

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*“Verlust der Langzeitpotenzierung an der CA1 – Subikulum
Synapse bei der Temporallappenepilepsie“*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nadine Buck

aus *Bremerhaven*

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. J. Behr
 2. Prof. Dr. Uwe Heinemann
 3. Prof. Dr. med. H. Beck

Datum der Promotion: 16.05.2010

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Die Temporallappenepilepsie	7
1.2 Der Hippokampus	10
1.3 Das Subikulum	11
1.4 Synaptische Plastizität	14
1.5 Langzeitpotenzierung	15
1.6 Langzeitdepression	22
1.7 Metaplastizität	23
1.8 Epilepsiemodelle	24
1.8.1 In vitro Modell der Temporallappenepilepsie: Niedrig-Magnesium-Modell	25
1.8.2 In vivo Modell der Temporallappenepilepsie: Pilocarpin-Modell	26
1.8.3 Selektive Hippokampektomie von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie	27
2. Fragestellungen	28
3. Methoden	29
3.1 Hirnschnittpräparation	29
3.2 Elektrophysiologische Methoden	29
3.2.1 Extrazelluläre Messungen	30
3.2.2 Intrazelluläre Messungen	30
3.3 Pilocarpin-Modell der Temporallappenepilepsie	31
3.4 Epilepsiechirurgische Hippokampektomie von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie	32
3.5 SDS-PAGE und Western Blot	33
3.6 Pharmaka	34

3.7	Aufbau des Messplatzes.....	34
3.8	Auswertung der Messergebnisse	34
4.	Ergebnisse	36
4.1	Extrazelluläre Ableitungen zur Langzeitpotenzierung im Subikulum der Ratte....	36
4.2	Extrazelluläre Ableitungen zur Langzeitdepression im Subikulum der Ratte	37
4.3	Zellspezifische Langzeitpotenzierung im Subikulum der Ratte.....	38
4.4	Langzeitpotenzierung in Pilocarpin-behandelten Tieren im Subikulum der Ratte	40
4.4.1	Synaptische Langzeitpotenzierung und -depression in Pilocarpin-behandelten Tieren im Subikulum der Ratte	40
4.4.2	Zellspezifische Langzeitpotenzierung und -depression in Pilocarpin-behandelten Tieren im Subikulum der Ratte	42
4.5	Effekt von Forskolin auf die subikuläre Langzeitpotenzierung	45
4.5.1	Effekt von Forskolin auf die synaptische Transmission und Langzeitpotenzierung	45
4.5.2	Effekt von Forskolin auf die zellspezifische Langzeitpotenzierung	46
4.6	Untersuchungen zur Expression der Adenylatcyclase Typ 1 im Kontrolltier und in Pilocarpin-behandelten Tieren.....	47
4.7	Untersuchungen zur Langzeitpotenzierung in humanen subikulären Zellen von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie	48
4.8	Langzeitpotenzierung im Niedrig-Magnesium-Modell.....	50
4.8.1	Effekt von H-89 auf die Langzeitpotenzierung im Niedrig-Magnesium-Modell.....	51
5.	Diskussion	54
5.1	Zellspezifischer Verlust von LTP im Pilocarpin-Modell der Temporallappenepilepsie	54
5.2	Verlust von LTP im Subikulum von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie	58

5.3 LTP im Niedrig-Magnesium-Modell der Temporallappenepilepsie	59
6. Zusammenfassung	61
Literaturverzeichnis	62
Anhang	79
Eidesstattliche Erklärung	79
Danksagung	80
Lebenslauf	81
Publikationsliste	83
Symposiumsbeiträge	84

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit ¹
AHS	Ammonshornsklerose
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-Isoazolepropionsäure
AMPAR	α -Amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-Isoazolepropionsäure Rezeptor
CA1	Cornu Ammonis 1; Subregion des Hippokampus
CA3	Cornu Ammonis 3; Subregion des Hippokampus
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin -abhängige Proteinkinase II
cAMP	cyclic AMP (zyklisches Adenosin 3'-5'-monophosphat)
DG	Gyrus dentatus (dentate gyrus)
EC	entorhinaler Kortex (entorhinal cortex)
EEG	Elektroenzephalographie
E-LTP	early LTP (frühe Phase der Langzeitpotenzierung)
EPSP	exzitatorisch postsynaptisches Potential
fp	Feldpotential
GABA	γ -aminobutyric acid (γ -Aminobutyrat)
Glu	Glutamat
L-LTP	late LTP (späte Phase der Langzeitpotenzierung)
LTD	long-term depression (Langzeitdepression)
LTP	long-term potentiation (Langzeitpotenzierung)
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NMDAR	N-methyl-D-aspartat Rezeptor
PKA	Proteinkinase A
PTP	posttetanische Potenzierung
PPF	paired-pulse Facilitation (Doppelpulsverstärkung)

RMP	Ruhemembranpotential
SD	Standardabweichung
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
Sub	Subikulum
TLE	Temporallappenepilepsie
ZNS	zentrales Nervensystem

¹ Artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (in mM), pH 7,4:

NaCl 129
Na₂PO₄ 1,25
NaHCO₃ 21
KCl 3
CaCl₂ 1,6
MgSO₄ 1,8
Glucose 10

² Low-Mg²⁺-Lösung (in mM), pH 7,4:

NaCl 129
Na₂PO₄ 1,25
NaHCO₃ 21
KCl 3
CaCl₂ 1,6
Glucose 10

³ Ringer Mg²⁺, Ca²⁺ (in mM), pH 7,4:

NaCl 129
Na₂PO₄ 1,25
NaHCO₃ 21

KCl 3

CaCl₂ 4

MgSO₄ 4

Glucose 10

⁴ ACSF (Humangewebe, (in mM)), pH 7,4:

NaCl 124

NaHCO₃ 26

KCl 4

CaCl₂ 2

MgCl₂ 2

Glucose 10

1. Einleitung

1.1 Die Temporallappenepilepsie

Die Epilepsie ist in der Menschheitsgeschichte eine der am längsten bekannten Krankheiten. Sie leitet sich vom griechischen *epilambanein* ab und bedeutet „Gepacktwerden, Ergriffenwerden“: Anfälle, an denen die Patienten früher litten, wurden als Form der „Besessenheit von bösen Geistern“ gesehen.

Epilepsien gehören zu der Gruppe heterogener Erkrankungen unterschiedlicher Ätiologie. Es handelt sich um die häufigste chronische Erkrankung des zentralen Nervensystems, die mit einer Prävalenz von bis zu 0,8% in der Bevölkerung auftritt (Yaari und Beck, 2002). Sie stellen somit neben den neurovaskulären Erkrankungen eines der häufigsten neurologischen Leiden dar. Die Klassifikation einer Epilepsie erfolgt sowohl durch ihren Anfallstyp als auch durch assoziierte klinische Befunde. Klinisch-phänomenologisch, ätiologisch und nach dem Befund in der Elektroenzephalographie (EEG) unterscheidet man hauptsächlich zwei Formen: Epilepsien partiellen (fokalen) Ursprungs und generalisierte Epilepsien.

Ein gemeinsames Merkmal epileptischer Anfälle sind wiederholte (mindestens zweimal), zumeist unprovokierte, auftretende epileptische Ereignisse, die als Folge einer paroxysmalen Spontanentladung einzelner Neuronenverbände zustande kommen. Vereinfacht betrachtet, beruht die Entstehung epileptischer Aktivität auf einer Störung des Gleichgewichtes von neuronaler Erregung und Hemmung oder auf Funktionsänderungen erregbarkeitsregulierender Mechanismen. Störungen können sowohl auf intrinsischer als auch auf synaptischer Ebene stattfinden. Epileptische Aktivität kann somit entweder durch eine erhöhte Erregbarkeit einzelner Neurone oder durch eine gesteigerte Synchronisationsneigung der neuronalen Netzwerkebene bedingt sein (Dichter und Ayala, 1987; McCormick und Contreras, 2001). Die zugrunde liegenden Pathomechanismen der Epilepsie, die zu einer neuronalen Übererregbarkeit führen, sind trotz fortwährender Bemühungen in der Epilepsieforschung derzeit nicht vollständig geklärt.

Die häufigste und schwerwiegendste Form der partiellen Epilepsien ist die Temporallappenepilepsie (TLE), bei der die Anfallsaktivität ihren Ursprung im Temporallappen hat. Die TLE kann mit oder ohne Verlust des Bewusstseins

einhergehen. Mit 70 - 80 % stellt die mesiale Temporallappenepilepsie das Hauptkontingent aller Temporallappenepilepsien dar. Mögliche Ursachen können Schädel-Hirn-Traumen, ischämische Insulte oder Enzephalitiden sein (Heinemann, 2004). Auch komplizierte epileptische Fieberanfälle in der Kindheit können ursächlich für die Entwicklung eines krampffördernden neuronalen Netzwerkes sein und so die Entstehung einer TLE im Erwachsenenalter begünstigen. Sowohl in Tiermodellen der TLE als auch bei Patienten mit pharmakoresistenter TLE kann man als pathologisch-anatomisches Substrat in der Magnetresonanztomographie (MRT) eine Hippokampusatrophie und/ oder -gliose nachweisen. Histopathologisch zeigt sich ein chronisch epileptischer Prozess mit Umbauvorgängen und einem Zellverlust vor allem in der Area CA1 und CA3 (Mathern et al., 1995; Houser, 1999; Guzman et al., 2006). Je nach Ausprägung spricht man von einer Ammonshornsklerose (AHS) oder einer Non-Ammonshornsklerose (Non-AHS) (Wyler et al., 1992). Nach dem Schweregrad der Sklerose und des Zellverlustes werden fünf neuropathologische Stadien unterschieden, die nach Wyler eingeteilt werden (Wyler et al., 1992). Non-AHS Gewebe wird mit Wyler Grad W0-W2 bezeichnet. AHS Gewebe unterteilt man in W3 und W4, das heißt es liegt ein Zelluntergang von > 50% sowie zusätzlich eine Hippokampusgliose vor. Kontrovers wird in der Literatur diskutiert, ob die hippokampale Sklerose Ursache für die Entwicklung einer TLE ist, oder ob sie eine sekundäre Erscheinung ist und somit nicht für die Manifestation einer TLE verantwortlich ist. In der Regel wird die TLE primär medikamentös behandelt. In einem Drittel der Fälle kann es jedoch zu einer Pharmakoresistenz kommen, d.h. es kann trotz einer optimalen epileptischen Therapie keine Anfallsfreiheit erreicht werden (Wieser et al., 1993). Bei erfolgloser konservativer Therapie stellt bei diesen Patienten die Entfernung des epileptischen Fokus, d.h. des Hippokampus und der angrenzenden Region, eine Therapiemöglichkeit dar. Bereits seit dem 19. Jahrhundert ist man sich des hohen epileptogenen Potentials der Hippokampusformation bewusst. Auffällig dabei ist, dass die hippokampale Formation die niedrigste Schwelle für das Auftreten epileptischer Entladungen im Gehirn besitzt (Green, 1964). In den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts (1957) erfolgte der erste epilepsiechirurgische Eingriff durch den Neurochirurgen William B. Scoville bei einem Patienten (H.M.) mit medikamentös nicht behandelbarer Temporallappenepilepsie. Durch die damals durchgeführte beidseitige Resektion des medialen Temporallappens fiel der Patient postoperativ durch einen schweren und andauernden Verlust des Neugedächtnisses auf. Es war ihm nicht möglich, Informationen vom Kurz- in das

Langzeitgedächtnis zu übertragen (Scoville und Milner, 1957). Demzufolge führte die bilaterale Hippokampusresektion zu einem Verlust der Möglichkeit, Neues zu lernen und sich an Ereignisse zu erinnern, die nach oder relativ kurz vor dem Eingriff stattgefunden hatten (anterograde Amnesie). Das Langzeitgedächtnis für Ereignisse und Informationen, die lange vor dem Eingriff auftraten oder gelernt wurden, blieb dabei relativ unverändert.

Diese klinische Fallstudie gab den entscheidenden Hinweis für die Bedeutsamkeit der hippokampalen Formation in der Gedächtnisverarbeitung. Bei Patienten, die an einer TLE leiden, werden häufig schwerwiegende Probleme bezüglich der Konsolidierung des Gedächtnisses sowie dem Wiederabrufen gespeicherter Informationen beobachtet (Elger, 2005), so dass die Intaktheit des Hippokampus zur Überführung von Informationen vom Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis (= Konsolidierung von Informationen) notwendig scheint. Der Hippokampus und seine angrenzende Struktur, der entorhinale Kortex (EC), sind demnach als „Tor zum Gedächtnis“ von besonderer Bedeutung für die Abspeicherung von Erfahrungen.

Im Wesentlichen lassen sich zwei Gruppen von Gedächtnisarten bei Betrachtung der Lerninhalte unterscheiden: ein deklaratives (explizites) Gedächtnis sowie ein nicht-deklaratives (implizites) Gedächtnis (Abbildung 1) (Eichenbaum, 2004; Leritz et al., 2006).

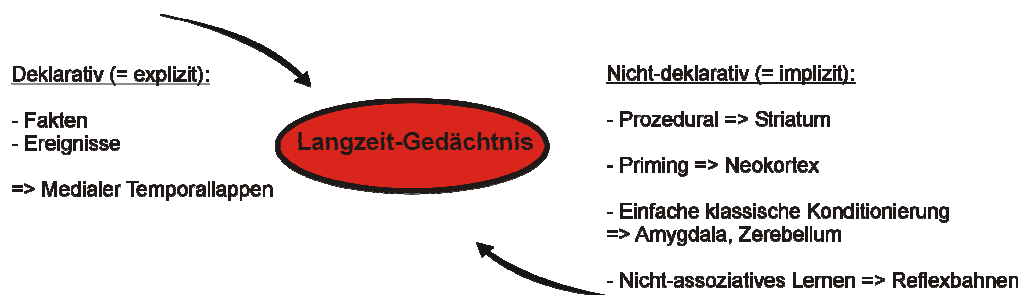


Abb. 1 Gedächtnisformen.

Das nicht-deklarative Gedächtnis ist unabhängig vom Hippokampus und umfasst weite Teile des zentralen Nervensystems. Als hippokampus-abhängig gilt hingegen das deklarative Gedächtnis (verändert nach Leritz et al., 2006).

Das deklarative (explizite) Gedächtnis wird wiederum in das episodische Gedächtnis (Erinnerungen an persönliche Ereignisse) und das semantische Gedächtnis (Fakten) untergliedert. An der expliziten Gedächtnisbildung sind vor allem der Temporallappen, besonders der Hippokampus, das Subikulum und der entorhinale Kortex sowie das

Diencephalon beteiligt (Squire, 1992). Das non-deklarative (implizite) Gedächtnis ist vor allem an motorische Handlungsabläufe gebunden und wird zudem unterteilt in prozedurale Fertigkeiten, assoziatives und nicht-assoziatives Lernen sowie in Priming (erhöhte Wiedererkennungsfähigkeit für früher unbewusst wahrgenommene Informationen) (Lynch, 2004). Anatomisch beteiligte Strukturen sind vor allem das Zerebellum und die Basalganglien (Squire, 1992).

1.2 Der Hippokampus

Der Hippokampus ist ein Teil des Archikortex. Er wird aufgrund anatomischer und funktioneller Charakteristika in zwei korrespondierende Bereiche unterteilt: die Area dentata (DG) und das Cornu Ammonis (CA) mit der Area CA1 und CA3 sowie das Subikulum (S) (Abbildung 2) (O'Keefe and Nadel, 1978; Amaral und Witter, 1989, 1995).

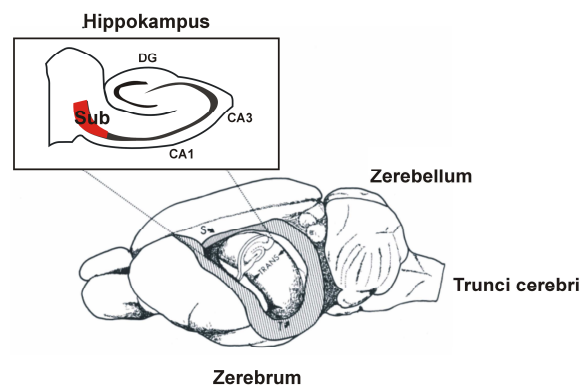


Abb. 2 Anordnung des Hippokampus.

Der Hippokampus verbindet auch entfernt voneinander liegende kortikale Areale und ist neben der Integration verschiedener Sinnesmodalitäten (visuell, akustisch und sensorisch) wesentlich an den Prozessen des Lernens und der Gedächtnisbildung beteiligt (Zola-Morgan et al., 1992; Squire et al., 2004). Schematische Darstellung der hippokampalen Formation im Gehirn der Ratte. Folgende Regionen lassen sich darstellen: Hippokampus, Gyrus dentatus (DG), Amonshorn (CA), Subikulum (Sub) (modifiziert nach Amaral and Witter, Neuroscience 1989;31:571-591).

Über den entorhinalen Kortex (EC) ist die hippokampale Formation mit zahlreichen und in ihrer Funktion unterschiedlichen Arealen des Gehirns verbunden. Die Körnerzellen der Area dentata erhalten vornehmlich ihre Eingänge über den so genannten Tractus

perforans aus dem EC und geben Axone ab, die synaptische Verbindungen mit den Pyramidenzellen der Area CA3 eingehen. Diese Synapse wird als Moosfaser-Synapse bezeichnet. Die Axone der CA3 Pyramidenzellen projizieren zu mehreren Zielorten: Einerseits verlassen sie den Hippokampus via Fornix und andererseits projizieren sie sowohl auf benachbarte CA3 Pyramidenzellen als auch auf nachgeschaltete CA1 Pyramidenzellen. Von der Area CA1 ziehen schließlich Axone zum Subikulum, das als wesentliche Ausgangsstruktur des Hippokampus Efferenzen zu kortikalen und subkortikalen Strukturen ausbildet (Witter und Groenewegen, 1990), und zum EC.

1.3 Das Subikulum

Das Subikulum ist eine bisher wenig untersuchte Struktur der hippocampalen Formation. Aufgrund seiner anatomischen Lage spielt es eine bedeutende Rolle in der Interaktion zwischen Hippokampus und kortikalen sowie subkortikalen Strukturen (Abbildung 3) (O'Mara et al., 2001).

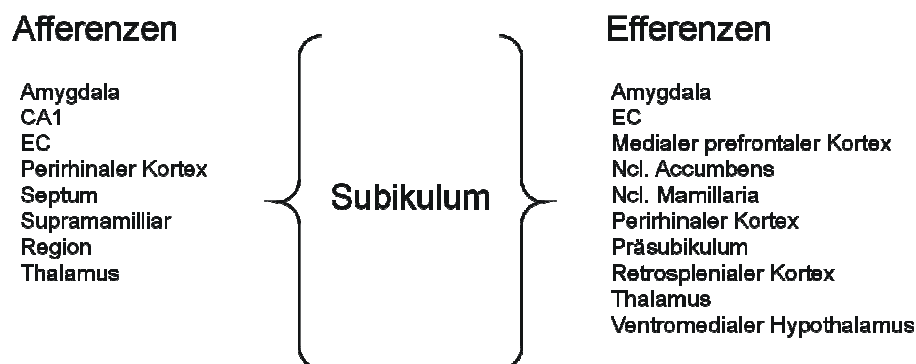


Abb. 3 Neuronale Verbindungen zum Subikulum.

Afferenzen und Efferenzen des Subikulums (modifiziert nach Greene).

Das Subikulum leitet neuronale Informationen der Area CA1 zu verschiedenen kortikalen und subkortikale Hirnregionen (Naber et al., 2000). Darüber hinaus erhält es temporoammonische Afferenzen aus der Schicht III des EC (Steward und Scoville, 1976). In in vivo Experimenten konnte bisher beobachtet werden, dass das Subikulum in einem Zeitfenster von wenigen Sekunden vor dem Hippokampus neue Informationen aufnimmt. Das Subikulum stellt eine wesentliche Schnittstelle in der Weiterleitung und

Verarbeitung von Informationen dar. Es agiert dabei als eine Art Detektor und Schaltstelle sensorischer Informationen (Burwell, 2000; Naber et al., 2000). Unter funktionell anatomischen Gesichtspunkten ist das Subikulum von besonderer Bedeutung für die Verarbeitung und Weiterleitung von Gedächtnisinhalten (Squire und Alvarez, 1995; Lynch, 2004). Tierexperimentelle Studien, bei denen eine Läsion im Subikulum durchgeführt wurde, zeigten, dass das Subikulum eine wichtige Rolle bei der räumlichen Repräsentation und Orientierung spielt (Morris et al., 1990). Sowohl hippokampale als auch subikuläre Läsionen scheinen mit einer Verschlechterung des räumlichen Langzeitgedächtnisses assoziiert zu sein. Das Kurzzeitgedächtnis hingegen war kaum betroffen. Darüber hinaus konnte in einer klinischen MRT-Studie zwischen Hippokampus und Subikulum eine räumliche Trennung spezifischer Gedächtnisfunktionen nachgewiesen werden, welche die Bedeutsamkeit des Subikulums im hippokampal-kortikalen Netzwerk verstärkt (Zeineh et al., 2003). Im Gegensatz zum Hippokampus besitzt das Subikulum komplementäre Gedächtnisfunktion, die eine spezifische Kodierung sensorischer Informationen ermöglicht (Deadwyler und Hampson, 2004). Des Weiteren scheint es an der Pathogenese verschiedener neurologisch-psychiatrischer Erkrankungen beteiligt zu sein. Auf der Grundlage von Untersuchungen an Hippokampus-Präparaten von Patienten mit pharmakoresistenter TLE wird dem Subikulum eine entscheidende Funktion in der Generierung von Temporallappenanfällen zugeschrieben (Cohen et al. 2002, 2003; Wozny et al., 2003).

Das Subikulum setzt sich aus drei Schichten zusammen. Die Molekularschicht besteht aus den apikalen Dendriten der subikulären Pyramidenzellen. Die basalen Dendriten reichen bis in tiefere Schichten der subikulären Struktur und das Stratum moleculare dient hauptsächlich der interneuronalen Verschaltung zwischen den Pyramidenzellen. Die Pyramidenzellen im Stratum pyramidale, welche das efferente System bilden, sind im Vergleich zu der Area CA1 weniger dicht angeordnet. Zwischen diesen Neuronen liegen wiederum viele kleinere Zellen, die als Interneurone bezeichnet werden (O'Mara et al., 2001). Die tiefe Schicht, die an den Alveus grenzt, bildet die polymorphe Schicht. Der Alveus besteht aus afferenten und efferenten Fasersystemen und stellt die weiße Substanz des Hippokampus dar (Amaral und Witter, 1995).

Subikuläre Pyramidenzellen lassen sich aufgrund ihres elektrophysiologischen Entladungsverhalten sowohl bei Nagern als auch beim Menschen in zwei Zelltypen

unterteilen (Behr et al., 1996; Mattia et al., 1993; Stewart und Wong, 1993; Taube, 1993; Wozny et al., 2003) (Abbildung 4).

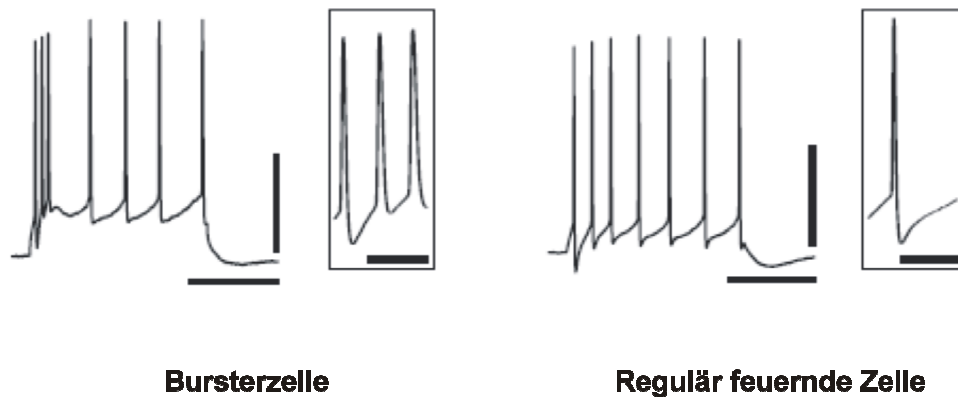


Abb. 4 Subikuläre Zelltypen.

