

Aus dem Institut für Neurophysiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Beteiligung intrinsischer Eigenschaften von Neuronen an  
Netzwerkoszillationen im Hippokampus

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexandra Kunert

aus Donauwörth

Gutachter:       1. Prof. Dr. U. Heinemann  
                      2. Prof. Dr. D. Schmitz  
                      3. Prof. Dr. H. J. Luhmann

Datum der Promotion: 22.06.2014

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Grundlegendes über Netzwerkoszillationen	1
1.2	Gamma-Oszillationen	1
1.3	Theta-Oszillationen	3
1.4	Grundlegende Mechanismen	3
1.5	Der M-Strom	4
1.6	Der h-Strom	5
1.7	Der Na <sup>+</sup> -Strom	5
1.8	Modulatoren von Ionenkanälen	6
1.8.1	XE991	6
1.8.2	Retigabine	6
1.8.3	Icagen-110381	7
1.8.4	Losigamone	7
1.8.5	ZD7288	8
<b>2</b>	<b>Fragestellung der Arbeit</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>11</b>
3.1	Versuchstiere	11
3.2	Präparation und Anfertigung der Hirnschnitte	11
3.3	Messkammer	13
3.4	Perfusionslösung	14
3.5	Elektroden	15
3.5.1	Reizelektroden	15
3.5.2	Referenzelektroden	15
3.5.3	Extrazelluläre Ableitelektroden	15
3.6	Anatomie des Hippokampus	15
3.7	Elektrophysiologische Messungen	17
3.7.1	Extrazelluläre Feldpotentialmessung	17
3.7.2	Population Spike	18
3.8	Datenerfassung -und analyse	18
3.8.1	Datenerhebung	18
3.8.2	Darstellung	20
3.9	Pharmaka	20
3.9.1	Kainat	21
3.10	Stimulationsprotokoll	21
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>23</b>
4.1	Kainat-induzierte Oszillationen <i>in vitro</i>	23
4.1.1	Entwicklung und Stabilität der Oszillationen	23
4.1.2	Effekt von XE991	24
4.1.3	Effekt von Losigamone	26
4.1.4	Effekt von Icagen-110381	28
4.2	Kainat-induzierte Theta-Oszillationen	30
4.2.1	Effekt von XE991	30

4.2.2	Effekt von Losigamone	31
4.2.3	Effekt von Icagen-110381	33
4.3	Stimulus-induzierte Gamma-Oszillationen	34
4.3.1	Effekt von XE991	35
4.3.2	Effekt von Losigamone	37
4.3.3	Effekt von Retigabine	38
4.3.4	Effekt von ZD7288	40
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>42</b>
5.1	Gamma-Oszillationen	42
5.2	Theta-Oszillationen	44
5.3	Badapplikation von KCNQ-Kanal Modulatoren supprimiert Netzwerkoszillationen	45
5.4	Badapplikation von Losigamone supprimiert Netzwerkoszillationen	47
5.5	Badapplikation von ZD7288 moduliert Netzwerkoszillationen	48
5.6	Ausblick	49
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>61</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis	61
8.2	Danksagung	62
8.3	Tabellarischer Lebenslauf	63
8.4	Publikationsliste	64
8.5	Selbständigkeitserklärung	65

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Benzamide	7
Abbildung 2: Schematischer Querschnitt durch eine Interface-Messkammer	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Konnektivität im Hippokampus	17
Abbildung 4: Elektrodenpositionierung	18
Abbildung 5: Effekt von XE991 auf Gamma-Oszillationen	25
Abbildung 6: Effekt von Losigamone auf Gamma-Oszillationen	27
Abbildung 7: Effekt von Icagen-110381 auf Gamma-Oszillationen	29
Abbildung 8: Effekt von XE991 auf Theta-Oszillationen	30
Abbildung 9: Effekt von Losigamone auf Theta-Oszillationen	32
Abbildung 10: Effekt von Icagen-110381 auf Theta-Oszillationen	33
Abbildung 11: Latenzen zwischen Gamma-Oszillationen im Gyrus Dentatus und Area CA3	35
Abbildung 12: Effekt von XE991 auf Stimulus-induzierte Gamma-Oszillationen	36
Abbildung 13: Effekt von Losigamone auf Stimulus-induzierte Gamma-Oszillationen	38
Abbildung 14: Effekt von Retigabine auf Stimulus-induzierte Gamma-Oszillationen	39
Abbildung 15: Effekt von ZD7288 auf Stimulus-induzierte Gamma-Oszillationen	41

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Eigenschaften der eingesetzten Wirkstoffe und ihre Konzentrationen	21
---	----

## **1 Einleitung**

### **1.1 Grundlegendes über Netzwerkoszillationen**

Im Gehirn von Mensch und Tier finden sich ubiquitär rhythmische elektrische Aktivitätsmuster, so genannte Netzwerkoszillationen, die sich anhand ihrer Frequenzen unterscheiden und im Bereich von 0.05 Hz bis 500 Hz auftreten. *In vivo* treten sie bei der Verarbeitung von Sinneseindrücken, z.B. im olfaktorischen System (Laurent und Davidowitz 1994), bei Wahrnehmungsprozessen und Gedächtnisbildung (Miltner, Braun et al. 1999), bei der Programmierung motorischer Handlungen (Murthy und Fetz 1996) und bei der Prozessierung, der Speicherung und dem Abruf gespeicherter Informationen auf (Singer 1993; Axmacher, Mormann et al. 2006). In pathophysiologischer Weise sind überdies rhythmische Entladungen bei epileptischen Krampfanfällen vorhanden (Fisahn 2005).

Obwohl Oszillationen in allen kortikalen Arealen abgeleitet werden, eignet sich der paarig angelegte Hippokampus für die Untersuchung solcher Rhythmen am besten. Aufgrund seiner übersichtlichen Architektur mit einem klaren, trilaminären Aufbau bietet er die Möglichkeit, Struktur und Funktionsweisen von Neuronen, Synapsen und übergeordneten Netzwerken im Modell zu untersuchen (Patton und McNaughton 1995). Aus anatomischer Sicht ist er somit die einfachste kortikale Struktur, mit parallel zueinander angeordneten Dendriten und senkrecht dazu angeordneten Afferenzen, was erklärt, warum in ihm die größten Amplituden extrazellulär abgeleiteter Potentiale gemessen werden (Bartos, Vida et al. 2007).

### **1.2 Gamma-Oszillationen**

Im Hippokampus und entorhinalen Kortex werden Gamma-Oszillationen ( $\gamma$ -Oszillationen) *in vivo* unter anderem während des REM-Schlafs (engl. „rapid eye movement“) oder explorativem Verhalten beobachtet, wobei sie von Theta-Oszillationen begleitet sein können, oder eigenständig sind (Chrobak und Buzsaki 1998). Man kann transiente Oszillationen, die nur für Bruchteile einer Sekunde andauern und z.B. durch kurze sensorische Stimuli induzierbar sind, von persistenten  $\gamma$ -Oszillationen unterscheiden, die über mehrere Sekunden oder Minuten aufrecht erhalten werden und z.B. als spontane, schnelle Oszillationen Theta-Oszillationen überlagern (Traub, Bibbig et al. 2000).

Transiente Oszillationen können in hippokampalen Hirnschnitten *in vitro* durch Aktivierung metabotroper Glutamat-Rezeptoren (mGluRs) via fokaler Glutamat

Applikation oder durch tetanische elektrische Stimulation erzeugt werden (Whittington, Traub et al. 1995; Traub, Whittington et al. 1996; Poschel, Heinemann et al. 2003). Persistente Oszillationen können durch Agonisten verschiedener metabotroper oder ionotroper Rezeptoren im Hirnschnitt experimentell hervorgerufen werden, darunter Agonisten muskarinerg Acetylcholin-Rezeptoren (mAChRs) und Kainat-Rezeptoren (KARs) (Fisahn 2005).

Bei den Stimulus-induzierten  $\gamma$ -Oszillationen werden die Neurone direkt aktiviert, was eine Ausschüttung neuroaktiver Substanzen wie Glutamat, GABA und Acetylcholin zur Folge hat und zur Ausbildung von Oszillationen führt, die nach  $\sim 100$  ms post-stimulatorisch einsetzen (Traub, Bibbig et al. 2004).

Der für Gamma-Oszillationen relevante intrazelluläre Mechanismus beruht auf der Kombination aus langsamen Membranpotentialdepolarisationen mit überlagerten und über  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren vermittelten inhibitorischen postsynaptischen Potentialen (Whittington, Traub et al. 1995). Diese, über synaptische Inhibition modulierte  $\gamma$ -Aktivität ruft Aktionspotentiale in Pyramidenzellen hervor, die synchron mit lokalen Feldpotentialen im  $\gamma$ -Frequenzbereich sichtbar werden.

Stimulus-induzierte  $\gamma$ -Oszillationen beginnen bei  $\sim 70 - 100$  Hz und fallen dann progressiv mit der Frequenz ab (Poschel, Heinemann et al. 2003). Pharmakologisch induzierte  $\gamma$ -Oszillationen bleiben bei einer Frequenz von  $\sim 40$  Hz stabil (Fisahn, Pike et al. 1998).

Allgemein wird angenommen, dass Netzwerkoszillationen auf synaptischen Interaktionen zwischen Hauptzellen und Interneuronen sowie zwischen Interneuronen untereinander beruhen (Bartos, Vida et al. 2002; Traub, Bibbig et al. 2004). Bei Stimulus-induzierten  $\gamma$ -Oszillationen feuern die Interneurone und Pyramidenzellen synchron in jedem  $\gamma$ -Zyklus, exzitatorische und inhibitorische Aktivität ist also zu annähernd gleichen Teilen beteiligt. Im Unterschied dazu stehen die pharmakologisch induzierten  $\gamma$ -Oszillationen, bei denen Korbzellen und andere Interneurone den Rhythmus bestimmen während die Pyramidenzellen nur bei ca. 5 % der  $\gamma$ -Zyklen mitfeuern (Fisahn, Pike et al. 1998). Doch nicht nur die schnelle GABAerge bzw. glutamaterg vermittelte synaptische Transmission ist von Bedeutung, sondern ebenso asynaptische Koppelungsmechanismen via elektrischer Synapsen, so genannter gap junctions (Traub, Bibbig et al. 2000).

### 1.3 Theta-Oszillationen

Langsame Oszillationen im Thetafrequenzbereich (4 – 15 Hz) sind ein dominantes Netzwerkmodell im Hippokampus. Sie werden während des REM-Schlafes (Jouvet 1969) beobachtet und treten überdies bei sämtlichen lokomotorischen Aktivitäten auf (Vanderwolf 1969). Auch bei Gedächtnisprozessen haben Theta-Oszillationen ( $\theta$ -Oszillationen) eine tragende Rolle: Sie gewährleisten eine gewisse Ordnung neuronaler hippocampaler Aktivität mit der sie die Verschlüsselung räumlicher Informationen und deren Überführung ins Kurzzeitgedächtnis ermöglichen. Dabei werden sie von phasischen  $\gamma$ -Oszillationen begleitet, mit denen sie funktionell eng verbunden sind. Gemeinsam scheinen sie eine Art neuronalen Kode zu bilden, der die Speicherung und den geordneten Abruf räumlicher Informationen ermöglicht (Raghavachari, Kahana et al. 2001; Lisman und Buzsaki 2008). Jedes Element im Raum wird dabei als Welle einer  $\gamma$ -Oszillation verschlüsselt, dessen Abruf zeitlich von den  $\theta$ -Oszillationen koordiniert wird. In diesem Modell können Anomalien von  $\theta$ -Oszillationen die Reihenfolge von Gedanken und Wahrnehmung irritieren und werden u.a. in die Pathophysiologie der Schizophrenie miteinbezogen.

Die Induktion persistenter  $\theta$ -Oszillationen *in vitro* erfolgt, ähnlich der  $\gamma$ -Oszillationen, pharmakologisch über die Aktivierung ionotroper Glutamat-Rezeptoren. Entscheidend für den jeweiligen Rhythmus ist dabei die Achse in der die Hirnschnitte angefertigt werden: eine longitudinale Schnittführung resultiert in einem  $\theta$ -Rhythmus während die Schnittführung in transversaler Ausrichtung einen  $\gamma$ -Rhythmus hervorruft. Diese orthogonale Beziehung lässt auf ein axonales Verzweigungsmuster hippocampaler Interneurone in Segmenten schließen, das den unterschiedlichen rhythmischen Aktivitäten als Struktur dient (Gloveli, Dugladze et al. 2005).

### 1.4 Grundlegende Mechanismen

Wenn das Gehirn arbeitet, werden Massen an Neuronen rhythmisch aktiviert und somit zeitlich und räumlich geordnet. Die Mechanismen, die diese Neurone zu rhythmisch kohärenten Einheiten zusammenschließen, sind bis heute nur unzureichend verstanden. Neben synaptischen Interaktionen, die in neuronaler Konnektivität resultieren, scheinen intrinsische Zelleigenschaften eine ebenso bedeutende Rolle bei der Entstehung von Netzwerkoszillationen zu spielen. Zu letzteren werden Resonanz und Membranpotentialoszillationen (MPOs) gezählt, die in vielen Neuronen eine Frequenz im Thetabereich aufweisen (Dickson, Magistretti et al. 2000; Hutcheon und Yarom

2000). Resonanz ist die Frequenz, bei der ein Neuron bestmöglich auf den Eingang eines injizierten Stroms reagiert. Sie ist das Resultat aus dem Zusammenspiel zwischen passiven Membraneigenschaften und zeit-, und spannungsabhängigen Ionenkanälen (Hutcheon und Yarom 2000). Von letzteren werden auch die MPOs unterhalten. Wie durch zahlreiche Experimente belegt wurde, beruhen sie im Hippokampus auf der Exprimierung des M-Stroms ( $I_M$ ), des h-Stroms ( $I_h$ ) und des niederschwelligen persistierenden Natriumstroms ( $I_{NaP}$ ) (Hutcheon und Yarom 2000; Hu, Vervaeke et al. 2002; Orban, Kiss et al. 2006), im Thalamus auf der Exprimierung von SK-Kanälen und  $Ca^{2+}$ -Kanälen vom T-Typ.

Pyramidenzellen im Hippokampus sind mit zwei langsamen, spannungsgesteuerten Ionenströmen ausgestattet: dem M-Strom und dem h-Strom. Bei beiden handelt es sich um nicht-inaktivierende Ströme, die sich bei Membranpotentialen unterhalb des Schwellenpotentials langsam aktivieren bzw. deaktivieren. Funktionell betrachtet arbeiten sie spiegelbildlich zueinander. Während  $I_M$  ein reiner  $K^+$ -Strom ist, der bei depolarisierten Membranpotentialwerten ( $\sim -60$  mV) aktiviert wird, stellt  $I_h$  einen gemischten Kationenstrom dar ( $Na^+$ ,  $K^+$ ), der durch Hyperpolarisationen über  $\sim -60$  mV hinaus aktiviert wird (Brown und Adams 1980; Halliwell und Adams 1982; Brown, Gahwiler et al. 1990; Stabel, Ficker et al. 1992; Pape 1996). Zusätzlich sind hippokampale und andere zentrale Neurone mit einem nicht-inaktivierenden niederschwelligen Natriumstrom ausgestattet ( $I_{NaP}$ ) (French, Sah et al. 1990; Alzheimer, Schwindt et al. 1993; Crill 1996).

## 1.5 Der M-Strom

Kaliumströme vom M-Typ ( $I_M$ ) übernehmen eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle neuronaler Erregbarkeit und bei der Reaktionsbereitschaft von Neuronen auf den Eingang eines synaptischen Signals (Brown und Adams 1980). Eine Zunahme ihrer Membranleitfähigkeit verursacht eine Hyperpolarisation und somit eine Abnahme der neuronalen Feuer-Frequenz (engl. „firing frequency“), wodurch ein starker inhibitorischer Einfluss ausgeübt wird. Sie gehören zur Familie der Kv7 (KCNQ) – Gene, die für fünf spannungsgesteuerte  $K^+$ -Kanäle kodiert, welche v.a. im Myokard (Kv7.1), im zentralen Nervensystem (Kv7.2-5) und im Innenohr (Kv7.1, Kv7.4) exprimiert sind. Mutationen an diesen Genen gehen mit autosomal-dominant vererbten Erkrankungen wie dem langen QT-Syndrom, der hereditären non-syndromalen Schwerhörigkeit

(DFNA) und den benignen familiären neonatalen Krampfanfällen (BFNS) einher (Wang, Curran et al. 1996; Singh, Charlier et al. 1998; Kubisch, Schroeder et al. 1999).

### 1.6 Der h-Strom

Der h-Strom ( $I_h$ ) wird von Kanälen gebildet, die von Genen der HCN-Familie kodiert werden und wird typischerweise auch Hyperpolarisations-aktivierter Strom genannt.  $I_h$  ist ein nach innen gerichteter Kationenstrom, der für verschiedene Ionen permeabel ist, vor allem aber für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  (Pape 1996). Er trägt in unterschiedlichen Zelltypen - Schrittmacherzellen im Herzen ebenso wie thalamischen Neuronen – zu Oszillationen und Resonanz bei und besitzt Schrittmacherqualität (Luthi und McCormick 1998; Dickson, Magistretti et al. 2000; Nolan, Malleret et al. 2004).

$I_h$  Kanäle tragen nachweislich zur Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials bei, indem sie die Membran leicht depolarisieren und den Eingangswiderstand entscheidend herabsetzen. Letzterer bestimmt die Empfindlichkeit von Neuronen auf den Eingang synaptischer Signale: Je höher der Eingangswiderstand ist, umso mehr reagieren die Zellen auf beispielsweise exzitatorische synaptische Signale. Wird  $I_h$  also blockiert, reagiert die Zellmembran sensitiver auf Erregungen (Klar, Surges et al. 2003).

### 1.7 Der $\text{Na}^+$ -Strom

Spannungsabhängige Natriumkanäle spielen bei der Ausbildung und Propagation von Aktionspotentialen eine entscheidende Rolle und ermöglichen die Informationsübertragung im Nervensystem.

Man unterscheidet transiente und persistente Natriumkanäle ( $I_{\text{NaP}}$ ). Obwohl die persistenten  $\text{Na}^+$ -Ströme weniger als 1% ausmachen, haben sie eine große Bedeutung.  $I_{\text{NaP}}$  ist ein nicht-inaktivierender  $\text{Na}^+$ -Strom, der die neuronale Erregbarkeit reguliert, indem er das Schwellenpotential für erneute Depolarisationen festlegt (Alzheimer, Schwandt et al. 1993). Die funktionelle Bedeutung von  $I_{\text{NaP}}$  liegt in der Tatsache begründet, dass er innerhalb eines Spannungsbereiches präsent ist, indem die meisten anderen spannungsgesteuerten Ströme noch inaktiv sind und der Eingangswiderstand der Neurone hoch ist. Er wird bei Membranpotentialen aktiv, die einen um etwa 10 mV negativeren Wert haben als das Aktivierungspotential des transienten  $\text{Na}^+$ -stroms (Crill 1996).

## 1.8 Modulatoren von Ionenkanälen

Kaliumkanäle nehmen großen Einfluß auf die Erregbarkeit von Zellen, da sie das Membranpotential zu hyperpolarisieren vermögen und somit die Neurone an der Ausbildung von Aktionspotentialen hindern. Eine Reihe von Substanzen modulieren den M-Strom. Kv7-Aktivatoren wie Retigabine, Flupirtine und Icagen-110381 bzw. 27243 scheinen vielversprechend für die Behandlung von Erkrankungen mit neuronaler Hyperexzitabilität wie Epilepsie; Kv7-Blocker wie Linopiridin-Analoga oder XE991 für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen die auf Störungen der Neurotransmitter Freisetzung beruhen (Tam und Zaczek 1995; Miceli, Soldovieri et al. 2008).

Der h-Strom wird sowohl am Herzen als auch im zentralen Nervensystem (ZNS) durch Caesiumionen blockiert (Halliwell und Adams 1982). In thalamo-kortikalen Neuronen des ZNS blockieren außerdem Zatebradine und Analoga sowie ZD7288 den h-Strom (Pape 1994; Harris und Constanti 1995).

Losigamone ist ein Blocker des persistenten  $\text{Na}^+$ -Stroms, der die Erregbarkeit von Zellen reduziert und sich aufgrund seines Wirkmechanismus bei anderen anerkannten Antikonvulsiva wie Carbamazepin, Valproat und Phenytoin einreihen lässt (Draguhn, Jungclaus et al. 1997). Für die vorliegende Arbeit wurden die im Folgenden beschriebenen Substanzen verwendet.

### 1.8.1 XE991

XE991 [10,10-bis(4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenon Dihydrochlorid] blockiert selektiv jene Kaliumkanäle, die durch eine heteromultimere Anordnung von KCNQ2 und KCNQ3 Genprodukten gebildet werden, und die die spannungsabhängigen Kaliumströme vom M-Typ ermöglichen. M-Ströme sind reine, nach außen gerichtete  $\text{K}^+$ -Stöme, die bei Depolarisationen positiver als -60 mV aktiviert werden (Hu, Vervaeke et al. 2002). Sie regulieren die Erregbarkeit von Neuronen und sind an Spike Nachpotentialen, Adaptation und Theta-Resonanz beteiligt (Hu, Vervaeke et al. 2007). Studien an KCNQ knock-out Mäusen zeigten eingeschränkte Theta-Resonanzeigenschaften in diesen Tieren (Peters, Hu et al. 2005).

### 1.8.2 Retigabine

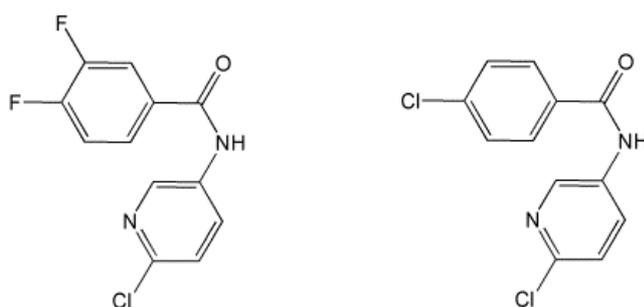
Retigabine [N-(2-Amino-4-[fluorobenzylamino]-phenyl)-Carbaminsäureethylester] ist ein neues Antikonvulsivum, das als potenter, jedoch nicht selektiver, KCNQ-Kanal Öffner gilt und sich aktuell in Phase III der klinischen Prüfung bei der Behandlung der

pharmakoresistenten fokalen Epilepsie befindet (Maljevic, Wuttke et al. 2008). Es erhöht die Offenheitswahrscheinlichkeit von KCNQ-Kanälen und verstärkt den M-Strom indem es seine Aktivierungskurve in Richtung des  $K^+$ -Gleichgewichtspotentials (-90 mV) verschiebt und seine Deaktivierungsgeschwindigkeit herabsetzt (Tatulian, Delmas et al. 2001). Folglich kommt es zu einer Hyperpolarisation der Neurone und zu einer Verringerung der Erregbarkeit der Membran, wie es bereits für hippokampale und sympathische Nervenzellen beschrieben wurde (Hetka, Rundfeldt et al. 1999; Yue und Yaari 2004). Wichtig ist, dass Retigabine keine Wirkung auf den Kv7.1-Kanal hat und demzufolge keine kardialen Nebenwirkungen auftreten sollten (Maljevic, Wuttke et al. 2008).

