

Aus dem Johannes-Müller-Zentrum für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Reduzierte Krampfbereitschaft in chronisch epileptischem
Gewebe

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Robert Karl Zahn

aus Tübingen

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. Uwe Heinemann
 2. Prof. Dr. rer. nat. Gudrun Ahnert - Hilger
 3. Prof. Dr. med. Heinz Beck

Datum der Promotion: 16.05.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract	Seite 4
2. Einleitung und Zielstellung	Seite 5
3. Material und Methoden	Seite 6 - 7
4. Ergebnisse	Seite 7 - 12
5. Diskussion	Seite 13 - 17
6. Literaturverzeichnis	Seite 18 - 19
7. Ausgewählte Publikationen	Seite 20
8. Anteilserklärung	Seite 21
9. Selbständigkeitserklärung	Seite 22
10. Danksagung	Seite 23
11. Lebenslauf	Seite 24

1. Abstract

Chronisch epileptisches Gewebe zeigt oftmals eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber konvulsiven Substanzen. Ich habe nach Ursachen für diese erhöhte Krampfschwelle gesucht. Der neuronale Zellverlust in der Schicht III des medialen entorhinalen Cortex (MEC) wurde im Kainat - Modell für die mesiale Temporallappenepilepsie reproduziert. Nach Stimulation konnten in den oberflächlichen Schichten des MEC hochfrequente Potentiale registriert werden; diese Entladungen wurden durch Unterbrechung der glutamatergen Transmission blockiert. Im Gegensatz zu Kontrollgewebe hatte Bicucullin im Gewebe der epileptischen Tiere eine verringerte Wirkung auf die stimulationsinduzierten Feldpotentiale. Eine in situ Hybridisierung von GAD 65/67 zeigte eine konstante Zahl an Interneuronen in den Schichten II und III des MEC. 4-Aminopyridin (4-AP) induzierte im entorhinalen und perirhinalen Cortex im Gewebe der Kontrolltiere seizure like events (SLEs). Im Gegensatz hierzu konnten durch 4-AP in Gewebe chronisch epileptischer Tiere keine SLEs hervorgerufen werden. Real time PCR zeigte keine signifikante Herunterregulation der für 4-AP hochaffinen Kanäle im Subiculum, entorhinalen und perirhinalen Cortex von chronisch epileptischen Ratten. Die Expression der Kv3.4-Untereinheiten, welche erst im millimolaren Bereich durch 4-AP beeinflusst werden, war in diesen Regionen reduziert. Die Ergebnisse konnten durch immunzytochemische Antikörperfärbungen bestätigt werden. Elektrophysiologische in vitro Experimente mit Hirngewebe werden normalerweise in artefizieller zerebrospinaler Flüssigkeit durchgeführt, welche keine Aminosäuren enthält. Nach Substitution von Glutamin wurde im MEC chronisch epileptischer Ratten epileptiforme Aktivität beobachtet. In Präparaten von Kontrolltieren konnten diese Entladungen nicht registriert werden. Die Potentiale waren auf den MEC beschränkt, wurden durch einen AMPA / Kainat - Rezeptor Antagonisten attenuiert und durch Inhibition der neuronalen Glutaminaufnahme unterdrückt. Bicucullinmethiodid verstärkte die Entladungen.

Die Übererregbarkeit der Neurone in Schicht II des MEC ist nicht durch einen Verlust der GABAergen Interneurone bedingt und resultiert möglicherweise in Alterationen der synaptischen Konnektivität innerhalb der oberflächlichen Schichten des MEC. Die Beobachtungen suggerieren Reorganisationsvorgänge im entorhinalen Cortex und Veränderungen der homeostatischen Plastizität, welche antikonvulsive Effekte aufweisen.

2. Einleitung und Zielstellung

Epilepsien beruhen auf pathologischen Veränderungen des Gehirns, welche mit einer andauernden Prädisposition für das Auftreten epileptischer Anfälle einhergehen. Die häufigste Form der fokalen Epilepsie im Erwachsenenalter ist die mesiale Temporallappenepilepsie (mTLE; Annegers, 1996). Die hippocampale Formation und parahippocampale Region sind bei der mTLE funktionellen und morphologischen Alterationen unterworfen. Dazu zählen Zellverluste im Gyrus dentatus, in der CA3- und CA1-Region sowie in Schicht III des entorhinalen Cortex (Du et al., 1993). Der Ursprung der ictalen und interiktalen Aktivität findet sich in den Strukturen des mesialen Temporallappens (Spencer and Spencer, 1994; Wennberg et al., 2002). Interessanterweise werden spontan auftretende epileptiforme Potentiale in vitro äußerst selten beobachtet. Für einen epileptischen Anfall charakteristische (hyper-) synchrone Aktivität kann in vivo und in vitro durch Substanzen wie 4-Aminopyridin (4-AP) oder Bicucullin induziert werden (Heinemann et al., 1991). Erstaunlicherweise zeigt chronisch epileptisches Gewebe oftmals eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber konvulsiven Substanzen (Jandova et al., 2006; Gabriel et al., 2004). Ich habe nach Ursachen für diese reduzierte Krampfbereitschaft gesucht.

In einer ersten Studie wurde die Übererregbarkeit der oberflächlichen Schichten des medialen entorhinalen Cortex (MEC) überprüft. Die reizinduzierten Potentiale und deren pharmakologische Beeinflussung wurden bestimmt und in Beziehung zu einem möglichen Verlust GABAerger Interneurone gesetzt.

Ziel der zweiten Studie war die Evaluation der durch 4-AP induzierten synchronen epileptiformen Aktivität in chronisch epileptischem Gewebe. Die Untereinheiten der spannungsabhängigen Kaliumkanäle, welche eine hohe Affinität für 4-AP haben, wurden immunzytochemisch dargestellt und molekularbiologisch analysiert.

Glutamin (GLN) ist die im Liquor am häufigsten vorkommende Aminosäure und dient als Vorläufermolekül für die Synthese von Glutamat und GABA in Nervenzellen. Diese Aminosäure wird jedoch bei elektrophysiologischen Messungen in vitro üblicherweise nicht substituiert. In entsprechenden Experimenten wurde untersucht, ob epileptisches Gewebe durch GLN-Substitution die Fähigkeit, epileptiforme Potentiale zu generieren, wiedererlangt. Zudem wurden die Auswirkungen der Glutaminsubstitution auf die stimulationsinduzierten Feldpotentiale im MEC evaluiert.

