

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

DISSERTATION

**Einfluß glialer Background-Kalium-Kanäle auf die Kalium-
Homöostase im gesunden und epileptischen Hippocampus**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dennis Päsler

aus Neuruppin

Datum der Promotion: 27.02.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....I

AbbildungsverzeichnisIV

Tabellenverzeichnis.....VI

Abkürzungsverzeichnis VII

AbstraktIX

AbstractXI

1. Einleitung..... 1

 1.1. Epilepsie, Temporallappenepilepsie 1

 1.2. Tiermodelle der Temporallappenepilepsie 2

 1.3. Regulation der extrazellulären Kaliumkonzentration..... 4

 1.4. Hippocampus5

 1.5. Two-pore-domain-Kalium-Kanäle im Hippocampus..... 11

 1.6. Fragestellung 13

2. Material und Methoden..... 15

 2.1. Untersuchtes Gewebe 15

 2.1.1. Kontrolltiere: 15

 2.1.2. Pilocarpin-behandelte Tiere: 15

 2.1.3. Resezierter Hippocampus von Patienten mit pharmakoresistenter Temporal-
lappenepilepsie: 16

 2.2. Präparation der Hirnschnitte 17

 2.2.1. Kontrolltiere: 17

 2.2.2. Pilocarpin-behandelte Tiere: 17

 2.2.3. Resezierter Hippocampus von Patienten mit pharmakoresistenter Temporal-
lappenepilepsie: 17

 2.3. Versuchsaufbau und Messungen 18

 2.4. Versuchsprotokolle 22

 2.4.1. Versuchsschema I: 22

2.4.2. Versuchsschema II:.....	23
2.5. Auswertung.....	23
3. Ergebnisse	26
3.1. Untersuchungen am Kontrollgewebe (Wistar-Ratten)	27
3.1.1. Bestimmung des Einflusses von TWIK-1, TASK-1, TASK-2, TASK-3, TREK-1 und TREK-2 durch Blockade mit Quinin.....	27
3.1.1.1. 200 μ M Quinin vermindern den neuronalen Ausstrom von K^+ und vermindern geringfügig die gliale K^+ -Aufnahme	28
3.1.1.2. 500 μ M Quinin supprimieren den neuronalen Ausstrom von K^+ und vermindern die gliale K^+ -Aufnahme deutlich.....	34
3.1.3. Bestimmung des Einflusses von TWIK-1, TASK-1, TASK-2, TREK-1 und TREK-2 durch Blockade mit Quinidin	37
3.1.3.1. Die Wirkung von 500 μ M Quinidin unterschied sich nicht von der von 500 μ M Quinin.....	37
3.1.4. Bestimmung des Einflusses von TASK-1, TASK-2, TASK-3 und TRESK durch Blockade mit Bupivacain	38
3.1.4.1. 200 μ M Bupivacain minderten den neuronalen Ausstrom von K^+ , beeinflußten die gliale K^+ -Aufnahme jedoch nicht.....	38
3.1.5. Die Minderung von neuronalem K^+ -Ausstrom durch K2P-Kanal-Inhibitoren und 2 mM Ba^{2+} ist auch nachweisbar, wenn Ba^{2+} zuerst appliziert wird.....	44
3.2. Statistische Evaluation der Differenzen zwischen den K2P-Blocker-Wirkungen	49
3.3. 200 μ M Quinin minderten den neuronalen K^+ -Ausstrom im Gewebe des Epilepsie- modells, beeinflußten die gliale K^+ -Aufnahme jedoch nicht	52
3.4. Im resezierten Hippocampus epilepsiechirurgischer Patienten minderten 200 μ M Quinin ebenfalls den Ausstrom von K^+ aus den Neuronen, während die gliale K^+ - Aufnahme wenig beeinträchtigt wurde	56
3.5. Vergleich der Wirkung von 200 μ M Quinin auf das Stratum pyramidale der CA1 von Kontrollgewebe, Gewebe eines Epilepsiemodells und resezierten Epilepsie- gewebes	60

Gliederung

4. Diskussion.....	65
4.1. Rekapitulation der Fragestellung.....	65
4.2. Zusammenfassung der Befunde.....	66
4.3. Methodenkritik	67
4.4. Ergebnisse im Kontrollgewebe und Schlußfolgerungen	68
4.4.1. Beteiligung von K2P-Kanälen an der neuronalen Kaliumfreisetzung	69
4.4.2. Beitrag der K2P-Kanäle zur glialen Kaliumaufnahme und zum spatial K ⁺ - buffering	71
4.5. Wirkungen auf die epileptischen Gewebe	73
4.6. Schlußfolgerungen.....	76
5. Literaturverzeichnis	77
Lebenslauf	88
Publikationsliste	90
Veröffentlichungen.....	90
Kongreßteilnahme mit Posterpräsentation.....	90
Beteiligung an Postern oder Vorträgen von Kollegen.....	91
Eidesstattliche Versicherung	92
Danksagung.....	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.: Histologische Präparate des Hippocampus einer Kontrollratte und einer Pilokarpin-behandelten epileptischen Ratte3

Abbildung 1.2.: histologische Präparate von humanem und Hippocampus der Ratte7

Abbildung 1.3.: Hippocampus und umgebende Strukturen in schräger Ansicht von dorsal und rostral8

Abbildung 1.4.: Schema der trisynaptischen Verschaltung am Beispiel eines Horizontalschnitts des Hippocampus der Ratte 11

Abbildung 1.5.: Schematische Darstellung einer Untereinheit eines Two-pore-domain-Kaliumkanals 13

Abbildung 2.1.: Schematischer Aufbau der genutzten Interface-Kammer im Querschnitt 18

Abbildung 2.2.: Positionierung der Stimulations- und der verklebten Iontophorese-/Meßelektroden in der CA1 sowie Darstellung der gemessenen Amplituden der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[K^+]_o$), der langsamen Feldpotentialänderungen (IFP) und der Summenaktionspotentiale (SAP) am Beispiel eines Hirnschnittes vom Kontrollgewebe (Wistar-Ratte).....21

Abbildung 3.1.A.:Effekt von 200 μ M Quinin auf durch repetitive Reizung ausgelöste Anstiege der $[K^+]_o$ und begleitender IFP im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten.....29

Abbildung 3.1.B.:Effekt von 200 μ M Quinin auf die Summenaktionspotentiale der Pyramidenzellen in der CA1 normaler Ratten nach Stimulation im Alveus30

Abbildung 3.1.C.:Effekt von 200 μ M Quinin auf durch Iontophorese ausgelöste Anstiege der $[K^+]_o$ und der IFP im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten31

Abbildung 3.1.D.:graphische Darstellung der Effekte von 200 μ M Quinin auf die Amplituden der SAP auf Einzelstimulus und die Anstiege der $[K^+]_o$ während repetitiver Reizung und iontophoretischer Kaliumapplikation..... 33

Abbildung 3.2.: Effekt von 500 μ M Quinin auf durch repetitive Reizung und Iontophorese induzierte Anstiege der $[K^+]_o$, begleitender IFP und der SAP im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten36

Abbildung 3.3.: Effekt von 200 μ M Bupivacain auf durch repetitive Reizung und Iontophorese induzierte Anstiege der $[K^+]_o$, begleitender IFP und SAP im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten41

Gliederung

Abbildung 3.4.:	Effekt von 2 mM Ba ²⁺ gefolgt von 500 µm Quinin auf durch repetitive Reizung und Iontophorese induzierte Anstiege der [K ⁺] _o , begleitender IFP und der SAP im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten	46
Abbildung 3.5.:	Effekt von 200 und 500 µM Quinin, 500 µM Quinidin und 200 µM Bupivacain auf die Anstiege der [K ⁺] _o und die SAP im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten	51
Abbildung 3.6.:	Effekt von 200 µM Quinin auf durch repetitive Reizung und Iontophorese induzierte Anstiege der [K ⁺] _o , begleitender IFP und SAP im Stratum pyramidale der CA1 Pilocarpin-behandelter Ratten	55
Abbildung 3.7.:	Effekt von 200 µM Quinin auf durch repetitive Reizung und Iontophorese induzierte Anstiege der [K ⁺] _o , begleitender IFP und SAP im Stratum pyramidale der CA1 humanen, epileptischen Hippocampusgewebes	59
Abbildung 3.8.:	Effekt von 200 µM Quinin auf die Anstiege der [K ⁺] _o und die SAP im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten, Pilocarpin-behandelter Ratten und humanen, epileptischen Hippocampusgewebes	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1.: Vergleich der historischen und aktuellen Terminologie des Hippocampus (nach El-Falougy 2006)6

Tabelle 2.1.: Eigenschaften der operierten Patienten 16

Tabelle 3.1.: Wirkungen der K2P-Kanal-Blocker auf die durch repetitive Reizung induzierten Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration, der langsamen Feldpotentialänderungen und der maximalen Summenaktionspotentiale sowie der iontophoretisch verursachten Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration und der langsamen Feldpotentialänderungen im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten43

Tabelle 3.2.: Wirkungen des K2P-Kanal-Blockers Quinin auf die durch repetitive Reizung induzierten Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration, der langsamen Feldpotentialänderungen und der Summenaktionspotentiale sowie der iontophoretisch verursachten Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration und der langsamen Feldpotentialänderungen im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten bei vorheriger Ba²⁺-Gabe48

Tabelle 3.3.: Wirkungen von 200 µM Quinin auf die durch repetitive Reizung induzierten Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration, der langsamen Feldpotentialänderungen und der maximalen Summenaktionspotentiale sowie der iontophoretisch verursachten Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration und der langsamen Feldpotentialänderungen im Stratum pyramidale der CA1 von Kontrollgewebe, Gewebe eines Epilepsiemodells und epileptischem humanen Gewebe 64

Abkürzungsverzeichnis

[K ⁺] _o	extrazelluläre Kaliumkonzentration
2-APV	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
4-AP	4-Aminopyridin
ACSF	artifizielle cerebro-spinale Flüssigkeit
AED	antiepileptic drugs = Antiepileptika
AHS	Ammonshornsklerose
Alv	Alveus des Hippocampus
AP	Aktionspotential
Ba ²⁺	Barium
CA	Cornu ammonis des Hippocampus (Ammonshorn)
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion
EC	entorhinaler Cortex
EEG	Elektroencephalogramm
GD	Gyrus dentatus des Hippocampus
GFAP	Saures Gliafaserprotein (Abk. von engl. Glial fibrillary acidic protein)
ILAE	International League Against Epilepsy
ionto	iontophoretisch
IPI	initial precipitating injuries ((meist frühkindliche) schädigende Ereignisse)
K2P	two-pore-domain-Kanäle
KCNK	two-pore-domain-Kanäle
Kir	einwärtsrichtende K ⁺ -Kanäle (K ⁺ -inward rectifier)
Kva	spannungsabhängige K ⁺ -Kanäle (K ⁺ -voltage activated)

Gliederung

IFP	langsame Feldpotentialänderungen
LTP	Langzeitpotenzierung (long term potentiation)
MF	Moosfasern (mossy fibers)
mM	millimolar; mmol/l
mV	milli Volt
PP	perforant Path
SAP	Summenaktionspotential(e)
SC	Schaffer-Kollateralen
stim	stimuliert
Sub	Subiculum des Hippocampus
TALK	<u>T</u> WIK-related <u>a</u> lkaline pH-activated <u>K</u> -channel
TASK	<u>T</u> WIK-related <u>a</u> cid <u>s</u> ensitive <u>K</u> -channel
TEA	Tetraethylammoniumion
THIK	<u>t</u> andem pore domain <u>h</u> alothane <u>i</u> nhibited <u>K</u> -channel
TMD	transmembranäre Domäne
TRAAK	<u>T</u> WIK-related <u>a</u> rachidonic <u>a</u> cid-activated <u>K</u> -channel
TREK	<u>T</u> WIK-related <u>K</u> -channel
TRESK	<u>T</u> WIK-related <u>s</u> pinal cord <u>K</u> -channel
TWIK	<u>T</u> andem pore domain in a <u>W</u> eak <u>I</u> nward rectifying <u>K</u> -channel
ZNS	Zentralnervensystem

Abstrakt

Bei dem häufig vorkommenden neurologischen Krankheitsbild der Epilepsie steigt die fokale extrazelluläre Kaliumkonzentration auf pathologisch hohe Werte an. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch immer nicht komplett erklärt. Hier rückten die schon in den 1950er Jahren vorhergesagten und in den letzten Jahren klonierten und intensiver untersuchten two-pore-domain-Kalium-Kanäle (K2P-Kanäle) in den wissenschaftlichen Fokus. Ein Beitrag dieser Kanäle zur Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials der Glia ist bereits belegt. In dieser Studie sollte der Beitrag der K2P-Kanäle zur Kalium-Homöostase im gesunden und epileptischen Hippocampus bestimmt werden.

Die Messungen wurden in der Pyramidenzellschicht der Regio I des Ammonshorns (CA1) akuter Hirnschnitte des Hippocampus von Kontrolltieren (Wistar-Ratten), einem Epilepsiemodell (Pilocarpin-behandelte Wistar-Ratten) und humanem epileptischen Gewebe (Hippocampusteilresektate operierter Patienten mit Temporallappenepilepsie) durchgeführt. Unter Blockade synaptischer Transmission wurden Anstiege der extrazellulären Kaliumkonzentration durch antidrom aktivierte Neurone (repetitive Reizung im Alveus) bzw. Kaliumiontophorese induziert und die Wirkungen verschiedener K2P-Kanal-Blocker (Quinin, Quinidin, Bupivacain) auf diese Anstiege untersucht. Zusätzlich wurden die Wirkungen der Blocker auf die Summenaktionspotentiale und die den Kaliumanstieg begleitenden langsamen Feldpotentialänderungen betrachtet. Quinin bzw. Quinidin inhibieren TWIK-1-, TASK-1-, TASK-2- und TREK-1-Kanäle, Bupivacain inhibiert TASK-1-, TASK-2-, TASK-3- und TRESK-Kanäle.

Im Kontrollgewebe minderte Quinin konzentrations- und zeitabhängig die neuronale Kaliumfreisetzung und die gliale Kaliumaufnahme. Die neuronale Aktivität blieb nahezu unbeeinflusst. Quinidin zeigte die gleichen Wirkungen wie Quinin. Die Effekte der K2P-Kanal-Blocker wurden bei Co-Applikation mit Barium, einem potenten Blocker einwärts gerichteter Kalium-Kanäle (Kir-Kanäle), deutlich verstärkt, wobei die zusätzliche Reduktion des neuronalen Kaliumausstroms als Folge einer drastischen Reduktion der reizinduzierten neuronalen Aktivität angesehen werden muß. Bupivacain blockierte den neuronalen Kaliumausstrom und die neuronale Aktivität, hatte aber keine Wirkung auf die gliale Kaliumaufnahme.

Im epileptischen Gewebe wurde der Kaliumausstrom aus Neuronen durch Quinin (200 μ M) ebenfalls gemindert, die gliale Kaliumaufnahme jedoch nicht relevant beeinflusst. Die Co-Applikation von Barium bewirkte eine starke Verminderung der reizinduzierten Aktivität und dadurch eine zusätzliche Verminderung des neuronalen Kaliumausstroms. Die ebenfalls sicht-

Abstrakt

bare Zunahme des iontophoretisch induzierten Kaliumanstiegs zeigt eine Verminderung der glialen Kaliumaufnahme durch Hemmung von Kir-Kanälen an.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen annehmen, daß die K₂P-Kanäle TWIK-1 und TREK-1 in allen untersuchten Geweben einen beachtlichen Anteil des durch antidrome Reizung induzierten neuronalen Kaliumausstroms vermitteln. Darüberhinaus sind TWIK-1- und TREK-1-Kanäle an der glialen Kaliumpufferung im Hippocampus von Kontrollratten beteiligt, jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß als Barium-sensitive Kir-Kanäle. Im epileptischen Hippocampus erfolgt die gliale Kaliumpufferung nur über Kir-Kanäle.

Abstract

In the frequent neurological disease of epilepsy, focal extracellular potassium concentration in the brain increases to pathological values. The underlying mechanisms are not yet fully understood. Two-pore-domain potassium channels (K2P channels), postulated in the 1950s and cloned and investigated in the past years, came into scientific view. A contribution of these channels on keeping membrane's resting potential of glial cells is proven. In the present study, the contribution of K2P channels on potassium homeostasis in healthy and epileptic hippocampus should be investigated.

Measurements were done in the pyramidal cell layer of Cornu ammonis regio I (CA1) in acute slices from hippocampus of control animals (Wistar rats), epilepsy model (pilocarpine treated Wistar rats) and human epileptic tissue (resected hippocampus of operated patients suffering from temporal lobe epilepsy). Rises of extracellular potassium concentration were induced by antidromically activated neurons (repetitive alvear stimulation) and potassium iontophoresis under blocked synaptic transmission. Effects of K2P channel blockers (quinine, quinidine, bupivacaine) on such rises were investigated. Additionally, effects of these blockers on summarized action potentials and slow field potential changes were considered. Quinine or quinidine inhibit TWIK-1-, TASK-1-, TASK-2- and TREK-1-channels, bupivacaine inhibits TASK-1-, TASK-2-, TASK-3- and TRESK-channels.

In control tissue quinine reduced neuronal potassium release and glial potassium uptake in a time and concentration dependent manner. Neuronal activity was nearly unaltered. Quinidine had similar effects as quinine. The effects of these K2P blockers were clearly increased under co-application with barium, a potent blocker of inward rectifying potassium channels (Kir channels). The additionally reduced neuronal potassium efflux must be seen as an effect of a strong reduction of stimulus induced neuronal activity. Bupivacaine blocked both, neuronal potassium efflux and neuronal activity, but had no effect on glial potassium uptake.

In epileptic tissue quinine (200 μ M) also reduced neuronal potassium efflux but glial potassium uptake was not significantly altered. Co-application of barium caused a strong reduction of stimulus induced activity and therefore an additional reduction of neuronal potassium efflux. The increase of iontophoretically induced potassium rise shows a reduction of glial potassium uptake by inhibition of Kir channels.

Abstract

The results of this study suggest that K₂P channels TWIK-1 and TREK-1 mediate a considerable part of stimulus induced neuronal potassium efflux in all investigated tissues. TWIK-1- and TREK-1-channels contribute to glial potassium buffering in hippocampus of control rats but clearly less than barium sensitive Kir channels. In epileptic hippocampus, glial potassium buffering is mainly carried by Kir channels.

1. Einleitung

1.1. Epilepsie, Temporallappenepilepsie

Die Epilepsie ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen mit einer Prävalenz in Deutschland von 0,7 – 0,8 % und einer Inzidenz von Neuerkrankungen von ca. 46/100.000. Man unterscheidet zwischen generalisierten und fokalen Epilepsien, wobei letztere noch in solche mit und ohne Bewußtseins Einschränkungen oder Entwicklung zu einem bilateralen Anfall unterteilt werden (AWMF-Leitlinie 2012). Die häufigste Form der fokalen Epilepsie ist mit einem Anteil von 80 – 90 % die Temporallappenepilepsie. Diese äußert sich im Anfall typischerweise in einer vorangehenden Aura, der eine zunehmende Bewußtseinsstrübung, orale Automatismen (Kauen/Schmatzen) und schließlich vegetative Symptome (Speichelfluß, Mydriasis und Rötung oder Blässe des Gesichts) folgen. Zumeist besteht eine Amnesie für den Anfall, an die einleitende Aura können sich viele Betroffene jedoch erinnern. Histologisch besteht bei einem Großteil der Patienten mit Temporallappenepilepsie eine Ammonshornsklerose regional unterschiedlichen Ausmaßes (ca. 81 % in einer aktuellen Studie operierter Patienten (Blümcke et al. 2007)). Dieser Befund konnte früher nur post mortem oder postoperativ erhoben werden, inzwischen ist eine entsprechende Diagnose aufgrund der besseren Bildgebung mittels MRT auch präoperativ möglich. Unklar ist aber weiterhin, ob die Sklerose ihrerseits Ursprung oder Folge der Epilepsie ist. Ursächlich vermutet man bei einem Großteil der Patienten ein oder mehrere, häufig frühkindliche, schädigende Ereignisse (IPI = initial precipitating injuries) wie Fieberkrämpfe, Hypoxie, komplizierter Geburtsvorgang, Schädel-Hirn-Trauma und/oder Enzephalitiden.

Zunehmende neuronale Aktivität führt zu einer Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[K^+]_o$). Während eines epileptischen Anfalls werden Werte bis zu 12 mM gemessen (Heinemann und Lux 1977). Diese Anstiege konnten unter Anoxie oder „spreading depression“ sogar 50 mM und mehr erreichen (Perez-Pinzon et al. 1995; Kraig und Nicholson 1978). Andererseits kann die erhöhte $[K^+]_o$ die neuronale Erregbarkeit noch steigern und somit wiederum zur Ausbreitung und/oder Auslösung epileptischer Aktivität beitragen (Yaari et al. 1986).

Therapeutisch wird nach entsprechender Diagnostik mit einer Medikation begonnen. In Deutschland sind über 20 Antiepileptika (AED = antiepileptic drugs) zugelassen, wovon die typischen zur Dauerbehandlung genutzten Medikamente Carbamazepin, Gabapentin, Lamotrigin, Levetiracetam, Oxcarbazepin, Phenobarbital, Phenytoin, Topiramid und Valproinsäure enthalten. Findet sich ein epileptogener Focus (benigner oder maligner Tumor, Gefäßmiß-

bildung, Dysplasie), ist häufig eine Resektion desselben indiziert. Eine begleitende Medikation kann dennoch nötig sein. Trotz der großen Bandbreite an AED kommt es bei den Epilepsien in bis zu einem Drittel aller Fälle zu einer Pharmakoresistenz (Kwan und Brodie 2002). Diese ist nach der ILAE (International League Against Epilepsy) definiert als fehlendes Ansprechen auf mindestens 2 gut vertragene, in ausreichender Dosis als Mono- oder Kombinationstherapie gegebene Standard-Antiepileptika (Kwan et al. 2010). Insbesondere dann sollte die Möglichkeit einer operativen Therapie in einem Epilepsiezentrum geprüft werden, da für pharmakoresistente Temporallappenepilepsien mehrere Studien mit hoher Erfolgsrate vorliegen. Zum Erreichen von Anfallsfreiheit oder -reduktion erfolgt eine selektive Amygdalo-Hippocampektomie und/oder Teilresektion des Temporallappens. In einer randomisierten Studie (Vergleich weiterer medikamentöser gegen operative Therapie) erreichten die operierten Teilnehmer ein Jahr postoperativ eine Freiheitsrate an bewußtseinseinschränkenden Anfällen von 64 % (Wiebe et al. 2001; durchschnittliche Epilepsiedauer 21,2 Jahre). In einer retrospektiven Studie 178 operierter Patienten zeigte sich sogar eine deutliche Besserung in 85 % der Fälle innerhalb eines Jahres post-OP (Engel-Grad I & II in Blümcke et al. 2007; durchschnittliche Epilepsiedauer 23,1 Jahre). Seit längerem wird schon über eine frühzeitige operative Therapie debattiert, auch hier gibt es vielversprechende Ergebnisse (Engel et al. 2012). Neben der histologischen Aufarbeitung bieten sich diese Resektate für die weitere Erforschung und elektrophysiologische Untersuchungen der (Temporallappen-)Epilepsie an. Da die Anzahl der Operationen begrenzt ist und auch ethische Probleme bestehen, waren und sind Tiermodelle und -experimente notwendig.

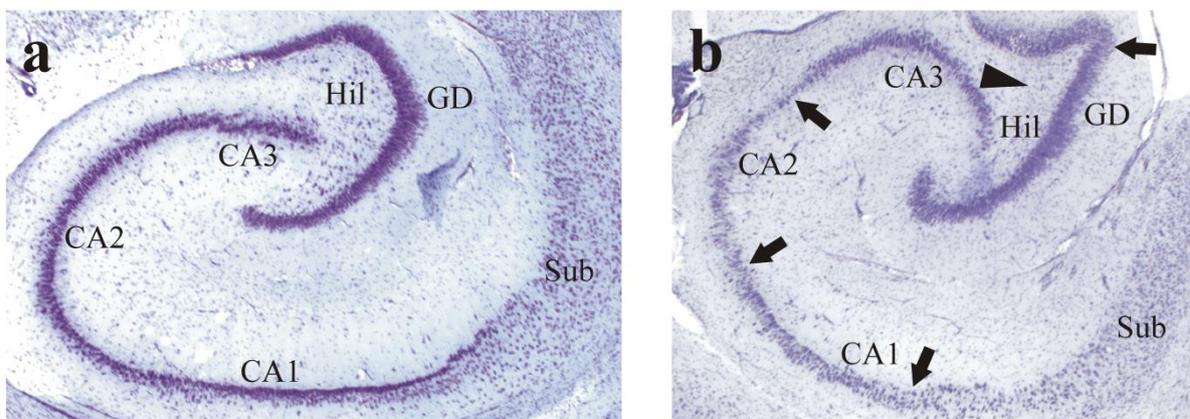
1.2. Tiermodelle der Temporallappenepilepsie

Für die Eignung zur Erforschung bestimmter Erkrankungen sollten die (Tier-)Modelle für Epilepsie gewisse Voraussetzungen bzw. Bedingungen erfüllen (Sarkisian 2001): Ähnlichkeit der epileptischen Anfälle in klinischer Erscheinung zu denen beim Menschen, begleitende paroxysmale Aktivität der Anfälle im EEG, ähnliche Ätiologie und ähnliche (Patho-)Morphologie. Diese Bedingungen werden durch die chronischen Post-Status-epilepticus-Modelle durch Kainat- oder Pilokarpin-Injektion oder das Kindling erfüllt. Demgegenüber gibt es noch akute Krampfmodelle. Weiterhin können die chronischen Modelle noch in genetische (idiopathische) und erworbene (symptomatische) unterschieden werden.

Beim Kainat-Modell (Ben-Ari 1985) entwickelt sich kurz nach intrathekaler oder intraperitonealer Injektion ein Status epilepticus, der dem IPI entspricht. Nach einer Latenzzeit von

mehreren Wochen („stille Periode“ = „silent period“) bilden sich dann spontane, wiederkehrende, epileptische Anfälle unterschiedlicher Frequenz aus. Nach gleichem Muster entwickeln sich ein Status epilepticus und nach der „silent period“ auch die wiederkehrenden spontanen Anfälle nach intraperitonealer Injektion von Pilokarpin (Turski et al. 1983). Beiden Modellen gemein sind die Ammonshornsklerose und der Neuronenzellverlust (Abbildung 1.1.) im Ammonshorn.