### 1.8.3 Icagen-110381

Die Benzamide stellen eine neue chemische Klasse unter den KCNQ2/3-Kanal Aktivatoren dar. Icagen-27243 ist ein Vertreter dieser Gruppe. Er verursacht eine Hyperpolarisation des Membranpotentials (Wickenden, Krajewski et al. 2008), die durch Co-applikation des M-Kanal Blockers XE991 unterbunden werden kann. Darüberhinaus aktiviert er die KCNQ2/3-Kanäle selektiv, ohne wie bei Retigabine die GABAerge Transmission zu verstärken (Kapetanovic, Yonekawa et al. 1995).

In dieser Arbeit wurde Icagen-110381 [4-Chlor-N-(6-chlor-pyridin-3-yl)-benzamid] verwendet, das Icagen-27243 strukturell sehr verwandt ist (Abbildung 1).



Icagen-27243

Icagen-110381

#### Abbildung 1: Benzamide

Icagen-27243 und Icagen-110381 gehören zu den Benzamiden. Strukturell sind sie sich ähnlich. Icagen-27243 trägt zwei Fluoratome am Ring, während Icagen-110381 statt dessen ein Chloratom trägt.

### 1.8.4 Losigamone

Losigamone [(±)-5(R,S)-5-(2-Chlorphenyl)hydroxymethyl)-4-methoxy(5H)-Furanon] ist ein Antikonvulsivum das, wie einige andere antiepileptische Pharmaka (Phenytoin, Valproat, Topiramate), auf den persistenten  $Na^+$ -Strom ( $I_{NaP}$ ) Einfluß nimmt.

Losigamone reduziert den  $I_{NaP}$  signifikant, verringert die Entladungsfrequenz von Neuronen und verkleinert die Amplitude exzitatorischer postsynaptischer Potentiale (Schmitz, Gloveli et al. 1995; Draguhn, Jungclaus et al. 1997; Gebhardt, Breustedt et al. 2001).

### **1.8.5 ZD7288**

ZD7288 [(4-ethylphenylamino-1,2-dimethyl-6-methylaminopyrimidinium Chlorid)] ist ein Agens, das spannungsunabhängig den  $h$ -Strom in CA1 Pyramidenzellen blockiert (Harris und Constanti 1995). Unter current-clamp Bedingungen, verursachte ZD7288 Hyperpolarisationen der Membran und eine Reduktion der Membranleitfähigkeiten. Diese induzierte Hyperpolarisation drosselt die Erregbarkeit der Zelle indem sie das Schwellenpotential für die Depolarisation heraufsetzt (Gasparini 1997). Da auch inhibitorische Interneurone der Area CA1  $I_h$  exprimieren (Maccaferri und McBain 1996), kann der  $I_h$ -Block durch ZD7288 ihr Membranpotential unter Ruhebedingungen hyperpolarisieren und somit in einer gedrosselten Aktivität und einer reduzierten Transmitterfreisetzung von GABA resultieren.

## 2 Fragestellung der Arbeit

Netzwerkoszillationen entstehen entweder, wie zum Beispiel im Thalamus, direkt aus der Schrittmacher-Aktivität bestimmter Neurone oder resultieren aus dem dynamischen Zusammenspiel von synaptischer Interaktion und intrinsischer elektrischer Neuroneneigenschaften, die gemeinsam zur rhythmischen Aktivität vieler Neurone auf Netzwerkebene führen.

Man kann zusammenfassen, dass sich Neurone über synaptische Interaktionen gegenseitig beeinflussen, ordnen und koordinieren, und schließlich gemeinsam als Netzwerk funktionell wirksam werden. Dazu müssen die Neurone mit intrinsischen Ionenleitfähigkeiten ausgestattet sein, die zu der Interpretation der synaptischen Signale beitragen und die „reaktive“ Zellantwort bestimmen können. Wenn die Leitfähigkeiten über Transmitter, Änderungen der extrazellulären Ionenkonzentrationen oder durch die Applikation von Ionenkanalmodulatoren experimentell verändert werden, sollte sich dies auch auf die funktionelle Integrität der Oszillationen auf Netzwerkebene auswirken.

In der vorliegenden Arbeit versuchten wir anhand von extrazellulären Feldpotential-Ableitungen in hippokampalen Hirnschnitten die Hypothese zu bekräftigen, dass intrinsischen Eigenschaften hippokampaler Neurone an der Aufrechterhaltung von Netzwerkoszillationen beteiligt sind. Dazu bedienten wir uns verschiedener Ionenkanalmodulatoren, die die Eigenschaften von M-Stömen, h-Strömen und Na<sup>+</sup>-Strömen verstärkten oder abschwächten.

Ionenkanäle werden auch klinisch zunehmend relevant. Epilepsie, Migräne, neuropathischer Schmerz, neurodegenerative Erkrankungen, spastische Lähmungen – sämtliche Krankheitsbilder haben einen gemeinsamen Nenner: neuronale Hyperexzitabilität. Unter diesem Gesichtspunkt rücken Ionenkanäle in den Fokus des Interesses, und wecken die Hoffnung auf neue pharmakologische Ansätze. Sie agieren als Regulatoren neuronaler Erregbarkeit und gestalten über präzise Aktivierungs- und Deaktivierungsabläufe die Erregungsmechanismen von Zellen. Hereditäre oder nicht-hereditäre Störungen, die zu positiven oder negativen Veränderungen der Ionenkanäle führen, können somit eine Übererregbarkeit neuronaler Zellen bewirken und o.g. Störungen hervorrufen.

Als Beispiel seien hier die benignen familiären Neugeborenenkrämpfe (BFNS) genannt. Die BFNS ist eine seltene autosomal-dominant vererbte idiopathische Form der Epilepsie bei Neugeborenen. 1964 wurde sie von den österreichischen Ärzten A. Rett

und R. Teubel erstmals beschrieben. Bei Neugeborenen beobachtet man dabei fokale, mitunter auch generalisierte zerebrale Konvulsionen, die innerhalb der ersten Lebensstage beginnen. Nach Wochen bis Monaten kommt es zur spontanen Remission. Mit der Entdeckung der Gene KCNQ2 und KCNQ3, die bei der BFNS mutiert und somit verantwortlich für die Erkrankung sind (Steinlein 2002; Dedek, Fusco et al. 2003), wurde ein neues Kapitel in der Epilepsieforschung aufgeschlagen, das einen Blick auf die molekulare Ätiologie und Bedeutung von Ionenkanälen bei der Genese idiopathischer generalisierter Epilepsiesyndromen gewährt.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere**

Die Experimente dieser Studie wurden an hippokampalen Hirnschnitten von insgesamt 126 Versuchstieren durchgeführt. Dabei handelte es sich um 6-8 Wochen alte, adulte Wistar Ratten beider Geschlechter.

Die Tiere wurden von „Charles River Laboratories“ in Sulzfeld, Deutschland, gezüchtet und nach Erreichen des geeigneten Alters in die zentrale Versuchstierhaltung der Charité überführt. Hier wurden sie unter standardisierten Bedingungen, in 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus und bei freiem Zugang zu Wasser und Futter in Käfigen gehalten. Alle Experimente wurden mit der Erlaubnis und entsprechend der rechtlichen Leitlinien des zuständigen Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (T0068/02) durchgeführt. Es wurde stets darauf geachtet, die Tieranzahl möglichst gering zu halten, u.a. indem Hirnschnitte desselben Tiers zwischen verschiedenen Experimentatoren geteilt wurden.

#### **3.2 Präparation und Anfertigung der Hirnschnitte**

Vor der Dekapitation wurden alle Tiere mit einer Konzentration von 2 ml Äther / 100 g Körpergewicht in eine ausreichend tiefe Narkose versetzt. Die Ratte wurde mit Hilfe einer Guillotine (Fallbeil) dekapitiert. In medio-dorsaler Schnitfführung wurde zunächst die Kopfhaut eingeschnitten und vom Schädeldach gelöst. Die am Schläfenbein ansetzende Massetermuskulatur wurde auf beiden Seiten durchtrennt und das *Os occipitale* samt Anteilen des darunterliegenden Cerebellums auf Höhe der *Sutura lambdoidea* abgesetzt. Die dadurch gewonnene caudale Schädelöffnung erlaubte es durch bilaterale Einschnitte der *Sutura squamosa* mit einer Knochenzange, die Schädelkalotte zu lockern und nach rostral abzuheben. Somit konnten die darunter liegenden kortikalen Strukturen unbeschädigt freigelegt werden. Um eine maximale Schonung des Gewebes zu gewährleisten wurde das Gehirn von diesem Moment an durch regelmäßige Benetzung mit gekühlter, oxygenierter, artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF, siehe Kapitel 3.4) schon während der Präparation abgekühlt und mit Nährstoffen versorgt. Mit einer Duraschere wurde die Dura Mater entlang der *Fissura longitudinalis cerebri* eingeschnitten und zu beiden Seiten abgezogen. Das Riechhirn wurde in coronarer Schnitfführung abgesetzt. Das übrige Gehirn wurde dann mit einem Spatel an der rostralen Schnitfführung ansetzend, vorsichtig aus der Schädelgrube gehoben und für 1 min in einem, mit  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  kalter,

oxygenierter ACSF gefüllten Becherglas zwischengelagert, um Stoffwechselfvorgänge zu verlangsamen.

Für die weiteren Präparationsschritte wurde das Gehirn mit der Hirnbasis auf ein mit ACSF getränktes Filterpapier, mit einem gekühlten Porzellanbrett als Unterlage, gelegt und entsprechend der für das Experiment gewünschten lamellären Organisation zurechtgeschnitten.

Um Gamma-Oszillationen sowohl pharmakologisch als auch durch elektrische Stimuli induzieren zu können, wurden transversale Hirschnitte wie folgt angefertigt: Zunächst wurden mit einer Rasierklinge die restlichen Cerebellumstrukturen entfernt. Durch einen Paramedianschnitt erfolgte die vollständige Trennung beider Hemisphären, die dann mit einem Haarpinsel auf ihre medianen Schnittflächen gekippt wurden. Mit einem zum *Sulcus parasylvius medialis* parallelen Horizontalschnitt wurden die parietalen Anteile der Hemisphären abgetrennt. Mit den so entstandenen Schnittflächen wurden die Hemisphären mit Hilfe von M-förmig gefalteten Filterpapierstreifen, die als Pinzette benutzt wurden, in die Schneidekammer gesetzt und auf einem um 12° abgeschrägten Präparierblock aus PVC mit Cyanacrylatklebstoff festgeklebt.

Für die Induktion von Theta-Oszillationen wurden longitudinale Hirschnitte angefertigt, indem zunächst durch einen großzügigen Frontalschnitt die Lobuli frontales abgesetzt wurden. Diese Schnittflächen entsprachen wiederum den späteren Klebeflächen. Es folgte die vollständige Trennung der Hemisphären durch einen Paramedianschnitt, der Transfer in die Schneidekammer und das Festkleben der Hemisphären auf einem Präparierblock, der für diese longitudinale Schnitfführung keinen Winkel aufwies.

Die bestückte Schneidekammer wurde nun mit gekühlter, oxygenierter ACSF aufgefüllt und auch während des Schneidvorganges kontinuierlich über einen Schlauch mit einem Gasgemisch (5% CO<sub>2</sub>; 95% O<sub>2</sub>) begast. Alle Hirschnittpräparate wurden in einer Dicke von 400 µm angefertigt.

Mit einem Vibratom (NVSLM1, Campden Instruments Ltd., Loughborough, UK) wurden die transversalen Schnitte (auf Höhe bregma -4,5 bis -7,3 mm) in fronto-okzipitaler Richtung geschnitten. Diese Hirschnittpräparate enthielten ab einer Schnitttiefe von etwa 2500 µm Hippokampus, entorhinalen Kortex, perirhinalen Kortex und die angrenzenden Anteile des temporalen Kortex.

Die longitudinalen Schnitte (auf Höhe bregma -3,3 bis -4,5) wurden in kranio-kaudaler Richtung geschnitten und waren nur dann für Experimente geeignet wenn der Gyrus Dentatus, das Cornu Ammonis 3 und 1 (CA3 und 1) in ihrer vollständigen Ausdehnung

zu erkennen waren und die Area CA3 nicht verlängert war. Aus jeder Hemisphäre konnten etwa 3-6 Schnitte gewonnen werden, die mit einem Haarpinsel und einem kleinen Spatel in die Messkammer transferiert wurden. Es schloß sich eine Erholungszeit von 120 min an, in der sich die Hirnschnitte unter physiologischen Bedingungen vor Beginn der Messungen regenerieren konnten.

### **3.3 Messkammer**

Wir führten unsere extrazellulären Experimente in einer „Interface“-Perfusionskammer (Abb. 2) durch. Ohne Unterbrechung der Versuche konnten die Perfusionsmedien einfach und schnell ausgewechselt werden, und die Stabilität der Messungen somit gewährleistet werden. Aufgrund des kleinen Messkammervolumens kam es zudem zum raschen Austausch der unterschiedlichen Lösungen, bei relativ langer Diffusionszeit.

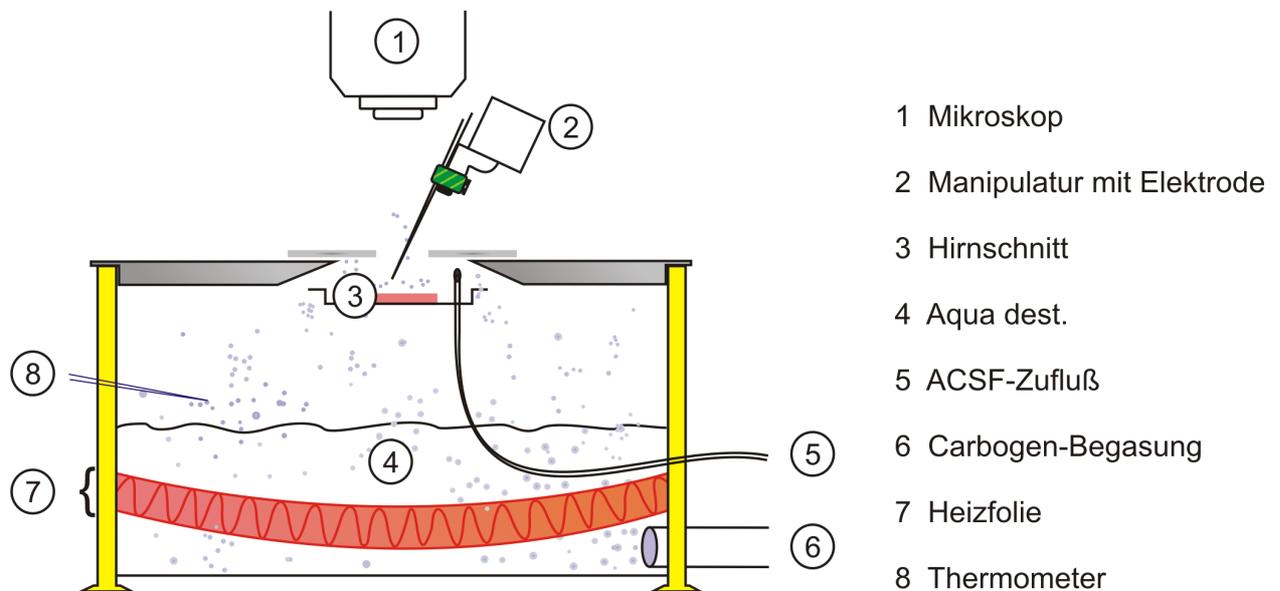
Um die Lebensfähigkeit der Hirnschnittpräparate für ca. 12 Stunden zu ermöglichen wurden Parameter wie Temperatur, Perfusion, Luftzusammensetzung und Luftfeuchtigkeit regelmäßig überprüft, ggf. korrigiert und dokumentiert. Auch hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse mußten die Versuchskonditionen möglichst konstant gehalten werden, sodass in unseren Experimenten bei einer ACSF-Temperatur von  $34 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , einer Perfusionsgeschwindigkeit von  $1.8 \pm 0.2$  ml/min und einem pH-Wert von  $7.4 \pm 0.5$  annähernd gleiche Bedingungen herrschten.

Es war wichtig, das Volumen der ACSF in der Messkammer, aber auch die Aqua dest. Menge in dem die Heizfolie umspülenden unteren Teil der Perfusionskammer konstant zu halten. Der Flüssigkeitsspiegel in der Messkammer wurde über die Zu,- und Abflußgeschwindigkeit der ACSF aufrechterhalten: Eine Rollenpumpe, die über Polyethylenschläuche die ACSF aus den Vorratsgefäßen zur Messkammer transportierte, regulierte über ihre Pumpgeschwindigkeit die pro Zeiteinheit beförderte Flüssigkeitsmenge. Der Abfluß erfolgte passiv nach den Gesetzen der Schwerkraft.

Auch auf eine gleichmäßige Begasung und optimale Abdeckung der Messkammern wurde geachtet, um den Sauerstoffpartialdruck und auch die Lufttemperatur und –feuchtigkeit in unmittelbarer Umgebung der Hirnschnitte konstant zu halten. Da es innerhalb der Messkammer Unterschiede in der Temperatur und in der Fließzeit der Perfusionslösung gibt, wurden die Hirnschnitte immer an gleicher Stelle platziert.

Um Rückstände von pharmakologisch wirksamen Substanzen zu entfernen, wurden die Kammern und das Schlauch-System im Anschluß an jeden Versuchstag mit

destilliertem Wasser (ca. vier Liter) durchgespült. Alle vier Wochen erfolgte eine chemische Reinigung mit 3%-iger Wasserstoffperoxyd-Lösung, an die sich eine gründliche Spülung mit Aqua dest. anschloß. Ebenso mußten die Schläuche regelmäßig ausgetauscht werden, die zum einen potentielle Keimträger, zum anderen anfällig für Materialermüdung waren.



**Abbildung 2: Schematischer Querschnitt durch eine Interface-Messkammer**

Die Interface-Kammer ist bis zur Hälfte mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gefüllt. Im unteren Bereich befinden sich eine Heizfolie und ein Kunststoffschlauch der Carbogengas in die Kammer leitet. Im oberen Abschnitt liegen zwei Messkammern, in denen sich die Hirnschnitte befinden und denen über zwei Kunststoffschläuche ACSF zugeführt wird. Ein über dem Schnitt befindliches binokulares Mikroskop ermöglicht es, die in den Manipulatoren eingespannten Elektroden kontrolliert zu platzieren.

### 3.4 Perfusionslösung

Als Nährmedium während der Präparation, der Erholungs- und auch der Experimentierphase diente artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit (engl. „artificial cerebrospinal fluid, ACSF“), die sich wie folgt zusammensetzt: 129 mM NaCl, 21 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3 mM KCl, 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 10 mM Glukose; womit sie in erster Näherung dem Liquor der Ratte entspricht. Die Osmolarität wurde in einem Gefrierpunkt-Osmometer (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) kontrolliert und betrug  $300 \pm 10$  mOsmol/kg. Durch die kontinuierliche Anreicherung der Lösung mit einem Gasgemisch aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> wurde der pH-Wert auf  $7.4 \pm 0.5$  gepuffert.

### **3.5 Elektroden**

#### **3.5.1 Reizelektroden**

Ich benutzte selbst angefertigte bipolare Reizelektroden. Eine Glaskapillare aus Borosilikat mit zwei, durch eine Trennwand separierten Lumina, einem Durchmesser von 2 x 2.5 mm und einer Wandstärke von 0.2 mm (sog. Thetaglas) der Firma Science Products aus Hofheim, wurde mittels eines vertikalen Elektrodenziehgerätes (hauseigene Werkstatt) mit definierter Zugkraft und Geschwindigkeit ausgezogen. Die Spitze der Kapillare hatte einen Durchmesser von ca. 0.1 mm. In die beiden Lumina wurde jeweils ein, mit 0.2 mm starker Silberdraht verlöteter 0.05 mm starker Platindraht ein- und durch die Öffnung ausgeführt. Unter mikroskopischer Sicht wurden Öffnung und Platindrähte mit durch Hitze verflüssigtem Schellack abgedichtet, parallel zueinander in einem Abstand von ca. 0.2 mm fixiert und auf eine Länge von ca. 1.5 mm zurückgeschnitten. Das Thetaglas wurde abschließend mit Dentalwachs verschlossen und die Silberdrähte zu Spiralen aufgewickelt.

#### **3.5.2 Referenzelektroden**

Referenzelektroden sind fest in die Interface-Kammer eingebaut. Sie bestehen aus unter großem Druck zu Pellets gepresstem Silber und Silberchlorid im Verhältnis 30:70 und sind über einen Silberdraht mit dem Vorverstärker verbunden.

#### **3.5.3 Extrazelluläre Ableitelektroden**

Für die Ableitung der Feldpotentiale wurden 2-5 M $\Omega$  messende Mikroelektroden verwendet, die ähnlich wie die Reizelektroden hergestellt wurden. Einlumige Borosilikatglaskapillaren von 1.5 mm Durchmesser und einer Wandstärke von 0.25 mm wurden mit dem oben beschriebenen Elektrodenausziehgerät (Puller) ausgezogen. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde die Spitze mechanisch abgebrochen und eine Öffnung von 1-3  $\mu$ M geschaffen. Nach dem Auffüllen der Kapillare mit ACSF wurde ein mit Silberchlorid beschichteter Silberdraht bis in die Spitze vorgeschoben und das Kapillarende luftdicht mit Dentalwachs verschlossen.

### **3.6 Anatomie des Hippokampus**

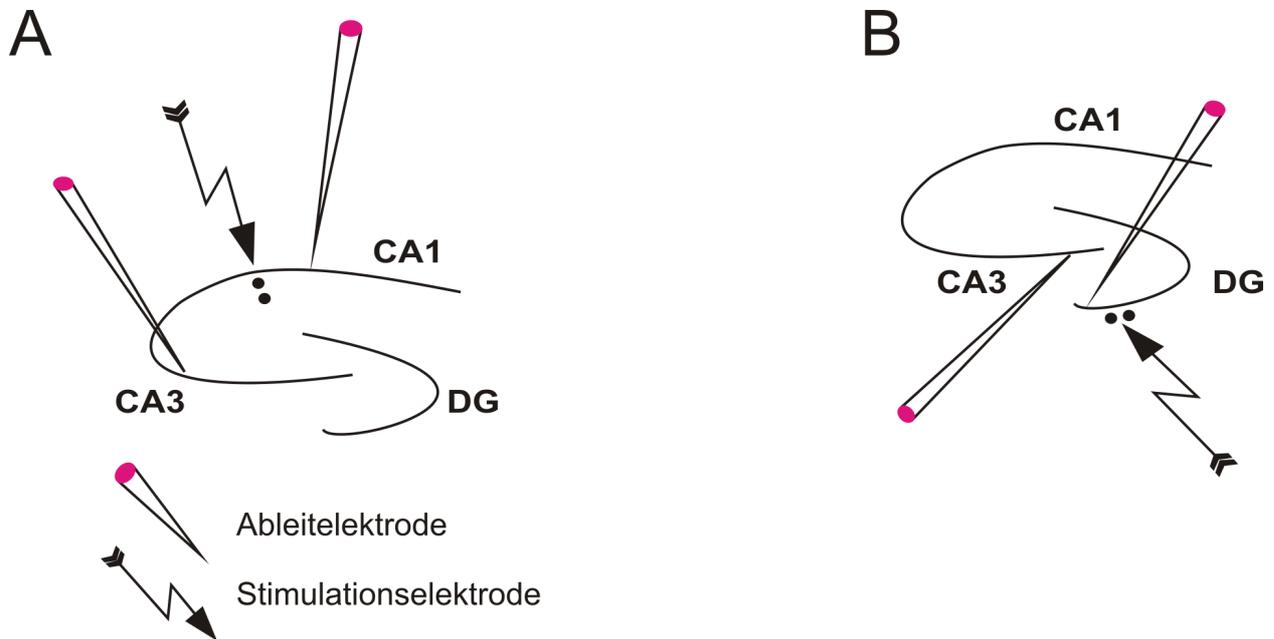
Der Hippokampus ist der evolutionär älteste Teil des Telenzephalons und befindet sich in den medialen Temporallappen beider Hemisphären. Aus anatomischer Sicht ist der Hippokampus die einfachste kortikale Struktur im Gehirn. Seine trilaminäre Organisation

gestaltet sich durch die sich als sichtbares Band aneinanderreihenden Nervenzellkörper (*stratum pyramidale*), und durch die von diesen Pyramidenzellen nach innen und außen ziehenden Nervenfaserverstränge (s.u.). Diese übersichtliche Architektur erleichtert die Konzeption physiologischer Experimente.

