

Aus dem
Charité Centrum 2 für Grundlagenmedizin
Institut für Neurophysiologie
Direktor: Professor Dr. med. Uwe Heinemann

Habilitationsschrift

Funktionen der Mitochondrien bei neuronaler Aktivität im Hippocampus der Ratte und des Menschen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach **Physiologie**

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Oliver Kann

geboren am 13.10.1971 in Homberg/Efze

Eingereicht:	Juni 2008
Dekan:	Professor Dr. med. Martin Paul
1. Gutachter:	<u>Prof. Dr. A. Konnerth</u>
2. Gutachter:	<u>Jun.-Prof. Dr. M. Müller</u>

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1.	Nervenzellen, Energiehaushalt und Mitochondrien	Seite 03
1.2.	Temporallappen-Epilepsie und Mitochondrien	Seite 06
2.	Ergebnisse	
2.1.	Erste Publikation: Etablierung der Methoden	Seite 08
2.2.	Zweite Publikation: Kopplung von neuronaler Aktivität und mitochondrialem Energiemetabolismus	Seite 19
2.3.	Dritte Publikation: Metabotrope Rezeptoren und neurometabolische Kopplung	Seite 34
2.4.	Vierte Publikation: Neuronale Netzwerkaktivitäten und mitochondrialer Energiemetabolismus	Seite 44
2.5.	Fünfte Publikation: Zellschädigung durch freie Radikale bei <i>status epilepticus</i>	Seite 55
2.6.	Sechste Publikation: Mitochondrienfunktionen bei epileptiformer neuronaler Aktivität	Seite 66
2.7.	Siebte Publikation: Metabolische Dysfunktion bei Ratten und Menschen mit Epilepsie	Seite 77
3.	Diskussion	
3.1.	Feinabstimmung der neurometabolischen Kopplung im physiologischen Bereich	Seite 90
3.2.	$[Ca^{2+}]_m$ -Transienten als Integrationssignal bei neurometabolischer Kopplung	Seite 92
3.3.	Komplexe neuronale Netzwerkaktivität, pO_2 und mitochondrialer Redox-Status	Seite 93
3.4.	Mitochondriale Dysfunktionen bei Epilepsie	Seite 95
3.5.	Ausblick	Seite 98
4.	Literatur	Seite 99
5.	Abkürzungen	Seite 107
6.	Zusammenfassung	Seite 108

1. Einleitung

1.1. Nervenzellen, Energiehaushalt und Mitochondrien

Das zentrale Nervensystem (ZNS) zeichnet sich durch einen außerordentlich hohen Energieumsatz aus: Unter Ruhebedingungen werden ca. 20% des inspirierten Sauerstoffs (O_2) durch Zellatmung (oxidative Phosphorylierung; oxidativer mitochondrialer Energiemetabolismus) verbraucht, wobei das Hirngewicht nur ca. 2% des Körpergewichts ausmacht (Erecinska und Silver, 2001). Die Ursache für den hohen Energieumsatz des ZNS ist in den sehr komplexen Leistungen von Neuronen zu sehen, die als hoch differenzierte Zellen große Mengen an Adenosintriphosphat (ATP) zur Aufrechterhaltung von Ionengradienten an der Zellmembran und für Neurotransmission benötigen (Attwell und Iadecola, 2002). Neuronale Aktivität führt in erster Linie zum Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen in das Cytosol und zum Ausstrom von K^+ -Ionen in den Extrazellularraum (Heinemann und Lux, 1975; Dietzel et al., 1982). Um die neuronale Erregbarkeit aufrechtzuerhalten, werden Transportprozesse für Ionen an Zellmembran (Na^+/K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase) und endoplasmatischen Retikulum (Ca^{2+} -ATPase) aktiviert. Diese Prozesse benötigen Energie in Form von ATP. Da über 90% des neuronalen ATP in Mitochondrien durch oxidative Phosphorylierung gebildet werden, sind Neurone essentiell auf intakte Mitochondrienfunktionen (neurometabolische Kopplung) beziehungsweise auf hinreichende Versorgung mit Glukose und O_2 (neurovaskuläre Kopplung) angewiesen (Villringer und Dirnagl, 1995; Erecinska und Silver, 2001). Umgekehrt führen Beeinträchtigungen der Funktionen von Mitochondrien, beispielsweise durch mitochondriale Enzymschädigung oder regionale Minderdurchblutung von Hirngewebe, zu drastischen funktionellen Störungen individueller Neurone und neuronaler Netzwerke. Funktionelle Störungen können insbesondere die hochkomplexen Leistungen des ZNS wie Lernen und Gedächtnisbildung oder die Bewußtseinslage empfindlich beeinträchtigen (Rossen et al., 1943; Hirsch et al., 1957; Buzsáki und Draguhn, 2004).

Die Nervenzelltypen des ZNS unterscheiden sich im Hinblick auf Morphologie, intrinsische elektrophysiologische Eigenschaften, Freisetzung von Neurotransmittern

und Funktionen innerhalb des jeweiligen neuronalen Netzwerks (Creutzfeldt, 1983; Llinás, 1988; Somogyi und Klausberger, 2005). So beträgt beispielsweise bei Netzwerkoszillationen im Gamma-Bereich (30-80 Hz) im Hippocampus die Frequenz von Aktionspotentialen 1-5 Hz in exzitatorischen Pyramidenzellen, bei bestimmten inhibitorischen Interneuronen sogar über 40 Hz (Bartos et al., 2007). Strukturelle und funktionelle Heterogenität ist aber auch kennzeichnend für die dendritischen, somatischen, axonalen und präsynaptischen Segmente individueller Neurone, was lokal zu sehr unterschiedlichen Energiebedürfnissen in einer Nervenzelle führt (Attwell und Iadecola, 2002). Dieser Aspekt zeigt sich möglicherweise auch anhand der neuronalen Mitochondrien, die sich hinsichtlich Form, Größe, Verteilung und biochemischen Eigenschaften unterscheiden (Wong-Riley, 1989; Popov et al., 2005; Chan, 2006). Die Heterogenität neuronaler Mitochondrien und ihre Bedeutung für die komplexen Leistungen individueller Nervenzellen und neuronaler Netzwerke ist bisher jedoch kaum erforscht.

Die Gewinnung von ATP in neuronalen Mitochondrien erfordert hauptsächlich Pyruvat, das ein Produkt der im Cytosol lokalisierten Enzyme der Glykolyse und potentiell der Laktatdehydrogenase-1 ist (Chih et al., 2001). Pyruvat wird über eine Transferase in die mitochondriale Matrix aufgenommen und am Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex verstoffwechselt, als Zwischenprodukt entsteht Acetyl-CoA. Die Acetylgruppe wird durch Enzyme des Citratzyklus (Krebs-Szent-Györgyi Zyklus) unter gleichzeitiger Reduktion von Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD^+) und Flavin-adenin-dinucleotid (FAD) zu CO_2 oxidiert. Die reduzierten Dinucleotide (NADH , FADH_2) dienen dem Energietransfer zur Elektronentransportkette und werden an den Komplexen I und II rückoxidiert. Aus den nachfolgenden Reaktionen (Elektronen- und Protonentransfer) resultieren ein pH-Gradient und eine Potentialdifferenz an der inneren Mitochondrienmembran ($\Delta\Psi_m$) von -150 bis -180 mV (negativ in Bezug auf das Cytosol), und es wird H_2O gebildet. Die Parameter ΔpH und $\Delta\Psi_m$ stellen die treibenden Kräfte für Protonen und Ionen wie Ca^{2+} zum Wiedereintritt in die Mitochondrienmatrix dar. Protonen treiben die F_1F_0 -ATP-Synthase (Komplex V) an, wodurch ATP entsteht. Ca^{2+} -Ionen werden über den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter aufgenommen und über Ionen-Austauscher

wieder abgegeben. Unter anaeroben Bedingungen werden pro Molekül Glukose nur 2 Moleküle ATP gebildet; unter aeroben Bedingungen, wenn der mitochondriale Citratzyklus voll aktiv und ausreichend O_2 vorhanden ist, jedoch potentiell bis zu 38 Moleküle ATP (Duchen, 1999; Voet et al., 2002).

Die hohen und lokal unterschiedlichen Energiebedürfnisse in Nervenzellen erfordern eine enge Kopplung von neuronaler Aktivität und mitochondrialem Energiemetabolismus (neurometabolische Kopplung). Das gegenwärtige Konzept für die Regulation des mitochondrialen Energiemetabolismus basiert in erster Linie auf Studien mit isolierten Mitochondrien beziehungsweise mitochondrialen Enzymen und läßt der Änderung der Verhältnisse von ATP/ADP, Acetyl-CoA/CoA und NADH/NAD⁺ sowie mitochondrialen Ca^{2+} -Ionen besondere Bedeutung zukommen. Für Ca^{2+} -Ionen im nanomolaren bis mikromolaren Konzentrationsbereich wurde gezeigt, daß sie die Aktivität von Enzymen des Citratzyklus beeinflussen können (Hansford und Zorov, 1998).

