüft. Unterschiede mit $P < 0{,}05$ wurden als signifikant angesehen.

2.6 Reverse Transkription und quantitative PCR (RT-qPCR)

2.6.1 Extraktion von RNA

Um eine Degradation von RNA während der Extraktion und der nachfolgenden cDNA-Synthese zu vermeiden, wurden alle Arbeitsflächen mit RNase Away® (Molecular BioProducts Inc., San Diego, USA) behandelt und stets mit frisch autoklavierten Plastikwaren sowie Handschuhen gearbeitet.

Die folgenden Schritte basieren auf der von Chomczynski & Sacchi (1987) entwickelten Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. Kryofixierte Kortexgewebe (TLE

oder Autopsie-Kontrollen; Schichten I–VI) wurden mit 10 µl TRIzol® Reagenz (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) je mg Gewebe versetzt und mit dem Homogenisator Ultra-Turrax T25 basic (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) aufgeschlossen. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde unlösliches Material (extrazelluläre Proteine, langkettige DNA) aus dem Homogenat abzentrifugiert (10 min bei 12.000 g, 4 °C). Die Überstände wurden mit 200 µl Chloroform (Mallinckrodt Baker B.V.) je 1 ml TRIzol® Reagenz versetzt, energisch geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde nochmals zentrifugiert (10 min bei 12.000 g, 4 °C) und die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen. Die darin enthaltene RNA wurde durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) je 1 ml TRIzol® Reagenz und 10 min Inkubation bei RT ausgefällt. Die Präzipitate wurden abzentrifugiert (15 min bei 12000 g, 4 °C) und durch Zugabe von 1 ml 75 %igem unvergälltem Ethanol (Mallinckrodt Baker B.V.) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 7.500 g, 4 °C) zur Entfernung des Ethanols wurden die RNA-Pellets 10 min an der Luft getrocknet und je nach Größe in 30–200 µl frischem H_2O (Milli-Q Synthesis; Millipore; hier wie auch im Folgenden) resuspendiert und später bei -80 °C gelagert.

Um den RNA-Gehalt der Präparation zu bestimmen, wurde die Extinktion bei 260 nm mit dem Nano-Spektrometer BioMate 3 (Thermo Scientific, Rockford, USA) gemessen. Die Werte lagen bei TLE-Geweben in einem Bereich von 0,2 bis 2,1 µg RNA /µl (n = 14) und bei Autopsiegeweben zwischen 0,8 und 1,6 µg RNA /µl (n = 7). Um die Qualität der RNA-Präparation zu überprüfen, wurde auch der Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt, der optimal zwischen 1,6 und 1,8 liegen soll (Invitrogen). Die eigenen Werte lagen zwischen 1,2 und 1,9 (n = 21). Dies deutet auf mögliche Proteinverunreinigungen in einigen der Präparationen hin. Allerdings wird die Aussagefähigkeit dieses Quotienten auch angezweifelt (z. B. Glasel, 1995).

Die RNA-Integrity Number (ein auf elektrophoretischen Verfahren basierender Index für die Integrität von RNA-Proben; siehe Schroeder *et al.*, 2006) wurde nicht bestimmt, weil bei den verwendeten kurzen Amplifikaten (62–171 Basenpaare; siehe Tabelle 1) kein Einfluss auf die Ergebnisse zu erwarten ist (Fleige & Pfaffl, 2006).

2.6.2 Reverse Transkription

Zur Synthese von cDNA aus den in den RNA-Extraktionen enthaltenen mRNAs wurde das "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" von Applied Biosystems Inc. (Foster City, USA) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Jeder Reaktionsansatz (50 µl) enthielt 5 µl RT-Puffer, 2 µl dNTP Mix, 5 µl Random-Primer, 2,5 µl MultiScribe Reverse

Transkriptase (50 U/µl) und ein 5 µg RNA-entsprechendes Volumen der jeweiligen Probe. Die Differenz zum 50 µl-Gesamtvolumen wurde mit frischem H_2O aufgefüllt. Als Negativ-Kontrolle wurde jede Probe auch in einem Ansatz ohne Reverse-Transkriptase gemessen. Nach dem Pipettieren wurden die Reaktionsansätze erst 10 min bei 25 °C und dann 2 h bei 37 °C inkubiert.

Um den Erfolg der reversen Transkription (v. a. die Abwesenheit von Signal in den Negativ-Proben) zu überprüfen, wurde eine konventionelle PCR-Amplifikation von β-Aktin-cDNA mit anschließender Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung durchgeführt (nicht gezeigt). Abschließend wurden die Proben durch Zugabe von 0–250 µl H_2O (je nach Stärke der Banden im Ethidiumbromid-Gel) verdünnt. Bis zur Messung wurden die fertigen cDNA-Lösungen bei -20 °C gelagert.

2.6.3 Quantitative real-time PCR

Quantitative *real-time* PCR Messungen zur Quantifizierung der von den zu untersuchenden Genen abgeleiteten cDNAs wurden mit einem TaqMan® 7500 Fast-System und entsprechender Software (Applied Biosystems Inc.) durchgeführt (siehe Drews *et al.*, 2009). Dieses System verwendet fluorogene Sonden, die während der Elongationsphasen des PCR-Zyklus durch die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase degradiert werden und das Fluorophor freisetzen (zur Übersicht siehe VanGuilder *et al.*, 2008). Hier wurden gebrauchsfertige Assay-Kits (siehe Tabelle 1) verwendet, die jeweils 5'-(6-Carboxy-Fluorescein)-markierte Sonden und ein entsprechendes Primer-Paar enthalten. Die Reaktionsansätze enthielten 1 µl cDNA-Probe, 10 µl TaqMan Fast Universal PCR Mastermix 2x (Applied Biosystems), 1 µl des jeweiligen Sonden/Primer-Gemisches und 8 µl frisches H_2O.

Die Fluoreszenzsignale der Negativ-Kontrollen (H_2O statt cDNA-Probe) lagen immer weit unter der Detektionsschwelle. Alle Reaktionen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Messungen mit Unterschieden von mehr als 0,5 C_T-Werten wurden verworfen und wiederholt.

Tabelle 1 – Verwendete Genexpressions-Assays

Gen	TaqMan Assay Nr.	Amplifikat-Länge [bp]	m	R^2	Effizienz
GAPDH	4333764F	122	-3,403418	0,999694	96,8 %
HPRT	Hs01003270_g1	127	-3,239393	0,998305	103,5 %
MAP-2	Hs01103240_m1	90	-3,329422	0,999648	99,7 %
UBC	Hs00824723_m1	71	-3,302670	0,998938	100,9 %
B2M	Hs99999907_m1	75	-3,540483	0,998662	91,6 %
TBP	Hs99999910_m1	127	-3,342921	0,981026	99,2 %
SDHA	Hs00417200_m1	124	-3,463718	0,995344	94,5 %
ACTB	4333762F	171	-3,511885	0,997520	92,7 %
SYP	Hs00300531_m1	98	-3,459891	0,996052	94,5 %
CYP	Hs99999904_m1	98	-3,520829	0,996550	92,3 %
NSE	Hs00157360_m1	77	-3,518951	0,994172	92,3 %
MRPL	Hs00371771_m1	66	-3,501792	0,999424	93,1 %
HCN1	Hs01085412_m1	63	-3,255231	0,998696	102,7 %
HCN2	Hs00606903_m1	97	-3,361545	0,999442	98,4 %
HCN3	Hs00380018_m1	69	-3,270508	0,996695	102,2 %
HCN4	Hs00975492_m1	62	-3,312762	0,997032	100,5 %
GFAP	Hs00909236_m1	59	-3,326209	0,999609	102,6 %
GARα5	Hs00181291_m1	64	-3,315565	0,999746	100,1 %

Daten der verwendeten Genexpression-Assays. Für die Effizienzbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe einer aus 6 repräsentativen TLE-Geweben gepoolten cDNA-Lösung hergestellt und die Expressionslevel (C_T-Werte) gegen die Verdünnungsstufe aufgetragen (Effizient-Plot, nicht gezeigt). Die Effizienz-Werte ergeben sich dann aus $E = 10^{(-1/m)}$.

2.6.4 Auswertung der RT-qPCR-Daten

Die Amplifikationsplots (Fluoreszenzsignal *vs.* PCR-Zyklus, nicht gezeigt) wurden *off-line* mit der 7500 Fast System Sequence Detection Software 1.3.1 (Applied Biosystems) ausgewertet. Zunächst wurde für jeden Messlauf die optimale Detektionsschwelle automatisch bestimmt. Für Messreihen aus mehreren Läufen wurde eine gemittelte Detektionsschwelle verwendet. Schließlich wurde für jede PCR-Reaktion der Zyklus mit schwellenüberschreitendem Fluoreszenzsignal (C_T-Wert) bestimmt.

Zur Validierung potentieller Referenzgene wurden zunächst die Streuungen der absoluten C_T-Werte betrachtet. Für weitere Evaluierungen mit dem geNorm-Algorithmus (geNorm Version 3.5, CMG, Universität Ghent, Belgien) und dem NormFinder-Algorithmus (MDL, Universität Aarhus, Dänemark) wurden die C_T-Werte in lineare effizienz-korrigierte Quantitäten (Q) umgerechnet mit:

$$Q_{\mathrm{Pr}obe} = E^{C_T(\min) - C_T(\mathrm{Pr}obe)}$$

Dabei ist *E* die Amplifikationseffizienz (siehe Tabelle 1) und C_T(min) der kleinste C_T-Wert für einen gegebenen Assay (Vandesompele *et al.*, 2002). Für die NormFinder-Analyse wurden zudem die jeweiligen experimentellen Gruppen (siehe unten) definiert.

Für die Messung der Expression der zu untersuchenden Gene (HCN1–HCN4) wurden deren Q-Werte auf den entsprechenden Normalisierungsfaktor (NF):

$$NF_{NormFinder} = \sqrt{Q_{NSE} * Q_{TBP}}$$

bezogen. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Daten als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Werte zwischen verschiedenen Patientengruppen wurden mit dem Mann-Whitney *U*-Test verglichen. Unterschiede mit $P < 0{,}05$ wurden als signifikant angesehen.

2.6 Immunoblotting

2.6.1 Extraktion von Membranprotein

Kryofixierte Kortexgewebe (TLE oder Autopsie-Kontrollen) wurden mit Lysispuffer (~5 µl/ je mg Gewebe) versetzt und mit dem Homogenisator Ultra-Turrax T25 basic (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) aufgeschlossen. Anschließend wurde jede Probe nochmals 3x 3 s mit dem Ultraschall Homogenisator Sonopuls GM70 (BANDELIN Gmbh & Co. KG, Berlin, Deutschland) behandelt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Homogenate in Ultrazentrifugen-Röhrchen (Beckmann Instruments Inc., Palo Alto, USA) überführt und 30 min bei 150.000 g (4 °C) zentrifugiert (Ultrazentrifuge: Beckmann Coulter Optima Max-XP). Anschließend wurden die Überstande (enthalten vorwiegend cytosolische Proteine) entfernt und die Membran-protein-Pellets mit 1 % (v/v) Triton-X100 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) in Lysis-Puffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde erneut

zentrifugiert (10 min, 2.300 g, 4 °C) und der membranprotein-haltige Überstand abgenommen (vgl. Much *et al*., 2003). Die Proteinkonzentration in den Präparationen wurde mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit nach dem Protokoll des Herstellers (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) und einem Mikroplatten-Reader (Synergy2, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland) bestimmt. Die Werte lagen zwischen 8,0 und 12,1 µg/µl (n = 8). Die präparierten Protein-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

2.6.2 Gelelektrophorese und Immunoblotting

Von jeder Probe wurde ein Volumen, das einer Proteinmenge von 100 µg entspricht, mit 8 µl 3xProbenpuffer versetzt und mit Tris-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 24 µl aufgefüllt. Diese Ansätze wurden 5 min bei 95 °C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden jeweils 1 µl 2-Mercaptoethanol (Sigma) hinzupipettiert und die Ansätze in die Probentaschen eines diskontinuierlichen Polyacrylamidgels (3,75 %iges Sammelgel/ 10 %iges Trenngel) geladen. In einer mit Puffer gefüllten Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurden die in den Proben enthaltenen Proteine dann nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Bereich: 27–250 kDa, 80–140 V ca. 3 h). Als Größen-Marker wurden in einer Geltasche 5 µl PageRuler™ "plus prestained protein ladder" (Fermentas Life Sciences, Burlington, Canada) aufgetragen.

Die im Polyacrylamidgel enthaltenen Proteine wurden in einer *Semi-dry*-Typ Blotting-Kammer (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) mit Blotting-Puffer auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran BA85, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) transferiert (16 V, 55 min; vgl. Rosenberg, 1996). Der Erfolg dieses Blotvorgangs wurde durch Anfärben der Membranen mit Ponceaurot S überprüft (nicht gezeigt). Nach Auswaschen des Ponceaurot S wurden die Membranen über Nacht in 10 % (w/v) Milchpulver (Blotting Grade, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in H_2O inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Nach Waschen mit PBS (3x 5 min) wurden die Membranen in den entsprechenden Verdünnungen (in PBS) des Primär-Antikörpers über Nacht (4 °C) inkubiert.

Nach Waschen mit PBS (3x 5 min) wurden die Membranen mit einem Esel-anti-Kaninchen- bzw. einem Schaf-anti-Maus-HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper (beide GE Healthcare Ltd., Buckinghamshire, UK) über Nacht (4 °C) inkubiert (1: 5.000 in PBS). Nach Waschen mit PBS (5x 5 min) wurde das Immunosignal durch Zugabe von Luminata™ Classico Western HRP Substrate (Millipore) sichtbar gemacht und auf einem Amersham Hyperfilm™ (GE Healthcare) festgehalten.

Polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen HCN1 (#AN-11; Epitop: aa6-24) wurden von Alomone Labs (Jerusalem, Israel) bezogen und in einer Verdünnungen von 1: 200 eingesetzt. Die Spezifität dieses Antikörpers wurde vorab an HEK293-Zellen getestet (nicht gezeigt), die mit humanen HCN1–4 Expressionsvektoren transfiziert worden waren (freundlicherweise von Prof. Bräuer zur Verfügung gestellt). Als interne Referenz wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen neuronales Klasse-III β-Tubulin (Tuj1) (HISS Diagnostics GmbH, Freiburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1: 10.000 verwendet.

Für die densitometrische Auswertung der Immunosignale wurde die Software ImageJ (Version 1.42q; National Intsitutes of Health, USA) verwendet.

2.7 Histochemische Darstellung Biocytin-markierter Neurone

Für die Darstellung abgeleiteter, mit Biocytin markierter, Neurone wurden die humanen Vibratomschnitte nach der Ableitung über Nacht in 4 % (w/v) PFA in PB (4 °C) fixiert. Nach Waschen in PBS (3x 15 min) wurden die Schnitte 3–4 h in 1 % TritonX-100 in PBS (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen (3x 15 min) und über Nacht (4 °C) in Alexa Fluor® 633-Streptavidin (Invitrogen Ltd., Paisley, UK) in PBS (1: 500) inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte gewaschen (PBS, 2x 15 min), auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen, über eine steigende Alkoholreihe dehydriert und mit Entellan (Merck) eingedeckelt (Protokol modifiziert nach Bullis *et al.*, 2007).

Mit Alexa Fluor® 633-Streptavidin gefärbte Präparate wurden mit einem Konfokalmikroskop (DMRE7, Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Deutschland) mit entsprechender Anregung (HeNe-Laser) untersucht. Von den markierten Neuronen (rot fluoreszierend) wurden je nach deren räumlicher Ausdehnung Serien (z-Stapel) mit etwa 200–300 Einzelbildern von verschiedenen Fokusebenen aufgenommen. Die in den Abbildungen gezeigten Mittelwert-Projektionen (Abb. 2) wurden für eine bessere Sichtbarkeit in negative Schwarz-Weiß-Bilder konvertiert.

3. Ergebnisse

3.1 Funktionelle Charakterisierung des I_h

3.1.1 Morphologie und intrinsische Eigenschaften neokortikaler Neurone

Pyramiden-Neurone der äußeren Körner- und äußeren Pyramidenzellschicht (Schichten II/III) wurden mit Infrarot-Videomikroskopie visualisiert (Abb. 2a, d, g) und mit *Patch-clamp*-Ableitungen (in der *whole-cell* Konfiguration) untersucht. Stabile Ableitungen konnten bei insgesamt 501 Neuronen von Patienten mit TLE (r = 104) und bei 38 Neuronen von Patienten mit FLE (r = 10) durchgeführt werden (Kriterien siehe 2.4). Wie in entsprechenden Neuronen bei Nagetieren (z. B. McCormick *et al*., 1985) lösten positive (depolarisierende) Strominjektionen auch in den humanen Neuronen mehr oder weniger regelmäßige Folgen von AP (Abb. 2c, f, i) aus. Zur weiteren Verifizierung dieses Zelltyps wurden einige humane Neurone während der Ableitung mit Biocytin markiert (Abb. 2b, e, h). Die untersuchten Zellen zeigten eine für Pyramiden-Neurone typische Morphologie mit vom Soma ausgehenden basalen und apikalen Dendriten, die verschieden dicht mit dendritischen Dornen besetzt sind. Weitere Beispiele sind bei Wierschke *et al*. (2010a, Abb. 1) gezeigt (vgl. Foehring *et al*., 1991).

Sehr wenige Neurone (~5 %) zeigten ein *Burst*-artiges Feuerverhalten (Abb. 3a). Solche intrinsischen *Burst*-Neurone stellen einen anderen Typ von Pyramiden-Neuronen dar (z. B. in Nagern: McCormick *et al*., 1985; Deisz, 1996; Huggenberger *et al*., 2009), wurden aber im humanen epileptogenen Neokortex bisher noch nicht beobachtet (Foehring *et al*., 1991). Exemplarisch wurde auch von einigen Neuronen mit spindelförmigem Soma (nicht gezeigt) abgeleitet. Diese Neurone (n = 16; z. B. Abb. 3b) zeigten bereits bei relativ kleinen Strominjektionen ein konstantes hochfrequentes Feuern (*Fast-spiking*-Neurone, McCormick *et al*., 1985). Solche Neurone wurden schon früher im humanen epileptogenen Neocortex beschrieben (Foehring *et al*., 1991; Menendez de la Prida *et al*., 2002) und repräsentieren höchstwahrscheinlich inhibitorische Interneurone (Markram *et al*., 2004). Im Folgenden werden nur regelmäßig feuernde Pyramiden-Neurone betrachtet. Diese sind experimentell leicht zugänglich und gehören zu dem am besten charakterisierten Neuronentyp des Säugerkortex.

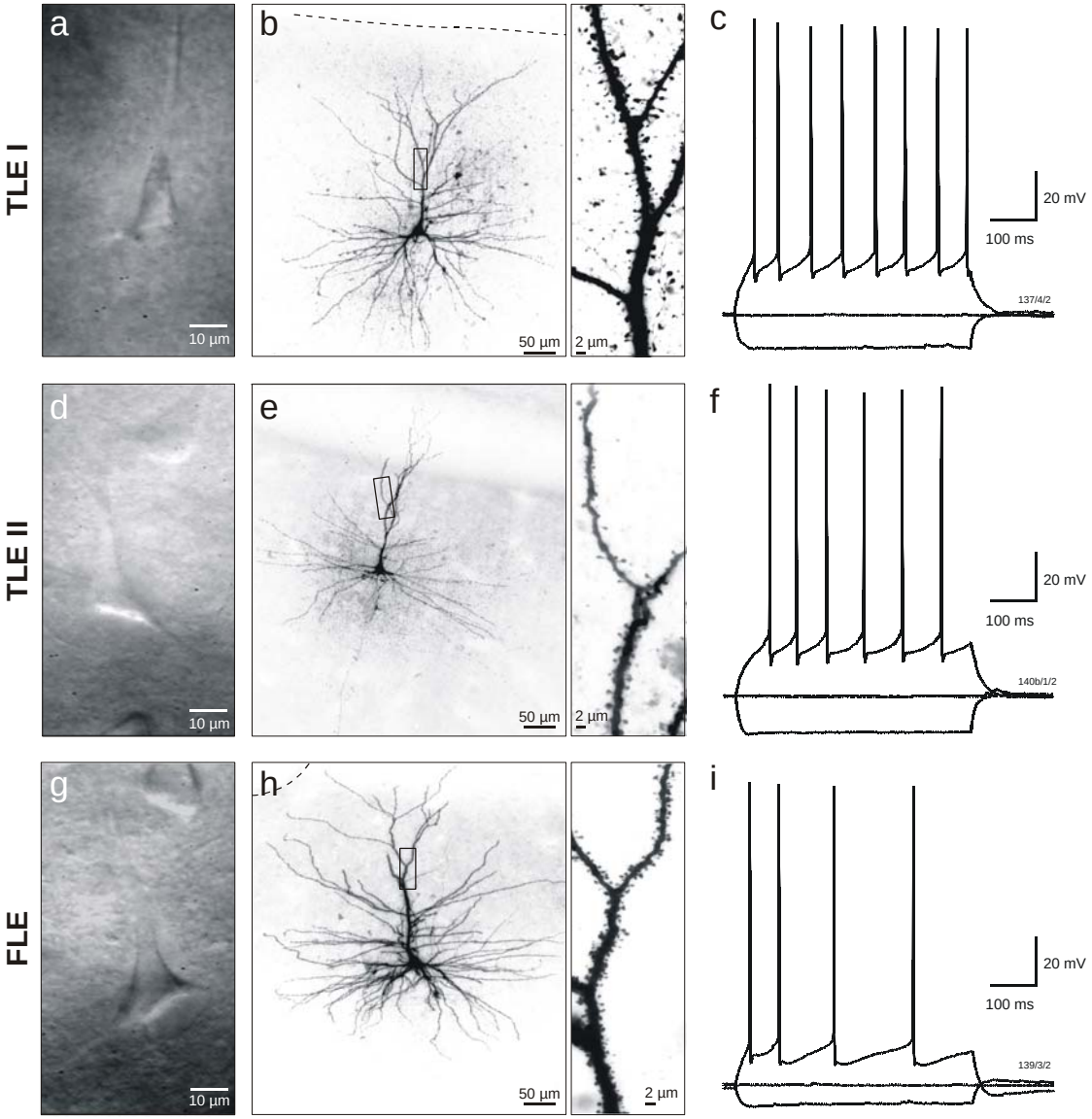

Abbildung 2. Morphologie und elektrophysiologische Eigenschaften humaner Kortex-Neurone. (a, d, g) Infrarot-videomikroskopische Bilder (aufgenommen während der Annäherung der *Patch-clamp* Elektrode) von drei Neuronen (a: 46-jähriger Patient mit Temporallappenepilepsie (TLE I), d: 47-jähriger Patient mit TLE (TLE II). g: 28-jährige Patientin mit Frontallappenepilepsie (FLE). Zu erkennen sind die pyramidenförmigen Somata und Ansätze der basalen und apikalen Dendriten. b, e, h) Histochemische Darstellung der Morphologie (Mittelwert-Projektionen aus mehreren konfokalmikroskopischen Einzelaufnahmen). Charakteristisch sind die komplexen Verzweigungen der apikalen und der basalen Dendriten. Jeweils rechts daneben ist ein Detail-Ausschnitt vom apikalen Dendriten (Rechtecke in b, e, h) gezeigt. Auffällig ist die variable Besetzung mit dendritischen Dornen. c, f, i) *Current-clamp*-Ableitungen bei verschiedenen Strominjektionen (-300, 0 und +300 pA bzw. + 150 pA in i) zeigen ein relativ regelmäßiges Feuern von Aktionspotentialen.