Die „hippokampale Formation“ besteht aus dem Hippokampus proper und angrenzenden Strukturen, wie dem Gyrus Dentatus und dem Subikulum. Mikroanatomisch kann der Hippokampus proper, auch Cornu Ammonis (CA) genannt, in Untereinheiten gegliedert werden (CA1 – CA4), die sich u.a. aus der Morphologie und Ausdehnung der Pyramidenzellen, sowie deren Afferenzen und Efferenzen ergeben. Über dem zellkörperreichen *stratum pyramidale* liegt das *stratum oriens*, in dem die basalen Dendriten der Pyramidenzellen sowie viele inhibitorische Nervenzellen liegen und das über Kommissurenfasern im angrenzenden Alveus mit dem kontralateralen Hippokampus in Verbindung steht. Unterhalb des *stratum pyramidale* liegt das *stratum radiatum* mit seinen Schaffer-Kollateralen, die als Assoziationsfasern die CA3- mit der CA1-Region verbinden. Daran schließt sich das *stratum moleculare* an, das oft mit dem benachbarten *stratum lacunosum* zum *stratum lacunosum-moleculare* zusammengefasst wird. Hier befinden sich parallele Fasern aus dem entorhinalen Kortex und apikal dendritische Endigungen. Der Hilus, auch als CA4-Region bezeichnet, bildet den Übergang der CA3-Region zum Gyrus Dentatus. Letzterer besteht aus der Molekularzellschicht (*stratum moleculare*) im Bereich der Dendritenbäume und der Körnerzellschicht (*stratum granulare*).



digitales Signal mit einer Auflösung von 5 – 10 kHz gespeichert. Auf einem Oszilloskop (HAMEG, Mainhausen, BRD) konnten die analogen Signale während der Messungen dargestellt und mitverfolgt werden.



**Abbildung 4: Elektrodenpositionierung**

A) Für Kainat-induzierte Oszillationen: die Stimulationselektrode (SE) stimuliert im *stratum radiatum* Schaffer-Kollaterale, die als Axone der CA3 Pyramidenzellen mit CA1 Pyramidenzellen Synapsen ausbilden. Feldpotentiale werden in CA3b und in CA1 mit entsprechenden Ableitelektroden (RE) detektiert. B) Für Stimulus-induzierte  $\gamma$ -Oszillationen: SE stimuliert Axone des Perforanten Pfades, die Signale von Neuronen aus der Schicht II des entorhinalen Kortex zu den Körnerzellen des Gyrus Dentatus (DG) projizieren. Die RE befinden sich im *stratum granulare* des DGs sowie in der CA3c des *stratum pyramidale* der CA3.

### 3.7.2 Population Spike

Der Population Spike (PS) ist ein Summenaktionspotential, das durch eine Verschiebung des elektrischen Potentials als Folge einer gleichzeitigen Aktivierung einer Vielzahl von Neuronen und den damit verbundenen Ionenbewegungen, entsteht. Er kann antidrom oder durch Reizung von Schaffer-Kollaterale und Kommissurenfasern orthodrom durch ein überschwelliges erregendes Potential annähernd synchron ausgelöst werden. Unsere Messungen begannen und schloßen mit der Ableitung eines PS, um einerseits die Vitalität des Hirnschnittes und andererseits die korrekte Ableitelektrodenposition zu überprüfen.

## 3.8 Datenerfassung –und analyse

### 3.8.1 Datenerhebung

Die Datenauswertung erfolgte offline mit den Programmen Spike2 Version 5 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) und Origin 6.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA). Zur Berechnung der Spektralanalyse verwendeten wir einen schnellen Fourier-Transformations (engl. „Fast Fourier Transformation, FFT“) Algorithmus mit einer FFT Größe von 1.221 Hz, und ein Hanning-Fenster (Spike2 Software). Feldpotential-Oszillationen wurden beurteilt indem ihre Powerspektren mittels eines schnellen Fourier Transformations Algorithmus berechnet wurden, der sich für Kainat-induzierte Oszillationen aus einer Rohdatenmengen von 300 s und für Stimulus-induzierte  $\gamma$ -Oszillationen aus Rohmaterialabschnitten von 0.5 s ergab. Für jedes Experiment wurden die Spitzenpower (engl. „Peak-Power“) und Spitzenfrequenz aus dem Powerspektrum für die Konditionen Kontrolle, Substanzapplikation und Auswaschung abgelesen. In der Regel erfolgte die Auswertung zeitlich a) unmittelbar vor der Substanzapplikation (Kontrolle), b) 60 min nach der Applikation (Effekt) und c) nach dem Auswaschen der Substanz (Auswaschung).

Im Falle der Stimulus-induzierten  $\gamma$ -Oszillationen wurden in jedem Hirnschnitt fünf konsekutive, in drei-minütigem Abstand auftretende Oszillationsepisoden für jede Kondition analysiert. Dann wurden die Werte der Peak-Power und Spitzenfrequenz gemittelt und anschließend ein Mittelwert aus allen analysierten Experimenten berechnet. Als weiterer Parameter ging zudem die Dauer der  $\gamma$ -Oszillation nach der hochfrequenten Stimulation (HFS) in die Auswertung ein.

Bei den pharmakologisch induzierten Oszillationen wurde das Powerspektrum noch hinsichtlich der sog. Halbbandbreite analysiert, indem die Breite des Powerspektrums auf Höhe der halbmaximalen Power abgelesen wurde. Die ermittelten Werte von Peak-Power und Halbbandbreite wurden für jede Kondition normalisiert um den interexperimentellen Vergleich zu erleichtern. Schließlich wurden die Mittelwerte von allen in die Analyse eingehenden Hirnschnitten berechnet. Zur Bestimmung der Latenzzeit zwischen CA3 und CA1 wurde eine repräsentative Auswahl an Kreuzkorrelations-Analysen anhand von Rohdatenabschnitten beider Regionen von 100 s durchgeführt und daraus der durchschnittliche Kreuzkorrelations-Koeffizient ermittelt. Die Amplitude von Spitze zu Spitze (engl. „peak-to-peak amplitude“) wurde durch eine Analyse von 10 aufeinanderfolgenden oszillatorischen Ereignissen aus den Kontrolldaten bestimmt.

Numerische Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Für die Anzahl der in eine Statistik eingehenden Messungen/Hirnschnitte wurde die Variable n verwendet.

Für statistische Vergleiche wurde je nach Art der zugrunde liegenden Daten der gepaarte t-Test (Origin 6.0, Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA) verwendet. Die Signifikanzniveaus sind in Diagrammen mit Sternchen gekennzeichnet: \* für  $P < 0.05$ , \*\* für  $P < 0.01$  und \*\*\* für  $P < 0.001$ .

### **3.8.2 Darstellung**

Für jede Substanz werden die gemittelten Werte für Power, Frequenz und Halbbandbreite als Säulen in Diagrammen abgetragen und mit entsprechender Standardabweichung und Signifikanz versehen. Zudem veranschaulichen Abbildungen zu einem für die Substanz repräsentativen Experiment den Effekt auf Netzwerkoszillationen: Es werden Rohdaten in Sekundenausschnitten präsentiert, die die Konditionen Kontrolle, Effekt und Auswaschung illustrieren. Übereinandergelegte Powerspektren verdeutlichen die Auswirkung der Substanz auf die Parameter Power, Frequenz und Halbbandbreite. Der Verlauf des Experiments ist auf einer Zeitachse abgetragen. Die Kurvenpunkte ergeben sich aus der Analyse aufeinanderfolgender Datenabschnitte von 90 s, wobei zur Glättung der Kurve gleitende Mittelwerte von jeweils drei aufeinanderfolgenden Messwerten in die Berechnung eingehen.

Alle Bilder und Grafiken wurden mit der Software CorelDraw 13.0 (Corel Co.; Ottawa, Kanada) erstellt.

### **3.9 Pharmaka**

Die zur akuten Badapplikation verwendeten Substanzen wurden wie in der Produktinformation des jeweiligen Herstellers beschrieben aus Trockensubstanzen zu Stammlösungen verarbeitet. Sie wurden meist 30 min vor Beginn der Experimente auf die gewünschte Konzentration mit ASCF verdünnt. In nachfolgender Tabelle sind die angewendeten Wirkstoffe (Name, Molekulargewicht und Firma) und ihre Konzentration aufgeführt:

Name	Molekulargewicht [g/mol]	Firma	Konzentration	Gelöst in:
Kainat	213.23	Tocris	100 nM	Aqua dest.
XE991	449.37	Tocris	2; 7; 10 $\mu$ M	Aqua dest.
Retigabine	303.34	Elbion AG	2 $\mu$ M	DMSO
Losigamone	254.7	Schwabe	50 -150 $\mu$ M	DMSO
Icagen- 110381	267.11	Elbion AG	5; 7 $\mu$ M	DMSO
ZD7288	292.81	BIOTREND	20 $\mu$ M	Aqua dest.

**abelle 1:** Eigenschaften der eingesetzten Wirkstoffe und ihre Konzentrationen

### 3.9.1 Kainat

L-Glutamat ist der vorherrschende exzitatorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem und vermittelt seine Wirkung sowohl über ionotrope Rezeptoren als auch über G-Protein-gekoppelte, metabotrope Rezeptoren. Die Entwicklung selektiver Liganden ermöglicht es heute, die Funktionen der einzelnen Glutamat-Rezeptorgruppen zu eruieren.

Kainat ist ein solcher Ligand und wirkt als Agonist selektiv an Kainat-Rezeptoren, einer Subgruppe der ionotropen Glutamat-Rezeptoren, und trägt den chemischen Namen [(2S,3S,4S)-Carboxy-4-(1-methylethenyl)-3-pyrrolidineacetische Säure].

Kainat-Rezeptoren gehören neben dem  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)- Rezeptor und dem N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor zur Familie der ionotropen Glutamat-Rezeptoren, die sich aus der homologen Aminosäuresequenz ergibt. Sie lassen sich in die fünf Untergruppen GluR5-7 und KA1-2 einteilen, sind in der hippokampalen Fomation prä-und postsynaptisch stark exprimiert und tragen gering zur Bildung exzitatorischer postsynaptischer Potentiale in vielen Regionen des Zentralnervensystems bei.

### 3.10 Stimulationsprotokoll

Tetanisch-induzierte  $\gamma$ -Oszillationen wurden durch Stimulation mit einer bipolaren Platindrahtelektrode evoziert. Stimuliert wurde das *stratum moleculare* des Gyrus Dentatus (DG), das afferent mit den Dendriten der Körnerzellen verbunden ist (Abb. 3) und Signale über den Tractus perforans empfängt. Angeschlossen war die

Stimulationselektrode an einen Reizstromgenerator (hauseigene Werkstatt). Über ihn konnte die Reizintensität so eingestellt werden, dass die Reizimpulse lediglich 70 % der maximal möglichen Reizantwort lieferten. Entscheidend war die Amplitude der Reizantwort, die bis zu einem Maximalpunkt anstieg. War dieser erreicht konnte sie trotz stärkeren Reizstroms nicht mehr zunehmen, bzw. veränderte ihre charakteristische Form. Für unsere Experimente lag die Reizintensität zwischen 3 und 7 V.

Tetanische Reize mit 100 Hz (30 Pulse mit einer Einzelpulsdauer von 100  $\mu$ s) erfolgten alle drei Minuten. Die Oszillationen wurden im Gyrus Dentatus und in Area CA3c abgeleitet (Abb. 4). Um einen Eindruck über die Vitalität und die synaptische Transmission der Hirnschnitte zu gewinnen, begann jedes Experiment mit einer Folge von vier Tetani. Waren die Reizantworten stabil wurde der Versuch mit der Applikation des zu untersuchenden Pharmakons fortgesetzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Kainat-induzierte Oszillationen *in vitro*

Um den Einfluss verschiedener Ionenkanal-Leitfähigkeiten auf neuronale oszillatorische Netzwerkaktivität innerhalb des Hippokampus zu untersuchen, applizierten wir 100 nM Kainat auf akute Hirnschnitte. Dies gilt als etablierte Methode zur Induktion von Gamma-Oszillationen in horizontalen Hirnschnitten (Buhl, Tamas et al. 1998; Hajos, Katona et al. 2000). Theta-Oszillationen wurden im Hippokampus erstmals cholinerg durch Applikation von Carbachol induziert (Konopacki, Maciver et al. 1987). Aber auch durch Kainat-Rezeptor Aktivierung ist es in coronalen Hirnschnitten möglich persistente Theta-Oszillationen zu induzieren (Gloveli, Dugladze et al. 2005).

#### 4.1.1 Entwicklung und Stabilität der Oszillationen

Nach der kontinuierlichen Badapplikation von 100 nM Kainat auf horizontale Hirnschnitte entwickelten sich nach 15 – 30 min Gamma-Oszillationen, die sich innerhalb einer Stunde stabilisierten. Die peak-to-peak Amplitude der Gamma-Oszillationen betrug 0.4 bis 2.5 mV in Area CA3 ( $1.13 \pm 0.17$  mV;  $n = 15$ ) und 0.1 bis 0.3 mV in Area CA1 ( $0.21 \pm 0.02$  mV;  $n = 10$ ). Die Analyse der Powerspektren aller Messungen ergab eine durchschnittliche Spitzenfrequenz um 33 Hz (CA3:  $32.63 \pm 0.62$  Hz;  $n = 44$ ; CA1:  $30.36 \pm 0.54$  Hz;  $n = 33$ ). In 80% der Messungen zeigte sich eine deutliche, jedoch kleinere zweite Spitze im Powerspektrum, die sich bei der doppelten, harmonischen Frequenz der Peak-Power befand. In den horizontalen Hirnschnitten betrug die maximale Peak-Power  $2.38 \pm 0.4 \cdot 10^{-3}$  mV<sup>2</sup> ( $n = 44$ ) in Area CA3, während sie in Area CA1 48.24 % ( $1.15 \pm 0.44 \cdot 10^{-3}$  mV<sup>2</sup>;  $n = 33$ ) der in Area CA3 gemessenen Peak-Power ausmachte. Als Ausdruck der Synchronizität der Oszillationen wurde außerdem die Bandbreite der Oszillationen auf Höhe der halbmaximalen Power gemessen (Halbbandbreite). In Area CA3 betrug sie im Durchschnitt  $9.38 \pm 0.72$  Hz ( $n = 44$ ) und in Area CA1  $8.03 \pm 0.85$  Hz ( $n = 33$ ). Die Latenzzeit zwischen Area CA3 und CA1 Gamma-Oszillationen, bestimmt durch Kreuzkorrelations Analyse, betrug  $2.38 \pm 0.25$  ms ( $n = 15$ ), der durchschnittliche Kreuzkorrelations Koeffizient betrug  $0.51 \pm 0.09$  ( $n = 15$ ).

In Experimenten in coronalen Hirnschnitten, welche überwiegend eine longitudinale Konnektivität aufwiesen, führte die Applikation von 100 nM Kainat zur Induktion von Theta-Oszillationen (4 – 15 Hz). Auf Grund der Präparation, die mit einer funktionellen Trennung von Area CA3 und Area CA1 einherging, konnten Theta-Oszillationen kaum

in die Area CA1 propagieren. Aus diesem Grund beschränkten sich die Ableitungen auf Area CA3 (n = 18). Dort hatte die Thetafrequenz eine durchschnittliche Spitzenfrequenz von  $12.01 \pm 0.39$  Hz, mit einer durchschnittlichen Peak-Power von  $4.75 \pm 1.44 \cdot 10^{-5}$  mV<sup>2</sup> und einer durchschnittlichen Halbbandbreite von  $26.35 \pm 2.36$  Hz. Die peak-to-peak Amplitude der Power reichte für Theta-Oszillationen in der Area CA3 von 0.18 bis 0.74 mV ( $0.45 \pm 0.07$  mV; n = 10).

Gelegentlich traten Theta- und Gamma-Oszillationen gemeinsam auf. Diese Schnitte wurden ausgeschlossen und gingen nicht in die Auswertung ein.

#### 4.1.2 Effekt von XE991

XE991 ist ein Kaliumkanalblocker der KCNQ2/3 Kanäle, die die spannungsabhängigen M-Stöme vermitteln. In Zellen, die über das Ruhemembranpotential hinaus depolarisiert sind tragen diese Ionenkanäle zur mittleren Nachhyperpolarisation (mAHP) bei (Dietrich, Clusmann et al. 1999; Gu, Vervaeke et al. 2005). Jüngste Versuche an Mäusen mit einem ausgeschalteten KCNQ-Kanal (knock-out Mäuse) zeigten in CA1 Pyramidenzellen attenuierte mAHP, gesteigerte Erregbarkeit, reduzierte spike-frequente Anpassung sowie abgeschwächte Theta-resonante Zelleigenschaften (Peters, Hu et al. 2005).

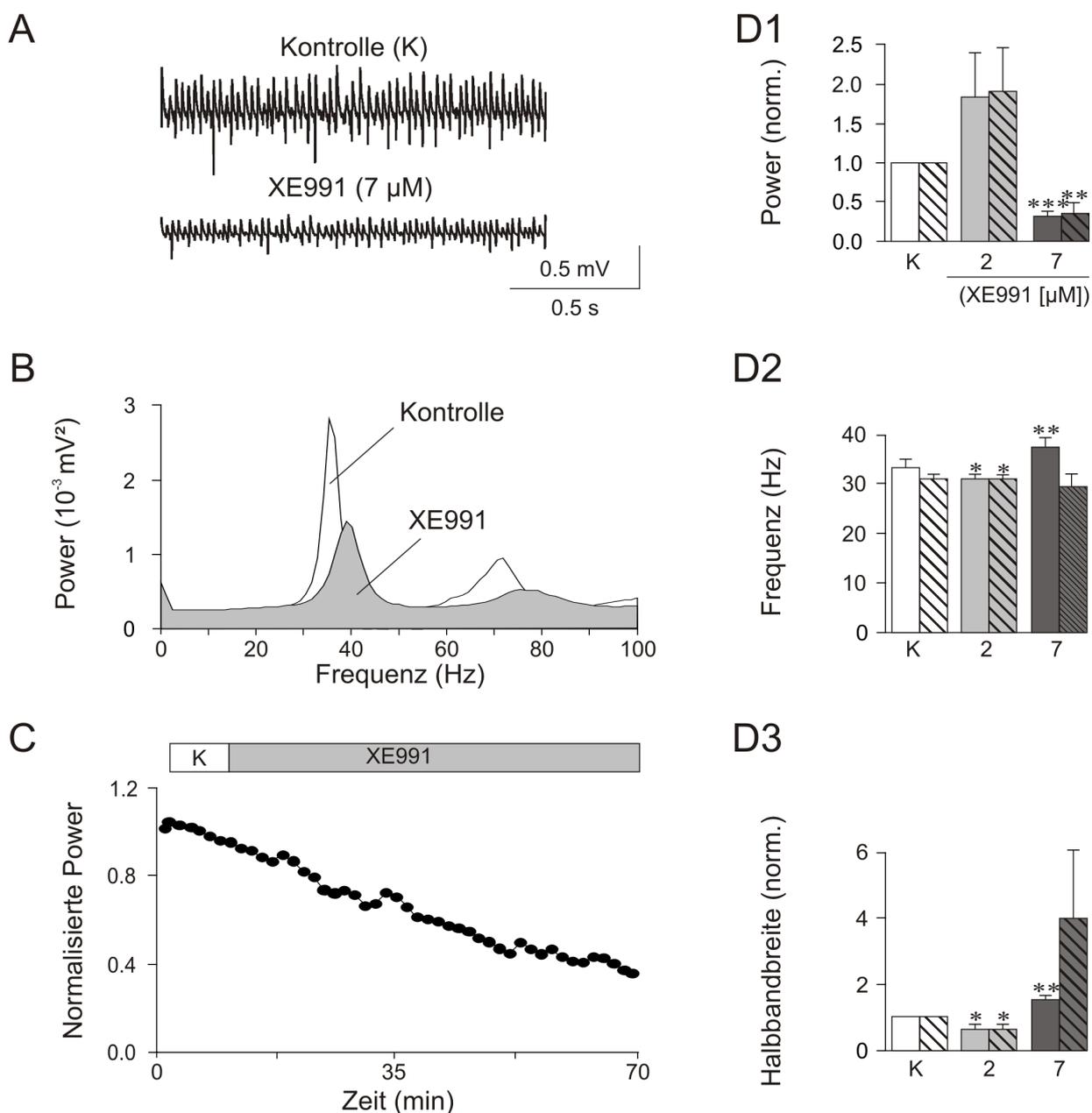
Die Applikation von XE991 nahm den größten Einfluß auf die Peak-Power. Die Frequenz blieb nahezu unbeeinflusst.

In unseren Versuchen applizierten wir XE991 in Konzentrationen von 2 und 7 µM. In allen Experimenten war der Versuch, XE991 über einen Zeitraum von bis zu zwei Stunden auszuwaschen frustan. Die Effekte waren irreversibel.

Die folgenden Ergebnisse sind in Abbildung 5 (D1 – 3) illustriert: Für die Power zeigte sich in Area CA3 bei 2 µM (n = 5) eine Verstärkung gegenüber der Kontrolle um  $82.4 \pm 56.44$  % (P = 0.22), die über den gesamten Applikationszeitraum bestehen blieb. Bei 7 µM (n = 7) nahm die Peak-Power im Verlauf um  $64.6 \pm 5.35$  % (P < 0.001) ab. Die Frequenz verschob sich für 2 µM auf  $30.74 \pm 0.61$  Hz (P < 0.05). Bei 7 µM stieg sie auf  $37.31 \pm 1.67$  Hz (P < 0.01) an. Die Halbbandbreite als negatives Korrelat zur Synchronizität der Oszillationen sank bei 2 µM um  $38.54 \pm 11.1$  % (P < 0.05). Bei 7 µM wuchs sie während der Powerreduktion um  $48.01 \pm 10.82$  % (P < 0.01).

Die Ergebnisse für Area CA1 entsprechen in etwa denen der CA3. Bei 2 µM (n = 5) stieg die Power um  $90.52 \pm 54.29$  % (P = 0.17), die Frequenz blieb mit  $30.75 \pm 0.59$  Hz gegenüber der Kontrolle mit  $30.95 \pm 0.85$  Hz (P < 0.05) stabil und die Halbbandbreite

verringerte sich um  $36.61 \pm 10.09 \%$  ( $P < 0.05$ ). Bei  $7 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ) fiel die Power um  $62.42 \pm 13.53 \%$  ( $P < 0.01$ ) ab. Die Frequenz blieb mit Werten um  $29.68 \pm 2.51 \text{ Hz}$  ( $P = 0.63$ ) stabil. Die Halbbandbreite stieg um  $282.95 \pm 220.48 \%$  ( $P = 0.27$ ).