Im Subikulum lassen sich zwei unterschiedliche Zelltypen unterscheiden: Bursterzellen und regulär feuernde Zellen. Maßstabsbalken: 30 mV und 100ms.

Zwei Drittel der subikulären Zellen reagieren auf einen depolarisierenden Strompuls mit einem initialen „Burst“ (= Aktionspotentialsalven) von 2 - 5 Aktionspotentialen und nachfolgenden einzelnen Aktionspotentialen (sog. Bursterzellen). Die übrigen Zellen antworten auf einen Stimulus mit einzelnen Aktionspotentialen ohne initialem Burst (sog. regulär feuernde Zellen) (O'Mara et al., 2001). Bursterzellen weisen keine Akkommodation (= Aktionspotential-Frequenzadaptation, d.h. die Abstände der Aktionspotentiale nehmen während eines depolarisierenden Pulses zu) zwischen den einzelnen Aktionspotentialen auf. Bursts von Aktionspotentialen bzw. die synchronisierte Burstaktivität neuronaler Netzwerke liegen physiologischen Prozessen wie Lern- und Gedächtnisprozessen zugrunde (Pike et al., 1999). Aufgrund weiterer tierexperimenteller Studien scheinen Bursterzellen zudem in der Initiierung von Krampfanfällen eine große Rolle zu spielen, da sie epileptische Entladungen begünstigen (Behr et al., 1996; Yaari und Beck, 2002). Bursts bewirken eine vermehrte Transmitterausschüttung an den jeweiligen Nervenendigungen und führen somit zu einer verstärkten synaptischen Übertragung. Demzufolge kommt es zu einer erhöhten Erregung des neuronalen Zellverbandes, welches wiederum die Wahrscheinlichkeit der pathologischen, epileptischen Synchronisation erhöht. Regulär feuernde Zellen werden vor allem in den oberflächlichen Zellschichten (Stratum moleculare) und Bursterzellen häufiger in den tieferen Schichten (polymorphe Schicht) abgeleitet (Greene und Mason,

1996; Greene und Totterdell, 1997). Zusätzlich publizierte Arbeiten zeigen einen Gradienten von Bursterzellen von der Area CA1 zum Subikulum: Während in der Area CA1 vor allem regulär feuernde Zellen beobachtet werden können, werden im Subikulum überwiegend Bursterzellen nachgewiesen (Staff et al., 2000; Jarsky et al., 2008). Darüber hinaus bestehen zwischen dem Subikulum und dem EC sowie dem Präsubikulum bidirektionale Verbindungen (Köhler, 1986; Funahashi et al., 1999), wobei regulär feuernde Zellen und Bursterzellen unterschiedlich zu diesen Strukturen projizieren (Stewart, 1997). Morphologische Unterschiede hinsichtlich der Somagröße zwischen beiden Zelltypen wurde von Menendez et al. (2002) dargestellt. Das Soma von Bursterzellen wird vergleichsweise größer und die Zellstruktur pyramidal beschrieben.

1.4 Synaptische Plastizität

Neuronale Plastizität liegt sowohl physiologischen (Lernen und Gedächtnis) als auch pathologischen (z.B. im Rahmen der Temporallappenepilepsie) Prozessen zugrunde (Blitzer et al., 2005). Neben funktionellen intrinsischen und synaptischen Prozessen kann die neuronale Erregbarkeit auch durch morphologische und genetische Veränderungen beeinflusst werden. Zur intrinsischen Plastizität zählen unter anderem die Veränderungen von Membraneigenschaften eines Neurons. Zelluläre Erregbarkeit wird im Wesentlichen durch spannungsabhängige transmembranöse Ströme geprägt. Entscheidend sind hier Na^+ -, Ca^{2+} - und K^+ -Ströme, die für De- und Repolarisation im Rahmen sowohl physiologischer als auch pathologisch epileptiformer Membranpotentialänderungen verantwortlich sind. Aufgrund dessen wurden diese Ströme in unterschiedlichsten Epilepsiemodellen näher untersucht (Avoli et al., 2005). Besonders hervorzuheben ist hierbei, dass der Prozentsatz des persistierenden Natriumstroms¹, der unter physiologischen Bedingungen nur 3% des

¹ Man unterscheidet einen schnellen von einem persistierenden Natriumstrom. Der schnelle Natriumstrom trägt den Hauptteil der Einwärtsströme bei der Depolarisation und ist somit für das Aktionspotential verantwortlich. Er inaktiviert rasch. Der persistierende Natriumstrom inaktiviert kaum oder sehr langsam und sorgt folglich für eine lang anhaltende Erregbarkeitssteigerung. Diese wird durch die Fähigkeit der Neurone deutlich, Bursts auf eine Depolarisation hin zu generieren statt einzelner Aktionspotentiale.

Gesamtnatriumstroms ausmacht, im Subikulum des chronisch epileptischem menschlichen Gewebe bei mesialen Temporallappenepilepsien deutlich erhöht ist (Vreugdenhil et al., 2004).

Die synaptische Plastizität betrifft Veränderungen in der Informationsübertragung zwischen Nervenzellen. Die Kurzzeitplastizität (sog. short-term plasticity) stellt eine Form der synaptischen Plastizität dar, die in der Doppelpulsfaszilitierung (paired-pulse facilitation (PPF)) und Doppelpulsdepression deutlich wird: Wenn zwei Stimuli innerhalb eines kurzen Zeitintervalls (10 - 100 ms) die Präsynapse erreichen, dann kann der zweite Stimulus in Abhängigkeit des „Interstimulus-Intervalls“ (10 - 500 ms) die Transmitterausschüttung entweder verstärken (Faszilitierung) oder schwächen (Depression). Die PPF beschreibt somit eine kurzfristige Modulation synaptischer Transmission: Bedingt durch den ersten synaptischen Stimulus befindet sich beim Eintreffen des zweiten Pulses residuales Kalzium ($\sim 1\mu\text{M}$) in der Präsynapse, welches sich zum Kalzium des zweiten Reizes aufsummiert (Jackson et al., 1991; Swandulla et al., 1991, Zucker und Regehr, 2002). Eine Doppelpulsverstärkung nach tetanischer Reizung kann demnach auf einen präsynaptischen Mechanismus zurückgeführt werden und bedingt eine vermehrte Transmitterfreisetzung. Eine Doppelpulsdepression hingegen beruht im Wesentlichen auf eine Verarmung an Transmittermolekülen der Präsynapse (sog. „releaseable pool of docked vesicles“) (Regehr and Stevens, 2000; Zucker und Regehr, 2002). Dabei ist die Antwort auf den zweiten Reiz gegenüber dem ersten kleiner. Das Ausmaß der Transmitterfreisetzung wird durch die sog. Freisetzungswahrscheinlichkeit der Synapse bestimmt. Besitzt eine Synapse eine sehr hohe Freisetzungswahrscheinlichkeit, wird bereits nach dem ersten Stimulus eine große Transmittermenge freigesetzt, so dass auf den zweiten Reiz eine Abnahme der Transmitterfreisetzung zu beobachten ist. Dieses Verhalten wird als Doppelpulsdepression (paired-pulse depression (PPD)) bezeichnet.

1.5 Langzeitpotenzierung

Der Neuropsychologe Donald Hebb formulierte 1949 eine Hypothese wie sensorische Information gespeichert werden könne und damit später wieder abrufbar sei. Bis heute besitzt dieses Postulat Gültigkeit:

„Wenn ein Neuron A wiederholt oder anhaltend zum Feuern eines Neurons B beiträgt, so kommt es zu einem Wachstumsprozess, der dazu führt, dass Neuron A in Zukunft leichter zum Feuern von Neuron B beiträgt.“

Hebb ging davon aus, dass Synapsen zwischen Neuronen dann in ihrer Wirksamkeit verstärkt werden, wenn prä- und postsynaptisches Neuron gleichzeitig aktiv sind und die zeitlich koordinierte Aktivität zweier synaptisch verbundener Neurone dann zu Veränderungen der synaptischen Stärke führen. Dieses Phänomen wird als Plastizität bezeichnet und ermöglicht, Informationen zu kodieren und zu speichern.

Eine wesentliche Eigenschaft erregender Synapsen des Zentralnervensystems ist die Fähigkeit zur Ausbildung einer aktivitätsabhängigen, lang andauernden Veränderung in der Wirksamkeit synaptischer Übertragung. Dieses Phänomen wird wegen der Dauerhaftigkeit der Verstärkung als Langzeitpotenzierung (long-term potentiation (LTP)) bezeichnet (Stevens, 1996). Es stellt ein allgemein anerkanntes Korrelat des Lernvorganges auf zellulärer Ebene dar (Bliss und Collingridge 1993; Malenka und Bear, 2004). Erstmals wurde dieses Ereignis im Tractus perforans des Gyrus dentatus von den Physiologen Terje Bliss und Tim Løvmø 1973 beschrieben (Bliss und Løvmø, 1973).

Es lassen sich zwei grundlegend verschiedene Formen der LTP unterscheiden: die NMDA-Rezeptor²-abhängige versus die Nicht-NMDA-Rezeptor-abhängige LTP. Die NMDA-Rezeptor-abhängige Form der LTP weist vier klassische Eigenschaften auf: eine schnelle Induktion, Eingangsspezifität, Assoziativität und Kooperativität. Eine kurze repetitive Stimulation der Afferenzen führt hier zu einer Aktivierung eines postsynaptisch lokalisierten NMDA-Rezeptors. Neben der Bindung eines Transmittermoleküls ist eine Aktivierung der postsynaptischen Zelle notwendig, um den spannungsabhängigen Magnesiumblock des NMDA-Rezeptors zu lösen. Der NMDA-Rezeptor dient damit als Koinzidenzdetektor, der nur aktiviert ist, wenn zwei Ereignisse in enger zeitlicher und räumlicher Kumulation auftreten: a) die Depolarisierung der Membran und b) die

² Glutamatrezeptoren sind Transmembranproteine in der Neuronenmembran. Sie binden spezifisch den Neurotransmitter Glutamat. Ihre Dichte ist besonders groß in der postsynaptischen Membran. Man unterscheidet ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren. Zu den ionotropen Rezeptoren gehören: NMDA- und non-NMDA-Rezeptoren (AMPA- und Kainatrezeptoren). Metabotrope Glutamatrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die indirekt über intrazelluläre Messenger einen Ionenkanal aktivieren.

Aktivierung des Rezeptors durch Glutamat. Die Eingangsspezifität besagt, dass LTP nur an aktiven Synapsen induziert werden kann. Die Assoziativität bezeichnet das Phänomen, bei dem eine schwache Stimulation an einer Synapse allein keine LTP auslösen kann. In Paarung jedoch mit einer starken Stimulation zu einer Depolarisation der Membran führt. Kooperativität und Assoziativität unterliegen ähnlichen zellulären Mechanismen. Bei der Kooperativität trifft entweder ein starker Stimulus auf eine Synapse und löst somit LTP aus oder mehrere schwache Stimuli treffen auf eine Synapse und induzieren summiert eine LTP.

Man unterscheidet hinsichtlich ihrer Dauer eine frühe Form der LTP (= early-LTP (E-LTP)) von einer späten Form (= late-LTP (L-LTP)) (Winder et al., 1998; Lynch, 2004). Die frühe Form beschreibt einen Prozess, der sich innerhalb der ersten zwei bis drei Stunden abspielt. Sie involviert die Aktivierung von Kinasen und Phosphatasen sowie die Translokation von Rezeptoren in die postsynaptische Membran. Das frühe Stadium der LTP ist, anders als das späte Stadium, unabhängig von RNA-Transkription und Proteinsynthese. Die Ausbildung der E-LTP lässt sich in drei Phasen mit unterschiedlichen Mechanismen unterteilen: Induktion, Transduktion und Expression. Die Induktion einer LTP beschreibt den Prozess, bei dem ein Signal den Beginn einer LTP triggert. Bei der LTP-Induktion an der Schaffer-kollateralen der Area CA1 spielt die Aktivierung von postsynaptischen NMDA-Rezeptoren und der dadurch bedingte Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} eine zentrale Rolle (Abbildung 5) (Bliss und Collingridge, 1993; Malenka und Nicoll, 1999).

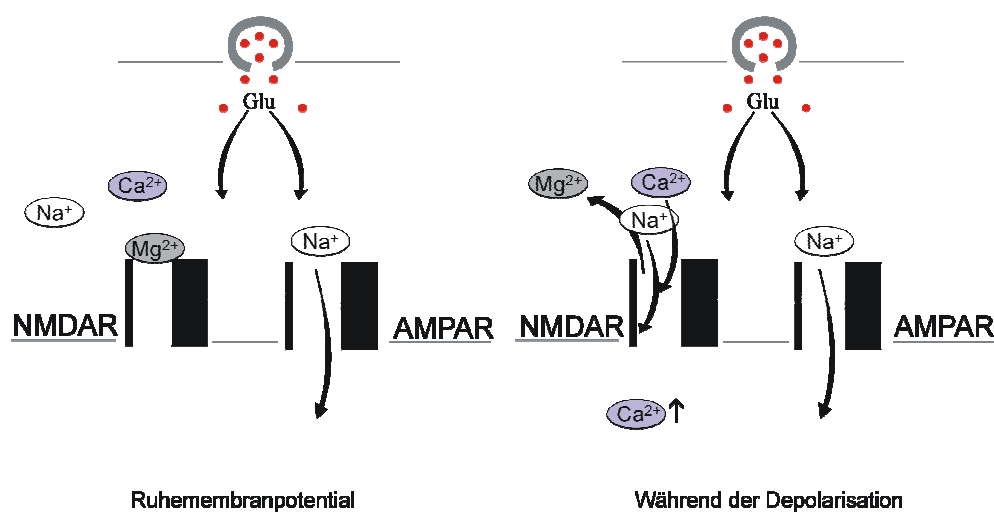


Abb. 5 Molekulare Ereignisse bei der Zelldepolarisation.

Während der synaptischen Transmission wird der Transmitter Glutamat (Glu) freigesetzt. Durch eine Bindung von Glu am AMPA-Rezeptor (AMPA) kommt es zu einer Zunahme der Leitfähigkeit des Kanals und Natrium (Na^+) strömt in die Postsynapse. Magnesium (Mg^{2+}) blockiert beim Ruhemembranpotential die Pore des NMDA-Rezeptors (NMDAR). Erst wenn es zu einer ausreichenden Depolarisation kommt, kann der spannungsabhängige Mg^{2+} -Block aufgehoben werden und Calcium (Ca^{2+}) und Na^+ können durch den Kanal in die Postsynapse strömen. Ca^{2+} fungiert im Zellinneren als second messenger und aktiviert spezifische Enzyme und ist somit der entscheidende Trigger für die Expression der LTP (modifiziert nach Malenka und Nicoll, 1999).

Ob neben dem Einstrom von Ca^{2+} die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern zur Induktion von LTP notwendig ist, ist derzeit unklar (Svoboda und Mainen, 1999). Des Weiteren wird in diesem Zusammenhang den metabotropen Glutamat-Rezeptoren eine wichtige Bedeutung zugeschrieben (McGuinness et al., 1991; Riedel et al., 1995a, 1995b).

Die E-LTP ist von der Aktivität verschiedener Proteinkinasen abhängig. Von besonderer Bedeutung sind die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und die Proteinkinase A (PKA) (Hsu et al., 2000; Lynch, 2004). Die CaMKII ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, welches in hoher Konzentration in der Postsynapse vorkommt und eine wesentliche Funktion in der Signalübertragung besitzt (Malenka et al., 1989; Malinow et al., 1989; Malenka und Nicoll, 1999; Lisman et al., 2002). Die CaMKII spielt sowohl bei der LTP-Expression als auch bei der Induktion eine bedeutsame Rolle (Fukunaga et al., 1995). Neben der Fähigkeit zur persistierenden Autophosphorylierung, um insbesondere einen Ca^{2+} -unabhängigen Zustand zu erreichen (Lisman et al., 1997, 2002; Giese et al., 1998), phosphoryliert sie die GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors und trägt über eine erhöhte Leitfähigkeit des Rezeptorkanals zur Expression der LTP bei (Derkach et al., 1999; Lee et al., 2000). AMPA-Rezeptoren spielen neben den NMDA-Rezeptoren eine große Rolle für die synaptische Plastizität. Im Hippokampus wird die Dichte der AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran von der Aktivität der Synapse reguliert. Die CaMKII bewirkt über noch nicht vollständig geklärte Mechanismen einen vermehrten Einbau von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran und führt somit zu einer Zunahme der Übertragungsstärke (Malenka und Nicoll, 1999; Hayashi et al., 2000; Lisman und Zhabotinsky, 2001; Zhang et al., 2005; Lisman und Raghavachari, 2006). Der Einbau von AMPA-Rezeptoren während der E-LTP ist unabhängig von der Proteinsynthese (Abbildung 5). Eine solche Veränderung der zellulären Lokalisation von AMPA-Rezeptoren bewirkt eine

Umwandlung von sog. stummen Synapsen („silent synapses“) in signalgebende Synapsen (Shi et al., 1999).

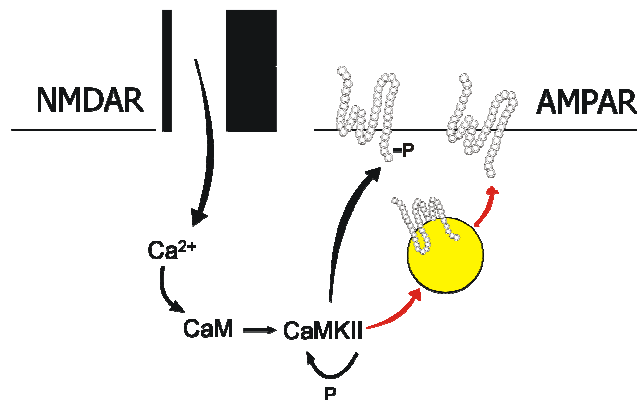


Abb. 5 CaMKII und LTP-Induktion.

Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors (NMDAR) führt zur LTP-Induktion. Die dadurch bedingte postsynaptische Calcium (Ca²⁺)-Erhöhung führt wiederum zu einer Aktivierung der Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII). Neben der Autophosphorylierung sowie der Phosphorylierung (P) von AMPA-Rezeptoren (AMPA) kommt es gleichzeitig zu einem vermehrten Einbau von AMPAR in die postsynaptische Membran (modifiziert nach Malenka und Nicoll, 1999).

Tierexperimentellen Studie verdeutlichen, dass die CaMKII eine wichtige Rolle in Lern- und Gedächtnisprozessen spielt. So konnte mit dem selektiven CaMKII-Blocker KN-62 die LTP-Induktion blockiert werden (Bortolotto und Collingridge, 1998). Darüber hinaus zeigten tierexperimentelle Untersuchungen mit dem gleichen Inhibitor, dass die Perfusion des Hippokampus mit KN-62 zu einer retrograden Amnesie führt (Lynch, 2004). Eine verminderte Autophosphorylierung der CaMKII scheint darüber hinaus mit einer Störung der LTP-Induktion und des räumlichen Gedächtnisses assoziiert zu sein (Giese et al., 1998).

Neben der CaMKII spielt die Proteinkinase A (PKA) eine besondere Rolle in der LTP (Nguyen und Woo, 2003; Xia und Storm, 2005; Young et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die cAMP-Konzentration und die PKA-Aktivität nach der Induktion einer LTP verstärkt sind (Huang und Kandel, 1994). Zudem phosphoryliert die PKA den AMPA-Rezeptor und führt somit ebenfalls zu einer verstärkten Rezeptorleitfähigkeit. In einer weiteren Studie konnte unter Verwendung eines selektiven PKA-Blockers (H-89) die LTP blockiert werden (Nguyen und Woo, 2003).

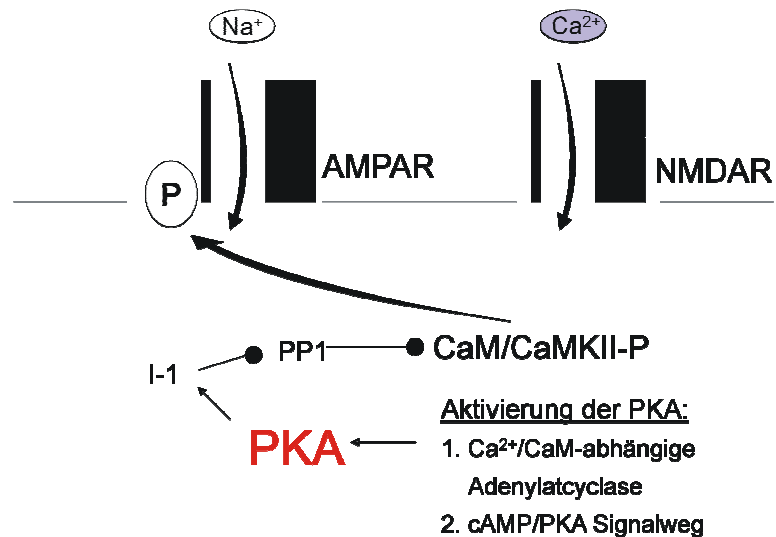


Abb. 6 Rolle der PKA bei der E-LTP.

Signalweg der Proteinkinase A (PKA): Die PKA phosphoryliert den AMPA-Rezeptor (AMPA) nicht direkt, sondern trägt indirekt über die Phosphorylierung (P) des Regulatorprotein I-1 dazu bei. Dadurch bedingt kommt es zu einer Blockierung der Proteinphosphatase-1 (PP1), wodurch der Autophosphorylierungsprozess der Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) durch PP1 nicht unterbrochen werden kann (Blitzer et al., 1998; Shobe, 2002; Nguyen und Woo, 2003). CaMKII bleibt somit aktiv und bewirkt eine Erhöhung der Leitfähigkeit des AMPA-Rezeptors.

Neben postsynaptischen Mechanismen spielen auch präsynaptische Faktoren eine wichtige Rolle in der LTP-Induktion. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Forskolin als membranpermeable Substanz die Adenylatcyclase aktiviert, somit die cAMP-Konzentration in der Präsynapse erhöht und in Folge zu einer erhöhten Transmitterfreisetzung führt (Nguyen und Kandel, 1996). Die wesentliche Bedeutung des Second Messengers cAMP für Lern- und Gedächtnisprozesse konnte bereits in zahlreichen genetischen und pharmakologischen Studien nachgewiesen werden (Nguyen und Woo, 2003; Ferguson und Storm, 2004). So führte eine genetische Inaktivierung des cAMP-Signalwegs zu einer Beeinträchtigung von Lern- und Gedächtnisprozessen (Wu et al., 1995). Wohingegen in einem Modell mit transgenen Mäusen ein erhöhter Level an cAMP mit einer verbesserten Gedächtnisleistung assoziiert war (Wang et al., 2004). Für die hippocampale Moosfasersynapse ist ebenfalls beschrieben, dass die Induktion einer LTP sowohl über die Aktivierung der CaMKII als auch durch die Aktivierung der PKA bedingt ist (Weisskopf et al., 1994). In einer Studie von Commins et al. konnte für die CA1-Subikulum Synapse gezeigt werden, dass hochfrequente Stimulation LTP unter in vivo Bedingungen induziert

(Commins et al., 1998b), wobei ein präsynaptischer Mechanismus vermutet wurde (Commins et al., 1998a). Detaillierte Patch-clamp Untersuchungen zur LTP an der CA1-Subikulum Synapse wiesen ebenfalls auf einen präsynaptischen Mechanismus hin (Kokaia, 2000). Zudem konnten Wozny et al. (2008a) an der CA1-Subikulum Synapse zeigen, dass bei der LTP-Induktion unterschiedliche Mechanismen in Bursterzellen und regulär feuernenden Zellen involviert sind. Durch eine Aktivierung des Second Messengers cAMP mittels der Applikation von Forskolin konnte in subikulären Bursterzellen eine LTP induziert werden. In regulär feuernenden Zellen hingegen nicht (Wozny et al., 2008b). Darüber hinaus konnte in derselben Studie gezeigt werden, dass eine Blockade der PKA zu einer Beeinträchtigung der LTP in subikulären Bursterzellen führt.