3. Material und Methoden

Tiergruppen und Induktion des Status epilepticus

Die Studien wurden mit Hirnschnittpräparaten chronisch epileptischer Kainat behandelter Sprague-Dawley-Ratten und Pilocarpin behandelter Wistar-Ratten sowie mit Gewebe der jeweiligen Kontrolltiere durchgeführt. Die Kontrolltiere wurden anstelle von Kainsäure und Pilocarpin mit „physiologischer Kochsalzlösung“ behandelt. 2,5 Monate nach SE wurde die Anfallshäufigkeit durch kontinuierliche Videoaufzeichnung bestimmt. Hierbei wurden Anfälle der Stufe V nach Racine erfasst (Tolner et al., 2007).

Präparation der Hirnschnitte und Elektrophysiologie

Die Präparation der horizontalen kombinierten entorhinal-hippocampalen Hirnschnitte fand 2,5 bis 10 Monate nach Induktion des Status epilepticus statt. Es wurden horizontale Schnitte mit einer Dicke von 400 μM angefertigt. Die Hirnschnitte wurden prompt in eine selbst angefertigte Interface Kammer transportiert (Zahn et al., 2008).

Elektrophysiologische Experimente begannen 1,5 Stunden nach der Präparation. Einige Schnitte wurden mit GLN inkubiert, hier betrug die Inkubationszeit mindestens 150 Minuten (Sandow et al., 2009). Als Ableittechniken wurden extrazelluläre Feldpotentialmessungen sowie intrazelluläre Messungen durchgeführt. Experimente, bei welchen GLN verwendet wurde, fanden in Gewebe Pilocarpin behandelte Tiere und Kontrolltiere statt. Die weiteren Experimente wurden in Gewebe Kainat behandelte Tiere durchgeführt. Die statistische Auswertung für nicht verbundene Stichproben erfolgte mit dem Test nach Mann-Whitney zwischen den Tiergruppen und mit dem Wilcoxon Test für verbundene Stichproben innerhalb der Tiergruppen. Elektrophysiologische Messwerte sind als Mittelwerte und der zugehörigen Standardabweichung angegeben (Zahn et al., 2008).

Isolation der mRNA, reverse Transkription und quantitative Polymerasekettenreaktion

Nach Isolation der RNA wurden die Proben revers transkribiert. Zur quantitativen Bestimmung relativer Expressionslevel spannungsabhängiger Kaliumkanäle (*engl.* voltage gated potassium channels, Kv) wurde die TaqMan real-time reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (*engl.* polymerase chain reaction, rt-PCR) eingesetzt und das Verfahren des vergleichenden Schwellenzyklus verwendet (Zahn et

al., 2008). Die statistische Auswertung zwischen den Gruppen wurde mit dem t-Test durchgeführt.

Perfusionsfixation und Immunzytochemie

Bei den immunzytochemischen Studien wurden für die jeweils zu untersuchenden Kv sowie für GAD 67 und anti-neuronale-Nuclei (anti-NeuN) spezifische Antikörper verwendet. Es wurden enzymatische Verfahren zur indirekten Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes angewendet. Kontrollgewebe und Gewebe epileptischer Tiere wurde stets gemeinsam prozessiert. Dies ermöglichte eine direkte semiquantitative Gegenüberstellung (Zahn et al., 2008). Die durchschnittliche Zahl an angefärbten Zellen wurde jeweils in zwei bis drei Schnitten eines Präparates bestimmt. Die statistische Auswertung zwischen den Gruppen wurde mit dem zweiseitigen Test nach Mann und Whitney durchgeführt. Die neuronale Dichte im MEC der epileptischen Tiere wurde als relative Zelldichte errechnet und als Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben (Tolner et al., 2007).

In situ Hybridisierung und Kresylviolett färbung

Eine nicht radioaktive in situ Hybridisierung wurde durchgeführt (Tolner et al., 2007). Hierbei wurden Digoxigenin markierte Ribosonden für GAD 65 und 67 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde eine Hybridisierung des kodierenden Stranges verwendet. Einige den immunzytochemisch prozessierten Präparaten benachbarte Schnitte wurden mit Kresylviolett angefärbt.

4. Ergebnisse

Evaluation der reizinduzierten Potentiale in den oberflächlichen Schichten des medialen entorhinalen Cortex

Die Feldantwort nach Stimulation der tiefen Schichten des MEC, des Parasubiculums (paraS) oder des Präsubiculums (prS) der Kontrolltiere beinhaltete einen primären negativen Transienten mit kurzer Latenzzeit ($1,53 \pm 0,11$ ms). Das Potential zeigte keine „paired-pulse-facilitation“ und konnte nicht nach Unterbrechung der glutamatergen Transmission (2-Amino-5-Phosphonovaleraterat, APV, 30 μ M; 6-Cyano-7-

Nitrochinoxalin-2,3-Dion, CNQX, 30 μM) unterdrückt werden. Dieser Komponente folgte ein weiterer negativer Transient mit einer Latenzzeit von 5 ms. Der zweite Transient konnte durch APV und CNQX komplett supprimiert werden. Die Antwort im Gewebe der epileptischen Tiere zeigte markante Unterschiede gegenüber der Feldantwort der Kontrolltiere. Den oben beschriebenen Komponenten folgten Nachentladungen mit einer Frequenz von 100 bis 300 Hz. Diese Nachentladungen überlagerten eine Negativität des Feldpotentials, welche bis zu einer Sekunde dauerte. APV reduzierte die hochfrequenten Nachentladungen deutlich, die gemeinsame Applikation von APV mit CNQX unterdrückte die Nachentladungen komplett.

Um den Einfluss einer funktionellen Alteration der inhibitorischen Netzwerkfunktion zu überprüfen, wurde der Effekt einer Blockierung der GABAergen synaptischen Übertragung auf die stimulationsinduzierten Potentiale in den oberflächlichen Schichten des MEC untersucht. Im Kontrollgewebe wandelte sich nach Perfusion des GABA-A Rezeptor Antagonisten Bicucullinmethiodid (BMI, 5 μM , 30 μM) die synaptische Komponente der Reizantwort zu einem langen negativen Transienten, dem negative Nachentladungen mit einer möglichen Dauer von mehr als einer Sekunde folgten. Deutlich abgeschwächt war der Einfluss von BMI in Präparaten der epileptischen Tiere. Das reizinduzierte Potential vergrößerte sich in Präparaten der epileptischen Tiere durch BMI nur minimal. In lediglich zwei von neun Präparaten epileptischer Tiere konnten Nachentladungen durch BMI induziert werden.