Abbildung 1.1.: Histologische Präparate des Hippocampus einer Kontrollratte (a) und einer Pilokarpin-behandelten epileptischen Ratte (b)



Sowohl im Ammonshorn als auch im Gyrus dentatus erkennt man im Epilepsiemodell (Pilokarpin-behandelte Ratte) deutlich die Verminderung und Auflockerung der Neuronenzellschicht (Pyramidenzellen, Körnerzellen, Pfeile), im Bereich des Hilus ist die Minderung der Interneurone nur andeutungsweise zu erkennen (Pfeilspitze), Sub = Subiculum, GD = Gyrus dentatus, CA1 = Cornu ammonis Regio I, CA2 = Cornu ammonis Regio II, CA3 = Cornu ammonis Regio III, Alv = Alveus, Hil = Hilus, Cresylviolett färbung, (Bilder zur Verfügung gestellt von Fr. Dr. Marleisje Njunting)

Beim Kindling (Goddard et al. 1969) werden mittels einer intraparenchymatös implantierten Elektrode Strompulse mit ca. 100 Hz für 1 s repetitiv appliziert, wodurch epileptische Antworten provoziert werden. Diese verstärken sich im Zeitverlauf und nach ca. 20 – 30 Reizwiederholungen werden zuverlässig epileptische Anfälle mit sekundärer Generalisierung ausgelöst. Dieser Zustand bleibt dann über Monate bis Jahre stabil. Für die Initiierung spontaner epileptischer Anfälle ist jedoch eine deutlich erhöhte Anzahl an Stimulationssitzungen notwendig.

Das Kindling-Modell nimmt eine Sonderstellung ein, da einerseits eine Post-Status-epilepticus-Epilepsie mit entsprechender Symptomatik und Morphologie (spontane Anfälle, Ammonshornsklerose, Progression der Erkrankung), andererseits jedoch auch eine Epilepsie ohne IPI und ohne Sklerose induziert werden können.

1.3. Regulation der extrazellulären Kaliumkonzentration

Im zentralen Nervensystem (ZNS) führt neuronale Aktivität, gleich ob physiologisch oder pathologisch wie im epileptischen Anfall, zur Anhäufung von Kaliumionen im Extrazellulärraum (Heinemann und Lux 1975; Lux und Neher 1973). Die Mechanismen, die der Kaliumfreisetzung aus aktivierten Neuronen zugrunde liegen, sind noch immer nicht komplett geklärt. Klassische Kaliumkanalblocker wie Tetraethylammonium (TEA) und 4-Aminopyridin (4-AP) hatten praktisch keinen Effekt auf die durch antidrome Stimulation im Alveus ausgelösten Anstiege der $[K^+]_o$ in der CA1 unter Blockung synaptischer Transmission (Jones und Heinemann 1987). Dieser Befund stützt die Vermutung, daß Kaliumströme durch „leak“-Kaliumkanäle bzw. two-pore-domain-Kaliumkanäle (K2P-Kanäle) in neuronalem Kaliumausstrom involviert sind (Lesage und Lazdunski 2000).

Zur Wiederherstellung der ursprünglich niedrigeren Konzentration dienen mehrere Mechanismen. Zum einen die physikalische Diffusion, wobei die Ionen ihrem Konzentrationsgradienten folgend im Extrazellulärraum verteilt werden, zum anderen aktive und passive Transportmechanismen (Kofuji und Newman 2004) in die Zellen (sowohl Neuronen als auch Astrozyten). Zu den aktiven Transportmechanismen gehören die Na^+/K^+ -ATPase, bei hoher $[K^+]_o$ der K^+/Cl^- -Co-Transporter (Payne 1997) und der $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Co-transporter. Bei den passiven Transportmechanismen ist hauptsächlich die Gruppe der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle (Kir = K inward rectifier) zu nennen. Nach Einstrom der Kaliumionen in Gliazellen erfolgt eine Umverteilung in deren Syncytium. Dies wurde von Orkand et al. 1966 „spatial buffering“ bezeichnet. Dabei werden Astrozyten durch die lokale Anhäufung von Kalium depolarisiert (Ransom und Goldring 1973), diese Depolarisation breitet sich dann zu entfernteren Kompartimenten aus, was zu räumlich unterschiedlichen Gradienten zwischen dem Membranpotential und dem Kaliumgleichgewichtspotential führt und die Kaliumaufnahme in Astrozyten an Orten hoher $[K^+]_o$ und die Kaliumfreisetzung an Orten mit niedriger $[K^+]_o$ unterhält. Hier konnten Wallraff et al. (2006) beweisen, daß diese Vorgänge sowohl durch Gap-junction-abhängige als auch Gap-junction-unabhängige Mechanismen verstärkt werden.

Wie bereits erwähnt, ist die Kaliumaufnahme in Astrozyten durch verschiedene Mechanismen vermittelt (siehe auch Walz 2000). Schnelle und große Effekte auf das extrazelluläre Kaliumgleichgewicht begründen sich hierbei auf die Kaliumaufnahme durch Ba^{2+} -sensitive Kaliumkanäle (Jauch et al. 2002). Dies sind Kir-Kanäle (Ransom und Sontheimer 1995; Sontheimer und Waxman 1993), hier insbesondere der Kir4.1 (Butt und Kalsi 2006; Kofuji und Newman 2004; Seifert et al. 2009). Gestützt wird diese Vermutung durch mehrere Studien, die eine Verminderung der glialen Pufferkapazität implizieren, wenn die Kir-Kanäle herunterreguliert (Binder und Steinhäuser 2006; Hinterkeuser et al. 2000; Kivi et al. 2000) oder ausgeknockt sind (Neusch et al. 2006; Chever et al. 2010). Wie in jüngerer Zeit veröffentlicht (Ivens et al. 2007), erhöhten 100 μM Ba^{2+} iontophoretisch induzierte Anstiege der $[K^+]_o$ um ca. 70 %. Frühere Studien zeigten einen Anstieg der $[K^+]_o$ um ca. 100 % unter 2 mM Ba^{2+} (Jauch et al. 2002). Unter der Voraussetzung, daß die Kir-Kanäle bereits durch 100 μM Ba^{2+} komplett blockiert sind, müssen weitere Kanäle beteiligt sein. Es wurde gezeigt, daß so hohe Konzentrationen wie 2 mM Ba^{2+} auch K2P-Kanäle blockieren (Lesage und Lazdunski 2000; Rajan et al. 2001). Dies weist darauf hin, daß auch diese Kanäle an der Regulation der $[K^+]_o$ mittels „spatial buffering“ beteiligt sind.

1.4. Hippocampus

Der Hippocampus ist entwicklungsgeschichtlich eine sehr alte Hirnstruktur und nimmt beim Menschen im Vergleich zu anderen Wirbeltieren nur noch ein verhältnismäßig kleines Volumen ein. Er gehört zum Allocortex und liegt medial des Temporallappens, wobei sich Kopf und Korpus in das Unterhorn des Seitenventrikels einwölben und der Schweif sich zunächst nach dorsal und dann nach rostral und schließlich wieder ventral wendet und in den Fornix fortsetzt (Abb. 1.3.). Der Hippocampus weist hauptsächlich 2 ineinander liegende C-förmige Strukturen auf, das Cornu ammonis (CA) und den Gyrus dentatus (GD) (Abb. 1.2.), sowie zusätzlich das Subiculum. Das Cornu ammonis und der Gyrus dentatus können in drei Schichten untergliedert werden. Dies sind beim Cornu ammonis das Stratum molekulare (welches noch in Stratum radiatum, lacunosum und molekulare subunterteilt werden kann), das Stratum pyramidale und das Stratum oriens und beim Gyrus dentatus das Stratum molekulare, das Stratum granulare und der Hilus. Das Stratum pyramidale und das Stratum granulare sind kräftige Nervenzellschichten und die Strata molekulare und oriens (auch multiforme) sind aus den Axonen bzw. Dendriten der Nervenzellen aufgebaut (Abb. 1.2.). Zusätzlich wird das Cornu ammonis beim Menschen noch in vier Bereiche mit entsprechender Bezeichnung (CA1, CA2, CA3, CA4) unterteilt (beim Nager

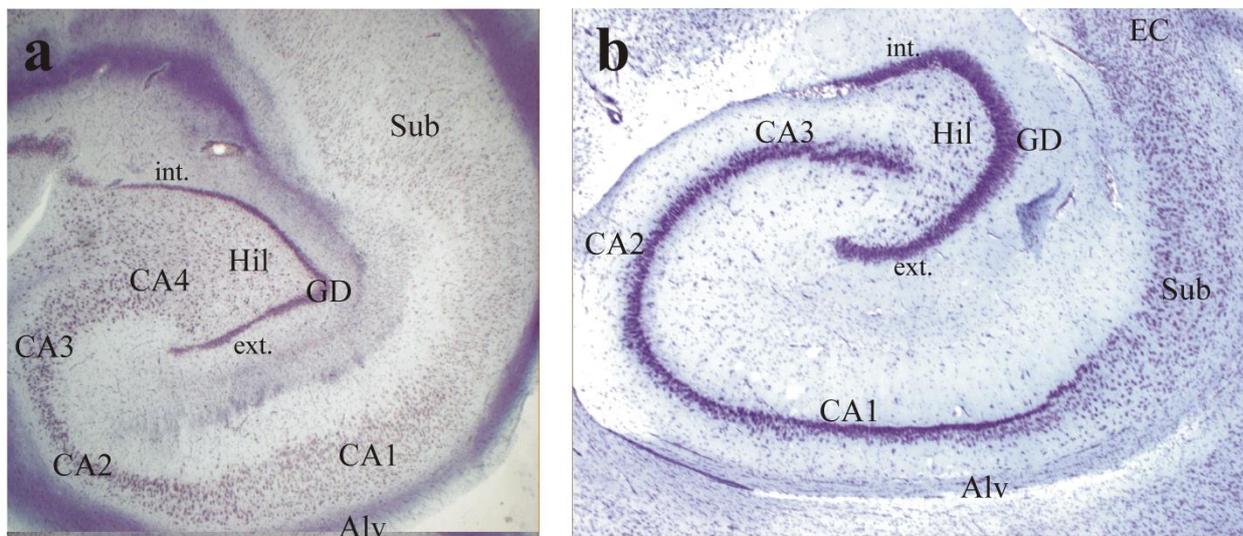
nur CA1 – 3). Die Bezeichnungen sind seit 1934 durch Lorente de N6 etabliert. Tabelle 1.1. zeigt eine verkleinerte Tabelle nach El-Falougy (2006) zum Vergleich der historischen und aktuellen Terminologie.

Tabelle 1.1.: Vergleich der historischen und aktuellen Terminologie des Hippocampus (nach El-Falougy 2006)

Cajal (1911)	Lorente de N6 (1934)	Terminologia anatomica (1998)
Fascia dentata	Fascia dentata	Gyrus dentatus
Hilus fasciae	CA4	Regio IV hippocampi proprii dentatae (CA4)
Regio inferior	CA3	Regio III hippocampi proprii (CA3)
	CA2	Regio II hippocampi proprii (CA2)
Regio superior	CA1	Regio I hippocampi proprii (CA1)
Subiculum	Subiculum	Subiculum
	Presubiculum	Presubiculum
	Parasubiculum	Parasubiculum

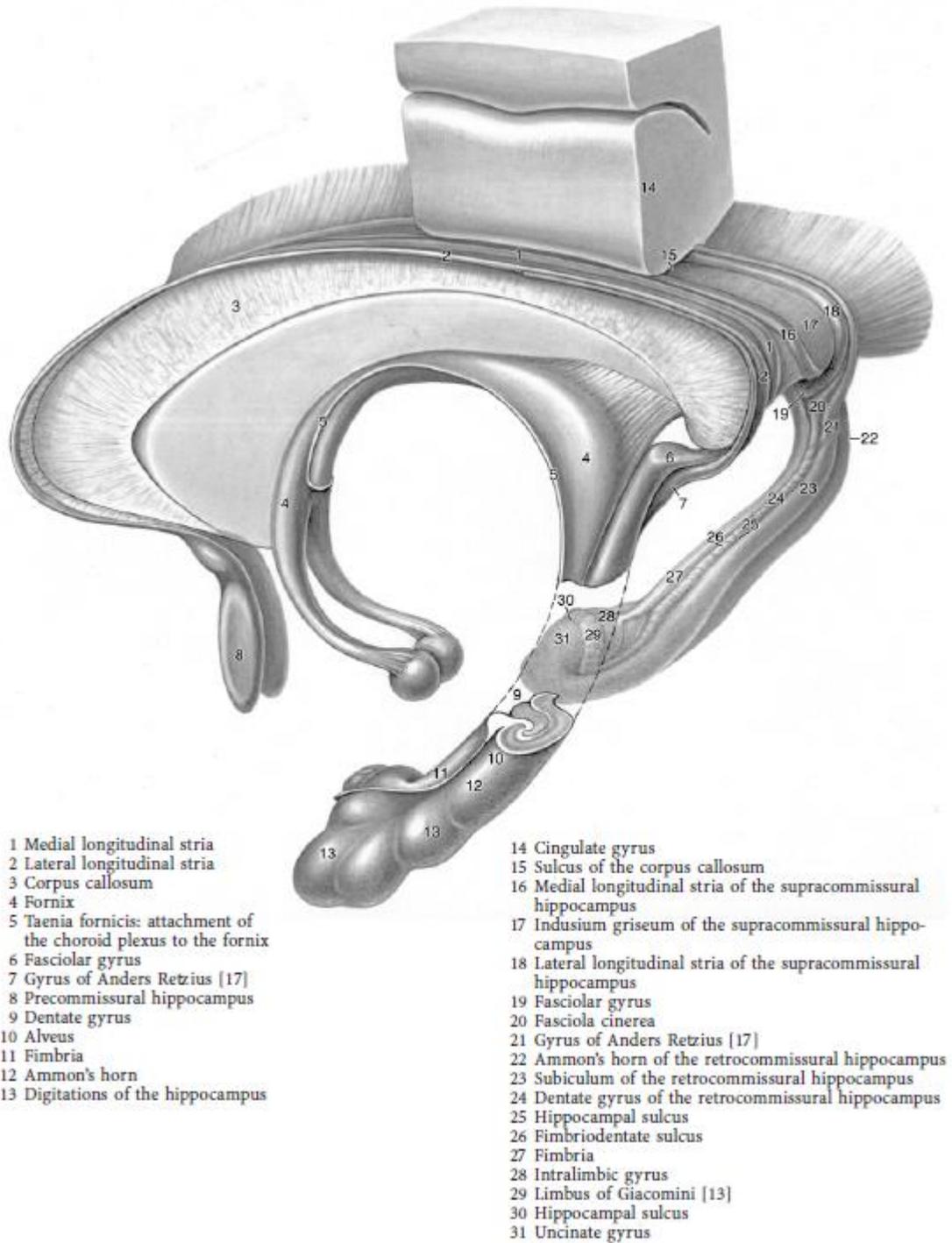
Die Pyramidenzellen in der CA1 sind recht eng geschichtet, liegen in der CA2 dann noch enger beieinander und weisen gr6oBere Zellkerne auf, um sich in der CA3 dann wieder etwas aufzulockern und in Richtung Gyrus dentatus umzuschlagen. Die CA4 weist die geringste Dichte an Pyramidenzellen auf und liegt schon im konkaven Bereich des Gyrus dentatus. Dieser wiederum kann noch in den Gyrus dentatus internus und externus unterteilt werden, wobei letzterer der CA2 und ersterer dem Subiculum zugewandt ist (Abb. 1.2.).

Abbildung 1.2.: histologische Präparate von humanem (a) und Hippocampus der Ratte (b)



EC = entorhinaler Cortex, Sub = Subiculum, GD = Gyrus dentatus, int. = internus, ext. = externus, CA1 = Cornu ammonis Regio I, CA2 = Cornu ammonis Regio II, CA3 = Cornu ammonis Regio III, CA4 = Cornu ammonis Regio IV (nur im humanen Gewebe), Alv = Alveus, Hil = Hilus, Cresylviolett-färbung, Bilder zur Verfügung gestellt von Fr. Dr. Claudia Raue (human) und Fr. Dr. Marleisje Njunting (Ratte)

Abbildung 1.3.: Hippocampus und umgebende Strukturen in schräger Ansicht von dorsal und rostral (aus Nieuwenhuys et al. 2008)

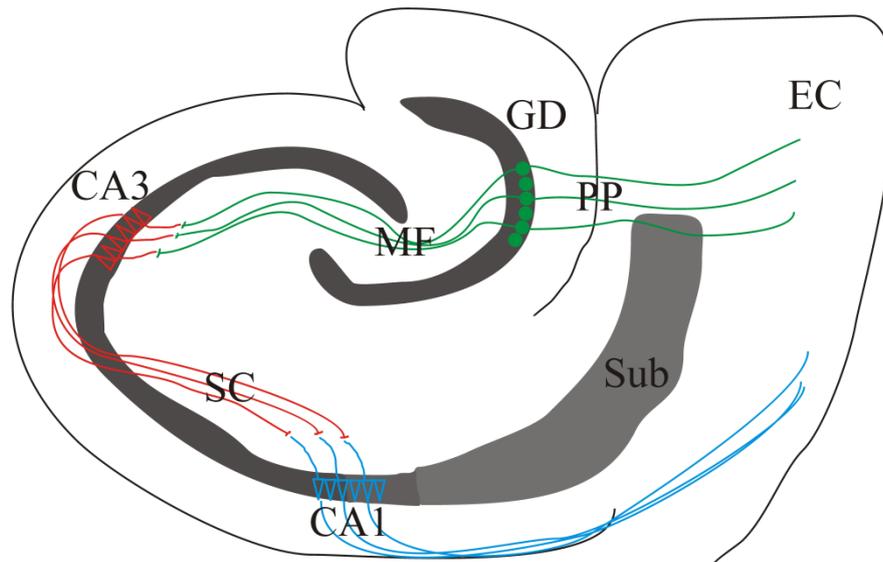


Funktionell ist der Hippocampus an der Gedächtniskonsolidierung, Streßadaptation und sexuell kognitiven Aufgaben beteiligt und aktuell immer noch vielfaches Objekt der Forschung. Seine Hauptafferenzen laufen durch das Subiculum und stammen aus dem entorhinalen Cortex, welcher seinerseits Afferenzen aus dem Neocortex, dem Riechhirn und der Amygdala, dem Gyrus cinguli, dem Thalamus, dem Septum und weiteren Hirnnervenkernen erhält. Innerhalb des Hippocampus erfolgt hauptsächlich eine dreifache synaptische Verschaltung (Schema-Abb. 1.4.). Die aus dem entorhinalen Cortex stammenden Fasern (Tractus perforans) projizieren auf die Körnerzellen des Gyrus dentatus, deren Axone (Hilus bzw. Moosfasertrakt) auf die Pyramidenzellen der CA3 projizieren, welche ihrerseits dann ihre Axone (Schaffer-Kollateralen) vor allem auf die Pyramidenzellen der CA1 schalten, die dann über das Subiculum wieder zurück in den entorhinalen Cortex (EC) und von dort weiter in den Fornix, die Corpora mamillaria, die Amygdala und den Hypothalamus projizieren. Zusätzlich bestehen von den Neuronen (Körnerzellen des GD und Pyramidenzellen des CA) noch modulierende Rückprojektionen über Interneurone (zumeist Korbzellen) bzw. auf die Neurone (Körner- und Pyramidenzellen) selbst. Diese sind insbesondere im sklerotischen epileptischen Hippocampus stark ausgeprägt (Lehmann et al. 2000 (CA1); Gabriel et al. 2004 (GD)). Daneben gibt es auch direkte Verbindungen vom EC zu den Pyramidenzellen der CA3 und CA1, welche zurück zum EC und dann weiter in den Assoziationscortex, Temporalpol und präfrontalen Cortex ziehen. Zusätzlich sind die Hippocampi beider Seiten über Kommissurenfasern mit der jeweiligen Struktur (CA1, CA3, GD) der Gegenseite verknüpft.

Besonders intensiv und detailliert wurden die Ein- und Ausgangsbeziehungen am Hippocampus der Ratte untersucht (Witter und Amaral 2004): ein großer Teil der Afferenzen und Efferenzen zum Hippocampus verläuft über myelinisierte Fasern des Alveus, welcher seinerseits an der Ventrikelseite liegt. Die Fasern bündeln sich dann als Fimbria und setzen sich in den Fornix fort, um weiter zu subcorticalen Regionen oder nach kontralateral zu laufen. Der Fornix spaltet sich in einen prä- und postkommisuralen Anteil auf. Der präkommisurale Anteil läuft dann zum Nucleus septalis und anderen Vorhirnstrukturen, der postkommisurale in Richtung Diencephalon und spaltet sich dort weiter in einen zum anterioren hypothalamischen Bereich und einen zum anterioren thalamischen Bereich ziehenden Anteil auf. Jedoch werden auch schon im Bereich der Fimbria Fasern über die Mittellinie laufend in die ventrale hippocampale Kommissur und damit in Felder der Gegenseite abgegeben. Zusätzlich gibt es noch ein zweites kommissurales Bündel, die dorsale hippocampale Kommissur, die die Mittellinie unmittelbar rostral und ventral des Splenium corporis callosi kreuzt. Dieses enthält Fasern, die von und zum Presubiculum, Para-

subiculum und EC ziehen. Dies ist der Hauptweg vom EC zu den septotemporalen Bereichen anderer Hippocampusareale (Subiculum, GD, CA) und enthält zusätzlich Fasern vom EC zum Thalamus und Gyrus cinguli. Der Haupteingang des GD ist der EC, sonst bestehen keine direkten Eingänge anderer Cortexareale, jedoch subcorticale Eingänge aus den Septumkernen, aus dem supramamillären Bereich des posterioren Hypothalamus und aus den monoaminergen Kernen im Hirnstamm (insbesondere aus dem Locus coeruleus und den Raphe-Kernen). Neben dem zur CA3 laufenden Moosfasertrakt gibt es weitere Efferenzen aus dem GD auf Interneurone sowie zusätzliche Kommissural- und Assoziationsfasern. Die CA3 erhält neben dem Moosfasertrakt weitere Afferenzen aus dem Nucleus septalis lateralis, dem Amygdala-Komplex und dem Locus coeruleus, als Efferenzen laufen Assoziationsfasern direkt und über Interneurone zur CA3, CA2 und zum Hilus sowie die Schaffer-Kollaterale zur CA1. Die Kommissurenfasern zur Gegenseite sind nur bei der Ratte, nicht jedoch beim Affen nachgewiesen. Als einziger subcorticaler Zielpunkt der CA3 ist der Nucleus septalis lateralis zu nennen, aus dem die CA3 auch Afferenzen erhält. Die Verbindungen der CA2 entsprechen in etwa denen der distalen CA3. Die CA1 erhält vor allem Eingänge aus der CA3, jedoch zusätzlich auch aus dem Subiculum, aus dem parahippocampalen Bereich, dem Amygdala-Komplex, über die Capsula interna und das cinguläre Bündel aus dem Thalamus und aus den Raphe-Kernen. Die Hauptefferenz zieht über den Alveus in das Subiculum, zusätzlich bestehen Assoziationsfasern zurück in die CA1, jedoch deutlich weniger als in der CA3, und inhibitorisch auf die CA3 und den Hilus. Weiterer Output erfolgt in die lateralen Septumkerne, den retrosplenischen Cortex, den Nucleus accumbens, die ventrale Taenia tecta, den prä- und infralimbischen Cortex, den anterioren Nucleus olfactorius, den anterioren und medialen Anteil des Hypothalamus, den Amygdala-Komplex sowie den medialen präfrontalen Cortex.

Abbildung 1.4.: Schema der trisynaptischen Verschaltung am Beispiel eines Horizontalschnitts des Hippocampus der Ratte



EC = entorhinaler Cortex, PP = perforant path, GD = Gyrus dentatus, MF = Moosfasertrakt, CA3 = Cornu ammonis Regio III, SC = Schaffer-Kollaterale, CA1 = Cornu ammonis Regio I, Sub = Subiculum

1.5. Two-pore-domain-Kalium-Kanäle im Hippocampus

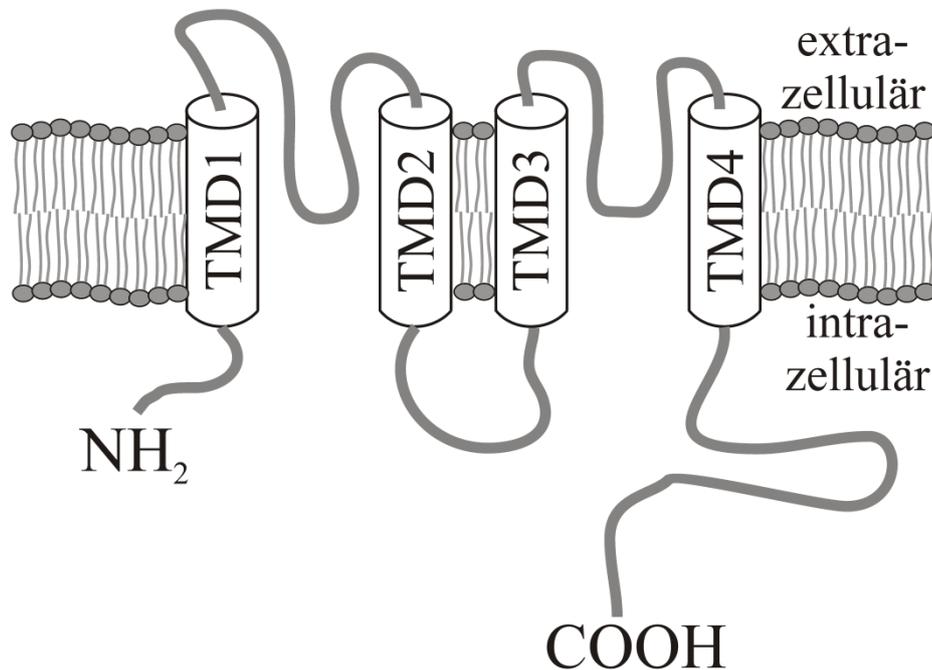
Durch die Ergebnisse ihrer Arbeit an Ionenflüssen durch die Zellmembran postulierten Hodgkin und Huxley 1952 die Existenz sogenannter Background-Kalium-Kanäle, die an der Aufrechterhaltung des Membranpotentials beteiligt seien. Der erste dieser Kanäle im humanen Gewebe wurde jedoch durch Lesage et al. erst 1996 kloniert und charakterisiert. Inzwischen ist die Gruppe dieser Kanäle auf 15 Mitglieder angewachsen und teilt sich in 6 Untergruppen: in TWIK, TASK, TREK, THIK, TALK und TRESK. Allen gemein ist der strukturelle Aufbau aus 2 Untereinheiten mit je 4 Zellmembran-durchspannenden Domänen, wovon zwei die porenbildende Einheit darstellen und beide Untereinheiten somit einen kaliumsensitiven Kanal bilden. Zudem besitzen alle einen intrazellulären N- und C-Terminus (Abb. 1.5.). Die Aminosäuresequenz und die im Körper ubiquitäre Gewebeverteilung der Untergruppen variieren, dennoch sind zwei Charakteristika gleich: 1. sind alle K2P-Kanäle spannungsunabhängig und 2. werden sie durch klassische K^+ -Kanal-Blocker wie TEA und 4-AP nicht inhibiert (Lotshaw 2007). Nach derzeitigem Stand der Forschung sind die K2P-Kanäle an vielen physiologischen Prozessen wie bspw. Neuroprotektion, cerebrovaskulärer Vasodilatation, Regulation der Aldosteronproduktion

und –sekretion, Depression, Chemorezeption und pulmonaler Vasokonstriktion beteiligt (Enyedi und Czirjak 2010). Die physiologische Regulierung der Kanäle erfolgt bspw. durch intra- oder extrazelluläre pH-Änderung, Hitze, Membranspannung (Zellschwellung), G-Protein-gekoppelt, Arachidonsäure oder anderer (ungesättigter) Fettsäuren.