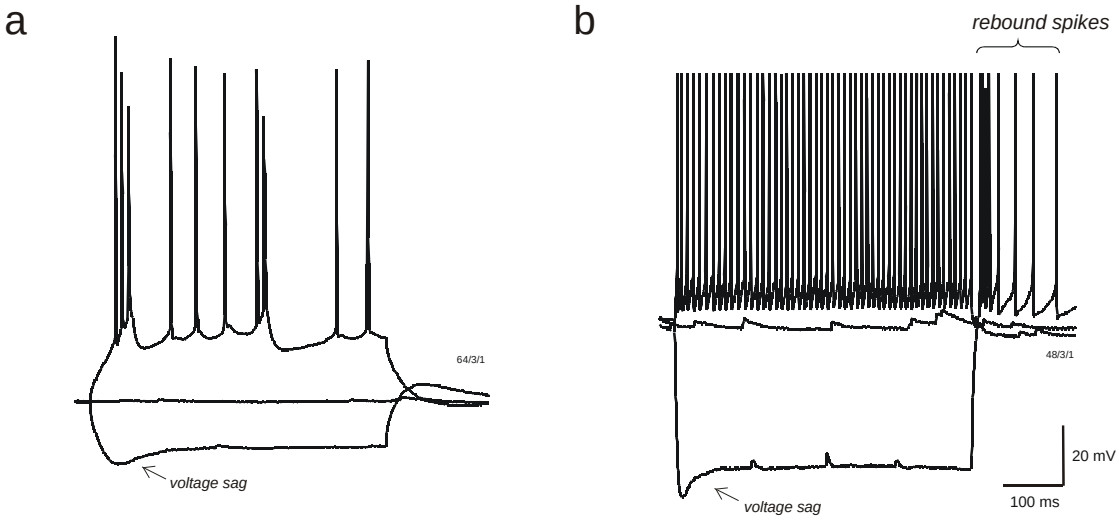

Abbildung 3. Weitere Arten von Feuerverhalten humaner neokortikaler Neurone.
a) *Current-clamp*-Ableitung (Strominjektionen: -300, 0, +200 pA; ACSF) von einem *Burst*-Neuron (48-jährige Patientin mit TLE). Im Gegensatz zu den meisten der untersuchten Neurone (vgl. Abb. 2), wies dieses Neuron distinkte langsame Depolarisationen mit einer Häufung von Aktionspotentialen (sog. *bursts*) auf. b) *Current-clamp*-Ableitung (Strominjektionen -300, 0, +100 pA; ACSF) von einem Neuron eines 43-jährigen TLE-Patienten. Dieses Neuron feuerte bereits bei geringen Strominjektionen hochfrequente Folgen von AP (*fast-spiking*, Amplituden gekürzt). Auch das Abschalten der negativen Strominjektion (untere Spur) löste AP (sog. *rebound spikes*) aus. Die in (b) gezeigte Skalierung gilt auch für (a). Beide Neurone wiesen bei negativer Strominjektion eine deutliche Abschwächung der Hyperpolarisation (*voltage sag*) auf.

Das V_m der Neurone betrug in TLE-Geweben -73,6 ± 4,5 mV (n = 501, r = 104) ähnlich wie das der Neurone aus FLE-Geweben (-74,8 ± 4,7 mV; n = 38, r = 10; $P > 0{,}05$). Als Referenz für „gesunde“ neokortikale Neurone wurden entsprechende Ableitungen auch bei Wistar-Ratten durchgeführt, dort betrug das V_m etwa -75 mV (Tabelle 1). Die Amplituden der AP (aAP) waren in den untersuchten TLE-Neuronen mit 111,4 ± 8,4 mV etwas kleiner als in FLE-Neuronen ($P = 0{,}0039$) oder Neuronen der Ratte ($P < 0{,}0001$).

Der neuronale Eingangswiderstand (R_n) wird als Maß für die Beteiligung intrinsischer Ionenströme an den Membraneigenschaften angesehen. In Neuronen aus TLE-Geweben wurden deutlich höhere R_n (69,2 ± 43,6 MΩ) gemessen als in Neuronen aus FLE-Geweben (45,7 ± 37,4 MΩ ; $P < 0{,}0001$). Diese höheren R_n in TLE-Neuronen deuten auf eine Verminderung intrinsischer Ionenströme wie dem I_h hin.

Negative (hyperpolarisierende) Strominjektionen erzeugten in einigen Neuronen (z. B. Abb. 3, 6a) eine zeitabhängige Abschwächung der Hyperpolarisation (z. B. Abb. 6a), die als *voltage sag* bezeichnet wird. Dieser *voltage sag* kommt durch die Aktivierung von HCN-Kanälen zustande (Harris & Constanti, 1995) und wurde auch schon in sehr frühen

Arbeiten am humanen epileptogenen Kortex beschrieben (Avoli & Olivier, 1989; Foehring & Waters, 1991). Da der *voltage sag* jedoch ein sehr indirektes Maß für den durch HCN-Kanäle vermittelten I_h darstellt (Aponte *et al.*, 2006; Huggenberger *et al.*, 2009), wurde von einer weiteren Quantifizierung abgesehen.

Tabelle 2 - Intrinsische neuronale Eigenschaften

Parameter	TLE	FLE	Ratte (SK)	Ratte (FK)
V_m [mV]	-73,6 ± 4,5	-74,8 ± 4,7	-74,7 ± 5,1	-74,9 ± 4,8
a_{AP} [mV]	111,4 ± 8,4**	115,2 ± 6,4	115,3 ± 8,3$^{\#\#\#}$	118,8 ± 5,1
R_n [MΩ]	69,4 ± 43,6***	45,7 ± 37,4	39,3 ± 19,0$^{\#\#\#}$	32,2 ± 8,9
	(n = 501; r = 104)	(n = 38; r = 10)	(n = 67)	(n = 14)
C_m [pF]	108,3 ± 53,8	114,1 ± 43,0	77,0 ± 34,8$^{\#\#\#}$	82,8 ± 47,4
	(n = 431; r = 98)	(n = 36; r = 10)	(n = 61)	(n = 14)

Intrinsische neuronale Eigenschaften von neokortikalen Pyramiden-Neuronen (Schicht II/III) in Geweben von Patienten mit Temporallappenepilepsie (TLE) und Frontallappenepilepsie (FLE) sowie von Neuronen im sensorimotorischen Kortex (SK) und frontalen Kortex (FK) der Wistar-Ratte. Alle Parameter wurden unter Kontrollbedingungen (ACSF) gemessen und sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. V_m = Ruhemembranpotential; a_{AP} = AP-Amplitude; R_n = neuronaler Eingangswiderstand; C_m = Membrankapazität (nicht in allen Neuronen gemessen). n = Anzahl der Neurone; r = Anzahl der Resektate. $^{**}P_{vs\ FLE} < 0{,}01$; $^{***}P_{vs\ FLE} < 0{,}0001$; $^{\#\#\#}P_{vs}$TLE < 0,0001. (Mann-Whitney U-Test).

3.1.2 Quantifizierung hyperpolarisations-aktivierter Ströme

Für eine direktere Messung des I_h im humanen epileptogenen Kortex, wurden die Neurone ausgehend von einem Haltepotential von -60 mV (in 10 mV Inkrementen) auf -140 mV hyperpolarisiert (*voltage-clamp*). Dabei wurden instantane und exponentiell verlaufende Strom-Komponenten aktiviert, deren Amplituden mit der Stärke der Hyperpolarisation zunahmen (Abb. 4a). Nach etablierten Daten von Rattenneuronen handelt es sich dabei um den instantanen Ba^{2+}-sensitiven, einwärts-gleichrichtenden K^+-Strom (I_{Kir}; siehe Nichols & Lopatin, 1997) und den langsam aktivierenden, persistierenden und ZD7288-sensitiven I_h (Sciancalepore & Constanti, 1998; Strauss *et al.*, 2004). Bei Letzterem ließen sich eine schnelle ($I_{h\text{-fast}}$) und eine langsamere Komponente ($I_{h\text{-slow}}$) unterscheiden (Abb. 4b). Dieses Phänomen wurde auch schon in Neuronen der Ratte (Solomon & Nerbonne, 1993; Strauss *et al.*, 2004) und der Maus (Huggenberger *et al.*, 2009) beobachtet.

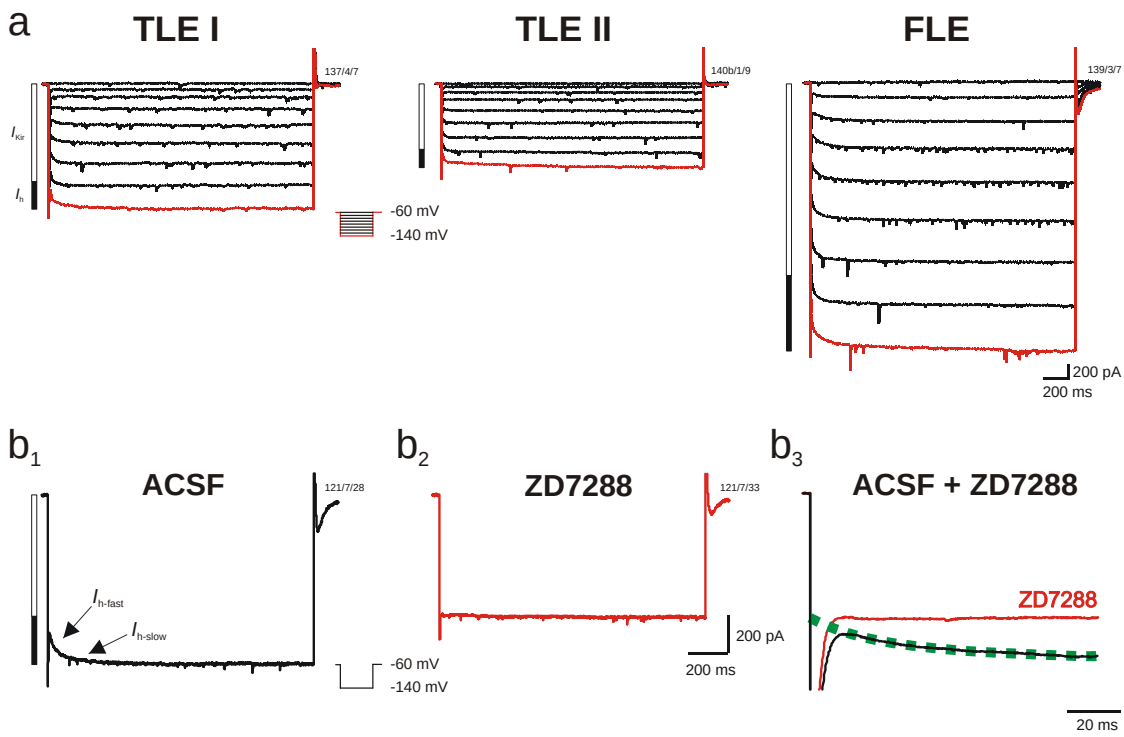

Abbildung 4. Hyperpolarisations-aktivierte Einwärtsströme humaner neokortikaler Neurone.
a) *Voltage-clamp*-Ableitungen von denselben Neuronen, die schon in Abb. 2 gezeigt wurden (Beschriftung entsprechend). Hyperpolarisationen (von -60 bis -140 mV in 10 mV Inkrementen, siehe Schema) aktivierten zwei verschiedene Typen von Einwärtsströmen: den instantanen einwärtsgleichrichtenden K^+-Strom (I_{Kir}) und den langsam aktivierenden I_h. Die Balken links neben den Stromspuren repräsentieren hier wie auch in den folgenden Abbildungen die Amplituden von I_{Kir} und I_h für die unterste Stromspur (rot, ΔV_m von -60 bis -140 mV). Im gezeigten FLE-Neuron konnten I_{Kir} und I_h mit wesentlich größeren Amplituden ausgelöst werden. b) Stromspuren eines anderen humanen Neurons (58-jähriger TLE-Patient) unter Kontrollbedingungen (ASCF, b_1) und in Gegenwart des HCN-Kanal-Antagonisten ZD7288 (50 µM, b_2). Nur eine Hyperpolarisation (ΔV_m von -60mV bis -140mV) ist gezeigt. Beim I_h lässt sich eine schnelle ($I_{h\text{-fast}}$) und einer langsame Komponente ($I_{h\text{-slow}}$) unterscheiden. Im Gegensatz zum I_{Kir} sind die I_h-Komponenten ZD7288-sensitiv. b_3) Überlagerung der initialen Abschnitte beider Stromspuren (ACSF + ZD7288) sowie eine zur Quantifizierung angenäherte Exponentialfunktion (repräsentiert durch Quadrate).

Erste Betrachtungen zeigten eine erhebliche Variabilität zwischen verschiedenen humanen Geweben v. a. in der Amplitude des I_{Kir} und I_h. Insbesondere FLE-Gewebe zeichneten sich dabei durch besonders große Stromamplituden aus (Abb. 4a). Für eine genaue Quantifizierung wurden die Amplituden und Zeitkonstanten aller drei Komponenten (I_{Kir}, $I_{h\text{-fast}}$ und $I_{h\text{-slow}}$) bei voller Aktivierung (bei -140 mV) bestimmt, indem den entsprechenden Stromspuren Exponentialfunktionen (3. Ordnung) angenähert wurden (siehe 2.5; Abb. 4b_3).

Tabelle 3 – Hyperpolarisations-aktivierte Ströme (I_{Kir} und I_h)

Parameter	TLE	FLE	Ratte (SK)	Ratte (FK)
a(I_{Kir}) [pA]	1435 ± 772***	2107 ± 981	2241 ± 975$^{###}$	2723 ± 846
τ(I_{Kir}) [ms]	2,8 ± 1,5*	2,2 ± 0,9	1,6 ± 0,9$^{###}$	2,1 ± 0,7
a($I_{h\text{-fast}}$) [pA]	285 ± 208***	536 ± 289	503 ± 199$^{###}$	503 ± 196
τ($I_{h\text{-fast}}$) [ms]	37,5 ± 33,2***	16,2 ± 7,5	15,5 ± 10,5$^{###}$	15,9 ± 8,7
	(n = 409; r = 103)	(n = 34; r = 10)	(n = 58)	(n = 14)
a($I_{h\text{-slow}}$) [pA]	72 ± 102***	176 ± 155	64 ± 61	77 ± 89
τ($I_{h\text{-slow}}$) [ms]	468 ± 361**	300 ± 184	448 ± 217	497 ± 213
	(n = 275; r = 98)	(n = 27; r = 10)	(n = 45)	(n = 14)

Amplituden (a) und Zeitkonstanten (τ) des einwärtsgleichrichtenden K^+-Strom (I_{Kir}) sowie der schnellen ($I_{h\text{-fast}}$) und langsamen I_H-Komponente ($I_{h\text{-slow}}$) in Pyramiden-Neuronen (Schicht II/III) in Temporallappenepilepsie- (TLE) und Frontallappenepilepsie-Geweben (FLE) sowie Pyramiden-Neuronen im sensorimotorischen Kortex (SK) und frontalem Kortex (FK) der Wistar-Ratte (Schicht II/III). Die Ströme wurden unter Kontrollbedingungen (ACSF) bei maximaler Aktivierung (-140 mV) gemessen und durch Annäherung einer Exponentialfunktion quantifiziert. Die Komponente $I_{h\text{-slow}}$ war nicht in allen Neuronen ausgeprägt. Mittelwert ± Standardabweichung. n = Anzahl der Neurone; r = Anzahl der Resektate. *$P_{vs\ FLE} < 0{,}05$; **$P_{vs\ FLE} < 0{,}01$; ***$P_{vs\ FLE} < 0{,}0001$; $^{###}P_{vs\ TLE} < 0{,}0001$ (Mann-Whitney U-Test).

Die ermittelten Werte sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Amplitude des I_{Kir} a(I_{Kir}) war in Neuronen aus TLE-Geweben etwa 32 % kleiner als in Neuronen aus FLE-Geweben ($P < 0{,}0001$). Interessanterweise waren die in den FLE-Geweben gemessenen Werte denen, die bei Vergleichsmessungen im somatosensorischen Kortex der Ratte gemessen wurden sehr ähnlich. Die Zeitkonstante der I_{Kir}-Komponente τ(I_{Kir}) war in TLE-Geweben etwas kleiner als in FLE-Geweben ($P = 0{,}021$). Im sensomotorischen Kortex der Ratte wurden kleinere Werte für τ(I_{Kir}) als in den humanen Geweben gemessen. Von weiteren quantitativen Betrachtungen des I_{Kir} wurde abgesehen, da im Bereich der kapazitiven Transiente reelle Datenpunkte für eine exakte Quantifizierung fehlen (Abb. 4b).

Die Amplituden der $I_{h\text{-fast}}$ a($I_{h\text{-fast}}$) waren in Geweben von Patienten mit TLE wesentlich kleiner als in Geweben von Patienten mit FLE ($P < 0{,}0001$; Abb. 4a). Die in den FLE-Geweben gemessenen Werte waren wiederum denen im Kortex der Ratte sehr ähnlich (siehe Abb. 2 in Wierschke *et al.*, 2010a). Neben der geringeren Amplitude zeigte der $I_{h\text{-fast}}$ in TLE-Geweben auch eine langsamere Aktivierung. Die Zeitkonstante τ($I_{h\text{-fast}}$) war in TLE-Geweben mehr als doppelt so groß wie in den FLE Geweben ($P < 0{,}0001$). Letztere zeigten ähnliche Werte wie die untersuchten Rattenneurone.

Die Amplituden der $I_{h\text{-slow}}$ a($I_{h\text{-slow}}$) waren sehr variabel. In einigen Neuronen wurden Werte von ~200 pA gemessen, während in anderen Neuronen eine solche Komponente kaum zu erkennen war. In TLE-Geweben zeigte diese Komponente kleinere Amplituden ($P < 0{,}0001$) und eine größere $\tau(I_{h\text{-slow}})$ d. h. langsamere Aktivierung als in FLE-Geweben ($P = 0{,}0081$). In den Rattenneuronen wurden etwas kleinere Amplituden für die $I_{h\text{-slow}}$ als in den humanen Neuronen gemessen. Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant.

Um auszuschließen, dass Unterschiede in den Amplituden der I_h-Komponenten durch unterschiedliche Größen (Membranoberflächen) der Neurone beeinflusst sind, werden im Folgenden nur die Stromdichten (Strom-Amplitude/ Membrankapazität, Tabelle 2; siehe Strauss *et al.*, 2004) betrachtet. Die Stromdichte der $I_{h\text{-fast}}$ betrug in TLE-Neuronen 2,7 ± 1,6 pA/pF (n = 389; r = 98) und war damit wesentlich kleiner als in FLE-Neuronen 4,8 ± 2,1 pA/pF (n = 34; r = 10; $P < 0{,}0001$). Noch höhere Werte ergaben sich für Rattenneurone (z. B. 7,3 ± 3,4 pA/pF; n = 56 im sensomotorischen Kortex). Die Dichten der $I_{h\text{-slow}}$ waren in TLE-Neuronen nur etwa halb so groß wie in FLE-Neuronen (TLE: 0,7 ± 1,1 pA/pF, n = 260, r = 97; FLE: 1,5 ± 1,3 pA/pF, n = 27, r = 10; $P < 0{,}0001$), jedoch vergleichbar mit Werten von Rattenneuronen (sensomotorischer Kortex: 0,9 ± 1,0 pA/pF, n = 43; $P > 0{,}05$).

Interessanterweise liegen die Höchstwerte für die Stromdichten der $I_{h\text{-fast}}$ in den epilepsiechirurgischen Geweben im Bereich des in der Ratte gemessenen Mittelwertes (z. B. 90. Perzentil: 6,4 ± 1,6 pA/pF (TLE) bzw. 7,3 ± 1,5 pA/pF (FLE). Die 10 % der Neurone mit den niedrigsten Werten (10. Perzentil) hatten Werte von 0,9 ± 0,2 pA/pF (TLE) bzw. 1,5 ± 0,4 pA/pF (FLE). Derart niedrige Werte wurden im Kortex der Ratte selten gemessen (Neurone im 10. Perzentil: 3,0 ± 0,5 pA/pF). Somit ist davon auszugehen, dass der kleinere Mittelwert v. a. durch eine hohe Anzahl von Neuronen mit niedrigen Werten zustande kommt.

Unklar ist, ob die unterschiedlichen $I_{h\text{-fast}}$-Dichten in TLE- und FLE-Geweben durch regional-spezifische Unterschiede in der Expression von HCN-Kanälen bedingt sind. Diese Frage kann am humanen Gewebe nicht beantwortet werden, da Teilresektionen des Temporallappens und des Frontallappens nicht durchgeführt werden. Nach Messungen im Neokortex der Ratte scheinen regionale Unterschiede jedoch eher unwahrscheinlich. Die intrinsischen Eigenschaften (Tabelle 2) und hyperpolarisations-aktivierten Ströme (Tabelle 3) waren zwischen Neuronen im sensomotorischen Kortex und im frontalen Kortex (alle Schicht II/III) der Ratte ähnlich ($P > 0.05$). Im frontalen Kortex der Ratte betrug die Stromdichte 7,6 ± 4,5 pA/pF ($I_{h\text{-fast}}$; n = 14) bzw. 1,3 ± 1,5 pA/pF ($I_{h\text{-slow}}$; n = 13).

