

Aus dem
Charité Centrum für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie
Klinik für Neurologie und Abteilung mit Experimenteller Neurologie
Charité Campus Mitte
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Endres

Habilitationsschrift

Synaptische und intrinsische Mechanismen der Regulation neuronaler Erregbarkeit

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach experimentelle Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Pawel Fidzinski

Eingereicht im Dezember 2015

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter: Prof. Heinz Beck

2. Gutachter: Prof. Holger Lerche

Henrike und Julian

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	4
1.1. Erregbarkeit im Nervensystem	4
1.2. Regulation neuronaler Erregbarkeit	6
1.3. Zielstellungen	8
2. Eigene Arbeiten	9
2.1. Zellspezifische bidirektionale Plastizität an CA1-Subikulum Synapsen	11
2.2. Modulation bidirektionaler Plastizität durch Azetylcholin und Kalzium.....	21
2.3. LTP an Entorhinalkortex – Subikulum Synapsen	26
2.4. Heterosynaptische Plastizität im Subikulum.....	34
2.5. Kontrolle GABAerger Inhibition durch K_v7 - Kaliumkanäle	46
2.6. Kalziumaktivierte Chloridkanäle in olfaktorischen Neuronen.....	61
3. Diskussion	71
3.1. Zellspezifische Plastizität an CA1-Subikulum Synapsen.....	71
3.2. Synaptische Plastizität an Entorhinalkortex-Subikulum Synapsen	72
3.3. K_v7 - Kaliumkanäle im ZNS.....	74
3.4. Identifikation von Anoctamin2 als Chloridkanal in olfaktorischen Neuronen	75
4. Zusammenfassung	78
5. Literatur	80
Danksagung.....	87
Erklärung.....	88

Abkürzungsverzeichnis

BAPTA	Bis-N,N,N',N'-Tetraacetat
CA1-4	Cornu ammonis (Area 1-4)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CNG	Cyclic nucleotide gated channel (über zyklische Nukleotide aktivierte Kanäle)
EPSP(s)	Exzitatorische(s) postsynaptische(s) Potential(e)
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
HCN	Hyperpolarisation activated cyclic nucleotide gated channel (über Hyperpolarisation und zyklische Nukleotide aktivierte Kanäle)
IP3	Inositoltrisphosphat
IPSP(s)	Inhibitorische(s) postsynaptische(s) Potential(e)
K _{Ca}	Kalziumabhängige Kaliumkanäle
K _v	Spannungsabhängige Kaliumkanäle
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
mGlu	metabotropes Glutamat
NaP	persistently open sodium channel (persistierend offene Natriumkanäle)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
VGCC	Voltage gated calcium channels (spannungsabhängige Kalziumkanäle)
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Während meiner wissenschaftlichen Laufbahn befasste ich mich mit Regulation synaptischer und intrinsischer Erregbarkeit im Nervensystem. Im Folgenden möchte ich daher zunächst die Grundlagen neuronaler Erregbarkeit und ihrer Regulation darstellen. Anschließend werde ich konkrete Zielstellungen formulieren und die Ergebnisse gegliedert in 1) Regulation synaptischer Plastizität im Subikulum, 2) Regulation intrinsischer Erregbarkeit in Interneuronen durch $K_v7.5$ Kaliumkanäle und 3) Regulation intrinsischer Erregbarkeit in olfaktorischen Neuronen durch kalziumaktivierte Chloridkanäle vorstellen.

1.1. Erregbarkeit im Nervensystem

Nach dem heutigen Verständnis ist der Informationsaustausch zwischen Nervenzellen eine Grundvoraussetzung für die adäquate Funktion des Nervensystems, wozu u. a. Verarbeitung sensorischer Eindrücke, Lernvorgänge oder Verhalten gehören. Das Nervensystem kann hierbei als Geflecht miteinander über Synapsen verknüpfter Zellen betrachtet werden, in dem Information in Form von elektrischen Signalen weitergeleitet wird. Zur Generierung und Weiterleitung elektrischer Signale müssen in Nervenzellen, ausgehend vom Ruhemembranpotential, Spannungsänderungen der Zellmembran auftreten. Diese Fähigkeit wird als neuronale Erregbarkeit bezeichnet und auf zellulärer Ebene in intrinsische und synaptische Erregbarkeit eingeteilt.

Intrinsische Erregbarkeit ist die Fähigkeit der Nervenzellen zur Generierung von Aktionspotentialen. Durch Aktivierung membranständiger, spannungsabhängiger Ionenkanäle kommt es beim Aktionspotential zu einer kurzen und schnellen Änderung (ca. 1 ms Dauer) des Membranpotentials ausgehend vom Ruhemembranpotential. Dafür werden zunächst schnelle, spannungsabhängige Natriumkanäle aktiviert, was zur raschen Depolarisation führt. Kurz danach öffnen spannungsabhängige Kaliumkanäle, was zur Repolarisation der Zelle (=Rückkehr zum Ruhemembranpotential) führt. Das Maß der intrinsischen

Erregbarkeit einer Nervenzelle wird durch die Anzahl und die Frequenz der auf einen gegebenen Reiz entstandenen Aktionspotentiale definiert, was unter anderem von der Dichte und den Subtypen der genannten Natrium- und Kaliumkanäle in dieser Zelle abhängig ist (Bean, 2007). Beispielsweise findet man in hemmenden Nervenzellen, sogenannten Interneuronen, hohe Aktionspotentialfrequenzen (>200 Hz). Diese Zellen exprimieren spezifische Kaliumkanäle, z.B. vom $K_v3.1$ Subtyp (Chow et al., 1999), welche durch eine besonders rasche Repolarisation die frühe Entstehung des darauffolgenden Aktionspotentials ermöglichen.

Unter synaptischer Erregbarkeit versteht man hingegen die Fähigkeit der Synapsen, das Aktionspotential in einer vorgeschalteten Zelle in eine Spannungsänderung in der nachgeschalteten Zelle zu „übersetzen“ (Kandel et al., 2000). Derartige Spannungsänderungen werden abhängig von ihrer Richtung als exzitatorische oder inhibitorische postsynaptische Potentiale (EPSPs oder IPSPs) bezeichnet. Der Unterschied zwischen postsynaptischen Potentialen und Aktionspotentialen besteht einerseits in einer unterschiedlichen zeitlichen Dynamik; Aktionspotentiale laufen definitionsgemäß rascher ab; andererseits in der unterschiedlichen Aktivierung der beteiligten Ionenkanäle (vor allem spannungsabhängig vs. ligandengesteuert). Synapsen werden in chemische Synapsen und elektrische Synapsen eingeteilt. Bei chemischen Synapsen löst ein präsynaptisches Aktionspotential eine Verschmelzung von Vesikeln mit der Zellmembran und die Ausschüttung des darin enthaltenen Botenstoffs (Neurotransmitters) aus. Der Neurotransmitter an erregenden Synapsen ist Glutamat, welches postsynaptisch an ionotrope Glutamatrezeptoren bindet und über ihre Öffnung zur Depolarisation der Zellmembran führt. An hemmenden Synapsen wird hingegen der Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA) ausgeschüttet, welcher postsynaptisch lokalisierte ionotrope GABA-Rezeptoren aktiviert. Ionotrope GABA-Rezeptoren führen bei Aktivierung zum Chloridstrom, dessen Richtung vom Chlorid-Umkehrpotential der Zelle abhängig ist. Aufgrund des Konzentrationsgefälle zwischen niedrigem intrazellulären und hohem extrazellulären Chlorid und folglich einem negativen Chlorid-Umkehrpotential in adulten Neuronen bewirkt die Aktivierung von GABA-

Rezeptoren eine Hyperpolarisation. Bei elektrischen Synapsen erfolgt die Signalübertragung ohne die Beteiligung eines Neurotransmitters, sondern über direkten elektrischen Kontakt zwischen zwei Zellen mittels sogenannter „gap junctions“.

Das Maß der synaptischen Erregbarkeit, also die Amplitude der synaptischen Antwort in der nachgeschalteten Zelle, hängt zum großen Teil von vier Faktoren ab (Johnston and Wu, 1995): 1) Anzahl der Synapsen zwischen den beteiligten Zellen, 2) Wahrscheinlichkeit einer Vesikelverschmelzung und folglich Neurotransmitterfreisetzung in der präsynaptischen Membran (sog. release probability), 3) Konzentration des Neurotransmitters in den Vesikeln sowie 4) Dichte der postsynaptischen Rezeptoren (sog. quantal size).

1.2. Regulation neuronaler Erregbarkeit

Die uns umgebenden sensorischen Reize unterliegen ständigen, dynamischen Änderungen. Damit solche Änderungen adäquat verarbeitet werden können, muss ein intaktes Nervensystem seine Erregbarkeit an verschiedene Situationen adaptieren können. Störungen dieser Anpassungsfähigkeit können zu pathologischen Reaktionen des Nervensystems führen. So kann es bei Patienten mit bestimmten Formen der Epilepsie bei hochfrequenten visuellen Stimuli oder bei Schlafmangel zu einer pathologischen Übererregung des Nervensystems und zu epileptischen Anfällen kommen (Shouse et al., 1996; Zifkin and Kasteleijn-Nolst, 2000).