Die LTP-Transduktion umfasst die biochemischen Mechanismen, die durch die LTP-Induktion aktiviert werden. Die Expression schließlich hat lang andauernde zelluläre Veränderungen zur Folge. Für die LTP-Expression existieren sowohl prä- als auch postsynaptische Mechanismen. Postsynaptisch werden die Phosphorylierung sowie der Einbau von AMPA-Rezeptoren als wesentlicher Mechanismus der LTP-Expression angesehen (Malenka und Nicoll, 1999). Insbesondere die AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR1 scheint bedeutsam für die Expression einer LTP zu sein (Hayashi et al., 2000). Zudem wurden verschiedene membrandurchlässige retrograde Botenstoffe diskutiert, welche nach postsynaptischer Induktion zu einer präsynaptischen Expression der LTP in Form einer erhöhten Transmitterfreisetzung und stärkere Aktivierung der sensitivierten Postsynapse führen. Hierzu gehören insbesondere Stickstoff und Arachidonsäure (Malenka und Nicoll, 1999). Schließlich treten neben funktionellen Veränderungen der Prä- und Postsynapse auch morphologische Veränderungen auf. Untersuchungen auf subzellulärer Ebene konnten zeigen, dass sich an postsynaptischen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen bereits 30 Minuten nach chemisch induzierter LTP neue synaptische Kontaktstellen (sog. Dornfortsätze (Spines)) entwickeln, an denen sich wiederum neue Synapsen ausbilden können (Engert und Bonhoeffer, 1999).

Die späte Form der LTP (L-LTP) kann über einen Zeitraum von bis zu 8 Stunden *in vitro* (Frey et al., 1993) und für einige Monate *in vivo* (Abraham et al., 2002) andauern. Diese Form beschreibt die Transkription und Translation von Genen und geht mit strukturellen Veränderungen an der Synapse einher (Bliss und Collingridge, 1993). Die L-LTP wird als die natürliche Folge der E-LTP betrachtet. Kontrovers wird allerdings diskutiert, ob

die L-LTP getrennt von der E-LTP induziert werden kann (Nguyen und Woo, 2003; Xia und Storm, 2005). Die L-LTP umfasst zudem zwei weitere Phasen: die erste Phase ist abhängig von der Proteinsynthese, wohingegen die zweite Phase sowohl von der Transkription als auch von der Proteinsynthese abhängt. Diese beiden Phasen werden auch als LTP2 und LTP3 bezeichnet und die E-LTP demnach als LTP1. In der hier vorgestellten Studie wurde die E-LTP untersucht.

1.6 Langzeitdepression

Von der lang anhaltenden Potenzierung synaptischer Transmission unterscheidet man die lang anhaltende Depression. Hierbei kann im Gegensatz zur LTP eine Abschwächung der synaptischen Effizienz beobachtet werden. Dieses Phänomen wird als Langzeitdepression (LTD) bezeichnet. Es wird durch repetetive niederfrequente Stimulation (0.5-5 Hz) präsynaptischer Axone hervorgerufen und hat eine lang anhaltende Abnahme der synaptischen Transmission zur Folge (Malenka und Nicoll, 1993; Kemp und Bashir, 2001). Die LTD ist in der CA1-Region sowohl vom NMDA- als auch von metabotropen Glutamat-Rezeptoren abhängig. Darüber hinaus ist ein postsynaptischer intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg notwendig (Dudek und Bear, 1992; Mulkey und Malenka, 1992; Bolshakov and Siegelbaum, 1994). Analog zur LTP ist bei der NMDA-abhängigen Form der LTD der postsynaptische Einstrom von Kalziumionen der entscheidende Induktionsmechanismus. Durch die vergleichsweise geringere Kalziumerhöhung nach niederfrequenter Stimulation werden spezifische Second-Messenger-Systeme aktiviert, die eine LTD bewirken. Im Rahmen dessen wird eine Dephosphorylierung der PKA beschrieben ohne eine gleichzeitige Änderung des Phosphorylierungsgrades der CaMKII (Kemp und Bashir, 2001). Dadurch kommt es zu einer Dephosphorylierung des AMPA-Rezeptors und in Folge zu einer verringerten Öffnungswahrscheinlichkeit des Rezeptors. Zudem kann im Zusammenhang mit der LTD-Induktion eine Internalisierung von AMPA-Rezeptoren beobachtet werden. Bisher ist allerdings nur wenig bekannt über die LTD an der CA1-Subikulum Synapse. In einer *in vitro* Studie von Li et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass gepaarte niederfrequente Stimulation LTD im Subikulum junger Ratten hervorruft. *In vivo* konnte hingegen durch die Applikation niederfrequenter Reizung nach einem spezifischen Protokoll, von dem man weiß, dass es LTD in der Area CA1 auslöst (Kemp und Bashir,

2001), keine LTD in subikulären Pyramidenzellen induziert werden. Es zeigte sich hierbei lediglich eine schwache Potenzierung (Anderson et al., 2000). Darüber hinaus beobachteten Fidzinski et al. (2008) in einer kürzlich veröffentlichten Studie, dass Bursterzellen und regulär feuernde Zellen zwei unterschiedliche Formen der LTD an der CA1-Subikulum Synapse aufweisen. In Bursterzellen konnte nach niederfrequenter Reizung eine LTD induziert werden, bei der ein postsynaptischer Mechanismus beteiligt war. In regulär feuernenden Zellen konnte hingegen nach dem gleichen Stimulationsprotokoll eine LTP beobachtet werden, die sich vom metabotropen Glutamatrezeptor abhängig darstellte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass LTD an der CA1-Subikulum Synapse sowohl in Bursterzellen als auch in regulär feuernenden Zellen vom spannungsabhängigen Kalziumkanal abhängig ist (Shor et al., 2009). Die Funktion der lang anhaltenden Depression synaptischer Transmission wird hingegen kontrovers diskutiert. Einerseits vermutet man, dass die LTD - ähnlich wie bei der LTP - der Speicherung von Gedächtnisinhalten dient (Levy und Steward, 1979; Dudek und Bear, 1992; Heynen et al., 1996) und andererseits könnte LTD das „neuronale Substrat des Vergessens“ darstellen (Tsumoto 1993) und somit dem Löschen nicht mehr benötigter Informationen dienen. Denkbar wäre auch, dass LTD über eine verminderte Erregbarkeit eines Neurons als eine Art Filter sensorischer Informationen fungiert (Bear und Abraham, 1996).

1.7 Metaplastizität

Als Erweiterung des Aspektes der Assoziativität werden mit dem Begriff der Metaplastizität Änderungen in der synaptischen Aktivität höherer Ordnung beschrieben, die die Feinabstimmung eines zellulären Verbandes beinhalten. Unter Metaplastizität versteht man demnach das Phänomen, bei dem die vorherige Erfahrung einer Synapse Auswirkung auf die Art und Ausbildung von lang andauernder Plastizität hat. Zellen bilden in Abhängigkeit ihrer Vergangenheit bei Stimulation entweder LTP (Langzeitpotenzierung) oder LTD (Langzeitdepression) aus. Synapsen sind meist bidirektional beeinflussbar und die Aktivierung von bestimmten Neurotransmitterrezeptoren beispielsweise spielt eine entscheidende Rolle dabei, welche Form von Plastizität, d.h. LTP oder LTD, ausgebildet wird (Bear und Malenka, 1994). Der entscheidende Mechanismus sowohl für die Induktion einer LTP als auch

einer LTD ist der postsynaptische Kalziueinstrom. Je nach Stärke der präsynaptischen Stimulation wird an vielen erregenden Synapsen innerhalb des ZNS eine LTP oder LTD induziert. Erklärt werden kann diese Bidirektionalität der synaptischen Plastizität durch das BCM-Modell (Bienenstock, Cooper und Munro, 1982). Das Modell besagt, dass jedes Neuron eine unterschiedliche Reizschwelle für Modifikationen besitzt. Diese Reizschwelle entscheidet dann, ob die Aktivierung des Neurons zu einer synaptischen Verstärkung oder Abschwächung führt und ist abhängig von der vorherigen synaptischen Aktivität. Von besonderer Bedeutung ist hierbei der unterschiedliche Schwellenwert für die postsynaptischen Kalziumkonzentration. Vereinfacht betrachtet, steigt bei hoher Frequenz des Stimulus die Konzentration des intrazellulären Ca^{2+} stark an und es werden spezielle Proteinkinasen aktiviert, die eine LTP induzieren. Eine schwächere Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert wiederum spezifische Kinasen, die eine LTD bewirken. Des Weiteren ist die Form der synaptischen Plastizität, LTP oder LTD, davon abhängig, wann der Stimulus die Postsynapse erreicht. Zur LTP kommt es nur, wenn die postsynaptische Membran 0 - 20 ms nach Erregung des NMDA-Rezeptors depolarisiert ist. Ist sie bereits davor depolarisiert, wird eine LTD induziert (Bi und Poo, 1998).

Der Zustand einer Synapse ist demnach kein starres Modell, sondern unterliegt vielmehr einer Dynamik (Bienenstock et al., 1982; Abraham, 1996; Abraham und Bear, 1996; Abraham und Tate, 1997). In diesem Zusammenhang könnten Prozesse eine Rolle spielen, die die funktionelle Dynamik von Synapsen beeinträchtigen wie z.B. hochfrequente synaptische Aktivität wie sie bei epileptischen Anfällen auftritt (Abraham et al., 2002).

1.8 Epilepsiemodelle

Das Krankheitsbild Epilepsie ist eine heterogene Erkrankung unterschiedlicher Ätiologie, bei der eine systemische Hypersynchronisation von Nervenzellen im Gehirn beschrieben wird. Warum Nervenzellen im Gehirn während eines epileptischen Anfalls synchronisierte Aktionspotentiale erzeugen und sich in der Zwischenzeit physiologisch verhalten, ist bisher nicht vollständig geklärt. Auch existiert heutzutage wenig Wissen darüber, inwiefern sich die für eine Epilepsie typische Übererregbarkeit im

Nervengewebe auf spezifische Verarbeitungsprozesse wie in der Gedächtnisbildung auswirkt. Von dem Hippokampus weiß man heutzutage, dass er als ein Teil des medialen Temporallappens von besonderer Bedeutung für das deklarative Gedächtnis ist (Squire et al., 2004) und Patienten mit Temporallappenepilepsie an schweren Gedächtnisstörungen leiden (Elger, 2005; Leritz et al., 2006). Bereits 1976 berichteten Hesse und Teyler, dass die LTP als ein allgemein anerkanntes zelluläres Modell für Lern- und Gedächtnisprozesse im Hippokampus durch vorherige epileptische Aktivität deutlich reduziert ist (Hesse und Teyler, 1976). Später konnte gezeigt werden, dass epileptische Aktivität die Induktion einer LTP in der Area CA1 inhibiert (Moore et al., 1993; Barr et al., 1997; Hsu et al., 2000). Mögliche relevante Proteinkinasen sind in der Area CA1 neben der CaMKII auch die PKA, die eine zentrale Rolle in der postsynaptischen LTP-Induktion spielen (Malenka und Nicoll, 1999; Nguyen und Woo, 2003). Präsynaptisch hat das cAMP eine bedeutsame Funktion (Weisskopf et al., 1994). Die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen im Subikulum sind hingegen kaum untersucht und Gegenstand dieser Arbeit.

Um pathophysiologische Mechanismen einer Epilepsie detaillierter untersuchen zu können, wurden in den vergangenen Jahrzehnten eine Vielzahl tierexperimenteller Modelle entwickelt. Wobei Untersuchungen zu grundlegenden Mechanismen der Gedächtnisbildung bzw. Störungen in der Gedächtnisverarbeitung, die im Tiermodell erhoben worden sind, womöglich auf Gedächtnisprozesse im Menschen übertragen werden können (Kandel, 1976). Tiermodelle bieten daher die Möglichkeit, die Epilepsie typische Hypersynchronisation des Nervengewebes nachzustellen und diese elektrophysiologisch näher zu untersuchen. Man unterscheidet akute (Niedrig-Magnesium-Modell) und chronische Epilepsiemodelle (Pilocarpin-Modell).

1.8.1 In vitro Modell der Temporallappenepilepsie: Niedrig-Magnesium-Modell

Das Niedrig-Magnesium-Modell ist ein etabliertes Modell in der experimentellen Epilepsieforschung. Es konnte gezeigt werden, dass die Erniedrigung von Magnesium in der Nährlösung zu epileptiformer Aktivität in Hirnschnitten der Ratte führt (Mody et al., 1987; Walther et al., 1986), welche elektrographisch den EEG-Aufnahmen eines epileptischen Anfalls beim Menschen ähnlich ist.

Der Entzug von Mg^{2+} in der Nährlösung bedingt eine Negativierung des zellulären Oberflächenpotentials und infolge dessen kommt es zu einer Depolarisierung des transmembranösen Potentials (Stanton, 1992; Jeffreys, 1998). Der Mg^{2+} -Block des NMDA-Rezeptors wird aufgehoben, so dass der Kanal nicht weiter blockiert wird und damit für mono- und bivalente Ionen geöffnet ist. Von diesen Ionen kommt Kalzium die größte Bedeutung zu. Die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Depolarisation steigt mit der Dauer der Auswaschphase. Die Folge ist ein Ungleichgewicht zwischen erregender und hemmender Neurotransmission (Coan und Collingridge, 1985; Wilson et al., 1986; Tancredi et al., 1990). Während in der Area CA1 und CA3 kurze rekurrente Entladungen auftreten, können durch die Veränderung des extrazellulären Ionenmilieus bis zu 70 Sekunden andauernde tonisch-klonische Entladungen im Subikulum sowie im EC beobachtet werden (Anderson et al., 1986; Dreier und Heinemann, 1991). Diese anfallsartigen Ereignisse lassen sich durch derzeit gebräuchliche Antikonvulsiva nicht blockieren und dienen somit als Modell des therapierefraktären Status epilepticus (Dreier und Heinemann, 1991).

1.8.2 In vivo Modell der Temporallappenepilepsie: Pilocarpin-Modell

Das Pilocarpin-Modell ist ein etabliertes Modell der chronischen TLE. In Pilocarpin-behandelten Tieren konnte bisher im Subikulum gezeigt werden, dass die einmalige Applikation von Pilocarpin mit Zelluntergängen und morphologischen Veränderungen wie einer verminderten „spine density“ und einer verminderten Verzweigung der Axone im proximalen Teil der Dendriten assoziiert ist. Ein Zellverlust, der mit ~ 30 % beschrieben wird (Knopp et al., 2005), ist hingegen weniger stark ausgeprägt als z.B. in der Area CA1 beschrieben (Wellmer et al., 2002). Darüber hinaus wurde in Pilocarpin-behandelten Tieren im Vergleich zu Untersuchungen unter Kontrollbedingungen ein inverses Verhältnis von Bursterzellen zu regulär feuernenden Zellen mit 1:2 beobachtet. Axonales „Sprouting“, d.h. eine Veränderung des axonalen und dendritischen Verzweigungsmuster von Neuronen zur Ausbildung neuer neuronale Kontaktstellen, wie es unter anderem in der Area CA1 und CA3 der hippocampalen Formation beschrieben wird, konnte im Subikulum bisher nicht gesehen werden (Knopp et al., 2005).

1.8.3 Selektive Hippokampektomie von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie

Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen zur LTP an Hirnschnitten bei Patienten, die an einer pharmakoresistenten TLE leiden. Ein wesentliches Merkmal der TLE ist die Ammonshornsklerose, die durch Zellverluste im Bereich des Hippokampus und hier besonders im Bereich der Area CA1 und CA3 gekennzeichnet ist. Das nachgeschaltete Subikulum zeigt hingegen nur einen geringen Zellverlust. Unter der Vorstellung, dass epileptische Aktivität in den mesialen Strukturen des Temporallappens generiert wird, konnte in Studien gezeigt werden, dass dem Subikulum eine wesentliche Bedeutung in der Generierung von Anfällen zugeschrieben werden muss (Cohen et al., 2002, 2003; Wozny et al., 2003). Die Ursachen für eine erhöhte Erregbarkeit des Subikulums sind bislang nicht eindeutig geklärt. Im resezierten Gewebe von Patienten mit TLE lassen sich im Subikulum beide Zelltypen nachweisen (Wozny et al., 2003, 2005). Zur Plastizität und funktionellen Bedeutung dieser beiden Zelltypen im humanen Subikulum gibt es bisher keine Untersuchungen.

2. Fragestellungen

Das Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, inwieweit die synaptische Plastizität im Subikulum bei Vorliegen einer Temporallappenepilepsie (TLE) im Vergleich zu Kontrollbedingungen verändert ist. Es erfolgten Untersuchungen der synaptischen Plastizität mit Hilfe des Modells der Langzeitpotenzierung (LTP) bzw. -depression (LTD) und des Paired-Pulse-Verhaltens (Doppelpulsverhalten) unter Kontrollbedingungen sowie nach Perfusion der Hirnschnitte mit Niedrig-Magnesiumlösung, in Hirnschnitten Pilocarpin-behandelter Tiere und an hippocampalen Hirnschnitten von Patienten mit TLE. In Hirnschnitten, bei denen mit Hilfe des Niedrig-Magnesium-Modells epileptische Aktivität in vitro induziert wurde, erfolgte zudem das Einwaschen von Pharmaka in die Badlösung, um die beteiligten Mechanismen einer veränderten Plastizität näher zu bestimmen. Sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Ableitungen sind durchgeführt worden, um folgende Fragen zu klären:

1. Gibt es Unterschiede in der zellspezifischen (Bursterzellen versus regulär feuernde Zellen) Induktion einer LTP bzw. LTD?
2. Welchen Einfluss haben Pilocarpin-induzierte Anfälle auf die Induktion einer subikulären LTP und LTD? Gibt es zellspezifische Unterschiede?
3. Zeigt sich bei einer Temporallappenepilepsie eine veränderte synaptische Plastizität in subikulären humanen Pyramidenzellen? Sind die Ergebnisse vergleichbar mit denen in der jeweiligen tierexperimentellen Gruppe?
4. Ist eine vergleichbare subikuläre LTP wie sie unter Kontrollbedingungen beobachtet werden kann in hippocampalen Hirnschnitten nach einer Perfusion mit Niedrig-Magnesiumlösung induzierbar? Welche Rolle spielt die PKA im Rahmen der synaptischen Plastizität im Niedrig-Magnesium-Modell?

3. Methoden

3.1 Hirnschnittpräparation

Die Experimente erfolgten an adulten (> 6 Wochen) Wistar-Ratten beider Geschlechter. Zur Anfertigung der Hirnschnitte wurden die Tiere zuvor in tiefe Äthernarkose versetzt und durch Dekapitation getötet. Anschließend wurden die Gehirne entnommen und in eisgekühlte (4 °C) und begaste (Carbogen: 95% O₂, 5% CO₂) ACSF (artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit) -Lösung überführt. Mittels eines Vibratomes (Campden Instruments, Loughborough, UK) wurden 400 µm dicke Hirnschnitte abgetragen. Die horizontalen Schnitte setzten sich aus der hippocampalen Formation, dem entorhinalen und perirhinalen Kortex sowie temporalen Kortexanteilen zusammen. Anschließend erfolgte der Transfer der Hirnschnitte in eine Interfacemesskammer (siehe 3.2), die mit ACSF-Lösung (32 - 34 °C) perfundiert wurde. Nach einer Ruhephase von mindestens einer Stunde zur Äquilibration wurden die Schnitte elektrophysiologisch untersucht.

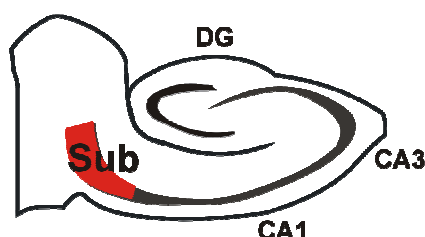


Abb. 7 Darstellung des Hippokampus in der Präparation.

Die Experimente wurden in horizontalen Hirnschnitten durchgeführt. Die Abbildung zeigt die laminare Struktur der hippocampalen Formation der Ratte (Gyrus dentatus (DG), Ammonshorn (CA), Subikulum (Sub)) (modifiziert nach Hammond C, Cellular and Molecular Neurobiology, Academic Press, 2001).

3.2 Elektrophysiologische Methoden

Zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden zur Messung neuronaler elektrischer Aktivität kommen in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz: Die extrazelluläre Messung von Feldpotentialen und die intrazelluläre Ableitung.

3.2.1 Extrazelluläre Messungen

Die Durchführung der Experimente erfolgte in einer Interfacemesskammer. Bei dieser Messkammer handelt es sich um einen Plexiglaszylinder, bei dem durch eine Vertiefung im Deckel eine Kammer entsteht. Unterhalb dieser Perfusionskammer befand sich ein bis zur Hälfte mit destilliertem Wasser gefüllter Raum, der mit Hilfe einer eingebauten Heizspirale unter Kontrolle einer Temperatursonde auf eine Temperatur von 32 - 34 °C reguliert wurde. Das destillierte Wasser wurde kontinuierlich mit Carbogen begast und das angewärmte und zu 100 % wasserdampfgesättigte Gas in die Perfusionskammer geleitet. Die Schnitte wurden zudem kontinuierlich mit ACSF-Lösung (in mM (pH 7,4): NaCl 129, NaH₂PO₄ 1,25, NaHCO₃ 21, KCl 3, CaCl₂ 1,6, MgSO₄ 1,8, Glucose 10, pH) perfundiert (Perfusionsrate 1,5 - 2,0 ml/min).

Bei extrazellulären Messungen wurde die Glasmikroelektrode nahe am Zellkörper positioniert und das elektrische Feldpotential in der Nähe der Zellsomata gemessen. Zur Aufzeichnung der Feldpotentiale in der Pyramidenzellschicht des Subikulums wurde eine mit ACSF gefüllte Glaselektrode mit einem Widerstand von ~ 2 MΩ verwendet. Die alveären Axone der Pyramidenzellen der Area CA1 wurden mittels einer bipolaren Platin-Drahtelektrode (= Reizelektrode, Abstand der beiden Platindrähte zueinander: 50 - 100 µm) stimuliert. Die Induktion der LTP erfolgte mit vier tetanischen Reizungen à 100 Hz (Dauer 1 s, Interstimulusintervall 10 s). Um das Ausmaß der LTP nach hochfrequenter Stimulation beurteilen zu können, wurde nachfolgend über einen Zeitraum von 30 min mit einem Doppelpuls (alle 60 s, Interstimulusintervall 60 ms) aufgezeichnet. Die Reizstärke betrug dabei 50 - 60 % der maximalen Antwort, die dann erreicht war, wenn auf einer weiteren Erhöhung der Stimulationsintensität keine weitere Zunahme der Potentialamplitude folgte.

Um LTD zu induzieren, wurde ein Reizparadigma von 900 Doppelpulsen mit einer Frequenz von 1 Hz (Interstimulusintervall 50 ms, Dauer 15 Minuten) verwendet.