Das Ruhemembranpotential, der Eingangswiderstand und die „Spiking“ Eigenschaften der Neurone unterschieden sich zwischen den Tiergruppen nicht signifikant voneinander. Zellen der Kontrolltiere in Schicht II zeigten ein inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP). Bei stärkerer Stimulationsintensität traten exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP) und schließlich Aktionspotentiale auf. Zellen der Kontrolltiere in Schicht III generierten nach Stimulation ein kombiniertes EPSP / IPSP. Neurone der Kainat behandelten Tiere zeigten jeweils länger andauernde EPSPs. Diese EPSPs führten zu dem Auftreten mehrerer Aktionspotentiale nach einer Stimulation. APV (30 μM) verkleinerte das EPSP deutlich, zusätzliche Applikation von CNQX (30 μM) unterdrückte das EPSP vollständig. Nach Unterbrechung der glutamatergen Transmission demaskierte sich teilweise ein IPSP in der Antwort der epileptischen Tiere.

Effekte von Bicucullin im entorhinalen und perirhinalen Cortex in Präparaten der epileptischen Tiere und der Kontrolltiere mit Darstellung GABAerger Neurone

Die nach Applikation von BMI (5 μ M, 30 μ M) auftretenden Feldpotentialtransienten im MEC und PC wurden evaluiert. In allen Präparaten der Kontrolltiere wurden wiederkehrende epileptiforme Entladungen (*engl.* recurrent epileptiform discharges, REDs) beobachtet. BMI konnte in drei von elf Präparaten der chronisch epileptischen Tiere keine REDs induzieren. Interessanterweise zeigte das Gewebe entweder epileptiforme Aktivität unter beiden angewandten Konzentrationen oder gar keine REDs. Im Gegensatz zu dem Kontrollgewebe waren die hochfrequenten Entladungen der Ereignisse nicht vorhanden. Der mittlere neuronale Zellverlust in der Schicht III des MEC der epileptischen Tiere, deren Gewebe von BMI nicht affiziert wurde, betrug $90 \pm 15\%$. Signifikant niedriger war der Zellverlust in der Schicht III des MEC der epileptischen Tiere, deren Schnitte REDs generierten ($44 \pm 16\%$ neuronaler Verlust).

In einer in situ Hybridisierung war die Dichte der GAD65/67 positiven Neurone in dem Gewebe der epileptischen Tiere in den Schichten I, II und III im Vergleich zu dem Kontrollgewebe nicht verändert. In den tiefen Schichten des MEC war die Anzahl reduziert. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden spezifische Antikörperfärbungen zur Darstellung der Isoform GAD 67 eingesetzt. Wiederum konnte eine Rarifizierung der GAD 67 positiven Neurone in Schicht V der epileptischen Tiere dargestellt werden. Die oberflächlichen Schichten zeigten keine Alterationen.

4-Aminopyridin induziert seizure like events und interiktale Aktivität im entorhinalen und perirhinalen Cortex der Kontrolltiere und hat ein stark herabgesetztes iktogenes Potential in Präparaten epileptischer Tiere

Die Blockade von spannungsabhängigen Kaliumkanälen durch 4-AP löst synchrone, epileptiforme Potentiale im Gewebe der Kontrolltiere aus. Hervorzuheben sind die in vitro induzierbaren seizure like events (SLEs). Applikation von 4-AP (50 μ M, 100 μ M) resultierte in dem Auftreten von iktaler und interiktaler Aktivität im MEC und PC aller Präparate der Kontrolltiere. SLEs traten in den oberflächlichen und tiefen Schichten des MEC simultan auf. Bei Applikation von 50 μ M 4-AP begannen die epileptiformen Entladungen in 84,4% im PC und in 6,7% im MEC. In 8,9% traten SLEs simultan im PC und MEC auf, welches einen Ursprung der SLEs im lateralen entorhinalen Cortex (LEC) suggeriert. Unter 100 μ M 4-AP war der PC in 71,4%, der LEC in 23,2% und der MEC in 5,4% Ursprung der SLEs. Das prS zeigte gewöhnlich ebenfalls SLEs, war

jedoch niemals der Ursprungsort. Zwischen den SLEs wurde nach einer Phase postiktaler Depression interiktale Aktivität beobachtet.

4-AP konnte SLEs in nur einem der 16 Präparate Kainat behandelte Tiere hervorrufen. REDs wurden durch 4-AP in allen Hirnschnitten Kainat behandelte Tiere induziert und ähnelten der interiktalen Aktivität in Hirnschnitten von Kontrolltieren. Der von mir verwendete Terminus REDs anstelle von interiktaler Aktivität berücksichtigt, dass ictale Aktivität unter 50 μM in nur einem von 16 (6,25%) und unter 100 μM in einem von zwölf Hirnschnitten (8,33%) der epileptischen Tiere registriert wurde.

Bemerkenswerterweise betrug der neuronale Zellverlust in der Schicht III des MEC von Tieren, deren Gewebe keine SLEs generierten $52 \pm 18\%$. In dem Tier in dessen Hirnschnitt die SLEs induziert wurden, lag der neuronale Zellverlust bei nur 18%. In zwei Gehirnschnitten von zwei verschiedenen Tieren wurden prolongierte REDs mit einer Dauer von einer bis fünf Sekunden beobachtet. Diese Ereignisse hatten kein Korrelat zu der Aktivität in dem Kontrollgewebe. Die drei Tiere, deren Gewebe länger andauernde Aktivität zeigte, hatten mit weniger als 4,5 Anfällen pro 24 h eine geringe Inzidenz von Anfällen in vivo. Die mittlere Anfallshäufigkeit der Tiere, deren Präparate lediglich kurze REDs generierten, war $10,5 \pm 9,1$ pro 24 Stunden mit einem Maximum von 40 Anfällen in 24 Stunden.

In weiteren Experimenten wurden die Effekte einer Applikation von 4-AP (100 μM) zusammen mit BMI (30 μM) untersucht. Im Gewebe der Kontrolltiere änderte die gemeinsame Applikation von 4-AP zusammen mit BMI das Verhaltensmuster der durch 4-AP induzierten Aktivität. Anstelle der SLEs generierte der Hirnschnitt kurze epileptiforme Entladungen. Im Gewebe Kainat behandelte Tiere konnte die gemeinsame Applikation von 4-AP und BMI ebenfalls keine SLEs erzeugen. Die Ereignisse unter diesen Bedingungen waren mit solchen im Kontrollgewebe vergleichbar. Diese kurzen wiederkehrenden Entladungen waren zwischen dem PC und MEC synchron.