3.1.3 Pharmakologische Charakterisierung

Um pharmakologisch zu überprüfen, ob es sich bei den in den humanen Neuronen beobachteten Stromkomponenten (siehe oben) tatsächlich um den I_{Kir} und den I_h handelt, wurden Messungen auch in Gegenwart etablierter Antagonisten durchgeführt (Applikation über die Bad-Lösung, mindestens 10 min Einwaschen).

Bariumionen blockieren neben vielen depolarisations-aktivierten K^+-Strömen auch den I_{Kir} (Alagem *et al.*, 2001). In TLE-Neuronen führte die Applikation von $BaCl_2$ (Ba^{2+}; 1 mM) zu einer deutlichen Depolarisation des V_m (Kontrolle: -73,9 ± 3,6 mV; Ba^{2+}: -67,5 ± 4,4 mV; n = 87, r = 39; $P < 0{,}0001$) und zu einer drastischen Erhöhung des R_n (Kontrolle: 61,7 ± 40,8 MΩ; Ba^{2+}: 207,5 ± 112,3 MΩ; $P < 0{,}0001$; Abb. 5a, b). Weiterhin kam es zu einer deutlichen Verstärkung des *voltage sag*, auch wenn dieser in der Kontrollmessung (ACSF) kaum sichtbar war (z. B. Abb 5a). In 44 von 87 Neuronen traten auch *rebound*-AP in Gegenwart von Ba^{2+} auf. Die gleichen Effekte von Ba^{2+} wurden auch in FLE-Neuronen (n = 15; r = 6) und kortikalen Neuronen der Ratte beobachtet (nicht gezeigt).

Wie nach etablierten Daten von Ratten (z. B. Sciancalepore & Constanti, 1998) zu erwarten, führte Ba^{2+} auch in TLE-Neuronen zu einer starken Verminderung der a(I_{Kir}) (Kontrolle: 1722 ± 852 pA; Ba^{2+}: 290 ± 234 pA; n = 87, r = 39; $P < 0{,}0001$; Abb. 5c, d). Dies zeigt, dass die entsprechende Komponente tatsächlich von Ba^{2+}-sensitiven I_{Kir}-Typ-K^+-Kanälen vermittelt ist. Unerwarteterweise führte Ba^{2+} in denselben Neuronen aber auch zu einer Erhöhung des Gesamt-I_h ($I_{h\text{-fast}}$ und $I_{h\text{-slow}}$; Kontrolle: 449 ± 336 pA; Ba^{2+}: 578 ± 365 pA; $P < 0{,}0009$; Abb. 5d). Die Gründe dafür sind unklar, zumal bei Neuronen des Thalamus (McCormick & Pape, 1990) und des Hippokampus der Ratte (van Welie *et al.*, 2005) eher Verminderungen des I_h durch Ba^{2+} beschrieben worden sind. Möglicherweise sind die größeren I_h-Amplituden in Ba^{2+} durch einen besseren ‚*Space clamp*' d. h. durch eine bessere Erfassung der von dendritisch lokalisierten HCN-Kanälen vermittelten Ströme (Williams & Stuart, 2000; Lörincz *et al.*, 2002) verursacht.

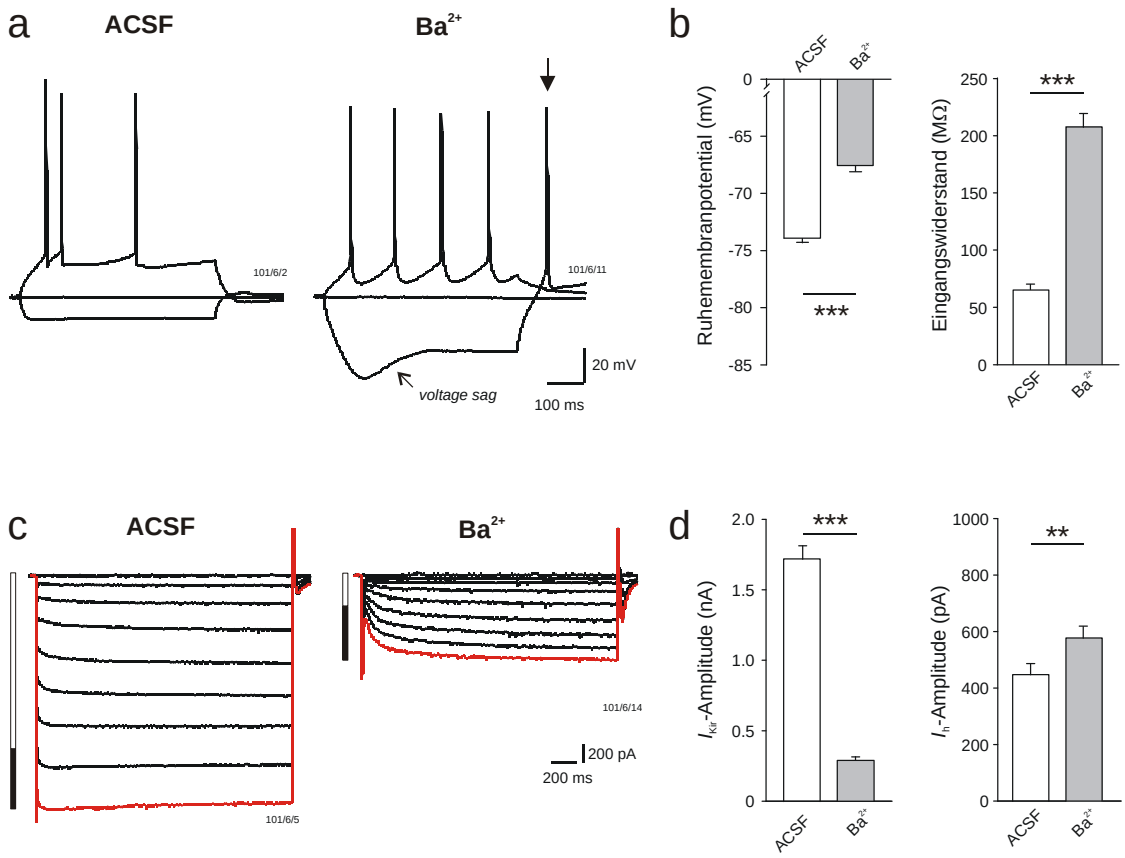

Abbildung 5. Effekte von Ba^{2+} auf humane neokortikale Neurone (TLE).
a) *Current-clamp*-Ableitungen von einem Neuron (5-jähriger TLE-Patient) bei verschiedenen Strominjektionen unter Kontrollbedingungen (ASCF; -300, 0, +250 pA) und in Gegenwart von 1 mM Bariumchlorid (Ba^{2+}; -300, 0, +100 pA). Auffällig ist die Zunahme des *voltage sag* in Ba^{2+} und das Auftreten eines *rebound*-AP nach Abschalten der negativen Strominjektion (Pfeil). b) Ruhemembranpotential und Eingangswiderstand (Mittelwert + Standardfehler) unter Kontrollbedingungen und in Ba^{2+} (n = 87; r = 39). c) *Voltage-clamp*-Ableitungen vom gleichen Neuron wie in (a). Einwärtsströme I_{Kir} und I_h wurden mit ΔV_m von -60 mV auf -140 mV (10 mV Inkrement) ausgelöst. Die Balken links neben den Stromspuren repräsentieren die Amplituden des I_{Kir} (weiß) und I_h (schwarz) für die unterste Stromspur (rot, von -60 mV auf -140 mV). Beachtenswert ist die erhebliche Verminderung des I_{Kir} in Ba^{2+} d) I_{Kir}- und I_h-Amplituden (bei -140 mV) unter Kontrollbedingungen (ACSF) und in Ba^{2+} (n = 81; r = 39). $^{**}P < 0{,}001$; $^{***}P < 0{,}0001$

Um zu verifizieren, ob die als I_h-Komponenten bezeichneten Ströme tatsächlich von HCN-Kanälen vermittelt werden, wurde der etablierte Antagonist ZD7288 (Harris & Constanti, 1995; Cheng *et al.*, 2007) in einer Konzentration von 50 µM appliziert. ZD7288 führte in TLE-Neuronen zu einer geringen aber signifikanten Hyperpolarisation des V_m (Kontrolle: -75,4 ± 2,5 mV; ZD7288: -78,0 ± 3,0 mV; n = 15, r = 13; P = 0,007) und einer Erhöhung des R_n (Kontrolle: 62,3 ± 27,3 MΩ; ZD7288: 81,6 ± 38,9 MΩ; P = 0,0013; Abb. 6b). Desweiteren kam es in Gegenwart von ZD7288 zu einem nahezu vollständigen Block des

voltage sag (Abb. 6a). In 6 von 15 Neuronen wurde durch die ZD7288-Applikation ein *Burst*-Verhalten in ursprünglich regelmäßig feuernden Neuronen induziert (siehe Abb. 5 in Wierschke *et al.*, 2010b). Wie nach etablierten Daten von Ratten (Harris & Constanti, 1995; Gasparini & DiFrancesco, 1997) zu erwarten, eliminierte ZD7288 die I_h-Komponenten fast vollständig, während die a(I_{Kir}) nahezu unverändert blieb (Abb. 4b und 5c, d). Auch in FLE-Gewebe zeigte ZD7288 die oben beschriebenen Effekte (n = 2, r = 1; nicht gezeigt).

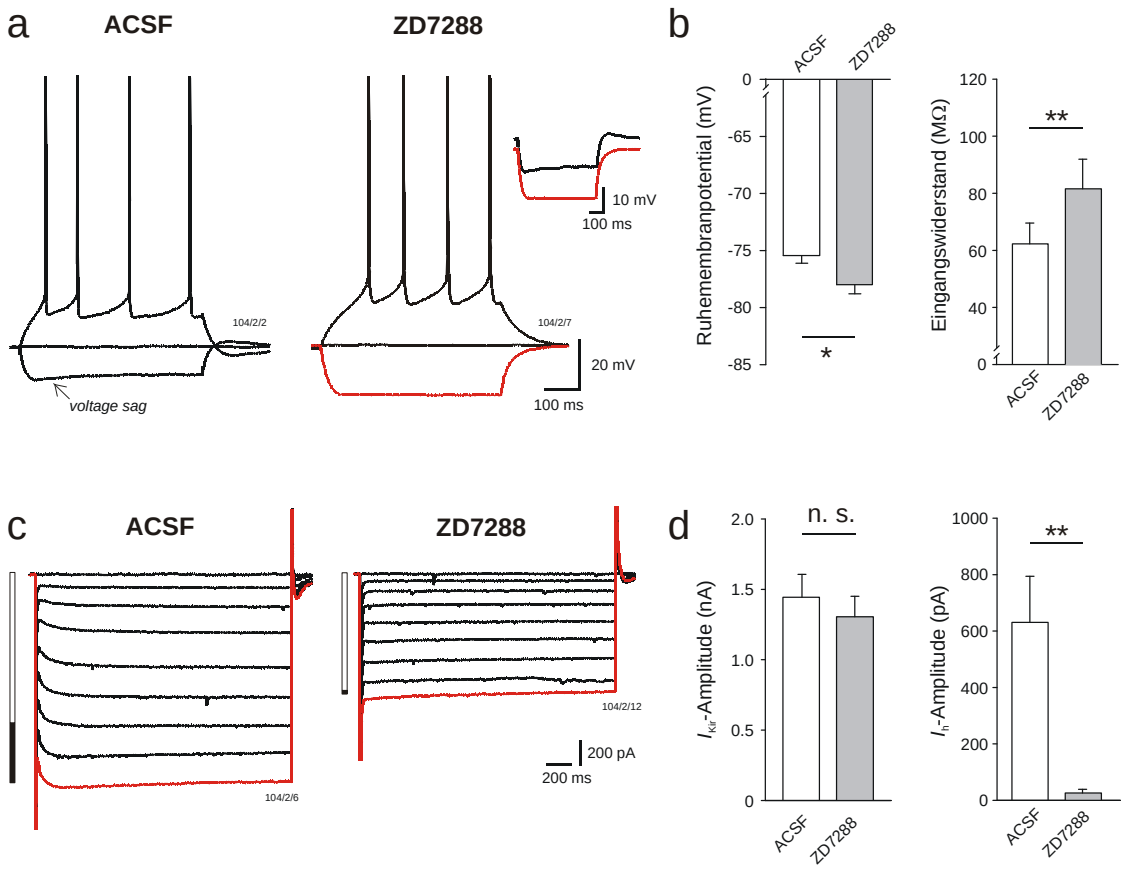

Abbildung 6. Effekte des HCN-Kanal-Antagonisten ZD7288 auf TLE-Neurone.
a) *Current-clamp*-Ableitungen von einem neokortikalen Neuron (51-jähriger TLE-Patient) bei verschiedenen Strominjektionen (-300, 0, +150 pA) unter Kontrollbedingungen (ACSF) und in Gegenwart von ZD7288 (50 µM). Der kleine *voltage sag* während der negativen Strominjektion ist in Gegenwart von ZD7288 vollständig antagonisiert (siehe Überlagerung der jeweils unteren Potentialspuren rechts neben der Ableitung in ZD7288) b) Ruhemembranpotential und Eingangswiderstand (Mittelwert + Standardfehler) unter Kontrollbedingungen und in ZD7288 (n = 15; r = 13). c) *Voltage-clamp*-Ableitungen des gleichen Neurons unter Kontrollbedingungen (ACSF) und in ZD7288. I_{Kir} und I_h wurden mit ΔV_m von -60 mV auf -140 mV (10 mV Inkrement) ausgelöst. Beachtenswert ist, dass ZD7288 die I_h-Komponenten (schwarzer Balken) aber nicht den I_{Kir} (weißer Balken) antagonisiert. d) I_{Kir}- und I_h-Amplituden (bei -140 mV) unter Kontrollbedingungen (ACSF) und in ZD7288 (n = 13; r = 11). n. s. nicht signifikant, *P < 0,05, **P < 0,001

3.1.4 Biophysikalische Eigenschaften des I_h

Um die biophysikalischen Eigenschaften des I_h in neokortikalen Neuronen eingehender zu untersuchen, wurde der I_h in einem Teil der Neurone pharmakologisch isoliert. Dazu wurden der Badlösung Ba^{2+} (1 mM), Ni^{2+} (200 µM) und TTX (0,1–0,5 µM) zugegeben, um den I_{Kir}, den I_T und Na^+-Aktionspotentiale zu blockieren.

3.1.4.1 Spannungsabhängigkeit

Die Spannungsabhängigkeit des (pharmakologisch isolierten) I_h könnte Hinweise auf die am gemessenen Strom beteiligten Typen von Untereinheiten liefern (siehe Stieber *et al.*, 2005). Deshalb wurden in einem Teil der humanen Neurone Aktivierungskurven bestimmt. Dazu wurden die normalisierten Amplituden der *tail*-Ströme, die nach Ende der Hyperpolarisationen entstehen (Abb. 7a–c) gegen das vorangegangene Kommandopotential aufgetragen (Abb. 7d). Zur Quantifizierung dieser Aktivierungskurven wurden Boltzmann-Funktionen (siehe 2.5) angenähert.

In TLE-Geweben betrug das Potential der halb-maximalen Aktivierung ($V_{1/2}$) -97,4 ± 7,0 mV (n = 20, r = 10) und ist damit etwas negativer als in Rattenneuronen (-92,5 ± 4,7 mV; n = 8; P = 0,049; siehe Wierschke *et al.*, 2010a). Der Anstieg der Aktivierungskurven k war in diesen Neuronen jedoch ähnlich (TLE: 10,4 ± 3,2; Ratte: 10,2 ± 3,7; $P > 0,05$).

Ein erster Vergleich von verschiedenen TLE-Geweben hinsichtlich der Anfallshäufigkeit bei den jeweiligen Patienten (zur Gruppeneinteilung siehe 3.1.6) zeigte keinen wesentlichen Unterschied in den Aktivierungskurven (Abb. 7d; $P > 0,05$). Bei TLE-Patienten mit wenig Anfällen betrug $V_{1/2}$ -96,6 ± 3,9 mV und k 9,7 ± 2,5 (n = 4; r = 4). Bei TLE-Patienten mit vielen Anfällen ergibt sich für $V_{1/2}$ ein Wert von -97,6 ± 7,6 mV bei einem k von 10,5 ± 3,4 (n = 16; r = 6). In FLE-Geweben wurde für $V_{1/2}$ -98,1 ± 7,8 mV und für k 11,5 ± 0,8 gemessen (n = 3, r = 2).

Dass der hier angegebene Mittelwert für das $V_{1/2}$ von 20 TLE-Neuronen (-97,4 mV) weniger negativ ist als der vorher publizierte Mittelwert von 8 Neuronen (-101,1 ± 8,7 mV; Wierschke *et al.*, 2010a) liegt daran, dass in der aktuellen Stichprobe (mittlere $I_{h\text{-fast}}$-Dichte 2,9 pA/pF; n = 20) mehr Neurone mit einem eher „normalen“ I_h enthalten sind als in der ursprünglichen Stichprobe ($I_{h\text{-fast}}$-Dichte: 2,3 pA/pF; n = 8).

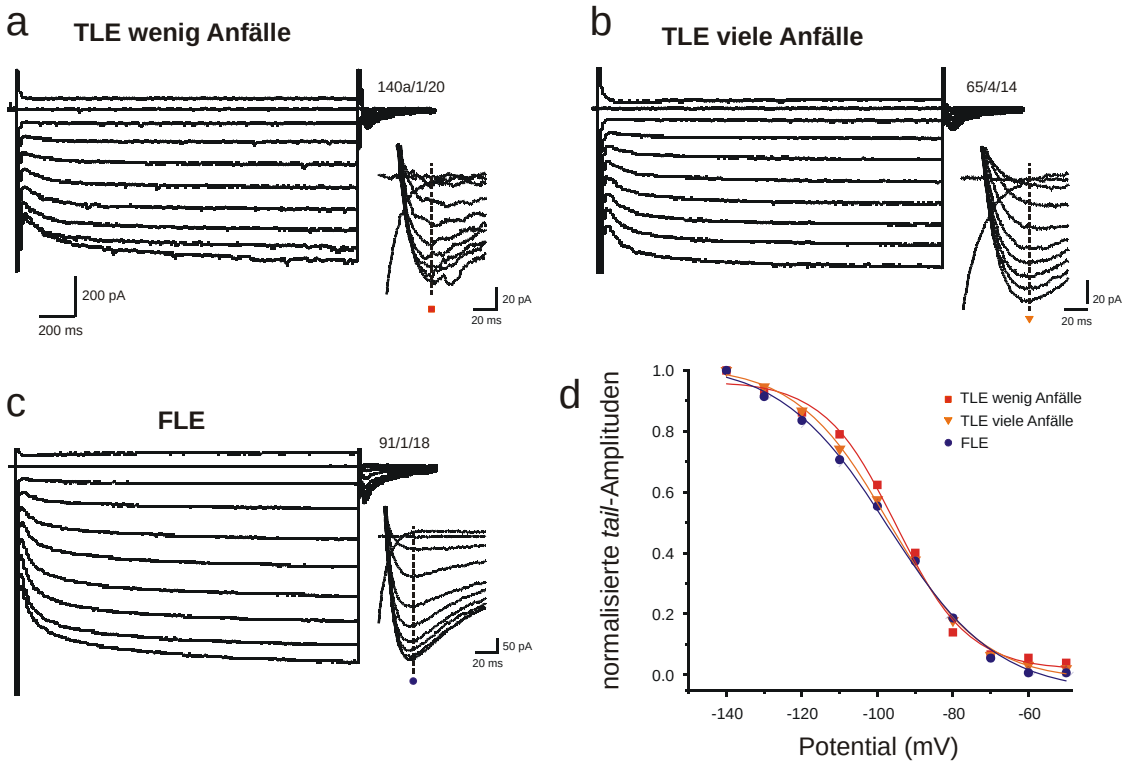

Abbildung 7. Spannungsabhängigkeit des pharmakologisch isolierten I_h in humanen Neuronen. a–c) *Voltage-clamp*-Ableitungen von drei Neuronen (a: 47-jähriger Patient mit TLE (wenig Anfälle, siehe 3.1.6), b: 58-jährige Patientin mit TLE (viele Anfälle), c: 10-jähriger Patient mit FLE). Durch Deaktivierung des I_h nach Abschalten der Hyperpolarisationen treten typische *tail*-Ströme auf (rechts neben der jeweiligen Ableitung vergrößert dargestellt). Alle gezeigten Ableitungen in Gegenwart von 1 mM Ba^{2+}, 200 µM Ni^{2+} und 0,5 µM Tetrodotoxin. d) Aktivierungskurven des isolierten I_h (Auftragung der normalisierten *tail*-Amplituden gegen das vorangegangene V_m) für die jeweiligen Patientengruppen wie angegeben. Die Linien repräsentieren Boltzmann-Funktionen, die an die jeweiligen Mittelwerte angenähert wurden. TLE wenig Anfälle (n = 4, r = 4), TLE viele Anfälle (n = 16, r = 6), FLE (n = 3, r = 2).

3.1.4.2 Umkehrpotential

Das Umkehrpotential (V_{rev}) ist ein Maß für die Art der am Strom beteiligten Ionen. Um das V_{rev} des (pharmakologisch isolierten) I_h zu bestimmen, wurden *tail*-Ströme durch Sprünge zu verschiedenen Kommandopotentialen nach vollständiger Aktivierung (bei -140 mV) ausgelöst (Abb. 8a). Die Auftragung der *tail*-Amplituden gegen das Kommandopotential ergab, wie für verschiedene Rattenneurone gezeigt (McCormick & Pape, 1990; Maccaferri & McBain, 1996), auch in TLE-Geweben einen linearen Zusammenhang (Abb. 8b). Das V_{rev}, das sich aus dem Schnittpunkt der extrapolierten Geraden mit der Abszisse ergibt, betrug in den untersuchten TLE-Neuronen -40,7 ± 2,0 mV (n = 6; r = 4) und entspricht

damit etablierten Werten aus verschiedenen Hirnstrukturen der Ratte (Pape, 1996). Das im Vergleich zum V_m weniger negative V_{rev} kommt durch die gemischte Na^+/K^+-Leitfähigkeit der HCN-Kanäle zustande. Das über die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (siehe 2.5) errechnete Verhältnis von Na^+- zu K^+-Permeabilität beträgt in TLE-Neuronen 0,14 (vgl. Stieber *et al*., 2003: 0,3; Strauss *et al*., 2004: 0,1).