Kürzlich wurden zwei Studien veröffentlicht, in denen die Struktur je eines humanen K2P-Kanals mittels Kristallstrukturanalyse gezeigt wurde, und zwar für TWIK-1 (Miller und Long 2012) sowie TRAAK (Brohawn et al. 2012). Der Aufbau aus zwei Untergruppen wurde bestätigt und bei beiden Kanälen wurde gezeigt, daß die extrazellulären Schleifen zwischen transmembranärer Domäne 1 und 2 (TMD1 und TMD2) über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind und eine „Kappe“ über dem Kanaleingang und einen Kaliumselektivitätsfilter bilden. Diese Kappe besitzt zwei seitliche Eingänge, welche einen freien Durchfluß von Kaliumionen ermöglichen, das Andocken oder Passieren von extrazellulären Blockern jedoch erschweren bzw. unmöglich machen könnten und die Erklärung für die Ineffektivität der klassischen Kanalblocker TEA und 4-AP bieten. Weiterhin wurde gezeigt, daß es seitlich zur Kanalachse etwa in Höhe der Mitte der Zellmembran vier Fenestrationen zum Zentralkanal gibt, welche möglicherweise Angriffspunkte für Blocker darstellen, die aber ihrerseits erst die Zellmembran passieren müßten. Miller und Long vermuten weiterhin, daß der C-Terminus, welcher sich nahezu parallel zur Zellmembran in Richtung Kanalpore ausrichtet, zusätzlich „gating“-Funktionen besitzen könnte.

Intracerebral sind K2P-Kanäle sowohl auf den Membranen von Neuronen (Talley et al. 2001) und Astrozyten (Kindler et al. 2000; Seifert et al. 2009) des Hippocampus als auch auf Astrozyten anderer Hirnregionen wie Cortex, Retina oder Kleinhirn exprimiert (Ferroni et al. 2003; Gnatenco et al. 2002; Kindler et al. 2000; Skatchkov et al. 2006). Die exprimierten Kanäle sind unterschiedlich sensitiv auf Quinin, Quinidin und Bupivacain. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, daß Quinin TWIK-1, TASK-1, TASK-2, TASK-3 sowie TREK-1 inhibiert (Lesage et al. 1996; Lesage und Lazdunski 2000; Zhou et al. 2009). Quinidin blockiert TWIK-1, TASK-1, TASK-2, TREK-1 und TREK-2 (Lesage und Lazdunski 2000; Patel et al. 1998). Bupivacain blockiert schon in niedriger Dosis TASK-1 und TASK-2, in höherer Dosierung auch TASK-3 sowie TRESK (Kim et al. 2000; Kindler et al. 1999).

Abbildung 1.5.: Schematische Darstellung einer Untereinheit eines Two-pore-domain-Kaliumkanals (K2P-Kanal)



Im Bild erkennt man die 4 membrandurchspannenden Domänen (TMD = transmembranäre Domäne), wobei jeweils zwei eine porenbildende Einheit darstellen (TMD1 und TMD2 sowie TMD3 und TMD4), der N- und C-Terminus der Aminosäure liegen intrazellulär.

1.6. Fragestellung

Die während physiologischer und pathologischer neuronaler Aktivität (wie bspw. während eines epileptischen Anfalls) extrazellulär akkumulierenden Kaliumionen müssen zur Erhaltung des Ruhemembranpotentials und neuer Erregbarkeit abgepuffert und wieder in den Intrazellulärraum transportiert werden. Einige hierfür verantwortliche Mechanismen sind schon erklärt (aktive Transporte mittels Na^+/K^+ -ATPase, K^+/Cl^- -Co-Transporter, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Co-transporter, Diffusion). Die Entdeckung der Kir- und der K2P-Kanäle ließ jedoch die Vermutung entstehen, daß auch diese zur Kaliumumverteilung beitragen und somit war das Ziel der vorliegenden Studie herauszufinden, ob K2P-Kanäle zur neuronalen Kaliumfreisetzung und zum „spatial buffering“ von Kalium durch Gliazellen beitragen. Dies sollte anhand folgender Fragestellungen geklärt werden:

1. Wie verändern sich reizinduzierte Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ nach Blockade der K2P-Kanäle und nach zusätzlicher Blockade der Kir-Kanäle während Entladungen von aktivierten

Neuronen? Diese Signale können durch die Änderung der Kaliumfreisetzung und durch Änderung der Kaliumumverteilung durch räumliche Pufferung moduliert sein.

2. Um Veränderungen der Kaliumaufnahme in Gliazellen zu untersuchen, kann Kalium in Gegenwart von Blockern synaptischer Transmission iontophoretisch appliziert werden. Veränderungen dieser Signale bei Blockade der K2P- bzw. Kir-Kanäle durch Ba^{2+} deuten auf eine veränderte Kaliumaufnahme hin.
3. Wie verhält sich dies im epileptischen Gewebe (Epilepsiemodell Pilocarpin-behandelter Ratten und reseziertes epileptisches Gewebe von Patienten, die aufgrund einer Temporal-lappenepilepsie operiert wurden)?
4. Gibt es Unterschiede in der Pufferung der $[K^+]_o$ zwischen dem Kontrollgewebe und dem epileptischen Gewebe?

Hierfür wurden die Effekte von Quinin, Quinidin, Bupivacain und Ba^{2+} auf die transienten Erhöhungen der $[K^+]_o$ untersucht, welche den Kalium-Ausstrom von endladenden Neuronen und die gliale Kaliumaufnahme abschätzen lassen. Daraus ergeben sich Hinweise, welche K2P-Kanäle an der Kaliumpufferung beteiligt sein könnten. Die Anstiege der $[K^+]_o$ werden von extrazellulären langsamen negativen Feldpotentialen (IFP) begleitet, welche eine Nettobewegung von positiven Ladungen aus dem Extrazellulärraum in zelluläre Kompartimente widerspiegeln (Dietzel et al. 1989). Sollten die glialen K2P-Kanäle an der Kaliumpufferung im Sinne einer zellulären Aufnahme beteiligt sein, ist durch eine Blockade mit den oben genannten Agentien eine Erhöhung der iontophoretisch induzierten Anstiege der $[K^+]_o$ und eine Beeinflussung der begleitenden IFP im Sinne einer Amplitudenreduktion zu erwarten, da Kalium dann extrazellulär erhöht wird, positiv geladene Ionen extrazellulär verbleiben und somit der Nettoladungsfluß nach intrazellulär abnimmt. Um blockervermittelte Änderungen in der Anzahl der antidrom aktivierten Neurone zu berücksichtigen, wurden auch die transienten Feldpotentialänderungen (Summenaktionspotentiale = SAP) untersucht, welche neuronale Gruppen-Entladungen repräsentieren. Auch hier sind Änderungen der SAP zu erwarten, wenn K2P-Kanäle am Aktionspotential beteiligt sind. Eine Blockade der Kanäle sollte dann zur Abnahme der Kaliumleitfähigkeit der Membran führen und die Amplitude der SAP verkleinern. Ist dies der Fall, ergibt sich zwingend eine verminderte Kaliumfreisetzung aus aktivierten Neuronen unter repetitiver Reizung und somit auch eine Amplitudenminderung der IFP (wobei die freigesetzten Kaliumionen dann schneller bzw. besser durch die Glia abgepuffert werden könnten).

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchtes Gewebe

Im Rahmen der Untersuchungen wurden Messungen der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[K^+]_o$), der begleitenden langsamen Feldpotentialänderungen (IFP) und der Summenaktionspotentiale (SAP) in der Area 1 des Ammonshorns in Akutschnitten des Hippocampus (CA1) an:

- a) Kontrollgewebe (adulte Wistar-Ratten),
- b) Gewebe eines Epilepsiemodells (adulte Pilocarpin-behandelte Wistar-Ratten) sowie
- c) reseziertem Gewebe von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie durchgeführt.

2.1.1. Kontrolltiere:

Die Experimente an den Kontrolltieren (Alter 6 – 31 Wochen, 200 – 300 g) erfolgten an adulten Ratten beiderlei Geschlechts.

2.1.2. Pilocarpin-behandelte Tiere:

Das Pilocarpin-Epilepsiemodell wurde ausführlich in Turski et al. 1983 beschrieben. Kurz zusammengefaßt wurde adulten, ca. sechs Wochen alten, männlichen Wistar-Ratten Methylscopolamin (1 mg/kg) subkutan injiziert, ca. 30 Minuten später Pilocarpin (340 mg/kg gelöst in bidestilliertem Wasser) intraperitoneal injiziert, worauf sich in weniger als 30 Minuten ein Status epilepticus entwickelte. Ca. 60 Minuten nach Beginn des Status epilepticus wurden 0,5 mg Atropin subkutan injiziert und der Status epilepticus ca. 90 Minuten nach dessen Beginn mit 10 mg/kg Körpergewicht Diazepam intraperitoneal durchbrochen. Zum Ausgleich des Säure-Basen-Haushaltes wurden 90 – 120 Minuten nach Diazepam-Injektion 12 ml Ringerlactat-Lösung mit 1 ml Natriumhydrogencarbonat sowie weitere 90 Minuten später 7 ml Ringerlactat-Lösung injiziert. Nach frühestens 2 Wochen konnten erste epileptische Anfälle beobachtet werden, die in festen Intervallen durch infra-rot-Videoüberwachung registriert werden konnten. Eine exemplarische Videoüberwachung der so behandelten Tiere ergab eine hochgerechnete durchschnittliche Anfallshäufigkeit von $1,64 \pm 0,93$ Anfällen pro Tag (min. 0,13; max. 6,14). Die Experimente erfolgten $30,3 \pm 4,6$ Wochen nach Pilocarpin-Injektion (min. 20; max. 46 Wochen). Somit ergibt sich für die Tiere ein durchschnittliches Alter von $35,7 \pm 4,8$ Wochen (min. 24; max. 52 Wochen) (ebenfalls 200 – 300 g).

2.1.3. Resezierter Hippocampus von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappen-epilepsie:

Nach Dlugos (2001) kann von einer Pharmakoresistenz ausgegangen werden, wenn innerhalb von zwei Jahren unter Kombination von zwei oder drei Antiepileptika mit maximal tolerierter Dosis keine Anfallsfreiheit erreicht wurde. Nach prächirurgischer Diagnostik der Temporallappenepilepsie entsprechend den deutschen und europäischen Leitlinien für prächirurgische Diagnostik (European Federation of Neurological Societies Task Force 2000) im Epilepsiezentrum Berlin-Brandenburg wurden die Patienten zum Erreichen von Anfallsfreiheit einem epilepsiechirurgischen Eingriff unterzogen. Dabei wurden Anteile des Hippocampus und des temporalen Cortex reseziert. Die Patienten wurden vorher über die Verwendung des resezierten Gewebes informiert und stimmten mittels schriftlicher Einverständniserklärung zu (Charité-Ethikkommission EA1/042/04 in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki).

Tabelle 2.1.: Eigenschaften der operierten Patienten

Pat.-Nr.	Geschlecht	Alter	Beginn	Dauer	Anfälle/M.	GM/a	OP-Seite	Wyler	Sklerose
1	M	33	24	9	3,5	5	rechts	2,5	ja
2*	M	49	22	27	30	0,01	rechts	3	ja
3	W	21	18	3	6,5	0,01	rechts	4	ja
4	M	36	28	8	6,5	0	rechts	1	nein
5	W	38	18	20	12,5	4	links	1	nein
6	M	38	1	37	4	2	links	2	nein
Mittel ± SEM		37,7 ± 3,7	19 ± 3,3	18,7 ± 4,7	13,3 ± 4,5	1,6 ± 0,8		2,4 ± 0,4	

Pat.-Nr.: Patienten-Nummer; Alter: Alter des Patienten in Jahren zum Operationszeitpunkt; Beginn: Alter in Jahren bei Erkrankungsbeginn; Dauer: Dauer der Epilepsie in Jahren zum Operationszeitpunkt; Anfälle/M.: Anzahl der Anfälle pro Monat; GM/a: Anzahl der Grand Mal-Anfälle pro Jahr; OP-Seite: Seite des resezierten Hippocampusanteils; Wyler: histologische Einstufung des Resektates nach Wyler-Klassifikation; Sklerose: Vorhandensein einer Sklerose; *: von diesem Patienten flossen zwei Hippocampuschnitte in die Messungen/Auswertung ein; Mittel ± SEM: Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes

2.2. Präparation der Hirnschnitte

2.2.1. Kontrolltiere:

Die Methodik der Präparation wurde bereits ausführlich geschildert (Dreier und Heinemann 1991) und folgte den Richtlinien des örtlichen Landesamtes für Gesundheit und Soziales (Projektnummer T 0049/03). Die Tiere wurden unter tiefer Äthernarkose dekapitiert und die Schädelknochen entfernt. Mit einem Vibratom (Campden Instruments Ltd., Leicester, UK) wurden 400 µm starke horizontale Hirnschnitte, welche den Hippocampus sowie Anteile des entorhinalen Cortex (EC) enthielten, unter ständiger Umspülung mit auf max. 4 °C gekühlter und carbogenerter (95% O₂, 5% CO₂) artifizieller cerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF; in mM: NaCl 129, NaH₂PO₄ 1.25, Glucose 10, CaCl₂ 1.6, MgCl₂ 1.8, KCl 3, NaHCO₃ 21) angefertigt. Die Hirnschnitte wurden unverzüglich in Interface-Kammern transferiert (ACSF hier mit 34,5 ± 0,5 °C; Perfusionsgeschwindigkeit 1,7 – 1,8 ml/min), welche für die Messungen sowie Lagerung dienen (Abb. 2.1.).

2.2.2. Pilocarpin-behandelte Tiere:

Die Präparation erfolgte analog der Kontrolltiere (Projektnummer G 0328/98 und G 0024/04).

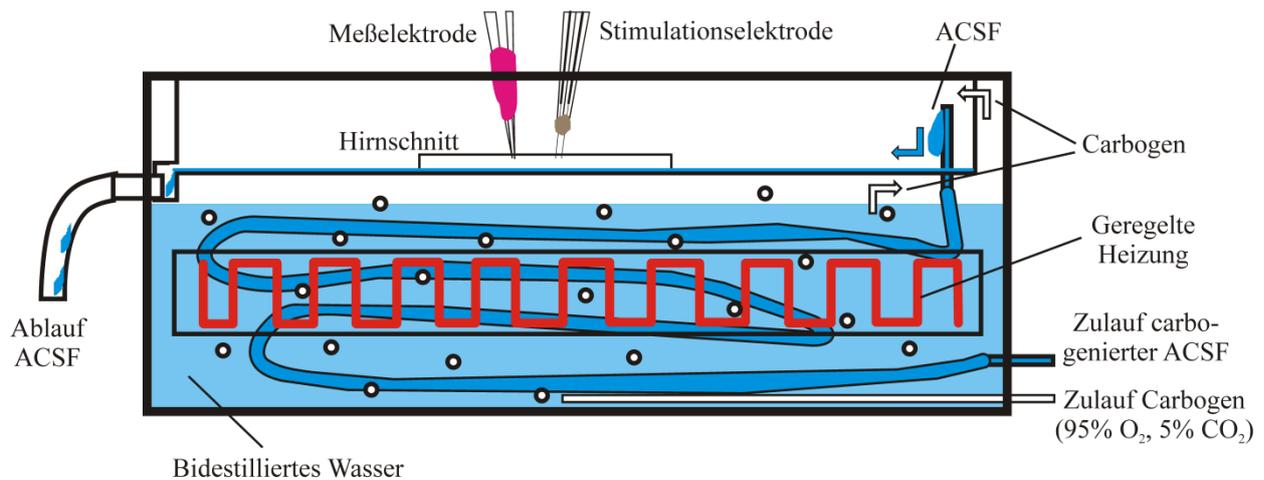
2.2.3. Resezierter Hippocampus von Patienten mit pharmakoresistenter Temporallappen-epilepsie:

Bei der Operation wurden 2 – 3 ca. 5 mm dicke koronare Gewebeblöcke des Hippocampus entnommen und sofort in eine 0,5 – 1 °C kalte und nahezu natriumfreie, carbogenierte Transportlösung (in mM: KCl 3, NaH₂PO₄ 1.25, Glucose 10, MgSO₄ 2, MgCl₂ 2, CaCl₂ 1.6, Saccharose 200, NaHCO₃ 21, α-Tocopherol 0.1, pH 7.4, Osmolalität 304 mosmol/kg, Ethanol 0.005 Vol%, siehe auch Gabriel et al. 2004, modifiziert) überführt und dann in einem luftdichten Thermogefäß zur Gewährleistung einer Temperatur ≤ 1 °C und eines Sauerstoffpartialdrucks über 560 Torr in das Labor transportiert. Hier wurden mit dem Vibratom 500 µm dicke Schnitte präpariert und ebenfalls in die mit ACSF (in mM: NaCl 129, KCl 3, NaHCO₃ 1.25, Glucose 10, MgCl₂ 1.6, CaCl₂ 1.6, NaHCO₃ 21, α-Tocopherol 0.03, pH 7.4, Osmolalität 303 mosmol/kg, 0.0025 Vol% Ethanol; 34,5 ± 0,5 °C; Perfusionsrate 1,7 – 1,8 ml/min) perfundierten Interface-Kammern transferiert. Die so gelagerten Gewebeschnitte zeigten bis zu 24 Stunden nach OP noch ausreichende Vitalität.

2.3. Versuchsaufbau und Messungen

Die Interface-Kammern dienen sowohl der Lagerung der Hirnschnitte als auch der Messung. Die Versorgung der Hirnschnitte mit Glucose sowie Elektrolyten als auch Sauerstoff erfolgte per Diffusion mittels Umspülung mit carbogener ACSF und mit Wasserdampf gesättigtem Carbogen als Phase über den Schnitten (Abb. 2.1.).

Abbildung 2.1.: Schematischer Aufbau der genutzten Interface-Kammer im Querschnitt



Die Hirnschnitte liegen zur besseren und gleichmäßigen Perfusion auf einer Lage Linsenreinigungspapier (Fa. Kodak). Präoxygenierte und durch den Schlauchverlauf durch das temperaturgeregelte Wasserbad (Aqua bidest) auf $34,5 \pm 0,5$ °C erwärmte ACSF fließt mit 1,7 – 1,8 ml/min auf das Linsenreinigungspapier. Carbogen wird durch das Wasserbad ebenfalls erwärmt und saturiert und überströmt dann als Phase die Hirnschnitte. Dies gewährleistet eine gute Versorgung der Hirnschnitte mit Sauerstoff, Glucose und Elektrolyten.

ACSF: artifizielle cerebro-spinale Flüssigkeit; Carbogen: Gasgemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid

Die Messungen wurden mit doppellumigen, kaliumsensitiven/Referenz-Mikroelektroden (modifiziert nach Lux und Neher 1973; Heinemann und Arens 1992) durchgeführt, die auf einen zehnfachen Kaliumanstieg mit einer Potentialänderung von 57 – 60 mV reagierten (Valinomycin-basierte Lösung, Potassium Ionophore Cocktail 1, Fluka, Buchs, Schweiz). Die Elektroden wurden dabei in einer Tiefe von 80 µm (Ratten) oder 100 µm (humanes Gewebe) positioniert (Abb. 2.2.). Die Änderungen der $[K^+]_o$ wurden dabei als Differenz der Spannung

zwischen der kaliumsensitiven und der Referenzseite der Elektrode, welche mit Natriumchlorid (154 mM) gefüllt war, gemessen (Filter-Grenzwert 1,6 Hz, Aufzeichnungsrate 100 Hz). Mittels der Referenzelektrode wurden die transienten Feldpotentialänderungen (Filter-Grenzwert 3 kHz, Aufzeichnungsrate 10 kHz) sowie die langsamen Feldpotentialänderungen (Filter-Grenzwert 1,6 Hz, Aufzeichnungsrate 10 kHz) gemessen. Beide Spannungen wurden getrennt mit einem selbstgebaute 2-Kanal-Gleichspannungsverstärker mit negativem Kapazitätsausgleich verstärkt und mit dem Programm Spike 2 (Version 4.01, CED, Cambridge, UK) für die spätere offline-Auswertung auf Festplatte gespeichert.

Die gebogene doppelumige Iontophorese-Elektrode wurde in einem Kanal mit Kaliumchloridlösung (KCl mit 500 mM), im anderen mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl mit 154 mM) befüllt und an der Spitze mittels Dentalwachs parallel so mit der ionensensitiven Meßelektrode verklebt, daß ein Spitzenabstand von 30 – 80 µm resultierte (Abb. 2.2).

Frühere Versuche haben die größten extrazellulären Kaliumanstiege während repetitiver Reizung im Stratum pyramidale der CA1 gezeigt (Gabriel et al. 1998), weswegen die Ableitungen hier durchgeführt wurden. Die Anstiege der $[K^+]_o$ wurden durch repetitive Reizung des efferenten Fasertraktes der CA1-Pyramidenzellen im Alveus sowie durch iontophoretische Kalium-Applikation induziert. Zur Vermeidung rekurrenter Erregung und glutamaterger synaptischer Aktivität erfolgten sämtliche Experimente unter Gabe der Glutamat-Rezeptoren-Blocker 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (2-APV) und 6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion (CNQX, jeweils Tocris, Köln, Deutschland) in der Konzentration von je 30 µM.

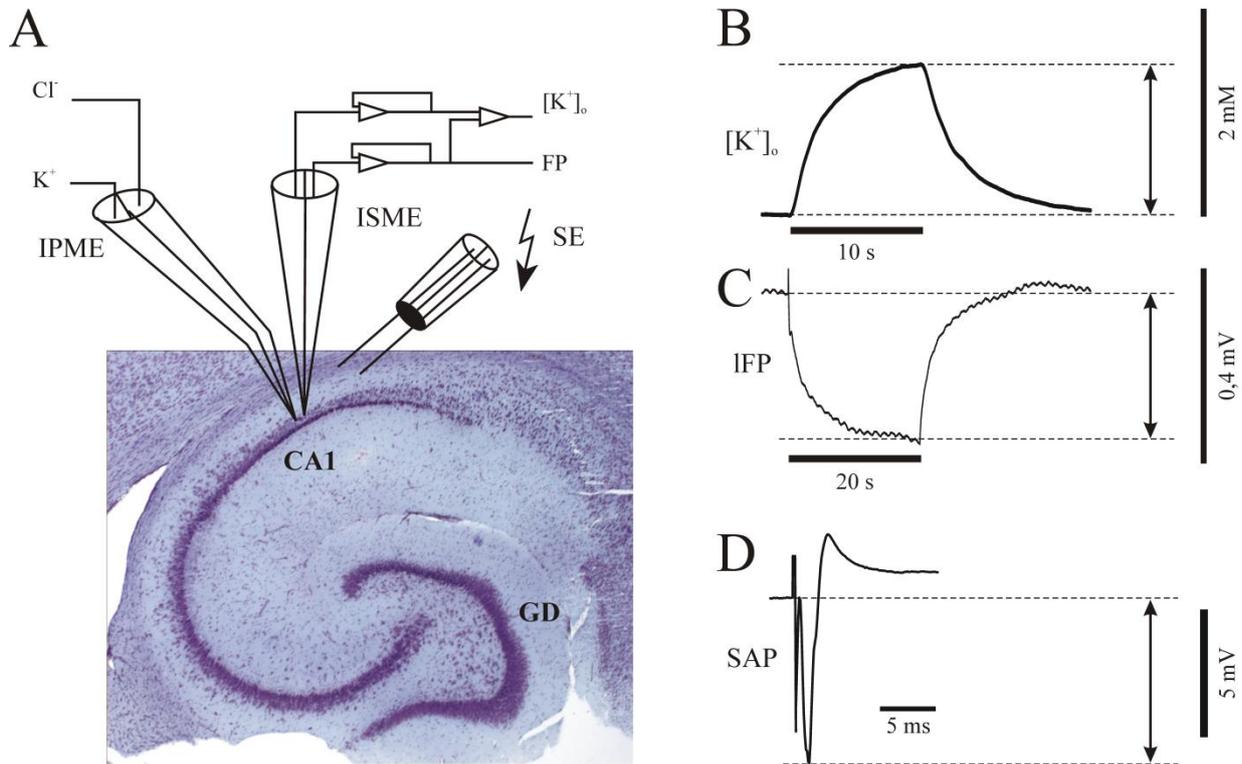
Für die Kaliumanstiege mittels repetitiver Reizung wurden Stimulusfolgen von 200 Pulsen (0,1 ms Pulsdauer; 20 Hz Wiederholrate; 10 Sekunden gesamte Stimulusdauer) mit zwei verschiedenen Reizstärken (30 – 80% und 50 – 100% der für die maximale SAP-Antwort notwendigen Stärke, 2 – 12 V) appliziert. Die Reizelektroden (20 µm starke Platindrähte mit 100 – 200 µm Abstand) wurden für Messungen in der CA1 in den Alveus auf der subiculären Seite positioniert und an eine Stimulationseinheit mit konstantem, regulierbarem Spannungsausgang angeschlossen.

Die iontophoretisch induzierten Kaliumanstiege wurden mittels der an eine Strompumpe angeschlossenen Iontophorese-Elektrode induziert, wobei abhängig von Elektrodenabstand und Ejektionsform (gegen Referenz oder Grund) zwei unterschiedlich starke Stromstärken zwischen 12 – 800 nA für 20 Sekunden appliziert wurden.

Die Dauer der repetitiven Reizung und der iontophoretischen Applikation von Kalium wurde so gewählt, daß gegen Ende der Reizserie eine Art Plateauphase des Kaliumanstiegs erreicht und eine LTP vermieden wurde. Begleitend zu den durch elektrische Reizung und iontophoretisch induzierten Anstiegen der $[K^+]_o$ zeigte sich eine negative Potentialverschiebung im Extrazellulärraum, deren Amplitude mit der Höhe des Kaliumanstiegs korreliert (Krnjevic und Morris 1975). Diese Potentialverschiebung kann durch eine Nettoaufnahme von Ladungsträgern in zelluläre Kompartimente wie beim spatial buffering erklärt werden, wobei die durch neuronale Aktivität extrazellulär kumulierenden Kaliumionen in Glia aufgenommen werden. Lothman und Somjen (1975) bestätigten den zeitlichen Zusammenhang von extrazellulärem Kaliumanstieg, extrazellulärer negativer Potentialverschiebung und intraglialem Kaliumanstieg im Rückenmarksgrau der Katze unter repetitiver Stimulation (siehe auch Heinemann und Lux 1975 und 1977).

Die Messungen begannen nach einer Erholungsphase nach der Präparation von ca. 1 Stunde für die akuten Hirnschnitte der Ratten bzw. 4 Stunden nach Präparation des humanen Gewebes.