Expression und regionale Verteilung von 4-Aminopyridin sensitiven Untereinheiten spannungsabhängiger Kaliumkanäle in der parahippocampalen Region

Das reduzierte ictogene Potential könnte auf eine verminderte Expression der für 4-AP hochaffinen spannungsabhängigen Kaliumkanäle zurückzuführen sein. Die relativen Expressionslevel von Kv1.4, Kv1.5 und Kv3.1 bis Kv3.4 im Subiculum, dem entorhinalen Cortex (EC) und dem perirhinalen Cortex (PC) wurden molekularbiologisch

evaluiert. Die Expression von Kv3.4 war in allen untersuchten Regionen reduziert. Eine erhöhte Expression der mRNA zeigten Kv3.2 und Kv3.3 im PC. Bemerkenswerterweise zeigten die Expressionsdaten in dem epileptischen Gewebe eine größere Variabilität als in dem Kontrollgewebe.

Die regionale und zelluläre Verteilung der Untereinheiten Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv3.1b, Kv3.2, Kv3.3 und Kv3.4 in der parahippocampalen Region der Kontrolltiere und der epileptischen Tiere wurde bestimmt. Bemerkenswerterweise zeigte Gewebe der Kontrolltiere eine starke native Expression der Kv1.x Untereinheiten in den oberflächlichen Schichten von EC und PC. In Ergänzung zeigten alle Mitglieder der Shawfamilie (Kv3.x) intensive Färbungen in den Schichten II und III des EC. Die intensivste Färbung wurde für die Untereinheiten von Kv3.4 in dem EC und PC beobachtet.

In dem Gewebe epileptischer Tiere war die Expression aller untersuchten Untereinheiten in der Schicht III des MEC stark reduziert. Kresylviolett-färbungen demonstrierten eine neuronenearme Schicht III. Zellzählungen bestätigten einen neuronalen Verlust der Schicht III im MEC von $52 \pm 18\%$. Neben diesen Beobachtungen, war die Proteinexpression von Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5 und Kv3.1b in dem Gewebe chronisch epileptischer Tiere im Vergleich zu dem Kontrollgewebe in Subiculum, prS, paraS, EC und PC unverändert.

Die Expression der Kv1.4-Kanaluntereinheiten war im Vergleich zu dem Kontrollgewebe in den oberflächlichen Schichten des MEC reduziert. Die Expression von Kv3.2 war in den oberflächlichen Schichten des PC erhöht. Kv3.3 zeigte eine stärkere Immunreaktion in den oberflächlichen Schichten des LEC.

Kv3.4-Untereinheiten waren in allen untersuchten Regionen der epileptischen Tiere vermindert exprimiert. Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen der PCR-Experimente überein, welche verminderte mRNA-Level in diesen Strukturen zeigten.

Glutamin induziert epileptiforme Entladungen in den oberflächlichen Schichten des medialen entorhinalen Cortex epileptischer Ratten

GLN (500 μ M, 2 mM) konnte in der hippocampalen Region in dem Gewebe der Kontrolltiere keine spontanen Entladungen induzieren.

Im MEC chronisch epileptisch Pilocarpin behandelte Tiere konnten dagegen spontan auftretende Ereignisse nach Perfusion mit GLN beobachtet werden. Mit einer physiologischen Konzentration von 0,5 mM induzierte GLN REDs in neun von 14

Präparaten. Unter der höheren Konzentration von 2 mM konnten die REDs in dem Gewebe aller epileptischen Tiere beobachtet werden. Die Aktivität war auf den MEC begrenzt. Spontan auftretende epileptische Potentiale konnten nicht im Gyrus dentatus, in der CA3- und CA1-Region, im LEC oder PC registriert werden. Die Ereignisse zeigten unter 2 mM GLN ein kürzeres Intervall im Vergleich zu 0,5 mM. Die Amplitude und Dauer ähnelten sich unter beiden Konzentrationen. CNQX (30 μ M) unterdrückte die REDs vollständig und reversibel. BMI (5 μ M) verlängerte und verstärkte die Ereignisse reversibel. Die Blockade der neuronalen Glutaminaufnahme durch Methylamino-Isobuttersäure (MeAIB, 10 mM) verlängerte das Intervall der REDs oder unterdrückte die Ereignisse vollständig. Zusätzlich trat eine Reduktion der Amplitude und Dauer auf. Nach Inkubation mit MeAIB konnten durch GLN keine REDs induziert werden. Allerdings traten REDs in diesen Schnitten auf, wenn GLN nach Inkubation ohne MeAIB perfundiert wurde.

Die stimulationsinduzierten Potentiale wurden in 37 Präparaten von zehn Kontrolltieren sowie in 31 Präparaten von zehn epileptischen Tieren untersucht. Diese induzierten Potentiale ereigneten sich mit kurzer und / oder langer Latenzzeit (*engl.* short latency response, SLR: ≤ 3.1 ms; *engl.* Long latency response, LLR: ≥ 3.4 ms). Die Potentiale traten hintereinander oder isoliert auf. Die SLR konnten nicht durch CNQX unterdrückt werden und galten somit als nicht synaptische Reizantwort. LLR als Phänotyp einer synaptischen Reizantwort wurden komplett unterdrückt. Die Reizantwort der epileptischen Tiere war von Nachentladungen und einem langsamen negativen Transienten geprägt. Die gesamte Dauer der durch Stimulation induzierten Potentiale war in dem Gewebe der epileptischen Tiere länger als in dem Kontrollgewebe.

Unter 2 mM GLN vergrößerten sich die nicht synaptische maximale Amplitude der Reizantwort in dem Gewebe beider Tiergruppen. Die maximale Amplitude der synaptischen Komponente vergrößerte sich lediglich in dem Kontrollgewebe, jedoch nicht in Präparaten der epileptischen Tiere. Die Gesamtdauer der Antwort veränderte sich in beiden Gruppen nicht. Bemerkenswerterweise verkleinerte sich die Amplitude der langsamen negativen Transienten in dem Gewebe der epileptischen Tiere unter GLN. CNQX unterdrückte diesen Bestandteil der Antwort vollständig.