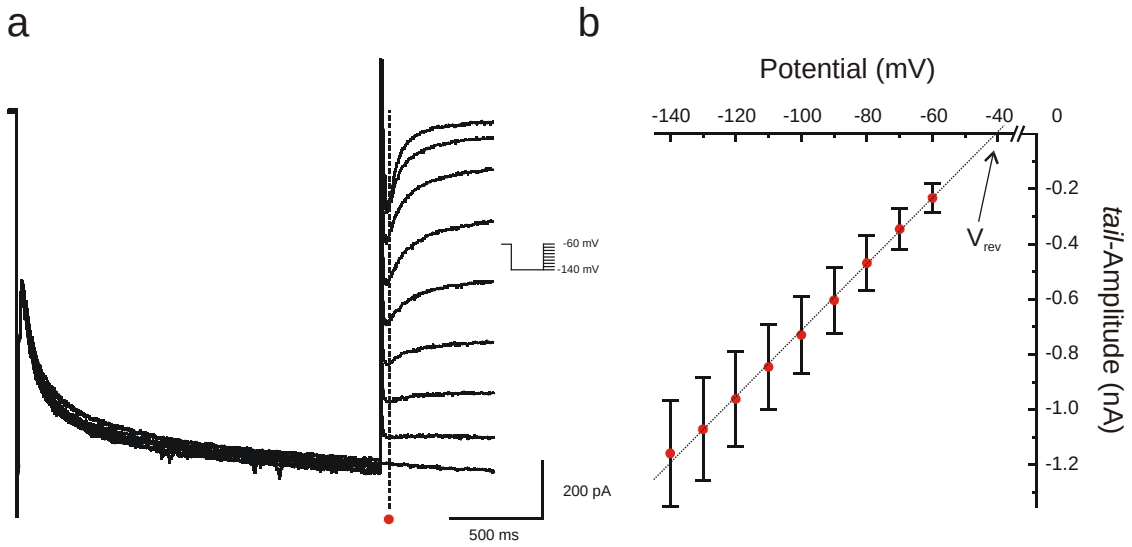

Abbildung 8. Umkehrpotential des pharmakologisch isolierten I_h in humanen Neuronen (TLE). a) *Voltage-clamp*-Ableitung von einem Neuron einer 58-jährigen Patientin mit TLE. Die *tail*-Ströme wurden durch Sprünge zu weniger negativen Potentialen nach vollständiger Aktivierung (bei -140 mV) ausgelöst (siehe Schema). (Ableitung in 1 mM Ba^{2+}, 200 µM Ni^{2+} und 0,5 µM Tetrodotoxin). b) Auftragung der *tail*-Amplituden gegen das jeweilige Kommandopotential (Mittelwert ± Standardfehler, n = 6, r = 4). Die Regressionsgerade (gestrichelte Linie), die den Mittelwerten angenähert wurde, ergab ein extrapoliertes Umkehrpotential (V_{rev}) von -40,7 mV.

3.1.5 Einflüsse auf die temporale Summation postsynaptischer Potentiale

Für hippokampale (Magee, 1999) und neokortikale Neurone (Strauss *et al*., 2004) wurde eine Dämpfung der temporalen Summation von EPSP durch den I_h beschrieben. Demnach könnte man bei Neuronen mit I_h-Defiziten mit einer erhöhten temporalen Summation rechnen. Um den Einfluss des I_H auf das Summationsverhalten zu untersuchen, wurden durch Strominjektionen Folgen von 5 artifiziellen EPSP (aEPSP) mit zwei verschiedenen Frequenzen (20 Hz und 50 Hz) ausgelöst (siehe 2.5). Gegenüber 'reellen' Stimulationen mit extrazellulären Elektroden hat dieses Verfahren den Vorteil, dass ausschließlich

postsynaptische Effekte, unabhängig von möglichen Änderungen der Transmitterfreisetzung (z. B. Chevaleyre & Castillo, 2002), untersucht werden können (Deisz *et al.*, 1991; Magee, 1999).

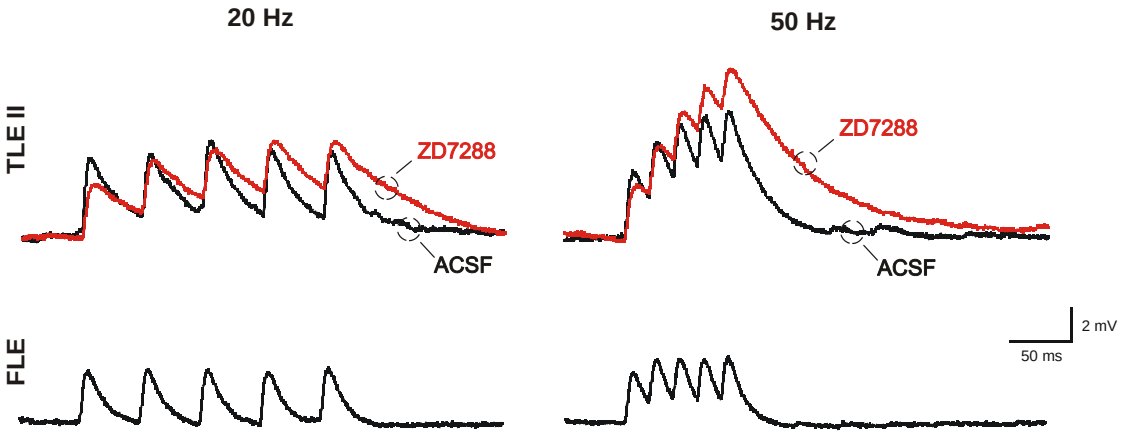

Abbildung 9. Temporale Summation von artifiziellen EPSP in humanen neokortikalen Neuronen. *Current-clamp*-Ableitungen von den gleichen Neuronen wie in Abb. 2 und Abb. 4 gezeigt (Beschriftung entsprechend) unter Kontrollbedingungen (ACSF) und während pharmakologischer Blockade des I_h (ZD7288, nur bei TLE II gemessen). Folgen von 5 artifiziellen EPSP mit einem zeitlichen Abstand von 50 ms (20 Hz) und 20 ms (50 Hz) wurden durch Injektion von exponentiellen Stromtransienten (siehe 2.5) ausgelöst. Beachtenswert ist die geringere temporale Summation im FLE-Neuron (starker I_h) im Vergleich zum TLE-Neuron (schwacher I_h) v. a. bei 50 Hz. Die Applikation von ZD7288 (50 µM) führte zu einer weiteren Verstärkung der temporalen Summation.

Die in TLE-Geweben untersuchen Neurone zeigten bei einer Frequenz von 20 Hz nur eine geringe temporale Summation (Abb. 9). Im Mittel war die Amplitude des letzten aEPSP 17,3 ± 14,6 % (n = 8; r = 4) größer als beim ersten aEPSP. In 2 Neuronen aus einem FLE-Gewebe wurde praktisch keine Summation (~1,4 %) gemessen. Bei einer Frequenz von 50 Hz erhöhte sich die Summation in TLE-Neuronen auf 71,3 ± 49,9 % (n = 8; r = 4) und in FLE-Neuronen auf 30,7 % (n = 2, r = 1). Die Anzahl der untersuchten Neurone ist für eine statistische Auswertung noch zu gering, dennoch zeichnet sich ab, dass die temporale Summation in TLE-Neuronen (d. h. in Geweben mit wenig I_h) in einem bestimmten Frequenzbereich erhöht sein könnte. Strauss *et al.* (2004) z. B. haben im sensomotorischen Kortex der Wistar-Ratte mit evozierten EPSPs bei 20 Hz Werte von ~2,5 % gemessen (50 Hz: ~75 %).

3.1.6 Korrelation mit den klinischen Daten

Die Interpretation von elektrophysiologischen Daten aus epilepsiechirurgischen Resektaten ist durch das Fehlen geeigneter Kontrollen erschwert (siehe 4.1.1). Deshalb wurden in bisherigen Arbeiten vor allem Referenzmessungen von Rattengeweben herangezogen (Deisz, 1999; Teichgräber *et al*., 2009). Die in dieser Arbeit erhobenen Referenzdaten (aus dem Neokortex der Wistar-Ratte) deuten auf eine pathologische Verminderung der schnellen I_h-Komponente v. a. in TLE-Geweben hin (siehe 3.1.2). Um dies unabhängig von Daten aus anderen Spezies zu überprüfen, wurde die Dichte des $I_{h\text{-fast}}$ mit der Häufigkeit der Anfälle korreliert. Dazu wurden die Werte von mindestens drei Neuronen (durchschnittlich 5 Neurone) eines Resektats (TLE) gemittelt und die Resektate in zwei Gruppen (wenig *vs.* viele Anfälle) eingeteilt.

Werden tonisch-klonische Anfälle (GM) betrachtet, zeigen sich in Resektaten von Patienten mit wenig GM (< 1 pro Jahr; Alter: 40,5 ± 16,4 Jahre) signifikant höhere Stromdichten (2,9 ± 1,0 pA/pF; r = 40) als in Resektaten von Patienten mit vielen GM (≥ 1 pro Jahr; Alter: 35,1 ± 14,0 Jahre; 2,4 ± 0,8 pA/pF; r = 30; P = 0,0240). Auch die Einteilung nach der Häufigkeit von komplex-partiellen Anfällen (CPS), die bei TLE weitaus häufiger sind als GM, ergab einen solchen Zusammenhang. In Resektaten von Patienten mit wenig CPS (< 104 pro Jahr; Alter: 38,0 ± 14,4 Jahre) betrug die mittlere Stromdichte 2,8 ± 1,0 pA/pF (r = 42) und in Resektaten von Patienten mit vielen CPS (≥ 104 pro Jahr; Alter: 37,6 ± 13,9) 2,2 ± 0,6 pA/pF (r = 13; P = 0,0072). In 69 % der Fälle führten beide Parameter (GM und CPS) zur gleichen Gruppeneinteilung. Deshalb wurden für die nachfolgenden Untersuchungen folgende Kategorien eingeführt: TLE „wenig Anfälle“ für Patienten mit < 1 GM und < 104 CPS pro Jahr und TLE „viele Anfälle“ für Patienten mit ≥ 1 GM oder ≥ 104 CPS pro Jahr (siehe Wierschke *et al*., 2010b)

3.2 Expression von HCN-Kanal-Untereinheiten

3.2.1 Evaluation von Referenzgenen in TLE Geweben

Die Expression der Untereinheiten HCN1–4 wurde mit reverser Transkription und anschließender quantitativer *real-time* PCR (RT-qPCR) untersucht (zur Übersicht siehe VanGuilder *et al*., 2008). Bei dieser Methode ist es üblich die Expression der untersuchten Gene auf die Expression eines endogenen Referenzgens zu normalisieren. Um ein geeignetes Referenzgen für eine verlässliche Quantifizierung in TLE-Geweben zu finden, wurde zunächst die Expression von 12 nach Literaturangaben potentiell geeigneten

Referenzgenen (Tabelle 4) in einer Auswahl verschiedener humaner Temporallappen-Gewebe (TLE und Autopsie-Kontrollen) gemessen.

Tabelle 4 - Potentielle Referenzgene für RT-qPCR-Messungen TLE-Geweben

Symbol	Name	Funktion/ Lokalisation	Referenzen
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-DH	Glykolyse	1, 2, 3
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase	Purin-Metabolismus	3
MAP2	Microtubuli-assoziiertes Protein 2	Cytoskelett	4
UBC	Ubiquitin C	Ubiquitinylierung	5
B2M	β-2-Mikroglobulin	Antigen-Präsentation	5
TBP	TATA-box-binding-Protein	Transkriptionsfaktor	5
SDHA	Succinat-DH, α-Untereinheit	Citrat-Zyklus	5
ACTB	β-Aktin	Cytoskelett	3
SYP	Synaptophysin	synaptische Vesikel	4
CYP	Cyclophilin A	Proteinfaltung	4
NSE	neuronen-spezifische Enolase	Glucose-Metabolismus	6
MRPL	39S ribosomales Protein L28	Mitochondrien	2

DH = Dehydrogenase.
Literaturangaben: [1]Blümcke *et al.*, 2000; [2]Jamali *et al.*, 2006; [3]Pernot *et al.*, 2010; [4]J. Chen *et al.*, 2001; [5]Coulson *et al.*, 2008; [6]Dwivedi *et al.*, 2005. Für Details zu den verwendeten Assays siehe (Tabelle 1)

3.2.1.1 Deskriptive Statistik der Genexpressions-Daten

Die Expression der potentiellen Referenzgene wurde in Form von C_T-Werten (Anzahl der PCR-Zyklen, die benötigt werden, um die Ausgangs-cDNA bis zu einer festgelegten Menge zu amplifizieren) in Gewebeproben von TLE-Patienten mit wenig Anfällen (Alter: 34,3 ± 19,7 Jahre), TLE-Patienten mit vielen Anfällen (Alter: 36,8 ± 12,7 Jahre) und Autopsie-Kontrollen (Alter: 35,8 ± 11,7 Jahre; jeweils n = 6) gemessen.

Streuungsdiagramme der (noch nicht normalisierten) C_T-Werte aus allen Proben (gesamt) und aus den einzelnen Patientengruppen sind in Abb. 10 gezeigt. Alle getesteten Gene zeigten eine erhebliche Variabilität der C_T-Werte. Die größte Streuung ergab sich bei der Messung der GAPDH-Expression (Bereich der C_T-Werte: 19,4–25,2), während ACTB die kleinste Streuung der C_T-Werte (Bereich: 21,4–25,5) aufwies. Bei der individuellen

Betrachtung der einzelnen Patientengruppen zeigte sich, dass vor allem die TLE-Gewebe, insbesondere jene von Patienten mit vielen Anfällen, eine hohe Variabilität in den C_T-Werten aufweisen. Die in den Geweben der Kontrollgruppe gemessenen Werte waren, trotz relativ großer Unterschiede in den PMI (2,5–14 h) wesentlich homogener.

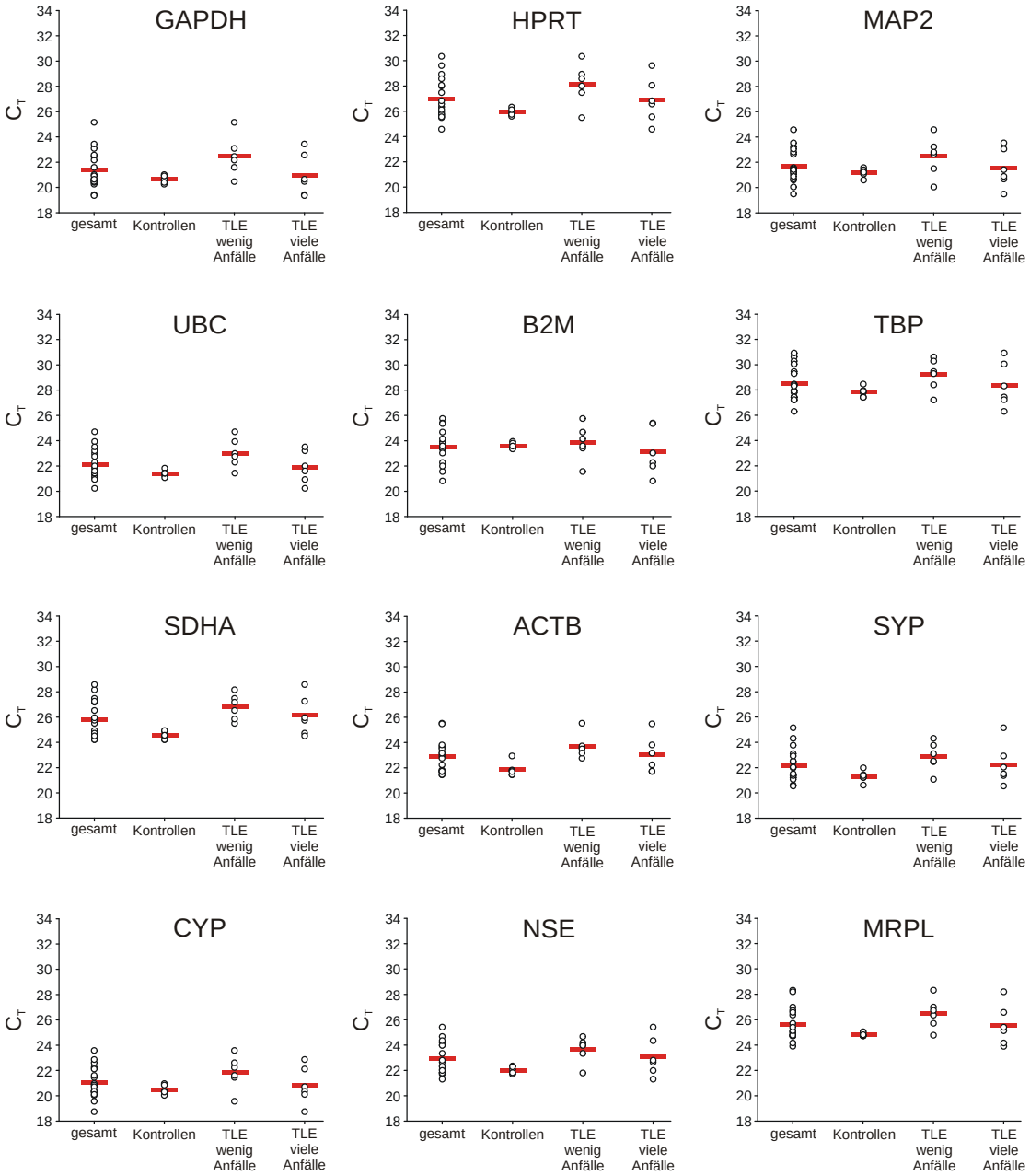

Abbildung 10. Streuung der C_T-Werte.
Threshold cycle (C_T)-Werte der 12 getesteten Referenzgene (siehe Tabelle 1) für alle untersuchten humanen neokortikalen Gewebe (gesamt, n = 18) und für die einzelnen Patientengruppen (Kontrollen, TLE wenig Anfälle, TLE viele Anfälle, jeweils n = 6). Die roten Linien geben den jeweiligen Mittelwert an (siehe auch Wierschke *et al.*, 2010b).

Im Gegensatz zur Streuung der nicht-normalisierten C_T-Werte ist ein Vergleich des mittleren C_T-Werts der verschiedenen Patientengruppen nicht sinnvoll, da die mehrstufige Aufbereitung der Proben (Gewebe-Homogenisierung, RNA-Präparation und cDNA-Synthese) vorhandene Unterschiede verfälschen kann (Huggett *et al.*, 2005).

3.2.1.2 Validierung der Referenzgene mit dem geNorm-Algorithmus

Für die weitere Validierung der potentiellen Referenzgene wurden die C_T-Werte in lineare Effizienz-korrigierte Quantitäten umgerechnet (siehe 2.6.4) und mit dem geNorm-Algorithmus (siehe Vandesompele *et al.*, 2002) analysiert. Bei diesem Verfahren wird die Expression mehrerer Gene jeweils paarweise miteinander verglichen und das Paar ermittelt, dessen Verhältnis der Expressionswerte sich zwischen den Proben am wenigsten ändert.

Die vom geNorm-Makro errechnete Rangfolge der getesteten Gene nach Expressions-Stabilität ist in Abb. 11a gezeigt. B2M zeigte die größte paarweise Variation (M) und damit die niedrigste Expression-Stabilität. Als Paar mit der stabilsten Expression wurde NSE/MRPL ermittelt. Überraschenderweise wurde die Expression der „klassischen" Referenzgene ACTB, HPRT und GAPDH als wenig stabil eingestuft. ACTB lag beispielsweise in der Rangfolge auf dem vorletzten Platz, obwohl die Streuung der entsprechenden C_T-Werte von allen untersuchten Genen am Geringsten war (Abb. 10).

Mehrere Arbeiten haben gezeigt, dass sich die Aussagesicherheit von Genexpressionsmessungen wesentlich erhöht, wenn zwei oder mehr Referenzgene (durch Bildung des geometrischen Mittels) zu einem Normalisierungsfaktor (NF) zusammengefasst werden (z. B. McNeill *et al.*, 2007). Mit dem geNorm-Makro kann die optimale Anzahl von Genen für einen geeigneten NF bestimmt werden. Dafür wird die paarweise Variation (V) der NF aus n Genen und der NF aus n + 1 Genen ($V_{n/n+1}$) ermittelt (Abb. 11b). Das Ergebnis dieser Rechnung zeigt, dass sich die V bis zur Aufnahme von 7 Referenzgenen in einen NF sukzessive vermindert. Dann wird eine Art „Plateau" (bei $V_{6/7}$) erreicht. Bei Hinzunahme weiterer Gene wird die Normalisierung nicht mehr verbessert. Das Kriterium für einen hinreichend stabilen Normalisierungsfaktor ($V < 0{,}15$, Vandesompele *et al.*, 2002) wird aber bereits mit drei Referenzgenen erreicht ($V_{2/3} = 0{,}114$). Folglich wäre die Kombination (geometrischer Mittelwert der Q-Werte) der 3 am stabilsten exprimierten Gene (d. h. SYP, NSE und MRPL) ein geeigneter NF für RT-qPCR-Messungen in TLE Geweben.