Der erste Teil der vorliegenden Habilitationsschrift befaßt sich mit der Frage, welche Bedeutung transiente Erhöhungen der Konzentration von Ca^{2+} -Ionen in Cytosol ($[Ca^{2+}]_c$) und in der Mitochondrienmatrix ($[Ca^{2+}]_m$) für die Regulierung des mitochondrialen Energiemetabolismus während der Aktivität von intakten Nervenzellen des ZNS haben. Hierzu wurden elektrophysiologische Methoden mit Fluoreszenztechniken kombiniert, auf ihre Anwendbarkeit in lebendigen, komplexen Hirnschnittpräparaten des Hippocampus getestet (erste Publikation; Schuchmann et al., 2001) und im weiteren für Untersuchungen im physiologischen Aktivitätsbereich von Nervenzellen angewendet (zweite und dritte Publikation; Kann et al., 2003a, 2003b). Die anschließende Publikation (vierte Publikation; Huchzermeyer et al., 2008) befaßt sich mit der Frage, welche Bedeutung der interstitielle Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und damit der mitochondriale oxidative Energiemetabolismus für die Entstehung von komplexen neuronalen Netzwerkaktivitäten wie Gamma-Oszillationen (30-80 Hz) hat.

1.2. Temporallappen-Epilepsie und Mitochondrien

Epilepsie des Temporallappens ist eine häufige Form der fokalen Epilepsien, die bei vielen Patienten mit den gängigen Antiepileptika nicht ausreichend zu therapieren ist. Bei einigen Patienten scheint die Temporallappen-Epilepsie sogar einen progressiven Verlauf zu nehmen (Pitkänen und Sutula, 2002). Lediglich eine kleine, nach strengen Kriterien ausgewählte Gruppe von pharmakoresistenten Patienten profitiert von der Resektion epileptogenen Gewebes aus Temporallappen und Hippocampus (Engel, 2001; Wiebe et al., 2001). Meistens stellen jedoch Anfallshäufigkeit und Dauer der Erkrankung, die zum Teil über Jahrzehnte verläuft, außerordentliche physische, psychische und soziale Belastungen für Patienten und Angehörige dar. Ebenso ergeben sich für das Gesundheitssystem erhebliche Kosten. Daher ist die weitere Aufklärung der pathologischen Mechanismen bei Epilepsie beziehungsweise der Epileptogenese dringend geboten. Histopathologisch zeigt das Gewebe der Patienten teilweise dramatische Nervenzellverluste und Astrogliose in bestimmten Regionen des Hippocampus, beispielsweise in der CA1-Region ("Ammonshorn-Sklerose") (Sommer, 1880; Wyler et al., 1992). Diese histopathologischen Veränderungen werden auch in Pilocarpin-behandelten, chronisch epileptischen Ratten gefunden (Cavalheiro et al., 1991; Lehmann et al., 2001). Daher werden Pilocarpin-behandelte Ratten als klassisches Modell für die experimentelle Erforschung der Epileptogenese beziehungsweise der Pathogenese bei Temporallappen-Epilepsie genutzt. In anderen Studien sind weiterhin Reorganisationsphänomene in neuronalen Netzwerken (Sutula et al., 1989) und Veränderungen von Rezeptoren beziehungsweise Ionenkanälen (Avanzini und Franceschetti, 2003) beschrieben worden. Dies könnte die erhöhte Erregbarkeit in epileptogenem Gewebe bedingen. Es ist bisher jedoch weitgehend ungeklärt, welche Schadensmechanismen bei häufig rezidivierenden epileptischen Anfällen (oder *status epilepticus*) zu den oben erwähnten, strukturellen und funktionellen Veränderungen und zu neuronalem Zelltod führen.

Eine wesentliche Bedeutung könnte dabei den Mitochondrien der Nervenzellen zukommen. Dafür sprechen folgende Fakten beziehungsweise Befunde: Erstens, Mitochondrien sind die primäre Energiequelle für Nervenzellen (Erecinska und Silver,

2001). Zweitens, neuronale Aktivität und Mitochondrienfunktionen sind eng gekoppelt (2. und 3. Publikation; Kann et al., 2003a, 2003b). Drittens, zellschädigende, freie Sauerstoffradikale wie das Superoxid-Anion entstehen hauptsächlich an Komplex I und an der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase in Mitochondrien (Adam-Vizi und Chinopoulos, 2006). Viertens, die mitochondriale DNS befindet sich unmittelbar am Entstehungsort freier Radikale und kodiert wesentliche Enzyme des Energiemetabolismus. Fünftens, Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle bei der Auslösung von programmiertem Zelltod (Apoptose) (Dawson und Dawson, 2004).

Der zweite Teil der vorliegenden Habilitationsschrift befaßt sich daher mit der Frage, welche Bedeutung den Funktionen beziehungsweise möglichen Dysfunktionen neuronaler Mitochondrien bei den Schadensmechanismen während und nach epileptischen Anfällen (oder *status epilepticus*) zukommt. Für diese Studien wurden komplexe Hirnschnittpräparate von gesunden Ratten, Pilocarpin-behandelten, chronisch epileptischen Ratten und von Patienten nach partieller, unilateraler Resektion des Hippocampus verwendet. Die Tierversuche wurden vom Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt (G 0328/98, G 0024/04), für die *in vitro* Untersuchungen von Resektionsgewebe von Patienten mit Temporallappen-Epilepsie lag die Zustimmung der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin (EA125/2001, EA1/042/04) vor. Das Gewebe von Ratten und Menschen wurde mit histologischen Färbungen, elektrophysiologischen Methoden und Fluoreszenztechniken untersucht. Zunächst wurden in einem Akutmodell zum *status epilepticus* die Auswirkungen der engen neurometabolischen Kopplung im Hinblick auf Parameter wie $[Ca^{2+}]_m$, mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$), Energiemetabolismus, Bildung freier Radikale und neuronalen Zelltod untersucht (fünfte und sechste Publikation, Kovács et al., 2002 und 2005). Wesentliche Befunde aus diesen beiden Studien konnten dann an lebendigem Gewebe aus dem Tiermodell und von Patienten mit Temporallappen-Epilepsie verifiziert werden (siebte Publikation, Kann et al., 2005).

2. Ergebnisse

2.1. Erste Publikation: Etablierung der Methoden

Schuchmann S, Kovacs R, Kann O, Heinemann U, Buchheim K. **Monitoring NAD(P)H autofluorescence to assess mitochondrial metabolic functions in rat hippocampal-entorhinal cortex slices.** Brain Res Brain Res Protoc 2001; 7: 267-76.

In dieser Arbeit wurden Methoden etabliert, um die Interaktionen von neuronaler Aktivität und mitochondrialem Energiemetabolismus in lebendigen Hirnschnittpräparaten untersuchen zu können. Als Präparat dienten akute Hirnschnitte von Hippocampus und entorhinalen Kortex der Ratte, die häufig für Studien von neurophysiologischen Prozessen und für Epilepsiemodelle genutzt werden (Mody et al., 1987; Schmitz et al., 2000). Für den experimentellen Ansatz ist von besonderem Interesse, daß die oben erwähnten, dem Energietransfer dienenden Dinucleotide je nach Redox-Status eine Zunahme ihrer Fluoreszenzintensität zeigen (NADH und NADPH [im folgenden: NAD(P)H] in reduzierter Form, FAD in oxidierte Form). Weiterhin sind die Dinucleotide vorwiegend in Mitochondrien lokalisiert. Die experimentelle Anwendung von NAD(P)H-Fluoreszenz war schon für isolierte Nervenzellen beschrieben worden (Duchen, 1992). Uns gelangt es in Hirnschnittpräparaten, Änderungen der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität (NAD(P)H-Transienten) während Stimulus-evozierter Erhöhung neuronaler Aktivität zu detektieren und dabei größere Gewebeschädigungen durch das Anregungslicht im UV-Bereich zu vermeiden. Dazu wurden die Fluoreszenzmessungen mit elektrophysiologischen Techniken (lokale Feldpotentiale, Änderungen der extrazellulären K^+ -Ionen Konzentration; $[K^+]_o$) kombiniert, um Art und Grad der neuronalen Aktivität einschätzen und quantifizieren zu können. Somit wurden erste Voraussetzungen geschaffen, um neurometabolische Kopplung während neuronaler Aktivität im physiologischen und pathologischen Bereich mit schneller zeitlicher Auflösung in komplexen Hirnschnittpräparaten visualisieren und untersuchen zu können.

2.2. Zweite Publikation: Kopplung von neuronaler Aktivität und mitochondrialem Energiemetabolismus

Kann O, Schuchmann S, Buchheim K, Heinemann U. **Coupling of neuronal activity and mitochondrial metabolism as revealed by NAD(P)H fluorescence signals in organotypic hippocampal slice cultures of the rat.** Neuroscience 2003a; 119: 87-100.

In dieser Arbeit wurde die Kopplung von neuronaler Aktivität, transienten Erhöhungen von $[Ca^{2+}]_c$ und $[Ca^{2+}]_m$ (im folgenden auch: "Transienten") und mitochondrialem Energiemetabolismus näher charakterisiert. Hierzu wurden die oben genannten Methoden erweitert (Verwendung von speziellen Ca^{2+} -Ionen Indikatoren für Cytosol und Mitochondrienmatrix) und die Fluoreszenz-Messbedingungen optimiert (Verwendung von organotypischen hippocampalen Hirnschnittkulturen). Die Erhöhung neuronaler Aktivität wurde durch repetitive elektrische Stimulation (in der Regel für 10 s bei 20 Hz) erreicht und auf ein physiologisches Maß beschränkt. Dazu diente als Kontroll-Parameter die simultane elektrophysiologische Messung von transienten, aktivitätsabhängigen Erhöhungen der $[K^+]_o$ von weniger als 3 mM während der Stimulation; $[K^+]_o$ -Transienten in diesem Bereich waren zuvor in Rückenmark und Kortex *in vivo* während physiologischer Stimuli gemessen worden (Heinemann et al., 1990; Amzica und Steriade, 2000). Pathologische neuronale Aktivität wie bei epileptischen Anfällen oder *spreading depression* führt zu vielfach höheren Anstiegen der $[K^+]_o$ (Dreier et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, daß zwischen erhöhter neuronaler Aktivität und mitochondrialem Energiemetabolismus (NAD(P)H-Transienten) eine enge zeitliche und quantitativ positive Korrelation besteht, die wesentlich über transiente Erhöhungen von $[Ca^{2+}]_c$ und $[Ca^{2+}]_m$ (letztere über den mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter) vermittelt ist. Diese neurometabolische Kopplung erfolgt sehr rasch im Bereich von wenigen hundert Millisekunden. Somit spielen neben Substraten (ATP/ADP, Acetyl-CoA/CoA und NADH/NAD⁺) auch $[Ca^{2+}]_m$ -Transienten eine wesentliche Rolle bei der neurometabolische Kopplung, möglicherweise im Sinne eines schnellen Integrationssignals und zur Feinabstimmung.