5. Diskussion

Die Neurone der oberflächlichen Schichten des MEC epileptischer Tiere sind übererregbar (Tolner et al., 2007). Die grundlegenden Eigenschaften dieser Neurone sind unverändert. Die Anzahl der Neurone in der Schicht III der epileptischen Tiere ist reduziert. Efferente Faserzüge der Schicht II des MEC ziehen als Tractus perforans in die hippocampale Formation (Witter and Amaral, 2004). Bei erhöhter Aktivität der oberflächlichen Schichten des MEC erhält die hippocampale Formation vermehrt afferente Signale. Über diesen Kreislauf könnten die oberflächlichen Schichten somit wichtig bei der Anfallsentstehung sein. Die Mechanismen, welche die Übererregbarkeit bedingen sind nicht bekannt.

Interneurone in der Schicht III des MEC werden durch glutamaterge Neurone der Schicht III des MEC - sowie aus dem perirhinalen Cortex - aktiviert und senden ihrerseits Axone zu den Hauptzellen der Schicht II (Witter and Amaral, 2004). Durch den neuronalen Zellverlust, welcher in dem epileptischen Gewebe hauptsächlich die Schicht III betrifft, erhalten die Interneurone weniger afferente Signale. Die verminderte Aktivierung der Interneurone könnte wiederum eine Disinhibition der Neurone der Schicht II bedingen. Falls der Zellverlust nicht auf die Hauptzellen des MEC beschränkt ist, sondern ebenfalls die Interneurone betrifft, könnte ebenfalls ein Verlust der Inhibition stattfinden (Kobayashi et al., 2003; Kumar and Buckmaster, 2006; Tolner et al., 2007). Diese von Kumar und Buckmaster aufgrund von Parvalbuminfärbungen aufgestellte Hypothese konnte in unseren Studien nicht bestätigt werden, da die Anzahl der inhibitorischen Interneurone in der Schicht III des EC der epileptischen Kainat behandelten Tiere nicht verringert war (Tolner et al., 2007). Interneurone der Schicht III erhalten im Vergleich zu dem Kontrollgewebe unveränderte afferente glutamaterge Signale (Kumar and Buckmaster, 2006). Nach Unterbrechung der glutamatergen Transmissions demaskierte sich ein IPSP der Zellen der epileptischen Tiere; zuvor war das IPSP von einem EPSP überlagert und nicht sichtbar. Diese Ergebnisse suggerieren, dass die Übererregbarkeit nicht durch einen Verlust inhibitorischer Zellen bedingt ist.

Die Effekte von BMI unterschieden sich deutlich zwischen den Tiergruppen. Die hochfrequente Komponente der induzierten Potentiale, welche in dem Kontrollgewebe beobachtet wurde, trat in dem Gewebe chronisch epileptisch Kainat behandelte Tiere

mit einer verringerten Inzidenz auf. REDs traten im Gewebe der epileptischen Tiere deutlich seltener auf als in Präparaten der Kontrolltiere. Eine veränderte inhibitorische Netzwerkfunktion könnte die unterschiedlichen Effekte der Blockierung von GABA-A Rezeptoren erklären. Aberrante neuronale Verbindungen treten bei gestörten Netzwerken auf. Beispielsweise ziehen bei der mTLE aberrante Moosfasern zu der inneren molekularen Schicht des Gyrus dentatus, was als Mossy fiber sprouting bezeichnet wird (Represa et al., 1990; Witter and Amaral, 2004). Die Übererregbarkeit könnte durch vermehrte inhibitorische Affenzen der inhibitorischen Interneurone in der Schicht III des MEC verursacht sein. Aufgrund des neuronalen Zellverlustes in der Schicht III des MEC, könnten aberrante Efferenzen der Interneurone und fehlgeleitete GABAerge Fasern aus dem prS stammend, andere inhibitorische Interneurone der Schicht III hemmen und somit zu einer Disinhibition der Neurone in der Schicht II führen.

Die hochfrequenten Nachentladungen wurden durch APV deutlich abgeschwächt. Da die Applikation von APV keinen deutlichen Einfluss auf die reizinduzierten Potentiale der Kontrolltiere hat, könnte eine erhöhte Expression oder Veränderungen der NMDA - Rezeptoren zur Übererregbarkeit beitragen (Tolner et al., 2007). Diesbezügliche Alterationen sind bislang noch nicht untersucht.

Chronisch epileptisches Gewebe Kainat behandelte Tiere hat eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber den konvulsiven Effekten von 4-AP. SLEs hatten in dem Kontrollgewebe eine Inzidenz von 100% unter beiden angewendeten Konzentrationen. Dagegen war die Inzidenz in Präparaten epileptischer Tiere stark verringert. Das reduzierte iktogene Potential von 4-AP korreliert mit einer Herunterregulation der Untereinheiten, die den spannungsabhängigen Kaliumkanal 3.4 bilden, in EC, PC und Subiculum. Exakt in diesen Bereichen des Cortex entstehen in dem Kontrollgewebe die SLEs. Es besteht ein neuronaler Zellverlust in der Schicht III des MEC.

Unter der Anwendung von niedrigen Konzentrationen beeinflusst 4-AP verschiedene verzögert reagierende (*engl.* delayed rectifier, DR-Typ) spannungsabhängige Kaliumkanäle (Gutman et al., 2005). Diese werden von Untereinheiten der Shaker- (Kv1.x) und Shawfamilie (Kv3.x) gebildet (Coetzee et al., 1999). Relativ niedrige IC50-Werte sind für Kv1.5 der Shakerfamilie als auch für Kv3.1 und Kv3.2 der Shawfamilie beschrieben worden (Gutman et al., 2005; Yao and Tseng, 1994). Des Weiteren affiziert 4-AP den A-Strom, welcher durch die Untereinheiten von Kv1.4 gebildet wird

(Coetzee et al., 1999; Gutman et al., 2005). A-Ströme sind durch ihre physiologischen Eigenschaften wesentlich an der Entstehung schnell aufeinander folgender Aktionspotentiale (AP) beteiligt (Bernard et al., 2004). Eine hohe Frequenz aufeinander folgender AP ist wiederum bei der synchronen und epileptiformen Aktivität entscheidend. 4-AP blockiert in den von mir verwendeten Konzentrationen auch D-Ströme, wobei die molekulare Identität dieser den Strom bildenden Untereinheiten unbekannt ist (Storm, 1990).