Abbildung 2.2.: Positionierung der Stimulations- und der verklebten Iontophorese-/Meßelektroden in der CA1 sowie Darstellung der gemessenen Amplituden der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[K^+]_o$), der langsamen Feldpotentialänderungen (IFP) und der Summenaktionspotentiale (SAP) am Beispiel eines Hirnschnittes vom Kontrollgewebe (Wistar-Ratte)



(A) Anordnung der Stimulations- und Iontophorese-/Meßelektrode im Alveus bzw. der CA1 des Hippocampus am Beispiel eines histologischen Präparates einer Wistar-Ratte. Die mittels Dentalwachs auf einen Spitzenabstand zwischen 30 – 80 μm verklebte Iontophorese-/Meßelektrode wird im Stratum pyramidale in einer Tiefe von ca. 80 μm positioniert. Die Stimulationselektrode wird mit ca. 1 – 2 mm Abstand im Alveus in Richtung entorhinaler Cortex (EC) positioniert, um retrograd axonal reizen zu können.

(B – D) Beispiele für die erhobenen Meßwerte, die Maßbalken geben den Meßbereich und die Zeitskala wieder.

(B) Beispiel eines extrazellulären Kaliumanstiegs ($[K^+]_o$) während repetitiver Reizung, (C) Beispiel einer langsamen Feldpotentialänderung (IFP) auf iontophoretische Applikation von Kalium, (D) Beispiel einer Mittelung von 5 Summenaktionspotentialen (SAP) auf Einzelstimuli im Alveus, nähere Erläuterung im Text.

Cl^- : Chlorid-Ionen in NaCl-Lösung; K^+ : Kalium-Ionen in KCl-Lösung; IPME: Iontophorese-Mikroelektrode; $[K^+]_o$: extrazelluläre Kaliumkonzentration; FP:

Feldpotential; ISME: Ionensensitive Mikroelektrode; SE: Stimulationselektrode; CA1: Regio CA1 des Hippocampus; GD: Gyrus dentatus des Hippocampus; lFP: langsame Feldpotentialänderungen; SAP: Summenaktionspotentiale

2.4. Versuchsprotokolle

Zur Vermeidung des Einflusses von synaptischer Aktivität wurden alle Versuche unter Blockung synaptischer Aktivität mittels je 30 μM 2-APV und CNQX durchgeführt. Da im späteren Versuchsablauf Ba^{2+} appliziert werden sollte, erfolgten sämtliche Messungen mit sulfatfreiem ACSF (in mM: NaCl 129, NaH_2PO_4 1.25, Glucose 10, CaCl_2 1.6, MgCl_2 1.8, KCl 3, NaHCO_3 21). Zur Gewährleistung der vollen Wirksamkeit des potentiellen K2P-Blockers (Quinin, Quinidin, Bupivacain) wurden die Messungen unter Einfluß desselben einmal nach 30 Minuten durchgeführt und nach 60 Minuten Einwaschphase wiederholt. Somit ergibt sich folgendes erstes Versuchsschema:

2.4.1. Versuchsschema I:

- a) Ableitung der Kontrollwerte (lFP, $[\text{K}^+]_o$, SAP), Einwaschen des potentiellen K2P-Blockers (Quinin, Quinidin, Bupivacain (alle Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland))
- b) nach 30 Minuten Ableitung der Meßwerte (lFP, $[\text{K}^+]_o$, SAP)
- c) nach 60 Minuten erneute Ableitung der Meßwerte (lFP, $[\text{K}^+]_o$, SAP), Einwaschen von Ba^{2+} (2 mM)
- d) nach weiteren 30 Minuten Ableitung der Meßwerte unter zusätzlichem Einfluß von Ba^{2+} (lFP, $[\text{K}^+]_o$, SAP)
- e) fakultativ: Auswaschen des K2P-Blockers und von Ba^{2+} durch Perfusion mit normaler ACSF und Ableitung der Meßwerte nach Auswaschphasen unterschiedlicher Dauer (lFP, $[\text{K}^+]_o$, SAP).

Zur Ermittlung eventueller additiver Effekte der potentiellen K2P-Blocker zusätzlich zum Ba^{2+} wurde ein zweites Schema verwandt, wobei nach Ermittlung der Kontrollwerte zunächst Ba^{2+} und dann der K2P-Blocker appliziert wurde. Somit ergibt sich:

2.4.2. Versuchsschema II:

- a) Ableitung der Kontrollwerte (IFP, $[K^+]_o$, SAP), Einwaschen von Ba^{2+} (2 mM)
- b) nach 30 Minuten Ableitung der Meßwerte unter Bariumeinfluß (IFP, $[K^+]_o$, SAP), Einwaschen des K2P-Blockers (500 μ M Quinin)
- c) nach weiteren 30 Minuten erneute Ableitung der Meßwerte unter Ba^{2+} und K2P-Blocker (IFP, $[K^+]_o$, SAP)
- d) nach 60 Minuten unter Ba^{2+} und K2P-Blocker erneute Ableitung der Meßwerte (IFP, $[K^+]_o$, SAP)
- e) fakultativ: Auswaschen des K2P-Blockers und Ba^{2+} durch Perfusion mit normaler ACSF und Ableitung der Meßwerte nach Auswaschphasen unterschiedlicher Dauer (IFP, $[K^+]_o$, SAP).

Die Ableitung der Meßwerte für jede experimentelle Phase bestand zumindest aus:

- a) 5 Summenaktionspotentialen (SAP) unter Reizung in der Intensität, welche unter Kontrollbedingungen nötig war, um 50 % der maximalen Reizantwort zu generieren (20 Sekunden Abstand)
- b) 5 Summenaktionspotentialen (SAP) unter Reizung in der Intensität, welche unter Kontrollbedingungen nötig war, um 100 % der maximalen Reizantwort zu generieren (20 Sekunden Abstand)
- c) 2 Kaliumanstiegen durch repetitive Reizung unterschiedlicher Reizstärke (30 – 80 % der Reizstärke für maximale Reizantwort unter Kontrollbedingungen und 50 – 100 % der Reizstärke für maximale Reizantwort unter Kontrollbedingungen) mit 3 Minuten Abstand
- d) 2 iontophoretisch induzierten Kaliumanstiegen unterschiedlicher Stromstärke mit 3 Minuten Abstand.

2.5. Auswertung

Die Auswertung der abgeleiteten Meßwerte erfolgte später offline und schloß die schnellen, transienten Feldpotentialänderungen als Stimulusantwort (SAP), die Kalium-Baseline, den

Anstieg der $[K^+]_o$ sowie die IFP unter dem Kaliumanstieg, welcher durch die Stimulusfolgen bzw. durch die iontophoretische Applikation von Kalium induziert wurde, für alle 4 oder 5 Phasen des Experimentes (a – e nach den Schemata unter 2.4.1. und 2.4.2.) ein. Hierfür wurde der Auswertungsmodus des Programms Spike 2 verwandt. Die 5 SAP wurden durch Spike 2 gemittelt und die Amplitude als Differenz zwischen dem maximalen Ausschlag und der Baseline vor dem Reiz abgelesen (Abb. 2.2.D). Die Amplituden der IFP wurden ebenfalls als Differenz zwischen der maximalen Änderung und der Baseline vor dem Stimulus ermittelt (Abb. 2.2.C). Für die Ermittlung der Kaliumanstiege mußten die als Spannung gespeicherten Daten der Baseline vor dem Anstieg und die Höchstwerte des Anstiegs mittels einer angepaßten Nernst-Gleichung in eine Konzentration in mM umgerechnet werden, um dann als Differenz den Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration zu ergeben (siehe Abb. 2.2.B).

Aus der allgemeinen Nernst-Gleichung:

$$U = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} * \ln \frac{c(a)}{c(i)} \quad \text{mit}$$

R = allgemeiner Gaskonstante,
 T = absoluter Temperatur,
 z = Wertigkeit des Ions,
 F = Faraday-Konstante,
 ln = natürlicher Logarithmus,
 c = Konzentration des Ions außer- (a) und innerhalb (i) der Membran

wird nach Einsetzen von Kalium und Errechnen der Konstanten:

$$E(K) = 58mV * \log \frac{\Delta c(K)}{c(K \text{ base})} \quad \text{mit}$$

E(K) = Spannungspotential für Kalium,
 58 mV = Spannungsdifferenz der ionensensitiven Meßelektrode bei 10-facher Konzentrationsänderung (zwischen 57 – 60 mV),
 log = dekadischer Logarithmus,
 Δc(K) = Konzentrationsänderung von Kalium,
 c(K base) = Konzentration der Kaliumbaseline vor Stimulus

Diese Gleichung kann dann auf die Kaliumkonzentration umgestellt und somit errechnet werden.

Für alle Parameter wurden Mittelwerte und Standardfehler der Meßwerte und der entsprechenden prozentualen Anteile vom Kontrollwert ((Meßwert/Kontrollwert)*100) errechnet. Dann wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft (Shapiro-Wilk-Test). Da häufig keine Normalverteilung vorlag, kamen parameterfreie Tests zur Anwendung. Statistisch signifikante Unterschiede durch die Blocker wurden mit Friedmans ein-faktorieller Varianzanalyse nach Rang (Friedman-Test für abhängige Stichproben; Paar-Vergleiche der Werte unter Kontrollbedingungen und nach Blockerapplikation) bestimmt.

Um die Wirkungen zwischen den Blockern und zwischen den Geweben vergleichen zu können, wurden die Werte der jeweiligen Experimentabschnitte zum Kontrollwert normiert ((Meßwert –

Kontrollwert) / Kontrollwert), in Prozent angegeben und dann mit dem Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben ausgewertet.

In allen Diagrammen und Tabellen sind die statistischen Ergebnisse der Paarvergleiche (Friedman-Test, Kruskal-Wallis-Test) angegeben. Da die Auswaschphasen nur fakultativ an kleinen Gruppen von Gewebeschnitten erfolgten, wurden diese nicht in die statistischen Vergleiche einbezogen. Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen. Der statistische Vergleich wurde mit dem Programm SPSS Version 18.0 (Fa. SPSS, Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Um Effekte der pharmakologischen Modulation von Kir- und K2P-Kanälen auf die Freisetzung von Kalium während neuronaler Aktivität zu untersuchen, nutzen wir repetitive Reizung des Alveus, in dem die Axone der CA1-Pyramidenzellen in Richtung Subiculum und in Richtung Fimbria Fornix verlaufen. Allerdings finden sich im Alveus auch Axone der temporo-ammonischen Bahn, die orthodrom Informationen aus dem entorhinalen und perirhinalen Cortex in die CA1-Region übertragen. Zum Ausschluß synaptischer Aktivität erfolgten sämtliche Messungen in Anwesenheit der Glutamat-Rezeptor-Antagonisten 2-APV und CNQX. Die elektrische Stimulation mittels Einzelpulsen im Alveus (0,1 ms Pulsdauer; 20 s Interpuls-Intervall) mit Erhöhung der Pulsintensität (2 – 12 V) führte zu größer werdenden negativen Summenaktionspotentialen (SAP) bis hin zu einem Maximalwert. Dabei handelt es sich um SAP aus den antidrom aktivierten Pyramidenzellen der Region CA1. Die Amplituden dieser Signale sind ein Maß der aktivierten Neurone. Ein Ausfall dieser Signale bei antidromer Reizung kann entweder auf Blockade von Natriumkanälen in Folge starker Depolarisation der Neurone durch Blockade von Kaliumkanälen oder durch lokal anästhetische Wirkungen bedingt sein.

Die gemittelten Maximalwerte der SAP in den durchgeführten Experimenten waren $-7,9 \pm 0,6$ mV für das Kontrollgewebe (n = 34; 23 Tiere; Wistar-Ratte).

Die repetitive elektrische Stimulation des Alveus resultierte in einem Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[K^+]_o$) und begleitenden negativen langsamen Feldpotentialänderungen (IFP), welche von der Stimulusfrequenz, der Intensität und der Dauer der Stimulusfolge abhängig sind (Nixdorf-Bergweiler et al. 1994). In den hier durchgeführten Untersuchungen wurden Stimulusfolgen von 10 s Dauer mit einer Frequenz von 20 Hz mit niedriger und höherer Stimulusintensität genutzt. Diese Reizfrequenz führte nicht zu langanhaltenden Änderungen der Reizantworten (LTP). Im Kontrollgewebe führten Stimulusintensitäten, welche durchschnittlich $39,6 \pm 2,3$ % bzw. $66,8 \pm 3,6$ % der maximalen Amplitude der SAP verursachten, zu Anstiegen der $[K^+]_o$ von $1,02 \pm 0,06$ mM bzw. $1,96 \pm 0,13$ mM (n = 34) und zu IFP von $-0,15 \pm 0,02$ mV bzw. $-0,37 \pm 0,03$ mV (n = 34).

Auf ähnliche Weise führten für 20 s applizierte Iontophoreseströme von durchschnittlich $177,6 \pm 19,5$ nA und $307,6 \pm 30,7$ nA im Kontrollgewebe zu Anstiegen der $[K^+]_o$ von $1,08 \pm 0,07$ mM bzw. $1,93 \pm 0,12$ mM (n = 33) und zu IFP von $-0,19 \pm 0,03$ mV bzw. $-0,32 \pm 0,05$ mV (n = 19). Die Amplitude dieser Signale hängt von der Intensität des Iontophoresestroms und vom Abstand zwischen Iontophorese- und Meßelektrode ab (Nicholson und Phillips 1981). Solche Signale

werden durch Applikation von TTX weitgehend unbeeinflusst gelassen, was darauf hindeutet, daß die induzierten Kaliumsignale nicht zu starker Aktivierung der Neurone führen (Jauch et al. 2002). Veränderungen dieser Signale können deshalb auf Veränderungen der Kaliumaufnahme in Zellen zurückgeführt werden.

Reiz- und Iontophorese-Signale werden im Stratum pyramidale (SP) von negativen IFP begleitet. Die Anstiege der $[K^+]_o$ und die Amplituden der negativen IFP korrelieren negativ miteinander (Spearman-Rho: $r = -0,715$; $p < 0,001$; $n = 66$ für repetitive Reizung und $r = -0,561$; $p < 0,001$; $n = 36$ für Iontophorese im Kontrollgewebe). Das Ergebnis entspricht der bereits 1975 durch Krnjevic und Morris veröffentlichten positiven Korrelation von Kaliumanstieg und absoluter Größe der begleitenden IFP.

Im folgenden Text und in den Tabellen sowie in den Abbildungen 3.5. und 3.8. sind die durch verschiedene K2P-Blocker oder an verschiedenen Geweben bewirkten Veränderungen von Anstiegen der $[K^+]_o$ und der negativen IFP als Mittelwerte normierter Differenzen in Prozent ($((\text{Meßwert} - \text{Kontrollwert}) / \text{Kontrollwert}) * 100$) angegeben. Im Unterschied dazu werden in den anderen Ergebnisdiagrammen (jeweils Abschnitt D) die Mittelwerte der Größen der Kaliumanstiege als Prozent des jeweiligen Kontrollwertes ($(\text{Meßwert} / \text{Kontrollwert}) * 100$) gezeigt und statistisch anhand der Paarvergleiche des Friedman-Tests miteinander verglichen.

3.1. Untersuchungen am Kontrollgewebe (Wistar-Ratten)

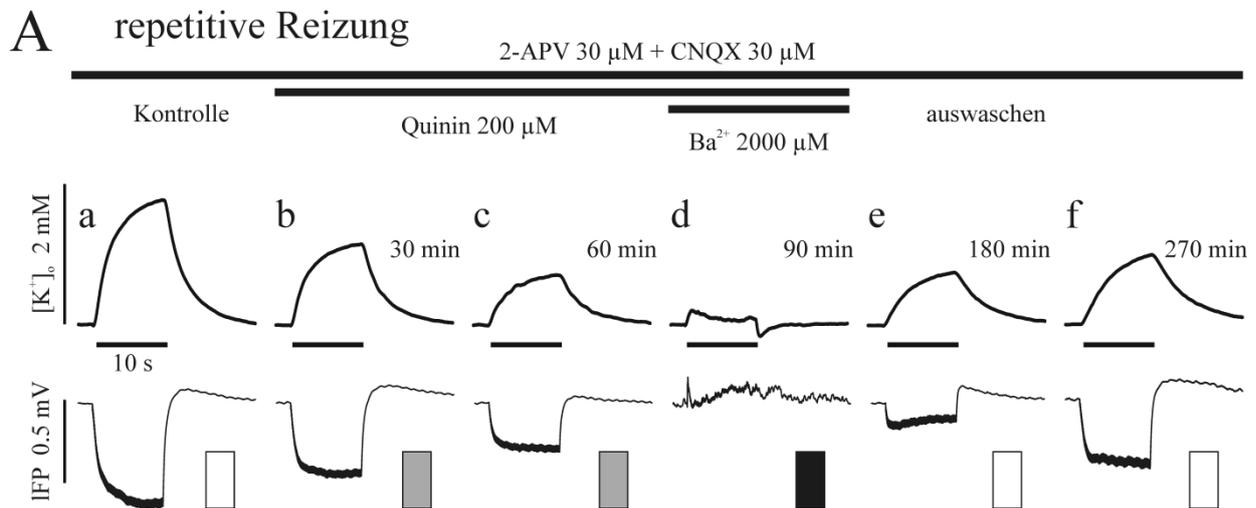
3.1.1. Bestimmung des Einflusses von TWIK-1, TASK-1, TASK-2, TASK-3, TREK-1 und TREK-2 durch Blockade mit Quinin

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, zeigten frühere Studien, daß TWIK-1-, TASK-1-, TASK-2-, TASK-3-, TREK-1- und TREK-2-Kanäle durch Quinin inhibiert wurden. Der Einfluß dieser Kanäle im Hippocampus sollte bestimmt werden, um eine Beteiligung dieser Kanäle an der neuronalen Freisetzung und glialen Aufnahme von Kaliumionen nachzuweisen. Durch die additive Gabe von Ba^{2+} sollte dann ermittelt werden, ob Kir-Kanäle darüberhinausgehende Anteile an der Kaliumpufferung besitzen.

3.1.1.1. 200 μM Quinin vermindern den neuronalen Ausstrom von K^+ und vermindern geringfügig die gliale K^+ -Aufnahme

Unter Kontrollbedingungen (gekennzeichnet durch weißes Rechteck) stieg die $[\text{K}^+]_o$ während repetitiver Reizung des Alveus mit submaximaler Reizstärke deutlich an (Abb. 3.1.A.a, oben), daneben zeigte sich eine Negativierung des begleitenden Feldpotentials (Abb. 3.1.A.a, unten). Bereits nach 30-minütigem Einwaschen von 200 μM Quinin (gekennzeichnet durch das graue Rechteck) ist bei gleicher Reizstärke während repetitiver Stimulation ein deutlich kleinerer Anstieg der $[\text{K}^+]_o$ festzustellen (Abb. 3.1.A.b, oben), welcher nach weiteren 30 min und vermutlich voller Wirksamkeit des Quinin (insgesamt 60 min, ebenfalls graues Rechteck) nochmals abnahm (Abb. 3.1.A.c, oben). Auch die Amplitude der begleitenden IFP nahm unter 200 μM Quinin kontinuierlich und deutlich ab (Abb. 3.1.A.b und c, unten, ebenfalls gekennzeichnet durch graues Rechteck). Nach zusätzlichem Einwaschen von 2 mM Ba^{2+} (insgesamt 90 min im experimentellen Verlauf, gekennzeichnet durch schwarzes Rechteck) zur Blockade aller Kir-Kanäle waren kaum mehr Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ auszulösen (Abb. 3.1.A.d, oben), auch die Amplituden der begleitenden IFP nahmen nochmals ab bzw. wurden leicht positiv (Abb. 3.1.A.d, unten). Nach dem Auswaschen von Quinin und Ba^{2+} (wieder Kennzeichnung durch weißes Rechteck) waren wieder deutliche Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ während repetitiver Reizung zu erzielen, ohne jedoch das Ausgangsniveau zu erreichen (Abb. 3.1.A.e und f, oben). Nach längerem Auswaschen nahm der Anstieg noch zu, was für eine Lipophilie und erschwerte Auswaschbarkeit des Quinin spricht. Aus diesem Grunde wurde nicht bei jedem Experiment eine komplette Reversibilität der Effekte untersucht und dies nur exemplarisch in einigen Experimenten getan. Bei den begleitenden IFP zeigte sich ebenfalls eine Teilerholung der Amplituden ohne Erreichen der ursprünglichen Größe (Abb. 3.1.A.e und f, unten).

Abbildung 3.1.A.: Effekt von 200 μM Quinin auf durch repetitive Reizung ausgelöste Anstiege der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[\text{K}^+]_o$) und begleitender langsamer Feldpotentialänderungen (IFP) im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten



Beispielaufnahmen der experimentellen Abschnitte unter Kontrollbedingungen, unter 30 und 60 min Bad-Applikation von 200 μM Quinin, weiterer zusätzlicher 30 min Bad-Applikationen zusammen mit 2 mM Ba²⁺ und Auswaschen von Quinin und Ba²⁺ für 90 und 180 min:

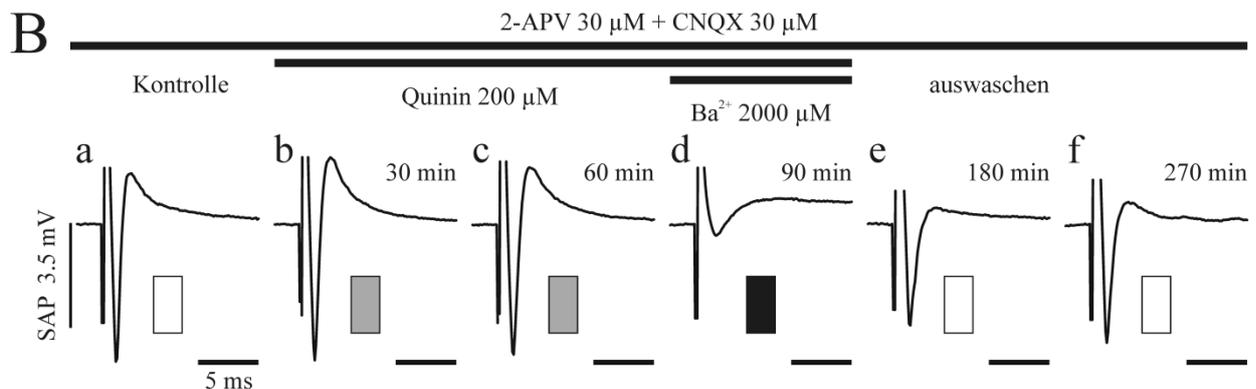
Anstiege der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[\text{K}^+]_o$ in mM, oben) und der langsamen Feldpotentialänderungen (IFP in mV, unten) ausgelöst durch repetitive Stimulation des Alveus (0,1 ms; 20 Hz; 60 %). Die waagerechten Balken zwischen den Graphen markieren die Dauer des Stimulus (10 s).

Ganz oben: die waagerechten Balken stellen die Perfusion mit den jeweiligen Substanzen während der experimentellen Abschnitte dar. Kontrolle: ca. 60 min Perfusion mit sulfatfreier ACSF und jeweils 30 μM 2-APV und CNQX. Die Zeit nach Kontrollbedingungen ist jeweils über dem Graphen des Kaliumanstiegs angegeben. Zusätzlich sind die jeweiligen experimentellen Abschnitte noch durch unterschiedlich eingefärbte Rechtecke markiert, welche sich zur Vereinfachung in den Diagrammen unter Teil D wiederfinden.

Die Veränderungen der Kaliumsignale können bei annähernd gleicher Erregung auf reduzierte Freisetzung zurückgeführt werden oder alternativ als Blockade der Entstehung von Aktionspotentialen (AP) bei Depolarisation oberhalb der Schwelle von Natriumströmen (Depolarisationsblockade) erklärt werden. Es wurden deshalb die Summenaktionspotentiale (SAP) und ihre Veränderungen analysiert. Hierbei wurden Reizstärken verwendet, die unter

Kontrollbedingungen (gekennzeichnet durch das weiße Rechteck) maximale Antworten auslösten (Abb. 3.1.B.a). Unter dem Einfluß von 200 μM Quinin (graue Rechtecke) zeigte sich eine kaum wahrnehmbare Abnahme der Amplitude (Abb. 3.1.B.b und c). Danach wurden 2 mM Ba^{2+} (schwarzes Rechteck) eingewaschen und nach weiteren 30 min wieder die Amplituden der SAP bestimmt. Nun zeigte sich eine deutliche Abnahme bzw. Auslöschung der Amplituden (Abb. 3.1.B.d). Nach dem Auswaschen von 200 μM Quinin und 2 mM Ba^{2+} (erneut weiße Rechtecke) zeigte sich eine Teilerholung der SAP-Amplituden (Abb. 3.1.B.e und f). In jedem Abschnitt sind der Reizartefakt und ca. 1 – 2 ms später die SAP deutlich zu erkennen.

Abbildung 3.1.B.: Effekt von 200 μM Quinin auf die Summenaktionspotentiale (SAP) der Pyramidenzellen in der CA1 normaler Ratten nach Stimulation im Alveus



Beispielaufnahmen der experimentellen Abschnitte unter Kontrollbedingungen, unter 30 und 60 min Bad-Applikation von 200 μM Quinin, weiterer zusätzlicher 30 min Bad-Applikationen zusammen mit 2 mM Ba^{2+} und Auswaschen von Quinin und Ba^{2+} für 90 und 180 min:

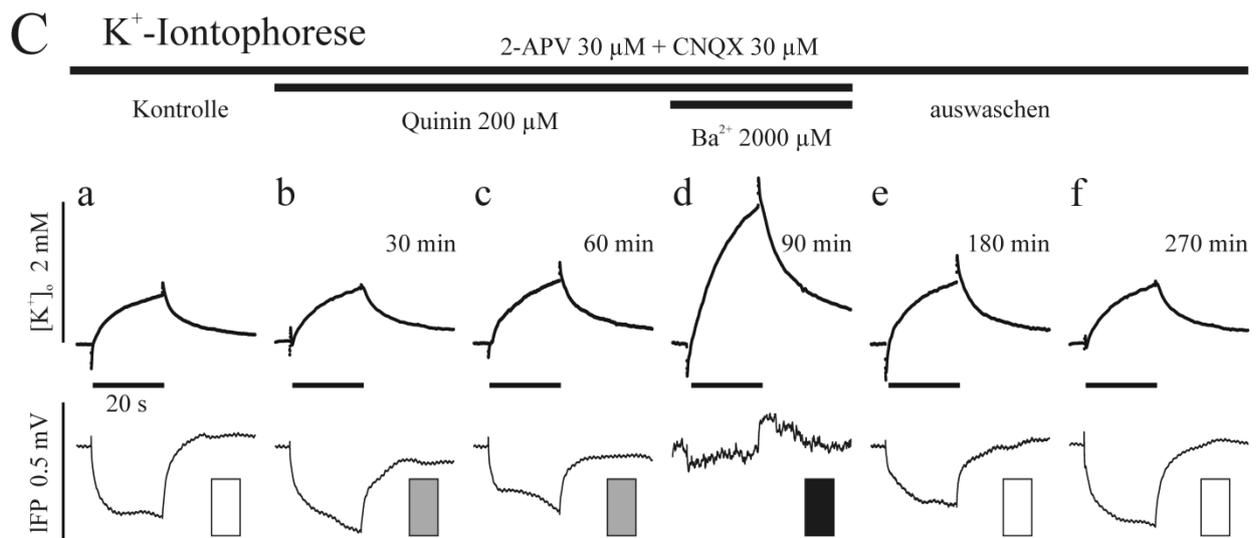
gemittelte Summenaktionspotentialamplituden (SAP in mV) ausgelöst durch 5 elektrische Einzelpulse im Alveus (0,1 ms; 0,05 Hz; 100 %) je experimentellem Abschnitt.