2.3. Dritte Publikation: Metabotrope Rezeptoren und neurometabolische Kopplung

Kann O, Kovács R, Heinemann U. **Metabotropic receptor-mediated Ca^{2+} signaling elevates mitochondrial Ca^{2+} and stimulates oxidative metabolism in hippocampal slice cultures.** J Neurophysiol 2003b; 90: 613-21.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von metabotropen Rezeptoren bei neurometabolischer Kopplung näher untersucht. Es wurde insbesondere der Frage nachgegangen, ob Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern ausreicht, um transiente Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_m$ und damit eine Stimulierung des mitochondrialen Energiemetabolismus auszulösen. Prinzipiell kann die Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol von Nervenzellen über mehrere Mechanismen erhöht werden, beispielsweise durch Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran (spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, ionotrope Rezeptoren etc) und durch Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern (endoplasmatisches Retikulum). Da bei elektrischer Stimulation von Hirnschnittpräparaten eine Vielzahl von Spannungs- und Liganden-gesteuerten Kanälen aktiviert werden (siehe vorherige Publikation), wurden hier selektive Agonisten für unterschiedliche Subtypen von metabotropen Rezeptoren verwendet, die über G-Proteine und Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP_3) mit der intrazellulären Ca^{2+} -Kaskade gekoppelt sind. Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung von glutamatergen, serotonergen und muscarinischen Rezeptoren selbst im niedrigen Konzentrationsbereich zu transienten Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_m$ und einer Stimulation des mitochondrialen Energiemetabolismus (NAD(P)H-Transienten) führt. Mit Hilfe von Ca^{2+} -freier extrazellulärer Lösung ließ sich zudem demonstrieren, daß IP_3 -vermittelte und Ca^{2+} -Ionen-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus den Speichern sowie kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom ausreichen, um die genannten Effekte zu erzielen. Somit können selbst Ca^{2+} -Transienten, die durch Aktivierung metabotroper Rezeptoren ausgelöst worden sind, von Mitochondrien erfaßt werden. Ca^{2+} -Transienten in Cytosol und Mitochondrienmatrix spielen daher eine wesentliche Rolle bei der Regulation des mitochondrialen Energiemetabolismus in Neuronen und sind Bestandteil der neurometabolischen Kopplung.

2.4. Vierte Publikation: Neuronale Netzwerkaktivitäten und mitochondrialer Energiemetabolismus

Huchzermeyer C, Albus K, Gabriel HJ, Otáhal J, Taubenberger N, Heinemann U, Kovács R, Kann O. **Gamma oscillations and spontaneous network activity in the hippocampus are highly sensitive to decreases in pO₂ and concomitant changes in mitochondrial redox state.** J Neurosci 2008; 28: 1153-62.

In den ersten Arbeiten war neuronale Aktivität in Hirnschnittpräparaten durch moderate elektrische Stimulation oder Applikation von Neurotransmittern induziert worden. Jedoch sind solche Stimuli vergleichsweise artifiziell, denn bei Netzwerkaktivitäten *in vivo* interagieren exzitatorische und inhibitorische Neurone in präziser Abstimmung als funktionelle Ensembles. So treten bei bestimmten Verhaltensformen der Ratte sogenannte Gamma-Oszillationen (30-80 Hz) im Hippocampus auf (Csicsvari et al., 2003), die wahrscheinlich eine temporäre Matrix zur Verarbeitung sensorischer Information und zur Gedächtnisbildung darstellen. In der folgenden Arbeit wurde die Bedeutung von mitochondrialem Energiemetabolismus und interstitiellem Sauerstoffpartialdruck (pO₂) für die Entstehung von komplexen neuronalen Netzwerkaktivitäten untersucht. Dazu wurden Messungen der NAD(P)H-Fluoreszenz und der für Mitochondrien noch spezifischeren FAD-Fluoreszenz (Kunz und Kunz, 1985; Huang et al., 2002) fast zeitgleich mit hoher räumlicher Auflösung durchgeführt und neuartige O₂-Mikrosensoren verwendet. Es konnte gezeigt werden, daß Gamma-Oszillationen und neuronale Spontanaktivität im Hippocampus weitaus empfindlicher gegenüber einer Absenkung des pO₂ im normoxischen Bereich sind als elektrisch evozierte Potentialänderungen. Es wurde nachgewiesen, daß pO₂ und mitochondrialer Redox-Status eng gekoppelt sind und daß es bei einem interstitiellen pO₂ von weniger als 41 mmHg während neuronaler Aktivierung zu einer deutlichen Einschränkung der oxidativen Kapazität der Mitochondrien kommt. Die Einschränkung der oxidativen Kapazität zeigte sich insbesondere im Bereich der Synapsen (*stratum radiatum*). Diese Studie ist eine der ersten, die die essentielle Bedeutung intakter Mitochondrienfunktionen für komplexe neuronale Netzwerkaktivitäten wie Gamma-Oszillationen herausgearbeitet hat.

2.5. Fünfte Publikation: Zellschädigung durch freie Radikale bei *status epilepticus*

Kovács R, Schuchmann S, Gabriel S, Kann O, Kardos J, Heinemann U. **Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slice cultures.** J Neurophysiol 2002; 88:2909-18.

In dieser Arbeit wurden die Schadenskaskaden näher untersucht, die bei *status epilepticus* zu neuronalem Zelltod führen. Hierzu wurde das sogenannte "niedrig Mg^{2+} -Modell" in Hirnschnittpräparaten verwendet, bei dem durch Herabsetzung der extrazellulären Mg^{2+} -Ionen Konzentration die Erregbarkeit im Gewebe stark erhöht ist (Entfernung des Mg^{2+} -Ionen-Blocks aus der Kanalpore von Glutamatrezeptoren [NMDA-Subtyp]; Mody et al., 1987). Dabei kommt es spontan oder nach kurzer elektrischer Stimulation zu Phasen synchroner Entladungen von Neuronenverbänden (iktale Aktivität, *seizure-like events*). Es konnte gezeigt werden, daß wiederkehrende *seizure-like events* zu mitochondrialer Dysfunktion führen. Dies ließ sich beispielsweise anhand der Abnahme mitochondrialer Ca^{2+} -Akkumulation und mitochondrialer Membran-Depolarisation sowie der Beeinträchtigung des Energiemetabolismus (abnormal veränderte NAD(P)H-Transienten) bei gleichzeitiger Zunahme der Produktion freier Sauerstoffradikale (ROS) belegen. Die beschriebenen Veränderungen gingen mit erhöhtem neuronalen Zelltod in den Hirnschnittpräparaten einher. Interessanterweise traten mitochondriale Dysfunktion und neuronaler Zelltod deutlich weniger in Anwesenheit von α -Tocopherol (Vitamin E) auf. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß es bei *status epilepticus* zu mitochondrialer Dysfunktion kommt, die insbesondere mit erhöhter Produktion von ROS einhergeht. ROS, wie das Superoxid-Anion, reagieren unter anderem mit intrinsischem Stickstoffmonoxid (NO); toxische Reaktionsprodukte wie Peroxynitrit können zu massiven Schädigungen von Ionenkanälen, Enzymen und DNS einer Nervenzelle sowie subzellulär von Mitochondrien führen und damit eine chronische Gewebsschädigung verursachen.

2.6. Sechste Publikation: Mitochondrienfunktionen bei epileptiformer neuronaler Aktivität

Kovács R, Kardos J, Heinemann U, Kann O. **Mitochondrial calcium ion and membrane potential transients follow the pattern of epileptiform discharges in hippocampal slice cultures.** J Neurosci. 2005 Apr 27;25(17):4260-9.

Die vorangegangenen Arbeiten legten nahe, daß Mitochondrien durch Ca^{2+} -Aufnahme und die Produktion von ROS eine bedeutende Rolle für neuronalen Zelltod bei *status epilepticus* spielen. Die verwendeten Techniken erlaubten jedoch keine räumliche Analyse von dynamischen mitochondrialen Parametern in den unterschiedlichen Segmenten einer Nervenzelle wie Dendriten und Zellkörper. In der folgenden Arbeit wurden daher die Funktionen von Mitochondrien während neuronaler Aktivität mit räumlich hochauflösender, konfokaler Fluoreszenzmikroskopie näher untersucht. Hierzu wurde erneut das "niedrig Mg^{2+} -Modell" in Hirnschnittpräparaten verwendet, bei dem insbesondere zwei Formen von experimenteller "epileptiformer" Aktivität elektrophysiologisch unterschieden werden können – iktale (*seizure-like events*) und inter-iktale neuronale Aktivität. Es konnte gezeigt werden, daß inter-iktale Aktivität nur in vereinzelt Mitochondrien zu Membran-Depolarisation führt, und zwar in den Dendriten. *Seizure-like events* hingegen verursachten massive und synchrone Membran-Depolarisation in dendritischen und somatischen Mitochondrien. Mit Hilfe von Mitochondrien-spezifischer Pharmakologie und speziellen Methoden zur Bildanalyse wurde nachgewiesen, daß die mitochondrialen Depolarisationen durch wechselnde Ca^{2+} -Aufnahme und -Abgabe der Mitochondrien (*Ca^{2+} cycling*) bedingt sind. Damit könnte eine pathologische neuronale Ca^{2+} -Akkumulation während epileptischer Aktivität zu verstärktem mitochondrialem *Ca^{2+} cycling*, Membran-Depolarisation und Veränderung des Verhältnisses NADH/NAD^+ in der Mehrzahl der Mitochondrien führen und somit die erhöhte Produktion von ROS und kritischen ATP-Mangel lokal in einer Nervenzelle begünstigen. Diese Schadenskaskade könnte insbesondere dann gravierende Folgen haben, wenn sie synchron in unterschiedlichen neuronalen Segmenten abläuft.