### Abbildung 5: Effekt von XE991 auf Gamma-Oszillationen

XE991 moduliert Gamma-Oszillationen in Area CA3 und CA1 in Abhängigkeit von der Konzentration. A) Beispiel einer Messung im *stratum pyramidale* in Area CA3 unter Kontrollbedingung (obere Spur) und nach 50 minütiger Applikation von  $7 \mu\text{M}$  XE991 (untere Spur). B) Powerspektrum über ein 100 s Zeitfenster der Rohdaten unter Kontrollbedingung (weiß) und nach Substanzapplikation (grau). C) Darstellung des Effekts von XE991 auf die Peak-Power in Abhängigkeit der Zeit. D) Zusammenfassende Darstellung aller Ergebnisse für Area CA3 und CA1 hinsichtlich der gemittelten, normalisierten Peak-Power (D1), der Spitzenfrequenz (D2) und der gemittelten, normalisierten Halbbandbreite (D3). CA1: schraffiert, CA3: gefüllt. Die Sternchen in D sind Ausdruck des Signifikanzniveaus von P.  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) und  $P < 0.001$  (\*\*\*)

### 4.1.3 Effekt von Losigamone

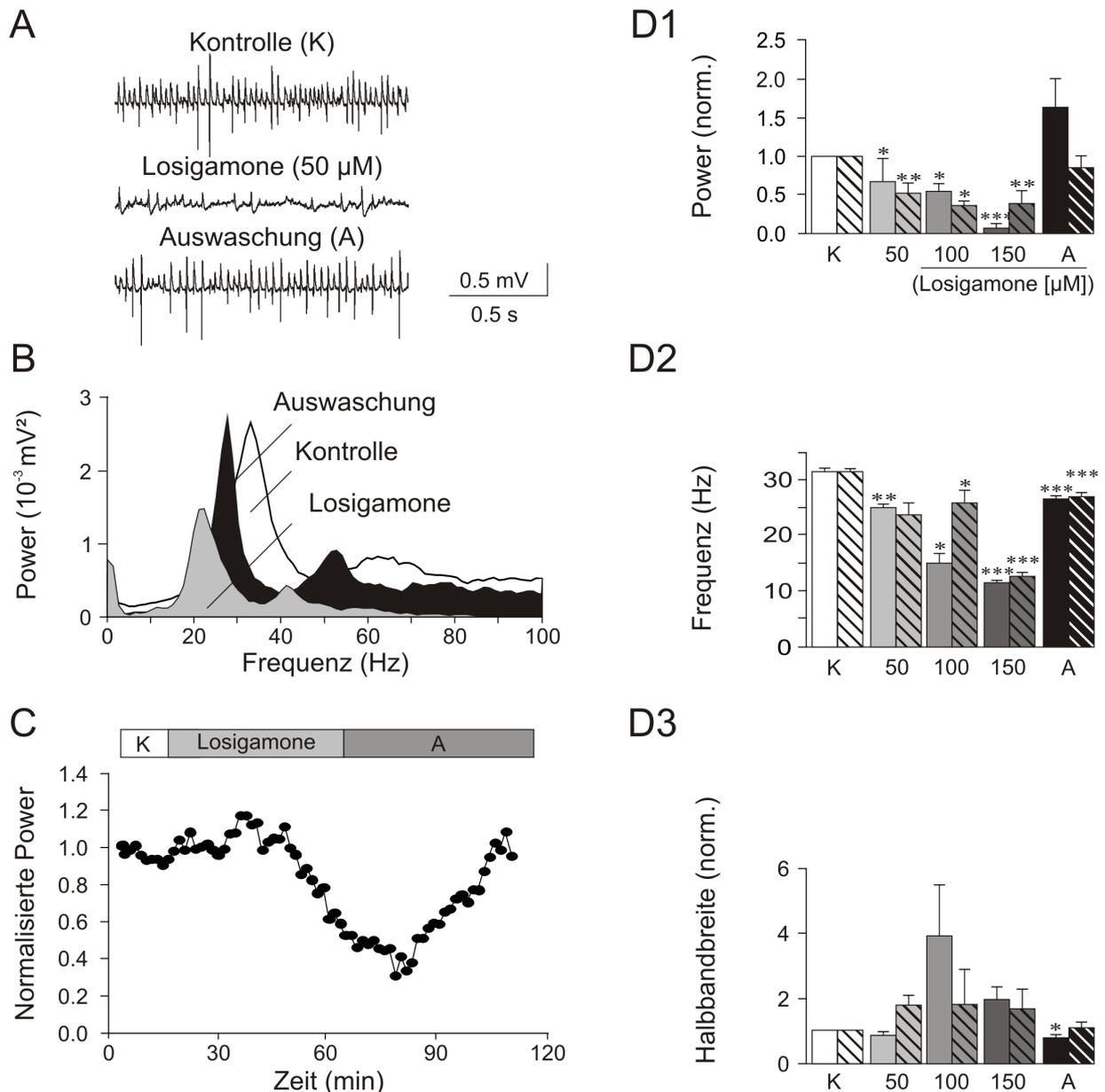
Losigamone ist eine Substanz die ursprünglich als Antikonvulsivum entwickelt wurde. In verschiedenen Studien mit Losigamone zeigte sich eine stark reduzierte repetitive Entladungsfrequenz (Draguhn, Jungclaus et al. 1997), eine moderate Reduktion exzitatorischer postsynaptischer Potentiale (Schmitz, Gloveli et al. 1995) und eine ausgeprägte Depression des persistenten Natriumkanals ( $I_{NaP}$ ) (Gebhardt, Breustedt et al. 2001). Miniaturpotentiale für GABA und Glutamat bleiben von der Substanz unbeeinflusst (Draguhn, Jungclaus et al. 1997).

Ausgehend von diesen bereits bekannten Effekten, stellte Losigamone eine geeignete Substanz dar um die Beteiligung persistenter Natriumströme an Kainat-induzierten Netzwerkoszillationen zu untersuchen. Losigamone wurde mit Konzentrationen von 50, 100 und 150  $\mu\text{M}$  appliziert. In allen Experimenten führte das Auswaschen der Substanz über eine Stunde zur Regeneration der Oszillationen, so dass wir von reversiblen Effekten für Losigamone sprechen. Im folgenden Text, sowie in Abbildung 6 (D1 - 3) sind die dosisabhängigen Effekte zunächst für Area CA3 dargestellt: Bei 50  $\mu\text{M}$  ( $n = 5$ ) reduzierte Losigamone die Peak-Power um  $44.29 \pm 37.14 \%$  ( $P < 0.05$ ), bei 100  $\mu\text{M}$  ( $n = 5$ ) um  $61.57 \pm 14.71 \%$  ( $P < 0.05$ ) und bei 150  $\mu\text{M}$  ( $n = 9$ ) wurden die Oszillationen fast vollständig um  $94.34 \pm 3.12 \%$  ( $P < 0.001$ ) blockiert. Nach dem Auswaschen von Losigamone ( $n = 13$ ) erholte sich die Power auf  $69.68 \pm 53.02 \%$  ( $P = 0.21$ ). Die Frequenz nahm in allen Konzentrationen ab. Ausgehend von einer Kontrollfrequenz von  $31.57 \pm 0.74 \text{ Hz}$  fiel sie bei 50  $\mu\text{M}$  auf  $24.12 \pm 0.78 \text{ Hz}$  ( $P < 0.01$ ), bei 100  $\mu\text{M}$  nahm sie mit  $13.76 \pm 1.96 \text{ Hz}$  ( $P < 0.05$ ) und bei 150  $\mu\text{M}$  mit  $11.97 \pm 1.18 \text{ Hz}$  ( $P < 0.001$ ) Werte im Thetafrequenzbereich an. Nach dem Auswaschen lag die Frequenz bei  $25.42 \pm 0.64 \text{ Hz}$  ( $P < 0.001$ ).

Die Halbbandbreite verringerte sich um  $10.08 \pm 10.94 \%$  ( $P = 0.41$ ) bei 50  $\mu\text{M}$ , stieg um  $298 \pm 160.05 \%$  ( $P = 0.14$ ) bei 100  $\mu\text{M}$  und stieg um  $98.01 \pm 35.82 \%$  ( $P = 0.06$ ) bei 150  $\mu\text{M}$ . Durch das Auswaschen wurde sie um  $20.17 \pm 36 \%$  ( $P = 0.05$ ) reduziert.

In Area CA1 hatte die Applikation von Losigamone ähnliche Konsequenzen. Die Peak-Power wurde bei 50  $\mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) um  $62.73 \pm 18.9 \%$  ( $P < 0.01$ ), bei 100  $\mu\text{M}$  ( $n = 5$ ) um  $78.31 \pm 4.6 \%$  ( $P < 0.05$ ) reduziert und bei 150  $\mu\text{M}$  ( $n = 8$ ) um  $79.45 \pm 16.82$  ( $P < 0.01$ ). Nach 60 minütigem Auswaschen ( $n = 13$ ) erholten sich die Oszillationen und erreichten Peak-Power Werte von  $75.78 \pm 15.12 \%$  ( $P = 0.14$ ) der Kontrolle. Ausgehend von einer Kontrollfrequenz von  $31.51 \pm 0.72 \text{ Hz}$ , verschob sie sich bei 50  $\mu\text{M}$  auf  $22.62 \pm 2.32 \text{ Hz}$  ( $P = 0.11$ ), bei 100  $\mu\text{M}$  auf  $24.68 \pm 2.33 \text{ Hz}$  ( $P < 0.05$ ), bei 150  $\mu\text{M}$  auf  $11.96 \pm 1.18 \text{ Hz}$

( $P < 0.001$ ) und nach dem Auswaschen auf  $25.42 \pm 0.64$  Hz ( $P < 0.001$ ). Die Halbbandbreite nahm in allen getesteten Konzentrationen zu: bei  $50 \mu\text{M}$  um  $77.85 \pm 30.38$  % ( $P = 0.13$ ), bei  $100 \mu\text{M}$  um  $79.96 \pm 109.31$  % ( $P = 0.52$ ), bei  $150 \mu\text{M}$  um  $64.42 \pm 38.76$  ( $P = 0.14$ ) und erfuhr nach dem Auswaschen einen Zuwachs um  $10.57 \pm 16.78$  % im Vergleich zur Kontrolle.



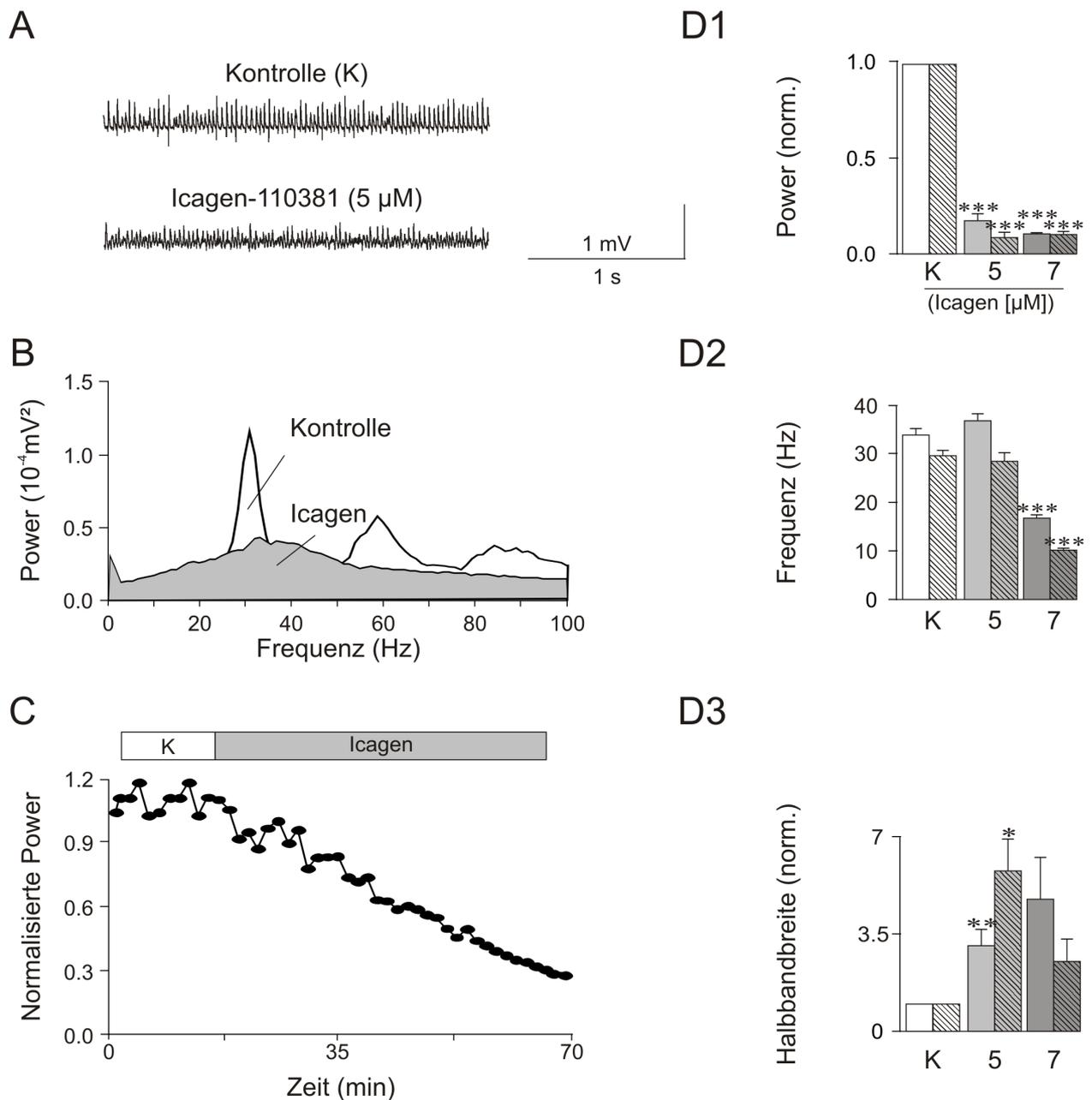
### Abbildung 6: Effekt von Losigamone auf Gamma-Oszillationen

A) Beispiel einer Messung im *stratum pyramidale* in Area CA3 unter Kontrollbedingung (obere Spur), nach 60 minütiger Applikation von  $50 \mu\text{M}$  Losigamone (mittlere Spur) und nach dem Auswaschen über 60 min (untere Spur). B) Powerspektrum über ein 100 s Zeitfenster der Rohdaten unter Kontrollbedingung (weiß), nach 60 min Substanzapplikation (grau) und nach 60 minütigem Auswaschen (schwarz). C) Darstellung des Effekts von Losigamone auf die Peak-Power in Abhängigkeit der Zeit. D) Zusammenfassende Darstellung der dosisabhängigen, reversiblen Effekte von Losigamone für Area CA3 und CA1 hinsichtlich der gemittelten, normalisierten Peak-Power (D1), der Spitzenfrequenz (D2) und der gemittelten, normalisierten Halbbandbreite (D3). CA1: schraffiert, CA3: gefüllt. Die Sternchen in D sind Ausdruck des Signifikanzniveaus von P.  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) und  $P < 0.001$  (\*\*\*)

#### 4.1.4 Effekt von Icagen-110381

Icagen-110381 wurde in Konzentrationen von 5 und 7  $\mu\text{M}$  über 60 min eingewaschen. Auswaschversuche von bis zu zwei Stunden blieben ohne Erfolg. Die beobachteten Effekte waren irreversibel. Beide Konzentrationen bewirkten einen signifikanten Rückgang der Peak-Power. In der Area CA3 reduzierte das Einwaschen von 5  $\mu\text{M}$  Icagen ( $n = 10$ ) die Power um  $83.1 \pm 3.71 \%$  ( $P < 0.001$ ), bei 7  $\mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) ging sie um  $87.18 \pm 5.04 \%$  ( $P < 0.001$ ) zurück. Die Kontrollfrequenz mit Kainat betrug  $33.87 \pm 1.18$  Hz, erhöhte sich nach Applikation von 5  $\mu\text{M}$  Icagen auf  $36.53 \pm 1.41$  Hz ( $P = 0.4$ ) und fiel bei 7  $\mu\text{M}$  auf  $17.03 \pm 0.39$  Hz ( $P < 0.001$ ). Die Halbbandbreite nahm bei 5  $\mu\text{M}$  um  $309.62 \pm 55.83 \%$  ( $P < 0.01$ ), bei 7  $\mu\text{M}$  um  $474.09 \pm 139.78 \%$  ( $P = 0.12$ ) zu.

In Area CA1 wirkt sich die Applikation von Icagen ähnlich aus. Bei 5  $\mu\text{M}$  ( $n = 4$ ) nahm die Peak-Power um  $92.18 \pm 3.46 \%$  ( $P < 0.001$ ) ab, bei 7  $\mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) um  $91.26 \pm 1.65 \%$  ( $P < 0.001$ ). Die Frequenz veränderte sich im Vergleich zur Kontrolle ( $29.66 \pm 0.97$  Hz) bei 5  $\mu\text{M}$  ( $28.47 \pm 1.46$  Hz;  $P = 0.34$ ) nicht. Im Gegensatz dazu fiel sie bei 7  $\mu\text{M}$  auf einen durchschnittlichen Wert von  $10.72 \pm 0.19$  Hz ( $P < 0.001$ ) ab. Die Halbbandbreite wuchs bei 5  $\mu\text{M}$  um  $577.93 \pm 114.15 \%$  ( $P < 0.05$ ) und bei 7  $\mu\text{M}$  um  $254.38 \pm 78.06 \%$  ( $P = 0.19$ ).



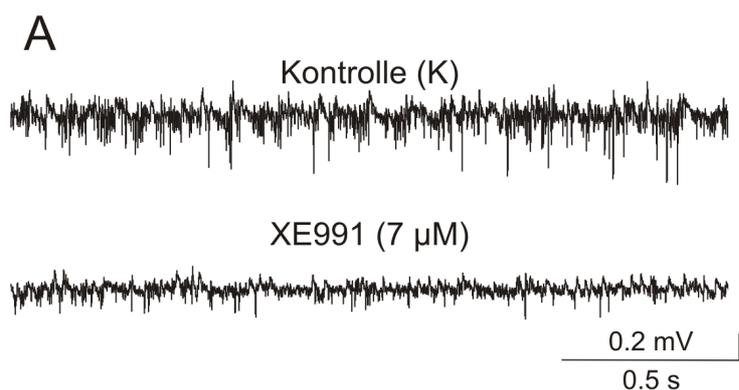
### Abbildung 7: Effekt von Icagen-110381 auf Gamma-Oszillationen

In horizontalen Hirnschnitten supprimiert Icagen Kainat-induzierte Gamma-Oszillationen. A) Repräsentative extrazelluläre Messung im *stratum pyramidale* der Area CA3 unter Kontrollbedingung (obere Spur) und nach 60 minütiger Applikation von 5  $\mu$ M Icagen (untere Spur). B) Powerspektrum über ein 100 s Zeitfenster der Rohdaten unter Kontrollbedingung (weiß) und nach 60 min Substanzapplikation (grau). C) Darstellung der Veränderungen der Peak-Power durch Icagen im Zeitverlauf. D) Zusammenfassung der dosisabhängigen Effekte von Icagen im Säulendiagramm für Area CA3 und CA1 hinsichtlich der gemittelten, normalisierten Peak-Power (D1), der Spitzenfrequenz (D2) und der gemittelten normalisierten Halbbandbreite (D3). CA1: schraffiert, CA3: gefüllt. Die Sternchen in D sind Ausdruck des Signifikanzniveaus von P. P < 0.05 (\*), P < 0.01 (\*\*) und P < 0.001 (\*\*\*).

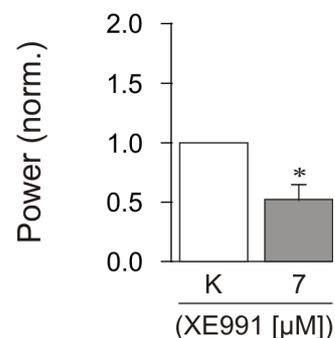
## 4.2 Kainat-induzierte Theta-Oszillationen

### 4.2.1 Effekt von XE991

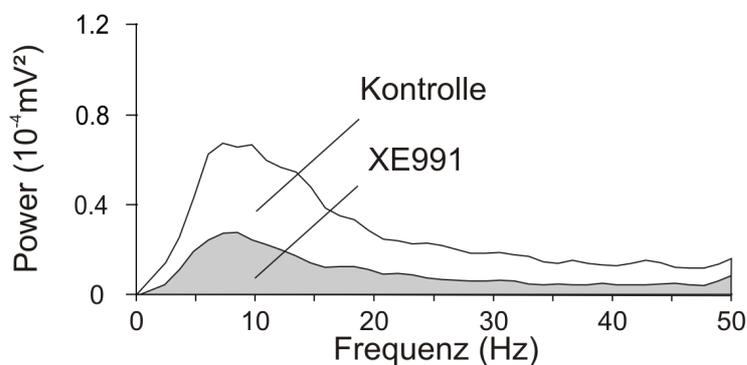
In coronalen Schnitten entsprach die verwendete Konzentration  $7 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ). Die Peak-Power fiel auf  $51.83 \pm 11.7 \%$  ( $P < 0.05$ ) der Kontrolle ab. Die Kontrollfrequenz betrug  $10.97 \pm 0.43 \text{ Hz}$  und veränderte sich im Versuchsverlauf nur unwesentlich. Eine Stunde nach Substanzapplikation betrug sie  $10.83 \pm 0.5 \text{ Hz}$  ( $P = 0.69$ ). Die Halbbandbreite stieg um  $33.23 \pm 31.38 \%$  ( $P = 0.35$ ).