Das reduzierte iktogene Potential von 4-AP könnte durch eine verminderte Expression der Kv, welche gegenüber 4-AP hochaffin sind, bedingt sein. Eine Herunterregulation dieser Kanäle wurde nicht beobachtet, jedoch war eine verstärkte Expression von Kv3.2-Untereinheiten im PC zu verzeichnen. Kv3.3-Untereinheiten zeigten eine Hochregulation im PC. Die stärkere Expression von Kv3.3 im lateralen EC (LEC) bedingte möglicherweise die registrierte Hochregulation im PC in den molekularbiologischen Experimenten. Kv3.1 und Kv3.2 bilden DR-Ströme mit einer hohen Sensitivität gegenüber 4-AP (Rudy et al., 1999). Die beobachtete Hochregulation von Kv3.2 und Kv3.3 würde eine erhöhte Sensitivität, oder zumindest unveränderte Effekte gegenüber 4-AP im PC vermuten lassen. Diese Region ist wichtig bei der Entstehung und Ausbreitung der SLEs.

Der einzige Kanal, dessen Untereinheiten eine Herunterregulation in allen untersuchten Regionen zeigte, war Kv3.4. Kv3.4-Untereinheiten bilden einen A-Strom und haben eine niedrige Affinität gegenüber 4-AP (Gutman et al., 2005). Wenn Kv-Untereinheiten Heteromere bilden, können verschiedene Eigenschaften der einzelnen Untereinheiten vereinigt werden oder neue entstehen (Rudy et al., 1999). Bei Heteromerbildung von Kv3.4- mit Kv3.1- oder Kv3.2-Untereinheiten könnte durch Umwandlung dieser DR-Ströme ein A-Strom mit einer hohen Affinität gegenüber 4-AP entstehen (Rudy et al., 1999). Die pharmakologischen Eigenschaften dieser Heteromere sind momentan nicht bekannt.

In zwei Hirnschnitten von chronisch epileptischen Kainat behandelten Tieren wurden verlängerte REDs und einmalig SLEs beobachtet. Diese Tiere hatten eine niedrige Anzahl von Anfällen in vivo. Das epileptische Tier, in dessen Hirnschnitt SLEs induziert werden konnten, hatte zudem auch einen geringeren Zellverlust im Vergleich zu den anderen Tieren, in deren Gewebe 4-AP keine iktale Aktivität hervorrufen konnte. Diese Beobachtung suggeriert, dass Alterationen innerhalb des neuronalen Netzwerkes im EC die Sensibilität des epileptischen Gewebes gegenüber 4-AP bedingen. Da der

Ursprung der SLEs nur zu einem geringen Anteil im MEC liegt, ist es unwahrscheinlich, dass der Zellverlust der Schicht III im EC für die reduzierte Iktogenese verantwortlich ist. Wenn reziproke Verbindungen zwischen PC und EC notwendig sind, um SLEs zu generieren, könnte das reduzierte iktogene Potential von 4-AP in dem chronisch epileptischen Gewebe auf Alterationen der Konnektivität dieser Regionen (Burwell and Amaral, 1998) zurückzuführen sein. Eine veränderte Inhibition und Alterationen der Interaktionen zwischen EC und PC könnten das reduzierte iktogene Potential von 4-AP erklären. Darum wurde überprüft, inwieweit das reduzierte iktogene Potential auf eine erhöhte Inhibition zurückzuführen ist. 4-AP zusammen mit BMI konnte jedoch ebenfalls keine SLEs induzieren.

Es konnte gezeigt werden, dass GLN über neuronale Aufnahme glutamaterge Entladungen in den oberflächlichen Schichten des MEC in dem Gewebe chronisch epileptisch Pilocarpin behandelte Tiere hervorruft. In anderen Regionen der hippocampalen Region wurde dagegen spontan auftretende Aktivität nicht beobachtet. Das Kontrollgewebe generierte überhaupt keine spontan auftretenden Ereignisse. GLN hat im Serum und Liquor im Vergleich zu anderen Aminosäuren eine hohe Konzentration (Pitkanen et al., 1989). Bei elektrophysiologischen Experimenten *in vitro* enthält die Perfusionslösung normalerweise keine biogenen Amine oder Aminosäuren. Die Tatsache, dass REDs in regulärem Medium nicht beobachtet wurden suggeriert, dass der Glutamat-Glutamin-Zyklus GLN nicht adäquat substituiert. Der astrozytäre Metabolismus und die GLN-Konzentration in epileptischem Gewebe sind jedoch unverändert (Melo et al., 2005).

Der Glutamat Rezeptor Antagonist CNQX unterdrückte die REDs - sowie den langsamen negativen Transienten der reizinduzierten Potentiale - komplett; diese Tatsache besagt, dass die REDs AMPA / Kainat vermittelte Ereignisse sind und schließt eine GABAerge Entstehung aus. Die Unterdrückung der REDs durch Unterbrechung der neuronalen GLN-Aufnahme zeigt, dass die neuronale GLN-Aufnahme essentiell bei der Entstehung der Ereignisse ist.

Die REDs hatten unter 2 mM ein kürzeres Intervall als unter 500 μ M. Da GLN ein Vorläufermolekül von GLU als auch GABA ist (Abbildung 1), könnte dessen Substitution die exzitatorische sowie die inhibitorische Netzwerkfunktion unterstützen. Die Beobachtung, dass unter der höheren Konzentration die Inzidenz der REDs höher ist, könnte ein Hinweis dafür sein, dass unter dieser Konzentration die Exzitation stärker

unterstützt wird als die Inhibition.