2.7. Siebte Publikation: Metabolische Dysfunktion bei Ratten und Menschen mit Epilepsie

Kann O, Kovács R, Njunting M, Behrens CJ, Otáhal J, Lehmann TN, Gabriel S, Heinemann U. **Metabolic dysfunction during neuronal activation in the ex vivo hippocampus from chronic epileptic rats and humans.** Brain. 2005 Oct;128(Pt 10):2396-407.

In der fünften Publikation wurde in einem Akutmodell zum *status epilepticus* beschrieben, daß wiederholte *seizure-like events* mit einer dramatischen Veränderung von NAD(P)H-Transienten einhergingen. Dieser Befund wies auf die Entwicklung von metabolischer Dysfunktion während eines *status epilepticus* hin. Interessanterweise zeigen auch Studien mit funktioneller Bildgebung an Epilepsiepatienten eine relative Abnahme des Glukoseverbrauchs ("Hypometabolismus") in den Entstehungsherden von epileptischen Anfällen und angrenzenden Hirnstrukturen (Casse et al., 2002). In der folgenden Arbeit wurden diese Aspekte an lebendigem hippocampalem Gewebe von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappen-Epilepsie weiter untersucht. Da für die Untersuchungen *per se* kein Kontrollgewebe von gesunden Menschen zur Verfügung steht, wurden die erhobenen Befunde mit Daten aus einem Tiermodell (Pilocarpin-behandelte, chronisch-epileptische und gesunde Ratten) in Beziehung gesetzt. Für chronisch-epileptische Ratten konnte gezeigt werden, daß während neuronaler Aktivierung eine metabolische Dysfunktion spezifisch in der CA1-Region des Hippocampus vorliegt. Dieser Befund war noch eindrücklicher in hippocampalem Gewebe der Patienten, wobei die Präparate mit Ammonshorn-Sklerose (AHS) tendenziell stärker betroffen waren als die ohne Sklerose (nAHS). Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ergaben sich Hinweise, daß individuelle neuronale Mitochondrien in AHS-Gewebe dennoch über ein negatives Membranpotential verfügen. Damit wurde ein zelluläres Korrelat für Hypometabolismus bei Epilepsie nachgewiesen, der partiell durch mitochondriale Enzymdefekte verursacht sein könnte.

3. Diskussion

In den dargelegten Studien wurden Funktionen der Mitochondrien bei neuronaler Aktivität unter physiologischen und pathologischen Bedingungen im Hippocampus der Ratte und des Menschen untersucht. Die Ergebnisse legen im Kern folgende Schlußfolgerungen nahe: Erstens, es existiert eine Feinabstimmung von mitochondrialem Energiemetabolismus und neuronaler Aktivität im physiologischen Bereich (neurometabolische Kopplung). Zweitens, bei dieser neurometabolischen Kopplung stellen schnelle transiente Erhöhungen von $[Ca^{2+}]_m$ ein wesentliches Integrationssignal dar. Drittens, komplexe neuronale Netzwerkaktivität ist besonders empfindlich gegenüber Absenkungen des pO_2 und den damit einhergehenden Veränderungen des mitochondrialen Redox-Status. Viertens, unter pathologischen Bedingungen, beispielsweise bei Epilepsie, kann es zu akuten und chronischen Funktionsstörungen der Mitochondrien kommen. Diese Funktionsstörungen sind zum Teil Ca^{2+} -vermittelt und gehen mit mitochondrialer Membran-Depolarisation, Produktion von ROS und metabolischer Dysfunktion einher.

3.1. Feinabstimmung der neurometabolischen Kopplung im physiologischen Bereich

Die dynamischen Änderungen von intrinsischer NAD(P)H- und FAD-Fluoreszenz während neuronaler Aktivität sind primär Ausdruck von Veränderungen im mitochondrialen Redox-Status und gelten als die Standardmethode zur direkten experimentellen Untersuchung von neurometabolischer Kopplung (Mayevsky und Chance, 2007; Kann und Kovács, 2007). Die Erhöhung von neuronaler Aktivität, beispielsweise durch elektrische Stimulation, Applikation von Neurotransmittern oder pharmakologische Auslösung von epileptischen Anfällen, führt in isolierten Nervenzellen, komplexen Hirnschnittpräparaten und im Kortex *in vivo* zu charakteristischen biphasischen NAD(P)H-Transienten (Mayevsky und Chance, 1975; Duchon, 1992; Kann et al., 2003a,b und 2005 [zweite, dritte und siebte Publikation]). Das Verhältnis zwischen initialer Abfallskomponente (*dip*, Zunahme der Oxidation) und nachfolgender Anstiegskomponente (*overshoot*) der NAD(P)H-

Fluoreszenz (biphasische Transienten) variiert zwar in Abhängigkeit von Faktoren wie der Art des Präparates, der untersuchten Hirnregion, der Höhe des interstitiellen pO_2 usw. Diese Aspekte sind an anderer Stelle detailliert diskutiert worden (Mayevsky und Chance, 2007; Kann und Kovács, 2007; Turner et al., 2007). Für unterschiedliche Präparate wurden jedoch enge zeitliche, positive Korrelationen zwischen neuronalem Aktivierungsgrad und den Amplituden der NAD(P)H-Transienten beschrieben. Diese positiven Korrelationen waren weitgehend unabhängig von der Art des neuronalen Stimulus wie elektrische Stimulation oder Applikation von Neurotransmittern (Lewis und Schuette, 1975; Duchen, 1992, Kann et al., 2003a,b [zweite und dritte Publikation]; Shuttleworth et al., 2003). Weiterhin konnten diese positiven Korrelationen über einen weiten Bereich moderater neuronaler Stimulation, was durch transiente Anstiege der $[K^+]_o$ von 0.25 bis 3 mM gesichert wurde, nachgewiesen werden (Kann et al., 2003a,b [zweite und dritte Publikation]). Damit ist durch die Analyse der Amplituden der NAD(P)H-Transienten in mehreren Studien evident geworden, daß eine Feinabstimmung bei der neurometabolischen Kopplung existiert.

Eine schnelle und fein abgestimmte Kopplung zwischen neuronaler Aktivität und Mitochondrienfunktionen (neurometabolische Kopplung) garantiert die Aufrechterhaltung von neuronaler Erregbarkeit und synaptischer Funktion in der Akutphase erhöhter neuronaler Aktivität. Voraussetzung dafür ist natürlich eine adäquate Versorgung des Parenchyms mit O_2 und Energieträgern wie Glukose. Untersuchungen *in vitro* sind jedoch nicht ohne weiteres auf *in vivo* Bedingungen zu übertragen, insbesondere wegen der verlängerten Diffusionsstrecken für Gase und Substrate (~ 90 bis $250 \mu m$) in Hirschnittpräparaten. Diese erfordern in der Nährlösung eine deutliche Erhöhung des pO_2 (146 bis 694 mmHg) und der Glukosekonzentration (10 bis 26 mM; *in vivo*: 0.35 bis 2.6 mM) (Leybaert, 2005; Kann und Kovács, 2007). Im intakten Gehirn wird die Versorgung mit O_2 und Glukose durch ein enges Gefäßnetz (Abstände der Kapillaren von 20 bis $40 \mu m$; Tata und Anderson, 2002) und komplexe Regulationsmechanismen sichergestellt (Villringer und Dirnagl, 1995). Dazu zählt die neurovaskuläre Kopplung, bei der der Gefäßdurchmesser und somit der Blutfluß an den Grad der neuronalen Aktivität in der Umgebung angepaßt wird. Neurovaskuläre Kopplung erfordert das funktionelle

Zusammenwirken von Neuronen, Astrozyten und vaskulären Zellen, die möglicherweise neurovaskuläre Einheiten bilden. Als Signalfaktoren werden beispielsweise NO, Adenosin und Erhöhungen der $[K^+]_o$ diskutiert (Dreier et al., 1995; Caesar et al., 1999; Zonta et al., 2003). Die Adaptation des Blutflusses bei Änderung der neuronalen Aktivität liegt in der Regel im Sekundenbereich (Malonek et al., 1999) und ergänzt damit die schnellere neurometabolische Kopplung, um die Energiebedürfnisse von Nervenzellen abzusichern.