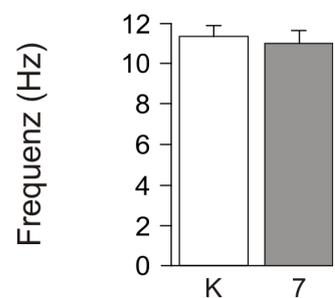
**D1**



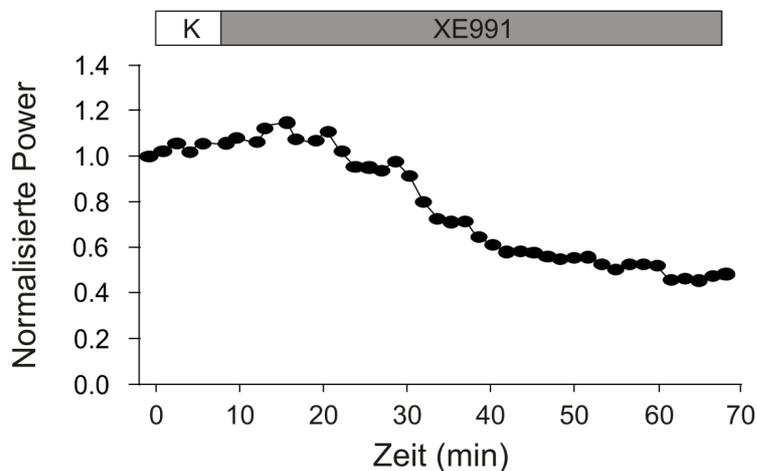
**B**



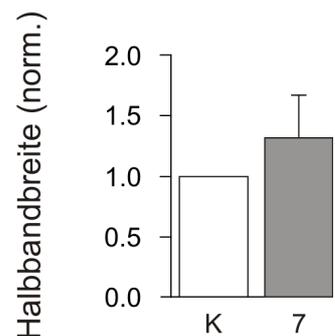
**D2**



**C**



**D3**

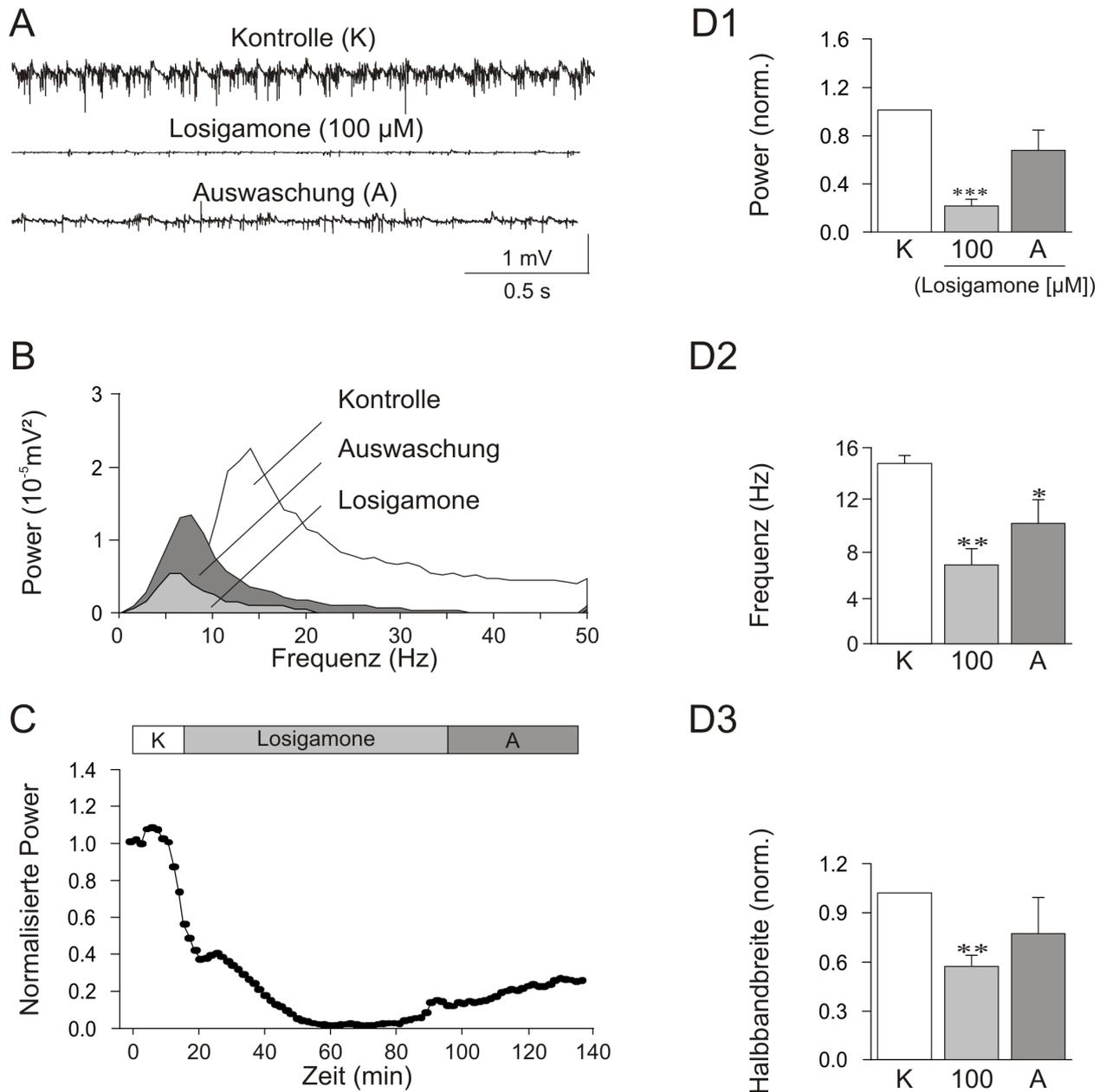


**Abbildung 8: Effekt von XE991 auf Theta-Oszillationen**

A) Beispiel einer Messung im *stratum pyramidale* in Area CA3 unter Kontrollbedingung (obere Spur), nach 60 minütiger Applikation von 7  $\mu\text{M}$  XE991 (untere Spur) B) Powerspektrum über ein 100 s Zeitfenster der Rohdaten unter Kontrollbedingung (weiß) und nach 60 min Substanzapplikation (grau). C) Darstellung des Effekts von XE991 auf die Peak-Power in Abhängigkeit der Zeit. D) Zusammenfassende Darstellung des Effektes von XE991 auf Theta-Oszillationen in Area CA3 hinsichtlich der gemittelten, normalisierten Peak-Power (D1), der Spitzenfrequenz (D2) und der gemittelten, normalisierten Halbbandbreite (D3). Die Sternchen in D sind Ausdruck des Signifikanzniveaus von P. P < 0.05 (\*), P < 0.01 (\*\*) und P < 0.001 (\*\*\*)

**4.2.2 Effekt von Losigamone**

Die Applikation von Losigamone mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (n = 4) bewirkte eine Reduktion der Peak-Power um  $79.5 \pm 5.31$  % (P < 0.001), verminderte die Spitzenfrequenz von einem Ausgangswert von  $13.68 \pm 0.72$  Hz auf  $6.73 \pm 1.11$  Hz (P < 0.01) und verringerte die Halbbandbreite um  $44.50 \pm 6.5$  % (P < 0.01). Der suppressive Effekt von Losigamone war reversibel. Nach dem Auswaschen erreichten die Theta-Oszillationen  $67.31 \pm 15.57$  % (P = 0.13) der ursprünglichen Powerwerte bei einer Frequenz von  $9.09 \pm 1.83$  Hz (P < 0.05). Die Halbbandbreite machte  $76.09 \pm 21.84$  % (P = 0.35) der Kontrolle aus.

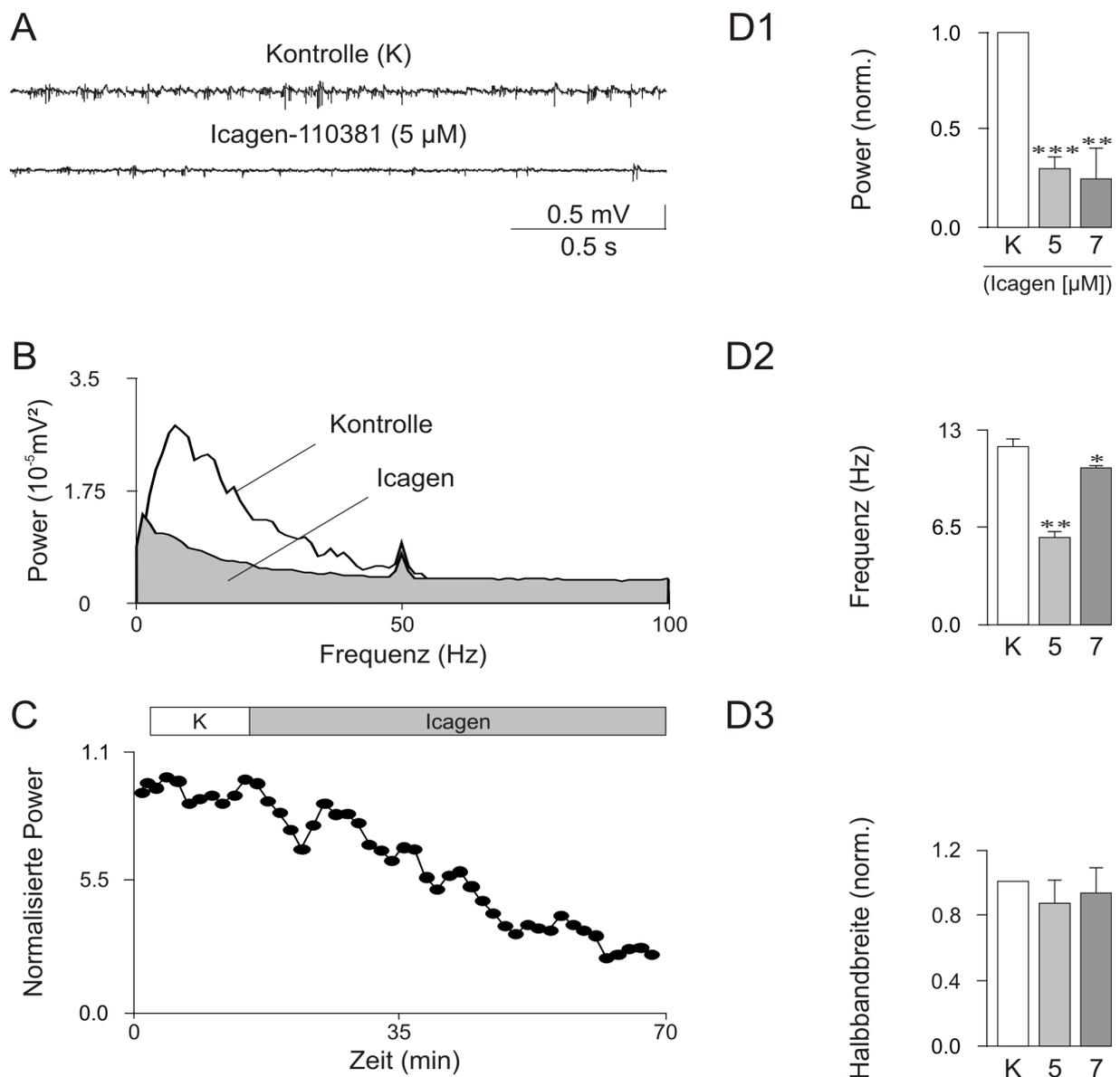


### Abbildung 9: Effekt von Losigamone auf Theta-Oszillationen

A) Beispiel einer Messung im *stratum pyramidale* in Area CA3 unter Kontrollbedingung (obere Spur), nach 60 minütiger Applikation von 100  $\mu$ M Losigamone (mittlere Spur) und nach dem Auswaschen über 60 min (untere Spur). B) Powerspektrum über ein 100 s Zeitfenster der Rohdaten unter Kontrollbedingung (weiß), nach 60 min Substanzapplikation (hellgrau) und nach 60 minütigem Auswaschen (grau). C) Darstellung des Effekts von Losigamone auf die Peak-Power in Abhängigkeit der Zeit. D) Zusammenfassende Darstellung der dosisabhängigen, reversiblen Effekte von Losigamone für Area CA3 hinsichtlich der gemittelten, normalisierten Peak-Power (D1), der Spitzenfrequenz (D2) und der gemittelten, normalisierten Halbbandbreite (D3). Die Sternchen in D sind Ausdruck des Signifikanzniveaus von P. P < 0.05 (\*), P < 0.01 (\*\*) und P < 0.001 (\*\*\*).

### 4.2.3 Effekt von Icagen-110381

In coronalen Schnitten wurde der Effekt von Icagen in Konzentrationen von 5 (n = 4) und 7  $\mu\text{M}$  (n = 5) getestet. Die Peak-Power ging in beiden Fällen zurück. Bei 5  $\mu\text{M}$  (n = 4) fiel sie um  $69.58 \pm 5.18 \%$  ( $P < 0.001$ ) und bei 7  $\mu\text{M}$  (n = 5) um  $75.31 \pm 15.74 \%$  ( $P < 0.01$ ). Die Applikation von 5  $\mu\text{M}$  verschob die Frequenz von  $12.24 \pm 0.51 \text{ Hz}$  auf  $5.85 \pm 0.31 \text{ Hz}$  ( $P < 0.01$ ) und bei 7  $\mu\text{M}$  auf  $10.42 \pm 0.16 \text{ Hz}$  ( $P < 0.05$ ). Die Halbbandbreite nahm bei 5  $\mu\text{M}$  um  $13.39 \pm 13.66 \%$  ( $P = 0.48$ ) ab und stieg mit 7  $\mu\text{M}$  um  $2.11 \pm 16.6 \%$  ( $P = 0.66$ ) an.

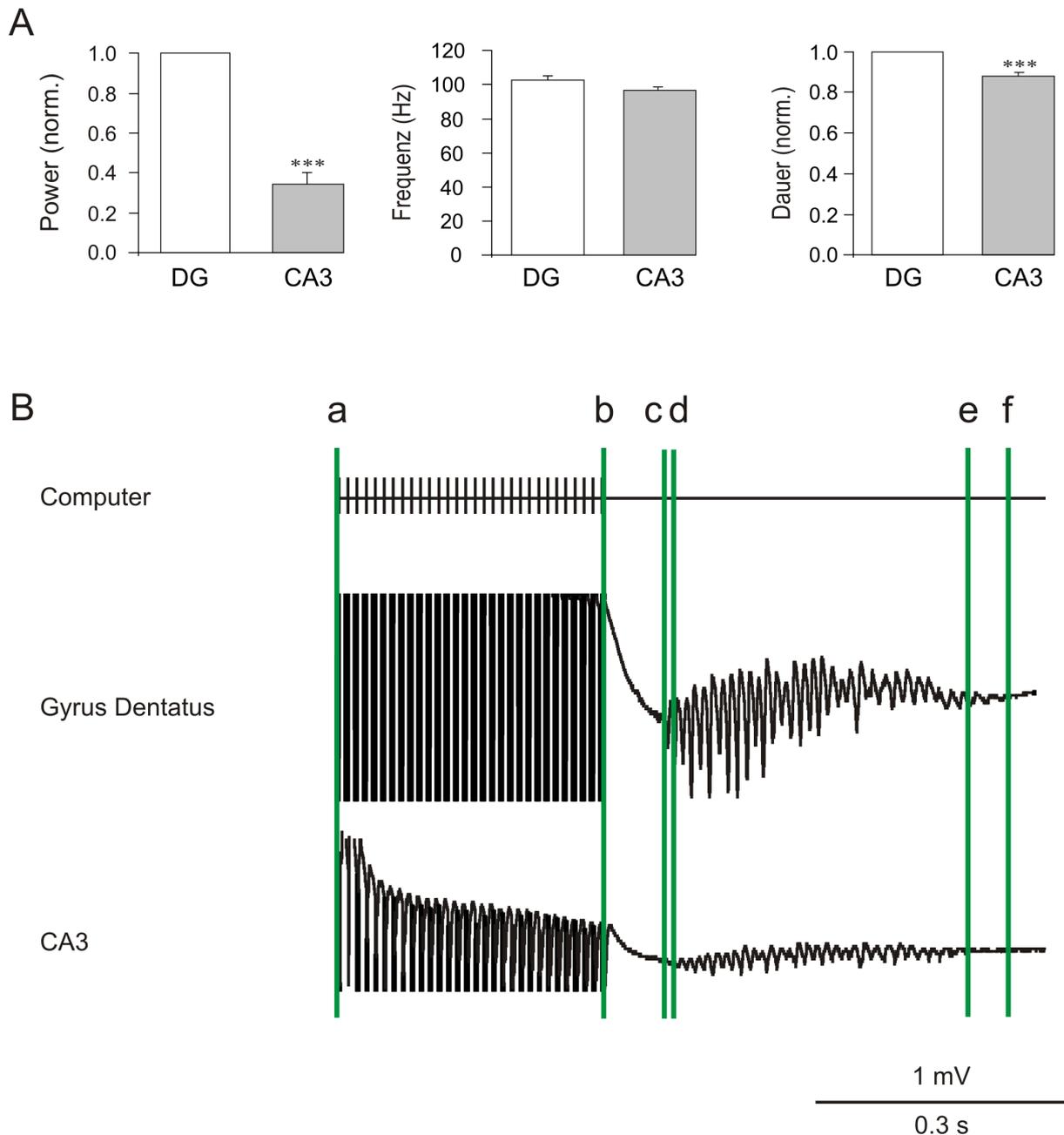


**Abbildung 10: Effekt von Icagen-110381 auf Theta-Oszillationen**

A) Repräsentative Messung im *stratum pyramidale* der Area CA3 unter Kontrollbedingung (obere Spur) und nach 60 minütiger Applikation von 5  $\mu$ M Icagen (untere Spur). B) Powerspektrum über ein 100 s Zeitfenster der Rohdaten unter Kontrollbedingung (weiß) und nach 60 min Substanzapplikation (grau). C) Darstellung des Effekts von Icagen auf die Peak-Power in Abhängigkeit der Zeit. D) Zusammenfassende Darstellung des Effektes von Icagen auf Theta-Oszillationen in Area CA3 hinsichtlich der gemittelten, normalisierten Peak-Power (D1), der Spitzenfrequenz (D2) und der gemittelten, normalisierten Halbbandbreite (D3). Die Sternchen in D sind Ausdruck des Signifikanzniveaus von P. P < 0.05 (\*), P < 0.01 (\*\*), P < 0.001 (\*\*\*)

**4.3 Stimulus-induzierte Gamma-Oszillationen**

Rhythmische oszillatorische Potentiale konnten wiederholt und beständig durch tetanische Stimulation des *stratum moleculare* des Gyrus Dentatus (DG) mit 100 Hz für 300 ms induziert werden. Die Gamma-Oszillationen wurden sowohl im DG (n = 32) als auch in der Area CA3 (n = 32) gemessen und unterschieden sich vor allem in ihrer Peak-Power und durchschnittlichen Dauer. Die in Area CA3 abgeleiteten Powerwerte waren stets kleiner als die des DG und machten unter Kontrollbedingungen  $34.59 \pm 9.9$  % (P < 0.001) der im DG gemessenen Werte aus. Die Oszillationen dauerten im DG in der Regel  $461.35 \pm 18.24$  ms und in Area CA3  $408.28 \pm 19.91$  ms. In den 32 gemessenen Hirnschnitten lag die Frequenz im DG bei 24 Experimenten über, bei 2 Experimenten unter der in Area CA3 gemessenen Frequenz, in 6 Experimenten war sie für beide Regionen identisch. Die durchschnittliche Spitzenfrequenz lag im DG bei  $102.58 \pm 2.49$  Hz und in Area CA3 bei  $96.59 \pm 2.05$  Hz. Die Latenzzeit zwischen den abgeleiteten Signalen aus dem DG und der Area CA3 wurde mittels Kreuzkorrelation bestimmt und betrug  $7.46 \pm 0.29$  ms (n = 13).



#### Abbildung 11: Latenzen zwischen Gamma-Oszillationen im Gyrus Dentatus und Area CA3

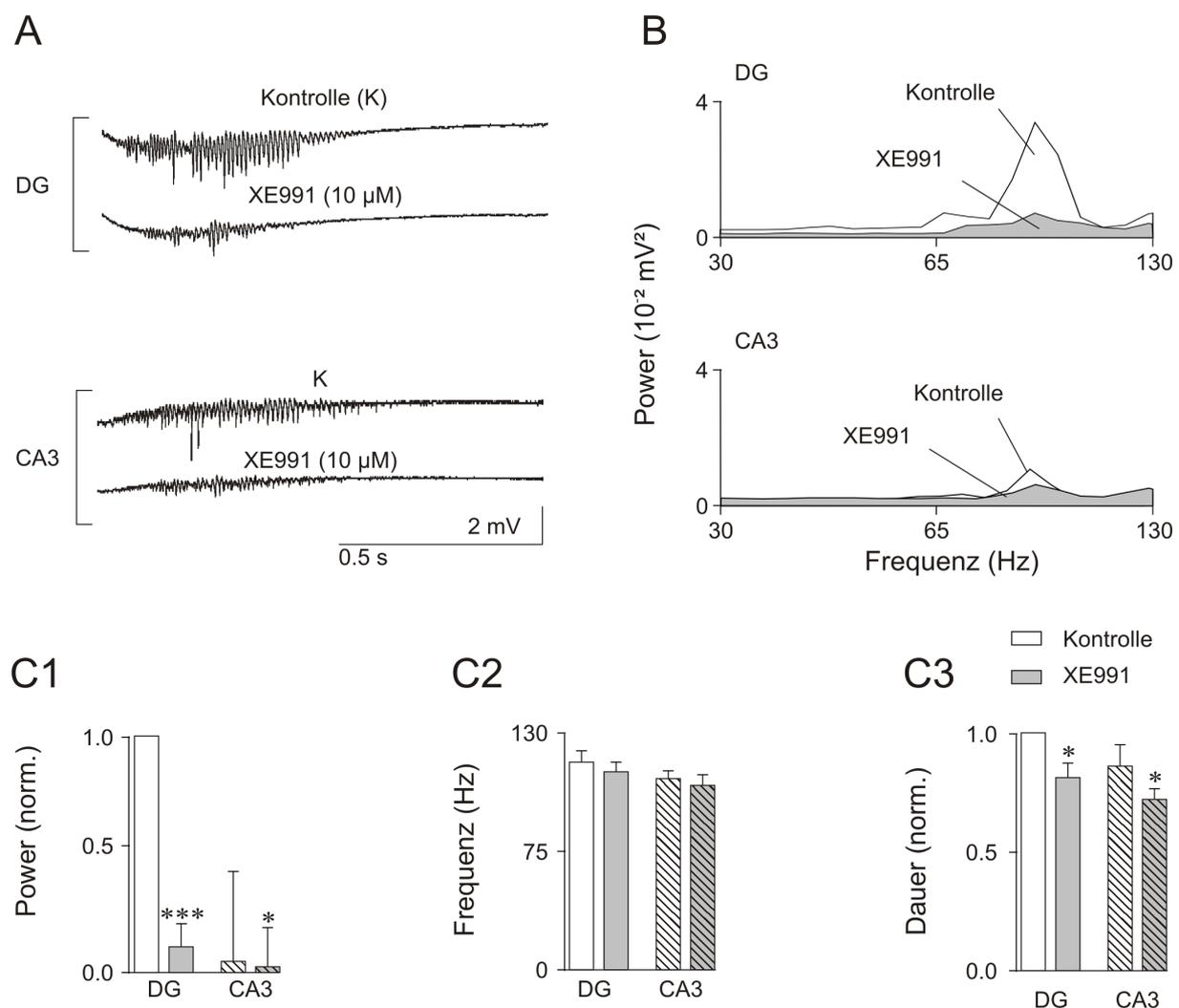
Die Säulendiagramme in A zeigen die Mittelwerte für die Parameter Peak-Power, Frequenz und Dauer aller gemessenen Hirnschnitte ( $n = 32$ ). Die Power und die Dauer sind als normalisierte Werte dargestellt. In B ist eine beispielhafte Originalaufnahme eines extrazellulären Experiments mit Stimulation der Dendriten der inneren Molekularschicht und Ableitung im Gyrus Dentatus (DG) und Area CA3 abgebildet. Der Stimulus (a – b) induziert sowohl im DG als auch in der Area CA3 Gamma-Oszillationen. Zu erkennen ist die Latenzzeit zwischen beiden Regionen. Die Oszillationen werden vom DG zur CA3 weitergeleitet, wo sie zeitlich um Millisekunden verzögert einsetzen (c – d). Das Intervall c – f markiert die Dauer der Oszillationen im DG, das Intervall d – e deren Dauer in Area CA3, das  $88.11 \pm 1.71\%$  ( $P < 0.001$ ) der Dauer im DG beträgt.

#### 4.3.1 Effekt von XE991

Der Effekt von XE991 auf Stimulus-induzierte Gamma-Oszillationen wirkte sich besonders auf die Peak-Power und die Zeitspanne aus, über welche die Oszillationen aufrechterhalten wurden. Im Gyrus Dentatus (DG;  $n = 8$ ) hatte die Applikation von 10

$\mu\text{M}$  nach einer Stunde Einwaschzeit einen Abfall der Power um  $89.82 \pm 9.74 \%$  ( $P < 0.001$ ) zufolge. Die Dauer der Oszillationen nahm um  $19.55 \pm 6.49 \%$  ( $P < 0.05$ ) ab. Unter Kontrollbedingungen lag die Frequenz im DG bei  $115.11 \pm 5.46 \text{ Hz}$  und fiel unter XE991 auf  $109.42 \pm 5.68 \text{ Hz}$  ( $P = 0.29$ ).