Auf intrinsischer Ebene erfolgt die Regulation der neuronalen Erregbarkeit über die Modulation der Aktionspotentialrate, was unter anderem durch Feineinstellung des Membranpotentials geschieht. Eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für die Entstehung weiterer Aktionspotentiale kann beispielsweise durch eine Nachdepolarisation erreicht werden. Nachdepolarisationen erfolgen unmittelbar nach einem Aktionspotential und werden u. a. durch spannungsabhängige Kalziumkanäle (VGCC), hyperpolarisationsaktivierte Kationenkanäle (HCN) und persistierend offene Natriumkanäle (NaP) vermittelt (Beck and Yaari, 2008). Analog zur

Nachdepolarisation kann eine Nachhyperpolarisation die Entstehung weiterer Aktionspotentiale hemmen und die Aktionspotentialrate reduzieren. Auch Nachhyperpolarisationen erfolgen nach einem Aktionspotential; sie werden abhängig von ihrem zeitlichen Ablauf in schnelle, mittlere und langsame Nachhyperpolarisationen eingeteilt und durch Aktivierung spannungsabhängiger (K_v) und kalziumabhängiger (K_{Ca}) Kaliumkanäle vermittelt (Johnston and Wu, 1995; Kandel et al., 2000). Zusätzlich kann unabhängig vom Auftreten von Aktionspotentialen über eine dauerhafte Aktivierung von membranständigen Ionenkanälen, z.B. Chloridkanälen (Rinke et al., 2010), die intrinsische Erregbarkeit von Neuronen dauerhaft reduziert oder gesteigert werden.

Auch synaptische Verknüpfungen sind in der Lage, über Änderung ihrer Erregbarkeit die Übertragungsstärke von Signalen dauerhaft zu verstärken oder abzuschwächen, was unter dem Begriff „synaptische Plastizität“ zusammengefasst wird. So kann eine wiederholt hochfrequente Aktivierung einer Synapse zur Verstärkung der Übertragung führen, während niederfrequente Stimuli die Übertragung abschwächen können. Da solche Effekte über längere Zeit bestehen bleiben und sogar lebenslang anhalten können, haben sich die Begriffe Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) etabliert. Es wird vermutet, dass Lernvorgänge auf zellulärer Ebene über die Veränderung synaptischer Erregbarkeit erfolgen, LTP und LTD werden dabei als zelluläre Korrelate fürs Lernen betrachtet (Kandel et al., 2000). LTP und LTD können abhängig vom Synapsentyp und Form der Induktion sowohl präsynaptisch als auch postsynaptisch vermittelt werden. Auf präsynaptischer Ebene kann es u. a. durch Phosphorylierung von präsynaptischen Proteinen zur Änderung der Wahrscheinlichkeit für die Neurotransmitterfreisetzung kommen. Postsynaptische Änderungen der Übertragungsstärke werden hingegen einerseits über Änderungen der postsynaptischen Rezeptorzahl mit Hilfe von Exozytose- und Endozytosevorgängen vermittelt, andererseits durch Phosphorylierung von postsynaptischen Rezeptoren, was eine Änderung ihrer elektrischen Leitfähigkeit bewirkt (Malenka and Bear, 2004).

1.3. Zielstellungen

Das Verständnis der neuronalen Erregbarkeit und ihrer Regulation ist für das Verständnis von zerebralen Grundfunktionen wie Lernen und Gedächtnis und auch zur Entwicklung von Therapiestrategien für Erkrankungen mit gestörter Erregbarkeit, allen voran Epilepsie, essentiell. Auch wenn die grundlegenden Mechanismen bekannt sind (siehe 1.1 und 1.2), so bleiben wichtige Fragen offen. Beispielsweise sind die Mechanismen synaptischer Erregbarkeit und Plastizität nicht in allen Hirnregionen untersucht, und auch bezüglich der zahlreichen in Nervenzellen exprimierten Ionenkanalproteine ist nicht bei jedem Protein abschließend bekannt, ob und welche Rolle es bei der Regulation intrinsischer Erregbarkeit einnimmt. In den hier vorgestellten Arbeiten wurden daher offene Fragen auf dem Gebiet der Regulation synaptischer und intrinsischer Erregbarkeit bearbeitet. Dabei wurden synaptische und intrinsische Mechanismen getrennt untersucht.

Die Regulation synaptischer Erregbarkeit wurde an zentralnervösen Schaltkreisen im Hippokampus, spezifisch im Subikulum, untersucht. Dabei wurden folgende, bis dahin nicht beantwortete Fragenkomplexe bearbeitet:

- Sind erregende Synapsen zwischen CA1 und Pyramidenzellen im Subikulum in der Lage, neben zellspezifischer LTP auch zellspezifische LTD zu exprimieren?
- Was sind die Charakteristika synaptischer Plastizität an erregenden Synapsen zwischen Entorhinalkortex und Pyramidenzellen im Subikulum?

Die Regulation intrinsischer Erregbarkeit wurde in der Region CA3 des Hippokampus sowie an sensorischen Neuronen des Geruchsinns näher untersucht, dabei wurde zu folgenden Fragenkomplexen ein Beitrag geleistet:

- Wie beeinflussen die im Zentralnervensystem breit exprimierten $K_v7.5$ Kaliumkanäle die intrinsische Erregbarkeit von Neuronen?
- Auf welche Weise tragen kalziumaktivierte Chloridkanäle in olfaktorischen Neuronen zur Erregbarkeit und Signalweiterleitung bei?

2. Eigene Arbeiten

Pyramidenzellen im Subikulum werden nach ihrem Entladungsverhalten in zwei Typen eingeteilt: „Burst“-Zellen und „Regular“-Zellen. Nach Hochfrequenzstimulation zeigen diese Zellen eine zellspezifische LTP, wobei in „Burst“ Zellen die LTP präsynaptisch und in „Regular“ Zellen postsynaptisch vermittelt wird (Aoto et al., 2015; Wozny et al., 2008a; Wozny et al., 2008b). Wir konnten zeigen, dass in den beiden genannten Zelltypen auch nach Niedrigfrequenzstimulation zellspezifische synaptische Plastizität auftritt (Beitrag 2.1).

In einer weiteren Arbeit untersuchten wir genauer, welche Mechanismen an der oben genannten zellspezifischen Plastizität beteiligt sind und konnten belegen, dass sowohl muskarinerge Azetylcholinrezeptoren als auch spannungsabhängige Kalziumkanäle (VGCC) die Plastizität modulieren (Beitrag 2.2).

Das Subikulum erhält zusätzlich zu CA1 auch Eingänge aus anderen Hirnregionen, allen voran aus dem Entorhinalkortex über den sogenannten temporoammonischen Weg. Wir beschäftigten uns mit der Frage, ob synaptische Plastizität außer an bereits charakterisierten CA1-Synapsen auch an Entorhinalkortex-Subikulum Synapsen induziert werden kann und welche Mechanismen daran beteiligt sind. Hochfrequenzstimulation des temporoammonischen Eingangs löste in den subikulären Pyramidenzellen im Gegensatz zu Stimulation von CA1 Synapsen eine rein postsynaptische LTP aus (Beitrag 2.3). Nach Niedrigfrequenzstimulation zeigte sich neben einer LTD an Synapsen zwischen Entorhinalkortex und Subikulum auch eine LTP an nicht stimulierten CA1-Subikulum Synapsen, womit wir einen neuen, heterosynaptischen Mechanismus der Erregbarkeitsmodulation beschreiben konnten (Beitrag 2.4).

Neben Mechanismen synaptischer Plastizität wurde auch der Einfluss von Ionenkanälen auf die Regulation intrinsischer Erregbarkeit untersucht.

Die Subtypen $K_v7.2$, $K_v7.3$ und $K_v7.5$ der K_v7 -Kaliumkanalfamilie werden im Gehirn breit exprimiert. Bei Mausmodellen und auch beim Menschen ist bekannt, dass der Funktionsausfall von $K_v7.2$ oder von $K_v7.3$ zur Übererregbarkeit im Nervensystem und zu Epilepsie führen kann. Hingegen sind Mäuse mit Funktionsausfall von $K_v7.5$ nicht epileptisch und zeigen keine offensichtlichen Verhaltensauffälligkeiten (Tzingounis et al., 2010). Daher gingen wir der Frage nach, welche Funktion der $K_v7.5$ Kaliumkanal im Zentralnervensystem hat und warum im Gegensatz zu $K_v7.2$ oder $K_v7.3$ ein Funktionsausfall von $K_v7.5$ nicht zu Epilepsie führt. Wir konnten zeigen, dass das $K_v7.5$ Protein vermehrt in inhibitorischen Zellen (sogenannten Interneuronen) sowie an inhibitorischen Synapsen zu finden ist und dass der Funktionsausfall dieses Proteins eine erhöhte Inhibition zur Folge hat (Beitrag 2.5).