3.2. $[Ca^{2+}]_m$ -Transienten als Integrationssignal bei neurometabolischer Kopplung

Die Anpassung von lokalen Energiebedürfnissen in Dendriten, Zellkörpern, Axonen und präsynaptischen Endigungen von Nervenzellen erfordert intrazelluläre Signale, die den Grad der neuronalen Aktivität in eine metabolische Antwort der Mitochondrien vor Ort integrieren. Neben Substraten wie ADP, Pyruvat und CoA sind Ca^{2+} -Ionen ein möglicher Kandidat, denn erstens ist neuronale Aktivierung eng mit transienten Erhöhungen der $[Ca^{2+}]_c$ bis in den mikromolaren Konzentrationsbereich assoziiert (Augustine et al., 2003), und zweitens ist die Aktivität von Enzymen des mitochondrialen Citratzyklus beziehungsweise von Komplexen der Elektronentransportkette sensitiv für Ca^{2+} -Ionen (Hansford und Zorov, 1998; Kadenbach, 2003). Tatsächlich sind enge zeitliche und quantitative Korrelationen zwischen transienten Erhöhungen von $[Ca^{2+}]_c$ beziehungsweise $[Ca^{2+}]_m$ und NAD(P)H (FAD)-Transienten während neuronaler Aktivität in Hirnschnittpräparaten beschrieben worden (Mironov und Richter, 2001; Kann et al., 2003a,b [zweite und dritte Publikation]; Shuttleworth et al., 2003). Diese Befunde werden von Daten aus isolierten Neuronen gestützt (Duchen, 1992; Schuchmann et al., 1998). Für experimentelle Bedingungen, die Erhöhungen von $[Ca^{2+}]_c$ und $[Ca^{2+}]_m$ verhindern, wurde weiterhin gezeigt, daß die Amplituden von NAD(P)H-Transienten während erhöhter neuronaler Aktivität in Hirnschnittpräparaten deutlich reduziert (Kann et al., 2003a [zweite Publikation]) beziehungsweise in isolierten Neuronen komplett unterdrückt werden können (Duchen, 1992). Eine Ca^{2+} -unabhängige Komponente von FAD-Transienten wurde auch im Cerebellum *in vivo* beschrieben (Reinert et al., 2004). Ebenso wurde nachgewiesen, daß die Membran-Depolarisation von isolierten cerebellären Purkinjezellen unmittelbar sowohl mit einer Ca^{2+} -abhängigen

mitochondrialen Redox-Antwort (NAD(P)H-Transienten) als auch mit O_2 -Verbrauch einhergeht (Hayakawa et al., 2005). Diese Befunde stützen das Konzept, daß Ca^{2+} -Ionen wesentlich an der Integration von neuronaler Aktivität in den mitochondrialen oxidativen Energiemetabolismus beteiligt sind. Somit könnten schnelle lokale Ca^{2+} -Transienten in Cytosol und Mitochondrienmatrix während neuronaler Aktivität dafür sorgen, daß der oxidative Energiemetabolismus stimuliert wird, bevor es zu lokalen Abfällen der cytosolischen ATP-Konzentration durch Aktivierung von Na^+/K^+ -ATPasen und Ca^{2+} -ATPasen kommt. Die besondere Rolle von $[Ca^{2+}]_m$ -Transienten für die Stimulierung des oxidativen Energiemetabolismus wird auch bei Myozyten und nicht-erregbaren Zellen vermutet (Pralong et al., 1994; Hajnóczky et al., 1995; White und Wittenberg, 1995).

3.3. Komplexe neuronale Netzwerkaktivität, pO_2 und mitochondrialer Redox-Status

In den meisten Studien zu den Funktionen neuronaler Mitochondrien *in vivo* oder in komplexen Hirnschnittpräparaten sind elektrische Stimuli beziehungsweise evozierte pathologische neuronale Aktivität wie epileptische (epileptiforme) Aktivität oder *spreading depression* angewendet worden (Jöbsis et al., 1971; Mayevsky und Chance, 1975; Shuttleworth et al., 2003; Foster et al., 2005). Diese Formen experimenteller neuronaler Aktivität sind jedoch vergleichsweise artifiziell, denn *in vivo* interagieren exzitatorische und inhibitorische Nervenzellen als funktionelle Ensembles und generieren in präzisiertem Zusammenspiel komplexere Netzwerkaktivitäten wie Oszillationen im Theta- (4 bis 10 Hz) oder Gamma-Bereich (30 bis 80 Hz) (Buzsáki und Draguhn, 2004; Bartos et al., 2007). Eine erste Studie zeigte, daß komplexe neuronale Netzwerkaktivitäten im Hippocampus sehr sensitiv gegenüber Absenkungen des interstitiellen pO_2 und den damit einhergehenden Veränderungen des mitochondrialen Redox-Status sind (Huchzermeyer et al., 2008 [vierte Publikation]). Interessanterweise reichten dazu Absenkungen des pO_2 im normoxischen Bereich aus. Unter diesen Bedingungen blieb elektrisch evozierte, neuronale Aktivität völlig unbeeinträchtigt; es konnte jedoch eine Einschränkung der mitochondrialen oxidativen Kapazität während erhöhter neuronaler Aktivität nachgewiesen werden. Diese Befunde deuten daraufhin, daß komplexe neuronale

Netzwerkaktivitäten durch mitochondriale Dysfunktion empfindlich gestört werden können, beispielsweise durch Einschränkung der Aktivität der mitochondrialen Atmungskette durch reduzierte Verfügbarkeit von Sauerstoff. Diese Störung könnte sich insbesondere bei bestimmten Interneuronen manifestieren. Für schnell feuernde Interneurone wurde ein sehr hoher Gehalt an Cytochrom C beschrieben (Gulyás et al., 2006). Außerdem haben diese Interneurone wesentlichen Anteil an der Synchronisation der Aktivität von exzitatorischen Neuronen (Csicsvari et al., 2003; Hájos et al., 2004). Durch einen moderaten Abfall des pO_2 könnten diese schnell feuernden Interneurone einen Teil ihrer Funktion innerhalb eines Netzwerkensembles einbüßen und damit die Synchronisation stören. Moderate pO_2 Abfälle könnten besonders kritisch in neuronalen Segmenten mit hoher Dichte von respiratorisch aktiven Mitochondrien sein, beispielsweise in präsynaptischen Endigungen, ohne daß es zu nennenswerten Einschränkungen der Erregbarkeit des neuronalen Gewebes durch artifizielle Stimuli kommt (Huchzermeyer et al., 2008 [vierte Publikation]). Letztere Annahme entspricht auch der Beobachtung, daß Hirnschnittkulturen, bei denen neurometabolische Kopplung mit 20%-iger O_2 -Begasung untersucht wurden, keine nennenswerten Funktionsstörung oder Zelltod aufwiesen (Kann et al., 2003a,b [zweite und dritte Publikation]). Für die hohe Empfindlichkeit von Netzwerkaktivitäten gegenüber Abfällen des pO_2 gibt es interessante Parallelen zu klinischen Beobachtungen. Es ist bekannt, daß zerebrale Ischämie sehr schnell zu Bewußtlosigkeit und dem Auftreten langsamer Wellen im Elektroenzephalogramm (EEG) führt, während sich evozierte Potentiale und Ionen-Verteilungen als resistenter erweisen (Rossen et al., 1943; Hirsch et al., 1957; Hansen, 1985; Howard et al., 1998). Ein erhöhter Energie- und damit Sauerstoffverbrauch während komplexer Netzwerkaktivitäten liegt möglicherweise auch den Beobachtungen zugrunde, daß Gamma-Oszillationen und hämodynamische Signale im visuellen Kortex eng miteinander korrelieren (Niessing et al., 2005). Die genannten Befunde sprechen dafür, daß lokale, moderate Abfälle des interstitiellen pO_2 und/oder Dysfunktionen neuronaler Mitochondrien wie bei Alterungsprozessen, Arteriosklerose, Epilepsie oder Schizophrenie zu abnormer neuronaler Netzwerkaktivität führen und somit schwerwiegende Störungen insbesondere von höheren Hirnleistungen bei neurologischen und psychiatrischen Patienten bedingen könnten (Whittington et al.,

2004; Kann et al., 2005 [siebte Publikation]; Vreugdenhil und Toescu, 2005; Cho et al., 2006). Die dargelegten Befunde erfordern weitere experimentelle Aufklärung und gegebenenfalls eine Revision der Sichtweise über die biochemischen und biophysikalischen Voraussetzungen für adäquate Mitochondrienfunktionen in Nervenzellen. Denn bisher wurde aufgrund von Studien an isolierten Mitochondrien davon ausgegangen, daß für den oxidativen Energiemetabolismus sehr niedrige pO_2 Werte von kleiner als 0.5 mmHg ausreichend sind (Jones, 1986; Erecinska und Silver, 2001). Diese Annahme müßte mit hochauflösenden Techniken *in situ* überprüft werden, die den Besonderheiten komplexen neuronalen Gewebes beziehungsweise des intakten Gehirns wie hoher Energieumsatz, Diffusionsstrecken und -geschwindigkeiten in zellulärem Milieu, Blutfluß, regionale Mitochondriendichte in neuronalen Segmenten etc gerecht werden.