Die Tendenzen in der Area CA3 ( $n = 8$ ) entsprechen denen des DG: Unter XE991 fiel die Peak-Power um  $49.67 \pm 16.51 \%$  ( $P < 0.05$ ), die Dauer verkürzte sich um  $18.25 \pm 6.08 \%$  ( $P < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrolle. Ausgehend von einer Spitzenfrequenz von  $106.22 \pm 3.91 \text{ Hz}$  fiel jene nach einstündiger Substanzapplikation auf  $103.19 \pm 5.68 \text{ Hz}$  ( $P = 0.45$ ) ab. Alle Effekte waren irreversibel für XE991.

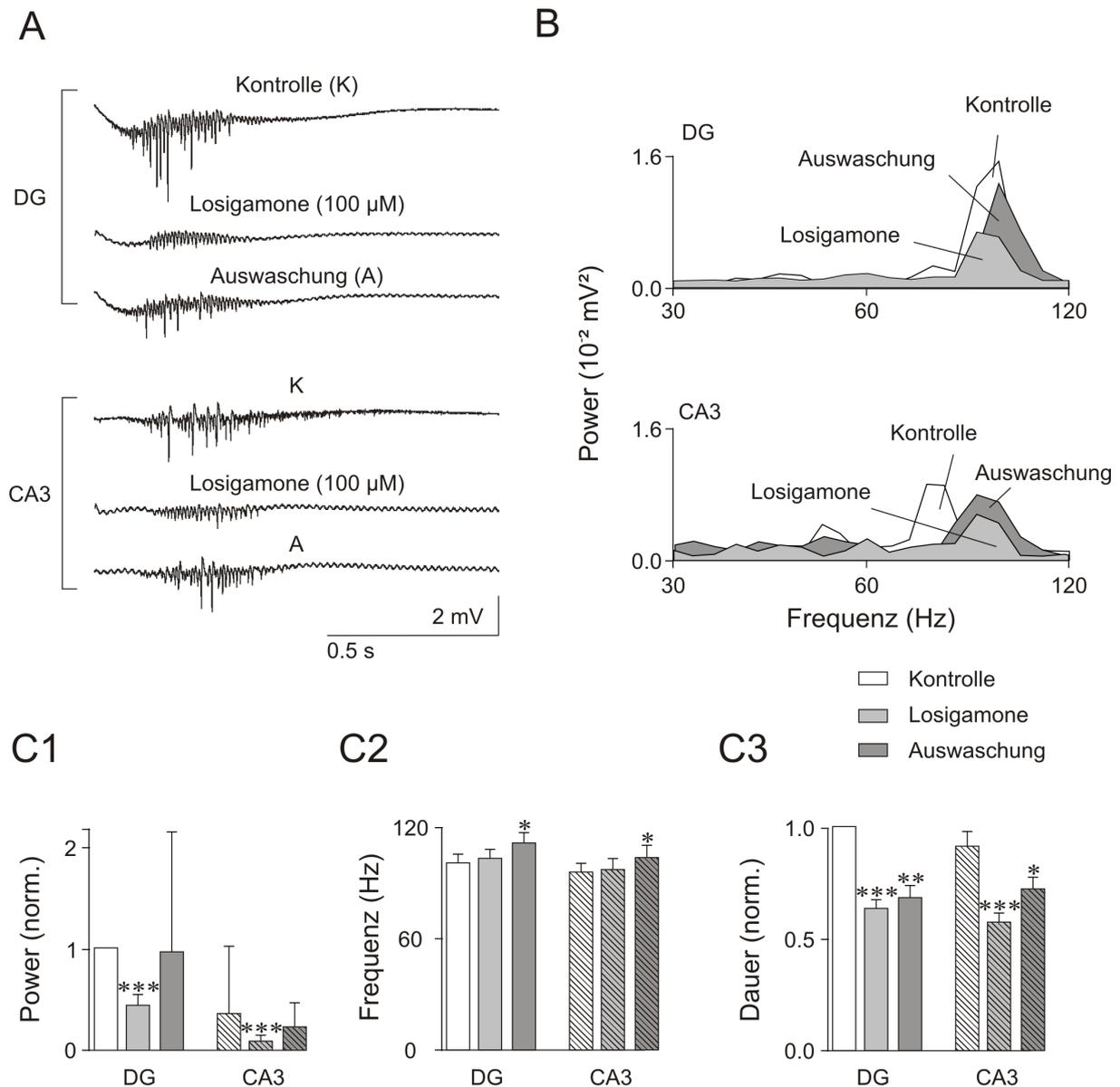


**Abbildung 12: Effekt von XE991 auf Stimulus-induzierte Gamma-Oszillationen**

A) zeigt Gamma-Oszillationen, wie sie infolge eines Stimulus auftreten. Zu erkennen sind die durch XE991 erzeugten Veränderungen im DG und in Area CA3 sowohl in der Amplitude der Peak-Power als auch in der Dauer der Oszillationen. B) zeigt die entsprechenden Powerspektren zu A). Die Säulendiagramme fassen die gemittelten Ergebnisse aller mit XE991 durchgeführten Experimente zusammen. C1) zeigt die Peak-Power normalisiert und gemittelt; C2) die Spitzenfrequenz und C3) die Dauer (CA3: schraffiert, DG: gefüllt). Die Sternchen in C sind Ausdruck des Signifikanzniveaus von P.  $P < 0.05$  (\*) und  $P < 0.001$  (\*\*).

Losigamone wurde in einer Konzentration von 100  $\mu$ M auf Stimulus-induzierte Gamma-Oszillationen eingewaschen. Insbesondere wurden die Peak-Power und die Dauer von der Substanz beeinflusst. Der Effekt war in allen Experimenten reversibel. Nach einer Stunde Einwaschzeit reduzierte sich die Power im DG ( $n = 8$ ) um  $56.66 \pm 10.35 \%$  ( $P < 0.001$ ), stieg aber nach dem Auswaschen wieder auf  $97.36 \pm 1.24 \%$  ( $P = 0.61$ ) des Kontrollwertes an. Die Spitzenfrequenz bewegte sich bei etwa 100 Hz (Kontrolle:  $100.52 \pm 4.88$  Hz; Effekt:  $103.44 \pm 5.26$  Hz,  $P = 0.46$ ) und stieg nach dem Auswaschen signifikant auf  $111.59 \pm 5.77$  Hz ( $P < 0.05$ ) an. Die Dauer der Gamma-Oszillationen nahm unter Losigamone um  $26.98 \pm 3.7 \%$  ( $P < 0.001$ ) ab und betrug nach dem Auswaschen  $68.27 \pm 4.92 \%$  ( $P < 0.01$ ) des Kontrollwertes.

In Area CA3 ( $n = 8$ ) reagierten die Gamma-Oszillationen in ähnlicher Weise auf die Applikation von 100  $\mu$ M Losigamone. Die Peak-Power ging um  $85.98 \pm 5.38 \%$  ( $P < 0.001$ ) zurück und stieg nach dem Auswaschen auf  $60.23 \pm 24.6 \%$  ( $P = 0.16$ ) der Kontrolle an. Die Spitzenfrequenz bewegte sich um ca. 96 Hz (Kontrolle:  $95.62 \pm 4.81$  Hz; Effekt:  $97.05 \pm 5.99$  Hz,  $P = 0.7$ ) und stieg nach dem Auswaschen auf  $103.1 \pm 6.76$  Hz ( $P < 0.05$ ) an. Die Dauer der Oszillationen nahm um  $47.03 \pm 4.13 \%$  ( $P < 0.001$ ) ab und betrug nach dem Auswaschen  $79.58 \pm 5.02 \%$  ( $P < 0.05$ ) der Dauer unter Kontrollbedingungen.



**Abbildung 13: Effekt von Losigamone auf Stimulus-induzierte Gamma-Oszillationen**

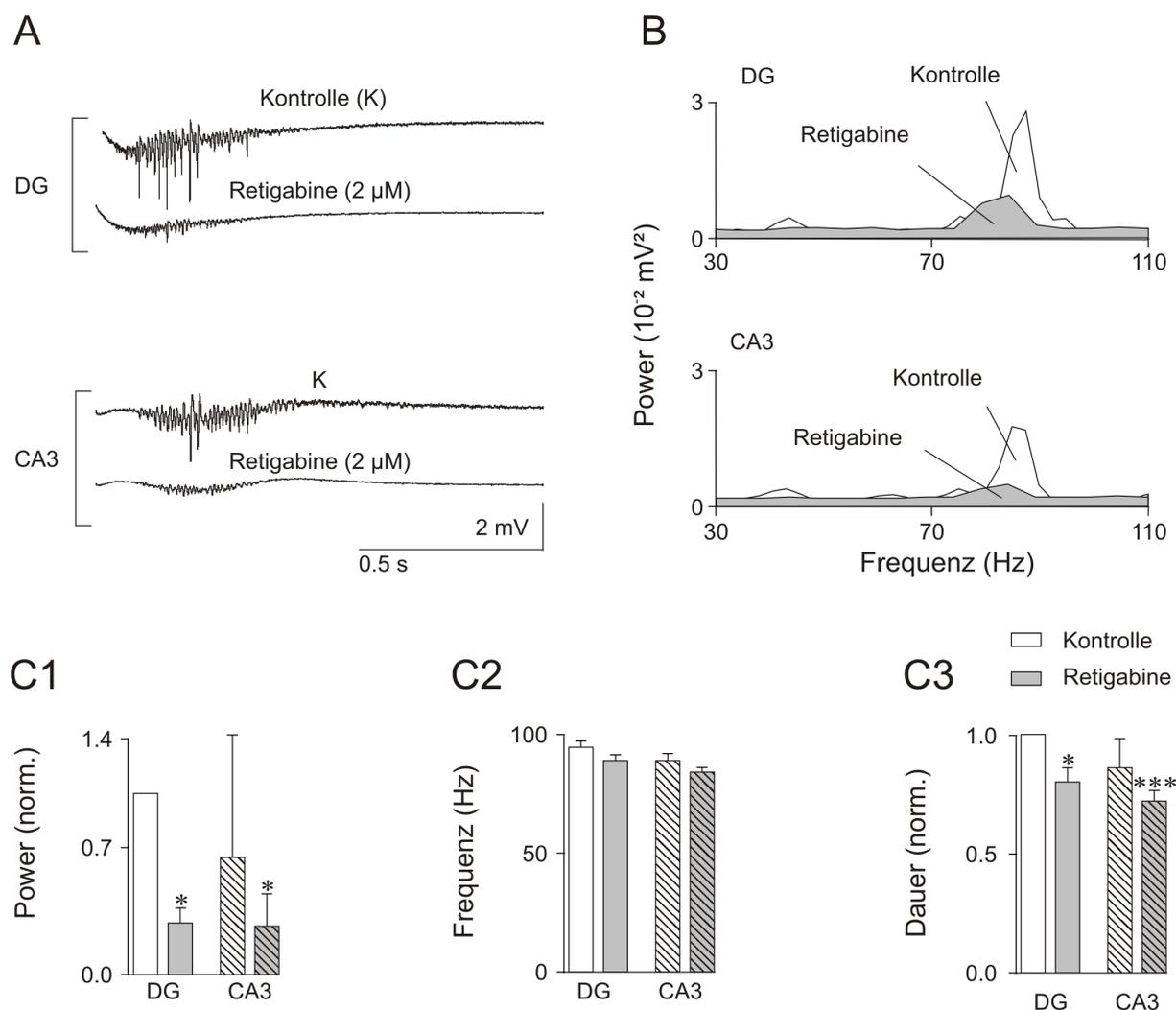
A) zeigt post-Stimulations Intervalle mit Gamma-Oszillationen und die Ein- und Auswascheffekte von Losigamone. Zu erkennen sind Veränderungen im DG und in Area CA3 sowohl in der Amplitude der Peak-Power als auch in der Dauer der Oszillationen. In B) sind die entsprechenden Powerspektren zu A) abgebildet. Die Säulendiagramme fassen die gemittelten Ergebnisse aller mit Losigamone durchgeführten Experimente zusammen. C1) zeigt die Peak-Power normalisiert und gemittelt; C2) die Spitzenfrequenz und C3) die Dauer (CA3: schraffiert, DG: gefüllt). Die Sternchen in C sind Ausdruck des Signifikanzniveaus von P. P < 0.05 (\*), P < 0.01 (\*\*) und P < 0.001 (\*\*).

#### 4.3.3 Effekt von Retigabine

Retigabine wurde in einer Konzentration von 2  $\mu$ M appliziert. Im DG (n = 6) wurde die Peak-Power durch die Substanz supprimiert. Sie ging auf  $23.11 \pm 8\%$  (P < 0.05) der Kontrollpower zurück. Die Dauer wurde ebenso beeinträchtigt. Sie betrug nach einer

Einwaschzeit von 60 min noch  $79.19 \pm 5.97 \%$  ( $P < 0.05$ ) der Kontrolle. Die Spitzenfrequenz ging von  $92.56 \pm 3.6$  Hz auf  $87.9 \pm 2.47$  Hz ( $P = 0.34$ ) zurück.

In Area CA3 ( $n = 6$ ) verhielten sich die Oszillationen nach Substanzapplikation ähnlich. Die Peak-Power ging um  $58.44 \pm 16.47 \%$  ( $P < 0.05$ ) zurück, die Dauer nahm um  $17.24 \pm 4.33 \%$  ( $P < 0.001$ ) ab und die Spitzenfrequenz fiel ausgehend von der Kontrolle mit  $88.31 \pm 2.69$  Hz auf  $82.79 \pm 2.38$  Hz ( $P = 0.19$ ) ab. Alle Effekte waren irreversibel und Auswaschversuche über eine Stunde ( $n = 3$ ) konnten die Oszillationen nicht regenerieren.



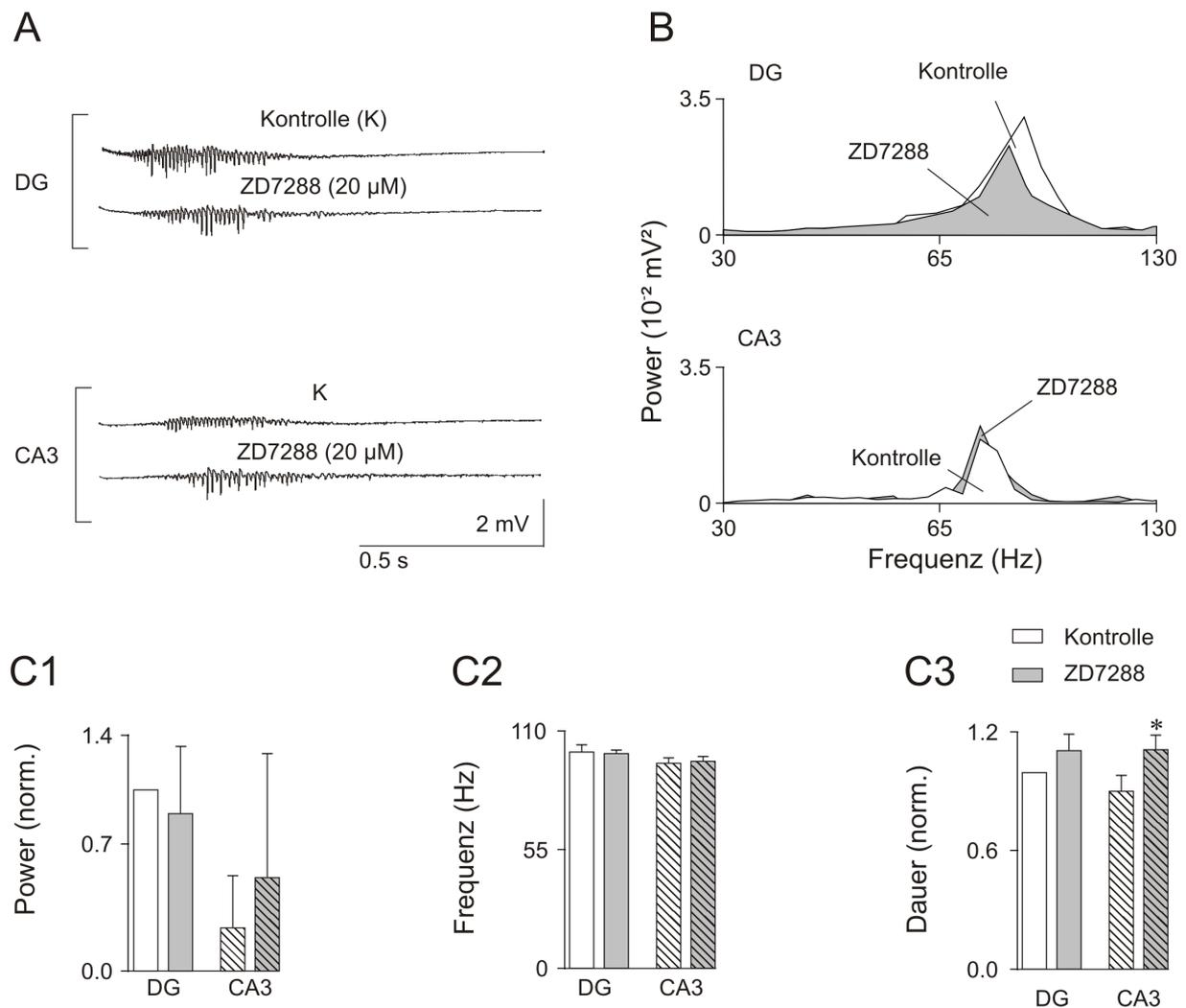
**Abbildung 14: Effekt von Retigabine auf Stimulus-induzierte Gamma-Oszillationen**

In A) sind die in Folge eines Tetanus induzierten Gamma-Oszillationen vor und nach dem Einwaschen von  $2 \mu\text{M}$  Retigabine dargestellt. Zu erkennen sind Veränderungen im DG und in Area CA3 sowohl in der Amplitude der Peak-Power als auch in der Dauer der Oszillationen. In B) sind die entsprechenden Powerspektren zu dem Beispiel in A) abgebildet. Die Säulendiagramme fassen die gemittelten Ergebnisse aller mit Retigabine durchgeführten Experimente zusammen. C1) zeigt die normalisierte und gemittelte Peak-Power; C2) die Spitzenfrequenz und C3) die Dauer (CA3: schraffiert, DG: gefüllt). Die Sternchen in C sind Ausdruck des Signifikanzniveaus von P.  $P < 0.05$  (\*) und  $P < 0.001$  (\*\*).

#### 4.3.4 Effekt von ZD7288

ZD7288 wurde in einer Konzentration von 20  $\mu$ M auf Stimulus-induzierte Gamma-Oszillationen appliziert (n = 10). Interessanter Weise verlängerte sich nach Substanzapplikation die Dauer der Oszillationen im Anschluss an die tetanische Reizung. Die Effekte von ZD7288 waren irreversibel. Im DG führte die 50 min Applikation zu einer Reduktion der Peak-Power um  $11.62 \pm 39.17$  % (P = 0.42). Die Frequenz blieb bei  $\sim 100$  Hz stabil (Kontrolle:  $100.23 \pm 3.06$  Hz; Effekt:  $99.25 \pm 1.59$  Hz; P = 0.77). Unter dem Einfluss von ZD7288 nahm die Dauer der Oszillationen um  $11.56 \pm 7.8$  % (P = 0.11) zu.

Im Gegensatz zum DG stieg In Area CA3 die Peak-Power um  $117.47 \pm 0.73$  % (P = 0.13). Die Frequenz blieb bei  $\sim 95$  Hz stabil (Kontrolle:  $94.63 \pm 2.59$  Hz; Effekt:  $95.8 \pm 2.26$  Hz; P = 0.67). Die Dauer verlängerte sich ebenfalls um  $12.09 \pm 9.2$  % (P < 0.05).



**Abbildung 15: Effekt von ZD7288 auf Stimulus-induzierte Gamma-Oszillationen**

A) Intervall mit HFS Gamma-Oszillationen vor und nach dem Einwaschen von 20  $\mu\text{M}$  ZD7288. Zu erkennen sind Veränderungen im DG und in Area CA3 sowohl in der Amplitude der Peak-Power als auch in der Dauer der Oszillationen, die sich unter ZD7288 verlängert. In B) sind die entsprechenden Powerspektren zu dem Beispiel in A) abgebildet. Die Säulendiagramme fassen die gemittelten Ergebnisse aller mit ZD7288 durchgeführten Experimente zusammen. C1) zeigt die normalisierte und gemittelte Peak-Power; C2) die Spitzenfrequenz und C3) die Dauer (CA3: schraffiert, DG: gefüllt). Die Sternchen in C sind Ausdruck des Signifikanzniveaus von  $P < 0.05$  (\*).

## 5 Diskussion

### 5.1 Gamma-Oszillationen

In elektrophysiologischen Experimenten am Hippokampus der Ratte, wurden Gamma-Oszillationen pharmakologisch durch Kainat und stimulatorisch durch hochfrequente elektrische Stimulation induziert.

Die durch unterschiedliche Paradigmen generierten  $\gamma$ -Oszillationen unterschieden sich hinsichtlich bestimmter Parameter. Kainat-induzierte  $\gamma$ -Oszillationen bildeten sich in der Area CA3 aus und propagierten in die Area CA1, waren somit großflächiger ableitbar als Stimulus-induzierte Oszillationen, die überwiegend lokal entstanden und hochfrequenter waren. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass die Geschwindigkeit neuronaler Kommunikation von Faktoren wie axonaler Signalweiterleitung und synaptischen Verzögerungen limitiert wird (Nunez 1996). Folglich koppeln hochfrequente Oszillationen benachbarte Neurone aneinander, während langsame Oszillationen auch weitläufigere Netzwerke synchronisieren, (Csicsvari, Jamieson et al. 2003) und entfernte Zell-Gruppen miteinander verknüpfen können, indem sie hochfrequente, lokale Oszillationen zeitlich exakt koordinieren. So war es nach HFS des *stratum moleculare* möglich,  $\gamma$ -Oszillationen im DG selbst und in der Area CA3c abzuleiten, jedoch gelang es nicht, Feldpotentiale in der Area CA1 abzuleiten (Daten nicht gezeigt).

Im adulten Gehirn nehmen Gamma- und hochfrequenterer Netzwerkoszillationen (100 - 200 Hz) eine zentrale Rolle für das Timing und die Koordination der neuronalen Aktivität ein. Sie sind ein „timing device“, also eine Art Taktgeber der prä-, und postsynaptischen Aktivität, und somit an der Koinzidenzdetektion beteiligt. Bei der Auswahl von Neuronen, die zu einer funktionell effizienten Einheit zusammengeschnürt werden sollen, ist die zeitliche Abstimmung ihrer prä- und postsynaptischer Aktivität eine wichtige Determinante: Die synaptische Verbindung zwischen zwei Nervenzellen wird gestärkt, wenn beide zeitgleich aktiviert werden (Hebb 1949; König, Engel et al. 1996; Ritz und Sejnowski 1997). Diese sog. synaptische Plastizität beschreibt die Eigenschaft synaptischer Zellverbindungen, die Effizienz ihrer Signalübertragung modulieren zu können. Sie kann gesteigert oder abgeschwächt werden, man spricht dann von einer Langzeitpotenzierung (LTP), bzw. von einer Langzeitdepression (LTD). Diese zellulären Veränderungen bilden die Grundlage unseres Lernens und unseres Gedächtnisses.