Ferner untersuchten wir auch die Modulation intrinsischer Erregbarkeit durch Ionenkanäle in olfaktorischen Neuronen, die für Signalgenerierung beim Geruchssinn verantwortlich sind. Es wurde jahrelang angenommen, dass kalziumaktivierte Chloridkanäle beim physiologischen Riechvorgang eine kritische Rolle spielen, da sie in olfaktorischen Neuronen den Hauptanteil an der für die Signalfortleitung notwendigen Depolarisation tragen (Reisert et al., 2003). Die molekulare Identität dieser Kanäle war jedoch zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen unbekannt. Wir konnten zunächst Anoctamin2 als den kalziumaktivierten Chloridkanal in olfaktorischen Neuronen identifizieren. Um den Beitrag von ANO2 für den Riechvorgang genauer zu evaluieren, schalteten wir diesen Kanal in Mäusen aus. Aus der reduzierten elektrischen Kanalaktivität in olfaktorischen Neuronen bei erhaltener Riechfunktion der Anoctamin2^{-/-} Mäuse konnten wir schlussfolgern, dass der kalziumaktivierte Chloridkanal für den physiologischen Riechvorgang nicht zwingend notwendig ist (Beitrag 2.6).

2.1. Zellspezifische bidirektionale Plastizität an CA1-Subikulum Synapsen

Fidzinski P., Shor O., Behr J. Target-cell-specific bidirectional synaptic plasticity at hippocampal output synapses. *European Journal of Neuroscience* 2008, 27(5):1111-1118.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06089.x>

Das Subikulum ist eine im Temporallappen zwischen der CA1 Region und dem Entorhinalkortex gelegene Struktur, welche im Gegensatz zu schmalen Pyramidenzellsäumen im Ammonshorn (CA1-CA4) durch eine breite Pyramidenzellschicht charakterisiert ist. Das Subikulum gilt als der Hauptausgang des Hippokampus, da ein Großteil der Axone aus der CA1-Region ins Subikulum projiziert und die Information dort verarbeitet wird, bevor sie in kortikale bzw. subkortikale Regionen weitergeleitet wird (O'Mara et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass das Subikulum, am ehesten aufgrund seiner Schlüsselrolle bei der Interaktion zwischen Hippokampus und Entorhinalkortex, an der Langzeitspeicherung von Informationen und somit an Gedächtnisvorgängen beteiligt ist (Aggleton and Christiansen, 2015; Deadwyler and Hampson, 2004; Gabrieli et al., 1997; Zeineh et al., 2003). Auch pathophysiologisch spielt das Subikulum eine wichtige Rolle: bei Temporallappenepilepsie mit Hippokampusklerose und somit Untergang der CA1-Zellen nimmt die Anfallsaktivität ihren Ursprung im noch intakten Subikulum (Cohen et al., 2002; Wozny et al., 2003). Folglich könnte die Modulation der Erregbarkeit im Subikulum, insbesondere eine Abschwächung dergleichen, eine Möglichkeit zur Behandlung der Temporallappenepilepsie darstellen.

Die Pyramidenzellen im Subikulum werden nach ihrem Entladungsmuster in zwei unterschiedliche Typen eingeteilt. Sogenannte „Burst“-Zellen antworten auf Depolarisation mit Gruppen (=“bursts“) von schnell aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen, während „Regular“ Zellen mit einzelnen Aktionspotentialen antworten (Staff et al., 2000). Diese beiden Zelltypen unterscheiden sich auch bezüglich ihrer Mechanismen der LTP. In „Burst“ Zellen kommt es nach einem Hochfrequenzstimulus an CA1-Subikulum Synapsen zur präsynaptisch vermittelten LTP durch Erhöhung der Freisetzungswahrscheinlichkeit für

Glutamat. Hingegen zeigen „Regular“ Zellen eine postsynaptische LTP, wahrscheinlich durch eine höhere Expression bzw. höhere Leitfähigkeit von AMPA-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran (Wozny et al., 2008a; Wozny et al., 2008b).

In der vorliegenden Studie untersuchten wir, wie CA1-Subikulum Synapsen auf niedrigfrequente Stimulation reagieren. Niedrigfrequente Stimulation ist ein Standardparadigma zur Induktion von LTD (Malenka and Bear, 2004). LTD wurde im Subikulum beschrieben (Li et al., 2005), jedoch war unbekannt, ob sie zellspezifisch auftritt. Wir konnten nachweisen, dass subikuläre Pyramidenzellen nach niedrigfrequenter Stimulation eine zellspezifische Plastizität exprimieren: In „Burst“ Zellen trat präferentiell eine LTD auf, während „Regular“-Zellen beim gleichen Stimulationsparadigma eine LTP zeigten, welche im Gegensatz zu hochfrequent induzierter LTP nicht sofort, sondern verzögert auftrat. Sowohl die Richtung als auch die Expressionsstärke der Plastizität waren von der Stimulationsfrequenz abhängig. Interessanterweise konnte insbesondere durch pharmakologische Beeinflussung die Richtung der Plastizität umgekehrt werden: nach Blockade metabotroper Glutamaterezeptoren (mGlu-Rezeptoren) zeigten auch „Regular“-Zellen eine LTD, während nach Blockade von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren die „Burst“-Zellen eine LTP zeigten. Beide Typen der Plastizität waren von der Aktivierung der postsynaptischen Kalzium-Signalkaskade abhängig, da nach Blockade dieser Kaskade mit dem Kalziumpuffer Bis-N,N,N',N'-Tetraacetat (BAPTA) die Plastizität komplett blockiert werden konnte.

Zusammenfassend konnten wir mit unseren Daten erstmalig zeigen, dass in subikulären Zellen nach Niedrigfrequenzstimulation zwei Arten synaptischer Plastizität exprimiert werden: eine postsynaptische, mGlu-Rezeptor abhängige LTP und eine postsynaptische, NMDA-Rezeptor abhängige LTD. Die präferierte Richtung der Plastizität ist dabei zellspezifisch und hängt vom Aktivierungsniveau von mGlu-Rezeptoren bzw. NMDA-Rezeptoren ab.

2.2. Modulation bidirektionaler Plastizität durch Azetylcholin und Kalzium

Shor O., Fidzinski P.*, Behr J.* Muscarinic acetylcholine receptors and voltage-gated calcium channels contribute to bidirectional synaptic plasticity at CA1-subiculum synapses. *Neuroscience Letters* 2009, 449(3):220-223 (*equal contribution).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2008.11.012>

Der Begriff der Neuromodulation beschreibt die Beeinflussung neuronaler Informationsübertragung über längere Zeitspannen sowie jenseits glutamaterger bzw. GABAerger Signaltransmission. „Klassische“ Neuromodulation erfolgt durch die Substanzen Azetylcholin, Adrenalin, Dopamin und Serotonin. Es wird vermutet, dass ein höheres Aktivierungsniveau einzelner Neuromodulatoren mit spezifischen Hirnfunktionen wie Wachheit oder Aufmerksamkeit zusammenhängt (Gu, 2002). Azetylcholin wird spezifisch mit Gedächtnisprozessen in Verbindung gebracht (Hasselmo, 2006). Der Hippokampus und das Subikulum werden aus dem medialen Septum und dem Diagonalband cholinerg innerviert (Lopes Da Silva et al., 1990; Mesulam et al., 1983). Es ist bekannt, dass muskarinerge Azetylcholinrezeptoren die Plastizität an glutamatergen Synapsen modulieren (Bashir, 2003; Grishin et al., 2005). Auch im Subikulum sind diese Rezeptoren für die LTD notwendig (Li et al., 2005).

Neben den klassischen Neuromodulatoren können auch spannungsabhängige Ionenkanäle neuromodulatorische Wirkung entfalten. Insbesondere scheint die Gruppe der VGCC dafür geeignet zu sein, da diese Kanäle in kalziumabhängige Signalkaskaden eingreifen und somit Signaltransmission und Plastizität regulieren können (Bloodgood and Sabatini, 2008; Jeon et al., 2008; Moosmang et al., 2005; Morgan and Teyler, 2001). Wir konnten zeigen, dass auch die in 2.1 beschriebene bidirektionale Plastizität an CA1-Subikulum Synapsen durch sowohl muskarinerge Azetylcholinrezeptoren als auch durch VGCC beeinflusst wird. Dabei scheint die Koaktivierung von muskarinergen Rezeptoren für die Induktion von sowohl LTP als auch LTD notwendig zu sein. VGCC sind hingegen an der Modulation beteiligt, indem ihr Aktivierungsniveau die zellspezifische Polarität (LTP vs. LTD) in subikulären Pyramidenzellen bestimmt.

2.3. LTP an Entorhinalkortex – Subikulum Synapsen

Fidzinski P., Wawra M., Bartsch J., Heinemann U., Behr J. High-frequency stimulation of the temporoammonic pathway induces input-specific long-term potentiation in subicular bursting cells. Brain Research 2012, 1430:1-7.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2011.10.040>

In den Beiträgen 2.1 und 2.2 wurde Regulation synaptischer Erregbarkeit mittels Plastizität an CA1-Subikulum Synapsen untersucht. Neben der starken Projektion aus der CA1 Region erhält das Subikulum Eingänge aus anderen Regionen, allen voran aus dem anatomisch benachbarten Entorhinalkortex (Tamamaki and Nojyo, 1993; Witter and Groenewegen, 1990). Wir gingen den Mechanismen der Plastizität an diesen Synapsen nach. Da die „Burst“-Zellen einen Großteil der Pyramidenzellen im Subikulum ausmachen, fokussierten wir uns zunächst auf die Untersuchung der Plastizität in „Burst“-Zellen.