3.4. Mitochondriale Dysfunktionen bei Epilepsie

Frühere Studien zu den pathologischen Mechanismen, die bei Epilepsie zu Funktionsstörungen und Zelltod von Neuronen führen, haben unter anderem die neurovaskuläre Kopplung untersucht. Es wurde gezeigt, daß der lokale cerebrale Blutfluß bei epileptischer Aktivität zunächst stark zunimmt, um die Energieversorgung der Nervenzellen zu gewährleisten. Bei länger andauernder epileptischer Aktivität beziehungsweise *status epilepticus* kann es aber auch zu einer Abnahme des cerebralen Blutflusses kommen, was zu einer relativen Hypoperfusion im betroffenen Gewebe führt (Meldrum und Nilsson, 1976; Ingvar und Siesjö, 1983; Kreisman et al., 1991). Damit könnte ein neuronales Energiedefizit ein wesentlicher Faktor für die pathologischen Prozesse bei Epilepsie sein. Diese Befunde lieferten jedoch keine ausreichende Erklärung, ob und wie es bei Epilepsie zu neuronalen Energiedefiziten und Zelltod kommt. Daher ist in den letzten Jahren die Rolle der neuronalen Mitochondrien bei epileptischer Aktivität in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt worden (Kunz, 2002; Patel, 2004; Kann und Kovács, 2007). Aus *in vitro* Untersuchungen in komplexen Hirnschnittpräparaten haben sich Hinweise darauf ergeben, daß die enge, zum Teil durch Ca^{2+} -Ionen vermittelte neurometabolische Kopplung bei epileptiformer Aktivität zu mitochondrialer

Dysfunktion führt. Diese zeigt sich beispielsweise an mitochondrialer Membran-Depolarisation, die nicht nur vereinzelt sondern auch synchron in Dendriten und im Soma von Nervenzellen auftreten und somit schwerwiegende Folgen in den einzelnen neuronalen Segmenten haben kann (Kovács et al., 2002 und 2005 [fünfte und sechste Publikation]). Weiterhin ist von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt worden, daß es bei epileptischer Aktivität *in vivo* (Frantseva et al., 2000a; Peterson et al., 2002), bei epileptiformer Aktivität in Hirnschnittpräparaten (Frantseva et al., 2000b; Kovács et al., 2002 [fünfte Publikation]) und in isolierten Mitochondrien, die *in vitro* erhöhten Konzentrationen von Na^+ -Ionen und Ca^{2+} -Ionen ausgesetzt wurden (Dykens, 1994), zu einer signifikanten Erhöhung der Produktion von ROS kommt. ROS werden insbesondere an Komplex I und möglicherweise an Komplex III der mitochondrialen Elektronentransportkette, an der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase des Citratzyklus und an der mitochondrialen Monoaminoxidase gebildet (Adam-Vizi und Chinopoulos, 2006). Hierbei scheinen auch die partielle Inhibition des Komplex I und die Veränderung des Verhältnisses von NADH/NAD^+ eine besondere Rolle zu spielen. Es gibt auch Belege dafür, daß NO, welches als wichtiger Modulator der Neurotransmission gilt, während epileptischer Aktivität verstärkt von neuronaler und endothelialer NO-Synthase gebildet wird (Schuchmann et al., 2002; Pereira de Vasconcelos et al., 2006). Diese Befunde sind in doppelter Hinsicht relevant, denn erstens vermag NO reversibel und irreversibel mitochondriale Funktionen zu blockieren (Brown, 2001), und zweitens können aus NO und ROS eine Reihe von äußerst toxischen Reaktionsprodukten wie Peroxynitrit entstehen. Somit könnten mitochondriale Depolarisation und Bildung von ROS sowie verstärkte NO-Freisetzung zu einer akuten Abnahme der mitochondrialen ATP Produktion in der gesamten Nervenzelle führen. Die Auswirkungen wären insbesondere dann gravierend, wenn die Mitochondrien-Depolarisationen synchronisiert in den einzelnen neuronalen Segmenten auftreten (Kovács et al., 2005 [sechste Publikation]). Befunde dafür gibt es aus Tiermodellen, in denen eine Abnahme des ATP-Gehalts bei epileptischen Anfällen beschrieben wurde (Folbergrova et al., 1981; Gupta et al., 2001). Diese Hypothese zu mitochondrialen Schadensmechanismen bei Epilepsie wird durch Studien zum neuronalen Redox-Status beziehungsweise zum Energiehaushalt unterstützt. So ergaben sich in Akutmodellen zum *status epilepticus*

Hinweise für das Auftreten von mitochondrialer metabolischer Dysfunktion (Schuchmann et al., 1999; Kovács et al., 2002 [fünfte Publikation]). Diese Befunde wurden in bestimmten Regionen des Hippocampus von chronisch-epileptischen Ratten und von Patienten mit Temporallappen-Epilepsie erhärtet (Kunz et al., 1999; Kann et al., 2005 [siebte Publikation]). Bisher ist allerdings noch nicht aufgeklärt, wie es unter Akutbedingungen *in vitro* beziehungsweise bei epileptischen Ratten und Patienten mit Temporallappen-Epilepsie zu dieser eindrücklichen metabolischen Dysfunktion kommt. Diskutiert werden ROS-vermittelte Schädigungen von mitochondrialen Enzymen und DNS, die einerseits zu Beeinträchtigungen der Elektronentransportkette und des Citratzyklus (Liang et al., 2000) und andererseits zur Aktivierung der Protein-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) mit nachfolgendem Abbau von Nicotinamid-adenin-Dinucleotiden führen könnten (Kauppinen und Swanson, 2007). Ebenso könnte bei erhöhter ROS-Produktion NAD(P)H, das wesentlicher Co-Faktor für verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden ist, direkt oder indirekt über intrinsisches anti-oxidatives Glutathion oxidiert werden (Dringen, 2000; Berger et al., 2004). Interessanterweise wurde für Patienten mit Temporallappen-Epilepsie eine Schädigung des Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette gezeigt (Kunz et al., 2000). Dies könnte Ausdruck dafür sein, daß rezidivierende epileptische Anfälle beziehungsweise *status epilepticus* durch die Produktion von ROS und NO zu kumulativer Schädigung insbesondere der mitochondrialen DNS führt und somit chronische Dysfunktion von Mitochondrien und Störungen des neuronalen Energiehaushalts bedingt. Weiterhin könnten freie Radikale andere zelluläre Enzyme, Ionenkanäle und nucleäre DNS zum Teil irreversibel schädigen und zu Funktionsstörungen von Nervenzellen führen, möglicherweise im Sinne einer sekundären Gewebsschädigung. Schädigungen des mitochondrialen Komplex I sind auch für andere neurologische Syndrome beschrieben worden, die mit Epilepsien assoziiert sind. Beispiele dafür sind das Leigh-Syndrom und das MELAS-Syndrom (Orth und Schapira, 2001; Filosto et al., 2007). Ob umgekehrt eine Schädigung des Komplex I und/oder oxidativer Streß die Erstmanifestation bestimmter Formen von Epilepsie begünstigen können, wird diskutiert (Kunz, 2002; Patel, 2004). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es eine Reihe von Hinweisen auf mitochondriale Dysfunktion bei Epilepsie gibt, die selbst bei

intakter neurovaskulärer Kopplung zu Energiedefiziten, neuronaler Funktionsstörung und Zelltod führt.

3.5. Ausblick

Die Funktionsweisen neuronaler Mitochondrien sind in den letzten Jahren zunehmend Gegenstand experimenteller neurophysiologischer, neurobiochemischer und neuropathologischer Studien geworden. Dabei hat sich gezeigt, daß neuronale Mitochondrien eine heterogene Population von Zellorganellen darstellen, die hinsichtlich ihrer Struktur und Funktionsweisen sehr komplex ist (mitochondriales *fission and fusion*, mitochondriales Ca^{2+} signalling, Energiemetabolismus, Apoptose etc). Weiterhin gibt es zunehmend Hinweise, daß Mitochondrienfunktionen in hohem Maße eine Voraussetzung für die komplexen und plastischen Leistungen von Nervenzellen und neuronalen Netzwerken sind; als Beispiele seien Phänomene wie *long-term potentiation* und Oszillationen genannt. Die Weiterentwicklung von zeitlich und räumlich hochauflösenden Bildgebungsverfahren wird es ermöglichen, die mannigfaltigen Funktionen neuronaler Mitochondrien unter physiologischen und pathologischen Bedingungen detaillierter zu charakterisieren. Dies könnte auch dazu führen, daß Mitochondrien als Ziel für adjuvante pharmakologische Intervention begriffen werden.

4. Literatur

Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Dec;27(12):639-45.

Amzica F, Steriade M. Neuronal and glial membrane potentials during sleep and paroxysmal oscillations in the neocortex. *J Neurosci.* 2000 Sep 1;20(17):6648-65.

Augustine GJ, Santamaria F, Tanaka K. Local calcium signaling in neurons. *Neuron.* 2003 Oct 9;40(2):331-46.

Attwell D, Iadecola C. The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci.* 2002 Dec;25(12):621-5.

Avanzini G, Franceschetti S. Cellular biology of epileptogenesis. *Lancet Neurol.* 2003 Jan;2(1):33-42.

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

Berger F, Ramírez-Hernández MH, Ziegler M. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem Sci.* 2004 Mar;29(3):111-8.

Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Mar 1;1504(1):46-57.

Buzsáki G, Draguhn A. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science.* 2004 Jun 25;304(5679):1926-9.

Caesar K, Akgören N, Mathiesen C, Lauritzen M. Modification of activity-dependent increases in cerebellar blood flow by extracellular potassium in anaesthetized rats. *J Physiol.* 1999 Oct 1;520 Pt 1:281-92.

Casse R, Rowe CC, Newton M, Berlangieri SU, Scott AM. Positron emission tomography and epilepsy. *Mol Imaging Biol.* 2002 Oct;4(5):338-51.

Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia.* 1991 Nov-Dec;32(6):778-82.

Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell.* 2006 Jun 30;125(7):1241-52.

Chih CP, Lipton P, Roberts EL Jr. Do active cerebral neurons really use lactate rather than glucose? *Trends Neurosci.* 2001 Oct;24(10):573-8.

Cho RY, Konecky RO, Carter CS. Impairments in frontal cortical gamma synchrony and cognitive control in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Dec 26;103(52):19878-83.

Creutzfeldt OD. Cortex cerebri: Leistung, strukturelle und funktionelle Organisation der Hirnrinde. Berlin: Springer-Verlag, 1983.

Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsáki G. Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron*. 2003 Jan 23;37(2):311-22.

Dawson VL, Dawson TM. Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr*. 2004 Aug;36(4):287-94.

Dietzel I, Heinemann U, Hofmeier G, Lux HD. Stimulus-induced changes in extracellular Na⁺ and Cl⁻ concentration in relation to changes in the size of the extracellular space. *Exp Brain Res*. 1982;46(1):73-84.

Dreier JP, Kleeberg J, Petzold G, Priller J, Windmüller O, Orzechowski HD, Lindauer U, Heinemann U, Einhüpl KM, Dirnagl U. Endothelin-1 potently induces Leão's cortical spreading depression in vivo in the rat: a model for an endothelial trigger of migrainous aura? *Brain*. 2002 Jan;125(Pt 1):102-12.

Dreier JP, Körner K, Görner A, Lindauer U, Weih M, Villringer A, Dirnagl U. Nitric oxide modulates the CBF response to increased extracellular potassium. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995 Nov;15(6):914-9.

Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*. 2000 Dec;62(6):649-71.

Duchen MR. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol*. 1999 Apr 1;516 (Pt 1):1-17.

Duchen MR. Ca(2+)-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *Biochem J*. 1992 Apr 1;283 (Pt 1):41-50.

Dykens JA. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca²⁺ and Na⁺: implications for neurodegeneration. *J Neurochem*. 1994 Aug;63(2):584-91.

Engel J Jr. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist*. 2001 Aug;7(4):340-52.

Erecinska M, Silver IA. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol*. 2001 Nov 15;128(3):263-76.

Filosto M, Tomelleri G, Tonin P, Scarpelli M, Vattemi G, Rizzuto N, Padovani A, Simonati A. Neuropathology of mitochondrial diseases. *Biosci Rep*. 2007 Jun;27(1-3):23-30.

Folbergrová J, Ingvar M, Siesjö BK. Metabolic changes in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum during sustained bicuculline-induced seizures. *J Neurochem*. 1981 Nov;37(5):1228-38.

Foster KA, Beaver CJ, Turner DA. Interaction between tissue oxygen tension and NADH imaging during synaptic stimulation and hypoxia in rat hippocampal slices. *Neuroscience*. 2005;132(3):645-57.

Frantseva MV, Perez Velazquez JL, Tsoraklidis G, Mendonca AJ, Adamchik Y, Mills LR, Carlen PL, Burnham MW. Oxidative stress is involved in seizure-induced neurodegeneration in the kindling model of epilepsy. *Neuroscience*. 2000a;97(3):431-5.

Frantseva MV, Velazquez JL, Hwang PA, Carlen PL. Free radical production correlates with cell death in an in vitro model of epilepsy. *Eur J Neurosci*. 2000b Apr;12(4):1431-9.

Gulyás AI, Buzsáki G, Freund TF, Hirase H. Populations of hippocampal inhibitory neurons express different levels of cytochrome c. *Eur J Neurosci*. 2006 May;23(10):2581-94.

Gupta RC, Milatovic D, Dettbarn WD. Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor-induced status epilepticus: protection by antioxidants. *Neurotoxicology*. 2001 Apr;22(2):271-82.

Hájos N, Pálhalmi J, Mann EO, Németh B, Paulsen O, Freund TF. Spike timing of distinct types of GABAergic interneuron during hippocampal gamma oscillations in vitro. *J Neurosci*. 2004 Oct 13;24(41):9127-37.

Hajnóczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*. 1995 Aug 11;82(3):415-24.

Hansen AJ. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev*. 1985 Jan;65(1):101-48.

Hansford RG, Zorov D. Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Mol Cell Biochem*. 1998 Jul;184(1-2):359-69.

Hayakawa Y, Nemoto T, Iino M, Kasai H. Rapid Ca²⁺-dependent increase in oxygen consumption by mitochondria in single mammalian central neurons. *Cell Calcium*. 2005 Apr;37(4):359-70.

Heinemann U, Schaible HG, Schmidt RF. Changes in extracellular potassium concentration in cat spinal cord in response to innocuous and noxious stimulation of legs with healthy and inflamed knee joints. *Exp Brain Res*. 1990;79(2):283-92.

Heinemann U, Lux HD. Undershoots following stimulus-induced rises of extracellular potassium concentration in cerebral cortex of cat. *Brain Res*. 1975 Jul 25;93(1):63-76.

Hirsch H, Bolte A, Schaudig A, Tönnis D. Über die Wiederbelebung des Gehirns bei Hypothermie. *Pflügers Arch*. 1957;265(4):328-36.

Howard EM, Gao TM, Pulsinelli WA, Xu ZC. Electrophysiological changes of CA3 neurons and dentate granule cells following transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 1998 Jul 6;798(1-2):109-18.

Huang S, Heikal AA, Webb WW. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophys J.* 2002 May;82(5):2811-25.

Huchzermeyer C, Albus K, Gabriel HJ, Otáhal J, Taubenberger N, Heinemann U, Kovács R, Kann O. Gamma oscillations and spontaneous network activity in the hippocampus are highly sensitive to decreases in pO₂ and concomitant changes in mitochondrial redox state. *J Neurosci.* 2008 Jan 30;28(5):1153-62.

Ingvar M, Siesjö BK. Local blood flow and glucose consumption in the rat brain during sustained bicuculline-induced seizures. *Acta Neurol Scand.* 1983 Sep;68(3):129-44.

Jöbssis FF, O'Connor M, Vitale A, Vreman H. Intracellular redox changes in functioning cerebral cortex. I. Metabolic effects of epileptiform activity. *J Neurophysiol.* 1971 Sep;34(5):735-49.

Jones DP. Intracellular diffusion gradients of O₂ and ATP. *Am J Physiol.* 1986 May;250(5 Pt 1):C663-75.

Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jun 5;1604(2):77-94.

Kann O, Kovács R. Mitochondria and neuronal activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Feb;292(2):C641-57.

Kann O, Kovács R, Njunting M, Behrens CJ, Otáhal J, Lehmann TN, Gabriel S, Heinemann U. Metabolic dysfunction during neuronal activation in the ex vivo hippocampus from chronic epileptic rats and humans. *Brain.* 2005 Oct;128(Pt 10):2396-407. Epub 2005 Jun 15.

Kann O, Schuchmann S, Buchheim K, Heinemann U. Coupling of neuronal activity and mitochondrial metabolism as revealed by NAD(P)H fluorescence signals in organotypic hippocampal slice cultures of the rat. *Neuroscience.* 2003a;119(1):87-100.

Kann O, Kovács R, Heinemann U. Metabotropic receptor-mediated Ca²⁺ signaling elevates mitochondrial Ca²⁺ and stimulates oxidative metabolism in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol.* 2003b Aug;90(2):613-21.

Kauppinen TM, Swanson RA. The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. *Neuroscience.* 2007 Apr 14;145(4):1267-72.

Kovács R, Kardos J, Heinemann U, Kann O. Mitochondrial calcium ion and membrane potential transients follow the pattern of epileptiform discharges in hippocampal slice cultures. *J Neurosci.* 2005 Apr 27;25(17):4260-9.

- Kovács R, Schuchmann S, Gabriel S, Kann O, Kardos J, Heinemann U. Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol.* 2002 Dec;88(6):2909-18.
- Kreisman NR, Magee JC, Brizzee BL. Relative hypoperfusion in rat cerebral cortex during recurrent seizures. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991 Jan;11(1):77-87.
- Kunz WS. The role of mitochondria in epileptogenesis. *Curr Opin Neurol.* 2002 Apr;15(2):179-84.
- Kunz WS, Kudin AP, Vielhaber S, Blümcke I, Zuschratter W, Schramm J, Beck H, Elger CE. Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.* 2000 Nov;48(5):766-73.
- Kunz WS, Goussakov IV, Beck H, Elger CE. Altered mitochondrial oxidative phosphorylation in hippocampal slices of kainate-treated rats. *Brain Res.* 1999 May 1;826(2):236-42.
- Kunz WS, Kunz W. Contribution of different enzymes to flavoprotein fluorescence of isolated rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Sep 6;841(3):237-46.
- Lehmann TN, Gabriel S, Eilers A, Njunting M, Kovacs R, Schulze K, Lanksch WR, Heinemann U. Fluorescent tracer in pilocarpine-treated rats shows widespread aberrant hippocampal neuronal connectivity. *Eur J Neurosci.* 2001 Jul;14(1):83-95.
- Lewis DV, Schuette WH. NADH fluorescence and $[K^+]_o$ changes during hippocampal electrical stimulation. *J Neurophysiol.* 1975 Mar;38(2):405-17.
- Leybaert L. Neurobarrier coupling in the brain: a partner of neurovascular and neurometabolic coupling? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 Jan;25(1):2-16.
- Liang LP, Ho YS, Patel M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. *Neuroscience.* 2000;101(3):563-70.
- Llinás RR. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science.* 1988 Dec 23;242(4886):1654-64.
- Malonek D, Dirnagl U, Lindauer U, Yamada K, Kanno I, Grinvald A. Vascular imprints of neuronal activity: relationships between the dynamics of cortical blood flow, oxygenation, and volume changes following sensory stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Dec 23;94(26):14826-31.
- Mayevsky A, Chance B. Oxidation-reduction states of NADH in vivo: from animals to clinical use. *Mitochondrion.* 2007 Sep;7(5):330-9.
- Mayevsky A, Chance B. Metabolic responses of the awake cerebral cortex to anoxia hypoxia spreading depression and epileptiform activity. *Brain Res.* 1975 Nov 7;98(1):149-65.