Oben wieder die Balken zur Darstellung der Perfusion mit den jeweiligen Substanzen während der experimentellen Abschnitte. Kontrolle: ca. 60 min Perfusion mit sulfatfreier ACSF und jeweils 30 μM 2-APV und CNQX. Die Zeit nach Kontrollbedingungen ist über dem Graph des SAP angegeben. Zusätzlich wieder Kennzeichnung der jeweiligen experimentellen Abschnitte durch eingefärbte Rechtecke, welche sich in den Diagrammen unter Teil D wiederfinden.

Neben Veränderungen in der Freisetzung von Kalium können auch Veränderungen in der Aufnahme von Kalium in Gliazellen eine Rolle spielen. Wir haben deshalb Kalium mit Hilfe

einer Iontophoreselektrode künstlich appliziert. Veränderungen in der Amplitude dieser Signale lassen auf eine veränderte zelluläre Aufnahme schließen. Unter Kontrollbedingungen (weißes Rechteck) führte die extrinsische Applikation von Kaliumionen mittels Iontophorese ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg der $[K^+]_o$ (Abb. 3.1.C.a, oben). Auch hierbei war ein deutlich negatives IFP zu messen (Abb. 3.1.C.a, unten). Unter Einfluß von 200 μM Quinin (graue Rechtecke) zeigte sich nach zunächst 30 min eine kaum wahrnehmbare, nach weiteren 30 min jedoch eine wahrnehmbare Erhöhung der iontophoretisch bedingten Änderung der $[K^+]_o$ (Abb. 3.1.C.b und c, oben). Die negativen Amplituden der die $[K^+]_o$ -Anstiege begleitenden IFP nahmen jedoch deutlich erkennbar ab (Abb. 3.1.C.b und c, unten). Die dann hinzugefügten 2 mM Ba^{2+} (schwarzes Rechteck) erhöhten die Anstiege der $[K^+]_o$ nach weiteren 30 min nochmals deutlich (Abb. 3.1.C.d, oben), wohingegen die Amplituden der IFP nochmals deutlich abnahmen bzw. positiv wurden (Abb. 3.1.C.d, unten). Nach dem Auswaschen von Quinin und Ba^{2+} (wiederum weiße Rechtecke) zeigte sich in den iontophoretisch induzierten Anstiegen der $[K^+]_o$ wieder eine Verringerung, welche jedoch deutlich über dem Ausgangsniveau unter Kontrollbedingungen blieb (Abb. 3.1.C.e und f, oben). Auch die Amplituden der begleitenden IFP nahmen wieder deutlich zu und erreichten nahezu Ausgangsniveau (Abb. 3.1.C.e und f, unten).

Abbildung 3.1.C.: Effekt von 200 μM Quinin auf durch Iontophorese ausgelöste Anstiege der $[K^+]_o$ und der IFP im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten



Beispielaufnahmen der experimentellen Abschnitte unter Kontrollbedingungen, unter 30 und 60 min Bad-Applikation von 200 μM Quinin, weiterer zusätzlicher 30 min Bad-Applikationen zusammen mit 2 mM Ba^{2+} und Auswaschen von Quinin und Ba^{2+} für 90 und 180 min:

Anstiege der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[K^+]_o$ in mM, oben) und der langsamen Feldpotentialänderungen (IFP in mV, unten) induziert durch K^+ -Iontophorese (Ejektionsstrom 100 nA). Die waagerechten Balken markieren die Dauer der Iontophorese-Applikation (20 s).

Oben wieder die Balken zur Darstellung der Perfusion mit den jeweiligen Substanzen während der experimentellen Abschnitte. Kontrolle: ca. 60 min Perfusion mit sulfatfreier ACSF und jeweils 30 μ M 2-APV und CNQX. Die Zeit nach Kontrollbedingungen ist über dem Graph des Kalium-Signals angegeben. Zusätzlich wieder Kennzeichnung der jeweiligen experimentellen Abschnitte durch eingefärbte Rechtecke, welche sich in den Diagrammen unter Teil D wiederfinden.

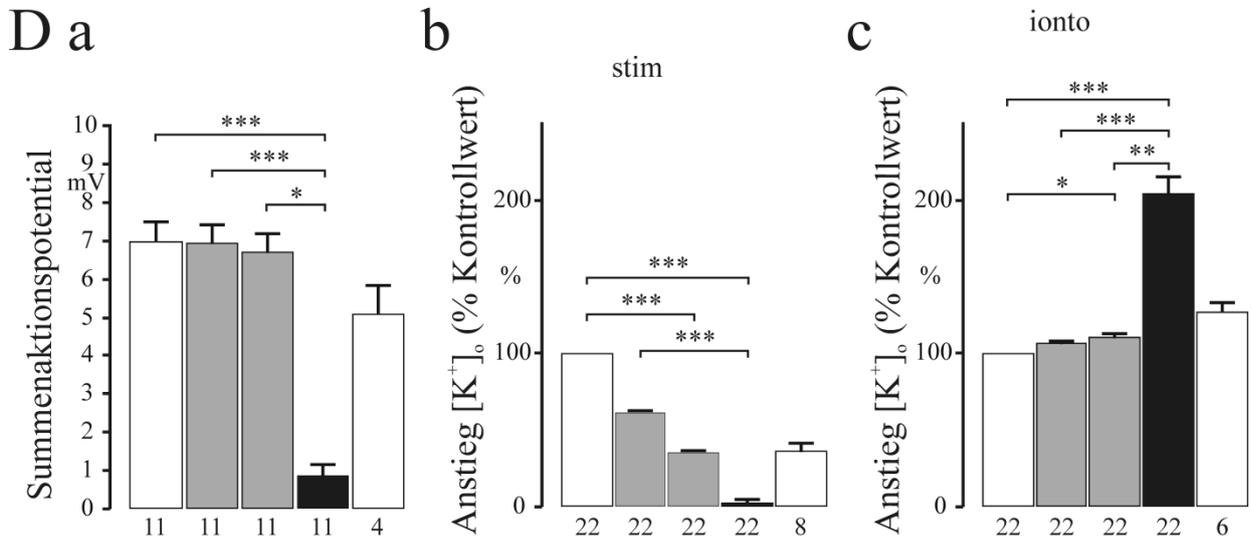
Die quantitative Analyse sämtlicher unter 200 μ M Quinin durchgeführten Messungen ist in den Ergebnisdiagrammen in Abbildung 3.1.D und zusätzlich in Tabelle 3.1. dargestellt (11 Hirnschnitte). Die gemittelten normierten Differenzen ((Meßwert – Kontrollwert) / Kontrollwert) nach 60 min Applikation von 200 μ M Quinin ergaben eine signifikante Minderung der durch repetitive Reizung induzierten Anstiege der $[K^+]_o$ ($-64,9 \pm 1,6$ %). Dies entspricht einem verbleibenden Kaliumanstieg von $35,1 \pm 1,6$ % (graue Säule, 60 min in Abb. 3.1.D.b; n = 22; 11 Hirnschnitte; p < 0,001) vom Kontrollwert (100 %, weiße Säule). Die Amplituden der begleitenden IFP verminderten sich um $52,1 \pm 4,3$ % (n = 22; 11 Hirnschnitte; p < 0,001; ohne Abb.). Nach Zugabe von 2 mM Ba^{2+} zu Quinin (schwarze Säule) waren die Kaliumsignale fast vollständig blockiert ($-97,5 \pm 1,9$ %; entsprechend einem verbleibenden Kaliumanstieg von $2,5 \pm 1,9$ % vom Kontrollwert; n = 22; 11 Hirnschnitte; p < 0,001; Abb. 3.1.D.b), auch die Amplituden der begleitenden IFP wurden hochsignifikant gemindert und leicht ins Positive umgekehrt ($-104,3 \pm 3,6$ %; n = 22; 11 Hirnschnitte; p < 0,001; ohne Abb.).

Bei den Amplituden der maximalen SAP nach Reizung zeigte sich eine nicht signifikante Minderung von $-7,0 \pm 0,5$ mV auf $-6,7 \pm 0,5$ mV ($-4 \pm 2,6$ %; n = 11; 11 Hirnschnitte; p = 1,000; Abb. 3.1.D.a) unter 200 μ M Quinin (graue Säulen). Unter gemeinsamer Applikation von Quinin und 2 mM Ba^{2+} (schwarze Säule) ist der Abfall der Amplituden jedoch deutlich und signifikant auf $-0,9 \pm 0,3$ mV ($-87,2 \pm 4,9$ %; n = 11; 11 Hirnschnitte; p < 0,001; Abb. 3.1.D.a). Dies suggeriert, daß Quinin in der gewählten Konzentration die Erregbarkeit fast nicht ändert, während die Kaliumfreisetzung stark vermindert ist. Demnach erfolgt die Kaliumfreisetzung stark über K₂P-Ionenkanäle. Hingegen ist bei Zugabe von Ba^{2+} zu Quinin eine fast vollständige Blockade der SAP zu beobachten, was auf eine depolarisationsbedingte Blockade der Genese

von AP hindeuten könnte. Das Verschwinden der Kaliumsignale bei Kombination von Ba^{2+} mit Quinin findet hier seine Erklärung.

Die durch Iontophorese induzierten Anstiege der $[K^+]_o$ erhöhten sich leicht aber signifikant nach Gabe von 200 μM Quinin ($+10,5 \pm 2,5 \%$; entsprechend $110,5 \pm 2,5 \%$ des Kontrollwerts; $n = 22$; 11 Hirnschnitte; $p = 0,043$; Abb. 3.1.D.c; graue Säulen). Auch die begleitenden IFP änderten sich signifikant, diese wurden jedoch deutlich gemindert ($-34,2 \pm 4,2 \%$; $n = 10$; 5 Hirnschnitte; $p = 0,004$; ohne Abb.). Die zusätzliche Gabe von 2 mM Ba^{2+} zu Quinin (schwarze Säule) erhöhte den Anstieg der $[K^+]_o$ durch Iontophorese nochmals deutlich und hoch signifikant ($+104,2 \pm 11,1 \%$; entsprechend $204,2 \pm 11,1 \%$ des Kontrollwerts; $n = 22$; 11 Hirnschnitte; $p < 0,001$; Abb. 3.1.D.c). Die begleitenden IFP wurden hoch signifikant gemindert ($-92,6 \pm 4,1 \%$; $n = 10$; 5 Hirnschnitte; $p < 0,001$; ohne Abb.).

Abbildung 3.1.D.: graphische Darstellung der Effekte von 200 μM Quinin auf die Amplituden der SAP auf Einzelstimulus und die Anstiege der $[K^+]_o$ während repetitiver Reizung und iontophoretischer Kaliumapplikation



Ergebnisdiagramme für die Größe der Summenaktionspotentialamplituden (SAP in mV, a) und der Anstiege der $[K^+]_o$, dargestellt als Prozent vom Kontrollwert (100 %) (b und c). „stim“ und „ionto“ bedeuten „induziert durch Stimulation (repetitive Reizung)“ bzw. „induziert durch K^+ -Iontophorese“. Die Einfärbung der Säulen korrespondiert mit denen der Rechtecke in Teil A bis C zur Identifizierung der experimentellen Abschnitte. Die Säulen und Fehlerbalken stellen den Mittelwert und den Standardfehler des Mittelwertes dar. Die Ziffern unter den Säulen geben die

*Anzahl der Messungen wieder, bei SAP die Anzahl der untersuchten Hirnschnitte (a), bei den Kalium-Anstiegen die Anzahl der Messungen (im Normalfall zwei Messungen pro Hirnschnitt, b und c). Die Sterne über den Klammern kennzeichnen die statistische Signifikanz für die Paarvergleiche des Friedman-Tests: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.*

3.1.1.2. 500 μM Quinin supprimieren den neuronalen Ausstrom von K^+ und vermindern die gliale K^+ -Aufnahme deutlich

In höherer Konzentration erzeugte Quinin ähnliche Ergebnisse wie in niedrigerer Konzentration (Abb. 3.2.A – D). Die qualitativen Effekte auf die $[\text{K}^+]_o$ und die begleitenden IFP während repetitiver Reizung sind in Abb. 3.2.A dargestellt. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich ein deutlicher Anstieg der $[\text{K}^+]_o$ und eine deutliche negative Verschiebung der begleitenden IFP (Abb. 3.2.A.a). Im Gegensatz zu 200 μM sind unter 500 μM Quinin die Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ bereits nach 30 min stark gemindert (Abb. 3.2.A.b, oben) wie auch die Amplitude der begleitenden IFP (Abb. 3.2.A.b, unten). Nach weiteren 30 min sind die Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ kaum mehr wahrnehmbar (Abb. 3.2.A.c, oben), ebenso wie die Amplitude des IFP (Abb. 3.2.A.c, unten). Nach zusätzlicher Ba^{2+} -Applikation sind beide Signale nicht mehr meßbar (Abb. 3.2.A.d). Das Auswaschen von Quinin und Ba^{2+} ist gegenüber der niedrigeren Konzentration deutlich verlangsamt, nach 90 min sind nur kleine Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ zu beobachten und die Amplitude der IFP ist gerade sichtbar (Abb. 3.2.A.e). Nach insgesamt sieben Stunden Auswaschen ist erst etwa das halbe Niveau des Ausgangswertes für den Anstieg der $[\text{K}^+]_o$ erreicht (Abb. 3.2.A.f, oben), die Amplitude des IFP erholt sich noch langsamer und erreicht nur einen Bruchteil des ursprünglichen Niveaus (Abb. 3.2.A.f, unten).

Die Wirkung von 500 μM Quinin auf die Amplituden der SAP nach Alveus-Reizung ist ebenfalls stärker als unter 200 μM . Nach 30 min zeigt sich bereits eine leichte Abnahme (Abb. 3.2.B.b), welche sich nach insgesamt 60 min noch verstärkte (Abb. 3.2.B.c). Unter zusätzlicher Ba^{2+} -Gabe waren keine Antworten mehr generierbar (Abb. 3.2.B.d). Nach längerem Auswaschen von Quinin und Ba^{2+} war zumindest eine deutliche Teilerholung der Reizantworten zu verzeichnen (Abb. 3.2.B.f). Dies belegt, daß Quinin appliziert mit 500 μM eine starke Reduktion der Kaliumfreisetzung bedingt, zu der aber auch eine Minderung der Erregbarkeit beiträgt.

Die Effekte auf die iontophoretisch verursachten Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ und der begleitenden IFP waren ebenfalls ausgeprägter als in niedrigerer Konzentration. Die Erhöhung des Anstiegs der $[\text{K}^+]_o$ war jeweils nach 30 und 60 min deutlich wahrnehmbar (Abb. 3.2.C.b und c, oben) und

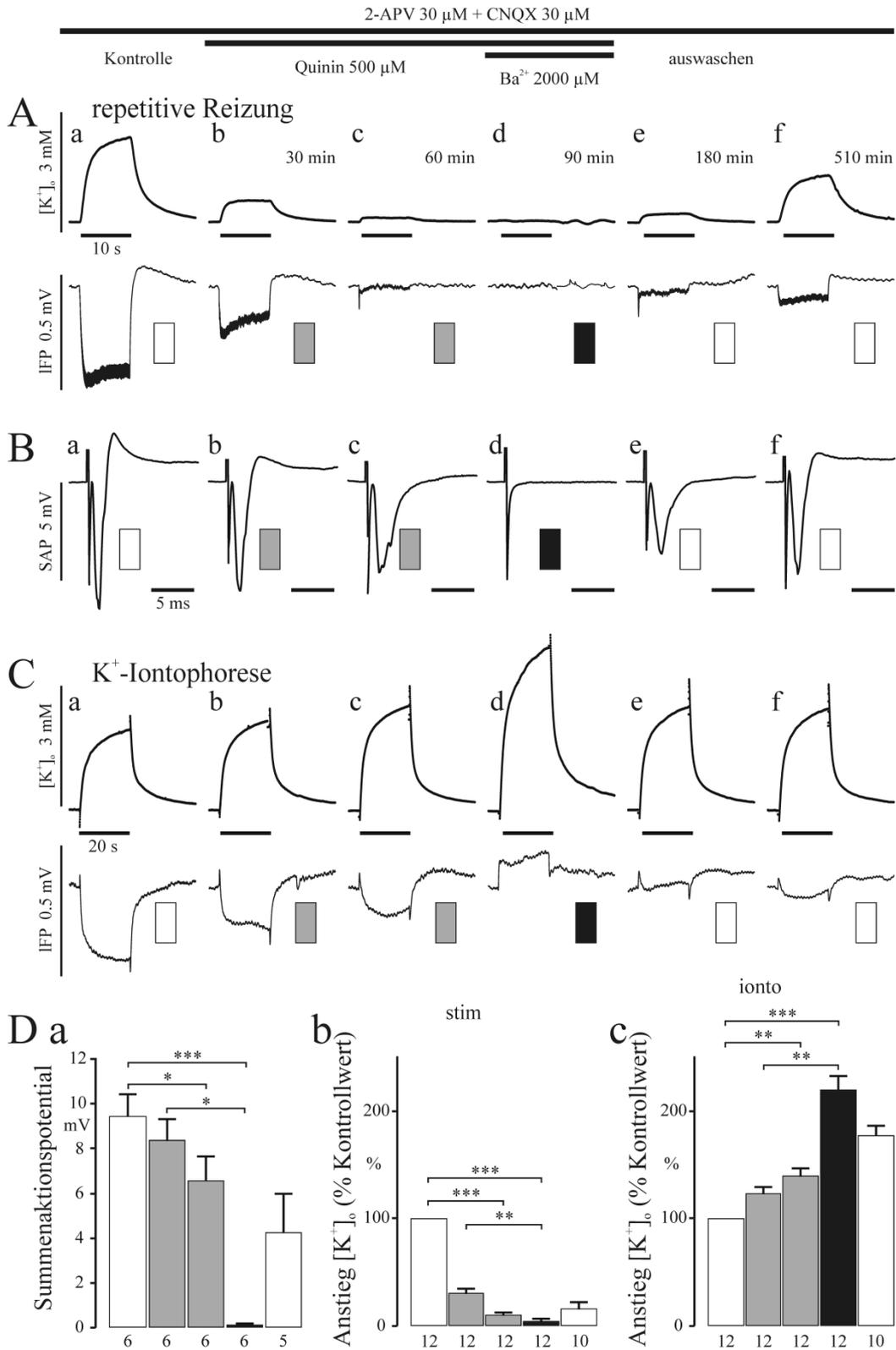
gipfelte bei kombinierter Gabe mit Ba^{2+} (Abb. 3.2.C.d, oben). Die Amplituden der begleitenden IFP nahmen stark ab (Abb. 3.2.C.b und c, unten), um in diesem Beispiel unter kombinierter Ba^{2+} -Gabe ins Positive umzuschlagen (Abb. 3.2.C.d, unten). Beim Auswaschen von Quinin und Ba^{2+} blieben die Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ länger erhöht (Abb. 3.2.C.e und f, oben), die Amplituden der IFP erholten sich wenig (Abb. 3.2.C.e und f, unten).

Die graphische Darstellung der quantitativen Effekte von 500 μM Quinin (graue Säulen in Abb. 3.2.D) bestätigt die stärkere Wirkung. Die durch repetitive Reizung verursachten Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ minderten sich deutlich und hoch signifikant ($-90,5 \pm 2,6 \%$; entsprechend einem verbleibenden Anstieg von $9,5 \pm 2,6 \%$ des Kontrollwerts; $n = 12$; 6 Hirnschnitte; $p < 0,001$; Abb. 3.2.D.b, graue Säulen) und waren unter kombinierter Gabe von 2 mM Ba^{2+} nahezu komplett erloschen ($-95,9 \pm 2,7 \%$; entsprechend einem verbleibenden Anstieg von $4,1 \pm 2,7 \%$ vom Kontrollwert; $n = 12$; 6 Hirnschnitte; $p < 0,001$; Abb. 3.2.D.b; schwarze Säule). Die Amplituden der begleitenden IFP schlugen schon unter vollständigem Quinineinfluß leicht ins Positive um ($-114,1 \pm 16,1 \%$; $n = 12$; 6 Hirnschnitte; $p < 0,001$; ohne Abb.), um nach zusätzlichem Ba^{2+} -Einfluß etwas weiter ins Positive anzusteigen ($-126,7 \pm 18,1 \%$; $n = 12$; 6 Hirnschnitte; $p < 0,001$; ohne Abb.).

Die Amplituden der SAP-Antworten auf Reizung im Alveus minderten sich deutlich und signifikant von $-9,4 \pm 1,0 \text{ mV}$ auf $-6,6 \pm 1,1 \text{ mV}$ ($-32,2 \pm 7,6 \%$; $n = 6$; 6 Hirnschnitte; $p = 0,044$; Abb. 3.2.D.a, graue Säulen) und waren unter zusätzlichem Ba^{2+} -Einfluß mit $-0,1 \pm 0,1 \text{ mV}$ kaum mehr auslösbar ($-98,7 \pm 0,8 \%$; $n = 6$; 6 Hirnschnitte; $p < 0,001$; Abb. 3.2.D.a, schwarze Säule).

Gegenüber Kontrollbedingungen (weiße Säule) zeigte sich ein durch Iontophorese verursachter deutlich höherer Anstieg der $[\text{K}^+]_o$ unter 500 μM Quinin ($+39,5 \pm 7,3 \%$; entsprechend $139,5 \pm 7,3 \%$ vom Kontrollwert; $n = 12$; 6 Hirnschnitte; $p = 0,009$; Abb. 3.2.D.c, graue Säulen), der unter additiver Ba^{2+} -Gabe nochmals deutlich größer wurde ($+120,0 \pm 12,5 \%$; entsprechend $220,0 \pm 12,5 \%$ vom Kontrollwert; $n = 12$; 6 Hirnschnitte; $p < 0,001$; Abb. 3.2.D.c, schwarze Säule). Die Amplituden der begleitenden IFP minderten sich unter Einfluß von 500 μM Quinin ebenfalls deutlich und signifikant ($-38,2 \pm 6,8 \%$; $n = 10$; 5 Hirnschnitte; $p = 0,019$; ohne Abb.), um unter zusätzlicher Ba^{2+} -Applikation weiter abzunehmen ($-85,1 \pm 13,3 \%$; $n = 10$; 5 Hirnschnitte; $p < 0,001$; ohne Abb.).

Abbildung 3.2.: Effekt von 500 μM Quinin auf durch repetitive Reizung und Iontophorese induzierte Anstiege der $[\text{K}^+]_o$, begleitender IFP und der SAP im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten



Die Art der Abbildungen und Bezeichnungen korrespondieren zu denen in Abbildung 3.1.A – D.

(A – C) Beispielaufzeichnungen der experimentellen Abschnitte unter Kontrollbedingungen, unter 30 und 60 min Bad-Applikation von 500 μM Quinin, zusätzlicher 30 minütiger Applikation zusammen mit 2 mM Ba^{2+} und Auswaschen von Quinin und Ba^{2+} für 1,5 und 7 Stunden.

(A) Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ (in mM, oben) und der IFP (in mV, unten) ausgelöst durch repetitive Stimulation im Alveus (0,1 ms; 20 Hz; 70 %) je experimentellem Abschnitt.

(B) gemittelte Summenaktionspotentialamplituden (SAP in mV) ausgelöst durch 5 elektrische Einzelpulse im Alveus (0,1 ms; 0,05 Hz; 100 %).

(C) Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ (in mM, oben) und IFP (in mV, unten) induziert durch K^+ -Iontophorese (Ejektionsstrom 200 nA).

(D) Ergebnisdiagramme für die Größe der Summenaktionspotentialamplituden (a, in mV) und der Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ in Prozent des Kontrollwerts (100 %) (b und c). Die Säulen und Fehlerbalken stellen wieder den Mittelwert und den Standardfehler des Mittelwertes dar, die Ziffern unter den Säulen und die Sternchen wie in Abbildung 3.1.

3.1.3. Bestimmung des Einflusses von TWIK-1, TASK-1, TASK-2, TREK-1 und TREK-2 durch Blockade mit Quinidin

Als Stereoisomer des Quinin hat Quinidin ein ähnliches pharmakologisches Profil und inhibiert somit auch nahezu die gleichen Kanäle, im einzelnen TWIK-1-, TASK-1-, TASK-2-, TREK-1- und TREK-2-Kanäle.

3.1.3.1. Die Wirkung von 500 μM Quinidin unterschied sich nicht von der von 500 μM Quinin

Die Experimente mit 500 μM Quinidin (Ergebnisse auch in Tabelle 3.1) ergaben sehr ähnliche Kurvenverläufe (ohne Abb.) für die Änderungen der $[\text{K}^+]_o$ sowie der begleitenden IFP wie unter 500 μM Quinin. Die Minderung der Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ während repetitiver Reizung war ähnlich stark ($-92,8 \pm 1,2$ %; n = 11; 6 Hirnschnitte; p < 0,001) und unter zusätzlichem Ba^{2+} (2 mM) ebenfalls kaum mehr auslösbar ($-99,6 \pm 0,3$ %; n = 11; 6 Hirnschnitte; p < 0,001).

Die Minderung der Amplituden der ausgelösten SAP-Signale unter Quinidineinfluß war deutlich erkennbar, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($-20,5 \pm 6,5$ %; n = 6; 6 Hirnschnitte; p = 0,877). Im Zusammenwirken mit 2 mM Ba^{2+} waren auch diese kaum mehr auslösbar ($-99,6 \pm 0,4$ %; n = 6; 6 Hirnschnitte; p = 0,010). Dies belegt, dass der Effekt von Quinidin in Bezug auf

die Verminderung der durch repetitive Reizung induzierten Kaliumsignale nicht so sehr auf Änderungen der Erregbarkeit zurückgeführt werden kann, sondern vielmehr auf einer verminderten Freisetzung von Kalium beruht.

Die durch Iontophorese verursachten Anstiege der $[K^+]_o$ stiegen auch unter Quinidin deutlich und signifikant an ($+30,3 \pm 4,4$ %; $n = 10$; 5 Hirnschnitte; $p = 0,040$), was sich nach additiver Ba^{2+} -Gabe nochmals deutlich verstärkte ($+115,3 \pm 24,8$ %; $n = 8$; 4 Hirnschnitte, $p < 0,001$). Die Amplituden der begleitenden IFP wurden unter Quinidin ebenfalls deutlich, jedoch nicht signifikant gemindert ($-78,1 \pm 10,4$ %; $n = 6$; 3 Hirnschnitte, $p = 1,000$), nahmen unter zusätzlichem Ba^{2+} weiter ab und kehrten sich in positive Werte um ($-135,3 \pm 17,6$ %; $n = 6$; 3 Hirnschnitte, $p = 0,010$).

3.1.4. Bestimmung des Einflusses von TASK-1, TASK-2, TASK-3 und TRESK durch Blockade mit Bupivacain

Um TASK- und TASK-ähnliche Kanäle einzeln zu testen, nutzen wir in weiteren Experimenten noch Bupivacain als Inhibitor dieser Kanäle, welches sich in früheren Veröffentlichungen als wirksames Agens erwies.