Nach Hochfrequenzstimulation an Entorhinalkortex-Subikulum Synapsen konnten wir erfolgreich eine eingangsspezifische LTP induzieren, welche deutliche Unterschiede zu der bereits beschriebenen, präsynaptischen LTP an CA1-Subikulum Synapsen (Wozny et al., 2008a; Wozny et al., 2008b) aufwies. Diese bestanden einerseits in einem höheren Schwellenwert zur LTP-Induktion: an Entorhinalkortex-Subikulum Synapsen war eine Disinhibition durch pharmakologische Blockade GABAerger Synapsen notwendig, um erfolgreich LTP zu induzieren, ferner zeigten diese Synapsen während des Hochfrequenzstimulus eine schwächere Fazilitierung der Spannungsantwort. Andererseits war im Gegensatz zu CA1-Subikulum Synapsen die LTP an Entorhinalkortex-Subikulum Synapsen postsynaptisch induziert, da sie durch Blockade postsynaptischer Signalkaskaden oder durch Hyperpolarisation der postsynaptischen Zelle verhindert werden konnte. Auch die Expressionsmechanismen unterschieden sich: die fehlende Änderung der sogenannten Paired-Pulse-Ratio wies auf eine postsynaptische Expression der LTP an Entorhinalkortex-Subikulum Synapsen hin.

Wir konnten folglich konstatieren, dass LTP im Subikulum nicht nur wie zuvor gezeigt zellspezifisch und von der Stimulationstärke (2.1) abhängig, sondern auch eingangsspezifisch reguliert ist.

2.4. Heterosynaptische Plastizität im Subikulum

Fidzinski P., Wawra M., Dugladze T., Gloveli T., Heinemann U., Behr J. Low-frequency stimulation of the temporoammonic pathway induces heterosynaptic disinhibition in the subiculum. *Hippocampus* 2011, 21(7):733-743.

<http://dx.doi.org/10.1002/hipo.20791>

Zur Komplettierung des Verständnisses über Mechanismen der Signalübertragung im Subikulum gingen wir analog zur Untersuchungen an CA1-Subikulum Synapsen der Frage nach, ob auch an Entorhinalkortex-Subikulum Synapsen nach Niedrigfrequenz-Stimulation eine LTD exprimiert wird.

In "Burst" Zellen konnten wir nach Niedrigfrequenzstimulation von Entorhinalkortex Eingängen analog zu CA1-Subikulum Synapsen eine robuste LTD beobachten. Interessanterweise war diese Plastizität im Gegensatz zu in 2.3 beschriebenen LTP nicht eingangsspezifisch, da gleichzeitig auch die Übertragung an CA1-Subikulum Synapsen moduliert und dort überraschenderweise eine LTP sichtbar wurde. Wir gingen den Mechanismen dieser heterosynaptischen LTP genauer nach und konnten in unserer Arbeit belegen, dass der Effekt auf einer Depression der hemmenden GABAergen Übertragung im Subikulum beruht, und dass diese GABAerge LTD von NMDA-Rezeptoren abhängig war. Dies stellte einen ungewöhnlichen Befund dar, da NMDA-Rezeptoren hauptsächlich an erregenden Synapsen exprimiert werden. Wir konnten Hinweise dafür finden, dass die Freisetzung von GABA im Subikulum durch Aktivierung von präsynaptischen NMDA-Rezeptoren beeinflusst werden kann.

Zusammen mit den Beiträgen 2.1-2.3 geben die Befunde Hinweise darauf, dass das Subikulum als Vermittler zwischen Hippokampus und neokortikalen Regionen über ein komplexes Repertoire zur Regulation der synaptischen Erregbarkeit verfügt, und dass auch heterosynaptische Mechanismen an dieser Regulation beteiligt sind.

2.5. Kontrolle GABAerger Inhibition durch K_v7 - Kaliumkanäle

Fidzinski P.*, Korotkova T.*, Heidenreich M.*, Maier N., Schuetze S., Kobler O., Zuschratter W., Schmitz D., Ponomarenko A., Jentsch T. J. KCNQ5 K(+) channels control hippocampal synaptic inhibition and fast network oscillations. *Nature Communications* 2015, 6:6254. (*equal contribution).

<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7254>

Die Familie der K_v7 Kaliumkanäle umfasst 5 Mitglieder (K_v7.1-K_v7.5), wovon K_v7.2, K_v7.3 und K_v7.5 eine breite Expression im Gehirn zeigen. Die Kanäle liegen meist als Heterotetramere vor, bei denen 4 Untereinheiten einen Kanal bilden und verschiedene Untereinheiten (z.B. K_v7.2 und K_v7.3) in einem Kanal vorliegen. K_v7.2 und K_v7.3 spielen eine kritische Rolle für die Regulation intrinsischer Erregbarkeit im Zentralnervensystem (ZNS), da sie bei Aktivierung, meist nach Depolarisation durch ein Aktionspotential, die Zelle langsam hyperpolarisieren. Somit verhindern sie die Entstehung weiterer Aktionspotentiale und können als eine Art neuronale „Bremse“ betrachtet werden. Die Bedeutung von K_v7.2 und K_v7.3 für die Erregbarkeit im ZNS wird auch durch Mutationen beim Menschen als auch korrespondierende Mausmodelle erkennbar – der Funktionsverlust von K_v7.2 oder K_v7.3 führt zu Epilepsie, und in einigen Fällen zu schwer therapierbarer epileptischer Enzephalopathie (Jentsch, 2000; Maljevic and Lerche, 2014; Singh et al., 2008).

Auch wenn K_v7.5 ähnlich zu K_v7.2 und K_v7.3 im ZNS breit exprimiert wird, konnten bislang keine epilepsiespezifischen Mutationen im K_v7.5 - Gen nachgewiesen werden (Kananura et al., 2000; Maljevic et al., 2010). Wir untersuchten daher die physiologische Funktion von K_v7.5 im ZNS unter Zuhilfenahme eines K_v7.5 Mausmodells (*Kcnq5^{dn/dn}*), bei dem alle K_v7.5-Untereinheit tragenden Kaliumkanäle funktionslos sind. Im Gegensatz zu K_v7.2 oder K_v7.3 Mausmodell zeigen *Kcnq5^{dn/dn}* Mäuse keine Anfälle oder Epilepsie (Tzingounis et al., 2010).

Wir fokussierten uns auf die CA3-Region des Hippokampus, in der K_v7.5 besonders stark exprimiert wird. Mit unseren Untersuchungen konnten wir belegen, dass K_v7.5 vorwiegend in inhibitorischen Neuronen (sog. Interneuronen)

und an inhibitorischen Synapsen exprimiert wird. Konsistent mit dieser Lokalisation fanden wir in den *Kcnq5^{dn/dn}* – Tieren eine reduzierte Erregbarkeit des lokalen CA3-Netzwerks und gleichzeitig eine erhöhte Erregbarkeit von Interneuronen.

Zusammenfassend weisen unsere Untersuchungen darauf hin, dass der Funktionsverlust von $K_v7.5$ im Gegensatz zu $K_v7.2$ und $K_v7.3$ die Erregbarkeit im ZNS reduziert, da aufgrund der Lokalisation von $K_v7.5$ in Interneuronen in einer höheren intrinsischen Aktivität der inhibitorischen Zellen resultiert. Folglich ist es als unwahrscheinlich zu erachten, dass *Kcnq5^{dn/dn}* – Mäuse zu Epilepsie neigen; man könnte sogar postulieren, dass der $K_v7.5$ Funktionsverlust gegen epileptische Anfälle protektiv wirkt.

2.6. Kalziumaktivierte Chloridkanäle in olfaktorischen Neuronen

Billig G.M., Pál B., Fidzinski P., Jentsch T.J. Ca²⁺-activated Cl⁻ currents are dispensable for olfaction. *Nature Neuroscience* 2011, 14(6):763-769.

<http://dx.doi.org/10.1038/nn.2821>

Auch beim physiologischen Riechvorgang ist intrinsische Erregbarkeit der beteiligten Neurone Voraussetzung. Unsere Fähigkeit, geringste Konzentrationen einer Plethora von Riechstoffen wahrzunehmen, beruht auf einer komplexen Signaltransduktion in olfaktorischen Neuronen der Riechschleimhaut (Kleene, 2008): zunächst binden geruchsaktive Moleküle an membranständige, G-Proteingekoppelte Rezeptoren, was zur Aktivierung einer Adenylzyklase und Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) führt. Im nächsten Schritt aktiviert cAMP einen Kationenkanal (cyclic nucleotide gated channel, CNG), der einen Einstrom von Natrium- und Kalziumionen und eine Depolarisation ermöglicht. Schließlich kommt es zur Aktivierung eines kalziumabhängigen Chloridkanals und aufgrund hoher intrazellulärer Chloridkonzentration (Stephan et al., 2009) zu weiterer Depolarisation der Zellmembran.