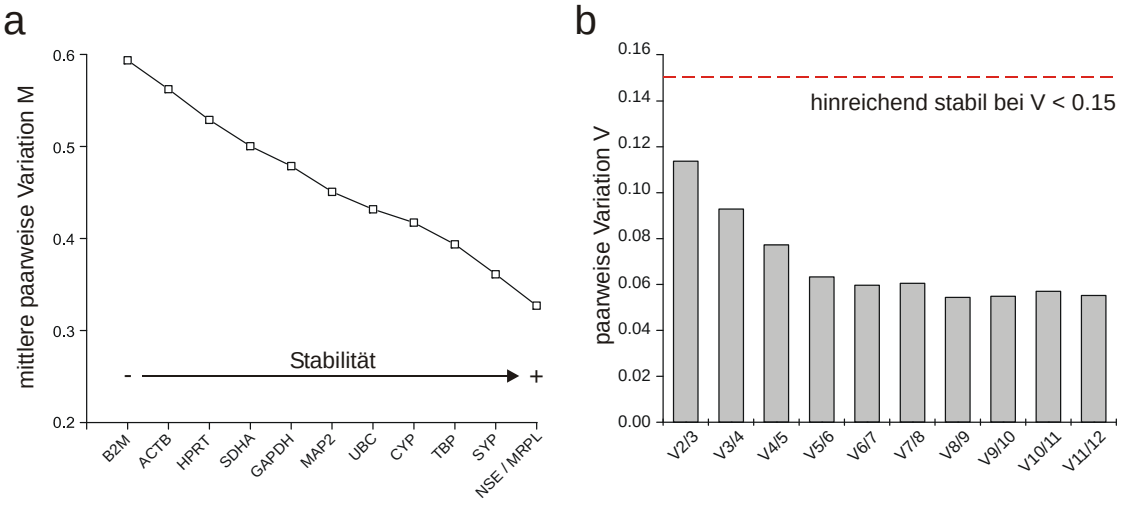

Abbildung 11. geNorm-Analyse der Expressions-Stabilität potentieller Referenzgene
a) Auftragung der Variabilität der Expression (geNorm-Analyse) der getesteten Referenzgene. Daraus ergibt sich eine Rangfolge nach der Stabilität der Expression (wie angegeben). Das Paar NSE/MRPL zeigte die stabilste Expression (kleinster M-Wert). Die Expression der klassischen Referenzgene wie z. B. ACTB wurde eher als unstabil eingeordnet. b) Bestimmung der optimalen Anzahl von Referenzgenen durch Auswertung der paarweisen Variation V. Der Gebrauch der 9 stabilsten Gene würde die genaueste Normalisierung ergeben, da $V_{8/9}$ den kleinsten Wert annimmt. Allerdings ist das Kriterium für eine hinreichend stabile Normalisierung bereits mit der Kombination der 3 stabilsten Gene erreicht ($V_{2/3} < 0.15$).

3.2.1.3 Validierung der Referenzgene mit dem NormFinder-Algorithmus

Ein wesentlicher Nachteil des geNorm-Algorithmus ist, dass zwei instabil exprimierte Gene als stabilstes Paar deklariert werden könnten, wenn deren Expression stark koreguliert ist. Deshalb wurden die gleichen Daten auch mit dem NormFinder-Algorithmus (siehe Andersen *et al.*, 2004) analysiert, der diesbezüglich weniger anfällig ist. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist, dass experimentelle Untergruppen (wie hier: Kontrollen, TLE wenig Anfälle und TLE viele Anfälle) definiert werden können. Die Expressions-Stabilität der untersuchten Gene wird dann aus der Intra- und Inter-Gruppen-Variabilität berechnet.

Interessanterweise führte die NormFinder-Analyse der gleichen Daten (nur mit Zuordnung der Expressionswerte zu den jeweiligen Patientengruppen) zu einer anderen Rangfolge als der geNorm-Algorithmus (Abb. 12). Einige Gene, die von geNorm als unstabil deklariert wurden (z. B. SDHA oder B2M), wurden auch von NormFinder als unstabil deklariert. Andere Kandidaten wie NSE, MRPL und TBP werden von beiden Algorithmen als relativ stabil bewertet. Unerwarteterweise wurde HPRT von NormFinder als

zuverlässigstes Einzel-Referenzgen deklariert, obwohl HPRT in der geNorm-Rangfolge der 3. schlechteste Kandidat war. Als bestes Paar wurde von NormFinder TBP/NSE spezifiziert (vgl. geNorm: NSE/MRPL).

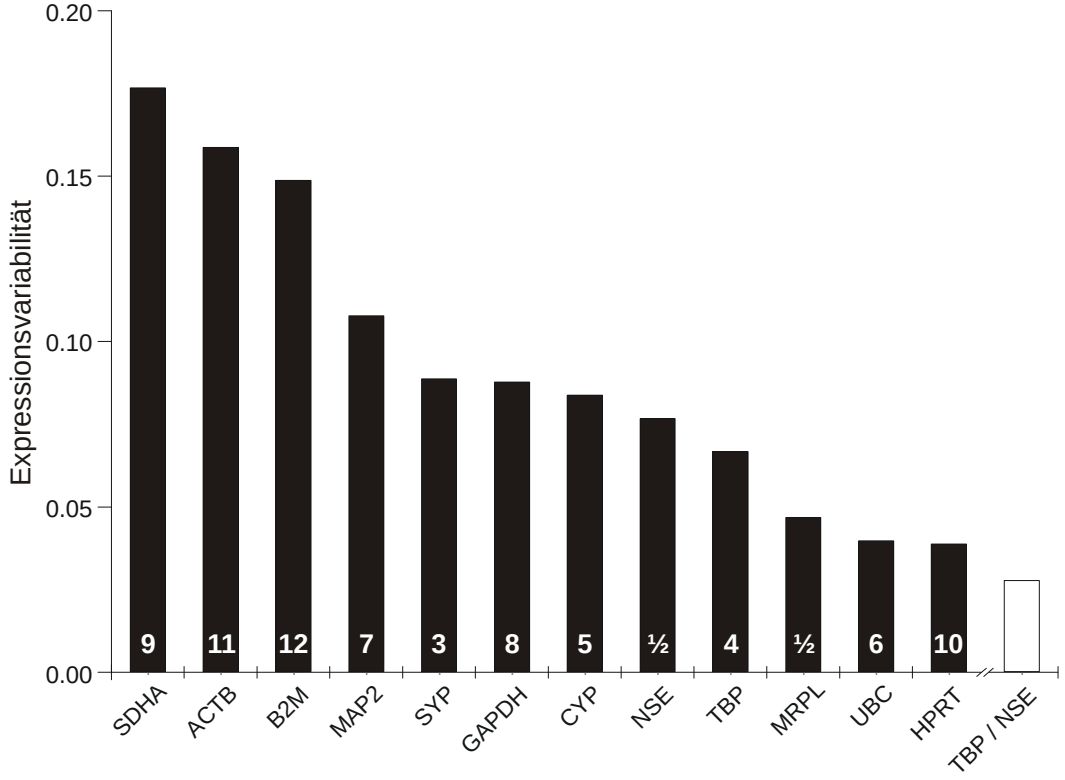

Abbildung 12. NormFinder-Analyse der Expressions-Stabilität potentieller Referenzgene. Stabilitätswerte wurden aus dem gleichen Datensatz wie für die geNorm-Analyse (Abb. 11) berechnet. Die Ziffern in den Balken geben zum Vergleich das geNorm-Ranking an. HPRT ist das am stabilsten exprimierte Einzelgen. Durch Kombination von TBP und NSE wird eine noch größere Stabilität erzielt.

3.2.1.4 Einfluss der Normalisierung auf Expressionswerte von Zielgenen

Um den Einfluss verschiedener Normalisierungsmethoden auf die Messergebnisse zu untersuchen, wurde die Expression der Gene des *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und der α_5-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors (GARα5) untersucht. Für beide Gene gibt es in der Literatur Daten über eine veränderte Expression bei TLE (Becker *et al*., 2002; Özbas-Gerçeker *et al*., 2006; Arion *et al*., 2006).

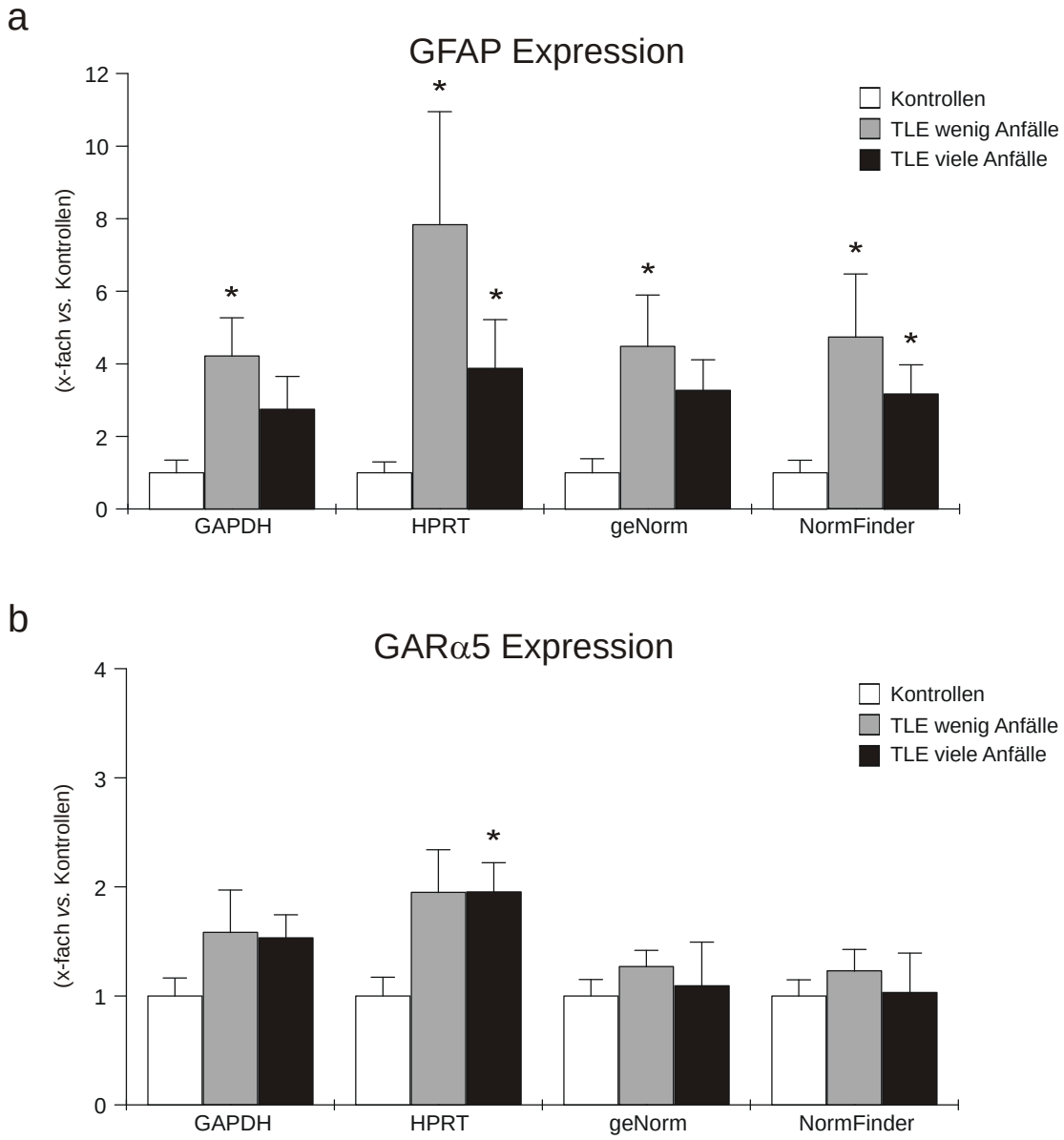

Abbildung 13. Einfluss der Normalisierungsmethode auf Ergebnisse von Expressionsmessungen. mRNA-Mengen von (a) *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und (b) der α5-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors (GARα5) in Autopsie-Kontrollen und TLE-Patienten mit wenig und vielen Anfällen (jeweils n = 6). Die Ergebnisse variieren in Anhängigkeit von der gewählten Normalisierungsmethode. Für eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Methoden wurden alle Werte auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe bezogen. Die Ergebnisse, die sich aus der NormFinder-Normalisierung (geometrisches Mittel von TBP/NSE) ergeben, sind den Ergebnissen aus der geNorm-Normalisierung (geometrisches Mittel von SYP/NSE/MRPL) sehr ähnlich.*$P < 0{,}05$ vs. Kontrollen

Unabhängig von der verwendeten Normalisierungsmethode war die Expression von GFAP in TLE-Geweben höher als in den entsprechenden Kontrollen (Abb. 13a; vgl. humaner epileptogener Hippokampus: Becker *et al*., 2002; Özbas-Gerçeker *et al*., 2006). Allerdings ergaben sich in Abhängigkeit von der gewählten Normalisierungsmethode quantitative Unterschiede im Ausmaß dieser hochregulierten GFAP-Expression. Den größten Effekt zeigte die Normalisierung auf die HPRT-Expression (z. B. Kontrollen *vs*. TLE wenig Anfälle: 7,8-fache Hochregulation). Unerwarteterweise lieferte die Normalisierung auf die GAPDH-Expression ähnliche Werte, wie die Normalisierungen auf die vom NormFinder oder geNorm vorgeschlagenen NF, obwohl GAPDH von beiden Algorithmen als eher unzuverlässig eingestuft wurde.

Im Gegensatz zu der bisher publizierten Verminderung der GARα5-Expression im humanen epileptogenen Hippokampus (Özbas-Gerçeker *et al*., 2006) und Neokortex. (Arion *et al*., 2006), zeigen die eigenen Daten überwiegend eine unveränderte GARα5-Expression (Abb. 13b). Die Normalisierung auf die HPRT-Expression zeigte in TLE-Geweben von Patienten mit vielen Anfällen sogar eine signifikant erhöhte GARα5-Expression.

3.2.2 Expression der HCN-Untereinheiten in TLE Geweben

Wie die oben beschriebene Evaluation gezeigt hat, ist der geometrische Mittelwert aus SYP-, NSE- und MRPL-Expression (geNorm-NF) ebenso wie der geometrische Mittelwert aus TBP- und NSE-Expression (NormFinder-NF) zur Normalisierung von RT-qPCR-Daten in TLE-Geweben geeignet. Für die folgenden Expressionsmessungen der Untereinheiten HCN1–4 wurde der NormFinder-NF verwendet. Damit wird das Vorhandensein verschiedener Patientengruppen berücksichtigt und weniger Probenmaterial benötigt, da ein Referenzgen weniger bestimmt werden muss.

Nach Normalisierung ergaben sich für die Expression der 4 HCN-Kanal-Untereinheiten distinkte Unterschiede in den 3 untersuchten Patientengruppen (jeweils r = 7; Abb. 14). Die Expression von HCN1 war in den TLE-Geweben im Vergleich zu nicht-epileptischen Kontrollgeweben um 51 % (TLE wenig Anfälle, $P = 0{,}005$) bzw. um 54 % (TLE viele Anfälle, $P = 0{,}003$) vermindert. Überraschenderweise gab es zwischen den TLE-Geweben (viel *vs.* wenig Anfälle) selbst keinen Unterschied in der HCN1-mRNA, obwohl dies angesichts der geringeren $I_{h\text{-}fast}$-Dichte in TLE-Geweben mit wenig Anfällen zu erwarten gewesen wäre. Bezüglich der HCN2- und auch der HCN3-Expression gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und TLE-Geweben ($P > 0{,}05$).

Für HCN4-mRNA zeigen die Daten interessanterweise eine starke Erhöhung der Expression in den Epilepsiegeweben (TLE wenig Anfälle: um 149 %, P = 0,037; TLE viele Anfälle: um 156 %, P = 0,003). Wie bei der HCN1-mRNA gab es auch hier keinen signifikanten Unterschied zwischen TLE-Geweben mit wenig und vielen Anfällen ($P > 0{,}05$).

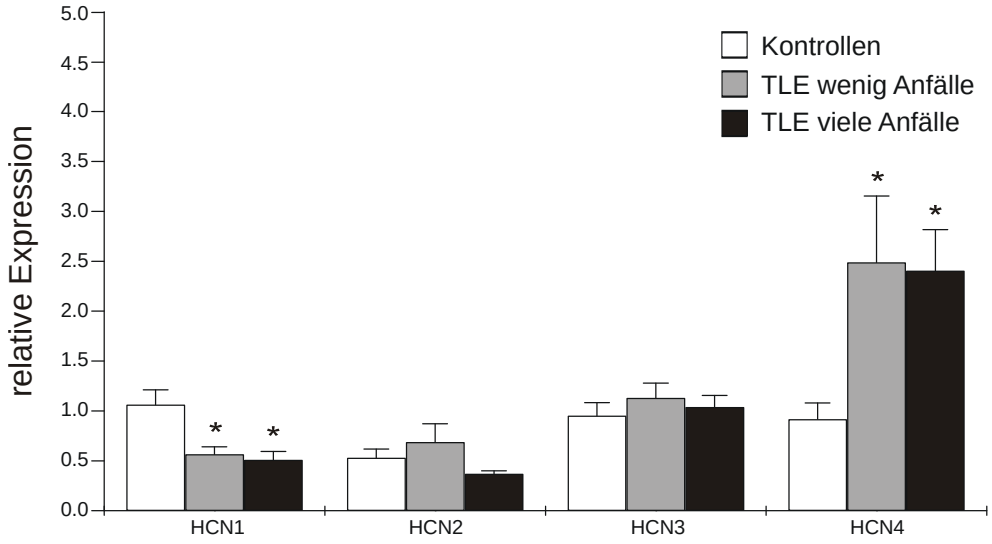

Abbildung 14. Expression von HCN-Kanal-Untereinheiten in humanen neokortikalen Geweben. Aufgetragen sind die relativen mRNA-Mengen der Isoformen HCN1–HCN4 in Autopsie-Kontrollen und TLE-Geweben von Patienten mit wenig Anfällen oder vielen Anfällen (Mittelwerte + Standardfehler von jeweils 7 Patienten). *$P < 0{,}05$ vs. Kontrollen

3.2.3 Expression von HCN1-Protein in humanen TLE-Geweben

Um die Expression von HCN1-Untereinheiten auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Membranprotein-Präparationen einiger ausgewählter humaner Gewebe elektrophoretisch aufgetrennt (denaturierende Bedingungen; 100 µg pro Spur) und die Untereinheiten-Proteine mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen (siehe 2.6.2). Leider waren nur zwei Kontrollgewebe (PMI: 12 h und 14 h) in hinreichender Menge vorhanden, um neben der cDNA auch Membranprotein-Fraktionen zu präparieren. Für die TLE Gruppen (wenig und viele Anfälle) wurden jeweils 3 repräsentative Proben ausgewählt (Altersangaben siehe Abb. 15).

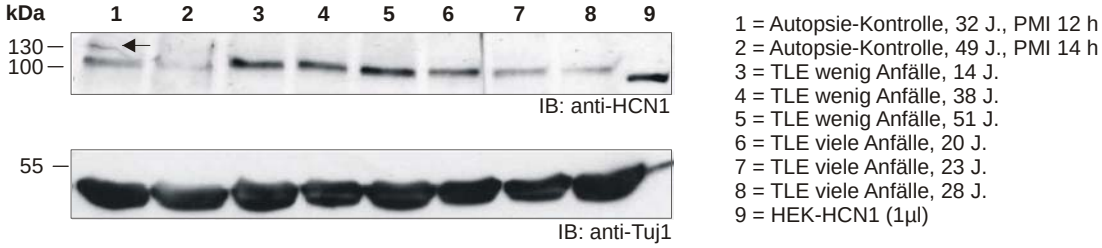

Abbildung 15. Nachweis von HCN1-Protein in humanen neokortikalen Geweben.
Immunoblots von Membranprotein-Präparationen zum Nachweis von HCN1-Protein in Proben (jeweils 100 µg Membranprotein) von verschiedenen Patienten (wie rechts daneben angegeben). Als Referenz wurde der jeweils untere Teil der Blots (55–35 kDa) mit einem Antikörper gegen Neuronales Klasse III β-Tubulin (Tuj1) behandelt. Als Positiv-Kontrolle wurden Lysate von HEK293-Zellen aufgetragen, die mit humanen HCN1 transfiziert worden waren.

Der Nachweis von HCN1-Protein (Abb. 15) zeigte in fast allen Proben ein mehr oder weniger intensives Immunosignal bei einem Molekulargewicht von ~100 kDa (vgl. Much *et al.*, 2003). Als Positiv-Kontrolle wurde außerdem ein Lysat (1 µl) von HCN1-überexprimierenden HEK293-Zellen aufgetragen (Spur 9). Das geringere Molekulargewicht des Immunosignals in der Positiv-Kontrolle beruht sehr wahrscheinlich auf einer andereren Glycosylierung in den HEK293-Zellen (siehe Thomas & Smart, 2005). Überraschenderweise zeigten die beiden Kontrollen (Spuren 1–2) im Vergleich zu den meisten TLE-Geweben sehr wenig HCN1-Immunosignal. Dies deutet zunächst auf eine erhöhte Expression von HCN1-Protein bei TLE hin, die im Widerspruch zu den PCR-Ergebnissen (siehe 3.2.2) steht. Die schwachen Signale, v. a. in der Kontrolle mit längerem PMI (Spur 2) könnten jedoch auch auf eine *post-mortale* Degradation (siehe 4.1.2) von HCN1-Protein zurückzuführen sein. Zumindest bei einer dieser „Kontrollen“ war eine 2. Bande bei einem um etwa 20 kDa höheren Molekulargewicht zu erkennen (Pfeil). Diese Bande könnte eine höher-glycosylierte Fraktion von HCN1-Proteinen repräsentieren (vgl. Much *et al.*, 2003), die in den TLE-Geweben nicht vorkommt.

Wie nach den unterschiedlichen $I_{h\text{-}fast}$-Dichten (aber nicht nach den mRNA-Werten) erwartet, gab es zwischen den TLE-Geweben deutliche Unterschiede in der Intensität des HCN1-Immunosignals. Die densitometrische Quantifizierung (mit Normalisierung auf das jeweilige Tuj1-Immunosignal) ergab in den drei TLE-Geweben von Patienten mit vielen Anfällen (mittlere $I_{h\text{-}fast}$-Dichte 1,9 ± 0,4 pA/pF; Spuren 6–8) durchschnittlich 51,5 % weniger HCN1-Protein als in den drei Geweben von Patienten mit wenig Anfällen (mittlere $I_{h\text{-}fast}$-Dichte 3,2 ± 0,5 pA/pF; Spuren 3–5). Für den Nachweis von HCN2–HCN4-Protein wurden bisher keine geeigneten Primärantikörper gefunden.