3.2.2 Intrazelluläre Messungen

Die intrazellulären Messungen erfolgten in der Stromklemme mit scharfer Mikroelektrode (~ 40 - 100 MΩ, gefüllt mit 2,5 mM Kaliumacetat). Diese Technik hat den Vorteil, dass sie das intrazelluläre Milieu nicht beeinflusst und somit postsynaptische

Transduktionskaskaden nicht ausgewaschen werden. Unter mikroskopischer Sicht wurde die Elektrode im Subikulum platziert und mittels eines Manipulators tiefer in den Schnitt vorgefahren. Durch einen oszillierenden Strompuls (Dauer 20 - 30 ms) und unter ständiger Verabreichung einer hypopolarisierenden Strominjektion (- 0,5 nA) konnte die Zellmembran beim Übergang zur Ganzzelleableitung penetriert werden. Nach Stabilisierung des Ruhemembranpotentials wurde die Zelle mit hyper- und depolarisierenden Strominjektionen (0,1 - 1 nA) auf ihre intrinsischen Eigenschaften hin untersucht. In der Stromklemme kann durch rechteckförmige Strominjektion eine De- oder Hyperpolarisation der Zellmembran abgeleitet werden, die die passiven Aufladevorgänge der Zelle widerspiegeln. Die Zelle wurde auf ihr Akkomodations- und Entladungsverhalten hin untersucht. Die Reizstärke wurde so gewählt, dass die EPSP (exzitatorisch postsynaptisches Potential) -Amplitude unter Kontrollbedingungen 50 - 60 % der maximalen EPSP Amplitude betrug. Die Induktion der LTP erfolgte wie bei den extrazellulären Messungen mit vier hochfrequenten Stimuli à 100 Hz. Nachfolgend wurde mit einem Doppelpuls (Intervallstimulus 60 ms, alle 30 s) über einen Zeitraum von 30 min aufgezeichnet, um das Ausmaß der frühen LTP beurteilen zu können. In den intrazellulären Experimenten wurde die GABAerge Transmission mit dem GABA_A-Rezeptor Antagonisten Bicucullin gehemmt, um auszuschließen, dass die LTP durch eine Abnahme der GABA_A-vermittelten Inhibition bedingt war. Während des hochfrequenten Stimulationsprotokolls wurde darauf geachtet, dass beide Zelltypen keine Aktionspotentiale feuerten, um somit ausschließen zu können, dass die LTP durch einen vermehrten intrazellulären Kalziumeinstrom verursacht wurde. Dabei wurden bei Auswertung der Signale die Zeitverläufe der Potenzierung beobachtet und es zeigte sich ein typischer Abfall der EPSPs nach wenigen Pulsen. Solche Zellen, die ein Aktionspotential während eines Tetanus feuerten, wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen. Darüber hinaus fanden die Experimente unter extrazellulärem ACSF mit 4mM CaCl₂ und MgSO₄ statt, um repetitive Nachentladungen zu vermeiden.

3.3 Pilocarpin-Modell der Temporallappenepilepsie

Adulte Wistar-Ratten (4 - 6 Wochen alt, 130 – 200 g schwer) erhalten durch intraperitoneale Applikation den muskarinergen Agonisten Pilocarpin (340 mg/kg KG), um einen Status epilepticus auszulösen. Vor der Pilocarpininjektion erhalten die Tiere

Methylscopolamin (1 mg/kg KG, subkutan), um cholinerge Nebenwirkungen zu reduzieren. Methylscopolamin kann aufgrund seiner quartären Ammoniumgruppe die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren, so dass nur die peripheren cholinergen Wirkungen des Pilocarpins aufgehoben werden. Mit Hilfe eines knock-out Mausmodell konnten Hamilton et al. (1997) zeigen, dass Pilocarpin-induzierte Anfälle auf den muskarinischen Rezeptor M_1 zurückgeführt werden können. Pilocarpin bedingt durch die Bindung an M_1 -Rezeptoren eine erhöhte Leitfähigkeit der Zellmembran für Ca^{2+} und K^+ und führt somit zu einer gesteigerten Erregbarkeit des Nervengewebes. 10 bis 30 Minuten nach der Pilocarpininjektion entwickeln die Tiere einen Status epilepticus. Nach 90 Minuten wird der Status epilepticus pharmakologisch mit Diazepam (5 - 10 mg/kg KG, intraperitoneal) unterbrochen. Nach einem anfallsfreien Intervall von durchschnittlich 2 Wochen entwickeln die Tiere spontane epileptische Anfälle. Um sowohl die Frequenz der Anfälle als auch die Ausprägung der einzelnen Anfälle zu protokollieren, wurden die Tiere nach 6 - 8 Wochen (400 - 600 g) für 3 - 10 Tage mit Videokamera überwacht. Es wurden nur Tiere für die Versuche verwendet, die spontane Anfälle zeigten. Die Kontrollgruppe wurde analog den Pilocarpin-behandelten Tieren behandelt, mit der Ausnahme, dass den Kontrolltieren anstelle von Pilocarpin physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert wurde. Zudem erhielten die Kontrolltiere entsprechend der Pilocarpin-behandelten Tiere Diazepam (5 - 10 mg/kg KG, intraperitoneal).

3.4 Epilepsiechirurgische Hippokampektomie von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie

Das humane Gewebe in der vorliegenden Arbeit stammte von Patienten mit einer pharmakoresistenten TLE. Patienten mit Ammonshornsklerose (AHS) waren zwischen 34 und 49 Jahre alt (42 ± 2) und litten an einer TLE für 29 ± 4 Jahre ($n=8$). Patienten ohne AHS (non-AHS) waren zwischen 24 bis 48 Jahre alt (38 ± 6) mit einer Epilepsie, die über 12 ± 3 Jahre ging ($n=5$). Eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten lag vor und die Studie war von der Ethikkommission der Charité - Universitätmedizin Berlin genehmigt (EA1/042/04). Der Hippokampus wurde im OP-Saal im Block entfernt und in eine $4\text{ }^\circ\text{C}$ kalte ACSF-Lösung (in mM: KCL 3, NaH_2PO_4 1,26, Glucose 10, MgSO_4 2, MgCl_2 2, CaCl_2 1,6, NaHCO_3 21, Sucrose 200, α -

Tocopherol 0,1, pH 7.4, Osmolarität 300 mosmol/l) transferiert. Das Natriumchlorid wurde vergleichsweise zur physiologischen ACSF-Lösung erniedrigt, um einem durch Hypoxie bedingten Natriumeinstrom in den Nervenzellen vorzubeugen. α -Tocopherol wurde als Radikalfänger zugesetzt. Anschließend erfolgte der sofortige Transport (Dauer \leq 30 Minuten) ins Labor, wo 500 μ m dicke Hirnschnitte mittels eines Vibratoms angefertigt wurden. Nach einer Ruhephase von 4 bis 5 Stunden in der Interfacemesskammer erfolgten die elektrophysiologischen Untersuchungen.

3.5 SDS-PAGE und Western Blot

Die immunhistologischen Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit Herrn Prof. Braunewell (Institut für Neurophysiologie der Charité, CCM) sowohl an Kontrolltieren als auch an Pilocarpin-behandelten Tieren. Horizontale subikuläre Hirnschnitte wurden bei 4 °C in einer spezifischen Pufferlösung homogenisiert (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM HEPES, 1 % EGEPAL, Proteinaseinhibitor Cocktail (Roche)). Das Homogenat wurde bei 20.000 G für 15 min zentrifugiert und der Überstand für die Gelelektrophorese (SDS-Page) verwendet. Ein Aliquot wurde dabei zur Proteinbestimmung mit der BCA Probe benutzt (Pierce, Rockford, IL). Zur Western Blot Analyse wurden gleiche Anteile an Homogenat von Kontrolltieren und Pilocarpin-behandelten Tieren eingesetzt und mittels SDS-PAGES aufgetrennt. Die Gele wurden für 2 Stunden auf PVDF Membranen (Roth, Karlsruhe, Deutschland) elektrisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Membranen 1 Stunde in einem spezifischen TBST Puffer geblockt (100 mM Tris-HCL; 0,9 % NaCL, 1 % Tween 20, pH 7,4). Die Blots wurden über Nacht bei 4 °C mit spezifischen primären Antikörpern inkubiert (anti AC-1 1:200, Santa Cruz Biotechnology) und die Immunreaktivität mit sekundären Antikörpern dargestellt (HRP-couple goat ant-rabbit oder goat anti-mouse Antikörper, Santa Cruz Biotechnology). Die Entwicklung erfolgte mittels eines Chemilumineszenz-Reagenz (Perkin Imer, Wellesley, MA). Die Quantifizierung des Western Blots wurde mit Hilfe von NIH Image Programm v1.61 durchgeführt.

3.6 Pharmaka

Folgende Pharmaka sind in den Experimenten eingesetzt worden und über die Badlösung appliziert worden:

Pharmakon, Konzentration:

- Bicucullin: 5 μ M (Sigma-Aldrich, Deutschland)
- Forskolin: 50 μ M (Tocris, UK)
- H-89: 10 μ M (Sigma-Aldrich, Deutschland)

3.7 Aufbau des Messplatzes

Der Messplatz bestand aus folgenden Geräten: Interfacemesskammer, Leitz-Manipulator, Headstage (Vorverstärker: 10fach Verstärkung), Verstärker (Zwischenverstärker: 100fach Verstärkung, SEL 05L oder SEL 10, NPI Instrumente, Tamm, Deutschland), AD- (Analog-Digital) Wandler, Oszilloskop (Heka, Lambrecht), Schreiber (Dash), Computer. Die Darstellung der abgeleiteten Antworten (Feldpotential bzw. EPSP) erfolgte nach Verstärkung des Signals mittels der Headstage bzw. des Zwischenverstärkers und der Filterung (gefiltert bei 3 kHz, Abtastrate 10 kHz) auf einem Oszilloskop.

3.8 Auswertung der Messergebnisse

Zur Erfassung und Auswertung der Messdaten wurden handelsübliche IBM-kompatible Computer verwendet. Die Messungen wurden auf einem Oszillographen aufgezeichnet, und die Daten mit Hilfe der Computersoftware TIDA (Heka, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) erfasst. Zur anschließenden Auswertung wurde Excel (Microsoft) verwendet. Für sämtliche erhobenen Daten wurde das arithmetische Mittel (Mittelwert \pm Standardfehler (SEM)) berechnet. Fehlerbalken in Abbildungen repräsentieren den SEM. Alle Ergebnisse sind mit Angabe der Größe der Stichprobe (n) repräsentiert. Zur Untersuchung der Kurzzeitplastizität wurde der Doppelpulsindex (Paired-Pulse

Facilitation (PPF) (Amplitude des zweiten Populationsspikes (Fp (Feldpotential)) bzw. EPSPs dividiert durch die Amplitude des ersten Populationsspikes bzw. EPSPs (FP1/FP2 bzw. EPSP2/EPSP1)) bestimmt. Zur Signifikanzbestimmung wurde ein Student's t-test (Excel, Microsoft) oder eine Analyse mittels ANOVA (Excel, Microsoft) durchgeführt und das Signifikanz-Niveau wurde auf $p < 0,05$ (*) festgelegt.

Den statistischen Berechnungen zu Induktionsparadigmen liegen die Feldpotential-/EPSP Amplituden der letzten 10 Messdaten vor Tetanus und vor Ende des Experiments nach Induktion zu Grunde.

Alle Tierversuche wurden das Land Berlin genehmigt (T 0413/94, G 269/95, G 0328/98).

4. Ergebnisse

Die erhobenen Daten zu intrazellulären Ableitungen im Pilocarpin-Modell und in humanen Schnitten an der CA1-Subikulum Synapse sind im Labor zu gleichen Anteilen mit Herrn Dr. Fidzinski entstanden. Die immunhistochemischen Untersuchungen in Pilocarpin-behandelten Tieren erfolgten in Kooperation mit Herrn Prof. Braunewell.

4.1. Extrazelluläre Ableitungen zur Langzeitpotenzierung im Subikulum der Ratte

Um beurteilen zu können, ob ein verändertes Plastizitätsverhalten auftritt, war es zunächst notwendig, auch bei Kontrolltieren Untersuchungen zur Plastizität durchzuführen, um anschließend das Plastizitätsverhalten im Niedrig-Magnesium-Modell, in Pilocarpin-behandelten Tieren sowie in Hirnschnitten von Patienten mit TLE beurteilen zu können. Zunächst erfolgte die Aufzeichnung einer stabilen Baseline (Ausgangswerte, auf die die Messpunkte nach Induktion einer LTP bzw. LTD bezogen wurden) über einen Zeitraum von 20 Minuten. Nach hochfrequenter Stimulation der CA1 Efferenz mit 4×100 Hz konnte eine deutliche Potenzierung des Populationsspikes im Subikulum abgeleitet werden. Dieses Phänomen wird als posttetanische Potenzierung (PTP) bezeichnet. Die PTP ($1,70 \pm 0,28$) nahm im Verlauf der Messung ab und es konnte die Ausbildung einer stabilen LTP beobachtet werden ($1,41 \pm 0,19$, $n=5$, $p < 0,05$, Abb. 8). Neben der LTP können Experimente zum Doppelpuls (Paired-Pulse (PP)) -Verhalten zur Klärung von prä- und postsynaptischen Mechanismen beitragen. Eine Änderung des Doppelpulsindex gibt dabei Hinweise auf einen zugrunde liegenden präsynaptischen Mechanismus. Der Doppelpulsindex betrug in dieser Messreihe vor tetanischer Reizung $1,02 \pm 0,05$ und nach der Stimulation $0,69 \pm 0,12$ ($p < 0,05$).

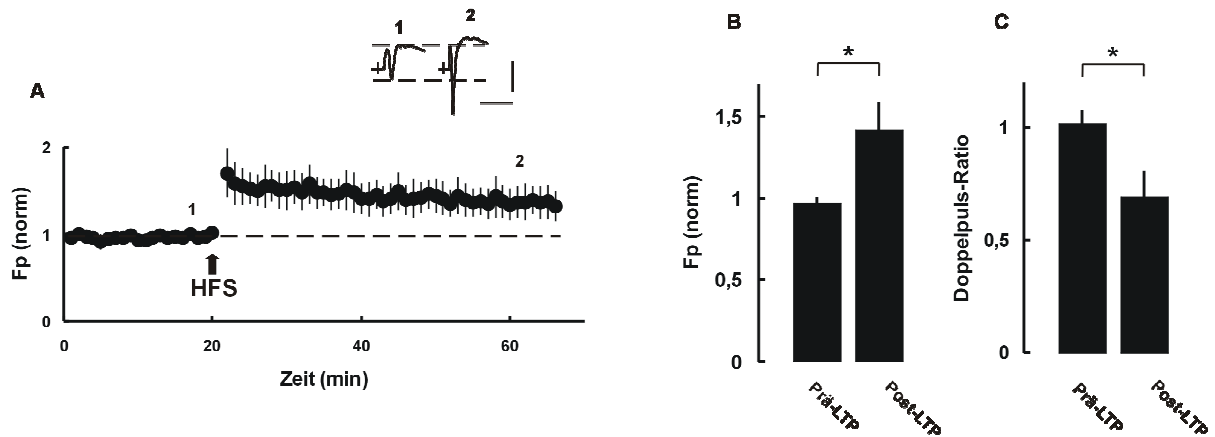


Abb. 8

A normalisierte Feldpotentialantwort (Fp (norm)) im Subikulum. (1) Baseline, (2) LTP. Zeitverlauf der LTP 45 min nach synaptischer Reizung (n=5). (Pfeil: LTP-Induktion durch hochfrequente Stimulation (HFS) mit 4×100 Hz). Maßstabsbalken: 1 mV und 10 ms **B** Säulenhistogramm der normalisierten Feldpotentialamplitude nach synaptischer Potenzierung in Bezug auf den Baseline-Wert (*: $p < 0,05$). **C** Doppelpulsindex vor und nach Induktion der LTP (*: $p < 0,05$). Mittelwert \pm SEM. Den statistischen Berechnungen zu Induktionsparadigmen liegen die Feldpotential-Amplituden der letzten 10 Messdaten vor Tetanus und vor Ende des Experiments nach Induktion zu Grunde.

4.2 Extrazelluläre Ableitungen zur Langzeitdepression im Subikulum der Ratte

Niederfrequente Stimulation mit einer Frequenz von 1 Hz über 15 min (900 Doppelpulse) erzeugte nach Reizung der Efferenz der CA1-Pyramidenzellen eine stabile LTD in subikulären Neuronen von $0,77 \pm 0,04$ (n=5, $p < 0,05$, Abb. 9). Der Doppelpulsindex betrug vor der Stimulation $1,00 \pm 0,04$ und danach $1,00 \pm 0,11$ und war somit nicht signifikant verändert ($p = 0,62$, Abb. 9).

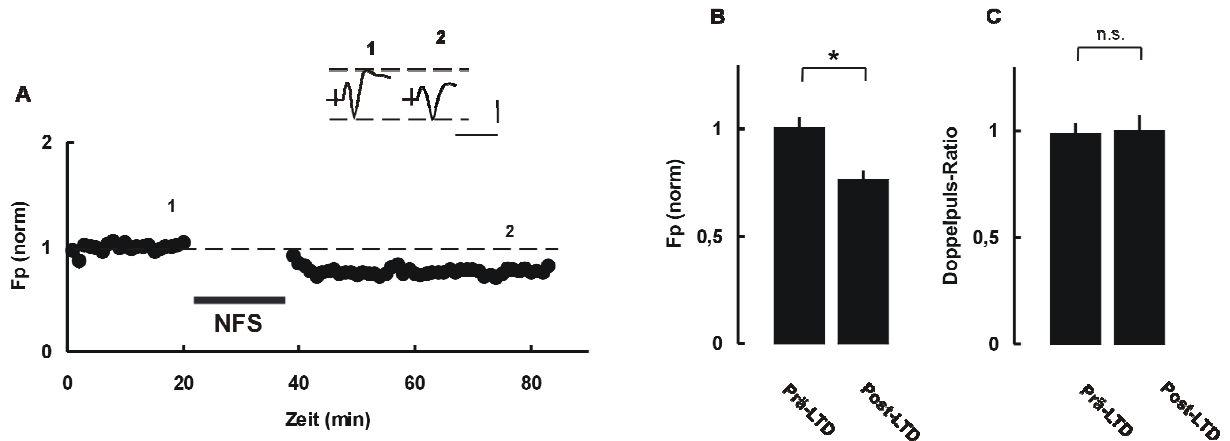


Abb. 9

A normalisierte Feldpotentialantwort (Fp (norm)) im Subikulum. (1) Baseline, (2) LTD. Zeitverlauf der LTD 45 min nach niederfrequenter Reizung (n=5). (LFS: LTD-Induktion durch niederfrequente Stimulation mit 1 Hz über 15 Minuten). Maßstabsbalken: 5 mV und 10 ms **B** Säulenhistogramm der normalisierten Feldpotentialamplitude nach synaptischer Potenzierung in Bezug auf den Baseline-Wert (*: $p < 0,05$). **C** Doppelpulsindex vor und nach Induktion der LTD (n.s.: $p > 0,05$). Mittelwert \pm SEM. Den statistischen Berechnungen zu Induktionsparadigmen liegen die Feldpotential-Amplituden der letzten 10 Messdaten vor Tetanus und vor Ende des Experiments nach Induktion zu Grunde.

4.3 Zellspezifische Langzeitpotenzierung im Subikulum der Ratte

Für diese Versuchsreihe wurden intrazelluläre Ableitungen mit der scharfen Mikroelektrode in horizontalen Hirnschnitten im Subikulum durchgeführt. Entsprechend ihrer elektrophysiologischen Entladungsmuster konnten zwei Zelltypen klassifiziert werden. Bursterzellen reagierten auf einen depolarisierenden Strompuls mit einer gruppierten Entladung (Burst) von 2 - 5 Aktionspotentialen und nachfolgenden einzelnen Aktionspotentialen. Zwei Drittel der abgeleiteten Zelltypen wurden als Bursterzellen klassifiziert. Die übrigen Zellen antworteten auf einen depolarisierenden Strompuls mit einzelnen Aktionspotentialen ohne initialem Burst und wurden als regulär feuernde Zellen bezeichnet. In Übereinstimmung mit vorherigen Studien im Kontrolltier (Taube, 1993; Stewart und Wong, 1993; Staff et al., 2000) zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in subikulären Pyramidenzellen bezüglich des Eingangswiderstandes und des Ruhemembranpotentials (Bursterzellen: $28 \pm 4,0 \text{ M}\Omega$, $-66,75 \pm 1,3 \text{ mV}$, n=8; regulär feuernde Zellen: $28,25 \pm 2,3 \text{ M}\Omega$, $-62,25 \pm 3,4 \text{ mV}$; n=8, Abb. 10).

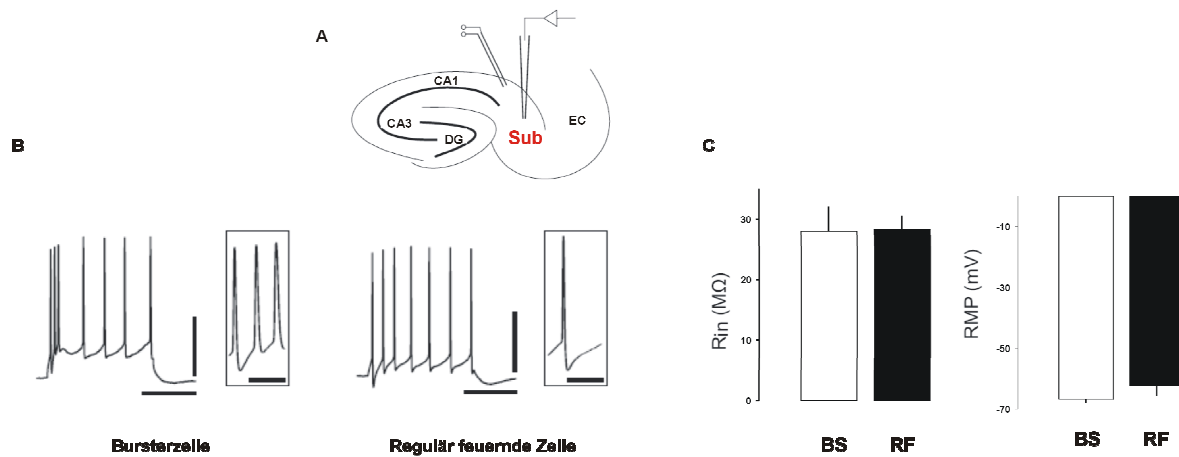


Abb. 10

A Schematische Darstellung von Stimulations- und Ableitelektrode im Experiment. Hippokampus: Amonshorn: CA3, CA1, Sub: Subikulum, EC: Entorhinaler Kortex, DG: Gyrus dentatus. **B** Entladungsverhalten von Bursterzellen und regulär feuenden Zellen auf einen depolarisierenden Stimulus hin. Maßstabsbalken: 30 mV und 100 ms. **C** Weder Eingangswiderstand noch Ruhemembranpotential zeigten sich in Bursterzellen (BS) und regulär feuenden Zellen (RF) verschieden.

Unter Kontrollbedingungen konnte nach tetanischer Stimulation in regulär feuenden Zellen und Bursterzellen eine stabile LTP induziert werden (Bursterzellen: $1,45 \pm 0,11$, $n=8$, $p < 0,001$; regulär feuende Zellen: $1,77 \pm 0,17$, $n=8$, $p < 0,01$; Abb. 11). Der Doppelpulsindex gibt wie bereits ausführlich beschrieben Hinweise auf den Expressionsort einer LTP. Eine Änderung nach tetanischer Reizung wäre Ausdruck einer präsynaptischen LTP (Debanne et al., 1996). Die LTP Expression war in Bursterzellen mit einer Veränderung des Doppelpulsindex verbunden ($1,2 \pm 0,08$ unter der Baseline zu $1,09 \pm 0,06$ nach LTP-Induktion, $p < 0,05$, Abb. 11). In regulär feuenden Zellen konnte keine signifikante Veränderung beobachtet werden ($1,08 \pm 0,09$ unter der Baseline zu $1,12 \pm 0,17$ nach LTP-Induktion, Abb. 11). Dieses Ergebnis ist somit mit den kürzlich veröffentlichten Daten von Wozny et al. (2008a, b) vergleichbar.