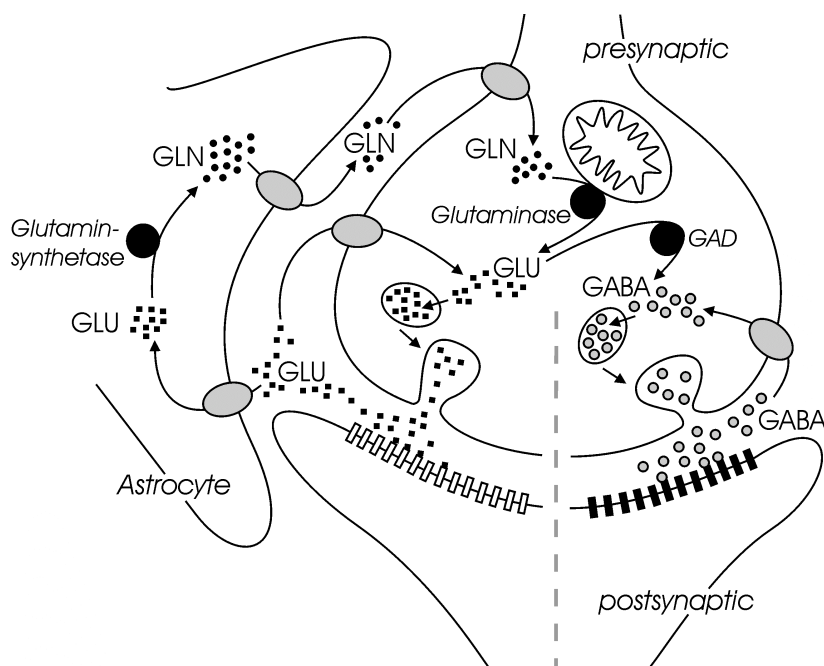


Abbildung 1

Glutamat-Glutamin-GABA-Kreislauf

Der Glutamattransporter 1 ist für die Aufnahme in Astrozyten verantwortlich. Hier wird GLU durch die Glutaminsynthetase in GLN überführt. System N Transporter schleusen GLN in den extrazellulären Raum.

GLN wird durch System A Transporter in Neuronen aufgenommen. Innerhalb der präsynaptischen Endigung wird GLN durch die Glutaminase erneut in GLU überführt. Das Enzym Glutamatdecarboxylase katalysiert die Synthese von GABA aus GLU in GABAergen Neuronen.

Bemerkenswerterweise verkleinerte GLN die Amplitude der AMPA / Kainat-Rezeptor vermittelten langsamen negativen Komponente der Reizantwort epileptischer Tiere. Die Amplitude und Dauer der REDs vergrößerten sich nach Applikation von BMI. Diese Beobachtungen legen wiederum nahe, dass die inhibitorische Netzwerkfunktion in den oberflächlichen Schichten des MEC partiell erhalten ist.

Ein weiterer, bislang nicht untersuchter Mechanismus, welcher die Übererregbarkeit bedingen würde, könnte die verringerte Bereitstellung von GABA aufgrund einer verminderten Synthese von GLN sein.

Die Ergebnisse der vorgestellten Studien können die These, dass ein Verlust der Inhibition die Übererregbarkeit der oberflächlichen Schichten des MEC bedingt, nicht bestätigen. Es konnte gezeigt werden, dass die oberflächlichen Schichten des MEC epileptischer Tiere nicht nur übererregbar sind, sondern unter bestimmten Umständen spontan auftretende epileptiforme Aktivität generieren. Bestimmte Konvulsiva haben in chronisch epileptischem Gewebe eine verminderte Wirksamkeit.

6. Literaturverzeichnis

1. Annegers, J.F., 1996. The Epidemiology of Epilepsy. Wyllie, E., Baltimore, M.D. (Eds.) *The Treatment of Epilepsy: Principles and Practice*, 2nd Ed. Williams & Wilkins.
2. Bernard, C., Anderson, A., Becker, A., Poolos, N.P., Beck, H., Johnston, D., 2004. Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science* 305, 532-535.
3. Burwell, R.D., Amaral, D.G., 1998. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: Interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 391, 293-321.
4. Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M.S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz de, M.E., Rudy, B., 1999. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* 868, 233-285.
5. Du, F., Whetsell, W.O., Jr., Abou-Khalil, B., Blumenkopf, B., Lothman, E.W., Schwarcz, R., 1993. Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 16, 223-233.
6. Gabriel, S., Njunting, M., Pomper, J.K., Merschhemke, M., Sanabria, E.R.G., Eilers, A., Kivi, A., Zeller, M., Meencke, H.J., Cavalheiro, E.A., Heinemann, U., Lehmann, T.N., 2004. Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis. *J Neurosci* 24, 10416-10430.
7. Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stuhmer, W., Wang, X., 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57, 473-508.
8. Heinemann, U., Arens, J., Dreier, J.P., Stabel, J., Zhang, C.L., 1991. In vitro epileptiform activity: role of excitatory amino acids. *Epilepsy Res* 10, 18-23.
9. Jandova, K., Pasler, D., Antonio, L.L., Raue, C., Ji, S., Njunting, M., Kann, O., Kovacs, R., Meencke, H.J., Cavalheiro, E.A., Heinemann, U., Gabriel, S., Lehmann, T.N., 2006. Carbamazepine-resistance in the epileptic dentate gyrus of human hippocampal slices. *Brain* 129, 3290-3306.
10. Kobayashi, M., Wen, X., Buckmaster, P.S., 2003. Reduced inhibition and increased output of layer II neurons in the medial entorhinal cortex in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 23, 8471-8479.
11. Kumar, S.S., Buckmaster, P.S., 2006. Hyperexcitability, interneurons, and loss of GABAergic synapses in entorhinal cortex in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 26, 4613-4623.
12. Melo, T.M., Nehlig, A., Sonnewald, U., 2005. Metabolism is normal in astrocytes in chronically epileptic rats: a (13)C NMR study of neuronal-glia interactions in a model of temporal lobe epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 1254-1264.

13. Pitkanen,A., Matilainen,R., Halonen,T., Kutvonen,R., Hartikainen,P., Riekkinen,P., 1989. Inhibitory and excitatory amino acids in cerebrospinal fluid of chronic epileptic patients. *J Neural Transm* 76, 221-230.
14. Represa,A., Tremblay,E., Ben-Ari,Y., 1990. Sprouting of mossy fibers in the hippocampus of epileptic human and rat. *Adv Exp Med Biol* 268, 419-424.
15. Rudy,B., Chow,A., Lau,D., Amarillo,Y., Ozaita,A., Saganich,M., Moreno,H., Nadal,M.S., Hernandez-Pineda,R., Hernandez-Cruz,A., Erisir,A., Leonard,C., Vega-Saenz de,M.E., 1999. Contributions of Kv3 channels to neuronal excitability. *Ann N Y Acad Sci* 868, 304-343.
16. Sandow,N., Zahn,R.K., Gabriel,S., Heinemann,U., Lehmann,T.N., 2009. Glutamine induces epileptiform discharges in superficial layers of the medial entorhinal cortex from pilocarpine-treated chronic epileptic rats in vitro. *Epilepsia* 50, 849-858.
17. Spencer,S.S., Spencer,D.D., 1994. Entorhinal-hippocampal interactions in medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 35, 721-727.
18. Storm,J.F., 1990. Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. Storm-Mathisen,J., Zimmer,J., Ottersen,O.P. (Eds.) *Progress in Brain Research*, 1 Ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 161-187.
19. Tolner,E.A., Frahm,C., Metzger,R., Gorter,J.A., Witte,O.W., Lopes da Silva,F.H., Heinemann,U., 2007. Synaptic responses in superficial layers of medial entorhinal cortex from rats with kainate-induced epilepsy. *Neurobiol Dis*.
20. Wennberg,R., Arruda,F., Quesney,L.F., Olivier,A., 2002. Preeminence of extrahippocampal structures in the generation of mesial temporal seizures: evidence from human depth electrode recordings. *Epilepsia* 43, 716-726.
21. Witter,M.P., Amaral,D.G., 2004. The hippocampal region. In: Paxinos, G (Ed.), *The Rat Brain*. Elsevier Academic Press, San Diego CA, US, pp. 637-703.
22. Yao,J.-A., Tseng,G.-N., 1994. Modulation of 4-AP block of a mammalian A-type K channel clone by channel gating and membrane voltage. *Biophys J* 67, 130-142.
23. Zahn,R.K., Tolner,E.A., Derst,C., Gruber,C., Veh,R.W., Heinemann,U., 2008. Reduced ictogenic potential of 4-aminopyridine in the perirhinal and entorhinal cortex of kainate-treated chronic epileptic rats. *Neurobiol Dis* 29, 186-200.