4. Diskussion

Die Daten, die im Rahmen dieser Arbeit von epilepsiechirurgischen Resektatgeweben erhoben wurden, zeigen auf funktioneller und auf molekularer Ebene Defizite des I_h bzw. von HCN-Kanälen. Die offensichtlich verminderte I_h-Dichte in TLE-Geweben – insbesondere bei Patienten mit vielen Anfällen – ist mit Befunden von Tiermodellen der TLE weitgehend vergleichbar und könnte zur Ausbreitung von Anfällen im humanen Neokortex betragen. Dennoch sind bei der Interpretation der Befunde einige methodische Einschränkungen zu beachten, die im Folgenden diskutiert werden.

4.1 Methodische Betrachtungen

4.1.1 Inhärente Einschränkungen bei der Untersuchung von Resektatgeweben

Epilepsiechirurgische Resektate bieten eine einzigartige Möglichkeit die Funktion des menschlichen Gehirns *in vitro* zu untersuchen. Bisherige Arbeiten haben wertvolle Erkenntnisse über die Informationsverarbeitung (z. B. McCormick, 1989; Avoli & Olivier, 1989) und die zellulären und molekularen Mechanismen der Epileptogenese (z. B. Avoli & Olivier, 1987; Deisz, 1999; Deisz *et al.*, 2011) geliefert. Gegenüber Untersuchungen an Tiermodellen müssen jedoch einige methodische Einschränkungen beachtet werden.

Die Resektate repräsentieren immer ein weit fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung. Zwischen dem ersten Anfall und der Operation liegen typischerweise mehrere Jahre (mittlere Dauer z. B. bei TLE: 20,9 ± 14,4 Jahre) mit wechselnder Medikation ohne hinreichende Anfallskontrolle (siehe 1.1.2). Neben dem Alter und dem Geschlecht machen auch Unterschiede bezüglich der Art und Häufigkeit von Anfällen, im Auftreten struktureller Veränderungen wie HS, Tumoren u. ä. sowie in der Lokalisation des Fokus die Einmaligkeit jedes Resektats aus, und schränken die Vergleichbarkeit von Messwerten ein.

Bestimmte Schädigungen der Gewebe (z. B. Ischämie) beim Transport und der Schnitt-Präparation sind unvermeidbar. Doch selbst wenn die Möglichkeit von z. B. Ischämie-abhängigen Änderungen in der HCN-Kanal-Expression (siehe Li *et al.*, 2010) eingeräumt wird, ist eine Verfälschung der Befunde unwahrscheinlich, da alle Gewebe diesbezüglich gleich behandelt wurden, und auch in hoch pathologischen Geweben Neurone mit „normalen“ intrinsischen Eigenschaften und Einwärtsströmen gefunden werden (siehe 3.1.2).

Während für molekulare Untersuchungen Autopsie-Gewebe als Kontrollen verwendet werden können (siehe 3.2.2; vgl. Bender *et al.*, 2003), stehen für funktionelle Untersuchungen wie *Patch-clamp*-Ableitungen in der Regel keine adäquaten Kontrollen zur Verfügung. In „nicht-epileptogenen" Zugangsgeweben von Resektionen tiefliegender Hirntumore, die in einigen Arbeiten (z. B. Teichgräber *et al.*, 2009) untersucht wurden, konnten zwar ähnliche neuronale Eigenschaften (z. B. Funktion von $GABA_B$-Rezeptoren) wie in gesunden Ratten gemessen werden, Einflüsse durch den Tumor können aber nicht völlig ausgeschlossen werden. Weiterhin sind die entsprechenden Fälle sehr selten (3,6 %; Teichgräber *et al.*, 2009) und wegen des potentiell höheren Alters der Patienten (51,7 ± 10,7 Jahre, n = 7; Deisz, unveröffentlichte Daten) nur bedingt mit TLE-Geweben vergleichbar.

In dieser Arbeit wurden Daten von Wildtyp-Ratten als Referenz für die Eigenschaften gesunder Neurone herangezogen. Dies ist v. a. aufgrund möglicher Speziesunterschiede problematisch. Außerdem ist die Äquivalenz von Kortexarealen und Altersbereichen zwischen Mensch und Nagetieren unklar. Dennoch konnten viele Arbeiten mit diesem Ansatz pathophysiologische Veränderungen in humanen epileptogenen Geweben zeigen (Cummins *et al.*, 1994; Beck *et al.*, 1998; Deisz, 1999; Deisz *et al.*, 2011).

4.1.2 Untersuchung von Autopsie-Geweben

Für die molekularen Untersuchungen wurden Autopsiegewebe als Kontrollen verwendet. Diese stammen von Körperspendern mit passendem Alter ($P > 0{,}05$ *vs.* TLE) und ohne neurologischen Befund (vgl. Bender *et al.*, 2003). Bei Autopsie-Geweben muss immer die Möglichkeit einer *post-mortalen* Degeneration insbesondere von RNA berücksichtigt werden (Hynd *et al.*, 2003; siehe aber auch Preece *et al.*, 2003). Daher wurden nur Gewebe mit möglichst kurzen PMI (2,5–14 h; Mittelwert: 7,9 h) untersucht (vgl. Bender *et al.*, 2003: 3–11 h; Mittelwert: 6,6 h).

Erhebliche Verfälschungen der Befunde durch RNA-Degradation sind wenig wahrscheinlich, da es innerhalb der Kontrollgruppe zwischen den HCN1-mRNA-Werten und dem PMI keine Korrelation (Spearman-Koeffizient r = -0,397; $P > 0{,}05$) und bezüglich der HCN4-mRNA sogar einen umgekehrten Zusammenhang (d. h. höhere Werte bei längerem PMI; Spearman-Koeffizient r = 0,786; $P = 0{,}036$) gab. In Vorversuchen an Rattenhirnen (n = 3; nicht gezeigt) wurde zumindest auch nach 32 h (4 °C) *post mortem* (das längste getestete Intervall) keinerlei Degradation von GAPDH-, MAP2-, HCN1- oder HCN2-mRNA beobachtet. Allerdings ist dieser Befund nur eingeschränkt auf humane Gewebe übertragbar, da bei diesen Versuchen die Köpfe der Ratten bei einer definierten

Temperatur von 4 °C gelagert wurden, und aufgrund der kleineren Masse eine schnellere Abkühlung möglich ist.

Über die *post-mortem*-Stabilität von Proteinen gibt es nur wenige Untersuchungen. Fountoulakis *et al.* (2001) haben zwar gezeigt, dass in Hirngeweben von Ratten die meisten Proteine erst nach ~24 h (Lagerung bei 23 °C) Veränderungen zeigen, dennoch wurde in einem Fall (*dihydropyrimidinase-related protein-2*) schon nach 6 h ein Abbau beobachtet.

4.1.3 Beschränkung auf somatische Patch-clamp-Ableitungen

In Schicht-V-Neuronen des Rattenkortex wurde eine dendritische Lokalisation der HCN-Kanäle gezeigt (Williams & Stuart, 2000; Berger *et al*., 2001). Wenn man diese Verteilung auch für Schicht-II/III-Neurone des humanen Neokortex annimmt, wären die in dieser Arbeit verwendeten somatischen Ableitungen zur Messung des I_h problematisch (*Space-clamp*-Problem, siehe Williams & Mitchell, 2008). Zur Vermeidung dieses Problems bzw. um überhaupt Daten über die subzelluläre Verteilung des I_h zu erheben, wären dendritische Ableitungen wünschenswert gewesen. Solche Ableitungen sind bisher aber nur bei relativ jungen Ratten gelungen. In pathologischen humanen Geweben erschweren v. a. ungünstige Sichtverhältnisse die Durchführung dendritischer Ableitungen (siehe Infrarot-Videomikroskopie-Bilder in Abb. 2 und in Wierschke *et al*., 2010a).

Andererseits sind die Voraussetzungen für eine hinreichende Erfassung des Gesamtstroms im humanen Gewebe aufgrund der pathologisch reduzierten dendritischen Komplexität (Multani *et al*., 1994; siehe auch Abb. 1b in Wierschke et al., 2010a) möglicherweise besser als im Kortex der Ratte. Außerdem wurde bei Ratten auch eine perisomatische HCN1-Immunoreaktivität in Schicht II/III Neuronen gezeigt (Strauss *et al*., 2004; siehe dazu auch Bullis *et al*., 2007), die auf einen weniger starken somatodendritischen HCN1-Gradienten hindeutet als in Schicht V-Neuronen.

Mögliche *Space-clamp*-Probleme durch akute Isolation der humanen Neurone (Cummins *et al*., 1994; Beck *et al*., 1998; Vreugdenhil *et al*., 2004) zu umgehen, wurde nicht in Betracht gezogen, da eine Untersuchung an Ratten Beeinträchtigungen des I_h durch die für die Isolation erforderliche Proteolysebehandlung gezeigt hat (Budde *et al*., 1994).

4.2 Eigenschaften des I_h in humanen epileptogenen Geweben

Der I_h spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle neuronaler Erregbarkeit, und zahlreiche Arbeiten an Tiermodellen haben einen Zusammenhang zwischen verändertem I_h bzw. veränderter Kanal-Expression und epileptischer Übererregbarkeit gezeigt (siehe 1.2.3). Auch aus Untersuchungen am humanen epileptogenen Neokortex ergaben sich Hinweise auf Beeinträchtigungen des I_h (Deisz, 1999; Kole *et al.*, 1999).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass sich Neurone in TLE-Geweben bezüglich der Amplituden und der Kinetik des pharmakologisch identifizierten I_h erheblich von Neuronen in FLE-Geweben oder im Rattenkortex unterscheiden. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Stromamplituden individueller Neurone auf deren C_m bezogen, um ein von der Membranoberfläche unabhängiges Maß für den I_h (Stromdichte; siehe Strauss *et al.*, 2004) zu erhalten. In TLE-Geweben waren die Stromdichten für $I_{h\text{-fast}}$ signifikant kleiner als in FLE-Geweben (um 44 %) oder im sensomotorischen Kortex der Ratte (um 63 %). Bezüglich der Dichten für $I_{h\text{-slow}}$ gab es jedoch nur zwischen TLE- und FLE-Geweben einen signifikanten Unterschied. Obwohl der Vergleich verschiedener Spezies problematisch ist (siehe 4.1.1), könnten die gefundenen Unterschiede auf pathologische Beeinträchtigungen des I_h in humanen epileptogenen Geweben vor allem bei Patienten mit TLE hindeuten. Verminderungen des I_h wurden zuvor auch in Tiermodellen der TLE (Shah *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2007) und in WAG/Rij-Ratten (möglicherweise auch ein Modell fokaler Epilepsien; Meeren *et al.*, 2002) beschrieben (Strauss *et al.*, 2004).

Bezüglich der Präsenz kinetisch verschiedener Stromkomponenten wird eine Beteiligung von verschieden schnell aktivierenden Untereinheiten am Gesamtstrom diskutiert (Solomon & Nerbonne, 1993; Pape *et al.*, 1996). Unter dieser Annahme könnten die im Vergleich zu Rattenneuronen geringeren Dichten und höheren Zeitkonstanten der $I_{h\text{-fast}}$ in TLE-Neuronen auf eine verminderte Beteiligung von schnell aktivierenden HCN1-Untereinheiten hindeuten. Die ähnlichen Dichten und Zeitkonstanten der $I_{h\text{-slow}}$ hingegen deuten auf eine unveränderte Beteiligung von langsam aktivierenden HCN2- oder HCN4-Untereinheiten (vgl. Franz *et al.*, 2000; Stieber *et al.*, 2005) hin. Derartige Untereinheiten-selektive Veränderungen wurden bereits bei WAG/Rij-Ratten beschrieben (Strauss *et al.*, 2004). Nachdem HCN1-Untereinheiten zu Strömen mit weniger negativen $V_{1/2}$ führen (Franz *et al.*, 2000), deutet auch das im Vergleich zu Ratten-Neuronen um ~5 mV (~9 mV, Wierschke *et al.*, 2010a) in Richtung negativerer Potentiale verschobene $V_{1/2}$ auf einen selektiven Verlust von HCN1-Untereinheiten in TLE-Geweben hin. Allerdings könnte eine solche Verschiebung der Spannungsabhängigkeit auch durch eine gestörte Phosphorylierung von HCN-Untereinheiten verursacht sein, wie kürzlich im Hippokampus des Pilokarpin-Modells gezeigt wurde (Jung *et al.*, 2010). Detailliertere Untersuchungen

hinsichtlich des Beitrags verschiedener Untereinheiten am Gesamtstrom waren leider nicht möglich, da bisher keine Untereinheiten-spezifische Antagonisten verfügbar sind.

Der etablierte HCN-Kanal-Antagonist ZD7288 (50 µM) bewirkte in den humanen Neuronen einen fast vollständigen Block beider I_h-Komponenten (Abb. 4b, 6c,d). Gleichzeitig kam es in diesen Neuronen zu einer Hyperpolarisation des V_m um 2,6 mV und zu einer Erhöhung des R_n um 31 %. Diese Änderungen sind im Vergleich zu Daten von Kontroll-Ratten (Strauss *et al.*, 2004: 5,2 mV Depolarisation; 108 %ige Erhöhung des R_n) wesentlich geringer. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine pathophysiologische Verminderung des I_h.

4.3 Zusammenhänge mit klinischen Daten

4.3.1 Unterschiede zwischen TLE und FLE

Die Eigenschaften des $I_{h\text{-fast}}$ und I_{Kir} waren in Neuronen aus FLE-Geweben, mit Ausnahme der um ~34 % geringeren Dichte des $I_{h\text{-fast}}$, denen in Rattenneuronen sehr ähnlich. Der im Vergleich zu TLE-Geweben größere (und schneller aktivierende) I_h in FLE-Geweben steht zunächst im Widerspruch zu einer I_h-Verminderung im Rahmen der Epileptogenese, da in Fällen von FLE die Resektionsgrenzen auf der Grundlage von präoperativen Ableitungen mit implantierten Plattenelektroden festgelegt werden (siehe Kellinghaus & Lüders, 2004), und die Irritabilität der resezierten Areale damit relativ sicher ist. Allerdings tragen auch andere Parameter z. B. depolarisierende $GABA_A$-Rezeptor-vermittelte Antworten (Deisz *et al.*, 1998, 2011) oder Defizite in der $GABA_B$-Rezeptor-vermittelten Hemmung (Teichgräber *et al.*, 2009) zur Übererregbarkeit im humanen Neokortex bei und könnten in diesen Fällen trotz relativ hoher I_h-Dichten zu Anfällen führen.

Die unterschiedliche Lokalisation (z. B. eine andere HCN-Kanal-Expression im Frontallappen) trägt möglicherweise wenig zum I_h-Unterschied zwischen TLE- und FLE-Geweben bei, da bei Ratten im sensomotorischen und frontalen Kortex ähnliche hyperpolarisations-aktivierte Ströme gemessen wurden (Tabelle 3). Wird eine ähnliche Expression von HCN-Untereinheiten im gesunden Temporal- und Frontallappen angenommen, deutet die größere I_h-Dichte in FLE-Neuronen darauf hin, dass der Frontallappen aufgrund anderer bisher unbekannter Faktoren (z. B. einer anderen Verschaltung) weniger empfindlich für eine pathophysiologische Verminderung des I_h ist. Diese dann eher "normale" Ausprägung des I_h könnte vielleicht die geringere Häufigkeit von FLE gegenüber TLE (siehe Kellinghaus & Lüders, 2004) erklären.

4.3.2 Korrelation mit der Schwere der Epilepsie

Interessanterweise wies die Dichte des $I_{h\text{-fast}}$ von TLE-Neuronen nicht nur innerhalb eines gegebenen Gewebes (siehe 3.1.2) sondern auch zwischen den Geweben verschiedener Patienten eine erhebliche Variabilität auf, die mit der jeweiligen Krankengeschichte zusammenhängen könnte. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen pathophysiologischer I_h-Verminderung und der Schwere der TLE zu untersuchen, wurde die Häufigkeit der Anfälle (GM und CPS) betrachtet (vgl. Cramer & French, 2001).

Bei den TLE-Geweben bestand ein deutlicher Unterschied (~24 %) in der mittleren Dichte des $I_{h\text{-fast}}$ zwischen Geweben von Patienten mit wenigen Anfällen und Geweben von Patienten mit vielen Anfällen. Interessanterweise galt dies sowohl für GM als auch für CPS. Nachdem für die Messungen keine humanen Kontrollgewebe zur Verfügung standen, und sowohl der Vergleich verschiedener Spezies als auch der Vergleich verschiedener Kortexareale problematisch ist, ist dieser Unterschied der wohl unstrittigste Hinweis auf eine I_h-Verminderung bei humaner TLE.

4.4 Molekulare Mechanismen der I_h-Verminderung bei TLE

Die gefundene I_h-Verminderung in TLE-Geweben (v. a. von Patienten mit vielen Anfällen) wirft die Frage nach den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen auf. Als am wahrscheinlichsten wurde eine verminderte Expression von HCN-Untereinheiten angenommen. Im Hinblick auf die biophysikalischen Eigenschaften (siehe 4.2) könnten davon v. a. die HCN1-Untereinheiten betroffen sein (vgl. Strauss *et al*., 2004). In dieser Arbeit wurde die Untereinheiten-Expression auf mRNA-Ebene (mittels RT-qPCR) und für die HCN1-Untereinheit auch auf Proteinebene (mittels Immunoblotting) untersucht.

Für die RT-qPCR-Messungen waren zunächst umfangreiche Voruntersuchungen notwendig, um geeignete Referenzgene für eine verlässliche Quantifizierung zu finden. Die Expression eines Referenzgenes sollte durch die experimentellen Bedingungen und durch die untersuchte Pathologie unbeeinflusst sein (Huggett *et al*., 2005). In der Literatur wurden bisher klassische "*Housekeeping*"-Gene wie GAPDH verwendet (z. B. Blümcke *et al*., 2000). Ob diese Gene in epileptogenen Geweben d. h. unter dem Einfluss wiederkehrender Anfälle stabil exprimiert sind, wurde bisher aber nur in Tiermodellen der TLE untersucht (Pernot *et al*., 2010).

Die Validierung von Referenzgenen stellt ein zirkuläres Problem dar, da – abgesehen von der Gesamt-RNA-Menge – keine Referenz für einen Bezug zur Verfügung steht. Die hier verwendeten Algorithmen geNorm und NormFinder wurden zur Lösung dieses

Problems entwickelt. Die entsprechenden Analysen haben in den untersuchten Temporallappengeweben eine eher instabile Expression der häufig verwendeten Gene ACTB und GAPDH gezeigt (Abb. 11a, 12). Damit ist deren Eignung als Referenzgen in Frage gestellt. Im Fall von ACTB war dieser Befund überraschend, da die zugehörigen C_T-Werte die geringste Streuung aufwiesen (Abb. 10). Dies zeigt jedoch, dass die Streuung der C_T-Werte allein wenig Aufschluss über die Stabilität der Expression liefert. Bezüglich GAPDH wurde schon früher eine verminderte Expression im Hippokampus von Pilokarpin-behandelten Ratten berichtet, die zu Fehlinterpretationen von PCR-Daten führen könnte (J. Chen *et al*., 2001).

Auch HPRT wird häufig als Referenzgen verwendet. Tatsächlich haben Untersuchungen am Hippokampus von TLE-Modellen eine (trotz der Anfälle) stabile Expression von HPRT gezeigt (J. Chen *et al*., 2001; Pernot *et al*., 2010). Die in den humanen Geweben erhobenen Daten sind diesbezüglich widersprüchlich. Einerseits wurde HPRT vom NormFinder-Algorithmus als das am stabilsten exprimierte Einzel-Referenzgen identifiziert (Abb. 12), andererseits wurde HPRT vom geNorm-Algorithmus als eher unzuverlässig eingestuft (Abb. 11a), und eine Normalisierung auf die HPRT-Expression schien zu Überschätzungen der Zielgen-Expression zu führen (Abb. 13). Schließlich hat die Evaluation potentieller Referenzgene ergeben, dass die geometrischen Mittelwerte der SYP-, NSE- und MRPL-Expression (geNorm) bzw. der TBP- und NSE-Expression (NormFinder) als Faktor für die Normalisierung verwendet werden können.

Die eigentliche Messung der HCN-Untereinheiten-Expression (normalisiert auf die TBP/NSE-Expression) ergab eine signifikante Verminderung der HCN1-mRNA in TLE-Geweben in Vergleich zu Autopsie-Kontrollen. Diese Verminderung steht im Widerspruch zu anderen Daten von epilepsiechirurgischen Resektaten, die eine verstärkte Expression von HCN1-mRNA in granulären Zellen des *Gyrus dentatus* zeigen (Bender *et al*., 2003; siehe aber auch Bräuer *et al*., 2001; Powell *et al*., 2008). In diesen Neuronen wird allerdings – zumindest im adulten Hippokampus der Ratte – *per se* keine HCN1-mRNA exprimiert (Bender et al., 2001). Damit bestehen in dieser Struktur ganz andere Voraussetzungen für pathophysiologische Veränderungen der Untereinheiten-Expression, die mit kortikalen Pyramidenneuronen nicht vergleichbar sind. Überraschenderweise bestanden zwischen TLE-Geweben mit wenig Anfällen und solchen mit vielen Anfällen keine Unterschiede in der HCN1-mRNA, obwohl es zwischen diesen Gruppen einen signifikanten Unterschied in der $I_{h\text{-}fast}$-Dichte gab (siehe 3.1.6). Dies könnte einerseits daran liegen, dass für die molekularen Untersuchungen alle Kortexschichten (I–VI) umfassende Gewebeproben verwendet wurden, während sich die *Patch-clamp*-Ableitungen auf Neurone der Schichten II/III beschränkten. Andererseits könnten diese Befunde auch

auf einen posttranskriptionalen Schadensmechanismus hindeuten, wie er z. B. auch für WAG/Rij-Ratten diskutiert wurde (Strauss *et al.*, 2004; siehe aber auch Bräuer *et al.*, 2001; Shah *et al.*, 2004; Richichi *et al.*, 2008).