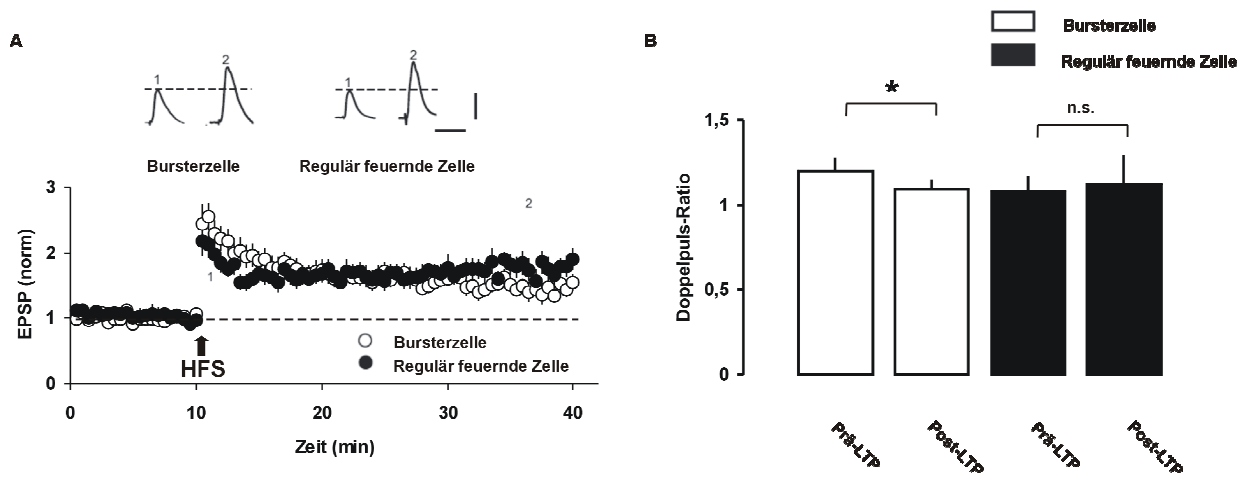


Abb. 11

A Unter Kontrollbedingungen zeigten beide Zelltypen (regulär feuernde Zellen (n=8) und Bursterzellen (n=8)) eine stabile LTP 30 min nach tetanischer Reizung. (Pfeil: HFS: LTP-Induktion durch hochfrequente Stimulation mit 4 x 100 Hz). Maßstabsbalken: 5 mV und 50 ms. **B** In Bursterzellen zeigte sich der Doppelpulsindex im Rahmen von LTP-Expression verändert. In regulär feuernden Zellen konnte keine signifikante Veränderung gemessen werden. Den statistischen Berechnungen zu Induktionsparadigmen liegen die EPSP-Amplituden der letzten 10 Messdaten vor Tetanus und vor Ende des Experiments nach Induktion zu Grunde.

4.4 Langzeitpotenzierung in Pilokarpin-behandelten Tieren im Subikulum der Ratte

4.4.1 Synaptische Langzeitpotenzierung und -depression in Pilokarpin-behandelten Ratten

Unter der Annahme das epileptische Aktivität selektiv die LTP spezifischen Signalkaskaden beeinträchtigt, jedoch nicht die LTD Kaskaden, wurden analog zu den Untersuchungen im Kontrolltier extrazelluläre Messungen in Pilokarpin-behandelten Tieren zur LTP und LTD durchgeführt. In Pilokarpin-behandelten Tieren konnte keine LTP nach hochfrequenter Reizung ausgelöst werden (PTP $1,10 \pm 0,08$, LTP $0,97 \pm 0,07$, n=5, $p > 0,05$, Abb. 12).

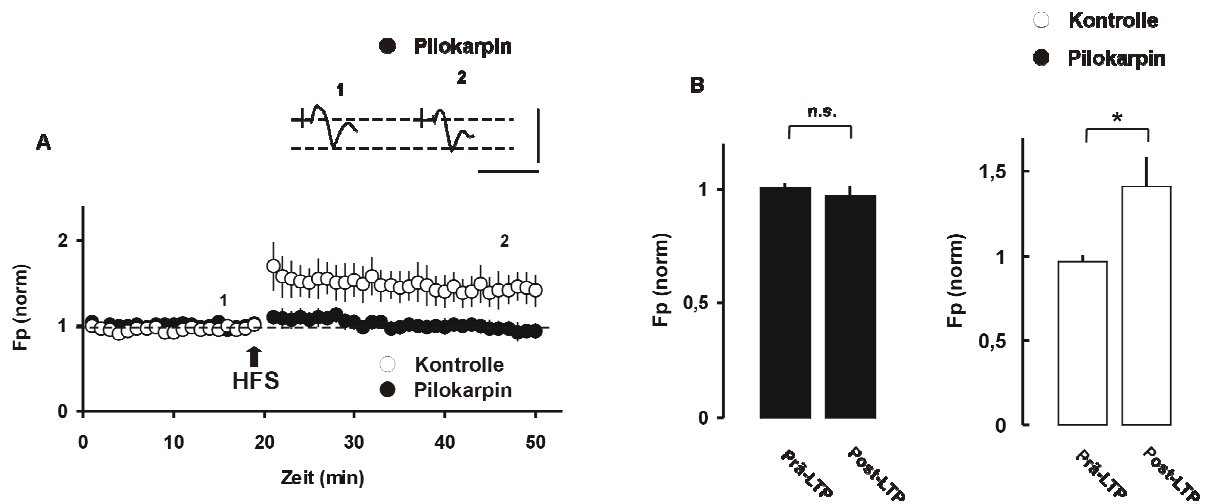


Abb. 12

A Normalisierte Feldpotentialantwort (FP (norm)) nach alveärer Reizung und Ableitung im Subikulum. (1) Baseline, (2) LTP. In Pilocarpin-behandelten Tieren konnte 30 min nach hochfrequenter Reizung keine LTP induziert werden: Zeitverlauf nach synaptischer Reizung (n=5). (Pfeil: HFS: Hochfrequente Stimulation mit 4 x 100 Hz). Maßstabsbalken: 1 mV und 10 ms. **B** Säulenhistogramm der normalisierten Feldpotentialamplituden nach synaptischer Potenzierung in Bezug auf den Baseline-Wert im Pilocarpin-behandelten Tier und im Kontrolltier (n.s.: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$). Den statistischen Berechnungen zu Induktionsparadigmen liegen die Feldpotential-Amplituden der letzten 10 Messdaten vor Tetanus und vor Ende des Experiments nach Induktion zu Grunde.

Nach niederfrequenter Stimulation konnte hingegen eine LTD in Pilocarpin-behandelten Tieren induziert werden (LTD $0,82 \pm 0,05$, n=5, $p < 0,05$, Abb. 13). Der Doppelpulsindex zeigte sich gegenüber den Kontrollwerten nicht signifikant verändert und betrug vor niederfrequenter Reizung $1,00 \pm 0,06$ und nach der Stimulation $1,00 \pm 0,20$ ($p > 0,05$).

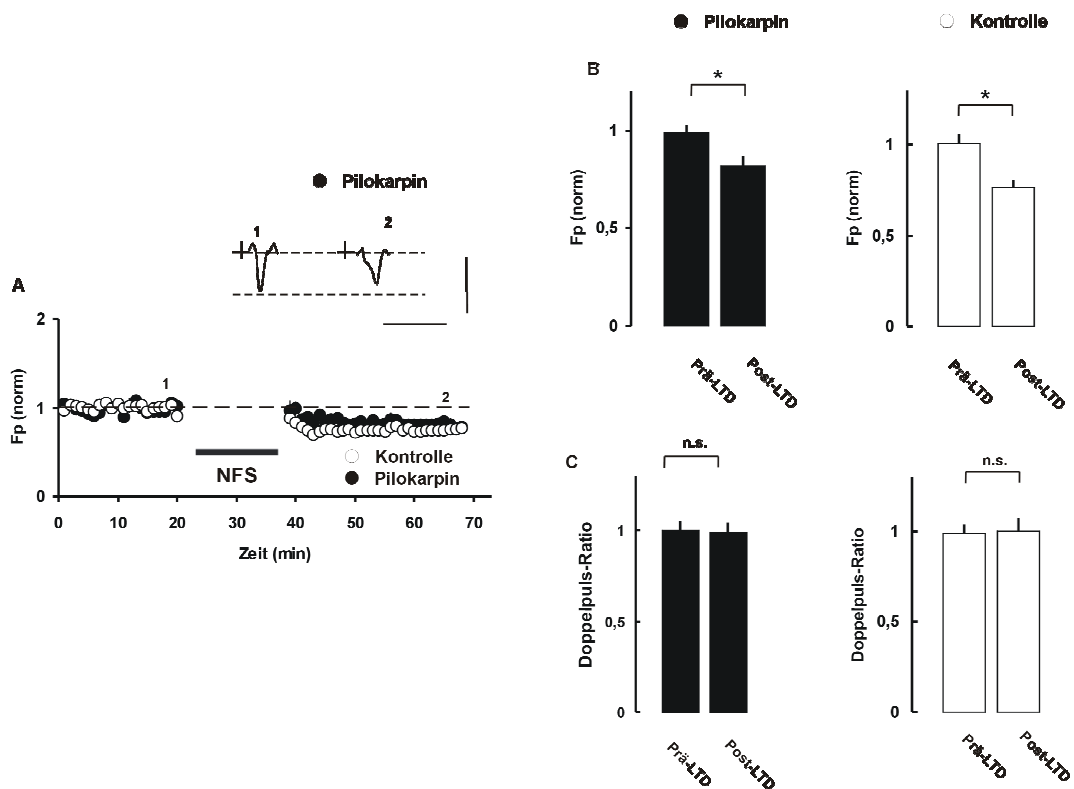


Abb. 13

A normalisierte Feldpotentialantwort (Fp (norm)) nach alveärer Reizung und Ableitung im Subikulum. (1) Baseline, (2) LTD. Maßstabsbalken: 5 mV und 10 ms. In Pilocarpin-behandelten Tieren konnte 30 min nach niederfrequenter Reizung eine LTD induziert werden: Zeitverlauf nach synaptischer Reizung (n=5). **B** Säulenhistogramm der normalisierten Feldpotentialamplituden nach synaptischer Depression in Bezug auf den Baseline-Wert im Pilocarpin-behandelten Tier und im Kontrolltier (*: $p < 0,05$). **C** Doppelpulsindex vor und nach Induktion der LTD im Pilocarpin-behandelten Tier und im Kontrolltier (n.s.: $p > 0,05$). Den statistischen Berechnungen zu Induktionsparadigmen liegen die Feldpotential-Amplituden der letzten 10 Messdaten vor Tetanus und vor Ende des Experiments nach Induktion zu Grunde.

4.4.2 Zellspezifische Langzeitpotenzierung und -depression in Pilocarpin-behandelten Ratten

In Pilocarpin-behandelten Tieren konnten beide Zelltypen, regulär feuervernde Zellen und Bursterzellen, abgeleitet werden. Regulär feuervernde Zellen reagierten auf einen depolarisierenden Strompuls mit einzelnen Aktionspotentialen. Bursterzellen antworteten auf einen Stimulus mit einem Burst von 2 - 3 Aktionspotentialen gefolgt von einzelnen Aktionspotentialen. In regulär feuervernden Zellen konnte nach tetanischer Reizung eine LTP gemessen werden, welche sich nicht signifikant zu den Messungen

im Kontrolltier unterschied ($1,47 \pm 0,19$, $n=9$, $p < 0,05$, Abb. 14). Im Gegensatz dazu konnte in Bursterzellen von Pilokarpin-behandelten Tieren keine LTP induziert werden ($1,03 \pm 0,09$, $n=7$, $p > 0,1$, Abb. 14).

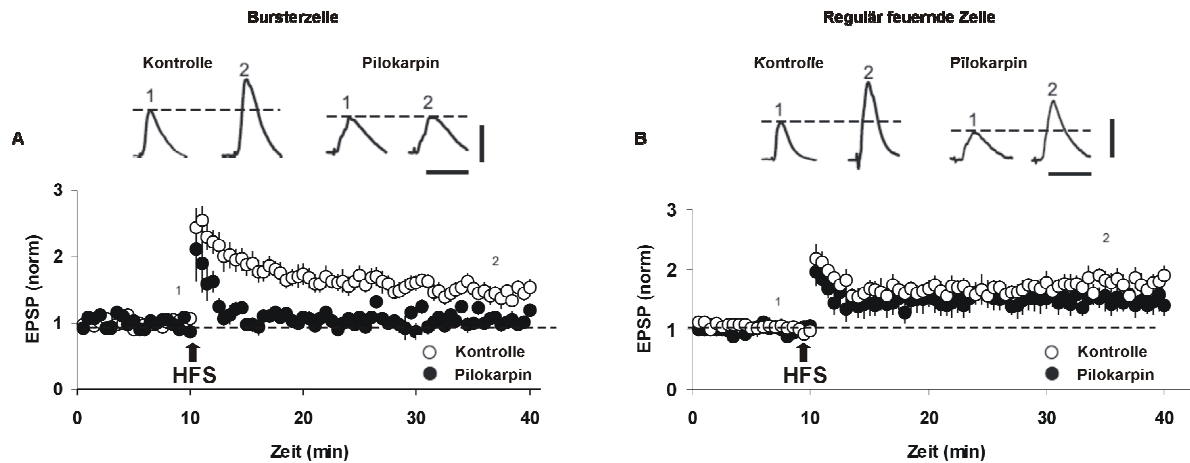


Abb. 14

Unter Kontrollbedingungen zeigten beide Zelltypen eine stabile LTP 30 min nach tetanischer Reizung. In Pilokarpin-behandelten Tieren konnte in Bursterzellen keine LTP induziert werden. In regulär feuernden Zellen war die LTP im Pilokarpin behandelten Tier nicht signifikant reduziert. **A** Bursterzellen ($n=7$) und **B** regulär feuernde Zellen ($n=9$). (Pfeil: HFS: LTP-Induktion durch hochfrequente Stimulation mit 4×100 Hz). Maßstabsbalken: 5 mV und 50 ms. Den statistischen Berechnungen zu Induktionsparadigmen liegen die EPSP-Amplituden der letzten 10 Messdaten vor Tetanus und vor Ende des Experiments nach Induktion zu Grunde.

Epileptische Aktivität scheint demnach selektiv die LTP spezifischen Signalkaskaden zu beeinträchtigen. In einer Studie von Fidzinski et al. (2008) konnte gezeigt werden, dass eine durch niederfrequente Stimulation induzierte LTD in subikulären Bursterzellen durch einen postsynaptischen NMDA-Rezeptor Mechanismus bedingt ist. Vor dem Hintergrund der Studie von Fidzinski et al. (2008) und den Ergebnisse der vorliegenden Experimente scheint die präsynaptische LTP-Expression beeinträchtigt. Die postsynaptischen LTD-Expression hingegen nicht. Um diese bidirektionale Plastizität in Pilokarpin-behandelten Tieren zu untersuchen, erfolgte die Applikation niederfrequenter Stimulation ohne vorherige LTP-Induktion. In beiden Zelltypen erzeugte niederfrequente Stimulation eine stabile LTD (Bursterzellen $0,78 \pm 0,97$, $n=10$, $p < 0,05$; regulär feuernde Zellen $0,75 \pm 0,10$, $n=6$, $p < 0,01$, Abb. 15), welches die Hypothese unterstützt, dass epileptische Aktivität selektiv die LTP spezifischen Signalkaskaden beeinträchtigt.

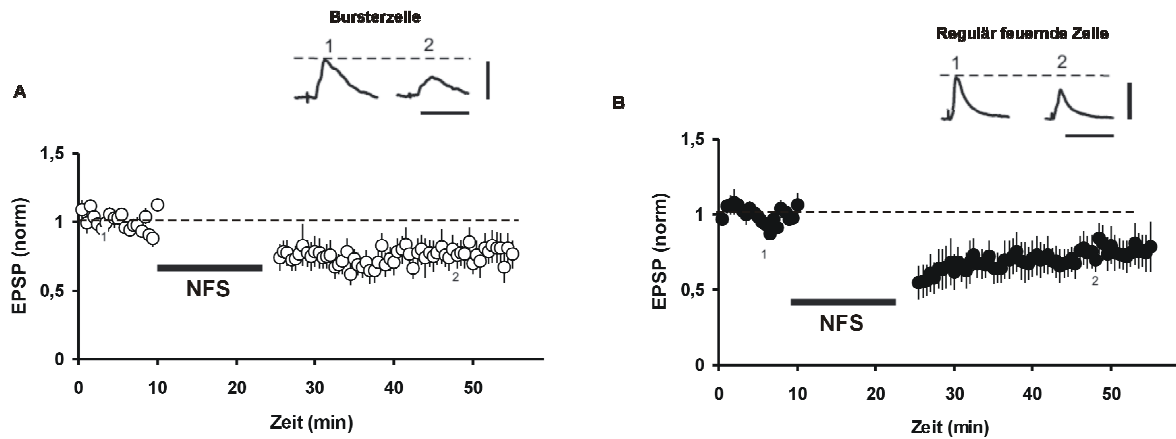


Abb. 15

Im Pilocarpin-behandelten Tier zeigten beide Zelltypen 30 min nach niederfrequenter Reizung eine stabile LTD. **A** Bursterzellen ($n=10$) und **B** regulär feuernde Zellen ($n=6$). Maßstabsbalken: 5 mV und 50 ms.

Weder Eingangswiderstand noch Ruhemembranpotential waren signifikant unterschiedlich zwischen regulär feuernde Zellen und Bursterzellen. Darüber hinaus konnte kein Unterschied im Kontrolltier (Bursterzellen: $28 \pm 4,0$ M Ω , $-66,75 \pm 1,3$ mV, $n=8$; regulär feuernde Zellen: $28,25 \pm 2,3$ M Ω , $-62,25 \pm 3,4$ mV; $n=8$) und im Pilocarpin-behandelten Tier (Bursterzellen: $27,5 \pm 4,1$ M Ω , $-63,1 \pm 2,2$ mV, $n=9$; regulär feuernde Zellen: $27,8 \pm 4,0$ M Ω , $-64,6 \pm 2,6$ mV; $n=7$, Abb. 16) zwischen den beiden Zelltypen beobachtet werden.

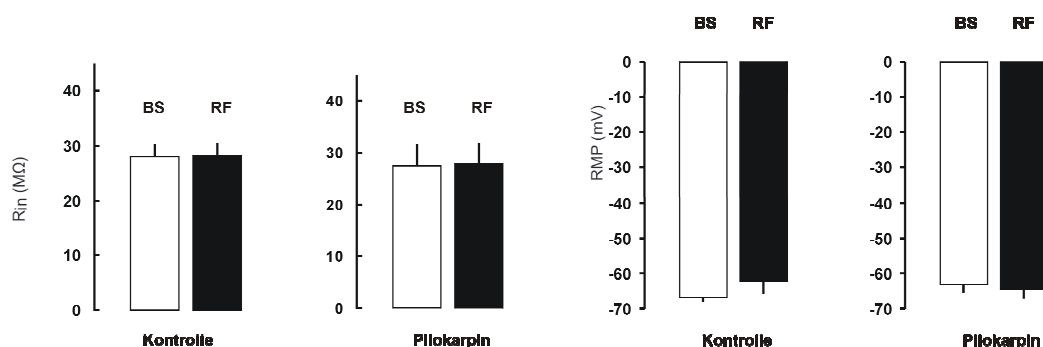


Abb. 16

Weder Eingangswiderstand noch Ruhemembranpotential zeigten sich in Bursterzellen (BS) und regulär feuernde Zellen (RF) verschieden.

4.5 Effekt von Forskolin auf die subikuläre Langzeitpotenzierung

Wozny et al. (2008b) konnten kürzlich zeigen, dass die Aktivierung der Adenylatcyclase (AC 1) durch Forskolin sowie die Applikation des spezifischen cAMP-Analogons Sp-5,6-DCL-cBIMPS eine präsynaptische LTP in Bursterzellen induziert, welche durch verschiedenen Inhibitoren der cAMP-Proteinkinase A (PKA) geblockt werden kann.

4.5.1 Effekt von Forskolin auf die synaptische Transmission und Langzeitpotenzierung

In Kontrolltieren konnte durch Forskolin eine chemische LTP induziert werden: Nach der Aufzeichnung einer stabilen Baseline über einen Zeitraum von 10 Minuten erfolgte die Applikation von Forskolin (50 μ M) über die Dauer von 45 Minuten. Nach Forskolingabe konnte nach ~ 20 Minuten ein Plateau der Feldpotential Amplitude beobachtet werden, welches auch nach Auswaschen von Forskolin erhalten blieb ($1,81 \pm 0,11$, $n=5$, $p < 0,05$, Abb. 17). Die Forskolin-induzierten Transmitterausschüttung führte zu einem signifikant veränderten Doppelpulsindex (Baseline $0,82 \pm 0,05$, Forskolin $0,97 \pm 0,04$, $p < 0,05$) und bestätigt die Hypothese einer präsynaptischen Expression der Forskolin-induzierten Faszilitierung.

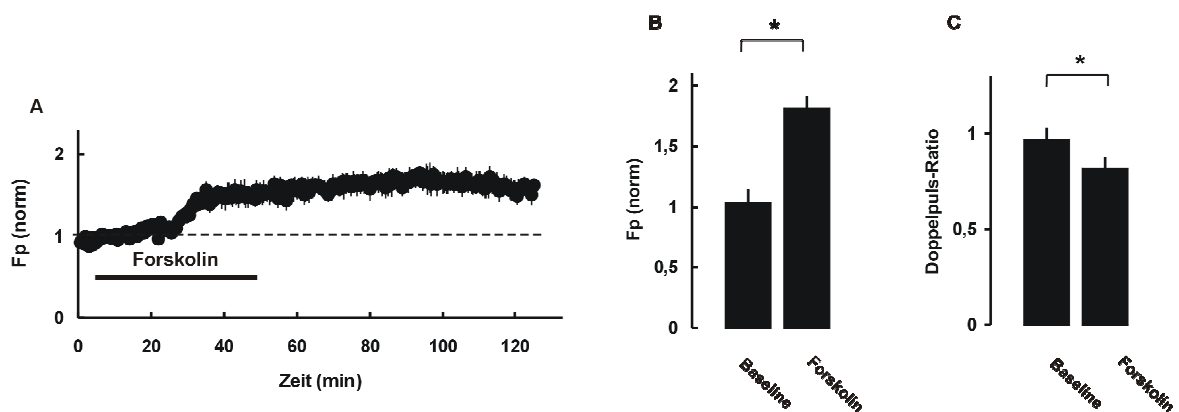


Abb. 17

A Zeitverlauf nach Forskolin induzierter LTP-Induktion ($n=5$). **B** Säulenhistogramm der normalisierten Feldpotentialamplituden (Fp (norm)) nach chemischer Potenzierung in Bezug auf den Baseline-Wert (*: $p < 0,05$). **C** Doppelpulsindex vor und nach Induktion der chemischen LTP (*: $p < 0,05$). Mittelwert \pm SEM.

Den statistischen Berechnungen zu Induktionsparadigmen liegen die Feldpotential-Amplituden der letzten 10 Messdaten vor Tetanus und vor Ende des Experiments nach Induktion zu Grunde.

4.5.2 Effekt von Forskolin auf die zellspezifische Langzeitpotenzierung

Auch in den intrazellulären Ableitungen von Bursterzellen konnte nach der Aufzeichnung einer stabilen Baseline und anschließender Applikation von Forskolin (50 μ M) über die Dauer von 20 Minuten eine chemische LTP im Kontrolltier induziert werden. Nach der Applikation zeigte sich nach \sim 20 Minuten eine stabile LTP, welche nach dem Auswaschen von Forskolin erhalten blieb (Bursterzellen: $2,19 \pm 0,35$, $n=5$, $p < 0,05$) und die sich nicht signifikant von einer nachfolgenden elektrisch induzierten LTP durch tetanische Reizung unterschied ($2,48 \pm 0,50$, $p > 0,1$). Da im Kontrolltier sowohl Forskolin eine Potenzierung der EPSP Amplitude in Bursterzellen bewirkt als auch tetanische Stimulation, liegt die Annahme nahe, dass Forskolin und tetanische Reizung die synaptische Neurotransmission in Bursterzellen über denselben Mechanismus verstärken (Abb. 18 A). Unterstützt wird die Hypothese einer präsynaptische LTP in Bursterzellen dadurch, dass die Forskolin-induzierte Verstärkung der synaptischen Übertragung mit einer Veränderung des Doppelpulsindex assoziiert war ($1,15 \pm 0,05$ vs. $0,86 \pm 0,07$, $p < 0,01$, Abb. 18 B). Unter der Annahme, dass epileptische Aktivität die LTP-Induktion in Bursterzellen über eine gestörte präsynaptische Transmitterausschüttung (über die cAMP-Abhängige PKA-Kaskade) beeinflusst, dürfte nach Forskolinapplikation keine chemische LTP in Pilocarpin-behandelten Tieren induzierbar sein. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte eine signifikant reduzierte Potenzierung der EPSP Amplitude nach Forskolingabe in Pilocarpin-behandelten Tieren beobachtet werden ($1,53 \pm 0,25$, $n=9$, $p < 0,001$, Abb. 18 A).