3.1.4.1. 200 μ M Bupivacain minderten den neuronalen Ausstrom von K^+ , beeinflussten die gliale K^+ -Aufnahme jedoch nicht

Die unter Kontrollbedingungen durch repetitive Reizung gut auslösbaren Anstiege der $[K^+]_o$ (Abb. 3.3.A.a, oben) waren schon nach kurzer Applikation (30 min) von 200 μ M Bupivacain nicht mehr auslösbar (Abb. 3.3.A.b und c, oben). Auch die Amplituden der begleitenden IFP, welche unter Kontrollbedingungen deutlich erkennbar sind (Abb. 3.3.A.a, unten), waren unter Bupivacaineinfluss erloschen (Abb. 3.3.A.b und c, unten). Dies änderte sich durch die zusätzliche Gabe von 2 mM Ba^{2+} nicht, die repetitive Reizung löste keine Signale mehr aus (Abb. 3.3.A.d). Auch nach sehr langer Auswaschphase (8 Stunden) von Bupivacain und Ba^{2+} ließen sich durch die repetitive elektrische Stimulation kaum Anstiege der $[K^+]_o$ auslösen (Abb. 3.3.A.f, oben), die Amplituden der begleitenden IFP waren gerade erkennbar (Abb. 3.3.A.f, unten).

Die Amplituden der SAP nach Einzelstimulus waren nach 30 min stark gemindert und nach 60 min nahezu erloschen (Abb. 3.3.B.b und c). Nach Addition von 2 mM Ba^{2+} waren dann keine

Potentiale mehr auszulösen (Abb. 3.3.B.d). Hier waren lange Auswaschphasen nötig, um eine Teilerholung zu erreichen (Abb. 3.3.B.e und f).

Die durch Iontophorese verursachten Anstiege der $[K^+]_o$ wurden durch Bupivacain auch nach 60 min nicht beeinflusst (Abb. 3.3.C.a – c, oben). Bei den begleitenden IFP war jedoch unter Bupivacain eine leichte Abnahme der Amplituden zu erkennen (Abb. 3.3.C.a – c, unten). Co-Applikation von 2 mM Ba^{2+} verursachte wiederum eine deutliche Erhöhung der Anstiege der $[K^+]_o$ (Abb. 3.3.C.d, oben), wobei die Amplitude der begleitenden IFP nochmals deutlich gemindert wurde (Abb. 3.3.C.d, unten). Nach Auswaschen beider Agentien waren die Anstiege der $[K^+]_o$ noch lange erhöht (Abb. 3.3.C.e und f, oben), auch die Amplituden der begleitenden IFP erreichten ihre ursprüngliche Größe nicht mehr (Abb. 3.3.C.e und f, unten).

Die quantitative Darstellung (auch Tabelle 3.1.) bestätigt die nahezu komplette Auslöschung der durch repetitive Reizung ausgelösten Anstiege der $[K^+]_o$ schon nach 30 min ($-99,5 \pm 0,4$ %; entsprechend einem verbleibenden Kaliumanstieg von $0,5 \pm 0,4$ % des Kontrollwerts; $n = 8$; 4 Hirnschnitte; $p = 0,006$; Abb. 3.3.D.b), was sich nach zusätzlicher Ba^{2+} -Gabe nicht änderte ($-99,5 \pm 0,4$ %; entsprechend einem verbleibenden Kaliumanstieg von $0,5 \pm 0,4$ % des Kontrollwerts; $n = 8$; 4 Hirnschnitte; $p = 0,016$). Die begleitenden IFP waren ebenfalls komplett supprimiert ($-100 \pm 0,0$ %; $n = 8$; 4 Hirnschnitte; $p = 0,008$ nach Bupivacain und $-100 \pm 0,0$ %; $n = 8$; 4 Hirnschnitte; $p = 0,008$ mit zusätzlichem Ba^{2+} , ohne Abb.).

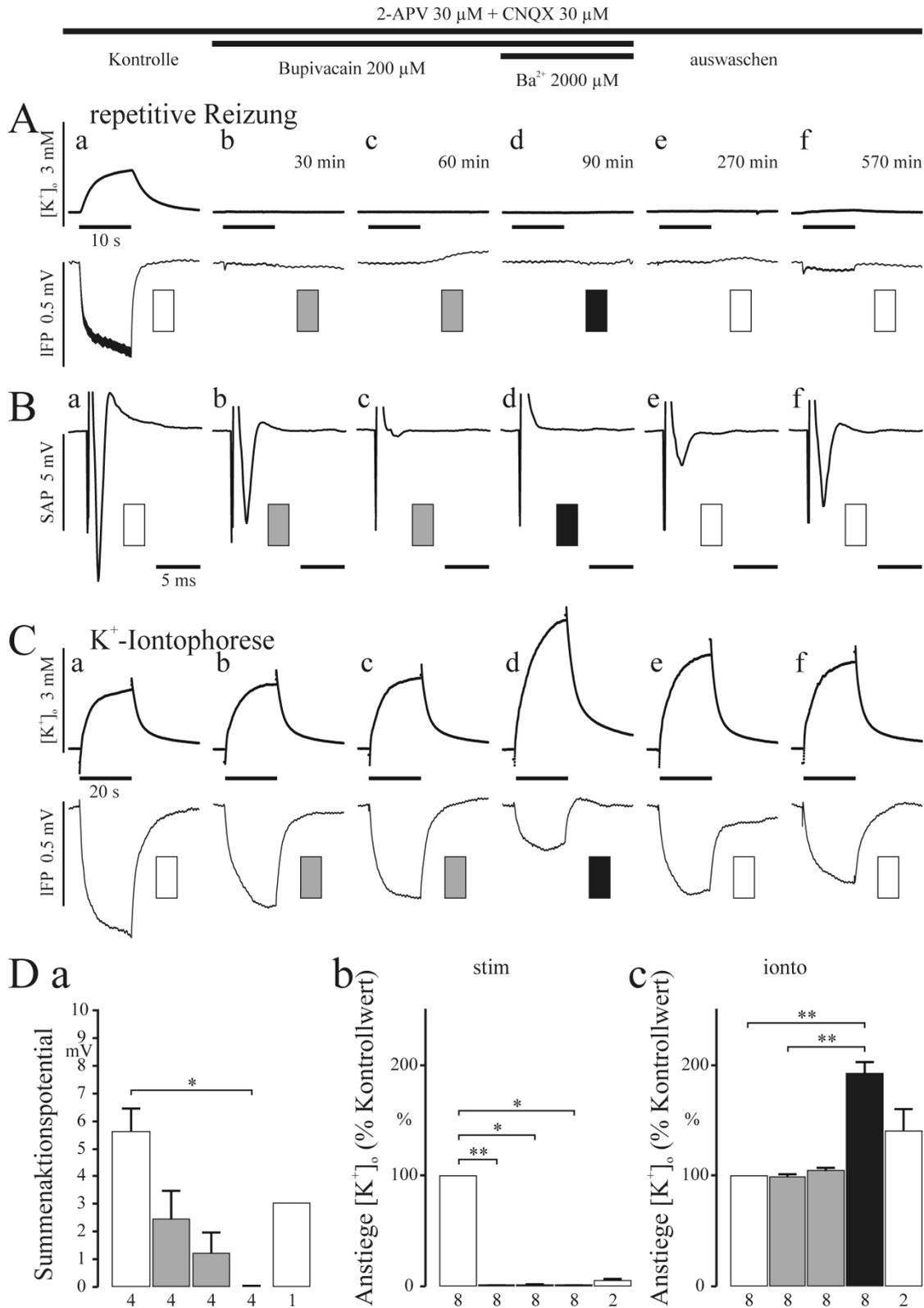
Die Amplituden der SAP minderten sich unter Bupivacain deutlich von $-5,6 \pm 0,8$ mV auf $-1,2 \pm 0,8$ mV ($-76,3 \pm 16,1$ %; $n = 4$; 4 Hirnschnitte; $p = 0,240$; whs. wegen geringer Gruppengröße nicht signifikant; Abb. 3.3.D.a) und waren unter zusätzlichem Ba^{2+} -Einfluß mit $0,0 \pm 0,0$ mV nicht mehr auslösbar ($-100 \pm 0,1$ %; $n = 4$; 4 Hirnschnitte; $p = 0,010$; Abb. 3.3.D.a).

Die iontophoretisch verursachten Anstiege der $[K^+]_o$ blieben unter Bupivacaineinfluß auf nahezu gleichem Niveau ($+4,2 \pm 2,6$ %; entsprechend $104,2 \pm 2,6$ % vom Kontrollwert; $n = 8$; 4 Hirnschnitte; $p = 1,000$; Abb. 3.3.D.c), erhöhten sich nach Ba^{2+} -Co-Applikation jedoch deutlich ($+92,5 \pm 10,8$ %; entsprechend $192,5 \pm 10,8$ % vom Kontrollwert; $n = 8$; 4 Hirnschnitte; $p = 0,003$; Abb. 3.3.D.c). Die Amplituden der begleitenden IFP minderten sich jeweils deutlich jedoch nicht signifikant ($-26,8 \pm 2,8$ %; $n = 2$; 1 Hirnschnitt bzw. $-76,8 \pm 11,2$ %; $n = 2$; 1 Hirnschnitt; $p = 0,145$; ohne Abb.). Bupivacain hemmt als Lokalanästhetikum spannungsabhängige Natriumkanäle. Hierdurch wird der Natriumeinstrom zur nötigen Depolarisation für das Aktionspotential verhindert, was die deutliche Minderung/Blockade der SAP erklärt. Der auf den Natriumeinstrom folgende Kaliumausstrom eines Aktionspotentials entfällt, was die deutliche

Ergebnisse

Abnahme bzw. die komplette Blockade der ursprünglich durch repetitive Reizung ausgelösten Anstiege der $[K^+]_o$ und der begleitenden Änderungen der IFP erklärt.

Abbildung 3.3.: Effekt von 200 μM Bupivacain auf durch repetitive Reizung und Iontophorese induzierte Anstiege der $[\text{K}^+]_o$, begleitender IFP und SAP im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten



Die Art der Abbildungen und Bezeichnungen korrespondieren zu denen in Abbildung 3.1.A – D.

Ergebnisse

(A – C) Beispielaufzeichnungen der experimentellen Abschnitte unter Kontrollbedingungen, unter 30 und 60 min Bad-Applikation von 200 μM Bupivacain, zusätzlicher 30 minütiger Applikation zusammen mit 2 mM Ba^{2+} und Auswaschen von Bupivacain und Ba^{2+} für 3 und 8 Stunden.

(A) Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ (in mM, oben) und der LFP (in mV, unten) ausgelöst durch repetitive Stimulation im Alveus (0,1 ms; 20 Hz; 60 %) je experimentellem Abschnitt.

(B) gemittelte Summenaktionspotentialamplituden (SAP in mV) ausgelöst durch 5 elektrische Einzelpulse im Alveus (0,1 ms; 0,05 Hz; 100 %).

(C) Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ (in mM, oben) und LFP (in mV, unten) induziert durch K^+ -Iontophorese (Ejektionsstrom 180 nA).

(D) Ergebnisdiagramme für die Größe der Summenaktionspotentialamplituden (a, in mV) und der Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ normiert auf den Kontrollwert als 100 % (b und c). Die Säulen und Fehlerbalken stellen wieder den Mittelwert und den Standardfehler des Mittelwertes dar, die Ziffern unter den Säulen und die Sternchen wie in Abbildung 3.1.

Tabelle 3.1.: Wirkungen der K2P-Kanal-Blocker auf die durch repetitive Reizung induzierten Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[K^+]_o$ stim), der langsamen Feldpotentialänderungen (IFP stim) und der maximalen Summenaktionspotentiale (SAP max) sowie der iontophoretisch verursachten Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[K^+]_o$ ionto) und der langsamen Feldpotentialänderungen (IFP ionto) im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten

Größe	K2P-Blocker	Anzahl	Kontrollwert	Änderung gegenüber	Signifikanz	Änderung gegenüber	Signifikanz
				Kontrollwert (60 min nur K2P-Blocker)		Kontrollwert (90 min K2P-Blocker, 30 min Ba^{2+})	
	μM	n	mM	%	p	%	p
$[K^+]_o$ stim	200 Quinin	22	1,56 ± 0,17	-64,93 ± 1,62	***	-97,49 ± 1,91	***
	500 Quinin	12	1,79 ± 0,23	-90,54 ± 2,63	***	-95,94 ± 2,74	***
	500 Quinidin	11	1,68 ± 0,22	-92,78 ± 1,16	**	-99,62 ± 0,29	***
	200 Bupivacain	8	1,11 ± 0,15	-99,45 ± 0,36	*	-99,47 ± 0,35	*
		n	mV	%	p	%	p
IFP stim	200 Quinin	22	-0,31 ± 0,04	-52,05 ± 4,25	***	-104,27 ± 3,59	***
	500 Quinin	12	-0,28 ± 0,04	-114,13 ± 16,08	***	-126,74 ± 18,10	***
	500 Quinidin	11	-0,28 ± 0,05	-92,79 ± 2,91	***	-100,00 ± 0,00	***
	200 Bupivacain	8	-0,19 ± 0,05	-100,00 ± 0,00	**	-100,00 ± 0,00	**
		N	mV	%	p	%	p
SAP max	200 Quinin	11	-6,98 ± 0,50	-4,03 ± 2,55		-87,22 ± 4,90	***
	500 Quinin	6	-9,44 ± 1,01	-32,22 ± 7,58	*	-98,72 ± 0,78	***
	500 Quinidin	6	-7,66 ± 1,10	-20,50 ± 6,53		-99,63 ± 0,37	*
	200 Bupivacain	4	-5,63 ± 0,82	-76,32 ± 16,14		-99,96 ± 0,04	*
		n	mM	%	p	%	p
$[K^+]_o$ ionto	200 Quinin	22	1,41 ± 0,13	+10,45 ± 2,52	*	+104,20 ± 11,07	***
	500 Quinin	12	1,26 ± 0,14	+39,49 ± 7,32	**	+120,04 ± 12,48	***
	500 Quinidin	10	2,14 ± 0,31	+30,33 ± 4,38	*	+115,32 ± 24,80 (n = 8)	***
	200 Bupivacain	8	1,62 ± 0,24	+4,20 ± 2,55		+92,50 ± 10,76	**
		n	mV	%	p	%	p
IFP ionto	200 Quinin	10	-0,33 ± 0,08	-34,18 ± 4,17	**	-92,55 ± 4,08	***
	500 Quinin	10	-0,21 ± 0,03	-38,19 ± 6,81	*	-85,05 ± 13,26	***
	500 Quinidin	6	-0,22 ± 0,09	-78,06 ± 10,36		-135,28 ± 17,58	*
	200 Bupivacain	2	-0,43 ± 0,18	-26,75 ± 2,75		-76,79 ± 11,21	

Spalten: K2P-Blocker: Angabe des Blockers und der applizierten Konzentration; Anzahl: N entspricht Anzahl der Hirnschnitte, n entspricht Anzahl der Messungen (gewöhnlich 2/Hirnschnitt); Kontrollwert: Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes der Meßgrößen (bestimmt nach 60 min Perfusion mit je 30 μM 2-APV und CNQX enthaltender sulfatfreier ACSF); Änderung gegenüber Kontrollwert (60 min nur K2P-Blocker): Mittelwert ± Standardfehler normierter Differenzen in Prozent des Kontrollwertes nach weiteren 60 min Perfusion mit zusätzlich enthaltenem K2P-Blocker allein; Änderung gegenüber Kontrollwert (90 Minuten K2P-Blocker, 30 min Ba^{2+}): Mittelwert ± Standardfehler normierter Differenzen in Prozent des Kontrollwertes nach weiteren 30 min Perfusion mit dem K2P-Blocker und 2 mM Ba^{2+} . Signifikante Änderungen (Vergleich der Meßwerte vor (Kontrolle) und nach Blocker-Applikation unter Nutzung des Friedman-Tests) sind mittels Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).*

3.1.5. Die Minderung von neuronalem K^+ -Ausstrom durch K2P-Kanal-Inhibitoren und 2 mM Ba^{2+} ist auch nachweisbar, wenn Ba^{2+} zuerst appliziert wird

Wie bereits bekannt (Gabriel et al. 1998), erhöhen 2 mM Ba^{2+} allein die durch repetitive Reizung induzierten Anstiege der $[K^+]_o$ innerhalb von 30 min um mehr als 100 % (Abb. 3.4.A.b, oben). Die negativen Amplituden der begleitenden IFP werden dabei stark vermindert und kehren ins Positive um (Abb. 3.4.A.b, unten). Werden nach dem Ba^{2+} zusätzlich 500 μ M Quinin appliziert, sind schon nach kurzer Zeit (30 min) keine Anstiege der $[K^+]_o$ durch repetitive Reizung auszulösen (Abb. 3.4.A.c und d, oben). Auch die Amplituden der begleitenden IFP sind dann nicht mehr erkennbar (Abb. 3.4.A.c und d, unten). Eine Teilerholung nach dem Auswaschen beider Blocker ist hierbei zu sehen (Abb. 3.4.A.e und f), diese erreichen jedoch nicht das Ausgangsniveau.

Bei den Amplituden der auf Einzelstimuli folgenden SAP zeigt sich eine leichte Zunahme unter Ba^{2+} (Abb. 3.4.B.b), erfolgt jedoch die Co-Applikation von 500 μ M Quinin, nehmen die Amplituden schnell ab und sind nach 60 min Co-Applikation kaum mehr auslösbar (Abb. 3.4.B.c und d). Im Beispielfall war eine nahezu komplette Amplitudenregeneration nach ca. 3 Stunden möglich (Abb. 3.4.B.e und f), im anderen experimentellen Fall jedoch nicht.

Unter Ba^{2+} -Einfluß erhöhten sich auch die iontophoretisch verursachten Anstiege der $[K^+]_o$ um mehr als 100 % (Abb. 3.4.C.b, oben), wohingegen die Amplituden der IFP deutlich abnahmen bzw. nicht mehr eruierbar waren (Abb. 3.4.C.b, unten). Nach zusätzlicher Gabe von Quinin blieben die Anstiege der $[K^+]_o$ auf nahezu gleichem Niveau (Abb. 3.4.C.c und d, oben), auch in den Signalformen der begleitenden IFP zeigten sich keine relevanten Änderungen (Abb. 3.4.C.c und d, unten). Nach Auswaschen beider Blocker blieben die durch Iontophorese induzierten Anstiege der $[K^+]_o$ deutlich erhöht (Abb. 3.4.C.e und f, oben), die IFP-Amplituden waren wieder nachweisbar (Abb. 3.4.C.e und f, unten).

Quantitativ ausgedrückt erhöhten sich die durch repetitive Reizung ausgelösten Anstiege der $[K^+]_o$ sehr deutlich ($+162,8 \pm 21,9$ %; entsprechend einem Kaliumanstieg von $262,8 \pm 21,9$ % des Kontrollwerts; $n = 8$; 4 Hirnschnitte; $p = 0,728$; Abbildung 3.4.D.b; schwarze Säule; auch Tabelle 3.2.) und fielen unter zusätzlichem Quinin komplett ab ($-100,0 \pm 0$ %; entsprechend verbliebenen 0 % Anstieg; $n = 8$; 4 Hirnschnitte; $p = 0,121$; Abbildung 3.4.D.b; dies war jedoch nur im Vergleich Ba^{2+} und Ba^{2+} -Quinin-Co-Applikation signifikant; $p = 0,001$). Die Amplituden der begleitenden IFP kehrten sich ins Positive um ($-298,0 \pm 38,0$ %; $n = 8$; 4 Hirnschnitte, $p <$

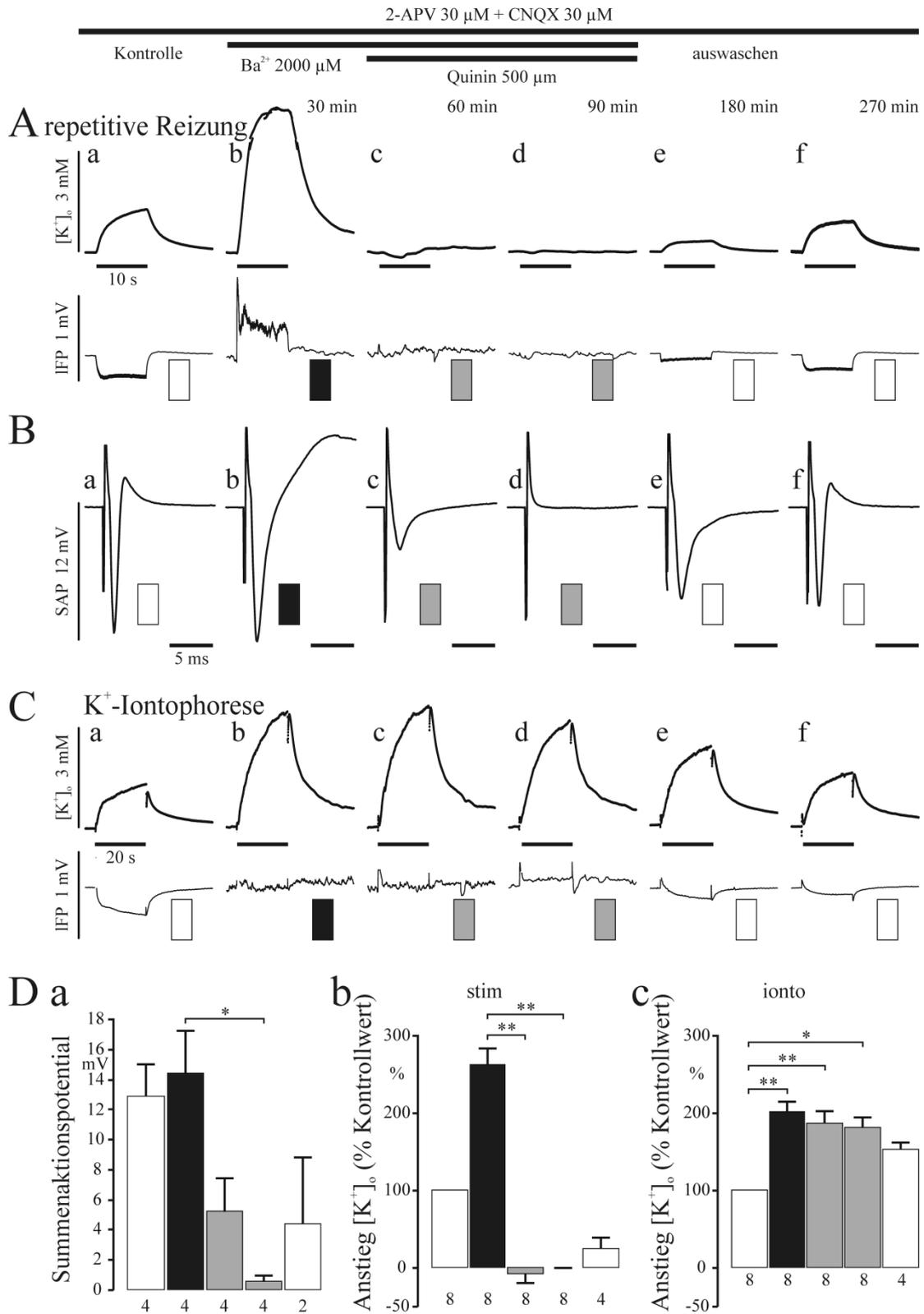
Ergebnisse

0,001; ohne Abb.), um nach zusätzlichem Quinineinfluß nicht mehr auslösbar zu sein ($-100,0 \pm 0,0$ %; $n = 8$; 4 Hirnschnitte, $p = 0,121$; ohne Abb.).

Die Amplituden der auf Einzelstimulus ausgelösten SAP wurden durch Ba^{2+} nur leicht von $-12,9 \pm 2,1$ mV auf $-14,4 \pm 2,8$ mV vergrößert ($+10,9 \pm 6,2$ %; $n = 4$; 4 Hirnschnitte; $p = 1,000$; Abb. 3.4.D.a; schwarze Säule), nach ausreichend langer zusätzlicher Quinin-Applikation waren diese dann mit $-0,6 \pm 0,4$ mV kaum mehr auslösbar ($-96,3 \pm 2,1$ %; $n = 4$; 4 Hirnschnitte; $p = 0,082$; Abb. 3.4.D.a; graue Säule, gegen alleinige Ba^{2+} -Gabe signifikant; $p = 0,016$).

Durch Iontophorese verursachte Anstiege der $[K^+]_o$ wurden unter Ba^{2+} verdoppelt ($+102,0 \pm 13,5$ %; entsprechend einem Anstieg von $202,0 \pm 13,5$ % des Kontrollwerts; $n = 8$; 4 Hirnschnitte; $p = 0,006$; Abb. 3.4.D.c; schwarze Säule) und blieben unter zusätzlicher Quiningabe weitgehend so hoch ($+81,6 \pm 12,7$ %; entsprechend $181,6 \pm 12,7$ % des Kontrollwerts; $n = 8$; 4 Hirnschnitte; $p = 0,040$; Abb. 3.4.D.c; graue Säule). Die Amplituden der begleitenden IFP nahmen unter Ba^{2+} schon deutlich ab ($-69,0 \pm 11,0$ %; $n = 8$; 4 Hirnschnitte; $p = 0,121$; ohne Abb.) und verminderten sich unter zusätzlichem Quinin weiter ($-88,6 \pm 10,0$; $n = 8$; 4 Hirnschnitte; $p < 0,001$; ohne Abb.).

Abbildung 3.4.: Effekt von 2 mM Ba²⁺ gefolgt von 500 µm Quinin auf durch repetitive Reizung und Iontophorese induzierte Anstiege der [K⁺]_o, begleitender IFP und der SAP im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten



Ergebnisse

Im Vergleich zu Abbildung 3.1. wurden die Zeitfolge und die Reihenfolge der Substanzapplikation geändert.

(A – C) Beispielaufzeichnungen für die experimentellen Abschnitte unter Kontrollbedingungen, 30-minütiger Applikation von 2 mM Ba²⁺, gefolgt von 30- und 60-minütiger Applikation zusammen mit 500 µM Quinin und Auswaschen von Ba²⁺ und Quinin für 90 und 180 min.

(A) Anstiege der [K⁺]_o (in mM, oben) und der LFP (in mV, unten) ausgelöst durch repetitive Stimulation im Alveus (0,1 ms; 20 Hz; 60 %) je experimentellem Abschnitt.

(B) gemittelte Summenaktionspotentialamplituden (SAP in mV) ausgelöst durch 5 elektrische Einzelpulse im Alveus (0,1 ms; 0,05 Hz; 100 %).

(C) Anstiege der [K⁺]_o (in mM, oben) und LFP (in mV, unten) induziert durch K⁺-Iontophorese (Ejektionsstrom 250 nA).

(D) Ergebnisdiagramme für die Größe der Summenaktionspotentialamplituden (a, in mV) und der Anstiege der [K⁺]_o, dargestellt als Prozent vom Kontrollwert (100 %) (b und c). Die Säulen und Fehlerbalken stellen wieder den Mittelwert und den Standardfehler des Mittelwertes dar, die Ziffern unter den Säulen und die Sternchen wie in Abbildung 3.1.