Bislang wurde angenommen, dass die über CNG-Kanäle vermittelte Spannungsänderung erst durch Verstärkung aufgrund der Aktivierung kalziumabhängiger Chloridkanäle eine für die Signalweiterleitung ausreichende Depolarisation möglich macht. Da die molekulare Identität des beteiligten Chloridkanals jedoch unbekannt war, blieb ein eindeutiger Nachweis dieser Verstärkungshypothese aus. In unserer Arbeit konnten wir Anoctamin2 als den kalziumaktivierten Chloridkanal in olfaktorischen Neuronen identifizieren: das Ausschalten von Anoctamin2 im Mausmodell führte zur Aufhebung von kalziumaktivierten Chloridströmen. Überraschenderweise hatte das Ausschalten von Anoctamin2 keinen Effekt auf die Riechfunktion: diese war in Anoctamin2 Knockout-Mäusen unverändert. Wir konnten somit in unserer Arbeit nachweisen, dass entgegen der bis dahin gängigen Lehrmeinung kalziumaktivierte Chloridkanäle in olfaktorischen Neuronen für eine physiologische Riechfunktion nicht zwingend notwendig sind.

3. Diskussion

In den Arbeiten meiner Habilitationsschrift wurde das Ziel verfolgt, durch Analyse der Regulationsmechanismen synaptischer und intrinsischer Erregbarkeit ein besseres Verständnis über die Signalverarbeitung im ZNS zu gewinnen. Im Folgenden gehe ich auf die behandelten Aspekte einzeln ein.

3.1. Zellspezifische Plastizität an CA1-Subikulum Synapsen

An CA1-Subikulum Synapsen konnten zwei Arten postsynaptisch vermittelter, zellspezifischer Plastizität beobachtet werden: mGlu-Rezeptor abhängige LTP und NMDA-Rezeptor abhängige LTD (Fidzinski et al., 2008). Die LTP und LTD traten in „Burst“- und „Regular“-Zellen mit unterschiedlichen Induktionsschwellen auf. Da auch die präsynaptische LTP im Subikulum zellspezifisch auftritt (Wozny et al., 2008a; Wozny et al., 2008b), erhärten die Daten die Vermutung, dass subikuläre Zellspezifität einen wichtigen physiologischen Steuerungsmechanismus darstellt. Die unterschiedliche Verteilung der Somata von „Burst“ und „Regular“ Zellen (Greene and Totterdell, 1997; Harris et al., 2001; Menendez et al., 2003; Staff et al., 2000) und auch die Verteilung und Erregbarkeit subikulärer Axone (Funahashi et al., 1999; Ishizuka, 2001; Kohler, 1986; Naber and Witter, 1998; Stewart, 1997) deuten daraufhin, dass Projektionen von „Burst“ und „Regular“ Zellen unterschiedliche Hirnregionen zum Ziel haben. Folglich ist denkbar, dass die vermutete Steuerung über zellspezifische Induktionsschwellen für synaptische Plastizität die Spezifität des hippocampalen Ausgangs reguliert.

Eine weitere Beobachtung war, dass die Richtung der Plastizität (LTP vs. LTD) nicht nur vom Zelltyp, sondern auch von der Stimulusfrequenz abhängig ist. Ähnliche Phänomene wurden auch in anderen Hirnregionen beschrieben, dabei konnte die Richtung der Plastizität vor allem durch unterschiedliche Grade der postsynaptischen Depolarisation und folglich unterschiedliche Kinetik der postsynaptischen Kalziumsignale erklärt werden (Cho et al., 2001; Harney et al., 2006; Ismailov et al., 2004). In unserer Arbeit beobachteten wir während der Stimulation eine unterschiedliche Kinetik der Spannungsantworten/EPSPs in „Burst“ und „Regular“ Zellen. Da NMDA-Rezeptoren bereits beim

Ruhemembranpotential an EPSPs in subikulären Zellen beteiligt sind (Behr et al., 1998), gehen wir davon an, dass zellspezifische Plastizität im Subikulum auf unterschiedlicher Kinetik von Kalziumsignalen basiert.

Damit konsistent ist die Notwendigkeit der Aktivierung muskarinerner Acetylcholinrezeptoren für die Induktion bidirektionaler Plastizität im Subikulum. Nach Blockade dieser Rezeptoren konnte weder LTP in „Burst“-Zellen noch LTD in „Regular“-Zellen induziert werden (Shor et al., 2009). Abhängig von ihrem Subtyp (M1-M5) können muskarinerge Azetylcholinrezeptoren unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Der in der hippocampalen Formation vorwiegend exprimierte M1-Rezeptor (Volpicelli and Levey, 2004) aktiviert eine über Phospholipase C vermittelte Signalkaskade, welche zur Produktion von Inositoltrisphosphat (IP3) und Öffnung intrazellulärer Kalziumspeicher führt. Da nach Blockade der Kalziumsignalwege mit der Puffersubstanz BAPTA die bidirektionale Plastizität in subikulären Zellen blockiert wird (Fidzinski et al., 2008), ist anzunehmen, dass auch die Blockade muskarinerner Azetylcholinrezeptoren zu veränderten bzw. abgeschwächten Kalziumsignalen führt, welche dann nicht mehr in der Lage sind, Plastizität zu induzieren. Auch die Effekte der Inhibition von VGCC-Kanälen, insbesondere die Beeinflussung der Polarität (LTP vs. LTD) sind mit einer Beteiligung intrazellulärer Kalziumkaskaden bei bidirektionaler Plastizität im Subikulum vereinbar.

3.2. Synaptische Plastizität an Entorhinalkortex-Subikulum Synapsen

An Synapsen zwischen Entorhinalkortex und „Burst“-Zellen im Subikulum fanden wir nach Hochfrequenzstimulation eine postsynaptisch vermittelte LTP, welche von der Aktivierung von NMDA Rezeptoren und intrazellulären Kalziumsignalen abhängig war (Fidzinski et al., 2012). Dieser Typ der LTP wurde in vielen anderen Synapsen im ZNS, insbesondere im Hippokampus beschrieben (Bliss and Collingridge, 1993), unterschied sich jedoch deutlich von präsynaptisch vermittelter LTP, welche im gleichen subikulären Zelltyp an Eingängen aus der Area CA1 gefunden wurde (Wozny et al., 2008a). Interessanterweise war zur LTP-Induktion auch ein deutlich stärkerer Hochfrequenzstimulus als an CA1-Synapsen

notwendig. Der hohe Schwellenwert zur LTP-Induktion ist mit einer spezifischen Eigenschaft von Pyramidenzellen in der Schicht III des Entorhinalkortex konsistent, welche die Hauptprojektion ins Subikulum vermitteln (Amaral and Witter, 1989; Lopes Da Silva et al., 1990; Witter et al., 2000): diese Zellen sind nicht in der Lage, Hochfrequenzstimuli adäquat in Aktionspotentiale zu übersetzen, nur bei Stimulationsfrequenzen unter 10 Hz kommt es zu verlässlicher Aktionspotentialgeneration (Gloveli et al., 1997).

Hingegen konnten wir nach Niedrigfrequenzstimulation der Entorhinaleingänge in „Burst“ Zellen sowohl eine homosynaptische LTD an Synapsen aus dem Entorhinalkortex als auch eine Fazilitierung der Synapsen aus der CA1 beobachten. Diese heterosynaptische Fazilitierung war durch GABAerge Disinhibition im Subikulum vermittelt und beruhte am ehesten auf einer Aktivierung präsynaptischer NMDA Rezeptoren an GABAergen Synapsen, womit wir einen neuen Mechanismus inhibitorischer Plastizität in Nervenzellen von Säugetieren beschrieben. Die heterosynaptische Aktivierung von NMDA Rezeptoren an GABAergen Synapsen könnte durch ein „Überschwappen“ von Glutamat aus glutamatergen zu GABAergen Synapsen bedingt sein; die hohe Glutamatsensitivität von NMDA-Rezeptoren (Kullmann et al., 1996) unterstützt diese Hypothese. Andererseits ist auch eine axoaxonale Verbindung zwischen glutamatergen Fasern aus dem Entorhinalkortex und GABAergen Axonen im Subikulum denkbar. Axoaxonische Verbindungen zwischen glutamatergen und GABAergen Fasern sind aus dem Neokortex bekannt (Ren et al., 2007). Schließlich kann auch eine dendritische Aktivierung von NMDA Rezeptoren in Interneuronen zur Veränderung der Freisetzung an ihren Synapsen führen. Derartige elektrotonische Effekte wurden im Zerebellum beschrieben (Christie and Jahr, 2008). Die gleichzeitige Hemmung des Entorhinaleingangs und Verstärkung des CA1 Eingangs könnte für die Homöostase des hippocampalen Ausgangs eine wichtige Rolle spielen, indem das Niveau der synaptischen Erregbarkeit im Subikulum in einem stabilen Bereich gehalten wird.

3.3. K_v7 - Kaliumkanäle im ZNS

Die Wirkungsweise von K_v7 Kaliumkanälen beruht auf einer langsamen, spannungsabhängigen Aktivierung und einer daraus resultierenden Hyperpolarisation. So können K_v7.2- und K_v7.3-Kanäle in Neuronen nach Aktivierung durch das erste Aktionspotential die Generation weiterer Aktionspotentiale verhindern und als neuronale „Bremse“ wirken (Soldovieri et al., 2011). Bereits ein partieller (heterozygoter) Funktionsverlust von K_v7.2 oder K_v7.3 kann sowohl beim Menschen (Biervert et al., 1998; Singh et al., 2008) als auch in Mausmodellen (Peters et al., 2005; Singh et al., 2008; Watanabe et al., 2000) zu Epilepsie führen.