7. ausgewählte Publikationen

Else A. Tolner, Christiane Frahm, Robert Metzger, Jan A. Gorter, Otto W. Witte, Fernando H. Lopes da Silva und Uwe Heinemann, Synaptic responses in superficial layers of medial entorhinal cortex from rats with kainate-induced epilepsy, *Neurobiology of Disease*, 2007, May; 26(2): 419-38

Robert K. Zahn, Else A. Tolner, Christian Derst, Clemens Gruber, Ruediger W. Veh und Uwe Heinemann, Reduced ictogenic potential of 4-aminopyridine in the perirhinal and entorhinal cortex of kainate-treated chronic epileptic rats, *Neurobiology of Disease*, 2008, Feb; 29(2): 186-200

Nora Sandow¹, Robert K. Zahn¹, Siegrun Gabriel, Uwe Heinemann² und Thomas-Nicolas Lehmann², Glutamine induces epileptiform discharges in superficial layers of the medial entorhinal cortex from pilocarpine-treated chronic epileptic rats in vitro, *Epilepsia*, 2009, Apr; 50(4): 849-58

^{1/2} diese Autoren tragen zu gleichen Anteilen an der Studie bei

8. Anteilserklärung

Robert Karl Zahn hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

Else A. Tolner, Christiane Frahm, Robert Metzger, Jan A. Gorter, Otto W. Witte, Fernando H. Lopes da Silva und Uwe Heinemann, Synaptic responses in superficial layers of medial entorhinal cortex from rats with kainate-induced epilepsy, *Neurobiology of Disease*, 2007

20 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Induktion der Epilepsie und Betreuung der epileptischen Tiere, Extrazelluläre Messungen, statistische Auswertung, substantielle Mitwirkung an Entwurf und Anfertigung der Publikation in der vorliegenden Form

Publikation 2:

Robert K. Zahn, Else A. Tolner, Christian Derst, Clemens Gruber, Ruediger W. Veh und Uwe Heinemann, Reduced ictogenic potential of 4-aminopyridine in the perirhinal and entorhinal cortex of kainate-treated chronic epileptic rats, *Neurobiology of Disease*, 2008

70 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Induktion der Epilepsie und Betreuung der epileptischen Tiere, Koordination des Projektes, Elektrophysiologie, Mitarbeit bei der immunzytochemischen und molekularbiologischen Analyse, statistische Auswertung, substantielle Mitwirkung an Entwurf und Anfertigung der Publikation in der vorliegenden Form

Publikation 3:

Nora Sandow¹, Robert K. Zahn¹, Siegrun Gabriel, Uwe Heinemann² und Thomas-Nicolas Lehmann², Glutamine induces epileptiform discharges in superficial layers of the medial entorhinal cortex from pilocarpine-treated chronic epileptic rats in vitro, *Epilepsia*, 2009

40 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Induktion der Epilepsie und Betreuung der epileptischen Tiere, Koordination des Projektes, Elektrophysiologie, statistische Auswertung, substantielle Mitwirkung an Entwurf und Anfertigung der Publikation in der vorliegenden Form

^{1/2} diese Autoren tragen zu gleichen Anteilen an der Studie bei

Prof. Dr. Uwe Heinemann
Betreuender Hochschullehrer

Robert Karl Zahn
Promovend

9. Selbständigkeitserklärung

Robert Karl Zahn
Schiestlstr. 6
97080 Würzburg

Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow-Klinikum
Promotionskommission
Augustenburger Platz 1
13353 Berlin

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Robert Karl Zahn, geboren am 08. Februar 1979, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema *Reduzierte Krampfbereitschaft in chronisch epileptischem Gewebe* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Würzburg, den 26. Oktober 2009

Robert Karl Zahn

10. Danksagung

Mein aufrichtiger und herzlichster Dank gilt Prof. Dr. med. U. Heinemann, der mir ermöglichte, diese Arbeit an seinem Institut anzufertigen, das Studium an der Charité – Universitätsmedizin Berlin fortzusetzen und zu beenden. Während der klinischen Studienjahre war es mir vergönnt, bleibende Momente mit einem einzigartigen Wissenschaftler und Menschen zu verbringen. Herzlich möchte ich Frau Dr. E. A. Tolner danken und erinnere mich gerne an die gemeinsame Laborzeit zurück.

Die immunzytochemischen und molekularbiologischen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Integrative Neuroanatomie unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. med. R. Veh durchgeführt. Hierdurch konnte die vorliegende Arbeit wesentlich erweitert und ergänzt werden. Neben Prof. Dr. Dr. med. R. Veh gilt mein Dank Dr. C. Derst und Dr. med. C. Gruber.

Meine Lehrer Prof. Dr. Dr. med. J. Grote und Prof. Dr. med. U. Wulfhekel prägten die Semester der Vorklinik an der Universität Bonn. Sie zeigten mir das Verständnis und eine Form der Medizin auf, die mich andauernd begleitet.

Die vorliegende Arbeit konnte unter anderem durch die „Charité – Studentische Forschungsförderung“ und durch ein Promotionsstipendium effektiv und produktiv gestaltet werden.

- unbeschreiblicher Dank gilt meiner Familie -

11. Lebenslauf

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