Ergebnisse

Tabelle 3.2.: Wirkungen des K2P-Kanal-Blockers Quinin (500 μM) auf die durch repetitive Reizung induzierten Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[\text{K}^+]_o$ stim), der langsamen Feldpotentialänderungen (IFP stim) und der Summenaktionspotentiale (SAP max) sowie der iontophoretisch verursachten Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration ($[\text{K}^+]_o$ ionto) und der langsamen Feldpotentialänderungen (IFP ionto) im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten bei vorheriger Ba^{2+} -Gabe (2 mM)

Größe	Anzahl	Kontrollwert	Änderung gegenüber	Signifikanz	Änderung gegenüber	Signifikanz
			Kontrollwert (30 min nur Ba^{2+})		Kontrollwert (90 min Ba^{2+} , 60 min 500 μM Quinin)	
	n	mM	%	p	%	p
$[\text{K}^+]_o$ stim	8	$1,22 \pm 0,25$	$+162,75 \pm 21,93$		$-100,00 \pm 0,00$	**
	n	mV	%	p	%	p
IFP stim	8	$-0,25 \pm 0,08$	$-298,04 \pm 37,95$	***	$-100,00 \pm 0,00$	
	N	mV	%	p	%	p
SAP max	4	$-12,92 \pm 2,13$	$+10,88 \pm 6,22$		$-96,29 \pm 2,08$	
	n	mM	%	p	%	p
$[\text{K}^+]_o$ ionto	8	$1,40 \pm 0,21$	$+101,96 \pm 13,53$	**	$+81,64 \pm 12,67$	*
	n	mV	%	p	%	p
IFP ionto	8	$-0,26 \pm 0,03$	$-69,01 \pm 11,01$		$-88,57 \pm 9,98$	***

Tabelle ähnlich der Tabelle 3.1. Anzahl: N entspricht Anzahl der Hirnschnitte, n entspricht Anzahl der Messungen (gewöhnlich 2/Hirnschnitt); Kontrollwert: Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes der Meßgrößen (bestimmt nach 60 min Perfusion mit je 30 μM 2-APV und CNQX enthaltender sulfatfreier ACSF); Änderung gegenüber Kontrollwert (30 min nur Ba^{2+}): prozentuale Änderung des Meßwertes \pm Standardfehler nach weiteren 30 min Perfusion mit zusätzlich enthaltenem Ba^{2+} allein; Änderung gegenüber Kontrollwert (90 Minuten K2P-Blocker, 30 min Ba^{2+}): prozentuale Änderung des Meßwertes \pm Standardfehler nach weiteren 60 min Perfusion mit 2 mM Ba^{2+} und zusätzlichem K2P-Blocker Quinin (500 mM); die Änderungen wurden wieder als normierte Differenzen berechnet ((Meßwert nach Blockerapplikation – Meßwert unter Kontrollbedingungen) / Meßwert unter Kontrollbedingungen) und als Prozent vom Kontrollwert angegeben. Signifikante Änderungen (Vergleich der Meßwerte vor Kontrolle und nach Blocker-Applikation unter Nutzung des Friedman-Tests) sind mittels Sternchen gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.2. Statistische Evaluation der Differenzen zwischen den K2P-Blocker-Wirkungen

Es wurden sowohl die dosisabhängigen Wirkungen von Quinin (200 und 500 μM) als auch die Unterschiede zwischen diesen und den Effekten von 500 μM Quinidin und 200 μM Bupivacain durch statistischen Vergleich der normierten Änderungen der untersuchten Meßgrößen in den jeweiligen experimentellen Abschnitten mittels des Kruskal-Wallis-Tests für unabhängige Stichproben bestimmt.

Beim Vergleich des dosisabhängigen Effektes zeigte sich eine signifikant stärkere Minderung der durch repetitive Reizung induzierten Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ durch 500 μM Quinin verglichen mit der niedrigeren Konzentration von 200 μM ($p < 0,001$; $n = 34$; Abb. 3.5.A; 60 min K2P-Blocker) und auch der begleitenden IFP ($p < 0,001$; $n = 34$; ohne Abb.), der SAP ($p = 0,048$; $n = 17$; Abb. 3.5.B) als auch eine stärkere Erhöhung der iontophoretisch induzierten Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ ($p = 0,004$; $n = 34$; Abb. 3.5.C) nach 60 min Applikation.

Zwischen 500 μM Quinin und 500 μM Quinidin ergab sich in keinem der gemessenen Parameter ($[\text{K}^+]_o$ und IFP, gleich, ob elektrisch oder iontophoretisch induziert, SAP) ein statistisch signifikanter Unterschied (für $[\text{K}^+]_o$ siehe Abb. 3.5.A – C; für IFP ohne Abb.).

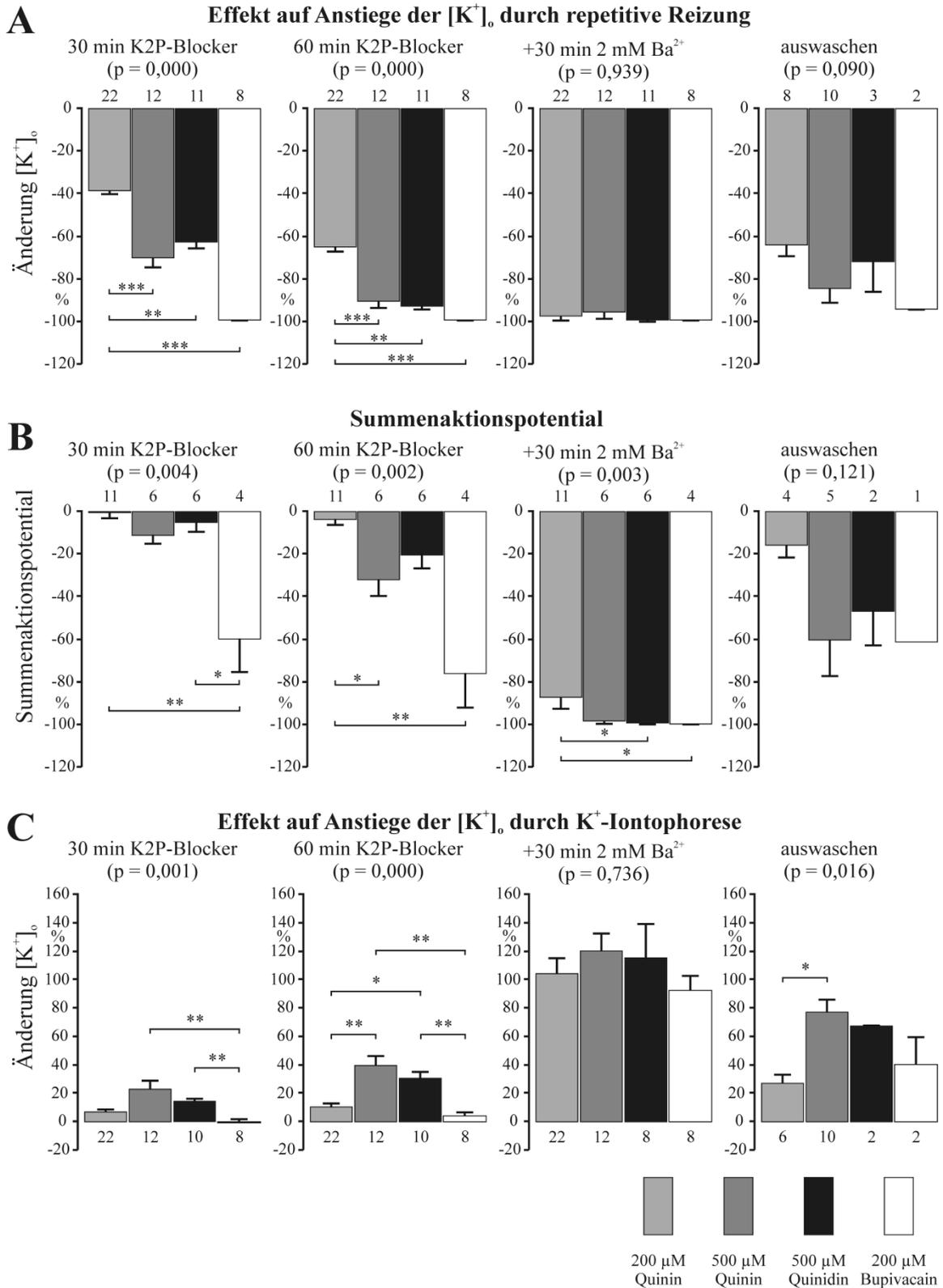
Da 500 μM Quinidin quantitativ ähnliche Wirkungen entfaltete wie 500 μM Quinin, ergaben sich im Vergleich mit 200 μM Quinin ähnlich signifikante Unterschiede: bei den durch repetitive Reizung induzierten Anstiegen der $[\text{K}^+]_o$ zeigte sich eine hoch signifikante Differenz in der Minderung der Signale ($p = 0,001$; $n = 33$; Abb. 3.5.A; 60 min K2P-Blocker), ebenso bei den Änderungen der IFP ($p = 0,001$; $n = 33$; ohne Abb.), bei den SAP zeigte sich eine deutliche jedoch unter der Signifikanzgrenze bestehende Differenz ($p = 0,444$; $n = 17$; Abb. 3.5.B). Die iontophoretisch induzierten Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ waren signifikant unterschiedlich ($p = 0,022$; $n = 32$; Abb. 3.5.C), wohingegen die Unterschiede in den begleitenden IFP nicht unterschiedlich waren ($n = 16$; nicht abgebildet).

Bei der Minderung der durch repetitive Reizung induzierten Änderungen der $[\text{K}^+]_o$ und der IFP nach 60 min Applikation mit 200 μM Bupivacain war der Effekt sehr ähnlich dem von 500 μM Quinin bzw. Quinidin, weswegen sich hier kein relevanter Unterschied ergab ($p = 0,374$; $n = 20$ bzw. $p = 0,176$; $n = 19$ für die $[\text{K}^+]_o$; Abb. 3.5.A und $p = 1,000$; $n = 20$ bzw. $p = 1,000$; $n = 19$ für die IFPs; ohne Abb.). Demgegenüber standen deutliche Unterschiede zu der geringeren Wirkung durch 200 μM Quinin ($p < 0,001$; $n = 30$ für $[\text{K}^+]_o$; Abb. 3.5.A und $p < 0,001$; $n = 30$ für IFP, ohne Abb.). Auf die SAP hatten 200 μM Bupivacain eine stark blockierende Wirkung, welche

jedoch nur gegenüber 200 μM Quinin eine statistische Signifikanz zeigte ($p = 0,003$; $n = 15$; Abb. 3.5.B) und vermutlich aufgrund der geringen Gruppengröße gegenüber 500 μM Quinin und Quinidin kein signifikantes Niveau erreichte ($p = 1,000$; $n = 10$ bzw. $p = 0,491$; $n = 10$; Abb. 3.5.B). Da sich wie in Abb. 3.3.C dargestellt die iontophoretisch induzierten Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ unter Bupivacain kaum änderten, war hier ein deutlicher Unterschied zu je 500 μM Quinin und Quinidin, welche nach 60 min Applikation eine deutliche Erhöhung verursachten, zu verzeichnen ($p = 0,002$; $n = 20$ bzw. $p = 0,007$; $n = 18$; vergleiche Abb. 3.5.C). Zu der nach 60 min Applikation geringen Erhöhung unter 200 μM Quinin ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 1,000$; $n = 30$; Abb. 3.5.C). Bei den iontophoretisch induzierten Änderungen der IFP zeigte sich zu keinem der anderen K2P-Blocker ein Unterschied (ohne Abb.).

Die kombinierte Applikation des jeweiligen K2P-Blockers mit Ba^{2+} zeigte nach 30 min für die durch repetitive Reizung induzierten Änderungen der $[\text{K}^+]_o$ und IFP eine nahezu komplette Blockade, weswegen sich hier keine Unterschiede ergaben ($p = 0,939$ für $[\text{K}^+]_o$, Abb. 3.5.A; $p = 0,498$ für IFP, ohne Abb.). Auch die deutliche Verstärkung der iontophoretisch induzierten Änderungen der $[\text{K}^+]_o$ und die Reduktion der IFP unter kombinierter Gabe waren nahezu gleich, weshalb auch hier kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen war ($p = 0,736$ für $[\text{K}^+]_o$, Abb. 3.5.C; $p = 0,129$ für IFP, ohne Abb.). Lediglich bei den SAP konnte noch ein Unterschied zwischen 200 μM Quinin und 500 μM Quinidin ($p = 0,010$; $n = 17$) und zwischen 200 μM Quinin und 200 μM Bupivacain nachgewiesen werden ($p = 0,035$; $n = 15$; jeweils Abb. 3.5.B), da unter kombinierter Applikation nur bei 200 μM Quinin noch relevante Potentialantworten bei den SAP nachweisbar waren.

Abbildung 3.5.: Effekt von 200 und 500 μM Quinin, 500 μM Quinidin und 200 μM Bupivacain auf die Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ und die SAP im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten



Teil A – C: die Diagramme zeigen die Blockereffekte nach 30 und 60 min, nach weiteren 30 min mit zusätzlich 2 mM Ba²⁺ und schließlich nach Auswaschen aller Blocker. Zur besseren Unterscheidbarkeit sind die Säulen jeweils unterschiedlich eingefärbt, dies entspricht der jeweiligen Substanz in bestimmter Konzentration und ist in allen Diagrammen gleich.

(A) Vergleich der Mittelwerte ± Standardfehler normierter Differenzen in Prozent des Kontrollwertes für die Änderungen der [K⁺]_o ausgelöst durch repetitive Reizung im Alveus (0,1 ms; 20 Hz; 10 s) in den jeweiligen experimentellen Abschnitten.

(B) Vergleich der Mittelwerte ± Standardfehler normierter Differenzen in Prozent des Kontrollwertes für die Änderungen der SAP ausgelöst durch elektrische Einzelimpulse im Alveus (0,1 ms; 0,05 Hz; 100 %) in den jeweiligen experimentellen Abschnitten.

(C) Vergleich der Mittelwerte ± Standardfehler normierter Differenzen in Prozent des Kontrollwertes für die Änderungen der [K⁺]_o induziert durch K⁺-Iontophorese (variable Ejektionsströme, innerhalb des experimentellen Verlaufs jedoch konstant)

*Die Ziffern über bzw. unter den jeweiligen Säulen geben die Anzahl der untersuchten Hirnschnitte an (Teil B) bzw. die Anzahl der Messungen (Teil A und C, normalerweise 2 pro Hirnschnitt); Statistik nach Kruskal-Wallis, Konfidenzintervall 95 %; die Sternchen über den Klammern geben das jeweilige Signifikanzniveau an, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.*

3.3. 200 µM Quinin minderten den neuronalen K⁺-Ausstrom im Gewebe des Epilepsiemodells (Pilocarpin-behandelte Wistar-Ratten), beeinflussten die gliale K⁺-Aufnahme jedoch nicht

Da bereits 200 µM Quinin ausreichten, um im Kontrollgewebe signifikante Änderungen hervorzurufen, wurden die weiteren Untersuchungen im Gewebe des Epilepsiemodells und des humanen Gewebes ebenfalls mit dieser Konzentration durchgeführt. Aufgrund der fehlenden Wirkung von Bupivacain auf die iontophoretischen Signale wurde bei beiden Epilepsiegeweben auf weitere Testungen verzichtet.

Im Gewebe des Epilepsiemodells waren auf Reize mit Einzelpulsen im Alveus unter Kontrollbedingungen SAP mit gemittelter maximaler Amplitude von $-3,5 \pm 0,7$ mV ($n = 8$; 7 Tiere; Pilocarpin-behandelte Wistar-Ratten) auszulösen. Reizstärken, die gemittelt $57,5 \pm 4,9$ % bzw. $90 \pm 3,8$ % der Maximalamplitude der SAP auslösten, verursachten Anstiege der [K⁺]_o von $0,81 \pm 0,12$ mM bzw. $1,40 \pm 0,15$ mM ($n = 8$) und IFP von $-0,23 \pm 0,06$ mV bzw. $-0,45 \pm 0,09$ mV ($n = 8$). Iontophoreseströme von 185 ± 36 nA bzw. $343,8 \pm 62,3$ nA induzierten einen Anstieg der

$[K^+]_o$ von $1,02 \pm 0,09$ mM bzw. $2,19 \pm 0,18$ mM ($n = 8$) und IFP von $-0,15 \pm 0,11$ mV bzw. $-0,27 \pm 0,17$ mV ($n = 2$). Auch hier korrelierten die IFP mit den Anstiegen der $[K^+]_o$ auf die Stimulusfolgen (Spearman-Rho: $r = -0,717$; $p < 0,001$; $n = 22$) und auf iontophoretisch induzierte Signaländerungen (Spearman-Rho: $r = -0,800$; $p = 0,2$; $n = 4$; whs. aufgrund der Gruppengröße nicht signifikant).

Der Graph in Abb. 3.6.A.b oben zeigt für die Anstiege der $[K^+]_o$ unter Quinineinfluß eine Abnahme während repetitiver Reizung. Unter Ba^{2+} -Co-Applikation waren die Signale nahezu ausgelöscht (Abb. 3.6.A.c, oben). Die Amplitudenabnahme der begleitenden IFP war weniger ausgeprägt als im Kontrollgewebe (Abb. 3.6.A.b, unten), nach Ba^{2+} -Co-Administration wurden diese nahezu komplett gemindert (Abb. 3.6.A.c, unten). Nach dem Auswaschen beider Blocker war eine deutliche Teilerholung beider Signale ($[K^+]_o$ und IFP) erkennbar (Abb. 3.6.A.d).

Die Signale der auf Einzelstimuli im Alveus verursachten SAP änderten sich unter Quinineinfluß wenig (Abb. 3.6.B.b), zusätzliches Ba^{2+} jedoch blockierte diese im Beispiel komplett (Abb. 3.6.B.c). Auch hier zeigte sich nach dem Auswaschen beider Blocker eine deutliche Teilerholung (Abb. 3.6.B.d).

Die durch Iontophorese verursachten Anstiege der $[K^+]_o$ wurden von 200 μ M Quinin kaum beeinflusst (Abb. 3.6.C.b, oben), wohingegen nach Ba^{2+} -Addition ein deutlicher Anstieg zu sehen war (Abb. 3.6.C.c). Die Erhöhung war nach dem Auswaschen nahezu komplett verschwunden (Abb. 3.6.C.d). Die Amplituden der begleitenden IFP nahmen deutlich ab und kehrten sich schon unter Quinineinfluß in positive Werte um (Abb. 3.6.C.b), was sich unter Ba^{2+} -Co-Administration noch leicht verstärkte (Abb. 3.6.C.d). Das Auswaschen hatte wenig Effekt auf die Signale der IFP (Abb. 3.6.C.d).

In der Summe reduzierten sich die Anstiege der $[K^+]_o$ unter repetitiver Reizung deutlich ($-45,7 \pm 5,6$ %; entsprechend einem verbleibenden Kaliumanstieg von $54,3 \pm 5,6$ % des Kontrollwertes; $n = 16$; 8 Hirnschnitte; $p < 0,001$; Abbildung 3.6.D.b) und waren unter Co-Applikation mit 2 mM Ba^{2+} ($-103,9 \pm 4,3$ %; $n = 16$; 8 Hirnschnitte; $p < 0,001$; Abb. 3.6.D.b) nicht mehr auslösbar. Die Amplituden der begleitenden IFP minderten sich ebenfalls unter Quinin ($-36 \pm 5,8$ %; $n = 16$; 8 Hirnschnitte; $p = 0,001$; ohne Abb.) und nochmals deutlicher nach Co-Applikation mit Ba^{2+} ($-92,3 \pm 3,8$ %; $n = 16$; 8 Hirnschnitte; $p < 0,001$; ohne Abb.) (auch Tabelle 3.3.).

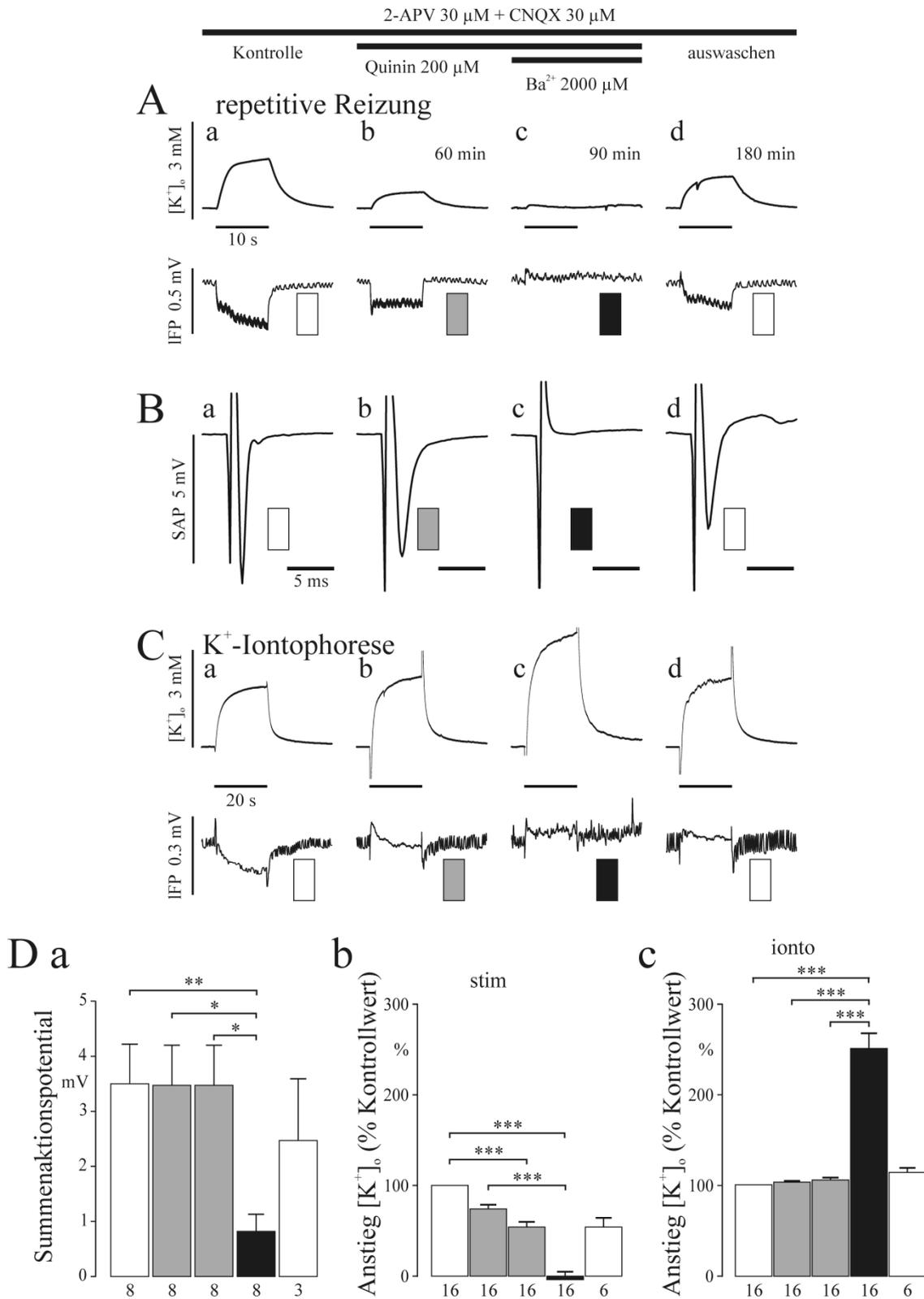
Die auf Einzelstimuli im Alveus auslösbaren SAP waren deutlich kleiner als im Kontrollgewebe und änderten sich nach 60 min unter dem Einfluß von 200 μ M Quinin kaum von $-3,5 \pm 0,7$ mV

Ergebnisse

auf $-3,5 \pm 0,7$ mV ($-2,13 \pm 2,56$ %; $n = 8$; 8 Hirnschnitte; $p = 1,000$; Abbildung 3.6.D.a). Nach Addition von Ba^{2+} nahmen die Amplituden deutlich auf $-0,8 \pm 0,3$ mV ab ($-78 \pm 7,5$ %; $n = 8$; 8 Hirnschnitte; $p = 0,006$; Abb. 3.6.D.a).

Die iontophoretisch induzierten Anstiege der $[K^+]_o$ nahmen unter Quinin leicht aber nicht signifikant zu ($+5,3 \pm 2,6$ %; entsprechend $105,3 \pm 2,6$ % des Kontrollwertes; $n = 16$; 8 Hirnschnitte; $p = 1,000$; Abbildung 3.6.D.c), die additive Ba^{2+} -Gabe bewirkte jedoch einen deutlichen und signifikanten Anstieg ($+148,6 \pm 16,6$ %; entsprechend $248,6 \pm 16,6$ % des Kontrollwertes; $n = 16$; 8 Hirnschnitte; $p < 0,001$; Abbildung 3.6.D.c). Die Amplituden der begleitenden IFP nahmen deutlich ab und kehrten sich unter Quinin ins Positive um ($-119,9 \pm 38,3$ %; $n = 4$; 2 Hirnschnitte; $p = 0,253$; ohne Abb.) und stiegen weiter ins Positive nach zusätzlichem Ba^{2+} ($-193,9 \pm 6,9$ %; $n = 4$; 2 Hirnschnitte; $p = 0,025$; ohne Abb.).

Abbildung 3.6.: Effekt von 200 μM Quinin auf durch repetitive Reizung und Iontophorese induzierte Anstiege der $[\text{K}^+]_o$, begleitender IFP und SAP im Stratum pyramidale der CA1 Pilokarpin-behandelter Ratten



Die Art der Abbildungen und Bezeichnungen korrespondieren wiederum zu denen in Abbildung 3.1.

(A – C) Beispielaufzeichnungen der experimentellen Abschnitte unter Kontrollbedingungen, unter 60 min Bad-Applikation von 200 μM Quinin, zusätzlicher 30 minütiger Applikation zusammen mit 2 mM Ba^{2+} und Auswaschen von Quinin und Ba^{2+} für 90 min.

(A) Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ (in mM, oben) und der IFP (in mV, unten) ausgelöst durch repetitive Reizung im Alveus (0,1 ms; 20 Hz; 100 %) je experimentellem Abschnitt.

(B) gemittelte Summenaktionspotentialamplituden (SAP in mV) ausgelöst durch 5 elektrische Einzelpulse im Alveus (0,1 ms; 0,05 Hz; 100 %).

(C) Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ (in mM, oben) und IFP (in mV, unten) induziert durch K^+ -Iontophorese (Ejektionsstrom 600 nA).

(D) Ergebnisdiagramme für die Größe der Summenaktionspotentialamplituden (a in mV) und der Anstiege der $[\text{K}^+]_o$, dargestellt als Prozent vom Kontrollwert (100 %) (b und c). Die Säulen und Fehlerbalken stellen wieder den Mittelwert und den Standardfehler des Mittelwertes dar, die Ziffern unter den Säulen und die Sternchen wie in Abbildung 3.1. Statistik nach Friedman.