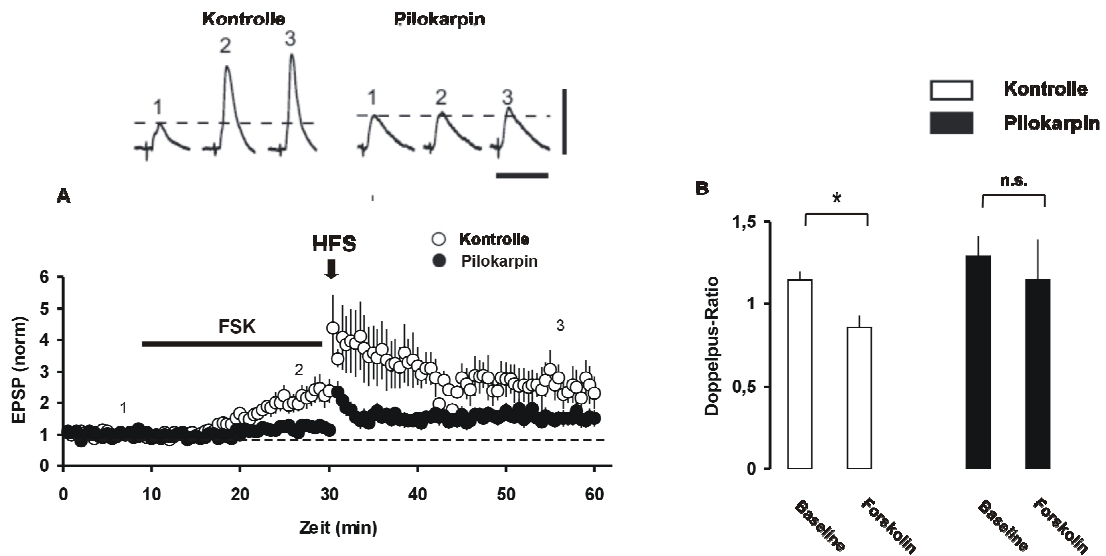


Abb. 18

A Im Kontrolltier erzeugte die Applikation von Forskolin (FSK) und hochfrequente Reizung (HFS) einen Anstieg der EPSP Amplitude (EPSP (norm)) in Bursterzellen. Im Pilocarpin behandelten Tier konnte keine LTP nach Forskolin- und elektrischer Reizung induziert werden. Zeitverlauf nach Forskolin-induzierter LTP-Induktion in Bursterzellen, gefüllte Punkte: Pilocarpin behandelte Tiere ($n = 5$), offene Punkte: Kontrolltiere ($n = 9$). **B** Forskolin-induzierter Anstieg der EPSP Amplitude ist im Kontrolltier in Bursterzellen mit einem signifikanten Anstieg der Doppelpulsfaszilitierung begleitet. Doppelpulsindex vor und nach Induktion der chemischen LTP im Kontrolltier und im Pilocarpin-behandelten Tier (*: $p < 0,05$, n.s.: $p > 0,05$). Mittelwert \pm SEM. Den statistischen Berechnungen zu Induktionsparadigmen liegen die EPSP-Amplituden der letzten 10 Messdaten vor Tetanus und vor Ende des Experiments nach Induktion zu Grunde.

4.6 Untersuchungen zur Expression der Adenylatcyclase Typ 1 im Kontrolltier und Pilocarpin-behandelten Tieren

Um die Bedeutung der Adenylatcyclase für eine gestörte präsynaptische LTP in Bursterzellen eingehender zu untersuchen, erfolgten immunhistochemische Untersuchungen. Mittels Western Blot konnte unter Kontrollbedingungen eine starke Proteinexpression der Adenylatcyclase Typ 1 (AC1) im Subikulum dargestellt werden. In subikulären Hirnschnitten von Pilocarpin-behandelten Tieren war diese Expression hingegen deutlich reduziert (Abb. 19 A). Das Kontrollprotein Aktin wurde nicht durch die Pilocarpin Behandlung beeinflusst.

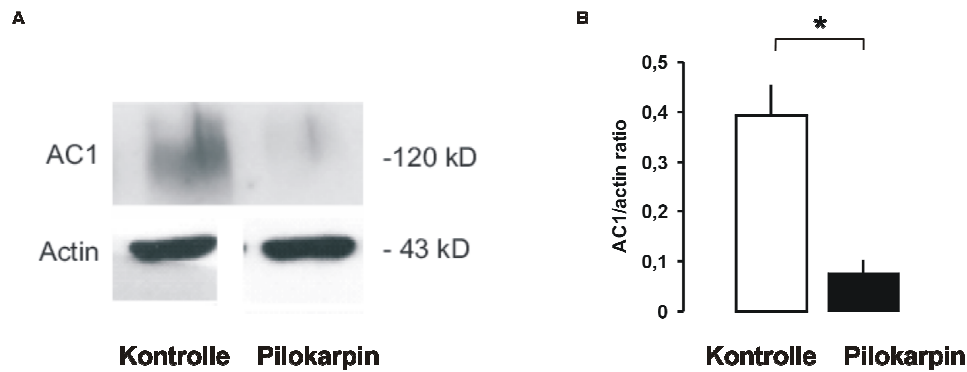


Abb. 19

Proteinanalyse mittels Westernblot im Subikulum. Sowohl in Kontrolltieren als auch in Pilocarpin-behandelten Tieren ließ sich eine Expression an Adenylatzyclase 1 (AC1) in Membran angereicherten Proteinextrakten nachweisen, wohingegen die Expression in Pilocarpin-behandelten deutlich reduziert war. In Kontrolltieren konnte eine Proteinbande (= Expression von AC1), mit einem Molekulargewicht von 120 kD detektiert werden. Aufgetrennt wurden gleiche Proteinmengen. Als Kontrolle diente Aktin (A). (B) Säulenhistogramm des AC1-Aktin Verhältnis im Kontrollschnitt und in subikulären Schnitten von Pilocarpin-behandelten Tieren. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($n=4$, $p < 0,05$).

4.7 Untersuchungen zur Langzeitpotenzierung in humanen subikulären Zellen von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie

Es wurden intrazelluläre Messungen in humanen subikulären Zellen von Patienten mit pharmakoresistenter TLE zur synaptischen LTP durchgeführt. Beide Zelltypen konnten im humanen epileptischen Gewebe abgeleitet werden. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Bursterzellen und regulär feuernenden Zellen in Bezug auf den Eingangswiderstand und des Ruhemembranpotentials weder im sklerotischen (AHS) noch im non-sklerotischen Gewebe (NAHS) gemessen werden. Auch zwischen den Gewebegruppen gab es keinen Unterschied hinsichtlich der Membraneigenschaften. Im AHS-Gewebe zeigten regulär feuernende Zellen im Mittel ein Ruhemembranpotential von $-66,5 \pm 2,1$ mV und einen Eingangswiderstand von $33,4 \pm 3,6$ M Ω ($n=12$). Bursterzellen zeigten ein Ruhemembranpotential von $-67,8 \pm 1,8$ ($n=9$, $p > 0,6$) und einen Eingangswiderstand von $29,3 \pm 2,4$ M Ω . Im non-AHS-Gewebe zeigten regulär feuernende Zellen im Mittel ein Ruhemembranpotential von $-72,8 \pm 3,0$ mV ($n=6$) und einen Eingangswiderstand von $29,3 \pm 2,4$ M Ω . Bursterzellen zeigten ein

Ruhemembranpotential von $-68,7 \pm 0,7$ ($n=3$) und einen Eingangswiderstand von $29,2 \pm 2,4$ M Ω (Abb. 20).

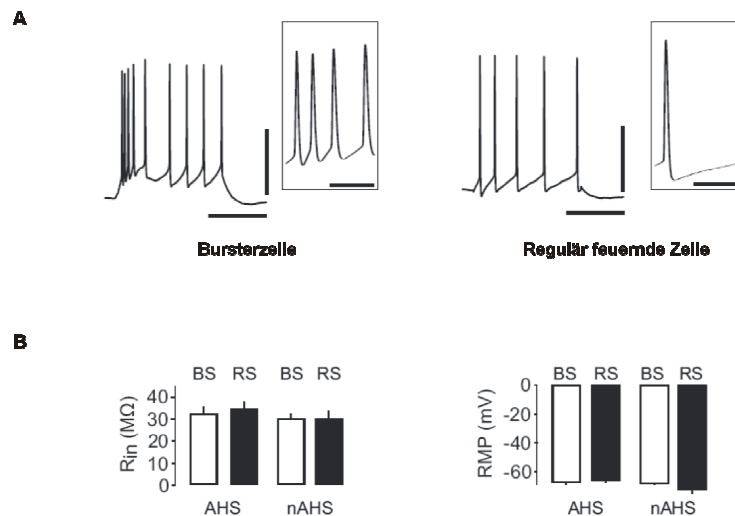


Abb. 20

Membraneigenschaften von subikulären Zellen im humanen epileptischen Gewebe. **A** Entladungsverhalten von Bursterzellen und regulär feuenden Zellen auf einen depolarisierenden Stimulus hin. Maßstabsbalken: 30 mV und 100 ms. **B** Weder Eingangswiderstand noch Ruhemembranpotential zeigten sich in Bursterzellen und regulär feuenden Zellen unterschiedlich.

Die Messungen in humanen subikulären Zellen zeigten wie in den Pilocarpin-behandelten Tieren eine beeinträchtigte synaptische Plastizität. Tetanische Stimulation an der CA1-Subikulum Synapse konnte keine LTP in Bursterzellen im humanen epileptischen Gewebe induzieren ($1,08 \pm 0,34$, $n=6$, Abb. 21 A). Im Gegensatz zu den Messungen im Pilocarpin-behandelten Tier war es auch in regulär feuenden Zellen nicht möglich, eine LTP nach hochfrequenter Reizung zu erzeugen ($1,00 \pm 0,10$, $n=9$). Der Verlust an LTP konnte sowohl im AHS-Gewebe als auch im non-AHS-Gewebe beobachtet werden. Eine LTD-Induktion nach niederfrequenter Stimulation war hingegen wie im Pilocarpin-Modell in beiden Zelltypen möglich (Bursterzellen: $0,77 \pm 0,66$, $n=5$, $p < 0,01$; regulär-feuernde Zellen: $0,74 \pm 0,55$, $n=9$, $p < 0,001$, Abb. 21 B), welches auf eine selektive Beeinträchtigung der Signalkaskade hinweist, die LTP bewirkt.

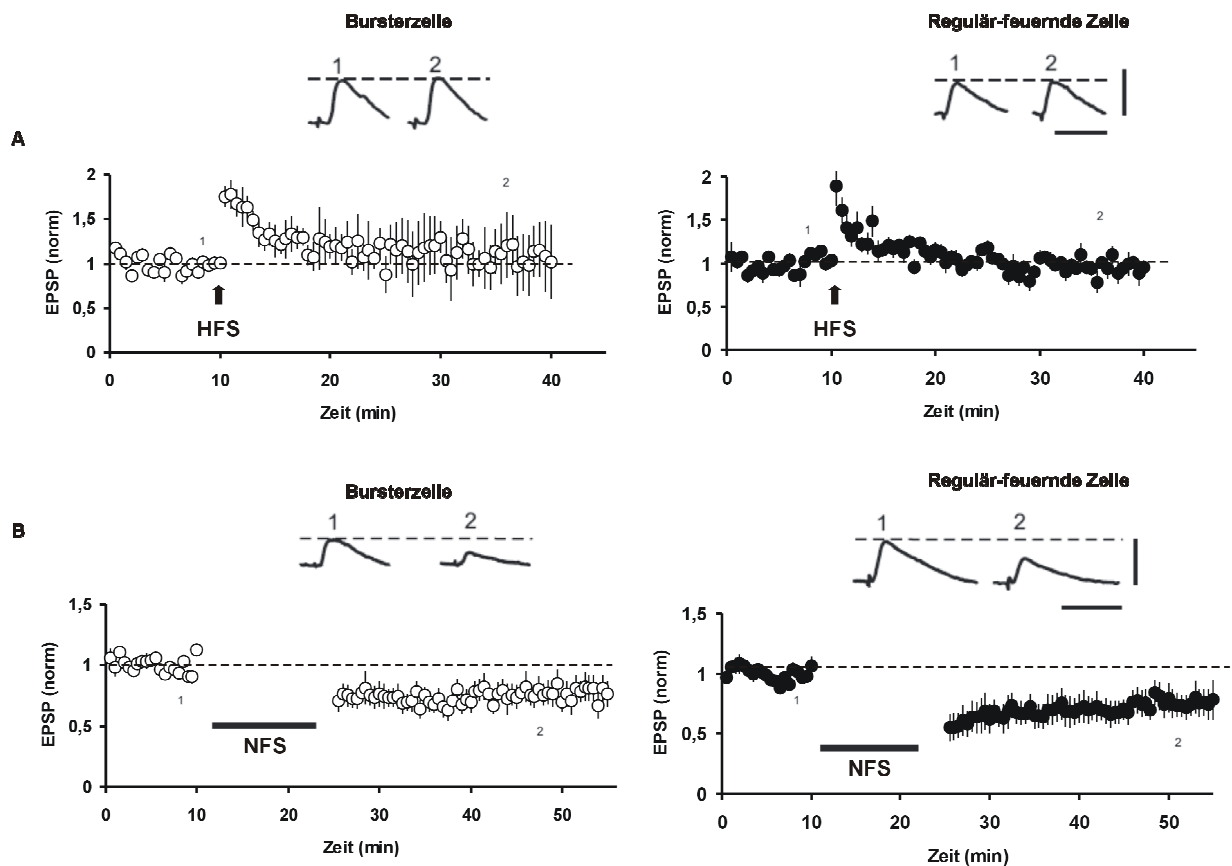


Abb. 21

Verlust von LTP in humanen subikulären Zellen. **A** Tetanische Stimulation (HFS) an der CA1-Subikulum Synapse konnte weder in Bursterzellen noch in regulär feuernenden Zellen eine LTP induzieren. **B** Niederfrequente Reizung (NFS) erzeugte 30 min nach Induktion in beiden Zelltypen eine stabile LTD. Maßstabsbalken: 5 mV und 25 ms. Den statistischen Berechnungen zu Induktionsparadigmen liegen die EPSP-Amplituden der letzten 10 Messdaten vor Tetanus und vor Ende des Experiments nach Induktion zu Grunde.

4.8 Langzeitpotenzierung im Niedrig-Magnesium-Modell

Um zu klären, welchen Einfluss epileptiforme Aktivität auf zelluläre und molekulare Signalkaskaden hat, die an der synaptischen Plastizität im Subikulum beteiligt sind, wurde ein akutes Epilepsiemodell verwendet, welches eine pharmakologische Intervention ermöglicht. Die Auswirkung epileptischer Aktivität auf die synaptische Plastizität wurde untersucht, indem hippocampale Hirnschnitte mit einer Niedrig-Magnesiumlösung perfundiert wurden. Nach dem Einwaschen der Niedrig-Magnesiumlösung konnte die erste epileptiforme Aktivität nach 30 ± 15 Minuten

elektrographisch registriert werden. Im Anschluss daran erfolgte die Aufzeichnung von epileptiformer Aktivität über einen Zeitraum von 30 Minuten. Das Wiedereinwaschen physiologischer ACSF-Lösung unterbrach die epileptiforme Aktivität innerhalb von 25 ± 5 Minuten. Die Badapplikation von Niedrig-Magnesiumlösung führte zu einer deutlichen Zunahme der Feldpotentialamplitude. Nach ~ 60 Minuten konnte ein Rückgang der Feldpotentialamplitude auf das Baseline-Niveau beobachtet werden. Nach anschließender hochfrequenter Stimulation konnte keine LTP induziert werden (LTP $1,05 \pm 0,09$, $n=6$, $p > 0,05$, Abb. 22).

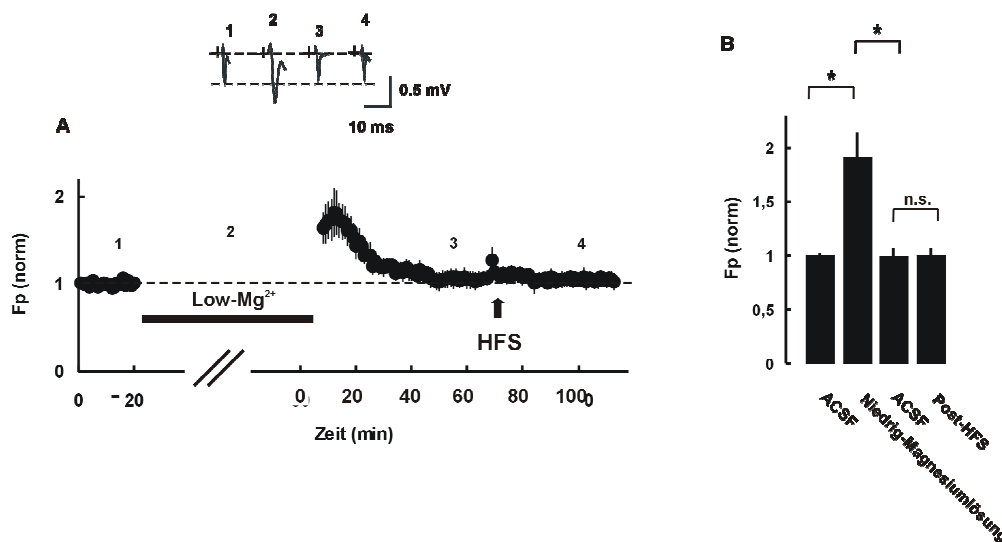


Abb. 22

Aufgehobene LTP im Niedrig-Magnesium-Modell: **A** Feldpotentialantwort vor epileptiformer Aktivität, während epileptiformer Aktivität und nach tetanischer Reizung. (1) Feldpotentialamplitude unter ACSF-Lösung (artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit), (2) Feldpotentialveränderung unter Niedrig-Magnesiumlösung (Low-Mg²⁺), (3) Einwaschen physiologischer ACSF-Lösung, (4) Feldpotentialantwort nach Reizung mit 4 x 100 Hz (HFS). Zeitverlauf nach synaptischer Reizung ($n=6$). Nach hochfrequenter Stimulation konnte keine LTP im Niedrig-Magnesium-Modell induziert werden. (Pfeil: HFS: LTP-Induktion durch hochfrequente Stimulation mit 4 x 100 Hz). **B** Säulenhistogramm der normalisierten Feldpotentialamplituden in Bezug auf den Baseline-Wert (*: $p < 0,05$, n.s.: $p > 0,05$). Den statistischen Berechnungen zu Induktionsparadigmen liegen die Feldpotential-Amplituden der letzten 10 Messdaten vor Tetanus und vor Ende des Experiments nach Induktion zu Grunde.

4.8.1 Effekt von H-89 auf die Langzeitpotenzierung im Niedrig-Magnesium-Modell

In den intrazellulären Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung der Adenylatcyclase vom Typ 1 eine wichtige Funktion in der präsynaptischen LTP in

Bursterzellen besitzt. Wozny et al. (2008b) konnten darüber hinaus beobachten, dass die Aktivierung der Adenylatcyclase (AC 1) durch Forskolin eine präsynaptische LTP in Bursterzellen induziert, welche durch verschiedenen Inhibitoren der cAMP-Proteinkinase A (PKA) geblockt werden kann. Um die involvierten Mechanismen der aufgehobenen LTP genauer zu untersuchen, erfolgten Experimente im Niedrig-Magnesium-Modell mit dem spezifischen PKA-Blocker H-89.

In dieser Versuchsreihe wurde geprüft, ob das Einwaschen von H-89 (10 μ M) Auswirkung auf die aufgehobene subikuläre LTP im Niedrig-Magnesium-Modell hat. Der Antagonist wurde nach Aufzeichnung einer stabilen Baseline von 10 Minuten über die Badlösung eingewaschen. Nach einer Einwaschzeit von 10 Minuten konnte kein Effekt auf die Feldpotential Amplitude beobachtet werden. Während der Aufzeichnung unter Niedrig-Magnesium-Lösung und 20 Minuten nach dem Wiedereinwaschen physiologischer ACSF-Lösung war der Antagonist in der Lösung anwesend. Im Gegensatz zu den Kontrollexperimenten im Niedrig-Magnesium-Modell konnte durch das Einwaschen des spezifischen Blockers H-89 eine signifikante LTP induziert werden. Die Feldpotentialamplitude stabilisierte sich nach epileptiformer Aktivität und Perfusion mit physiologischer ACSF-Lösung vergleichsweise zur Baseline auf einem höheren Niveau. Unter der Berücksichtigung das eine Stabilisierung der Feldpotentialamplitude nach epileptiformer Aktivität auf einem höheren Niveau zu beobachten war, zeigte sich eine LTP von $1,26 \pm 0,2$ ($n=4$, $p < 0,05$, Abb. 23 A) im Vergleich zur Feldpotentialantwort nach Wiedereinwaschen physiologischer ACSF-Lösung. Der Doppelpulsindex zeigte sich sowohl vor epileptischer Aktivität und vor hochfrequenter Reizung signifikant verändert ($0,97 \pm 0,07$ vs. $0,90 \pm 0,2$, $p = 0,005$, Abb. 23 C) als auch nach dem Wiedereinwaschen physiologischer ACSF-Lösung und nach hochfrequenter Reizung signifikant verändert ($0,90 \pm 0,2$ vs. $0,80 \pm 0,2$, $p < 0,05$, Abb. 23 C).

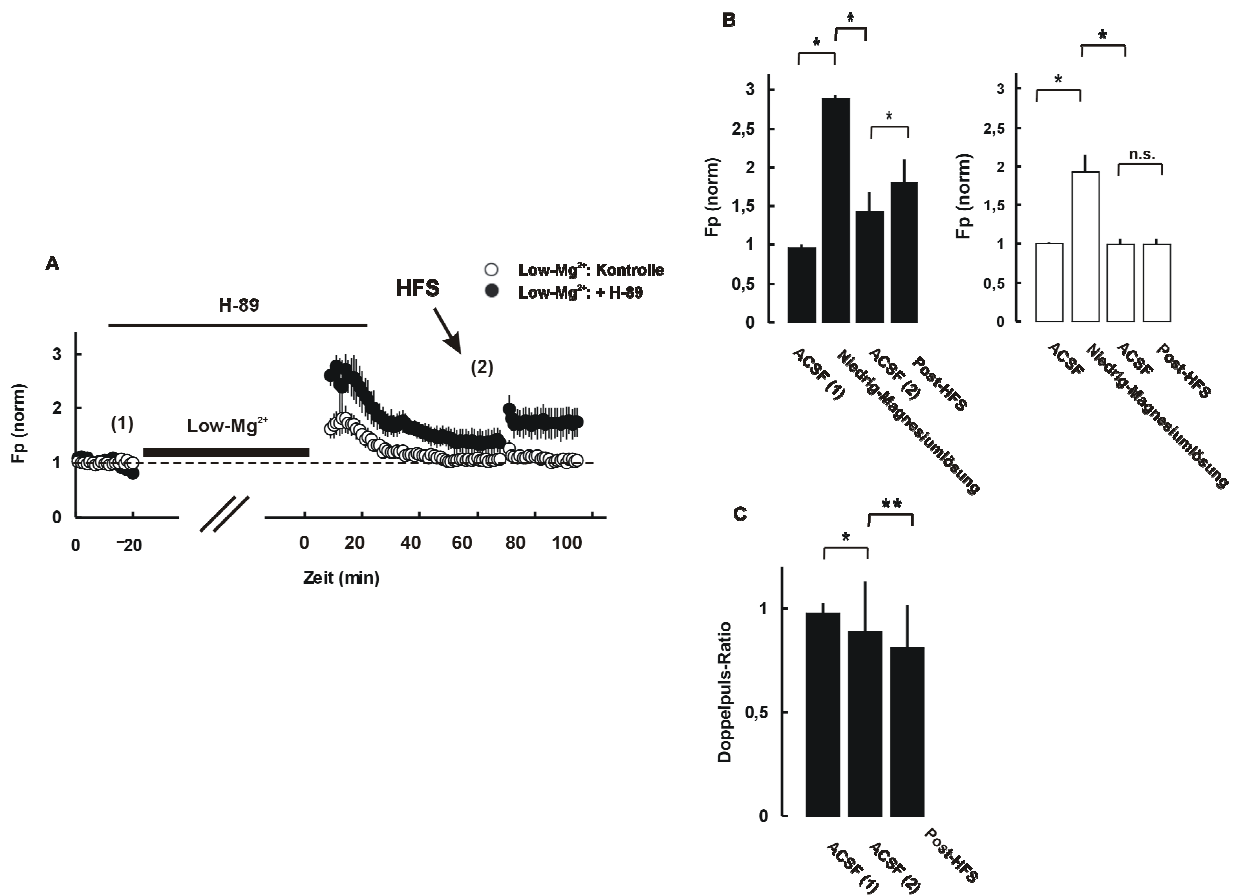


Abb. 23

Induktion von LTP nach epileptiformer Aktivität im Niedrig-Magnesium-Modell. **A** Zeitverlauf nach synaptischer Reizung (n=4). Nach hochfrequenter Stimulation konnte im Gegensatz zur Kontrolle eine LTP im Niedrig-Magnesium-Modell nach Perfusion mit H-89 induziert werden. (Pfeil: HFS: LTP-Induktion durch hochfrequente Stimulation mit 4 x 100 Hz). ACSF (artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit)

B Säulenhistogramm der normalisierten Feldpotentialamplituden in Bezug auf den Baseline-Wert (* p < 0,05, n.s.: p > 0,05).