Während die TLE-Gewebe bezüglich der HCN2- und HCN3-mRNA keinen Unterschied zu den Kontrollen zeigten, war die Menge an HCN4-mRNA in den TLE-Geweben signifikant erhöht. In den meisten der bisher publizierten Arbeiten am Neokortex wurde die Expression von HCN4-mRNA nicht untersucht. Wahrscheinlich wird angesichts des fehlenden Immunosignals im Rattenkortex (Notomi & Shigemoto, 2004) angenommen, dass HCN4-Untereinheiten nicht wesentlich zum I_h adulter neokortikaler Neurone beitragen. Franz *et al.* (2000) konnten mit semi-quantitativer Einzelzell-PCR in neokortikalen Neuronen der Maus (Schicht-V) dennoch beachtliche Mengen an HCN4-mRNA nachweisen. Ob HCN4-mRNA in humanen Temporallappengeweben ebenfalls nicht in funktionelle Kanalproteine umgesetzt wird, ist unklar. Jedenfalls wäre eine höhere Beteiligung von HCN4-Untereinheiten bei gleichzeitigem Verlust von HCN1-Untereinheiten während der Epileptogenese mit einer langsameren Aktivierung und einem negativeren $V_{1/2}$ des I_h gut vereinbar (siehe 3.1.2; vgl. Stieber *et al.*, 2005).

4.5 Konsequenzen für die neuronale Erregbarkeit

Die Rolle des I_h bei der Kontrolle der neuronalen Erregbarkeit ist v. a. bei Nagern umfangreich untersucht worden. Der I_h ist (neben dem I_{Kir} u. a. ionalen Leitfähigkeiten) an der Einstellung und Stabilisierung des V_m beteiligt. Wie durch Applikation des Antagonisten ZD7288 gezeigt werden kann, ist der Beitrag des I_h am V_m depolarisierend (etwa 5 mV, Strauss *et al.*, 2004; in TLE immerhin noch 2,6 mV, Abb. 6). Obwohl sich damit der Abstand des V_m zur AP-Feuerschwelle verringert, ergibt sich daraus nicht zwangsläufig eine gesteigerte Erregbarkeit. Viel entscheidender ist offensichtlich der erhebliche Anteil des I_h an der Ruhemembranleitfähigkeit ($1/R_n$; ~50 %, Strauss et al., 2004; in TLE jedoch nur 24 %). Dieser wirkt Änderungen des V_m sowohl in hyperpolarisierender (siehe *voltage sag*) als auch in depolarisierender Richtung (z. B. EPSP) entgegen.

Aus diesen Eigenschaften ergeben sich wichtige Implikationen für die synaptische Transmission. Es wurde gezeigt, dass der I_h in neokortikalen Neuronen zur Abschwächung der temporalen Summation von EPSP beiträgt (z. B. Berger et al., 2001). Tatsächlich wurde in einigen Tiermodellen mit I_h-Defizit eine erhöhte temporale Summation gefunden (Shah et al., 2004; Strauss et al., 2004; siehe aber auch Jung et al., 2007). Erste exemplarische Messungen der temporalen Summation (von aESPS) an humanen

Neuronen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden (Abb. 9), deuten ebenfalls auf eine Erhöhung der temporalen Summation bei TLE hin. Eine verstärkte temporale Summation in einzelnen Neuronen sollte die Wahrscheinlichkeit, dass die im Netzwerk nachgeschalteten Neurone aktiviert werden, wesentlich erhöhen. Auf diese Weise könnte das v. a. bei TLE-Patienten mit vielen Anfällen gefundene I_h-Defizit zur Entstehung und Ausbreitung exzessiver Aktivität im humanen epileptogenen Neokortex beitragen.

Eine I_h-Verminderung könnte auch über eine Demaskierung von *Burst*-artigem Feuerverhalten – wie pharmakologisch mit ZD7288 gezeigt (z. B. Abb. 5 in Wierschke *et al.*, 2010a) – zu Übererregbarkeit beitragen. Bezüglich der ionalen Mechanismen neuronalen *Burst*-Verhaltens wird v. a. von einer Beteiligung des I_T-Typ Ca^{2+}-Stroms ausgegangen (Friedman & Gutnick, 1987; Williams & Stuart, 1999). Für die äußeren Kortexschichten (II/III) wurde jedoch gezeigt, dass auch TTX-insensitive Na^+-Ströme zu *Burst*-Depolarisationen beitragen (Deisz, 1996). Welche Rolle der I_h in diesem Zusammenhang spielt, wurde im Detail noch nicht untersucht. In jedem Fall sollte *Burst*-artiges Verhalten in einem gegebenen Neuron zu einer erhöhten Freisetzung von Neurotransmittern und damit zu einer wahrscheinlicheren Aktivierung der nachgeschalteten Neurone führen (siehe Williams & Stuart, 1999).

4.6 Kausale Zusammenhänge und therapeutische Implikationen

Unklar ist ob die hier oder in vielen anderen Arbeiten beschriebenen I_h-Verminderungen die Ursache oder die Folge von epileptischen Anfällen sind. Für beide Möglichkeiten gibt es Hinweise von verschiedenen Tiermodellen. Bei Mäusen können durch *knock-out* der HCN2-Expression generalisierte Anfälle (Ludwig *et al.*, 2003) und durch HCN1-*knock-out* neben kognitiven Defiziten auch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Kainat indiziert werden (Nolan *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2009). Auch die Tatsache, dass sich bei der ontogenetischen Entwicklung von WAG/Rij-Ratten Verminderungen von I_h und HCN1-Protein bereits vor dem Auftreten von *Spike-wave*-Entladungen nachweisen lassen (Kole *et al.*, 2007), spricht dafür, dass I_h-Verminderungen ursächlich an der Epileptogenese beteiligt sind. Andererseits haben z. B. Untersuchungen an Hippokampus-Kulturen gezeigt, das sich Änderungen der Untereinheiten-Expression auch durch experimentell induzierte Anfallsaktivität (Kainat und verringerte Mg^{2+}-Konzentration) ausgelösen lassen (Richichi *et al.*, 2008).

Welche kausalen Zusammenhänge bei humanen Epilepsien bestehen kann auch anhand der hier gezeigten Daten nicht geklärt werden. Nachdem I_h-Verminderungen aber sowohl Ursache als auch Folge der Epileptogenese sein können (siehe oben), ist auch eine Art

Teufelskreis denkbar. So könnten beispielsweise bestimmte zerebrale Schädigungen wie Läsionen über eine Deafferenzierung den I_h in bestimmten Neuonen vermindern (vgl. Bräuer *et al*., 2001) und damit deren Erregbarkeit erhöhen. Wiederkehrende Anfälle in Folge einer gesteigerten Erregbarkeit könnten dann ihrerseits weitere funktionelle Defizite im I_h nach sich ziehen und die Erregbarkeit noch weiter steigern. Solche Szenarien wurden auch schon im Zusammenhang mit in TLE-Geweben verminderten $GABA_B$-Rezeptoren diskutiert (Teichgräber *et al*., 2009) und könnten zur Progredienz bestimmter Epilepsieformen beitragen (Hauser & Lee, 2002).

Angesichts der hier und in anderen Arbeiten gezeigten Befunde, ist eine pharmakologische Verstärkung des I_h, die in einem möglichst frühem Stadium der Epileptogenese ansetzt, ein naheliegender therapeutischer Ansatz. Tatsächlich wurde für die Medikamente LTG (dendritische Ableitungen; Poolos *et al*., 2002) und GBP (somatische Ableitungen; Surges *et al*., 2003) eine Verstärkung des I_h in Hippokampus-Neuronen der Ratte gezeigt, die zur antikonvusiven Wirkung dieser Substanzen beitragen könnte. Eigene Versuche (somatische Ableitungen) an TLE-Geweben zeigten bisher keine messbaren Effekte von LTG auf den I_h neokortikaler Neurone (nicht gezeigt). Ob dieser fehlende Effekt – wie von Poolos *et al*. (2002) konstatiert – auf eine eingeschränkte Erfassung dendritischer Ströme (siehe 4.1.3) zurückzuführen ist, muss noch geklärt werden. Ungeachtet dessen wäre es jedoch denkbar, dass die von den o. g. Autoren beschriebene Verstärkung des I_h die massiven Defizite in TLE-Geweben (v. a. von Patienten mit vielen Anfällen) nur unzureichend kompensiert, und es dadurch zur Wirkungslosigkeit, d. h. Pharmakoresistenz kommt (siehe 1.1.2).

Zur weiteren Klärung dieser Zusammenhänge und zur Umsetzung der in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse bei der Entwicklung von neuen verbesserten Therapien, ist noch weitere Forschungarbeit an humanen Geweben aber auch an Tiermodellen notwendig.

5. Zusammenfassung

Der hyperpolarisations-aktivierte Kationenstrom (I_h), der von Kanälen der HCN-Familie vermittelt wird, spielt eine zentrale Rolle bei der neuronalen Erregbarkeitskontrolle. Untersuchungen an Tiermodellen der Temporallappenepilepsie (TLE) haben funktionelle Beeinträchtigungen des I_h bzw. eine verminderte Expression von HCN-Kanälen gezeigt. Ob es bei humaner TLE zu vergleichbaren Änderungen kommt, wurde bisher nicht umfassend untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die biophysikalischen Eigenschaften des I_h in Neuronen (Schichten II/III) des humanen epileptogenen Neokortex mit somatischen *Patch-clamp*-Ableitungen (*whole cell*-Modus) untersucht. Die untersuchten Gewebe umfassen anfallsauslösende Kortex-Areale, die in Fällen von pharmakoresistenter TLE oder Frontallappenepilepsie (FLE) aus therapeutischen Gründen entfernt wurden. In einigen TLE-Geweben (und Autopsie-Kontrollen) wurde die mRNA der Kanal-Untereinheiten HCN1–HCN4 mit quantitativer PCR und der relative Gehalt an HCN1-Protein mit Immunoblots gemessen.

In Resektatgeweben von TLE- und FLE-Patienten wurden (neben Ba^{2+}-sensitiven I_{Kir}) Einwärtsströme mit den typischen biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften des I_h gemessen. Im Vergleich zu neokortikalen Neuronen der Ratte waren die Stromdichten der schnellen I_h-Komponente ($I_{h\text{-}fast}$) in den TLE-Geweben 63 % geringer, die Aktivierung langsamer und die Spannungsabhängigkeit in Richtung negativerer Potentiale verschoben. In Geweben von FLE-Patienten wurden 44 % höhere Dichten von $I_{h\text{-}fast}$ und eine schnellere Aktivierungskinetik gemessen als in TLE-Geweben. In TLE-Geweben von Patienten mit vielen Anfällen war die mittlere Dichte von $I_{h\text{-}fast}$ ~24 % geringer als in TLE-Geweben von Patienten mit wenig Anfällen. Exemplarische Messungen zeigten eine stärkere temporale Summation von artifiziellen EPSP in Neuronen mit wenig I_h als in Neuronen mit viel I_h (z. B. von FLE-Geweben).

Im Vergleich zu Autopsie-Kontrollen zeigte sich in TLE-Geweben (unabhängig von der Anfallshäufigkeit) eine ~50 %ige Verminderung der HCN1-mRNA und eine ~150 %ige Zunahme der HCN4-mRNA. Die Menge an HCN1-Protein war in den untersuchten TLE-Geweben von Patienten mit vielen Anfällen um etwa die Hälfte geringer als in Geweben von Patienten mit wenig Anfällen.

Zusammengefasst zeigen die erhobenen Daten eine deutliche Verminderung des kortikalen I_h bei humaner TLE v. a. bei Patienten mit vielen Anfällen. Die Messungen der mRNA verschiedener Untereinheiten legen nahe, dass bei TLE die Anzahl funktioneller Kanäle (aus HCN1-Untereinheiten) auf transkriptionaler Ebene reduziert sein könnte.

Allerdings deuten die unterschiedlichen Mengen an HCN1-Protein (bei gleicher mRNA) zwischen TLE-Geweben von Patienten mit wenig Anfällen und solchen von Patienten mit vielen Anfällen auch auf posttranskriptionale Schadesmechanismen hin. Ein pathologischer Verlust von HCN-Kanälen und dem von ihnen vermittelten I_h könnte die Erregbarkeit des Netzwerks erhöhen und zur Ausbreitung epileptischer Anfälle beitragen.

6. Summary

The hyperpolarization-activated cation current (I_h) is mediated by the family of HCN channels and plays a pivotal role in the control of neuronal excitability. Studies on animal models of temporal lobe epilepsy (TLE) have shown functional deficits of I_h or a reduced expression of HCN-channels. Possible alterations of I_h in human TLE have not been investigated in detail, so far.

Here, the biophysical properties of I_h were investigated in neurons (layer II/III) of human epileptogenic neocortex using somatic patch-clamp recordings (whole-cell mode). The tissues investigated comprise epileptogenic areas of the neocortex that were resected for therapeutical reasons from patients with pharmacoresistant TLE or frontal lobe epilepsy (FLE). In some TLE-tissues (and autopsy controls) the mRNA of the channel subunits HCN1–HCN4 were determined using quantitative PCR and the amount of HCN1 protein was investigated by immunoblotting.

Neurons from TLE tissues and FLE tissues exhibited (beside a Ba^{2+}-sensitive I_{Kir}) inward currents with typical biophysical and pharmacological properties of I_h. Compared to rat neocortical neurons, the current densities of the fast I_h-component ($I_{h\text{-fast}}$) were 63 % smaller than in TLE tissues. Furthermore, the kinetics of activation were slower and the voltage-dependence was shifted to more negative potentials in TLE. In FLE tissues the density of $I_{h\text{-fast}}$ was 44 % larger and the current activation was faster than in TLE tissues. In TLE tissues from patients that suffered many seizures the mean density of $I_{h\text{-fast}}$ was decreased by ~24 % in comparison to TLE tissues from patients that suffered many seizures. First measurements of the temporal summation of artificial EPSP revealed a more efficient summation in neurons with a small I_h than in neurons with a large I_h (e. g. in FLE tissues).

Compared to autopsy controls, the HCN1 mRNA was down regulated (by ~50 %) and the HCN4-mRNA was up-regulated (by ~150 %) in TLE tissues, independent of the

seizure frequency. The amount of HCN1 protein was about 50 % less in TLE tissues from patients with many seizures than in tissues from patients with few seizures.

In conclusion, the data presented reveal a considerable reduction of cortical I_h in human TLE – primarily in patients that suffered many seizures. The measurements of the mRNA of the different subunits suggest that in TLE the number of functional channels (consisting of HCN1 subunits) is decreased at the transcriptional level. However, the different amounts of HCN1 protein (present at similar mRNA levels) between TLE tissues from patients with few seizures and patients with many seizures might indicate that post-transcriptional mechanisms may play a role as well. A pathophysiological loss of HCN channels and subsequently of I_h might increase the network excitability and facilitate the spread of seizure activity.

7. Literaturverzeichnis

Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, DiFrancesco D. From funny current to HCN channels: 20 years of excitation. News Physiol Sci 2002, 17: 32–37.

Aghajanian GK, Rasmussen K. Intracellular studies in the facial nucleus illustrating a simple new method for obtaining viable motoneurons in adult rat brain slices. Synapse 1989, 3: 331–338.

Alagem N, Dvir M, Reuveny E. Mechanism of Ba^{2+} block of a mouse inwardly rectifying K^{+} channel: differential contribution by two discrete residues. J Physiol 2001, 534: 381–393.

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res 2004, 64: 5245–5250.

Angelo K, London M, Christensen SR, Häusser M. Local and global effects of I_h distribution in dendrites of mammalian neurons. J Neurosci 2007, 27: 8643–8653.

Aponte Y, Lien CC, Reisinger E, Jonas P. Hyperpolarization-activated cation channels in fast-spiking interneurons of rat hippocampus. J Physiol 2006, 574: 229–243.

Arion D, Sabatini M, Unger T, Pastor J, Alonso-Nanclares L, Ballesteros-Yáñez I, García Sola R, Muñoz A, Mirnics K, DeFelipe J. Correlation of transcriptome profile with electrical activity in temporal lobe epilepsy. Neurobiol Dis 2006, 22: 374–387.

Avoli M, Olivier A. Bursting in human epileptogenic neocortex is depressed by an *N*-methyl-D-aspartate antagonist. Neurosci Lett 1987, 76: 249–254.

Avoli M, Olivier A. Electrophysiological properties and synaptic responses in the deep layers of the human epileptogenic neocortex in vitro. J Neurophysiol 1989, 61: 589–606.

Beck H, Steffens R, Elger CE, Heinemann U. Voltage-dependent Ca^{2+} currents in epilepsy. Epilepsy Res 1998, 32: 321–332.

Becker AJ, Chen J, Paus S, Normann S, Beck H, Elger CE, Wiestler OD, Blümcke I. Transcriptional profiling in human epilepsy: expression array and single cell real-time qRT-PCR analysis reveal distinct cellular gene regulation. Neuroreport 2002, 13: 1327–1333.

Bell JE, Alafuzoff I, Al-Sarraj S, Arzberger T, Bogdanovic N, Budka H, Dexter DT, Falkai P, Ferrer I, Gelpi E, Gentleman SM, Giaccone G, Huitinga I, Ironside JW, Kliouеva N, Kovacs GG, Meyronet D, Palkovits M, Parchi P, Patsouris E, Reynolds R, Riederer P, Roggendorf W, Seilhean D, Schmitt A, Schmitz P, Streichenberger N, Schwalber A, Kretzschmar H. Management of a twenty-first century brain bank: experience in the BrainNet Europe consortium. Acta Neuropathol 2008, 115: 497–507.

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

Bender RA, Soleymani SV, Brewster AL, Nguyen ST, Beck H, Mathern GW, Baram TZ. Enhanced expression of a specific hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN) in surviving dentate gyrus granule cells of human and experimental epileptic hippocampus. J Neurosci 2003, 23: 6826–6836.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. Epilepsia 2010, 51: 676–685.

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

Bernard C, Anderson A, Becker A, Poolos NP, Beck H, Johnston D. Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. Science 2004, 305: 532–535.

Blümcke I, Beck H, Lie AA, Wiestler OD. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res 1999, 36: 205–223.

Blümcke I, Becker AJ, Klein C, Scheiwe C, Lie AA, Beck H, Waha A, Friedl MG, Kuhn R, Emson P, Elger C, Wiestler OD. 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 2000, 59:1–10.

Blümcke I, Thom M, Wiestler OD. Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. Brain Pathol 2002, 12: 199–211.

Bräuer AU, Savaskan NE, Kole MH, Plaschke M, Monteggia LM, Nestler EJ, Simbürger E, Deisz RA, Ninnemann O, Nitsch R. Molecular and functional analysis of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the hippocampus after entorhinal cortex lesion. FASEB J 2001, 15: 2689–2701.

Brewster A, Bender RA, Chen Y, Dube C, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ. Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. J Neurosci 2002, 22: 4591–4599.

Brewster AL, Bernard JA, Gall CM, Baram TZ. Formation of heteromeric hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the hippocampus is regulated by developmental seizures. Neurobiol Dis 2005, 19: 200–207.

Broicher T, Seidenbecher T, Meuth P, Munsch T, Meuth SG, Kanyshkova T, Pape HC, Budde T. T-current related effects of antiepileptic drugs and a Ca^{2+} channel antagonist on thalamic relay and local circuit interneurons in a rat model of absence epilepsy. Neuropharmacology 2007, 53: 431–446.

Budde T, White JA, Kay AR. Hyperpolarization-activated Na^{+}-K^{+} current (I_h) in neocortical neurons is blocked by external proteolysis and internal TEA. J Neurophysiol 1994, 72: 2737–2742.

Bullis JB, Jones TD, Poolos NP. Reversed somatodendritic I_h gradient in a class of rat hippocampal neurons with pyramidal morphology. J Physiol 2007, 579: 431–443.

Chen K, Baram TZ, Soltesz I. Febrile seizures in the developing brain result in persistent modification of neuronal excitability in limbic circuits. Nat Med 1999, 5: 888–894.

Chen K, Aradi I, Thon N, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ, Soltesz I. Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. Nat Med 2001, 7: 331–337.

Chen S, Wang J, Siegelbaum SA. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. J Gen Physiol 2001, 117: 491–504.

Chen X, Shu S, Schwartz LC, Sun C, Kapur J, Bayliss DA. Homeostatic regulation of synaptic excitability: tonic $GABA_A$ receptor currents replace I_h in cortical pyramidal neurons of HCN1 knock-out mice. J Neurosci 2010, 30: 2611–2622.

Cheng L, Kinard K, Rajamani R, Sanguinetti MC. Molecular mapping of the binding site for a blocker of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-modulated pacemaker channels. J Pharmacol Exp Ther 2007, 322 :931–939.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987, 162: 156–159.

Coenen AM, van Luijtelaar EL. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. Behav Genet 2003, 33: 635–655

Coulson DT, Brockbank S, Quinn JG, Murphy S, Ravid R, Irvine GB, Johnston JA. Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. BMC Mol Biol 2008, 9: 46.

Coulter DA, Huguenard JR, Prince DA. Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons. Ann Neurol 1989, 25: 582–593.

Cramer JA, French J. Quantitative assessment of seizure severity for clinical trials: a review of approaches to seizure components. Epilepsia 2001, 42: 119–129.

Crunelli V, Leresche N. A role for $GABA_B$ receptors in excitation and inhibition of thalamocortical cells. Trends Neurosci 1991, 14: 16–21.

Crunelli V, Leresche N. Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks. Nat Rev Neurosci 2002, 3: 371–382.

Cummins TR, Xia Y, Haddad GG. Functional properties of rat and human neocortical voltage-sensitive sodium currents. J Neurophysiol 1994, 71: 1052–1064.

Day M, Carr DB, Ulrich S, Ilijic E, Tkatch T, Surmeier DJ. Dendritic excitability of mouse frontal cortex pyramidal neurons is shaped by the interaction among HCN, Kir2, and K_{leak} channels. J Neurosci 2005, 25: 8776–8787.

Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Genome Res 2001, 11: 1156-1166.

Deisz RA, Fortin G, Zieglgänsberger W. Voltage dependence of excitatory postsynaptic potentials of rat neocortical neurons. J Neurophysiol 1991, 65: 371–382.

Deisz RA. A tetrodotoxin-insensitive sodium current initiates burst firing of neocortical neurons. Neuroscience 1996, 70: 341–351.

Deisz RA, Lehmann TN, Lanksch WR, Meencke HJ, Nitsch R. Receptor mechanisms involved in hyperexcitability of cortical tissue from epilepsy surgery. J Physiol 1998, 513: P35–36.

Deisz RA. $GABA_B$ receptor-mediated effects in human and rat neocortical neurones in vitro. Neuropharmacology 1999, 38: 1755–1766.