Das Frequenzspektrum der pharmakologisch induzierten  $\gamma$ -Oszillationen bewegte sich zwischen 30 - 40 Hz, während das der Stimulus-induzierten  $\gamma$ -Oszillationen in höherfrequenten Bereichen bei ca. 100 Hz lag.

Während nur die pharmakologisch induzierten  $\gamma$ -Oszillationen auf elektrische Synapsen, also gap junctions angewiesen sind (Traub, Bibbig et al. 2000; Hormuzdi, Pais et al. 2001), ist die Beteiligung von Interneuronen an der Generierung von  $\gamma$ -Oszillationen durch beide Induktionswege sicher und wurde u.a. in Versuchen mit dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Antagonist Bicucullin belegt (Fisahn, Pike et al. 1998; Hajos, Katona et al. 2000; Vreugdenhil, Bracci et al. 2005). Allerdings können alleine in der Area CA1 des Hippokampus 16 verschiedene Klassen von Interneuronen unterschieden werden (van Hooft, Giuffrida et al. 2000), die wahrscheinlich in unterschiedlichem Maß an der Entstehung von Oszillationen beteiligt sind. So führt beispielsweise die Applikation von Monoaminen (Norepinephrin, Serotonin und Dopamin) auf pharmakologisch und Stimulus-induzierte  $\gamma$ -Oszillationen zu unterschiedlichen Ergebnissen: Die Amplitude der pharmakologisch induzierten Oszillationen verkleinert sich nach Monoamin-Applikation, während die Amplitude der HFS Oszillationen im Gegensatz dazu zunimmt (Weiss, Veh et al. 2003; Wojtowicz, van den Boom et al. 2009). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass verschiedene Interneuron-Klassen an  $\gamma$ -Oszillationen beteiligt sind, die sich zum Beispiel bezüglich ihres unterschiedlichen Expressionsmusters von Rezeptorsubtypen unterscheiden.  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptorsubtypen sprechen zum Beispiel unterschiedlich auf ihre Agonisten an: einige verstärken die GABAerge Transmission, während andere sie abschwächen.

Die Ergebnisse unserer Versuche hinsichtlich pharmakologisch und Stimulus-induzierter  $\gamma$ -Oszillationen unterschieden sich nicht in ihrer Tendenz: In fast allen Versuchen zeigte sich durch die Applikation der Substanzen eine signifikante Supprimierung der  $\gamma$ -Oszillationen. Die von uns gewählten Substanzen beeinflussen verschiedene intrinsische Eigenschaften der Neurone, also MPOs und Resonanzeigenschaften. Diese sind zwar an der Genese von Theta-Oszillationen beteiligt, allerdings sind bisher weder MPOs noch Resonanzeigenschaften im Gamma-Frequenzbereich bekannt geworden. Somit muss nach anderen Erklärungen gesucht werden, die den Block der  $\gamma$ -Oszillationen erklären könnten. Denkbar wäre z.B. eine eingeschränkte Transmitterfreisetzung an den präsynaptischen Nervenendigungen der Neurone (Meir, Ginsburg et al. 1999).

Unsere Ergebnisse sprechen also für die Beteiligung bestimmter Ionenkanäle an Oszillationen im Netzwerk und nicht nur auf Zellebenen in Form von Resonanz bzw. MPOs (Hu, Vervaeke et al. 2002) und werfen gleichzeitig die dringliche Frage auf, welche spezifischen Klassen von Interneuronen an der Rhythmusgenerierung beteiligt sind. Dies zu erörtern bleibt eine Herausforderung, da bis dato kaum Methoden etabliert sind mit denen die spezifischen Typen von Interneuronen einfach und zuverlässig im Netzwerk untersucht werden können. Allerdings könnten durch die exakte Zuordnung von Ionenkanälen zu den Zellen bzw. Neuronen in denen sie exprimiert werden, zukünftig und einhergehend mit der Aufklärung von Pathophysiologien erblicher Epilepsiesyndrome (z.B. der BNFS), gezielt Substanzen entwickelt werden, die ein geringeres Nebenwirkungsprofil als herkömmliche Medikamente haben.

Epileptiker leiden häufig unter kognitiven Dysfunktionen, deren Ausmaß von Faktoren wie Patientenalter, Dauer, Frequenz, Ätiologie, Art der Krampfanfälle u.a. bestimmt wird, und durch die antiepileptische (engl. „antiepileptic drug, AED“) Therapie (Vermeulen und Aldenkamp 1995). Da Epilepsie-Patienten oft ihr Leben lang Medikamente einnehmen müssen, kann es während der Langzeitbehandlung zu Folgeschäden kommen: Phenobarbital beeinträchtigt z.B. die Gedächtnis- und Konzentrationsleistung, Phenytoin die Aufmerksamkeit und oft addieren sich die Nebenwirkungen durch eine angesetzte Polytherapie oder hohe Medikamentenspiegel (Vining 1987). Die durch die Konvulsionen in Mitleidenschaft gezogene Kognition wird durch die herkömmlichen AEDs also oft zusätzlich geschädigt (Mula und Trimble 2009), da diese Medikamente nicht nur die Konvulsionen eindämmen, sondern sämtliche Rhythmen auf Netzwerkebene, die z.B. an der Gedächtnisbildung beteiligt sind.

Diese Tatsache verdeutlicht die Bedeutung, die in der Entwicklung neuer antiepileptischer Arzneimittel liegt. Und auf der Suche nach besseren, nebenwirkungsärmeren Antiepileptika, sollte die Rolle und Identifizierung bestimmter Ionenkanäle geklärt werden.

## **5.2 Theta-Oszillationen**

Die Tatsache, dass die spezifischen Stadien der Wahrnehmung und des Verhaltens an verschiedene und distinkte Rhythmen im Gehirn gekoppelt sind, verstärkt das Interesse am oszillatorischen Verhalten von Neuronen. Beim Studieren dieser globalen Oszillationen fiel in biophysikalischen Versuchen auf, dass auch einzelne Neurone über dynamische intrinsische Eigenschaften verfügen, wie zum Beispiel die Fähigkeit,

Resonanz zu entwickeln und zu oszillieren (Llinas 1988; Hutcheon und Yarom 2000). Möglicherweise werden über dieses präzise Timing ihrer Aktivität Informationen innerhalb neuronaler Netzwerke verschlüsselt. Hippokampale Pyramidenzellen besitzen z.B. spannungs- und zeitabhängige Filtereigenschaften, die es ihnen ermöglichen, Signale anhand ihrer Frequenz auszuwählen und angrenzende Interneurone zu beeinflussen (Marshall, Henze et al. 2002).

Die bevorzugte Frequenz vieler Neurone im Zentralen Nervensystem (ZNS) liegt für Membranpotentialoszillationen (MPOs) und/oder Resonanz im Thetafrequenzbereich (Puil, Meiri et al. 1994; Lampl und Yarom 1997). Innerhalb der hippocampalen Formation wurden MPOs im Thetafrequenzbereich erstmals in den Pyramidenzellen und den Körnerzellen des DG nachgewiesen (Fujita und Sato 1964; Artemenko 1972; Andersen 1980), später auch in Sternzellen des entorhinalen Kortex (Alonso und Llinas 1989). Im selben Frequenzbereich wie die MPOs zeigen diese Zellen resonantes Verhalten, was die Vermutung nahelegt, dass beide funktionell verbunden sind oder auf ähnlichen Mechanismen beruhen (Haas und White 2002; Erchova, Kreck et al. 2004). Darüber hinaus wurden MPOs in den tiefen Schichten des medialen entorhinalen Kortex, in Zellen, die vom perirhinalen Kortex zum entorhinalen Kortex projizieren, und in einigen Interneuronen im *stratum moleculare* der Area CA1 des Hippokampus beschrieben (Schmitz, Gloveli et al. 1998; Bilkey und Heinemann 1999).

Wir zeigen in unseren Versuchen, dass eine zuverlässige Induktion von Theta-Oszillationen in coronalen hippocampalen Hirnschnitten durch Kainat-Applikation möglich ist.

### **5.3 Badapplikation von KCNQ-Kanal Modulatoren supprimiert Netzwerkoszillationen**

M-Ströme sind wichtige Elemente zellulärer und neuronaler Erregbarkeit im oszillierenden Netzwerk. Ihre Attenuierung hat Effekte auf das Verhalten neuronaler Netzwerke und die Gedächtnisleistung von Versuchstieren. In elektrophysiologischen Versuchen an Mäusen mit attenuiertem M-Kanal, wurden folgende Veränderungen in CA1 Pyramidenzellen im Hippokampus sichtbar: Sie zeigten eine erhöhte Erregungsbereitschaft, eine reduzierte Fähigkeit sich an repetitive, erregende Signale anzupassen (engl. „spike-frequency adaptation“), abgeschwächte mittlere Nachhyperpolarisationen und reduzierte intrinsische Theta-Resonanz (Aiken, Lampe et al. 1995). *In vivo* äußerten sich diese Veränderungen in Form von hyperaktivem

Verhalten, epileptiformen Krämpfen und einer Beeinträchtigung des episodischen Gedächtnisses. Außerdem zeigte sich in freilaufenden Tieren eine Reduktion der Theta-Oszillationen, die gewöhnlich während explorativen Verhaltens auftreten (Peters, Hu et al. 2005).

In unseren Versuchen mit pharmakologisch induzierten  $\gamma$ - und  $\theta$ -Oszillationen verwendeten wir den KCNQ-Kanal Aktivator Icagen-110381 und den KCNQ-Kanal Blocker XE991. Beide Substanzen reduzierten die Amplitude der Oszillationen. In den HFS Experimenten wurde Icagen gegen Retigabine ausgetauscht. Auch in diesen Experimenten wurde die Amplitude der Oszillationen signifikant reduziert und die Dauer der Oszillationen verkürzt.

Retigabine ist ein neues Antiepileptikum, welches sich in Phase III der pharmakologischen Testung für pharmakoresistente fokale Epilepsien befindet (Maljevic, Wuttke et al. 2008). Seine Wirkung entfaltet Retigabine dosisabhängig. In niedrigen Konzentrationen wirkt es überwiegend auf KCNQ-Kanäle und GABA-Ströme. Es verschiebt die Aktivierungsschwelle von  $I_M$  zu negativeren Werten und potenziert die *de novo* Synthese von GABA das dadurch den nach innengerichteten  $Cl^-$ -Strom verstärkt. In höheren Konzentrationen beeinflusst Retigabine zusätzlich  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Ströme, sowie ZNS-Rezeptoren wie den Kainat-Rezeptor (Kapetanovic 1996; Rundfeldt und Netzer 2000).

Icagen wirkt im Unterschied zu Retigabine selektiv auf KCNQ2/3 Kanäle und ist pharmakologisch auf andere in der antiepileptischen Therapie bekannte Kanäle oder Rezeptoren inaktiv (Wickenden, Krajewski et al. 2008). Der hyperpolarisierende Effekt beider Substanzen kann durch den selektiven KCNQ2/3-Kanal Blocker XE991 aufgehoben werden. In unseren Versuchen hatte XE991 allerdings denselben suppressiven Effekt auf Netzwerkoszillationen, wie die Aktivatoren des M-Stroms. Damit passen unsere Daten zu den in Einzelzell-Experimenten erzielten Ergebnissen, in denen es durch pharmakologische Blockierung von  $I_M$  durch XE991 zur Blockierung resonanter Zelleigenschaften kam. Dabei blockierte XE991 nur bei depolarisierten Membranpotentialen die Resonanz, nicht aber bei hyperpolarisierten Werten (Hu, Vervaeke et al. 2002). Die pharmakologische Inaktivierung der  $I_M$  – Leitfähigkeit beeinträchtigt also nicht nur  $\theta$ -Resonanz im Hippokampus, sondern ebenso Oszillationen auf Netzwerkebene. Da pharmakologisch induzierte Oszillationen, ebenso wie Stimulus-induzierte Oszillationen blockiert wurden, müssen KCNQ-Kanäle über die Interneuronen-Ebene hinaus, auch an nicht-synaptischen Mechanismen beteiligt sein

(siehe 5.1). Der Rückgang der Oszillationen im Netzwerk durch  $I_M$ -Blockade könnte demzufolge auf dem Ausfall neuronaler Resonanz und somit auf intrinsischen Zelleigenschaften beruhen. Für eine Beeinflussung der Erregbarkeit und synaptischen Interaktion spricht allerdings die Tatsache, dass es bei Theta-Oszillationen keine harmonischen Peaks gibt.

#### **5.4 Badapplikation von Losigamone supprimiert Netzwerkoszillationen**

Losigamone ist ein effizientes Antikonvulsivum, das in Kombination mit herkömmlichen Antiepileptika wie Valproat und Phenobarbital pharmakodynamisch günstig, also synergistisch wirkt. Allerdings interagiert Losigamone auch pharmakokinetisch, wodurch die Anwendung in der Praxis erschwert, bzw. die Bestimmung von Konzentrationsspiegeln wichtig wird (Borowicz, Kimber-Trojnar et al. 2007). Durch die Masse an neuen Antiepileptika, werden die Kriterien verschärft, damit Medikamente überhaupt auf deren Potential für die klinische Anwendung geprüft werden. Zusätzlich zu ihrer antikonvulsiven Wirkung sollten sie besonders vorteilhaft oder günstig hinsichtlich anderer Störungen wie neuropathischem Schmerz, Kopfschmerz oder bipolaren Störungen sein (Abou-Khalil 2004). Für Losigamone wurden im Tierversuch additive anxiolytische, antidepressive und Gedächtnis-stützende Wirkungen nachgewiesen (Bialer, Johannessen et al. 1999). Persistente  $Na^+$ -Ströme regulieren die Aktionspotentialschwelle, während die schnellen  $Na^+$ -Ströme für die vorübergehende Generierung von Aktionspotentialen verantwortlich sind. Das Umkehrpotential von  $I_{NaP}$  liegt am Höhepunkt seiner Aktivierungskurve, was ihn neben  $Ca^{2+}$ -Kanälen vom L-Typ und NMDA-Rezeptor Strömen zu einem Verstärker resonanter Eigenschaften macht (Hutcheon und Yarom 2000). Da er bei Depolarisation aktiviert wird, verursacht er weitere Depolarisationen, wohingegen er bei Hyperpolarisation abgeschaltet wird und somit zur Verstärkung der Hyperpolarisation führt. Der Block von  $I_{NaP}$  führt in Pyramidenzellen des Hippokampus zum vollständigen Verlust resonanter Eigenschaften (Hu, Vervaeke et al. 2002) und kann z.B. durch Losigamone hervorgerufen werden (Gebhardt, Breustedt et al. 2001).

In unseren Versuchen reduzierte die Applikation von Losigamone konzentrationsabhängig und reversibel die Amplitude von  $\gamma$ - und  $\theta$ -Oszillationen. Die Frequenz nahm in allen pharmakologischen Experimenten irreversibel niedrigere Werte an. Dies hängt möglicherweise mit der schnellen Aktivierungskinetik von  $I_{NaP}$  zusammen, die es ihm erlaubt mit resonanten Strömen zu interagieren, ohne dabei

deren Frequenz zu beeinflussen (Hutcheon und Yarom 2000). Die Ergebnisse unserer Versuche befürworten die Existenz persistenter Natriumströme auf Interneuronen-Ebene. Über den Einfluss der Ströme auf das Spike Verhalten der Interneurone kann allerdings noch keine Aussage getroffen werden.

### **5.5 Badapplikation von ZD7288 moduliert Netzwerkoszillationen**

$I_h$  ist ein Kationenstrom, der nach Blockierung durch ZD7288 in CA1 Pyramidenzellen zum Verlust resonanter Eigenschaften führt (Hu, Vervaeke et al. 2002). Die Charakterisierung von Resonanz und bevorzugten Frequenzbereichen von Zellen kann als Vorlage zum Begreifen der Dynamik von Netzwerkoszillationen dienen.  $I_h$  unterliegt einer hohen Variabilität, da er aus einer Familie von Kanälen generiert wird, unterschiedlich sensitiv auf Neurotransmitter anspricht und manche Kanäle durch Protein-Phosphorylierung modifiziert werden können (Pape 1996; Ludwig, Zong et al. 1998; Santoro, Liu et al. 1998). Somit scheinen Neurone in der Lage zu sein, die Eigenschaften des  $I_h$ -Kanals entsprechend ihrer Funktion auf Netzwerkebene anzupassen, was möglicherweise auch auf die Vielzahl an Interneuronen zutrifft (Aponte, Lien et al. 2006).

In unseren HFS Experimenten hatte die Applikation von ZD7288 keinen signifikanten Effekt auf die Amplitude und Frequenz der Oszillationen. Einzig in der Area CA3 nahm die Dauer der Oszillationen nach dem Stimulus zu. Dieser Effekt unterscheidet sich von den übrigen HFS Experimenten mit anderen Substanzen, in denen die Dauer zurückging und die Amplitude abnahm. Versuche an Pyramidenzellen aus Schicht V des EC und subikularen Neuronen ergeben, dass die Applikation von Dopamin (DA) zu einer verminderten Erregbarkeit der Neurone führt (Behr, Gloveli et al. 2000), die sich durch die Zunahme von  $I_h$  und der damit einhergehenden Hyperpolarisation erklären lässt (Behr, Gloveli et al. 2000). In weiteren Versuchsreihen erhöhte die DA-Applikation nach Inaktivierung von  $I_h$  durch Depolarisation oder pharmakologische Blockierung die neuronale Erregbarkeit (Rosenkranz und Johnston 2006). Diese Beobachtung passt zu unseren Ergebnissen, befürwortet die Beteiligung von  $I_h$  an neuronaler Erregbarkeit und hinterlässt Fragen nach den Ursachen, die zu der erhöhten Erregungsbereitschaft führen. Natriumströme könnten als Ursache in Frage kommen, da sie  $D_1$ -dopaminerg vermittelt herabreguliert (Cantrell, Scheuer et al. 1999) und möglicherweise  $D_2$ -dopaminerg vermittelt hochreguliert werden (Surmeier, Eberwine et al. 1992).

Auch in Theta-Rhythmen ist  $I_h$  involviert (Dickson, Magistretti et al. 2000; Hu, Vervaeke et al. 2002; Kocsis und Li 2004). Theta-Rhythmen sind für die Gedächtnisausbildung und den koordinierten Abruf von gespeicherten Informationen wichtig (Judge und Hasselmo 2004). Veränderungen an diesem Ionenkanal können somit auch an dem Verlust kognitiver Fähigkeiten beteiligt sein.

## 5.6 Ausblick

Zur Ausbildung eines Gedächtnis müssen eingehende Informationen nach einem bestimmten Schema prozessiert werden. EEG Ableitungen am Menschen belegen, dass sich das Gehirn dabei synchroner neuronaler Netzwerkaktivitäten in verschiedenen Frequenzbereichen bedient. Gedächtniskonsolidierung ist die graduelle Vertiefung einer Gedächtnisspur, die initial verschlüsselt wurde. Zunächst wird sie durch Langzeitpotenzierung (LTP) initiiert, und dann durch den Transfer von Informationen vom Hippokampus zum Neokortex abgeschlossen (Frankland und Bontempi 2005).  $\theta$ -Oszillationen stellen dabei die konstante Phase dar, an die die in Form von  $\gamma$ -Oszillationen eingehenden Informationselemente zeitlich gekoppelt werden, um dann in chronologischer Reihenfolge gespeichert zu werden (Axmacher, Mormann et al. 2006). Die Speicherung im Langzeitgedächtnis erfolgt während des slow-wave Schlafes über hochfrequente Sharp wave-ripple Komplexe (100 – 200 Hz).

Während oszillatorischer Aktivität werden im Hippokampus Neuromodulatoren wie Serotonin oder Acetylcholin ausgeschüttet. Die Freisetzung dieser Substanzen führt zu einer Nachdepolarisation (engl. „afterdepolarization, ADP“), die sich in einer transienten Zunahme der Erregbarkeit zeigt (Araneda und Andrade 1991). Die ADP ist zu kurz um den Mechanismus des Kurzzeitgedächtnisses zu erklären, sie ist aber lang genug um Informationen zwischen Zyklen von Oszillationen im Thetabereich (5 – 12 Hz) abzuspeichern. Geht man allerdings davon aus, dass eine einmal getriggerte ADP das Feuern von Zellen im nächsten Zyklus begünstigt, würde die ADP kontinuierlich aktualisiert werden (Lisman und Idiart 1995). Umgekehrt kommt es allerdings in Abwesenheit der Transmitter zu einer Nachhyperpolarisation (engl. „afterhyperpolarisation, AHP“), die die Erregbarkeit der Neurone vorübergehend herabsetzt. Als unerwünschte Nebenwirkung könnte es folglich bei Medikamenten, die über eine reduzierte Erregbarkeit von Zellen wirken zur Beeinträchtigung kognitiver Funktionen kommen. So wurde beispielsweise für das Antikonvulsivum Topiramat eine

dosisabhängige, eingeschränkte Kurzzeitgedächtnisleistung bei Patienten beobachtet, die mit diesem Medikament behandelt wurden (Burton und Harden 1997).

Der Grat zwischen Nutzen und Schaden von Medikamenten ist nach wie vor schmal und lässt Forscher immer wieder nach neuen, nebenwirkungsärmeren Medikamenten suchen. Ionenkanäle stellen dabei einen wichtigen Angriffspunkt für Antikonvulsiva dar, da sie die Erregbarkeit neuronaler Zellen regulieren. So weisen auch unsere Versuche auf einen Zusammenhang zwischen der Aufrechterhaltung hippokampaler Netzwerkoszillationen im  $\theta$ - und  $\gamma$ -Frequenzbereich und der Ausstattung von Neuronen mit intrinsischen Eigenschaften hin. Die Veränderungen von Netzwerkoszillationen durch künstliche Modulation von Ionenkanälen, epileptische Krampfanfälle und andere Pathologien, die auf einer Membranstabilität beruhen, können also die Funktion des Gehirns beeinträchtigen. Den Fokus vom Großen auf das Kleine zu richten, vom Gehirn auf den Hippokampus, auf Netzwerkoszillationen, auf grundlegende Mechanismen wie intrinsische Zelleigenschaften, ist vor diesem Hintergrund und der andauernden Suche nach neuen antiepileptischen Medikamenten bedeutend und aktuell.

## 6 Zusammenfassung

Der Hippokampus ist der wichtigste Umschalt- und Verarbeitungsort sämtlicher Informationen aus der Umwelt. Alle Signale werden über ihn zum Kortex und wieder zurück geleitet, wobei er sich kohärenter Netzwerkoszillationen bedient. Diese verschlüsseln zeitlich Informationselemente in neuronalen Zellensembles und heften sämtliche kognitive Erfahrungen zusammen, die wir schließlich als Wahrnehmung erleben bzw. zu denen wir über unser Gedächtnis Zugang erhalten.

Besonders Gamma- und Theta-Oszillationen greifen dabei ineinander und ergänzen sich gegenseitig, so dass sie unverzichtbar für die Verarbeitung, Speicherung und Abrufung von Informationen sind. Sie unterliegen der synaptischen GABAergen und glutamatergen Übertragung, aber auch nicht-synaptischen Mechanismen und können experimentell *in vitro* pharmakologisch und stimulatorisch induziert werden. *In vivo* sind Netzwerkoszillationen jedoch nicht nur für oben beschriebene physiologische Aktivitätsmuster verantwortlich, sondern auch für Krankheitsbildern wie etwa Epilepsie.