K_v7.5, das ebenfalls eine breite zerebrale Expression zeigt, wurde bereits 2000 nach Mutationsanalysen eher unwahrscheinlich als Kandidatengen für humane Epilepsie betrachtet (Kananura et al., 2000). Um die Unterschiede von K_v7.2/K_v7.3 Kanälen und K_v7.5 Kanälen genauer zu untersuchen, verwendeten wir Mäuse mit einer dominant-negativen Mutation im K_v7.5-Gen, welche die Kanalpore funktionslos macht. Tatsächlich zeigten diese Mäuse im Gegensatz zu K_v7.2 und K_v7.3 Mausmodellen keine offensichtlichen Verhaltensauffälligkeiten oder gar Epilepsie. Vielmehr konnten wir in akuten Hirnschnitten beobachten, dass im K_v7.5 Mausmodell nicht die Erregbarkeit, sondern die Hemmung verstärkt war (Fidzinski et al., 2015).

Der Unterschied in der Funktion zwischen K_v7.2 und K_v7.3 einerseits und K_v7.5 andererseits kann durch die unterschiedliche Lokalisation erklärt werden. K_v7.2 und K_v7.3 sind vorwiegend in erregenden Pyramidenzellen am Axonhügel und in Axonen an Ranvierschen Schnürringen zu finden (Klinger et al., 2011), womit sie eine optimale Lokalisation zur Aktionspotentialkontrolle haben und bei ihrem Funktionsausfall eine Übererregbarkeit resultiert (Peters et al., 2005). Hingegen fanden wir K_v7.5 in inhibitorischen Zellen (sog. Interneuronen) und auch an hemmenden Synapsen, an denen K_v7.2 und K_v7.3 nicht nachgewiesen werden konnte (Klinger et al., 2011). Analog zu erhöhter Erregbarkeit von Pyramidenzellen in K_v7.2/K_v7.3 Mausmodellen konnten wir in Hirnschnittuntersuchungen belegen, dass in *Kcnq5*^{dn/dn} Mäusen mehrere Klassen

von Interneuronen eine erhöhte intrinsische Erregbarkeit zeigen. Somit scheint $K_v7.5$ im ZNS eine komplementäre Funktion zu $K_v7.2$ und $K_v7.3$ zu spielen. Die unveränderte intrinsische Erregbarkeit von Pyramidenzellen in unserem $K_v7.5$ Mausmodell unterstützt diese Hypothese.

Es ist prinzipiell denkbar, dass verstärkte Inhibition in $Kcnq5^{dn/dn}$ Mäusen einen protektiven Mechanismus gegen epileptische Anfälle darstellt. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass die in Hirnschnitten von $Kcnq5^{dn/dn}$ Mäusen beobachtete verstärkte Aktivität von Interneuronen und somit verstärkte Inhibition auch *in vivo* zu finden war. Insbesondere konnten wir im Vergleich zu Kontrollen eine Dämpfung zerebraler Oszillationen im Gamma- (40-80 Hz) und auch im hochfrequenten (100-200 Hz) Frequenzbereich finden. Daher ist zu erwarten, dass auch pathologische Oszillationen während epileptischer Aktivität bei Funktionsausfall von $K_v7.5$ unterdrückt werden könnten und somit die $K_v7.5$ Mutation eine antikonvulsive Wirkung hat.

Pathologische Übererregbarkeit im ZNS, z.B. bei Epilepsie, kann über Öffnung von $K_v7.2$ und $K_v7.3$ Kanälen reduziert werden. Retigabin, ein unspezifischer K_v7 -Kanalöffner, wird als Antikonvulsivum verwendet (Yamada and Welty, 2012). Neben $K_v7.2$ und $K_v7.3$ wirkt Retigabin jedoch auch als Öffner von $K_v7.5$ (Schenzer et al., 2005). Da die Öffnung von $K_v7.5$ aufgrund von uns beschriebener Lokalisation im hemmenden System die Erregbarkeit steigern kann, erscheint es daher als möglich, dass die antikonvulsive Wirkung von Retigabin durch die Aktivierung von $K_v7.5$ und folglich Reduktion der zerebralen Hemmung abgeschwächt wird. Hingegen ist vorstellbar, dass spezifische Öffner für $K_v7.2$ und $K_v7.3$ ohne Wirkung auf $K_v7.5$, z.B. ICA-27243 (Wickenden et al., 2008), eine höhere antikonvulsive Wirkung als Retigabin zeigen.

3.4. Identifikation von Anoctamin2 als Chloridkanal in olfaktorischen Neuronen

Kalziumaktivierte Chloridkanäle werden in unterschiedlichsten Spezies und Geweben exprimiert (Hartzell, 2008). Abhängig vom Chloridumkehrpotential bewirkt ihre Öffnung eine Änderung des Membranpotentials nach Aktivierung

durch Kalziumionen. Erstmals wurden kalziumaktivierte Chloridkanäle in *Xenopus*-Eizellen charakterisiert, wo sie nach Fertilisation und Einstrom von Kalzium die Zellmembran depolarisieren und so die Fusion eines weiteren Spermiums mit der Zellmembran verhindern (Miledi and Parker, 1984). Auch im Nervensystem, insbesondere in olfaktorischen Neuronen (Lowe and Gold, 1993) und in Hinterhorn ganglien (Currie et al., 1995) sind kalziumaktivierte Chloridkanäle beschrieben worden. Die Charakterisierung der Chloridströme in olfaktorischen Neuronen ergab, dass deren Anteil am Gesamt-Rezeptorstrom bis zu 90% betrug (Kleene, 2008; Kurahashi and Yau, 1993; Reisert et al., 2003) und folglich eine hohe physiologische Relevanz haben musste. Als Kandidaten in olfaktorischen Neuronen wurden unterschiedliche Proteine postuliert, darunter Anoctamin2 (Stephan et al., 2009) und Bestrophin-2 (Pifferi et al., 2006).

Bis 2008 war die molekulare Identität der kalziumaktivierten Chloridkanäle ungeklärt. Die Klonierung von Anoctamin1 (Schroeder et al., 2008) konnte dieses Rätsel lösen und gab Anstoß zur Charakterisierung der gesamten Anoctamin-Familie mit 10 Mitgliedern, denen eine hohe funktionelle Diversität auch jenseits der Chloridkanalfunktion zugeschrieben wird (Milenkovic et al., 2010). In unserer Arbeit konnten wir Anoctamin2 als den kalziumaktivierten Chloridkanal in olfaktorischen Neuronen identifizieren (Billig et al., 2011), da nach Ausschalten des *Ano2*-Gens in Mäusen die Chloridströme nahezu komplett verschwanden. Hingegen wiesen unveränderte Chloridströme in Bestrophin-2 Knockout Mäusen daraufhin, dass dieses Protein nicht wesentlich zu Chloridantwort beitragen kann (Pifferi et al., 2009).

Trotz der reduzierten Chloridströme in Einzellableitungen aus Riechepithel-Schnittpräparaten und auch reduzierten Antworten bei Elektroolfaktogramm-Ableitungen in Anoctamin2-Knockout Mäusen zeigten die Tiere im mehreren Tests keine Änderung der Riechfunktion. Auch bei einigen Patienten mit von-Willenbrand-Syndrom, einer hereditären Gerinnungsstörung, ist ein Funktionsausfall des Anoctamin2 Gens nachgewiesen worden (Schneppenheim et al., 2007). Ähnlich den Anoctamin2 Knockout Mäusen zeigen auch diese Patienten keine offensichtliche Störung des Geruchsinns.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass für eine regelrechte Funktion des Geruchs sinns die in olfaktorischen Neuronen exprimierten CNG-Kanäle eine ausreichende Rezeptorantwort leisten können und keine Regulation der intrinsischen Erregbarkeit durch Verstärkung durch Chloridströme über kalziumaktivierte Chloridkanäle notwendig ist.

4. Zusammenfassung

Störungen neuronaler Erregbarkeit sind an vielen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen beteiligt, folglich basieren eine Reihe pharmakologischer Ansätze zur Therapie dieser Erkrankungen auf der Beeinflussung dieser Erregbarkeit. In der vorliegenden Arbeit sind Mechanismen der Erregbarkeit auf synaptischer und intrinsischer Ebene näher untersucht worden.

Bezüglich synaptischer Erregbarkeit wurde gezeigt, dass die im Subikulum exprimierten Pyramidenzelltypen, „Burst“- und „Regular“-Zellen, an den CA1-Subikulum Synapsen neben der zellspezifischen Langzeitpotenzierung (LTP) auch eine niedrigfrequenzinduzierte, zellspezifische Langzeitdepression (LTD) zeigen, und dass diese über muskarinerge Acetylcholinrezeptoren, spannungsabhängige Kalziumkanäle und sowohl metabotrope als auch ionotrope Glutamatrezeptoren reguliert wird. Zusätzlich konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch Synapsen zwischen Entorhinalkortex (EC) und Subikulum LTP und LTD exprimieren, dabei wurde auch eine neue Form der heterosynaptischen Plastizität zwischen EC-Subikulum und CA1-Subikulum Synapsen beschrieben, welche auf GABAerger LTD beruht. Die beschriebenen Mechanismen sind für das Verständnis synaptischer Erregbarkeit an der hippocampalen Ausgangsstruktur essentiell.