C Doppelpulsindex vor und nach dem Tetanus (* p < 0,05; ** p < 0,05, Bestimmung des Signifikanzniveaus mit ANOVA). Den statistischen Berechnungen zu Induktionsparadigmen liegen die Feldpotential-Amplituden der letzten 10 Messdaten vor Tetanus und vor Ende des Experiments nach Induktion zu Grunde.

5. Diskussion

Patienten mit TLE leiden nicht selten an schweren Störungen der Gedächtnisbildung. Auch das Abrufen gespeicherter Informationen ist oftmals gestört (Elger, 2005). Um solche Störungen in der hippocampalen Gedächtnisbildung erklären zu können, ist es von großer Bedeutung, die Grundmechanismen der Gedächtnisverarbeitung und ihrer Störung zu verstehen. Synaptische Plastizität wie Langzeitpotenzierung (LTP) stellt dabei ein anerkanntes Korrelat des Lernens sowie der Gedächtnisbildung auf zellulärer Ebene dar (Martin et al., 2000). Ergebnisse, die in tierexperimentellen Modellen zu den Grundmechanismen der Gedächtnisbildung, aber auch zu den Störungen erhoben worden sind, haben gezeigt, dass die Erkenntnisse auch auf den Menschen übertragbar sind (Kandel, 1976). Da das Subikulum eine wesentliche Rolle in der Weiterleitung und Verarbeitung von hippocampalen Informationen spielt, haben Untersuchungen zur synaptischen Plastizität an der CA1-Subikulum Synapse in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutsamkeit gewonnen. Das Subikulum als Hauptziel der CA1-Pyramidenzellen fungiert dabei als wichtigste Schaltstelle hippocampaler Efferenzen. Es konnte sowohl in den extra- als auch intrazellulären Ableitungen gezeigt werden, dass die synaptische Plastizität nach epileptischer Aktivität sowohl in experimentellen Epilepsiemodellen (Pilocarpin-Modell, Niedrig-Magnesium-Modell) als auch in humanen Hirnschnitten von Patienten mit TLE in charakteristischer Weise beeinträchtigt ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Erkenntnisse mittels elektrophysiologischer Messmethoden zur Langzeitpotenzierung an der CA1-Subikulum Synapse in humaner und experimenteller Temporallappenepilepsie zu erhalten, da ein besseres Verständnis des epileptogenen Prozesses zu einer Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze beitragen könnte.

5.1 Zellspezifischer Verlust von LTP im Pilocarpin-Modell der Temporallappenepilepsie

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CA1-Subikulum Synapse kein einheitliches System darstellt. In Abhängigkeit vom subikulären Zelltyp (Bursterzellen und regulär feuernde Zellen) können zwei grundsätzlich unterschiedliche Formen der NMDA-abhängigen LTP beobachtet werden: In regulär feuernenden Zellen ist

die LTP von einem postsynaptischen Ca^{2+} -Einstrom abhängig und wird postsynaptisch exprimiert. In Bursterzellen hingegen ist die Aktivierung der präsynaptischen cAMP-Kaskade für die Induktion einer LTP notwendig (Wozny et al., 2008a, b). Hochfrequente Stimulation führte im Kontrolltier in beiden Zelltypen zu einer LTP.

Für die Ausbildung einer LTP ist die Proteinkinase A (PKA) ein essentielles Signaltransduktionsmolekül (Nguyen and Woo, 2003). Forskolin ist dabei eine etablierte Modellsubstanz zur Aktivierung der PKA. Der Effekt von Forskolin beruht auf einer direkten Aktivierung der Adenylatcyclase (Onda et al., 2001) und erhöht so indirekt die cAMP-Konzentration in der Präsynapse, welche wiederum zu einer erhöhten Transmitterfreisetzung führt. In Bursterzellen konnte durch die Applikation von Forskolin eine signifikante LTP beobachtet werden. Eine anschließende tetanische Reizung führte zu keiner weiteren Potenzierung der EPSP Amplitude. Hinsichtlich der oben dargestellten Beobachtungen kann angenommen werden, dass in Bursterzellen die gleichen Mechanismen an einer elektrisch induzierten LTP durch hochfrequente Reizung und chemisch induzierter LTP durch die Forskolingabe beteiligt sind. Für einen präsynaptischen Mechanismus in Bursterzellen spricht darüber hinaus die signifikante Veränderung des Doppelpulsindex nach tetanischer Reizung.

Die bisher im Pilocarpin-Modell gewonnenen Daten zeigen, dass chronisch epileptische Aktivität nicht zu einem signifikanten Verlust an subikulären Pyramidenzellen führt, sondern vielmehr eine Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität an der CA1-Subikulum Synapse durch epileptische Aktivität resultiert (Knopp et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Einzellmessungen an der CA1-Subikulum-Synapse eine zellspezifische Störung der LTP in Pilocarpin-behandelten Tieren beobachtet werden. Die Ergebnisse im Pilocarpin-Modell zeigen, dass epileptische Aktivität ausschließlich zu einem Verlust der LTP in Bursterzellen führt. Eine Beeinträchtigung der LTP an Synapsen von regulär feuernenden Zellen konnte nicht beobachtet werden. Des Weiteren konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Bursterzellen und regulär feuernenden Zellen in Bezug auf die Membraneigenschaften ermittelt werden, der den Verlust der LTP in Bursterzellen erklären könnte. Im Gegensatz zu den intrazellulären Messungen konnte in den extrazellulären Ableitungen keine signifikante LTP induziert werden. Eine Erklärung dafür könnte die topografische Verteilung von burstentladenden und regulär feuernenden Zellen sein. In Abhängigkeit von der Region tief versus oberflächlich, proximal versus distal kann der Anteil der regulär feuernenden Zellen gering ausfallen (Greene und Totterdell, 1997; Harris et al., 2001;

Menendez et al., 2002; Staff et al., 2000), so dass sich in Feldantworten keine signifikante LTP zeigte. Die räumliche Verteilung von Bursterzellen und regulär feuernenden Zellen in den Schichten des Subikulums und die Topografie der subikulären Efferenzen (Ishizuka, 2001) lassen vermuten, dass Bursterzellen und regulär feuernende Zellen mit unterschiedlichen subkortikalen Strukturen verbunden sind. Bursterzellen und regulär feuernende Zellen könnten demnach unterschiedliche Aufgaben einerseits bei der Aufnahme von Informationen und andererseits bei der Informationsverteilung besitzen. In Abhängigkeit des betroffenen Zelltyps würde der Verlust der LTP bedeuten, dass die Weiterleitung von sensorischen Informationen zu spezifischen kortikalen und subkortikalen Strukturen beeinträchtigt wird. Ein Verlust der LTP in burstenden Zellen im Epilepsietiermodell könnte demnach als Erklärung für eine Beeinträchtigung des deklarativen Gedächtnisses bei Patienten mit TLE dienen, da Bursts von Aktionspotentialen physiologischen Prozessen wie Lern- und Gedächtnisprozessen zugrunde liegen (Pike et al., 1999).

Vor dem Hintergrund weiterer Untersuchungen in der vorliegenden Studie liegt die Annahme nahe, dass ein durch epileptische Aktivität bedingte verminderte Expression an Adenylatcyclase vom Typ 1 (AC1) zu einer Beeinträchtigung der LTP in Bursterzellen führt. Diese Hypothese beruht auf folgenden Resultaten: Erstens, die gestörte Expression einer präsynaptischen LTP ist assoziiert mit einer nicht gestörten Expression einer LTD, die durch einen postsynaptischen NMDA-Rezeptor abhängigen Mechanismus bedingt ist (Fidzinski et al., 2008). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass epileptische Aktivität eine selektive Beeinträchtigung der LTP und den zugrunde liegenden Signalkaskaden hervorruft. Zweitens, unter Kontrollbedingungen führte in Bursterzellen die Applikation von Forskolin zu einem deutlichen Anstieg der EPSP Amplitude, wobei durch anschließende tetanische Stimulation keine LTP induziert werden konnte. Dieses Verhalten weist daraufhin, dass Forskolin und hochfrequente Reizung LTP über den gleichen Mechanismus induzieren. Die Annahme einer präsynaptischen Form der LTP in Bursterzellen wird dadurch unterstützt, dass nach elektrisch induzierter LTP eine verminderte Doppelpulsfaszilitierung beobachtet werden kann. So wie nach chemisch induzierter LTP durch die Applikation von Forskolin (Wozny et al., 2008b). Demgegenüber zeigte sich in Bursterzellen von Pilocarpin-behandelten Tieren lediglich ein stark verminderter Effekt von Forskolin und nachfolgender tetanischer Reizung auf die synaptische Übertragungsstärke. Die Ergebnisse zur LTP an der CA1-Subikulum Synapse weisen darauf hin, dass die

präsynaptische Form der LTP in Bursterzellen eine hohe Sensitivität gegenüber dem AC1-cAMP-PKA-System besitzt. Für die Moosfaser-CA3 Synapse konnte bereits gezeigt werden, dass epileptische Aktivität die präsynaptische Aktivität der PKA herunterreguliert (Goussakov et al., 2000). Frühere Studien zum Langzeitgedächtnis und zur LTP weisen auf eine Beteiligung der AC1 hin (Ferguson und Storm, 2004): Knockout Studien, in denen die Calcium-, Calmodulin-stimulierte Adenylatcyclase Typ 1 (AC1KO) ausgeschaltet wird, verdeutlichen, dass die Aktivität der AC1 sowohl für die prä- als auch für die postsynaptische Form der LTP notwendig ist (Villacres et al., 1998; Wong et al., 1999). Zudem wird die AC1 in Hirnregionen exprimiert, in denen die Aktivierung des NMDA-Rezeptors einen Anstieg der cAMP-Konzentration bewirkt (Chetkovich and Sweatt, 1993). Darüber hinaus scheint die AC1 an der NMDA-abhängigen LTP beteiligt zu sein, da der NMDA-Rezeptor bedingte Kalziumanstieg die Funktion der Ca^{2+} -stimulierten Adenylatcyclase in vivo beeinflussen könnte (Wong et al., 1999).

Vor dem Hintergrund der vorliegenden Studie stellt sich somit die Frage, ob Veränderungen in der Expression der AC1 den Verlust der präsynaptischen LTP in Pilocarpin-behandelten Tieren erklären können. In hippokampalen Hirnschnitten konnte eine hohe Expression an AC1 in Westernblot Analysen nachgewiesen werden. Dieser Befund stimmt mit einer kürzlich veröffentlichten Studie überein, in der die AC1 eine stabile prä- und postsynaptische Expression im Hippokampus von Mäusen sowohl in der postnatalen Phase als auch im Erwachsenenalter aufwies. Die hippokampale Expression von AC1 erschien dabei wesentlich ausgeprägter als die anderer Isoformen (Conti et al., 2007). Auch wenn die AC1 nicht die Isoform im Hippokampus darstellt, die am stärksten exprimiert wird, zeigt sie jedoch eine fünf mal höhere Sensitivität gegenüber Calcium als vergleichsweise die AC8 (Wang und Storm, 2003). Die stark verminderte Expression an AC1 im Vergleich zum Kontrollprotein Aktin, lässt darauf schließen, dass eine reduzierte AC1 Expression und eine damit verbundene reduzierte cAMP Produktion in Pilocarpin-behandelten Tieren für eine verminderte synaptische Übertragungsstärke in Bursterzellen verantwortlich ist. Der zugrunde liegende Mechanismus, der zu einer verminderten hippokampalen Expression von AC1 nach epileptischer Aktivität führt, ist bisher nicht geklärt. Da jedoch für die AC1 eine NMDA-Rezeptor-abhängige Exzitotoxizität beschrieben worden ist (Wang et al., 2007), könnte eine Herunterregulierung dieses Enzyms als eine Art neuroprotektiver Schutzmechanismus nach epileptischer Aktivität dienen.

5.2 Verlust von LTP im Subikulum von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie

Bei Patienten, die an einer TLE leiden, werden nicht selten schwerwiegende Lern- und Gedächtnisdefizite beschrieben (Elger, 2005). Durch die Verwendung tierexperimenteller Modelle, aber auch durch Untersuchungen in humanen Hippokampus-Resektaten von Patienten mit TLE konnten die zugrunde liegenden Pathomechanismen bis heute nicht vollständig geklärt werden. In der vorliegenden Arbeit konnten beide subikuläre Zelltypen mit ihrem spezifischen Entladungsmuster in humanen Hippokampus-Präparaten von Patienten mit TLE nachgewiesen werden. Nach hochfrequenter Stimulation konnte wie in den Pilocarpin-behandelten Tieren keine LTP in subikulären Bursterzellen induziert werden. Im Gegensatz zum Tiermodell konnte hingegen in den regulär feuernden Zellen ebenfalls keine LTP nach hochfrequenter Reizung gemessen werden. In der Literatur wird beschrieben, dass im humanen pathologischen Gewebe Neurodegeneration und Sklerose vor allem in der Area CA1 und CA3 zu einer ausgeprägten Reorganisation des neuronalen Netzwerks führen. Typische pathologische Veränderungen in diesem Zusammenhang sind neben anatomisch aberanten Konnektivitäten zwischen den Neuronen auch eine gesteigerte Neosynaptogenese (Houser und Esclapez, 1996). Vor dem Hintergrund der oben dargestellten Beobachtungen liegt die Vermutung nahe, dass ein Verlust der LTP wie sie in der vorliegenden Arbeit in extrazellulären Messungen im Pilocarpin-Modell beobachtet werden kann, auf einen Zellverlust zurückgeführt werden könnte. Dem steht jedoch die Studie von Knopp et al. (2005) gegenüber, in der gezeigt werden konnte, dass das nachgeschaltete Subikulum im Tiermodell keine Sklerose und häufig einen nur sehr gering ausgeprägten Zellverlust aufweist. Zudem zeigte sich in der vorliegenden Studie der Verlust der LTP in humanen subikulären Zellen von Patienten mit TLE unabhängig vom Wyler Grad. Unter der Annahme, dass epileptische Aktivität in den mesialen Strukturen des Temporallappens generiert wird, besitzt das Subikulum eine Schlüsselfunktion in der Anfallsgenerierung, da ein intaktes Netzwerk Voraussetzung für die Generierung von Anfällen ist (Wozny et al., 2003). Veränderungen auf Netzwerkebene scheinen demnach für die Epileptogenese im Subikulum eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass Veränderungen auf synaptischer Ebene für eine erhöhte Erregbarkeit im Subikulum von Bedeutung sind. Des Weiteren konnten in der vorliegenden Studie keine

Veränderungen bezüglich der Membraneigenschaften von Bursterzellen und regulär feuernenden Zellen beobachtet werden, die den Verlust der LTP in beiden Zelltypen erklären könnten. Ebenfalls ungeklärt ist, warum im Subikulum eine Beeinträchtigung der LTP in regulär feuernenden Zellen in humanen Hippokampus-Resektaten von Patienten mit TLE resultierte, in Pilocarpin-behandelten Tieren jedoch kein Verlust in regulär feuernenden Zellen zu beobachten war. Aus diesen vorläufigen Befunden lässt sich möglicherweise schließen, dass durch die Temporallappenepilepsie plastische Phänomene induziert werden, die mit einer Verschiebung des Schwellenwertes für die Induzierbarkeit von LTP einhergehen könnten. Mögliche weitere Ursachen könnten eine unterschiedliche Sensitivität der Signalkaskaden gegenüber epileptischer Aktivität sein, eine unterschiedliche Epileptogenese oder eine grundsätzlich unterschiedliche Form der synaptischen Plastizität in humanen subikulären Zellen im Vergleich zur tierexperimentellen TLE.

5.3 LTP im Niedrig-Magnesium-Modell der Temporallappenepilepsie

In der vorliegenden Arbeit erfolgten extrazelluläre Messungen in einem Akut-Modell der TLE, um zelluläre und molekulare Pathomechanismen der TLE an der CA1-Subikulum Synapse aufzudecken. In früheren Studien konnte bereits eine verminderte synaptische Übertragungsstärke nach epileptischer Aktivität beobachtet werden (Hesse und Teyler, 1976). Für die Schaffer-kollateral-CA1 Synapse konnte gezeigt werden, dass durch eine Veränderung des extrazellulären Ionenmilieus im Niedrig-Magnesium-Modell epileptiforme Aktivität hervorgerufen werden kann und nach stattgehabter epileptischer Aktivität keine LTP zu induzieren ist (Coan und Collingridge, 1985; Hsu et al., 2000). Das Niedrig-Magnesium-Modell bietet im Gegensatz zu einem chronischen Epilepsiemodell den Vorteil, dass akute Veränderungen der synaptischen Plastizität untersucht werden können und die zugrunde liegenden Mechanismen durch die Applikation von Pharmaka direkt beeinflussbar sind. Für die Induktion der LTP spielt der NMDA-Rezeptor vermittelte postsynaptische Anstieg an intrazellulärem Kalzium eine wesentliche Bedeutung (Malenka et al., 1989). Der erhöhte Kalzium-Spiegel führt beispielsweise zu einer Phosphorylierung der PKA (Huang und Kandel, 1994). Die Aktivierung der PKA erfolgt durch die Bindung des Signalmoleküls cAMP, wodurch das Abdissoziieren der inhibitorischen regulatorischen Untereinheit der PKA bewirkt wird.

Der second messenger cAMP wird wiederum von der membranständigen Adenylatcyclase gebildet. In einer Studie von Boulton et al. (1993) wird beschrieben, dass die Aktivierung der PKA durch Forskolin oder cAMP-Applikation zu einer verstärkten epileptischen Aktivität im Neokortex der Ratte führt, die primär durch den Entzug von Magnesium ausgelöst wurde. Für eine erhöhte epileptogene Wirkung der PKA spricht eine Studie von Yechikov et al. (2001), in der eine erhöhte PKA Aktivität u.a. im Hippokampus bei einem Rattenstamm mit häufig spontaner epileptischer Aktivität beschrieben wird. Im Hippokampus der Ratte konnte zudem nachgewiesen werden, dass eine Aktivierung der PKA durch Forskolin zu einer Verstärkung der epileptischen Aktivität führt (Higashima et al., 2002). Darüber hinaus konnten in einem Epilepsie-Modell der Maus beobachtet werden, dass eine Hemmung der PKA durch H-89 die epileptische Aktivität abschwächt (Tehrani und Barnes, 1995).

Vor dem Hintergrund der dargestellten Studien erscheint vor allem die Modulation des AC1-cAMP-PKA-Systems nach epileptischer Aktivität im Niedrig-Magnesium-Modell interessant. Wie in den vorliegenden Daten gezeigt, ist der Verlust von LTP nach epileptischer Aktivität beeinflussbar: Die Applikation von H-89 und eine somit fehlende Aktivierung der PKA während der epileptiformen Aktivität ermöglichte die Induktion einer LTP im Subikulum nach hochfrequenter Stimulation. Vor dem Hintergrund der hier dargestellten Beobachtungen wird aufgezeigt, dass epileptische Aktivität zu einer Beeinträchtigung der LTP an der CA1-Subikulum Synapse führt: Im Pilocarpin-behandelten Tier führte die verminderte Expression von AC1 zu einem Verlust der LTP. Im Niedrig-Magnesium-Modell hingegen ermöglichte eine fehlende Aktivierung der PKA während epileptischer Aktivität die Induktion der LTP.

6. Zusammenfassung

Das Subikulum ist von besonderer Bedeutung für die Verarbeitung und Weiterleitung von Gedächtnisinhalten (Squire und Alvarez, 1995; Lynch, 2004). Es erhält Informationen aus der Area CA1 und fungiert dabei als Detektor und Verteiler sensorischer Informationen (Naber et al, 2000; Burwell 2000), indem es neuronale Informationen der Area CA1 in verschiedene kortikale und subkortikale Hirnregionen weiterleitet (Amaral und Witter, 1995). Bei Patienten, die an einer TLE leiden, werden oftmals schwere Störungen der Gedächtnisbildung beschrieben (Elger, 2005). LTP wird in tierexperimentellen Studien als ein anerkanntes Korrelat der Gedächtnisbildung auf zellulärer Ebene (Martin et al., 2000) eingesetzt, um somit Grundlagen der Gedächtnisbildung bzw. Störungen näher zu erforschen. Im Tiermodell und in humanen Hippokampus-Resektaten finden sich im Subikulum der Ratte zwei unterschiedliche Typen von Pyramidalzellen, die sich auf Grund ihres intrinsischen Entladungsverhaltens charakterisieren lassen. Vorarbeiten zeigten eine zellspezifisch ausgeprägte LTP: In regulär feuernenden Zellen wird die LTP postsynaptisch exprimiert. In Bursterzellen hingegen ist die Aktivierung der präsynaptischen Adenylatcyclase-cAMP Kaskade für die Induktion einer LTP notwendig. In Pilocarpin-behandelten Tieren und in Hippokampus-Präparaten von Patienten mit TLE ließ sich in der vorgelegten Arbeit nach hochfrequenter Reizung keine LTP in Bursterzellen induzieren, wohingegen in regulär feuernenden Zellen ein Verlust der LTP nur in humanen Hirnschnitten von Patienten mit TLE zu beobachten war. In Pilocarpin-behandelten Tieren war der Verlust der präsynaptischen LTP in Bursterzellen mit einer nicht gestörten Expression einer LTD nach niederfrequenter Reizung assoziiert. Eine reduzierte Expression der Adenylatcyclase Typ 1 (AC1) in Pilocarpin-behandelten Tieren und der Verlust von LTP in Bursterzellen lassen sich im epileptischen Gewebe auf eine reduzierte cAMP Produktion zurückführen. Aus diesen Befunden lässt sich möglicherweise schließen, dass die Herunterregulierung der AC1 im epileptischen Gewebe ein wesentlicher Faktor für eine Beeinträchtigung des deklarativen Gedächtnisses bei Patienten mit Temporallappenepilepsie darstellt.