Oszillationen beschränken sich jedoch nicht nur auf Netzwerke, sondern sind auch in Form von Resonanz oder Membranpotentialoszillationen einzelnen Zellen zueigen. Zur Ausbildung dieser benötigen die Zellen intrinsische Eigenschaften zu denen Ionenkanäle wie der M-Strom ( $I_M$ ), h-Strom ( $I_h$ ) und der persistierenden  $Na^+$ -Strom ( $I_{NaP}$ ) gehören. Diese Ströme regulieren die Erregbarkeit von Zellen und können bei eingeschränkter bzw. überschießender Funktion ursächlich an Krankheitsbildern beteiligt sein. Aus diesem Grund beobachteten wir in extrazellulären Versuchen an hippokampalen Hirnschnitten die Auswirkungen verschiedener Ionenkanalmodulatoren auf Kainat-induzierte  $\gamma$ - und  $\theta$ - Oszillationen sowie auf Stimulus-induzierte  $\gamma$ -Oszillationen. Wir applizierten den  $I_M$ -Blocker XE991, die  $I_M$ -Aktivatoren Icagen-110381 und Retigabine, den  $I_{NaP}$ -Blocker Losigamone sowie den  $I_h$ -Blocker ZD7288. Außer ZD7288 supprimierten alle Substanzen sowohl  $\gamma$ -als auch  $\theta$ -Oszillationen, unabhängig von ihrem Induktionsweg. Abgesehen von synaptischen Interaktionen scheinen also auch intrinsische Eigenschaften von Neuronen bei der Aufrechterhaltung von  $\gamma$ - und  $\theta$ -Oszillationen im Hippokampus von Bedeutung zu sein. Diese künstliche Supprimierung der Netzwerkoszillationen durch Modulation der Ionenkanäle steht stellvertretend für sämtliche Pathologien. Beide beruhen auf einer Membranstabilität, die beim Menschen mit eingeschränkten kognitiven Fähigkeiten einhergehen. Somit kann man davon ausgehen, dass die Beschäftigung mit der Identifikation weiterer

Ionenkanäle, bei der Suche nach neuen Medikamenten weiterhin eine große Rolle spielen wird.

## 7 Literaturverzeichnis

Abou-Khalil, B. W. (2004). "Losigamone: Another Novel Drug for Partial Seizures." Epilepsy Curr **4**(2): 61.

Aiken, S. P., B. J. Lampe, et al. (1995). "Reduction of spike frequency adaptation and blockade of M-current in rat CA1 pyramidal neurones by linopirdine (DuP 996), a neurotransmitter release enhancer." Br J Pharmacol **115**(7): 1163-8.

Alonso, A. und R. R. Llinas (1989). "Subthreshold Na<sup>+</sup>-dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer II." Nature **342**(6246): 175-7.

Alzheimer, C., P. C. Schwindt, et al. (1993). "Modal gating of Na<sup>+</sup> channels as a mechanism of persistent Na<sup>+</sup> current in pyramidal neurons from rat and cat sensorimotor cortex." J Neurosci **13**(2): 660-73.

Andersen, P. (1980). "Participating neurones and mechanisms underlying theta activity in unanaesthetized rabbits." Prog Brain Res **54**: 371-80.

Araneda, R. und R. Andrade (1991). "5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub> and 5-hydroxytryptamine 1A receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex." Neuroscience **40**(2): 399-412.

Artemenko, D. P. (1972). "[Participation of hippocampal neurons in the generation of theta waves]." Neirofiziologija **4**(5): 531-9.

Axmacher, N., F. Mormann, et al. (2006). "Memory formation by neuronal synchronization." Brain Res Rev **52**(1): 170-82.

Bartos, M., I. Vida, et al. (2002). "Fast synaptic inhibition promotes synchronized gamma oscillations in hippocampal interneuron networks." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13222-7.

Bartos, M., I. Vida, et al. (2007). "Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks." Nat Rev Neurosci **8**(1): 45-56.

Behr, J., T. Gloveli, et al. (2000). "Dopamine depresses excitatory synaptic transmission onto rat subicular neurons via presynaptic D1-like dopamine receptors." J Neurophysiol **84**(1): 112-9.

Behr, J., T. Gloveli, et al. (2000). "Dopamine depresses polysynaptic inhibition in rat subicular neurons." Brain Res **861**(1): 160-4.

Bialer, M., S. I. Johannessen, et al. (1999). "Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the fourth Eilat conference (EILAT IV)." Epilepsy Res **34**(1): 1-41.

Bilkey, D. K. und U. Heinemann (1999). "Intrinsic theta-frequency membrane potential oscillations in layer III/V perirhinal cortex neurons of the rat." Hippocampus **9**(5): 510-8.

- Borowicz, K. K., Z. Kimber-Trojnar, et al. (2007). "Isobolographic analysis of interactions between losigamone and conventional antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock model." Eur Neuropsychopharmacol **17**(2): 94-101.
- Brown, D. A. und P. R. Adams (1980). "Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K<sup>+</sup> current in a vertebrate neurone." Nature **283**(5748): 673-6.
- Brown, D. A., B. H. Gahwiler, et al. (1990). "Membrane currents in hippocampal neurons." Prog Brain Res **83**: 141-60.
- Buhl, E. H., G. Tamas, et al. (1998). "Cholinergic activation and tonic excitation induce persistent gamma oscillations in mouse somatosensory cortex in vitro." J Physiol **513** ( Pt 1): 117-26.
- Burton, L. A. und C. Harden (1997). "Effect of topiramate on attention." Epilepsy Res **27**(1): 29-32.
- Cantrell, A. R., T. Scheuer, et al. (1999). "Voltage-dependent neuromodulation of Na<sup>+</sup> channels by D1-like dopamine receptors in rat hippocampal neurons." J Neurosci **19**(13): 5301-10.
- Chrobak, J. J. und G. Buzsaki (1998). "Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat." J Neurosci **18**(1): 388-98.
- Crill, W. E. (1996). "Persistent sodium current in mammalian central neurons." Annu Rev Physiol **58**: 349-62.
- Csicsvari, J., B. Jamieson, et al. (2003). "Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat." Neuron **37**(2): 311-22.
- Dedek, K., L. Fusco, et al. (2003). "Neonatal convulsions and epileptic encephalopathy in an Italian family with a missense mutation in the fifth transmembrane region of KCNQ2." Epilepsy Res **54**(1): 21-7.
- Dickson, C. T., J. Magistretti, et al. (2000). "Properties and role of I(h) in the pacing of subthreshold oscillations in entorhinal cortex layer II neurons." J Neurophysiol **83**(5): 2562-79.
- Dietrich, D., H. Clusmann, et al. (1999). "Two electrophysiologically distinct types of granule cells in epileptic human hippocampus." Neuroscience **90**(4): 1197-206.
- Draguhn, A., M. Jungclaus, et al. (1997). "Losigamone decreases spontaneous synaptic activity in cultured hippocampal neurons." Eur J Pharmacol **325**(2-3): 245-51.
- Erchova, I., G. Kreck, et al. (2004). "Dynamics of rat entorhinal cortex layer II and III cells: characteristics of membrane potential resonance at rest predict oscillation properties near threshold." J Physiol **560**(Pt 1): 89-110.
- Fisahn, A. (2005). "Kainate receptors and rhythmic activity in neuronal networks: hippocampal gamma oscillations as a tool." J Physiol **562**(Pt 1): 65-72.
- Fisahn, A., F. G. Pike, et al. (1998). "Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro." Nature **394**(6689): 186-9.

- Frankland, P. W. und B. Bontempi (2005). "The organization of recent and remote memories." Nat Rev Neurosci **6**(2): 119-30.
- French, C. R., P. Sah, et al. (1990). "A voltage-dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons." J Gen Physiol **95**(6): 1139-57.
- Fujita, Y. und T. Sato (1964). "Intracellular Records from Hippocampal Pyramidal Cells in Rabbit during Theta Rhythm Activity." J Neurophysiol **27**: 1012-25.
- Gasparini, S. a. D. F., D. (1997). "Action of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons." Pflügers Arch - Eur J Physiol **435**: 99-106.
- Gebhardt, C., J. M. Breustedt, et al. (2001). "The antiepileptic drug losigamone decreases the persistent Na<sup>+</sup> current in rat hippocampal neurons." Brain Res **920**(1-2): 27-31.
- Gloveli, T., T. Dugladze, et al. (2005). "Orthogonal arrangement of rhythm-generating microcircuits in the hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(37): 13295-300.
- Gu, N., K. Vervaeke, et al. (2005). "Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa<sub>2</sub>/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells." J Physiol **566**(Pt 3): 689-715.
- Haas, J. S. und J. A. White (2002). "Frequency selectivity of layer II stellate cells in the medial entorhinal cortex." J Neurophysiol **88**(5): 2422-9.
- Hajos, N., I. Katona, et al. (2000). "Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations." Eur J Neurosci **12**(9): 3239-49.
- Halliwel, J. V. und P. R. Adams (1982). "Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons." Brain Res **250**(1): 71-92.
- Harris, N. C. und A. Constanti (1995). "Mechanism of block by ZD 7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea pig substantia nigra neurons in vitro." J Neurophysiol **74**(6): 2366-78.
- Hebb, D. (1949). "The Organization of Behaviour." New York: Wiley.
- Hetka, R., C. Rundfeldt, et al. (1999). "Retigabine strongly reduces repetitive firing in rat entorhinal cortex." Eur J Pharmacol **386**(2-3): 165-71.
- Hormuzdi, S. G., I. Pais, et al. (2001). "Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice." Neuron **31**(3): 487-95.
- Hu, H., K. Vervaeke, et al. (2002). "Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na<sup>+</sup> current in rat hippocampal pyramidal cells." J Physiol **545**(Pt 3): 783-805.
- Hu, H., K. Vervaeke, et al. (2007). "M-channels (Kv7/KCNQ channels) that regulate synaptic integration, excitability, and spike pattern of CA1 pyramidal cells are located in the perisomatic region." J Neurosci **27**(8): 1853-67.

Hutcheon, B. und Y. Yarom (2000). "Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons." Trends Neurosci **23**(5): 216-22.

Jouvet, M. (1969). "Biogenic amines and the states of sleep." Science **163**(862): 32-41.

Judge, S. J. und M. E. Hasselmo (2004). "Theta rhythmic stimulation of stratum lacunosum-moleculare in rat hippocampus contributes to associative LTP at a phase offset in stratum radiatum." J Neurophysiol **92**(3): 1615-24.

Kapetanovic, I. M., W. D. Yonekawa, et al. (1995). "The effects of D-23129, a new experimental anticonvulsant drug, on neurotransmitter amino acids in the rat hippocampus in vitro." Epilepsy Res **22**(3): 167-73.

Kapetanovic, I. M. a. R., C. (1996). "D-23129; A New Anticonvulsant Compound." CNS Drug Reviews **2**: 308-321.

Klar, M., R. Surges, et al. (2003). "Ih channels as modulators of presynaptic terminal function: ZD7288 increases NMDA-evoked [3H]-noradrenaline release in rat neocortex slices." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **367**(4): 422-5.

Kocsis, B. und S. Li (2004). "In vivo contribution of h-channels in the septal pacemaker to theta rhythm generation." Eur J Neurosci **20**(8): 2149-58.

Konig, P., A. K. Engel, et al. (1996). "Integrator or coincidence detector? The role of the cortical neuron revisited." Trends Neurosci **19**(4): 130-7.

Konopacki, J., M. B. Maciver, et al. (1987). "Theta in hippocampal slices: relation to synaptic responses of dentate neurons." Brain Res Bull **18**(1): 25-7.

Kubisch, C., B. C. Schroeder, et al. (1999). "KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness." Cell **96**(3): 437-46.

Lamp, I. und Y. Yarom (1997). "Subthreshold oscillations and resonant behavior: two manifestations of the same mechanism." Neuroscience **78**(2): 325-41.

Laurent, G. und H. Davidowitz (1994). "Encoding of Olfactory Information with Oscillating Neural Assemblies." Science **265**(5180): 1872-1875.

Lisman, J. und G. Buzsaki (2008). "A neural coding scheme formed by the combined function of gamma and theta oscillations." Schizophr Bull **34**(5): 974-80.

Lisman, J. E. und M. A. Idiart (1995). "Storage of 7 +/- 2 short-term memories in oscillatory subcycles." Science **267**(5203): 1512-5.

Llinas, R. R. (1988). "The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function." Science **242**(4886): 1654-64.

Ludwig, A., X. Zong, et al. (1998). "A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels." Nature **393**(6685): 587-91.

Luthi, A. und D. A. McCormick (1998). "H-current: properties of a neuronal and network pacemaker." Neuron **21**(1): 9-12.

Maccaferri, G. und C. J. McBain (1996). "The hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons." J Physiol **497 ( Pt 1)**: 119-30.

Maljevic, S., T. V. Wuttke, et al. (2008). "Nervous system KV7 disorders: breakdown of a subthreshold brake." J Physiol **586**(7): 1791-801.

Marshall, L., D. A. Henze, et al. (2002). "Hippocampal pyramidal cell-interneuron spike transmission is frequency dependent and responsible for place modulation of interneuron discharge." J Neurosci **22**(2): RC197.

Meir, A., S. Ginsburg, et al. (1999). "Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release." Physiol Rev **79**(3): 1019-88.

Miceli, F., M. V. Soldovieri, et al. (2008). "Molecular pharmacology and therapeutic potential of neuronal Kv7-modulating drugs." Curr Opin Pharmacol **8**(1): 65-74.

Miltner, W. H., C. Braun, et al. (1999). "Coherence of gamma-band EEG activity as a basis for associative learning." Nature **397**(6718): 434-6.

Mula, M. und M. R. Trimble (2009). "Antiepileptic drug-induced cognitive adverse effects: potential mechanisms and contributing factors." CNS Drugs **23**(2): 121-37.

Murthy, V. N. und E. E. Fetz (1996). "Oscillatory activity in sensorimotor cortex of awake monkeys: synchronization of local field potentials and relation to behavior." J Neurophysiol **76**(6): 3949-67.

Nolan, M. F., G. Malleret, et al. (2004). "A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons." Cell **119**(5): 719-32.

Nunez, P. L. (1996). "Neocortical Dynamics and Human EEG Rhythms." Physics Today **49**(4).

Orban, G., T. Kiss, et al. (2006). "Intrinsic and synaptic mechanisms determining the timing of neuron population activity during hippocampal theta oscillation." J Neurophysiol **96**(6): 2889-904.

Pape, H. C. (1994). "Specific bradycardic agents block the hyperpolarization-activated cation current in central neurons." Neuroscience **59**(2): 363-73.

Pape, H. C. (1996). "Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons." Annu Rev Physiol **58**: 299-327.

Patton, P. E. und B. McNaughton (1995). "Connection matrix of the hippocampal formation: I. The dentate gyrus." Hippocampus **5**(4): 245-86.

Peters, H. C., H. Hu, et al. (2005). "Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior." Nat Neurosci **8**(1): 51-60.

Poschel, B., U. Heinemann, et al. (2003). "High frequency oscillations in the dentate gyrus of rat hippocampal slices induced by tetanic stimulation." Brain Res **959**(2): 320-7.

Puil, E., H. Meiri, et al. (1994). "Resonant behavior and frequency preferences of thalamic neurons." J Neurophysiol **71**(2): 575-82.

Raghavachari, S., M. J. Kahana, et al. (2001). "Gating of human theta oscillations by a working memory task." J Neurosci **21**(9): 3175-83.

Ritz, R. und T. J. Sejnowski (1997). "Synchronous oscillatory activity in sensory systems: new vistas on mechanisms." Curr Opin Neurobiol **7**(4): 536-46.

Rosenkranz, J. A. und D. Johnston (2006). "Dopaminergic regulation of neuronal excitability through modulation of Ih in layer V entorhinal cortex." J Neurosci **26**(12): 3229-44.

Rundfeldt, C. und R. Netzer (2000). "The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits." Neurosci Lett **282**(1-2): 73-6.

Santoro, B., D. T. Liu, et al. (1998). "Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain." Cell **93**(5): 717-29.

Schmitz, D., T. Gloveli, et al. (1998). "Subthreshold membrane potential oscillations in neurons of deep layers of the entorhinal cortex." Neuroscience **85**(4): 999-1004.

Schmitz, D., T. Gloveli, et al. (1995). "Effects of losigamone on synaptic potentials and spike frequency habituation in rat entorhinal cortex and hippocampal CA1 neurones." Neurosci Lett **200**(2): 141-3.

Singer, W. (1993). "Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning." Annu Rev Physiol **55**: 349-74.

Singh, N. A., C. Charlier, et al. (1998). "A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns." Nat Genet **18**(1): 25-9.

Stabel, J., E. Ficker, et al. (1992). "Young CA1 pyramidal cells of rats, but not dentate gyrus granule cells, express a delayed inward rectifying current with properties of IQ." Neurosci Lett **135**(2): 231-4.

Steinlein, O. K. (2002). "Channelopathies can cause epilepsy in man." Eur J Pain **6 Suppl A**: 27-34.

Surmeier, D. J., J. Eberwine, et al. (1992). "Dopamine receptor subtypes colocalize in rat striatonigral neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10178-82.

Tam, S. W. und R. Zaczek (1995). "Linopirdine. A depolarization-activated releaser of transmitters for treatment of dementia." Adv Exp Med Biol **363**: 47-56.

Tatulian, L., P. Delmas, et al. (2001). "Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine." J Neurosci **21**(15): 5535-45.

Traub, R. D., A. Bibbig, et al. (2000). "A model of gamma-frequency network oscillations induced in the rat CA3 region by carbachol in vitro." Eur J Neurosci **12**(11): 4093-106.

Traub, R. D., A. Bibbig, et al. (2004). "Cellular mechanisms of neuronal population oscillations in the hippocampus in vitro." Annu Rev Neurosci **27**: 247-78.

Traub, R. D., M. A. Whittington, et al. (1996). "Analysis of gamma rhythms in the rat hippocampus in vitro and in vivo." J Physiol **493 ( Pt 2)**: 471-84.

van Hooft, J. A., R. Giuffrida, et al. (2000). "Differential expression of group I metabotropic glutamate receptors in functionally distinct hippocampal interneurons." J Neurosci **20**(10): 3544-51.

Vanderwolf, C. H. (1969). "Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **26**(4): 407-18.

Vermeulen, J. und A. P. Aldenkamp (1995). "Cognitive side-effects of chronic antiepileptic drug treatment: a review of 25 years of research." Epilepsy Res **22**(2): 65-95.

Vining, E. P. (1987). "Cognitive dysfunction associated with antiepileptic drug therapy." Epilepsia **28 Suppl 2**: S18-22.

Vreugdenhil, M., E. Bracci, et al. (2005). "Layer-specific pyramidal cell oscillations evoked by tetanic stimulation in the rat hippocampal area CA1 in vitro and in vivo." J Physiol **562**(Pt 1): 149-64.

Wang, Q., M. E. Curran, et al. (1996). "Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias." Nat Genet **12**(1): 17-23.

Weiss, T., R. W. Veh, et al. (2003). "Dopamine depresses cholinergic oscillatory network activity in rat hippocampus." Eur J Neurosci **18**(9): 2573-80.

Whittington, M. A., R. D. Traub, et al. (1995). "Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation." Nature **373**(6515): 612-5.

Wickenden, A. D., J. L. Krajewski, et al. (2008). "N-(6-chloro-pyridin-3-yl)-3,4-difluoro-benzamide (ICA-27243): a novel, selective KCNQ2/Q3 potassium channel activator." Mol Pharmacol **73**(3): 977-86.

Wojtowicz, A. M., L. van den Boom, et al. (2009). "Monoamines block kainate- and carbachol-induced gamma-oscillations but augment stimulus-induced gamma-oscillations in rat hippocampus in vitro." Hippocampus.

Yue, C. und Y. Yaari (2004). "KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons." J Neurosci **24**(19): 4614-24.

---

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

ACSF	artificial cerebrospinal fluid
ADP	afterdepolarization
Aqua dest.	Aqua destillata
BFNS	Benign familial neonatal seizures
CA3/1	Cornu Ammonis 3/1
DA	Dopamin
DG	Gyrus Dentatus
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Entorhinaler Kortex
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
$\gamma$ -Oszillation	Gamma-Oszillation
HFS	hochfrequente Stimulation
KAR	Kainat-Rezeptor
mAChR	muskarinerge Acetylcholin-Rezeptor
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
MPO	Membranpotentialoszillation
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PS	population spike
$\Theta$ -Oszillation	Theta-Oszillation
ZNS	zentrales Nervensystem

## 8.2 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Ihnen, Prof. Dr. Uwe Heinemann. Sie haben mir nicht nur als Doktorvater beigestanden, sondern mir darüberhinaus durch Ihren großen Einsatz eine Tür geöffnet, durch die ich sehr gerne gegangen bin.

Colin, ohne Dich würde ich heute ebenso wenig stehen, wo ich heute stehe (im wahrsten Sinne des Wortes). Ich danke Dir für deine Unterstützung bis zum Schluss.

Agustin, Du wirst als „Leidensgenosse“ von der ersten Stunde an unvergessen für mich bleiben, mit Dir war ich nicht nur doppelt so effektiv, sondern es hat auch doppelt so viel Spaß gemacht.

Anne, Du warst mein zu Fleisch gewordener Geduldengel, ohne Dich hätte es kein störungsfreies Set-up und somit keine Doktorarbeit gegeben. Ich danke Dir aufrichtig für Deine Unterstützung und Deinen scharfen Blick für Details.

Dr. Herbert Siegmund und Dr. Hans-Jürgen Gabriel, Ihnen danke ich für Ihren Sinn für Kniffliges und Ihr Vermögen dieses zu lösen. In allen Hard- und Software Angelegenheiten waren Sie bis zum Schluß unersetzlich.

Vielen Dank an das Graduiertenkolleg 1123 für das umfangreiche Weiterbildungsangebot und die monetäre Unterstützung.

Christine, meinen Platz vis-à-vis von Dir gebe ich nur ungerne auf. Du warst das gute Klima und offene Ohr in unserem Büro. Außerdem verstehst Du es, Etappenziele zu feiern und hast mir verlockende Anreize zur richtigen Zeit gesetzt.

Christoph und Anna, ohne Euch wäre das Großraumlabor nur irgendein Labor gewesen.

Frau Frosinski, Sie sind die zuverlässigste, organisierteste, sympathischste allround Sekretärin die es gibt.

Bei allen anderen Kollegen und Mitarbeitern im Vorder- und Hintergrund möchte ich mich für die reibungslose Zusammenarbeit, den fachlichen Austausch, ihre Hilfe und ihren Beitrag zum freundlichen Klima im Institut herzlich bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern dafür bedanken, dass sie mir den Rücken freigehalten haben, meinem Studium und meiner Doktorarbeit sorgenfrei und unbeschwert nachgehen zu können.

### **8.3 Tabellarischer Lebenslauf**

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

#### **8.4 Publikationsliste**

Boehlen, A., Kunert, A., Heinemann, U.

“Effects of XE991, retigabine, losigamone and ZD7288 on kainate-induced theta-like and gamma network oscillations in the rat hippocampus *in vitro*”  
Brain Research (akzeptiert am 9.08.2009)

## **8.5 Selbständigkeitserklärung**

„Ich, Alexandra Kunert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Beteiligung intrinsischer Eigenschaften von Neuronen an Netzwerkoszillationen im Hippokampus selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 13.08.2009

Alexandra Kunert