Die Regulation der intrinsischen Erregbarkeit wurde an zwei Beispielen untersucht, dem $K_v7.5$ Kaliumkanal und dem Anoctamin2 Chloridkanal. Wir konnten erstmalig nachweisen, dass $K_v7.5$ im Gegensatz zu $K_v7.2$ und $K_v7.3$ vorwiegend die Erregbarkeit hemmender Neurone kontrolliert, und dass beim Funktionsverlust von $K_v7.5$ die GABAerge Inhibition erhöht ist. Da unspezifische K_v7 Kanalaktivatoren als Antikonvulsiva eingesetzt werden, haben die hier gewonnenen Erkenntnisse eine direkte klinische Relevanz.

Schließlich konnten wir mit Anoctamin2-Chloridkanal die molekulare Identität des kalziumaktivierten Chloridkanals in sensorischen olfaktorischen Neuronen aufklären und zeigen, dass entgegen der bis dahin gängigen Lehrmeinung der kalziumaktivierte Chloridkanal für die adäquate Funktion des Geruchsinns nicht zwingend notwendig ist.

Zusammenfassend ergänzen die Arbeiten durch Charakterisierung bis dahin unbekannter zellspezifischer, eingangsspezifischer und heterosynaptischer Effekte die bisherige Kenntnis über Mechanismen synaptischer Erregbarkeit und Plastizität im Subikulum. Ferner wird anhand der Funktionsanalyse von $K_v7.5$ und Anoctamin2 deutlich, dass Steigerung intrinsischer Erregbarkeit abhängig vom Zelltyp entgegengesetzte Effekte auf die Gesamterregbarkeit eines Netzwerks haben kann ($K_v7.5$) und dass selbst eine Abschwächung der intrinsischen Erregbarkeit nicht zwingend mit einem physiologischen Funktionsverlust einhergehen muss (Anoctamin2).

5. Literatur

Aggleton, J.P. and Christiansen, K. (2015). The subiculum: the heart of the extended hippocampal system. *Prog. Brain Res.* *219*, 65-82.

Amaral, D.G. and Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* *31*, 571-591.

Aoto, J., Foldy, C., Ilcus, S.M., Tabuchi, K., and Sudhof, T.C. (2015). Distinct circuit-dependent functions of presynaptic neurexin-3 at GABAergic and glutamatergic synapses. *Nat. Neurosci.* *18*, 997-1007.

Bashir, Z.I. (2003). On long-term depression induced by activation of G-protein coupled receptors. *Neurosci. Res.* *45*, 363-367.

Bean, B.P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 451-465.

Beck, H. and Yaari, Y. (2008). Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 357-369.

Behr, J., Gloveli, T., and Heinemann, U. (1998). The perforant path projection from the medial entorhinal cortex layer III to the subiculum in the rat combined hippocampal-entorhinal cortex slice. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 1011-1018.

Biervert, C., Schroeder, B.C., Kubisch, C., Berkovic, S.F., Propping, P., Jentsch, T.J., and Steinlein, O.K. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* *279*, 403-406.

Billig, G.M., Pal, B., Fidzinski, P., and Jentsch, T.J. (2011). Ca²⁺-activated Cl⁻ currents are dispensable for olfaction. *Nat. Neurosci.* *14*, 763-769.

Bliss, T.V. and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* *361*, 31-39.

Bloodgood, B.L. and Sabatini, B.L. (2008). Regulation of synaptic signalling by postsynaptic, non-glutamate receptor ion channels. *J. Physiol* *586*, 1475-1480.

Cho, K., Aggleton, J.P., Brown, M.W., and Bashir, Z.I. (2001). An experimental test of the role of postsynaptic calcium levels in determining synaptic strength using perirhinal cortex of rat. *J. Physiol* *532*, 459-466.

Chow, A., Erisir, A., Farb, C., Nadal, M.S., Ozaita, A., Lau, D., Welker, E., and Rudy, B. (1999). K(+) channel expression distinguishes subpopulations of parvalbumin- and somatostatin-containing neocortical interneurons. *J. Neurosci.* *19*, 9332-9345.

Christie,J.M. and Jahr,C.E. (2008). Dendritic NMDA receptors activate axonal calcium channels. *Neuron* 60, 298-307.

Cohen,I., Navarro,V., Clemenceau,S., Baulac,M., and Miles,R. (2002). On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 298, 1418-1421.

Currie,K.P., Wootton,J.F., and Scott,R.H. (1995). Activation of Ca(2+)-dependent Cl⁻ currents in cultured rat sensory neurones by flash photolysis of DM-nitrophen. *J. Physiol* 482 (Pt 2), 291-307.

Deadwyler,S.A. and Hampson,R.E. (2004). Differential but complementary mnemonic functions of the hippocampus and subiculum. *Neuron* 42, 465-476.

Fidzinski,P., Korotkova,T., Heidenreich,M., Maier,N., Schuetze,S., Kobler,O., Zuschratter,W., Schmitz,D., Ponomarenko,A., and Jentsch,T.J. (2015). KCNQ5 K(+) channels control hippocampal synaptic inhibition and fast network oscillations. *Nat. Commun.* 6, 6254.

Fidzinski,P., Shor,O., and Behr,J. (2008). Target-cell-specific bidirectional synaptic plasticity at hippocampal output synapses. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1111-1118.

Fidzinski,P., Wawra,M., Bartsch,J., Heinemann,U., and Behr,J. (2012). High-frequency stimulation of the temporoammonic pathway induces input-specific long-term potentiation in subicular bursting cells. *Brain Res.* 1430, 1-7.

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

Gabrieli,J.D., Brewer,J.B., Desmond,J.E., and Glover,G.H. (1997). Separate neural bases of two fundamental memory processes in the human medial temporal lobe. *Science* 276, 264-266.

Gloveli,T., Schmitz,D., Empson,R.M., and Heinemann,U. (1997). Frequency-dependent information flow from the entorhinal cortex to the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 78, 3444-3449.

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

Grishin,A.A., Benquet,P., and Gerber,U. (2005). Muscarinic receptor stimulation reduces NMDA responses in CA3 hippocampal pyramidal cells via Ca²⁺-dependent activation of tyrosine phosphatase. *Neuropharmacology* 49, 328-337.

Gu,Q. (2002). Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience* 111, 815-835.

Harney,S.C., Rowan,M., and Anwyl,R. (2006). Long-term depression of NMDA receptor-mediated synaptic transmission is dependent on activation of metabotropic glutamate receptors and is altered to long-term potentiation by low intracellular calcium buffering. *J. Neurosci.* *26*, 1128-1132.

Harris,E., Witter,M.P., Weinstein,G., and Stewart,M. (2001). Intrinsic connectivity of the rat subiculum: I. Dendritic morphology and patterns of axonal arborization by pyramidal neurons. *J. Comp Neurol.* *435*, 490-505.

Hartzell,H.C. (2008). Physiology. CaCl-ing channels get the last laugh. *Science* *322*, 534-535.

Hasselmo,M.E. (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* *16*, 710-715.

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

Ismailov,I., Kalikulov,D., Inoue,T., and Friedlander,M.J. (2004). The kinetic profile of intracellular calcium predicts long-term potentiation and long-term depression. *J. Neurosci.* *24*, 9847-9861.

Jentsch,T.J. (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *1*, 21-30.

Jeon,D., Song,I., Guido,W., Kim,K., Kim,E., Oh,U., and Shin,H.S. (2008). Ablation of Ca²⁺ channel beta3 subunit leads to enhanced N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long term potentiation and improved long term memory. *J. Biol. Chem.* *283*, 12093-12101.

Johnston, D. and Wu, M. S. *Foundations of Cellular Neurophysiology.* 1995. Cambridge Massachusetts, USA, MIT Press.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Kananura,C., Biervert,C., Hechenberger,M., Engels,H., and Steinlein,O.K. (2000). The new voltage gated potassium channel KCNQ5 and neonatal convulsions. *Neuroreport* *11*, 2063-2067.

Kandel, E., Schwartz, J., and Jessell, T. M. *Principles of Neural Science . 4th.* 1-7-2000. Mc Graw-Hill.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Kleene,S.J. (2008). The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia. *Chem. Senses* *33*, 839-859.

Klinger,F., Gould,G., Boehm,S., and Shapiro,M.S. (2011). Distribution of M-channel subunits KCNQ2 and KCNQ3 in rat hippocampus. *Neuroimage.* *58*, 761-769.

Kohler,C. (1986). Cytochemical architecture of the entorhinal area. *Adv. Exp. Med. Biol.* *203*, 83-98.

Kullmann,D.M., Erdemli,G., and Asztely,F. (1996). LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated signals: evidence for presynaptic expression and extrasynaptic glutamate spill-over. *Neuron* *17*, 461-474.

Kurahashi,T. and Yau,K.W. (1993). Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature* *363*, 71-74.

Li,H., Zhang,J., Xiong,W., Xu,T., Cao,J., and Xu,L. (2005). Long-term depression in rat CA1-subicular synapses depends on the G-protein coupled mACh receptors. *Neurosci. Res.* *52*, 287-294.

Lopes Da Silva,F.H., Witter,M.P., Boeijinga,P.H., and Lohman,A.H. (1990). Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev.* *70*, 453-511.

Lowe,G. and Gold,G.H. (1993). Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* *366*, 283-286.

Malenka,R.C. and Bear,M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* *44*, 5-21.