Deisz RA. Cellular mechanisms of pharmacoresistance in slices from epilepsy surgery. Novartis Found Symp 2002, 243: 186–199.

Deisz RA. 2009. Intrinsic mechanisms contributing to hyperexcitability of human epileptogenic cortex. In: Schwartzkroin PA (Hrsg.) Encyclopedia of Basic Epilepsy Research, Band 3, Oxford: Academic Press, 1266–1272.

Deisz RA, Lehmann TN, Horn P, Dehnicke C, Nitsch R. Components of neuronal chloride transport in rat and human neocortex. J Physiol 2011, 589: 1317–1347.

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

Dodt HU, Zieglgänsberger W. Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-videomicroscopy. Brain Res 1990, 537: 333–336.

Drews D, Klar M, Dame C, Bräuer AU. Developmental expression profile of the YY2 gene in mice. BMC Dev Biol 2009, 9: 45.

Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. Lancet 2006, 367: 1087–1100.

Durrenberger PF, Fernando S, Kashefi SN, Ferrer I, Hauw JJ, Seilhean D, Smith C, Walker R, Al-Sarraj S, Troakes C, Palkovits M, Kasztner M, Huitinga I, Arzberger T, Dexter DT, Kretzschmar H, Reynolds R. Effects of antemortem and postmortem variables on human brain mRNA quality: a BrainNet Europe study. J Neuropathol Exp Neurol 2010, 69: 70–81.

Dwivedi Y, Mondal AC, Rizavi HS, Conley RR. Suicide brain is associated with decreased expression of neurotrophins. Biol Psychiatry 2005, 58: 315–324.

Eckert WA 3rd, Willcockson HH, Light AR. Interference of biocytin with opioid-evoked hyperpolarization and membrane properties of rat spinal substantia gelatinosa neurons. Neurosci Lett 2001, 297: 117–120.

Engel J Jr, Van Ness PC, Rasmussen TB. 1993. Outcome with respect to epileptic seizures. In: Engel J Jr (Hrsg.) Surgical Treatment of the Epilepsies. 2. Aufl. New York: Raven Press Ltd, 609–621.

Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Mol Aspects Med 2006, 27: 126–139.

Foehring RC, Lorenzon NM, Herron P, Wilson CJ. Correlation of physiologically and morphologically identified neuronal types in human association cortex in vitro. J Neurophysiol 1991, 66: 1825–1837.

Foehring RC, Waters RS. Contributions of low-threshold calcium current and anomalous rectifier (I_h) to slow depolarizations underlying burst firing in human neocortical neurons in vitro. Neurosci Lett 1991, 124: 17–21.

Forsgren L, Beghi E, Õun A, Sillanpää M. The epidemiology of epilepsy in Europe – a systematic review. Eur J Neurol 2005, 12: 245–253.

Fountoulakis M, Hardmeier R, Höger H, Lubec G. Postmortem changes in the level of brain proteins. Exp Neurol 2001, 167: 86-94.

Franz O, Liss B, Neu A, Roeper J. Single-cell mRNA expression of *HCN1* correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (Ih) in central neurons. Eur J Neurosci. 2000, 12: 2685–2693.

Frère SG, Lüthi A. Pacemaker channels in mouse thalamocortical neurones are regulated by distinct pathways of cAMP synthesis. J Physiol 2004, 554: 111–25.

Friedman A, Gutnick MJ. Low-threshold calcium electrogenesis in neocortical neurons. Neurosci Lett 1987, 81: 117-122.

Gasparini S, DiFrancesco D. Action of the hyperpolarization-activated current (I_h) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. Pflugers Arch 1997, 435: 99–106.

Glasel JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. Biotechniques 1995, 18: 62–63.

Harris NC, Constanti A. Mechanism of block by ZD 7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea pig substantia nigra neurons in vitro. J Neurophysiol 1995, 74: 2366–2378.

Hauser WA, Lee JR. Do seizures beget seizures? Prog Brain Res 2002, 135: 215–219.

Holmes MD, Brown M, Tucker DM. Are “generalized” seizures truly generalized? Evidence of localized mesial frontal and frontopolar discharges in absence. Epilepsia 2004, 45: 1568–1579.

Horikawa K, Armstrong WE. A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. J Neurosci Methods 1988, 25: 1–11.

Huang Z, Walker MC, Shah MM. Loss of dendritic HCN1 subunits enhances cortical excitability and epileptogenesis. J Neurosci 2009, 29: 10979–10988.

Huggenberger S, Vater M, Deisz RA. Interlaminar differences of intrinsic properties of pyramidal neurons in the auditory cortex of mice. Cereb Cortex 2009, 19: 1008–1018.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes Immun 2005, 6: 279–284.

Hynd MR, Lewohl JM, Scott HL, Dodd PR. Biochemical and molecular studies using human autopsy brain tissue. J Neurochem 2003, 85: 543–562.

Internationale Liga gegen Epilepsie. ILAE Commission Report. The epidemiology of the epilepsies: future directions. International League Against Epilepsy. Epilepsia 1997, 38: 614–618.

Jamali S, Bartolomei F, Robaglia-Schlupp A, Massacrier A, Peragut JC, Régis J, Dufour H, Ravid R, Roll P, Pereira S, Royer B, Roeckel-Trevisiol N, Fontaine M, Guye M, Boucraut J, Chauvel P, Cau P, Szepetowski P. Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. Brain 2006, 129: 625–641.

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

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

Kellinghaus C, Lüders HO. Frontal lobe epilepsy. Epileptic Disord 2004, 6: 223–239.

Kole MHP, Strauss U, Lehmann TN, Lanksch WR, Meencke HJ, Deisz RA. Hyperpolarization-activated inward currents of human neocortical neurons. Soc Neurosci 1999, 25: 844.

Kole MH, Bräuer AU, Stuart GJ. Inherited cortical HCN1 channel loss amplifies dendritic calcium electrogenesis and burst firing in a rat absence epilepsy model. J Physiol 2007, 578: 507–525.

Kwan P, Brodie MJ. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. Epilepsia. 2005, 46: 224–235.

Kwan P, Sills GJ, Brodie MJ. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. Pharmacol Ther 2001, 90: 21–34.

Lewis AS, Schwartz E, Chan CS, Noam Y, Shin M, Wadman WJ, Surmeier DJ, Baram TZ, Macdonald RL, Chetkovich DM. Alternatively spliced isoforms of TRIP8b differentially control h channel trafficking and function. J Neurosci 2009, 29: 6250–6265.

Li S, He Z, Guo L, Huang L, Wang J, He W. Behavioral alterations associated with a down regulation of HCN1 mRNA in hippocampal cornus ammon 1 region and neocortex after chronic incomplete global cerebral ischemia in rats. Neuroscience 2010, 165: 654–661.

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

Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. Nature 1998, 393: 587–591.

Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K, Langebartels A, Wotjak C, Munsch T, Zong X, Feil S, Feil R, Lancel M, Chien KR, Konnerth A, Pape HC, Biel M, Hofmann F. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. EMBO J 2003, 22: 216–224.

Maccaferri G, McBain CJ. The hyperpolarization-activated current (I_h) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurones. J Physiol 1996, 497: 119–130.

Macri V, Proenza C, Agranovich E, Angoli D, Accili EA. Separable gating mechanisms in a mammalian pacemaker channel. J Biol Chem 2002, 277: 35939–35946.

Magee JC. Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. J Neurosci 1998, 18: 7613–7624.

Magee JC. Dendritic I_h normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. Nat Neurosci 1999, 2: 508–514.

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. Nat Rev Neurosci 2004, 5: 793–807.

McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA. Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. J Neurophysiol 1985, 54: 782–806.

McCormick DA. GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. J Neurophysiol 1989, 62: 1018–1027.

McCormick DA, Pape HC. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. J Physiol 1990, 431:291–318.

McCormick DA, Bal T. Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. Annu Rev Neurosci 1997, 20: 185–215.

McNeill RE, Miller N, Kerin MJ. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. BMC Mol Biol 2007, 8: 107.

Meeren HKM, Pijn JPM, van Luijtelaar ELJM, Coenen AML, Lopes da Silva FH. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. J Neurosci 2002, 22: 1480–1495.

Menendez de la Prida L, Benavides-Piccione R, Sola R, Pozo MA. Electrophysiological properties of interneurons from intraoperative spiking areas of epileptic human temporal neocortex. Neuroreport 2002, 13: 1421–1495.

Moyer JR, Brown TH. Methods for whole-cell recording from visually preselected neurons of perirhinal cortex in brain slices from young and aging rats. J Neurosci Methods 1998, 86: 35–54.

Much B, Wahl-Schott C, Zong X, Schneider A, Baumann L, Moosmang S, Ludwig A, Biel M. Role of subunit heteromerization and *N*-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. J Biol Chem 2003, 278: 43781–43786.

Multani P, Myers RH, Blume HW, Schomer DL, Sotrel A. Neocortical dendritic pathology in human partial epilepsy: a quantitative Golgi study. Epilepsia 1994, 35: 728–736.

Najm IM, Tilelli CQ, Oghlakian R. Pathophysiological mechanisms of focal cortical dysplasia: a critical review of human tissue studies and animal models. Epilepsia 2007, 48 Suppl 2:21–32.

Nichols CG, Lopatin AN. Inward rectifier potassium channels. Annu Rev Physiol. 1997, 59: 171–191.

Nolan MF, Malleret G, Lee KH, Gibbs E, Dudman JT, Santoro B, Yin D, Thompson RF, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A. The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. Cell 2003, 115: 551–564.

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

Noma A, Irisawa H. Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. Pflügers Arch. 1976 364: 45–52.

Notomi T, Shigemoto R. Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. J Comp Neurol 2004, 471: 241–276.

Özbas-Gerçeker F, Redeker S, Boer K, Ozgüç M, Saygi S, Dalkara T, Soylemezoglu F, Akalan N, Baayen JC, Gorter JA, Aronica E. Serial analysis of gene expression in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. Neuroscience 2006, 138: 457–474.

Pape HC. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. Annu Rev Physiol 1996, 58: 299–327.

Paxinos G, Watson C. 2005. The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam: Elsevier Academic Press.

Pernot F, Dorandeu F, Beaup C, Peinnequin A. Selection of reference genes for real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in hippocampal structure in a murine model of temporal lobe epilepsy with focal seizures. J Neurosci Res 2010, 88: 1000–1008.

Preece P, Virley DJ, Costandi M, Coombes R, Moss SJ, Mudge AW, Jazin E, Cairns NJ. An optimistic view for quantifying mRNA in post-mortem human brain. Brain Res Mol Brain Res 2003, 116: 7–16.

Prole DL, Yellen G. Reversal of HCN channel voltage dependence via bridging of the S4-S5 linker and Post-S6. J Gen Physiol 2006, 128: 273–282.

Poolos NP, Migliore M, Johnston D. Pharmacological upregulation of h-channels reduces the excitability of pyramidal neuron dendrites. Nat Neurosci 2002, 5: 767–774.

Portzehl H, Caldwell PC, Rueegg JC. The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab maia squinado on the internal concentration of free calcium ions. Biochim Biophys Acta 1964, 79: 581–591.

Powell KL, Ng C, O'Brien TJ, Xu SH, Williams DA, Foote SJ, Reid CA. Decreases in HCN mRNA expression in the hippocampus after kindling and status epilepticus in adult rats. Epilepsia 2008, 49: 1686–1695.

Rémi J, Noachtar S. Clinical features of the postictal state: correlation with seizure variables. Epilepsy Behav 2010, 19:114–117.

Remy S, Gabriel S, Urban BW, Dietrich D, Lehmann TN, Elger CE, Heinemann U, Beck H. A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. Ann Neurol 2003, 53: 469–479.

Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. Brain. 2006, 129: 18–35.

Richichi C, Brewster AL, Bender RA, Simeone TA, Zha Q, Yin HZ, Weiss JH, Baram TZ. Mechanisms of seizure-induced 'transcriptional channelopathy' of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated (HCN) channels. Neurobiol Dis 2008, 29: 297–305.

Rickham PP. Human experimentation. Code of ethics of the world medical association. Declaration of Helsinki. Br Med J 1964, 2: 177.

Rosenberg IM. 1996. Protein analysis and purification benchtop techniques. Boston: Birkhäuser, 153–159.

Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. Cell 1998, 93: 717–729.

Santoro B, Piskorowski RA, Pian P, Hu L, Liu H, Siegelbaum SA. TRIP8b splice variants form a family of auxiliary subunits that regulate gating and trafficking of HCN channels in the brain. Neuron 2009, 62: 802–813.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol Biol 2006, 7: 3.

Sciancalepore M, Constanti A. Inward-rectifying membrane currents activated by hyperpolarization in immature rat olfactory cortex neurones in vitro. Brain Res 1998, 814: 133–142.

Scimemi A, Andersson A, Heeroma JH, Strandberg J, Rydenhag B, McEvoy AW, Thom M, Asztely F, Walker MC. Tonic $GABA_A$ receptor-mediated currents in human brain. Eur J Neurosci 2006, 24: 1157–1160.

Shah MM, Anderson AE, Leung V, Lin X, Johnston D. Seizure-induced plasticity of h channels in entorhinal cortical layer III pyramidal neurons. Neuron 2004, 44: 495–508.

Sherwin A, Robitaille Y, Quesney F, Olivier A, Villemure J, Leblanc R, Feindel W, Andermann E, Gotman J, Andermann F, Ethier R, Kish S. Excitatory amino acids are elevated in human epileptic cerebral cortex. Neurology 1988, 38: 920–923.

Shin M, Brager D, Jaramillo TC, Johnston D, Chetkovich DM. Mislocalization of h channel subunits underlies h channelopathy in temporal lobe epilepsy. Neurobiol Dis 2008, 32: 26–36.

Solomon JS, Nerbonne JM. Two kinetically distinct components of hyperpolarization-activated current in rat superior colliculus-projecting neurons. J Physiol 1993, 469: 291–313.

Steriade M. Sleep, epilepsy and thalamic reticular inhibitory neurons. Trends Neurosci 2005, 28: 317–324.

Stieber J, Stöckl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F. Functional expression of the human HCN3 channel. J Biol Chem 2005, 280: 34635–34643.

Strauss U, Kole MH, Bräuer AU, Pahnke J, Bajorat R, Rolfs A, Nitsch R, Deisz RA. An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. Eur J Neurosci 2004, 19: 3048–3058.

Surges R, Freiman TM, Feuerstein TJ. Gabapentin increases the hyperpolarization-activated cation current Ih in rat CA1 pyramidal cells. Epilepsia 2003, 44: 150–156.

Tang B, Sander T, Craven KB, Hempelmann A, Escayg A. Mutation analysis of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels HCN1 and HCN2 in idiopathic generalized epilepsy. Neurobiol Dis 2008, 29: 59–70.

Tasker JG, Dudek FE. Electrophysiology of GABA-mediated synaptic transmission and possible roles in epilepsy. Neurochem Res 1991, 16: 251–262.

Teichgräber LA, Lehmann T, Meencke H, Weiss T, Nitsch R, Deisz RA. Impaired function of $GABA_B$ receptors in tissues from pharmacoresistant epilepsy patients. Epilepsia 2009, 50: 1697–1716.

Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. J Pharmacol Toxicol Methods 2005, 51: 187–200.

Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY. How does voltage open an ion channel? Annu Rev Cell Dev Biol. 2006, 22: 23–52.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 2002, 3: 0034.1–0034.12.

VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. Biotechniques 2008, 44: 619–626

van Welie I, Wadman WJ, van Hooft JA. Low affinity block of native and cloned hyperpolarization-activated I_h channels by Ba^{2+} ions. Eur J Pharmacol 2005, 507: 15–20.

Velumian AA, Zhang L, Pennefather P, Carlen PL. Reversible inhibition of I_K, I_{AHP}, I_h and I_{Ca} currents by internally applied gluconate in rat hippocampal pyramidal neurones. Pflügers Arch 1997, 433: 343–350.

Viscomi C, Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Moroni A, DiFrancesco D. C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. J Biol Chem 2001, 276: 29930–29934.

Vreugdenhil M, Hoogland G, van Veelen CW, Wadman WJ. Persistent sodium current in subicular neurons isolated from patients with temporal lobe epilepsy. Eur J Neurosci 2004, 19: 2769–2778.

Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. Nature 2001, 411: 805–810.

Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, Shu Y, Simen A, Duque A, Vijayraghavan S, Brennan A, Dudley A, Nou E, Mazer JA, McCormick DA, Arnsten AF. α2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. Cell 2007, 129: 397–410.

Williams SR, Stuart GJ. Mechanisms and consequences of action potential burst firing in rat neocortical pyramidal neurons. J Physiol 1999, 521: 467-482.

Williams SR, Stuart GJ. Site independence of EPSP time course is mediated by dendritic I_h in neocortical pyramidal neurons. J Neurophysiol 2000, 83: 3177–3182.

Williams SR, Mitchell SJ. Direct measurement of somatic voltage clamp errors in central neurons. Nat Neurosci 2008, 11: 790–798.

Wierschke S, Lehmann TN, Dehnicke C, Horn P, Nitsch R, Deisz RA. Hyperpolarization-activated cation currents in human epileptogenic neocortex. Epilepsia 2010a, 51: 404–414.

Wierschke S, Gigout S, Horn P, Lehmann TN, Dehnicke C, Bräuer AU, Deisz RA. Evaluating reference genes to normalize gene expression in human epileptogenic brain tissues. Biochem Biophys Res Commun 2010b, 403: 385–390.

Wuarin JP, Peacock WJ, Dudek FE. Single-electrode voltage-clamp analysis of the *N*-methyl-D-aspartate component of synaptic responses in neocortical slices from children with intractable epilepsy. J Neurophysiol 1992, 67: 84-93.

Xu X, Vysotskaya ZV, Liu Q, Zhou L. Structural basis for the cAMP-dependent gating in the human HCN4 channel. J Biol Chem 2010, 285: 37082–37091.

Yu FH, Catterall WA. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. Sci STKE 2004, 253: re15.

Yu X, Duan KL, Shang CF, Yu HG, Zhou Z. Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I_h channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004, 101: 1051–1056.

Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. Nature 2003, 425: 200–205.

8. Eidesstattliche Erklärung

Mit meiner Unterschrift versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine weiteren außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt. Aus anderen Werken inhaltlich und wörtlich entnommene Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Berlin, den 30.03.2011

Stephan Wierschke

9. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Dr. habil. Rudolf Deisz für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Er hat mich mit viel Geduld in den anspruchsvollen experimentellen Techniken unterwiesen und mich bei der Planung und Durchführung der Experimente engagiert unterstützt. Im gleichen Atemzug danke ich auch Herrn Prof. Hans-Joachim Pflüger für sein Interesse und die Vertretung meiner Promotion am Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin.

Ich bedanke mich bei allen Kooperationspartnern, ohne deren Unterstützung dieses Promotionsprojekt gar nicht möglich gewesen wäre. Besonders danke ich dem Oberarzt Dr. Christoph Dehnicke vom Epilepsie-Zentrum Berlin-Brandenburg für die Bereitstellung der klinischen Daten und für seine fachlichen Kommentare. Frau Prof. Anja Bräuer (Institut für Zell- und Neurobiologie) und ihren Mitarbeitern insbesondere Bettina Brokowski danke ich ganz herzlich für die umfangreiche Unterstützung bei den RT-qPCR-Messungen und Immunoblot-Nachweisen. Herrn Dr. Sylvain Gigout danke ich für seine engagierte Hilfe bei den Experimenten und für konstruktive Kritik an Manuskripten und Präsentationen.

Für die exzellente technische Assistenz möchte ich mich bei Heike Meyer und Elke Hoffmann bedanken. Außerdem danke ich Dr. Karl Roth und Peter Köhler für ihre Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen im Labor. Bei der Optimierung der Fluoreszenzfärbungen und deren Dokumentation mit dem Konfokalmikroskop hat mich Jutta Schüler kompetent unterstützt. Weiterhin danke ich Pamela Richter und Marni Pollrich sowie allen anderen Kollegen des Instituts, die mir verzeihen mögen, wenn ich sie hier aus Platzgründen nicht namentlich erwähnen kann.

Einen besonderen Dank bin ich schließlich der Sonnenfeld-Stiftung schuldig, die die vorliegende Arbeit mit einem Promotionsstipendium ermöglicht hat. Insbesondere dem Vorsitzenden der Sonnenfeld-Stiftung, Herrn Prof. von Villiez, danke ich für die aufmunternden Gespräche und sein persönliches Interesse an der Thematik.

Für das aufmerksame Korrekturlesen bedanke ich mich bei Kristin Stock und meinem Bruder Robert Wierschke. Meine Eltern, meine liebe Anika und viele Freunde außerhalb der Wissenschaft haben auch in schwierigen Phasen immer an mich geglaubt und mir Mut gemacht – auch ihnen sei herzlich gedankt.

10. Verzeichnis der Publikationen

10.1 Originalarbeiten

Wierschke S, Gigout S, Horn P, Lehmann TN, Dehnicke C, Bräuer AU, Deisz RA. Evaluating reference genes to normalize gene expression in human epileptogenic brain tissues. Biochem Biophys Res Commun 2010, 403: 385–390.

Wierschke S, Lehmann TN, Dehnicke C, Horn P, Nitsch R, Deisz RA. Hyperpolarization-activated cation currents in human epileptogenic neocortex. Epilepsia 2010, 51: 404–414.

10.2 Konferenzbeiträge

Wierschke S, Horn P, Dehnicke C, Bräuer AU, Deisz RA. Reduced hyperpolarization-activated cation currents in temporal lobe epilepsy. Berlin Neuroscience Forum 2010 (Abstrakt und Poster).

Wierschke S, Lehmann TN, Dehnicke C, Nitsch R, Deisz RA. h-currents in human neocortical neurons in epilepsy surgery tissues. 20th European Students Conference 2009 (Abstrakt und Vortrag).

Wierschke S, Lehmann TN, Dehnicke C, Nitsch R, Deisz RA. Reductions of hyperpolarization-activated inward currents of human neocortical neurones correlate with severity of epilepsy. Proc Physiol Soc 2006, 3: C105 (Abstrakt und Poster).

Wierschke S, Horn P, Dehnicke C, Bräuer AU, Deisz RA. Reduced hyperpolarization-activated cation currents in temporal lobe epilepsy. Berlin Neuroscience Forum 2006 (Abstrakt und Poster).

11. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.