Literaturverzeichnis

- 1 Abraham WC. Activity-dependent regulation of synaptic plasticity (metaplasticity) in the hippocampus. In: The hippocampus: Functions and Clinical Relevance. Ed. N. Kato. Elsevier Science B.V: Amsterdam, 1996:15-26.
- 2 Abraham WC, Bear MF. Metaplasticity: The synaptic plasticity of plasticity. *Tr Neurosci* 1996;19:126-130.
- 3 Abraham WC, Tate WP. Metaplasticity: A new vista across the field of synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 1997;52:303-323.
- 4 Abraham WC, Logan B, Greenwood JM, et al. Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. *J Neurosci* 2002;22:9626-9634.
- 5 Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organisation of the hippocampal formation; a review of anatomical data. *Neuroscience* 1989;31:571-591.
- 6 Amaral DG, Witter MP. Hippocampal formation. IN: Paxinos, G (Ed.). *The Rat Nervous System, Second Edition*, Academic Press, New York, 1995.
- 7 Anderson WW, Lewis DV, Swartzwelder HS, et al. Magnesium-free medium activates seizure-like events in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 1986;398:215-219.
- 8 Anderson M, Commins S, O'Mara SM. The effects of low frequency and two-pulse stimulation protocols on synaptic transmission in the CA1-subiculum pathway in the anesthetized rat. *Neurosci Lett* 2000;279:181-184.
- 9 Avoli M, Louvel J, Pumain R et al. Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Prog Neurobiol* 2005;77:166-200.

10 Barr DS, Hoyt KL, Moore SD, et al. Post-ictal depression transiently inhibits induction of LTP in area CA1 of the rat hippocampal slice. *Epilepsy Res* 1997;27(2):111-118.

11 Bear MF, Malenka RC. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4 (3):389-399.

12 Bear MF, Abraham WC. Long-term depression in hippocampus. *Annu Rev Neurosci* 1996;19:437-462.

13 Behr J, Empson RM, Schmitz D, et al. Electrophysiological properties of rat subicular neurons in vitro. *Neurosci Lett* 1996;220:41-44.

14 Bi GQ, Poo MM. Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: Dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J Neurosci* 1998;18:551-555.

15 Bienenstock EL, Cooper LN, Munro PW. Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *J Neurosci* 1982;2:32-48.

16 Bliss TV, Løvmø T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973;232:331-356.

17 Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361:31-39.

18 Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, et al. Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* 1998;280(5371):1940-1942.

19 Blitzer RD, Iyengar R, Landau EM. Postsynaptic signaling networks: Cellular cogwheels underlying long-term plasticity. *Biol Psychiatry* 2005;57:113-119.

20 Bolshakov VY, Siegelbaum SA. Postsynaptic induction and presynaptic expression of hippocampal long-term depression. *Science* 1994;264:1148–1152.

21 Bortolotto ZA, Collingridge GL. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in the setting of a molecular switch involved in hippocampal LTP. *Neuropharmacol* 1998;37:535-544.

22 Boulton CL, McCrohan CR, O`Shaughnessy CT. Cyclic AMP analogues increase excitability and enhance epileptiform activity in rat neocortex in vitro. *Eur J Pharmacol* 1993;236:131-136.

23 Burwell, R.D. The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann NY Acad.Sci.* 2000;911:25-42.

24 Chetkovich DM, Sweatt JD. NMDA receptor activation increased cyclic AMP in area CA1 of the hippocampus via calcium/calmodulin stimulation of adenylyl cyclase. *J Neurochem* 1993;61:1933-1942.

25 Coan EJ, Collingridge GL. Magnesium ions block an N-methyl-D-aspartate receptor-mediated component of synaptic transmission in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1985;53:21-26.

26 Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, et al. On the origin of Interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 2002;298:1418-1421.

27 Cohen I, Navarro V, Le Duigou C, et al. Mesial temporal lobe epilepsy: a pathological replay of developmental mechanisms? *Biol Cell* 2003;95:329-333.

28 Commins S, Gigg J, Anderson M, et al. Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation in the projection from hippocampal area CA1 to the subiculum. *NeuroReport* 1998a;9:4109-4113.

29 Commins S, Gigg J, Anderson M, et al. The projection from hippocampal area CA1 to the subiculum sustains long-term potentiation. *NeuroReport* 1998b;9:847-850.

30 Conti AC, Maas JW, Jr., Muglia LM et al. Distinct regional and subcellular localization of adenylyl cyclases type 1 and 8 in mouse brain. *Neurosci* 2007;146:713-729.

31 Deadwyler SA, Hampson RE. Differential but complementary mnemonic functions of the hippocampus and subiculum. *Neuron* 2004;42:465-476.

32 Debanne D, Guerineu NC, Gähwiler BH, et al. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J Physiol* 1996;491:163-176.

33 Derkach V, Barria A, Soderling TR. Ca^{2+} /calmodulin-kinase II enhances channel conductance of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoazolepropionate type glutamate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3269-3274.

34 Dichter MA, Ayala GF. Cellular mechanism of epilepsy: A status report. *Science* 1987;237:157-164.

35 Dreier JP, Heinemann U. Regional and time dependent variations of low Mg^{2+} induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Experimental Brain Research* 1991;87:581-596.

36 Dudek SM, Bear MF. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4363-4366.

37 Eichenbaum. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 2004;44:109-120.

38 Elger CE. Epilepsy: a model for the study of brain function. *Lancet Neurol* 2005;4:3.

39 Engert F, Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 1999;6;399(6731):66-70.

40 Fidzinski P, Shor O, Behr J. Target-cell-specific bidirectional synaptic plasticity at hippocampal output synapses. *Eur J Neurosci*. 2008 Mar;27(5):1111-8.

41 Ferguson GD, Storm DR. Why calcium-stimulated adenylyl cyclases? *Physiology (Bethesda)* 2004;19:271-276.

42 Fukunaga K, Muller D, Miyamoto E. Increased phosphorylation of Ca^{2+} / Calmodulin-dependent kinase II and its endogenous substrates in the induction of long-term potentiation. *J Biol Chem* 1995;270:6119-6124.

43 Funahashi M, Harris E, Stewart M. Re-entrant activity in a presubiculum-subiculum circuit generates epileptiform activity in vitro. *Brain Res* 1999;849:139-146.

44 Frey U, Huang YY, Kandel ER. Effects of cAMP stimulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* 1993;260:1661-1664.

45 Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, et al. Autophosphorylation at Thr-286 of the alpha calcium calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* 1998;279:870-873.

46 Goussakov IV, Fink K, Elger CE, et al. Metaplasticity of mossy fiber synaptic transmission involves altered release probability. *J Neurosci* 2000;20:3434-3441.

47 Guzman de P, Inaba Y, Biagini G, et al. Subiculum network excitability is increased in a rodent model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 2006;16:1-18.

48 Green J D (1964). *The Hippocampus*. *Physiol Rev* 1964: 44:561-608.

49 Greene JR, Mason A. Neuronal diversity in the subiculum: correlations with the effects of somatostatin on intrinsic properties and on GABA-mediated IPSPs in vitro. *J Neurophysiol* 1996;76:1657-1666.

50 Greene JR, Totterdell S. Morphology and distribution of electrophysiologically defined classes of pyramidal and nonpyramidal neurons in rat ventral subiculum in vitro. *J Comp Neurol* 1997;380(3):395-408.

51 Hamilton SE, Loose MD, Ming QI et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *PNAS* 1997;94:13311-13316.

52 Hammond C. *Cellular and Molecular Neurobiology*. Academic Press 2001.

53 Harris E, Witter MP, Weinstein G et al. Intrinsic connectivity of the rat subiculum: I. Dendritic morphology and patterns of axonal arborisation by pyramidal neurons. *J Comp Neurol* 2001;435:490-505.

54 Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, et al. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 2000;287:2262-2267.

55 Hebb DO. *The organization of behaviour*. New York: Wiley, 1949.

56 Heinemann U. Basic mechanisms of partial epilepsies. *Curr Opin Neurol* 2004;17:155-159.

57 Hesse GW, Teyler TJ. Reversible loss of hippocampal long-term potentiation following electroconvulsive seizures. *Nature* 1976;264:562-564.

58 Heynen AJ, Abraham WC, Bear MF. Bidirectional modification of CA1 synapses in the adult hippocampus in vivo. *Nature* 1996;381:163-166.

59 Higashima M, Ohno K, Koshino Y. Cyclic AMP-mediated modulation of epileptiform afterdischarge generation in rat hippocampal slices. *Brain Res* 2002;949:157-161.

60 Houser CR, Esclapez M. Vulnerability and plasticity of the GABA system in the pilocarpine model of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsy Res* 1996;26:207-218.

61 Houser CR. Neuronal loss and synaptic reorganization in temporal lobe epilepsy. In: Delgado-Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW, Porter RJ, editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 3rd Ed (Advances in Neurology, Vol 79). Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

62 Hsu KS, Ho WC, Huang CC, et al. Transient removal of extracellular Mg^{2+} elicits persistent suppression of LTP at hippocampal CA1 synapses via PKC activation. *J Physiol* 2000;84(3):1279-1288.

63 Huang Y, Kandel ER. Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of the hippocampus requires repeated tetanization. *Learn Mem* 1994;1:74-82.

64 Ishizuka, N. Laminar organization of the pyramidal cell layer of the subiculum in the rat. *J. Comp Neurol* 2001;435:89-110.

65 Jackson MB, Konnerth A, Augustine GJ. Action potential broadening and frequency-dependent facilitation of calcium signals in pituitary nerve terminals. PNAS 1991;88:380-384.

66 Jarsky T, Mady R, Kennedy B et al. Distribution of bursting neurons in the CA1 Region and the subiculum of the rat hippocampus. J Comp Neurol 2008;506:535-547.

67 Jeffreys JG. Mechanisms and experimental models of seizure generation. Curr Opin Neurol 1998;11:123-127.

68 Kandel ER. Cellular basic of behaviour. An introduction to behavioral neurobiology. Freeman, San Francisco 1976.

69 Kemp N, Bashir ZI. Long-term depression: a cascade of induction and expression mechanisms. Prog Neurobiol 2001;65:339-365.

70 Knopp A, Kivi A, Wozny C, et al. Cellular and network properties of the subiculum in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. J Comp Neurol 2005;483:476-488.

71 Knopp A, Frahm C, Fidzinski P et al. Loss of GABAergic neurons in the subiculum and its functional implications in temporal lobe epilepsy. Brain 2008;131:1516-1527.

72 Kokaia, M. Long-term potentiation of single subicular neurons in mice. Hippocampus 2000;10:684-692.

73 Köhler C. Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain. II. The medial entorhinal area. J Comp Neurol 1986;246:149-169.

74 Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, et al. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. Nature 2000;405:955-959.

75 Leritz EC, Grande LJ, Bauer RM. Temporal lobe epilepsy as a model to understand human memory: The distinction between explicit and implicit memory. *Epilepsy and Behav* 2006;9:1-13.

76 Levy WB, Steward O. Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation. *Brain Res.*1979;75:233–245.

77 Li H, Zhang J, Xiong W et al. Long-term depression in rat CA1-subicular synapses depends on the G-protein coupled mACh receptors. *Neurosci Res* 2005;52:287-294.

78 Lisman J, Malenka RC, Nicoll RA, et al. Learning mechanisms: The case for CaMKII. *Science* 1997;276.

79 Lisman JE, Zhabotinsky AM. A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly. *Neuron* 2001;31:191-200.

80 Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:175-190.

81 Lisman J, Raghavachari S. A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses. *Science's STKE* 2006;7:1-15.

82 Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 2004;84:87-136.

83 Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, et al. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* 1989;340:554-557.

84 Malenka RC, Nicoll RA. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* 1993;16(12):521-527.

85 Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation – A decade of progress? *Science* 1999;285:1870-1874.

86 Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 2004;44:5-21.

87 Malinow R, Schulman H, Tsien RW. Inhibition of postsynaptic PKC in cerebellar long-term depression in culture. *Neuron* 1989;15:1393-1401.

88 Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:649-711.

89 Mattia D, Hwa GG, Avoli M. Membrane properties of rat subicular neurons in vitro. *J Neurophysiol* 1993;70:1244-1248.

90 Mathern GW, Pretorius JK, Babb TL. Quantified patterns of mossy fiber sprouting and neuron densities in hippocampal and lesional seizures. *J Neurosurg* 1995;82:211-219.

91 McCormick DA, Contreras D. On the cellular and network based on epileptic seizures. *Annu Rev Physiol* 2001;63:815-846.

92 McGuinness N, Anwyl R, Rowan N. Trans-ACPD enhances long-term potentiation in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 1991;197:231-232.

93 Menendez de la Prida L, Suarez F, Pozo MA. The effect of different morphological sampling criteria on the fraction of bursting cells recorded in the rat subiculum in vitro. *Neurosci Lett* 2002; 322:49-52.

94 Mody I, Lambert JDC, Heinemann U. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 1987;57:869–888.

95 Moore SD, Barr DS, Wilson WA. Seizure-like activity disrupts LTP in vitro. *Neurosci Lett* 1993;163:117-119.

96 Morris RG, Schenk F, and Tweedie F, et al. Ibotenate lesions of hippocampus and / or subiculum: dissociating components of allocentric spatial learning. *Eur J Neurosci* 1990;2:1016-1028.

97 Mulkey RM, Malenka RC. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 1992;9:967-975.

98 Naber PA, Witter MP, Lopes Silva. Networks of the hippocampal memory system of the rat. The pivotal role of the subiculum. *Ann NY Acad Sci* 2000;911:392-403.

99 Nguyen PV, Kandel ER. A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *J Neurosci* 1996;16:2239-2246.

100 Nguyen PV, Woo NH. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Progress in Neurobiol* 2003;71:401-437.

101 O'Keefe J, Nadel L. A review of the hippocampal place cells. *Prog Neurobiol* 1978;13:419-439.

102 O'Mara SM, Commins S, Anderson M, et al. The subiculum: A review of form, physiology, and function. *Prog Neurobiol* 2001; 64:129-155.

103 Onda T, Hashimoto Y, Nagai M et al. Type specific regulation of adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 2001;276:47785-47793.

104 Pike FG, Meredith RM, Olding AWA et al. Postsynaptic bursting is essential for "Hebbian" induction of associative long-term potentiation at excitatory synapses in rat hippocampus. *J Physiol* 1999;518:571-576.

105 Regehr WG, Stevens CF. Physiology of synaptic transmission and short term synaptic plasticity. In: Cowan WM, Südhof TC, Stevens CF, (eds.). *The Synapse*. Johns Hopkins University Press: Baltimore, 2000.

106 Riedel G, Manahan-Vaughan D, Kozikowski AP, et al. Metabotropic glutamate receptor agonist trans-azetidine-2,4-dicarboxylic acid facilitates maintenance of LTP in the dentate gyrus in vivo. *Neuropharmacol* 1995a;34:1107-1109.

107 Riedel G, Wetzel W, Reymann KG. Metabotropic glutamate receptor in spatial and nonspatial learning in rats studied by means of agonist and antagonist application. *Learn Mem* 1995b;2:243-265.

108 Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psych* 1957;20:11-21.

109 Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after NMDA receptor activation. *Science* 1999;284:1811-1816.

110 Shobe J. The Role of PKA, CaMKII, and PKC in avoidance conditioning: permissive or instructive? *Neurobiol Learn Mem* 2002;77:291-312.

111 Shor OL, Fidzinski P, Behr J. Muscarinic acetylcholine receptors and voltage-gated calcium channels contribute to bidirectional synaptic plasticity at CA1-subiculum synapses. *Neurosci Lett* 2009;449:220-223.

112 Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. *Psychol Rev* 1992;99:195-231.

113 Squire LR, Alvarez P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Cur Opin Neurobiol* 1995;5:169-177.

114 Squire LR, Stark CE, Clark RE. The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* 2004;27:279-306.

115 Staff NP, Jung HY, Thiagarajan T, et al. Restino and active properties of pyramidal neurons in subiculum and CA1 of rat hippocampus. *J Neurophysiol* 2000;84:2398-2408.

116 Stanton PK. Noradrenergic modulation of epileptiform bursting and synaptic plasticity in the dentate gyrus. In: *The Dentate Gyrus and Its Role in Seizure*. *Epilepsy Res, Suppl. 7*, Chapter 1992;9:135–149.

117 Stevens CF. Strengths and weaknesses in memory. *Nature* 1996;381:471-472.

118 Steward O, Scoville SA. Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentate of the rat. *J Comp Neurol* 1976;169:347-370.

119 Stewart M, Wong RKS. Intrinsic properties and evoked responses of guinea pig subicular neurons in vitro. *J Neurophysiol* 1993;70: 232-245.

120 Stewart M. Antidromic and orthodromic responses by subicular neurons in rat brain slices. *Brain Res* 1997;769:71-85.

121 Svoboda K, Mainen ZF. Synaptic $[Ca^{2+}]_i$: intracellular stores spill their guts. *Neuron* 1999;22(3):427-430.

122 Swandulla D, Hans M, Zipser K et al. Role of residual calcium in synaptic depression and posttetanic potentiation: fast and slow calcium signaling in nerve terminals. *Neuron* 1991;7:915-926.

123 Tancredi V, Hwa GGC, Zona C, et al. Low magnesium epileptogenesis in the rat hippocampal slice: electrophysiological and pharmacological features. *Brain Res* 1990;511:280-290.

124 Taube JS. Electrophysiological properties of neurons in the rat subiculum in vitro. *Exp Brain Res* 1993;96:304-318.

125 Tehrani MH, Barnes EM. Reduced function of gamma-aminobutyric acid A receptors in tottering mouse brain: role of cAMP-dependent protein kinase. *Epilepsy Res* 1995;22:13-21.

126 Tsumoto T. Long-term depression in cerebral cortex: a possible substrate of „forgetting“ that should not be forgotten. *Neurosci Res* 1993;16: 263-270.

127 Villacres EC, Wong ST, Chavkin C. Type I adenylyl cyclases mutant mice have impaired mossy fiber long-term potentiation. *J Neurosci* 1998;18:3186-3194.

128 Vreugdenhil M, Hoogland G, Veelen CW van, et al. Persistent sodium current in subicular neurons isolated from patients with temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 2004;19:2769-2778.

129 Walther H, Lambert JDC, Jones RSG, et al. Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with low magnesium medium. *Neurosci Lett* 1986;69:156-161.

130 Wang H, Storm DR. Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system. *Mol Pharmacol* 2003;63:463-468.

131 Wang H, Ferguson GD, Pineda VV, et al. Overexpression of type-1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP. *Nat Neurosci* 2004;7:635-642.

132 Wang H, Gong B, Vadakkan KI et al. Genetic evidence for adenylyl cyclases 1 as a target for preventing neuronal excitotoxicity mediated by N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 2007;282:1507-1517.

133 Weisskopf MG, Castillo PE, Zalutsky RA, et al. Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science* 1994;265:1878-1882.

134 Wellmer J, Su H, Beck H, Yaari Y. Long-lasting modification of intrinsic discharge properties in subicular neurons isolated from patients with temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 2002;16:259-266.

135 Wieser HG, Engel JR, Williamson PD, et al. Surgically remediable temporal lobe syndrome. In: *Surgical Treatment of the Epilepsies, Second Edition* 49-63. New York: Raven Press, 1993.

136 Wilson WA, Lewis DV, Swartzwelder HS, et al. Magnesium-free medium activates seizure-like events in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 1986;398:215-219.

137 Winder DG, Mansuy IM, Osman M, et al. Genetic and pharmacological evidence for a novel, intermediate phase of long-term potentiation suppressed by calcineurin. *Cell* 1998;92:25-37.

138 Witter MP, Groenewegen HJ. The subiculum: Cytoarchitectonically a simple structure, but hodologically complex. *Prog Brain Res* 1990;83:47-58.

139 Wong ST, Athos J, Figueroa XA, et al. Calcium-stimulated Adenylatcyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron* 1999;23:787-798.

140 Wozny C, Kivi A, Lehmann TN, et al. Comment on „On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro“. *Science* 2003;301:463.

141 Wozny C, Knopp A, Lehmann TN, et al. The subiculum: a potential site of ictogenesis in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2005;46;Suppl 5:17-21.

142 Wozny C, Maier N, Schmitz D, et al. Two different forms of long-term potentiation at CA1-subiculum synapses. *J Physiol* 2008a;586(11):2725-2734.

143 Wozny C, Maier N, Fidzinski P, et al. Differential cAMP signaling at hippocampal output synapses. *J Neurosci* 2008b;28:14358-14362.

144 Wu Z, Thomas SA, Villacres EC, et al. Altered behavior and long-term potentiation in type 1 adenylyl cyclase mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:220-224.

145 Wyler AR, Dohan Jr. FC, Schweitzer JB et al. A grading system for mesial temporal pathology (hippocampal sclerosis) from anterior temporal lobectomy. *J Epilepsy* 1992;5:220-225.

146 Xia Z, Storm DR. The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nature Rev* 2005;6:267-276.

147 Yaari Y, Beck H. "Epileptic numerous" in temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* 2002;12:234-239.

148 Yechikko S, Morenkov E, Chulanova T et al. Involvement of cAMP and Ca²⁺ /calmodulin-dependent neuronal protein phosphorylation in mechanisms underlying genetic predisposition audiogenic seizures in rats. *Epilepsy Res* 2001;46:15-25

149 Young JZ, Isiegas C, Abel T, et al. Metaplasticity of the late-phase of long-term potentiation: a critical role for protein kinase A in synaptic tagging. *Eur J Neurosci* 2006;23:1784-1794.

150 Zhang L, Kirschstein T, Sommersberg B, et al. Hippocampal synaptic plasticity requires inhibitory autophosphorylation of Ca²⁺ /Calmodulin-dependent kinase II. *J Neurosci* 2005; 25(33):7697-7707

151 Zeineh MM, Engel SA, Thompson PM, et al. Dynamics of the hippocampus during encoding and retrieval of face-name pairs. *Science* 2003;299:577-580.

152 Zola-Morgan S, Squire LR, Rempel NL, et al. Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus. *J Neurosci* 1992;12:2582-2596.

153 Zucker RS, Regehr WG. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 2002;64:355-405.

Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Nadine Buck, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Titel „Verlust der Langzeitpotenzierung an der CA1 – Subikulum Synapse bei der Temporallappenepilepsie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 13. Dezember 2009

Nadine Buck

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Betreuer meiner Dissertation Herrn PD Dr. J. Behr für sein stets persönliches und freundliches Engagement, seine Anregungen und gewissenhafte Unterstützung zur Planung und Durchführung der Versuche und Erstellung meiner Dissertation.

Des Weiteren möchte ich für viele anregende Diskussionen und Unterstützung Herrn Dr. Pawel Fidzinski sehr danken. Zudem möchte ich Herrn Dr. Christian Wozny, Herrn Dr. Andreas Knopp, Herrn Dr. Anatol Kivi, Frau Elisabeth Roggenhofer und Herrn Olaf Maaßen danken. Herzlich danken möchte ich vor allem aber auch Frau Susanne Walden für ihre besondere und freundschaftliche Unterstützung nicht nur in der alltäglichen Laborarbeit.

Herrn Dr. Thomas-Nicolas Lehmann danke ich sehr für die Bereitstellung des humanen Gewebes.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie und meinem Freund für ihre außerordentliche Unterstützung.

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

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

Publikationsliste

Buck N, Cali S, Behr J (2005). Enhancement of long-term potentiation at CA1-subiculum synapses in MK-801-treated rats. *Neurosci Lett*

Fidzinski P *, **Buck N** *, Boeck K, Braunewell KH, Lehmann TN, Wozny C, Behr J (2009). Downregulation of adenylyl cyclase type 1 causes loss of long-term potentiation in temporal lobe epilepsy. Submitted, * equal contribution.

Brackmann M, Wozny C, **Buck N**, Zhao C, Boeck K, Buttgereit J, Bader M, Heinemann U, Braunewell KH, Behr J (2009). Particulate Guanylyl Cyclase NPR-B affects Synaptic Plasticity in the Subiculum. Submitted.

Symposiumsbeiträge

Buck N, Knopp A, Wozny C, Lehmann TN, Behr J (2006). Altered LTP and reduced interneuron density in the subiculum of pilocarpine treated rats. International Symposium Neuroscience Symposium, SFB/TR 3, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn

Brackmann M, **Buck N**, Anand R, Behr J, Braunewell KH (2006). Neuronal calcium sensor (NCS) protein VILIP-1 modulates cGMP signalling by regulating receptor guanylyl cyclase B cell surface expression and activity in neural cells and hippocampal neurons. Berlin Neuroscience Forum 2006