Maljevic,S. and Lerche,H. (2014). Potassium channel genes and benign familial neonatal epilepsy. *Prog. Brain Res.* *213*, 17-53.

Maljevic,S., Wuttke,T.V., Seeböhm,G., and Lerche,H. (2010). KV7 channelopathies. *Pflugers Arch.* *460*, 277-288.

Menendez,d.I.P., Suarez,F., and Pozo,M.A. (2003). Electrophysiological and morphological diversity of neurons from the rat subicular complex in vitro. *Hippocampus* *13*, 728-744.

Mesulam,M.M., Mufson,E.J., Wainer,B.H., and Levey,A.I. (1983). Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* *10*, 1185-1201.

Miledi,R. and Parker,I. (1984). Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes. *J. Physiol* *357*, 173-183.

Milenkovic,V.M., Brockmann,M., Stohr,H., Weber,B.H., and Strauss,O. (2010). Evolution and functional divergence of the anoctamin family of membrane proteins. *BMC. Evol. Biol.* *10*, 319.

Moosmang,S., Haider,N., Klugbauer,N., Adelsberger,H., Langwieser,N., Müller,J., Stieß,M., Marais,E., Schulla,V., Lacinova,L., Goebbels,S., Nave,K.A., Storm,D.R., Hofmann,F., and Kleppisch,T. (2005). Role of hippocampal Cav1.2 Ca²⁺ channels

in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *J. Neurosci.* *25*, 9883-9892.

Morgan,S.L. and Teyler,T.J. (2001). Electrical stimuli patterned after the theta-rhythm induce multiple forms of LTP. *J. Neurophysiol.* *86*, 1289-1296.

Naber,P.A. and Witter,M.P. (1998). Subicular efferents are organized mostly as parallel projections: a double-labeling, retrograde-tracing study in the rat. *J. Comp Neurol.* *393*, 284-297.

O'Mara,S.M., Commins,S., Anderson,M., and Gigg,J. (2001). The subiculum: a review of form, physiology and function. *Prog. Neurobiol.* *64*, 129-155.

Peters,H.C., Hu,H., Pongs,O., Storm,J.F., and Isbrandt,D. (2005). Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nat. Neurosci.* *8*, 51-60.

Pifferi,S., Dibattista,M., Sagheddu,C., Boccaccio,A., Al,Q.A., Ghirardi,F., Tirindelli,R., and Menini,A. (2009). Calcium-activated chloride currents in olfactory sensory neurons from mice lacking bestrophin-2. *J. Physiol* *587*, 4265-4279.

Pifferi,S., Pascarella,G., Boccaccio,A., Mazzatenta,A., Gustincich,S., Menini,A., and Zucchelli,S. (2006). Bestrophin-2 is a candidate calcium-activated chloride channel involved in olfactory transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 12929-12934.

Reisert,J., Bauer,P.J., Yau,K.W., and Frings,S. (2003). The Ca-activated Cl channel and its control in rat olfactory receptor neurons. *J. Gen. Physiol* *122*, 349-363.

Ren,M., Yoshimura,Y., Takada,N., Horibe,S., and Komatsu,Y. (2007). Specialized inhibitory synaptic actions between nearby neocortical pyramidal neurons. *Science* *316*, 758-761.

Rinke,I., Artmann,J., and Stein,V. (2010). ClC-2 voltage-gated channels constitute part of the background conductance and assist chloride extrusion. *J. Neurosci.* *30*, 4776-4786.

Schenzer,A., Friedrich,T., Pusch,M., Saftig,P., Jentsch,T.J., Grotzinger,J., and Schwake,M. (2005). Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K⁺ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *J. Neurosci.* *25*, 5051-5060.

Schneppenheim,R., Castaman,G., Federici,A.B., Kreuz,W., Marschalek,R., Oldenburg,J., Oyen,F., and Budde,U. (2007). A common 253-kb deletion involving VWF and TMEM16B in German and Italian patients with severe von Willebrand disease type 3. *J. Thromb. Haemost.* *5*, 722-728.

Schroeder,B.C., Cheng,T., Jan,Y.N., and Jan,L.Y. (2008). Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* *134*, 1019-1029.

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

Shouse,M.N., da Silva,A.M., and Sammaritano,M. (1996). Circadian rhythm, sleep, and epilepsy. *J. Clin. Neurophysiol.* *13*, 32-50.

Singh,N.A., Otto,J.F., Dahle,E.J., Pappas,C., Leslie,J.D., Vilaythong,A., Noebels,J.L., White,H.S., Wilcox,K.S., and Leppert,M.F. (2008). Mouse models of human KCNQ2 and KCNQ3 mutations for benign familial neonatal convulsions show seizures and neuronal plasticity without synaptic reorganization. *J. Physiol* *586*, 3405-3423.

Soldovieri,M.V., Miceli,F., and Tagliatela,M. (2011). Driving with no brakes: molecular pathophysiology of Kv7 potassium channels. *Physiology*. (Bethesda.) *26*, 365-376.

Staff,N.P., Jung,H.Y., Thiagarajan,T., Yao,M., and Spruston,N. (2000). Resting and active properties of pyramidal neurons in subiculum and CA1 of rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* *84*, 2398-2408.

Stephan,A.B., Shum,E.Y., Hirsh,S., Cygnar,K.D., Reisert,J., and Zhao,H. (2009). ANO2 is the cilia calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *106*, 11776-11781.

Stewart,M. (1997). Antidromic and orthodromic responses by subicular neurons in rat brain slices. *Brain Res.* *769*, 71-85.

Tamamaki,N. and Nojyo,Y. (1993). Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus* *3*, 471-480.

Tzingounis,A.V., Heidenreich,M., Kharkovets,T., Spitzmaul,G., Jensen,H.S., Nicoll,R.A., and Jentsch,T.J. (2010). The KCNQ5 potassium channel mediates a component of the afterhyperpolarization current in mouse hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *107*, 10232-10237.

Volpicelli,L.A. and Levey,A.I. (2004). Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog. Brain Res.* *145*, 59-66.

Watanabe,H., Nagata,E., Kosakai,A., Nakamura,M., Yokoyama,M., Tanaka,K., and Sasai,H. (2000). Disruption of the epilepsy KCNQ2 gene results in neural hyperexcitability. *J. Neurochem.* *75*, 28-33.

Wickenden,A.D., Krajewski,J.L., London,B., Wagoner,P.K., Wilson,W.A., Clark,S., Roeloffs,R., McNaughton-Smith,G., and Rigdon,G.C. (2008). N-(6-chloro-pyridin-3-yl)-3,4-difluoro-benzamide (ICA-27243): a novel, selective KCNQ2/Q3 potassium channel activator. *Mol. Pharmacol.* *73*, 977-986.

Witter,M.P. and Groenewegen,H.J. (1990). The subiculum: cytoarchitectonically a simple structure, but hodologically complex. *Prog. Brain Res.* 83, 47-58.

Witter,M.P., Wouterlood,F.G., Naber,P.A., and Van,H.T. (2000). Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 911, 1-24.

Wozny,C., Kivi,A., Lehmann,T.N., Dehnicke,C., Heinemann,U., and Behr,J. (2003). Comment on "On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro". *Science* 301, 463.

Wozny,C., Maier,N., Fidzinski,P., Breustedt,J., Behr,J., and Schmitz,D. (2008a). Differential cAMP signaling at hippocampal output synapses. *J. Neurosci.* 28, 14358-14362.

Wozny,C., Maier,N., Schmitz,D., and Behr,J. (2008b). Two different forms of long-term potentiation at CA1-subiculum synapses. *J. Physiol* 586, 2725-2734.

Yamada,M. and Welty,T.E. (2012). Ezogabine: an evaluation of its efficacy and safety as adjunctive therapy for partial-onset seizures in adults. *Ann. Pharmacother.* 46, 1358-1367.

Zeineh,M.M., Engel,S.A., Thompson,P.M., and Bookheimer,S.Y. (2003). Dynamics of the hippocampus during encoding and retrieval of face-name pairs. *Science* 299, 577-580.

Zifkin,B.G. and Kasteleijn-Nolst,T.D. (2000). Reflex epilepsy and reflex seizures of the visual system: a clinical review. *Epileptic. Disord.* 2, 129-136.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während meiner wissenschaftlichen Laufbahn als Mentoren, Gruppenleiter oder einfach nur Berater begleitet haben, allen voran sind hier Prof. Thomas Jentsch, Prof. Martin Holtkamp, Prof. Joachim Behr und Prof. Uwe Heinemann zu nennen. Die genannten dienten mir als Vorbild wissenschaftlichen Denkens und Arbeitens.

Weiterhin gilt mein Dank allen wissenschaftlichen Kollegen und Kolleginnen, mit denen ich gemeinsam wissenschaftliche Projekte betreut habe und die wesentlich zum Erfolg dieser Projekte beigetragen haben.

Schließlich gilt der größte Dank meiner Familie, die einen Ruhepol nicht nur in stressigen Zeiten darstellte. Insbesondere meiner Ehefrau möchte ich nicht nur für Ihr Verständnis und Ihre Geduld danken, sondern vor allem für Ihre nicht abreißende Begeisterung und Diskussionen über wissenschaftliche Themen und Zusammenhänge jenseits ihres eigenen Forschungsfeldes.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

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

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

10. Dezember 2015

.....
Unterschrift