- Meldrum BS, Nilsson B. Cerebral blood flow and metabolic rate early and late in prolonged epileptic seizures induced in rats by bicuculline. *Brain*. 1976 Sep;99(3):523-42.
- Mironov SL, Richter DW. Oscillations and hypoxic changes of mitochondrial variables in neurons of the brainstem respiratory centre of mice. *J Physiol*. 2001 May 15;533(Pt 1):227-36.
- Mody I, Lambert JD, Heinemann U. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol*. 1987 Mar;57(3):869-88.
- Niessing J, Ebisch B, Schmidt KE, Niessing M, Singer W, Galuske RA. Hemodynamic signals correlate tightly with synchronized gamma oscillations. *Science*. 2005 Aug 5;309(5736):948-51.
- Orth M, Schapira AH. Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet*. 2001 Spring;106(1):27-36.
- Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med*. 2004 Dec 15;37(12):1951-62.
- Pereira de Vasconcelos A, Riban V, Wasterlain C, Nehlig A. Role of endothelial nitric oxide synthase in cerebral blood flow changes during kainate seizures: a genetic approach using knockout mice. *Neurobiol Dis*. 2006 Jul;23(1):219-27.
- Peterson SL, Morrow D, Liu S, Liu KJ. Hydroethidine detection of superoxide production during the lithium-pilocarpine model of status epilepticus. *Epilepsy Res*. 2002 May;49(3):226-38.
- Pitkänen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol*. 2002 Jul;1(3):173-81.
- Popov V, Medvedev NI, Davies HA, Stewart MG. Mitochondria form a filamentous reticular network in hippocampal dendrites but are present as discrete bodies in axons: a three-dimensional ultrastructural study. *J Comp Neurol*. 2005 Nov 7;492(1):50-65.
- Pralong WF, Spät A, Wollheim CB. Dynamic pacing of cell metabolism by intracellular Ca^{2+} transients. *J Biol Chem*. 1994 Nov 4;269(44):27310-4.
- Reinert KC, Dunbar RL, Gao W, Chen G, Ebner TJ. Flavoprotein autofluorescence imaging of neuronal activation in the cerebellar cortex in vivo. *J Neurophysiol*. 2004 Jul;92(1):199-211.
- Rossen R, Kabat H, Anderson JP. Acute arrest of cerebral circulation in man. *Arch Neurol Psychiatry*. 1943; 50: 510-28.

- Schmitz D, Frerking M, Nicoll RA. Synaptic activation of presynaptic kainate receptors on hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*. 2000 Aug;27(2):327-38.
- Schuchmann S, Albrecht D, Heinemann U, von Bohlen und Halbach O. Nitric oxide modulates low-Mg²⁺-induced epileptiform activity in rat hippocampal-entorhinal cortex slices. *Neurobiol Dis*. 2002 Oct;11(1):96-105.
- Schuchmann S, Kovacs R, Kann O, Heinemann U, Buchheim K. Monitoring NAD(P)H autofluorescence to assess mitochondrial metabolic functions in rat hippocampal-entorhinal cortex slices. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2001 Jul;7(3):267-76.
- Schuchmann S, Buchheim K, Meierkord H, Heinemann U. A relative energy failure is associated with low-Mg²⁺ but not with 4-aminopyridine induced seizure-like events in entorhinal cortex. *J Neurophysiol*. 1999 Jan;81(1):399-403.
- Schuchmann S, Müller W, Heinemann U. Altered Ca²⁺ signaling and mitochondrial deficiencies in hippocampal neurons of trisomy 16 mice: a model of Down's syndrome. *J Neurosci*. 1998 Sep 15;18(18):7216-31.
- Shuttleworth CW, Brennan AM, Connor JA. NAD(P)H fluorescence imaging of postsynaptic neuronal activation in murine hippocampal slices. *J Neurosci*. 2003 Apr 15;23(8):3196-208.
- Somogyi P, Klausberger T. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol*. 2005 Jan 1;562(Pt 1):9-26.
- Sommer W. Erkrankung des Ammonshorns als ätiologisches Moment der Epilepsie. *Arch Psychiatr Nervenkr*. 1880; 10:631-75.
- Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol*. 1989 Sep;26(3):321-30.
- Tata DA, Anderson BJ. A new method for the investigation of capillary structure. *J Neurosci Methods*. 2002 Jan 30;113(2):199-206.
- Turner DA, Foster KA, Galeffi F, Somjen GG. Differences in O₂ availability resolve the apparent discrepancies in metabolic intrinsic optical signals in vivo and in vitro. *Trends Neurosci*. 2007 Aug;30(8):390-8.
- Villringer A, Dirnagl U. Coupling of brain activity and cerebral blood flow: basis of functional neuroimaging. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1995 Fall;7(3):240-76.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Lehrbuch der Biochemie*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2002.
- Vreugdenhil M, Toescu EC. Age-dependent reduction of gamma oscillations in the mouse hippocampus in vitro. *Neuroscience*. 2005;132(4):1151-7.

- White RL, Wittenberg BA. Effects of calcium on mitochondrial NAD(P)H in paced rat ventricular myocytes. *Biophys J*. 1995 Dec;69(6):2790-9.
- Whittington MA, Faulkner HJ, Doheny HC, Traub RD. Neuronal fast oscillations as a target site for psychoactive drugs. *Pharmacol Ther*. 2000 May;86(2):171-90.
- Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M; Effectiveness and efficiency of surgery for temporal lobe epilepsy study group. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med*. 2001 Aug 2;345(5):311-8.
- Wong-Riley MT. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci*. 1989 Mar;12(3):94-101.
- Wyler AR, Dohan Jr FC, Schweitzer JB, Berry AD. A grading system for mesial temporal pathology (hippocampal sclerosis) from anterior temporal obectomy. *J Epilepsy*. 1992; 5:220-5.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci*. 2003 Jan;6(1):43-50.

5. Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AHS	Ammonshorn-Sklerose
ATP	Adenosintriphosphat
CA1, CA3	Cornu ammonis
$[Ca^{2+}]_c$	cytosolische Ca^{2+} -Ionen Konzentration
$[Ca^{2+}]_m$	mitochondriale Ca^{2+} -Ionen Konzentration
EEG	Elektroenzephalogramm
$FADH_2$	Flavin-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
IP_3	Inositol 1,4,5-trisphosphat
$[K^+]_o$	extrazelluläre K^+ -Ionen Konzentration
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
NO	Stickstoffmonoxid
pO_2	interstitieller Sauerstoffpartialdruck
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Sauerstoffradikale)
ZNS	Zentrales Nervensystem

6. Zusammenfassung

Die Funktionen von Mitochondrien bei Aktivität von intakten zentralen Nervenzellen sind bisher kaum untersucht worden. In den Studien, die der vorliegenden Habilitationsschrift zugrunde liegen, wurden Mitochondrienfunktionen bei neuronaler Aktivität im physiologischen Bereich und bei Epilepsie im Hippocampus der Ratte und des Menschen untersucht. Dazu wurden lebendige Hirnschnittpräparate verwendet, und elektrophysiologische Techniken mit Fluoreszenzmessungen bei hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung kombiniert. Die Ergebnisse legen im Kern folgende Schlußfolgerungen nahe:

- 1) Es existiert eine Feinabstimmung von neuronaler Aktivität im physiologischen Bereich und mitochondrialem Energiemetabolismus (neurometabolische Kopplung).
- 2) Bei dieser neurometabolischen Kopplung stellen schnelle Erhöhungen der mitochondrialen Ca^{2+} -Ionen Konzentration ein wesentliches Integrationssignal dar.
- 3) Komplexe neuronale Netzwerkaktivität ist besonders empfindlich gegenüber Absenkungen des pO_2 und den damit assoziierten Veränderungen des mitochondrialen Redox-Status.
- 4) Unter pathologischen Bedingungen wie Epilepsie kann es zu akuten und chronischen Funktionsstörungen der Mitochondrien kommen, die zum Teil durch Ca^{2+} -Ionen vermittelt sind und mit mitochondrialer Membran-Depolarisation, Produktion von ROS und metabolischer Dysfunktion einhergehen.

Damit wurde gezeigt, daß Funktionen der neuronalen Mitochondrien und neurometabolische Kopplung eine essentielle Bedeutung für die komplexen und plastischen Leistungen von Nervenzellen und neuronalen Netzwerken unter physiologischen Bedingungen haben. Unter pathologischen Bedingungen wie Epilepsie kann es zu mitochondrialer Dysfunktion mit schwerwiegenden Folgen für die Integrität von Nervenzellen kommen.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei folgenden Personen bedanken, die mit vielfältigem Rat, inhaltlicher Diskussion und praktischer Unterstützung zu den Publikationen für diese Habilitation beigetragen haben: Kristin Fröhlich, Christine Huchzermeyer, Dr. Jakob Otáhal, und Dr. Richard Kovács aus meiner Arbeitsgruppe, Dr. Christoph J. Behrens, Dr. Klaus Albus, Frau Sieglinde Latta, Dr. Dr. Sebastian Schuchmann, Dr. Katharina Buchheim (†), Dr. Siegrun Gabriel, Dr. Hans-Jürgen Gabriel, Dr. Katrin Schulze, Marleisje Njunting, Dr. Herbert Siegmund, Dr. Thomas-Nicolas Lehmann und natürlich dem Professor Dr. Uwe Heinemann. Weiterhin danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung der Projekte in den Sonderforschungsbereichen 507 und 665. Blumen für Anja Tuma, Dr. Uli Stelzl, Ulrike Kann, Dorothea Fuhr und Doris Kann.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

09.06.08.....
Datum

Oliver Kamm.....
Unterschrift