3.4. Im resezierten Hippocampus epilepsiechirurgischer Patienten minderten 200 μM Quinin ebenfalls den Ausstrom von K^+ aus den Neuronen, während die gliale K^+ -Aufnahme wenig beeinträchtigt wurde

Die Maximalamplituden der SAP waren im epileptischen humanen Gewebe am kleinsten ($-1,9 \pm 0,6$ mV; n = 7; 6 Patienten; resezierter Hippocampus pharmakoresistenter Epilepsiepatienten). Die Reizstärken, welche durchschnittlich $52,9 \pm 7,8$ % bzw. $87,1 \pm 7,1$ % der Maximalamplituden der SAP verursachten, waren für Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ von $0,98 \pm 0,09$ mM bzw. $1,85 \pm 0,24$ mM (n = 7) und für IFP von $-0,26 \pm 0,05$ mV bzw. $-0,53 \pm 0,12$ mV (n = 7) verantwortlich. Für Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ von $1,09 \pm 0,18$ mM bzw. $1,76 \pm 0,24$ mM (n = 7) und IFP von $-0,15 \pm 0,05$ mV bzw. $-0,24 \pm 0,09$ mV (n = 5) wurden Iontophoreseströme von $242,9 \pm 42,9$ nA und $402,9 \pm 66,4$ nA appliziert. In dieser Gruppe zeigte sich eine strenge Korrelation zwischen den Anstiegen der $[\text{K}^+]_o$ und den negativen IFP nur für die durch repetitive Reizung induzierten Signale (Spearman-Rho: $r = -0,582$; $p = 0,001$; n = 31). Bei den iontophoretisch induzierten Signalen war keine entsprechende Korrelation nachweisbar (Spearman-Rho: $r = -0,173$ bei $p = 0,398$ und n = 28).

Im humanen epileptischen Gewebe löste die repetitive Reizung im Alveus ebenfalls deutliche Anstiege der $[K^+]_o$ aus (Abb. 3.7.A.a), welche unter Quinin jedoch stark gemindert wurden (Abb. 3.7.A.b, oben). Auch hier waren diese Anstiege nach zusätzlicher Ba^{2+} -Gabe kaum mehr auslösbar (Abb. 3.7.A.c, oben). Der Anstieg nach Auswaschen der Blocker war nur gering (Abb. 3.7.A.d, oben). Die Amplituden der begleitenden IFP wurden unter Quinin wieder deutlich gemindert (Abb. 3.7.A.b, unten) und unter zusätzlichem Ba^{2+} leicht positiv (Abb. 3.7.A.c, unten). Es zeigte sich weiterhin eine Teilerholung nach Auswaschen von Quinin und Ba^{2+} (Abb. 3.7.A.d, unten).

Einzelstimuliverursachte SAP wurden unter Quinin erkennbar leicht gemindert (Abb. 3.7.B.a – b), nach Addition von Ba^{2+} waren diese dann stark gemindert, aber noch auslösbar (Abb. 3.7.B.c). Die Erholung nach dem Auswaschen der Blocker war deutlich eingeschränkt (Abb. 3.7.B.d).

Anstiege der $[K^+]_o$, welche durch Iontophorese verursacht sind, vergrößerten sich unter Quinin nur wenig (Abb. 3.7.C.a und b, oben). Unter zusätzlichem Ba^{2+} zeigte sich dann jedoch wieder eine deutliche Verstärkung der Anstiege (Abb. 3.7.C.c, oben). Nach dem Auswaschen von Quinin und Ba^{2+} blieben die Signalstärken noch erhöht (Abb. 3.7.C.d, oben). Die Amplituden der begleitenden IFP wurden unter Quinineinfluß nur sehr leicht gemindert (Abb. 3.7.C.b, unten), bei Co-Applikation mit Ba^{2+} wurden die Amplituden wieder deutlich kleiner und kehrten sich in positive Signale um (Abb. 3.7.C.c, unten). Nach dem Auswaschen der beiden Blocker nahm die Amplitude wieder zu und negative Werte an (Abb. 3.7.C.d, unten).

Die quantitative Analyse der Daten (auch Tabelle 3.3.) bestätigte die deutliche Minderung der Anstiege der $[K^+]_o$ während repetitiver Reizung unter Quinin ($-71,2 \pm 2,6$ %; entsprechend einem verbleibenden Anstieg von $28,8 \pm 2,6$ % des Kontrollwertes; $n = 14$; 7 Hirnschnitte; $p < 0,001$; Abbildung 3.7.D.b). Bei zusätzlicher Ba^{2+} -Gabe sanken die Anstiege nochmals ($-89,2 \pm 4,5$ %; entsprechend einem verbleibenden Anstieg von $10,8 \pm 4,5$ % des Kontrollwertes; $n = 13$; 7 Hirnschnitte; $p < 0,001$). Die Amplituden der begleitenden IFP sanken ebenfalls deutlich unter Quinin ($-61,4 \pm 6,5$ %; $n = 14$; 7 Hirnschnitte; $p = 0,001$; ohne Abb.) und wurden nach Co-Applikation mit Ba^{2+} leicht positiv ($-105,2 \pm 2,9$ %; $n = 13$; 7 Hirnschnitte; $p < 0,001$; ohne Abb.).

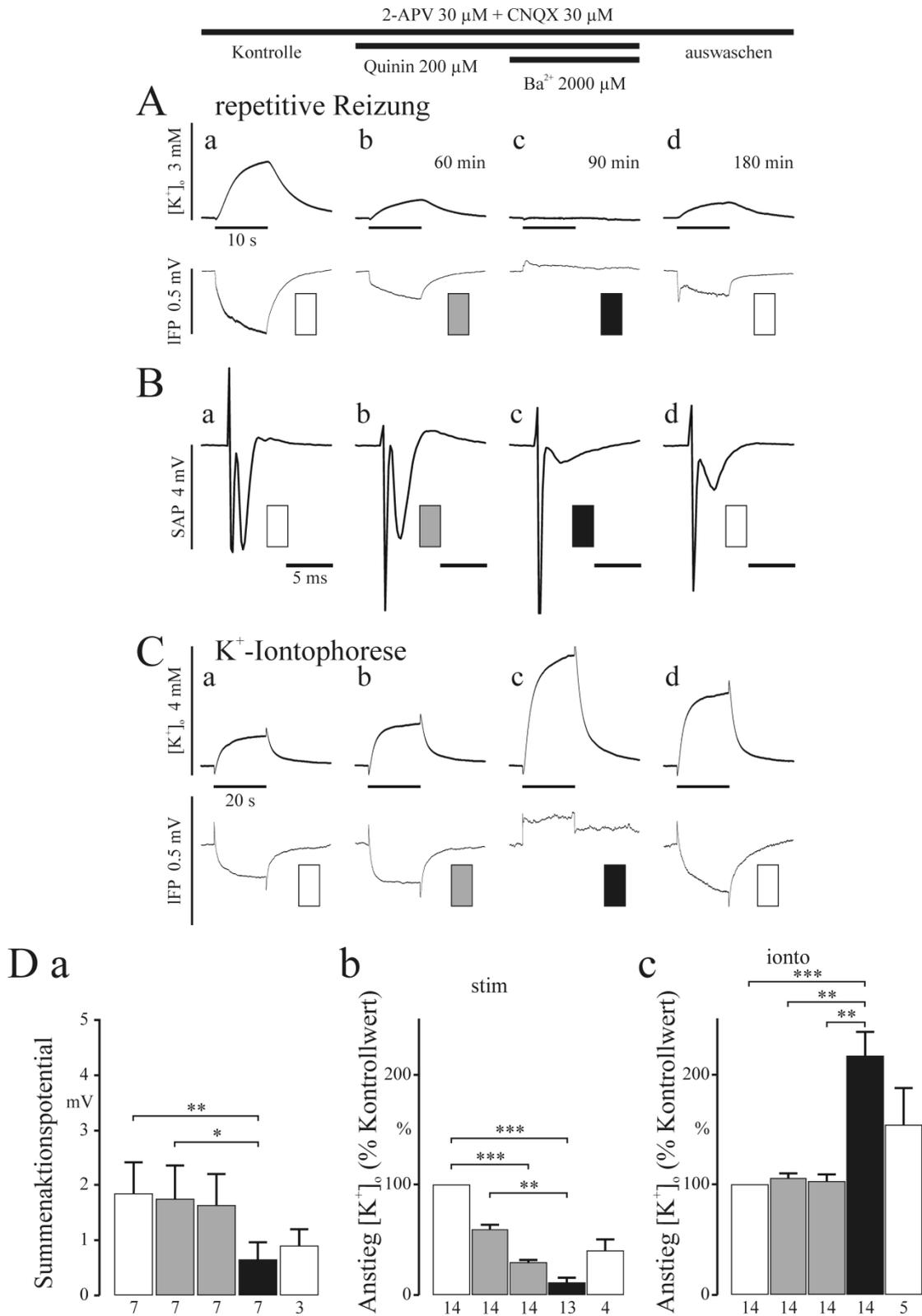
Die Amplituden der auf Einzelstimuli ausgelösten SAP wurden gegenüber Kontrollbedingungen erkennbar jedoch nicht signifikant von $-1,9 \pm 0,5$ mV auf $-1,6 \pm 0,6$ mV gemindert ($-24,8 \pm 8,2$ %; $n = 7$; 7 Hirnschnitte; $p = 0,137$; Abbildung 3.7.D.a). Nach Ba^{2+} -Addition waren die

Ergebnisse

Amplituden weiter gemindert auf $-0,6 \pm 0,3$ mV ($-71,6 \pm 9,9$ %; $n = 7$; 7 Hirnschnitte; $p = 0,001$; Abbildung 3.7.D.a).

Die iontophorese-bedingten Anstiege der $[K^+]_o$ wurden durch Quinin nicht relevant beeinflusst ($+3,0 \pm 7,0$ %; entsprechend $103,0 \pm 7,0$ % vom Kontrollwert; $n = 14$; 7 Hirnschnitte; $p = 1,000$; Abbildung 3.7.D.c). Ba^{2+} -Co-Administration ergab jedoch auch hier eine deutliche Vergrößerung der Anstiege der $[K^+]_o$ ($+116,5 \pm 22,4$ %; entsprechend $216,5 \pm 22,4$ % vom Kontrollwert; $n = 14$; 7 Hirnschnitte; $p < 0,001$; Abbildung 3.7.D.c). Die Amplituden der begleitenden IFP waren unter Quinin ebenfalls wenig beeinträchtigt ($-4,7 \pm 10,1$ %; $n = 10$; 5 Hirnschnitte; $p = 1,000$; ohne Abb.), wogegen die zusätzliche Gabe von Ba^{2+} erneut eine starke Minderung und leichte Positivierung bewirkte ($-110,7 \pm 8,4$ %; $n = 10$; 5 Hirnschnitte; $p = 0,008$; ohne Abb.).

Abbildung 3.7.: Effekt von 200 μM Quinin auf durch repetitive Reizung und Iontophorese induzierte Anstiege der $[\text{K}^+]_o$, begleitender IFP und SAP im Stratum pyramidale der CA1 humanen, epileptischen Hippocampusgewebes



Die Art der Abbildungen und Bezeichnungen korrespondieren zu denen in Abbildung 3.1.

(A – C) Beispielaufzeichnungen der experimentellen Abschnitte unter Kontrollbedingungen, unter 60 min Bad-Applikation von 200 μM Quinin, zusätzlicher 30 minütiger Applikation zusammen mit 2 mM Ba^{2+} und Auswaschen von Quinin und Ba^{2+} für 90 min.

(A) Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ (in mM, oben) und der IFP (in mV, unten) ausgelöst durch repetitive Reizung im Alveus (0,1 ms; 20 Hz; 100 %) je experimentellem Abschnitt.

(B) gemittelte Summenaktionspotentialamplituden (SAP in mV) ausgelöst durch 5 elektrische Einzelpulse im Alveus (0,1 ms; 0,05 Hz; 100 %).

(C) Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ (in mM, oben) und IFP (in mV, unten) induziert durch K^+ -Iontophorese (Ejektionsstrom 500 nA).

(D) Ergebnisdiagramme für die Größe der Summenaktionspotentialamplituden (a, in mV) und die Anstiege der $[\text{K}^+]_o$, dargestellt als Prozent vom Kontrollwert (100 %) (b und c). Die Säulen und Fehlerbalken stellen wieder den Mittelwert und den Standardfehler des Mittelwertes dar, die Ziffern unter den Säulen und die Sternchen wie in Abbildung 3.1. Statistik nach Friedman.

3.5. Vergleich der Wirkung von 200 μM Quinin auf das Stratum pyramidale der CA1 von Kontrollgewebe (Wistar-Ratten), Gewebe eines Epilepsiemodells (Pilocarpin-behandelte Wistar-Ratten) und resezierten Epilepsiegewebes (humaner Hippocampus)

In Tabelle 3.3. sind die prozentualen Änderungen der untersuchten Meßgrößen zusammengefaßt.

Unter 200 μM Quinin zeigte sich die Minderung der durch repetitive Reizung verursachten Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ des Pilocarpin-behandelten Gewebes weniger ausgeprägt als die des Kontrollgewebes und des humanen Epilepsiegewebes, weswegen sich hier ein Unterschied ergab ($p = 0,030$; $n = 38$ bzw. $p = 0,001$; $n = 30$; Abb. 3.8.A; 60 min 200 μM Quinin). Nach additiver Ba^{2+} -Applikation zeigte sich wieder ein homogeneres Bild, ein Unterschied zwischen dem Epilepsiemodellgewebe und dem humanen epileptischen Gewebe fand sich dennoch ($p = 0,004$; $n = 29$). Bei den begleitenden IFP zeigte sich ein Unterschied zwischen dem Pilocarpin-behandelten Gewebe und dem humanen epileptischen Gewebe ($p = 0,012$; $n = 30$), in den restlichen Gruppenvergleichen und unter dem zusätzlichen Einfluß von Ba^{2+} waren keine Unterschiede feststellbar (ohne Abb.).

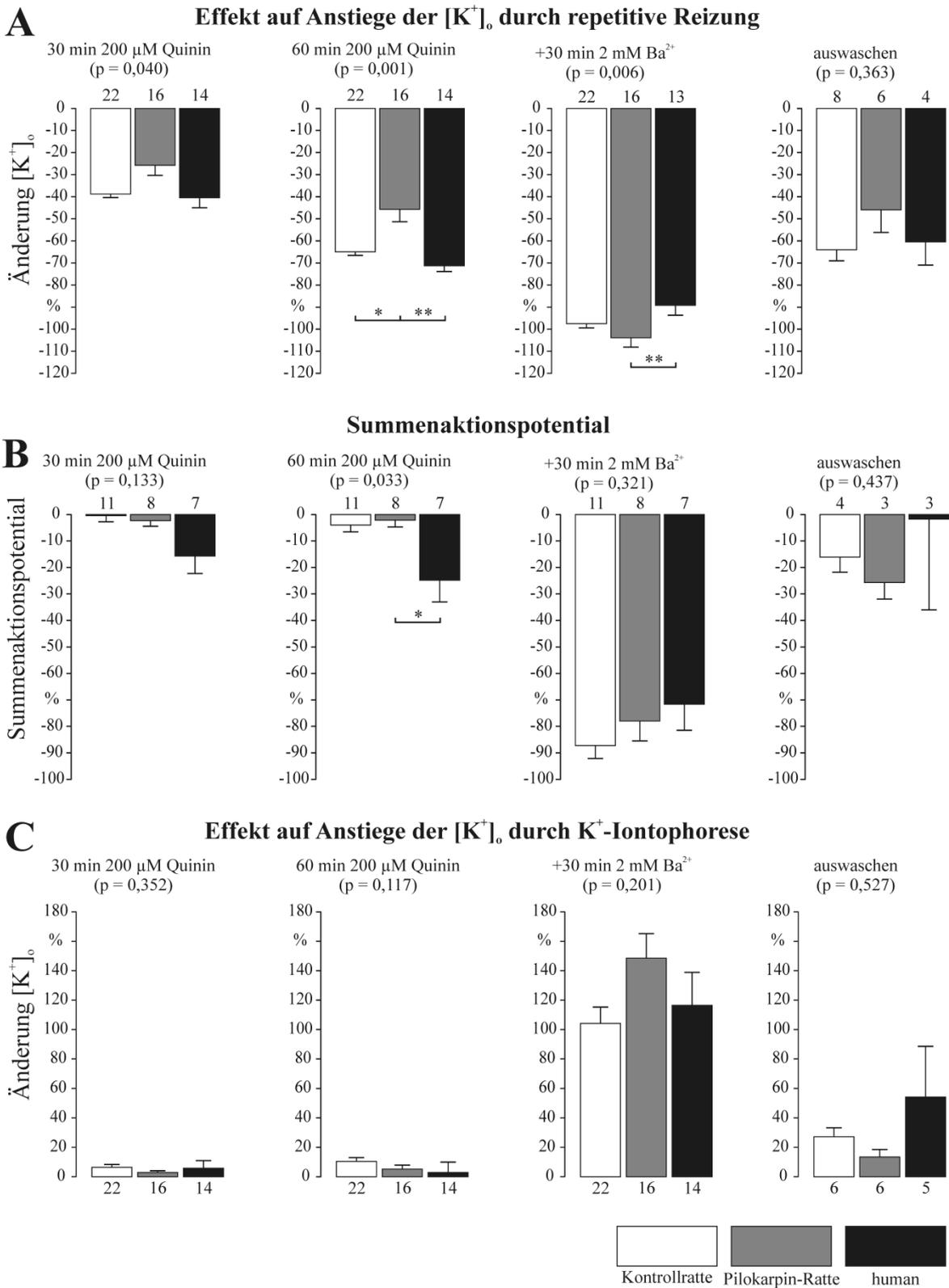
Die Änderungen bei den Amplituden der SAP auf Einzelpulsreizung im Alveus waren im Kontrollgewebe und im Gewebe des Epilepsiemodells kaum und im humanen epileptischen Gewebe nur leicht ausgeprägt, so daß es lediglich zwischen dem Epilepsiemodell-Gewebe und

Ergebnisse

dem epileptischen humanen Gewebe einen signifikanten Unterschied unter dem Einfluß von 60 min 200 μM Quinin ($p = 0,046$; $n = 15$; Abb. 3.8.B) gab. Unter dem zusätzlichen Einfluß von 2 mM Ba^{2+} waren die Minderungen der Amplituden sehr ähnlich, so daß es innerhalb der Gruppe keine Unterschiede gab ($p = 0,321$; $n = 26$).

Die iontophoretisch verursachten Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ waren unter den Gruppen sowohl durch alleinigen Quinin- als auch unter kombiniertem Quinin- und Ba^{2+} -Einfluß recht homogen, so daß sich hier keine Unterschiede fanden (Abb. 3.8.C). Bei den iontophoretisch induzierten IFP zeigte sich nach 60 min Quinin-Einfluß lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Epilepsiemodell- und dem epileptischen humanen Gewebe ($p = 0,004$; $n = 14$), nach zusätzlicher Ba^{2+} -Gabe änderte sich dies jedoch, nun bestand ein Unterschied zwischen dem Kontroll- und dem Epilepsiemodellgewebe ($p = 0,004$; $n = 14$; jeweils ohne Abb.).

Abbildung 3.8.: Effekt von 200 μM Quinin auf die Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ und die SAP im Stratum pyramidale der CA1 normaler Ratten, Pilocarpin-behandelter Ratten und humanen, epileptischen Hippocampusgewebes



Ergebnisse

Teil A – C: die Diagramme zeigen den Effekt von 200 μM Quinin nach 30 min, 60 min, nach weiteren 30 min mit zusätzlich 2 mM Ba^{2+} und schließlich nach Auswaschen der Blocker. Zur besseren Unterscheidbarkeit sind die Säulen jeweils unterschiedlich eingefärbt, dies entspricht dem jeweiligen Gewebe und ist in allen Diagrammen gleich.

(A) Vergleich der Mittelwerte \pm Standardfehler normierter Differenzen in Prozent des Kontrollwertes für die Änderungen der $[\text{K}^+]_o$ ausgelöst durch repetitive Reizung im Alveus (0,1 ms; 20 Hz; 10 s) in den jeweiligen experimentellen Abschnitten.

(B) Vergleich der Mittelwerte \pm Standardfehler normierter Differenzen in Prozent des Kontrollwertes für die Änderungen der SAP ausgelöst durch elektrische Einzelimpulse im Alveus (0,1 ms; 0,05 Hz; 100 %) in den jeweiligen experimentellen Abschnitten.

(C) Vergleich der Mittelwerte \pm Standardfehler normierter Differenzen in Prozent des Kontrollwertes für die Änderungen der $[\text{K}^+]_o$ induziert durch K^+ -Iontophorese (variable Ejektionsströme, innerhalb des experimentellen Verlaufs jedoch konstant).

*Die Ziffern über bzw. unter den jeweiligen Säulen geben die Anzahl der untersuchten Hirnschnitte an (Teil B) bzw. die Anzahl der Messungen (Teil A und C, normalerweise 2 pro Hirnschnitt); Statistik nach Kruskal-Wallis, Konfidenzintervall 95 %; die Sternchen über den Klammern geben das jeweilige Signifikanzniveau an, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.*

Tabelle 3.3.: Wirkungen von 200 µM Quinin auf die durch repetitive Reizung induzierten Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration ($\Delta [K^+]_o$ stim), der langsamen Feldpotentialänderungen (Δ IFP stim) und der maximalen Summenaktionspotentiale (Δ SAP max) sowie der iontophoretisch verursachten Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration ($\Delta [K^+]_o$ ionto) und der langsamen Feldpotentialänderungen (Δ IFP ionto) im Stratum pyramidale der CA1 von Kontrollgewebe (Wistar-Ratten), Gewebe eines Epilepsiemodells (Pilocarpin-behandelte Wistar-Ratten) und epileptischem humanen Gewebe (Hippocampusresektate pharmakoresistenter Epilepsiepatienten)

Größe	Änderung gegenüber Kontrollwert (60 min 200 µM Quinin)					Änderung gegenüber Kontrollwert (90 min 200 µM Quinin, 30 min 2 mM Ba ²⁺)				
	Kontrollgewebe	Sign. p	Pilo	Sign. p	human	Kontrollgewebe	Sign. p	Pilo	Sign. p	human
$\Delta [K^+]_o$ stim (%)	-64,93 ± 1,62	*	-45,72 ± 5,57	**	-71,25 ± 2,63	-97,49 ± 1,91		-103,87 ± 4,29	**	-89,22 ± 4,46
Anzahl n	22		16		14	22		16		13
Δ IFP stim (%)	-52,05 ± 4,25		-36,01 ± 5,80	*	-61,43 ± 6,48	-104,27 ± 3,59		-92,28 ± 3,79		-105,62 ± 2,94
Anzahl n	22		16		14	22		16		13
Δ SAP max (%)	-4,03 ± 2,55		-2,13 ± 2,56	*	-24,82 ± 8,20	-87,06 ± 4,90		-77,98 ± 7,53		-71,62 ± 9,85
Anzahl N	11		8		7	11		8		7
$\Delta [K^+]_o$ ionto (%)	+10,45 ± 2,52		+5,25 ± 2,64		+2,96 ± 6,96	+104,20 ± 11,07		+148,56 ± 16,57		+116,45 ± 22,41
Anzahl n	22		16		14	22		16		14
Δ IFP ionto (%)	-34,18 ± 4,17		-119,89 ± 38,33	**	-4,70 ± 10,11	-92,55 ± 4,08	**	-193,88 ± 6,91		-110,72 ± 8,39
Anzahl n	10		4		10	10		4		10

$\Delta [K^+]_o$: Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration ausgelöst durch Stimulusfolgen (stim) oder Iontophorese (ionto) jeweils in Prozent; Δ SAP max: Änderungen der maximalen Summenaktionspotentiale auf elektrischen Einzelstimulus; Δ IFP: Änderungen der langsamen Feldpotentialänderungen ausgelöst durch Stimulusfolgen (stim) oder Iontophorese (ionto); Änderung gegenüber Kontrollwert (60 min Quinin): Mittelwerte ± Standardfehler normierter Differenzen in Prozent des Kontrollwertes für die Änderungen nach 60 min Perfusion mit 200 µM Quinin allein; Änderung gegenüber Kontrollwert (90 Minuten K2P-Blocker, 30 min Ba²⁺): Mittelwerte ± Standardfehler normierter Differenzen in Prozent des Kontrollwertes für die Änderungen nach weiteren 30 min Perfusion mit 200 µM Quinin und 2 mM Ba²⁺. Signifikante Unterschiede (Vergleich der Meßwerte unter Nutzung des Kruskal-Wallis-Tests) sind mittels Sternchen zwischen den entsprechenden Meßgrößen gekennzeichnet (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Kontrollgewebe: Hippocampus von Wistar-Ratten; Pilo: Hippocampus von Pilocarpin-behandelten Wistar-Ratten; human: Hippocampusresektat von Patienten, welche sich aufgrund pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie einer Operation unterzogen; Werte < -100 % bezeichnen hier eine Umkehr der Amplitude vom Negativen ins Positive.

4. Diskussion

4.1. Rekapitulation der Fragestellung

Den Astrozyten kommen viele Aufgaben zu (Sofroniew und Vinters 2010): Transmitterfreisetzung und –aufnahme an den neuronalen Synapsen, Regulation des Blutflusses an den Arteriolen, Einfluß auf die Entwicklung der Neurone und deren Axone, Beteiligung an und Aufbau der Blut-Hirn-Schranke, Beteiligung am Metabolismus der Neurone durch Bereitstellung von Energielieferanten (Laktat, Glykogen) und Aufrechterhaltung des extrazellulären Gleichgewichts in Flüssigkeitshaushalt, pH, Neurotransmitter und Ionen wie bspw. Kalium. Einige der zur Kaliumhomöostase beitragenden Mechanismen wurden eingangs erläutert. Ziel dieser Arbeit war es, den Beitrag der K2P-Kanäle bei der Pufferung der K^+ -Ionen sowohl im gesunden als auch im epileptisch veränderten Hippocampus zu bestimmen. Hierzu wurden die Wirkungen von mittels Perfusionsmedium appliziertem Quinin in Konzentrationen von 200 und 500 μM , Bupivacain in einer Konzentration von 200 μM und Ba^{2+} in einer Konzentration von 2 mM untersucht und in den Abbildungen 3.1. – 3.4. mit Beispielverläufen sowie Ergebnisdiagrammen dargestellt. Diese folgen dem zeitlichen Ablauf des Experiments. Um zu prüfen, ob Blocker-induzierte Veränderungen der $[\text{K}^+]_o$ mit korrespondierenden Änderungen in der Anzahl antidrom aktivierter Neuronen assoziiert sind, wurden auch die Wirkungen der K2P-Blocker auf die Summenaktionspotentialänderungen für jeden Experimentabschnitt dargestellt. Hierfür zeigen die Tabellen 3.1. und 3.2. die Mittelwerte sowie die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Absolutwerte der Meßgrößen (Änderungen der $[\text{K}^+]_o$ und IFP durch repetitive Reizung im Alveus oder iontophoretische Kaliumapplikation, SAP) sowie deren blockerverursachte Änderungen als normierte Differenzen in Prozent vom Kontrollwert. Hierbei muß angemerkt werden, daß die jeweiligen K2P-Blocker-vermittelten normierten Änderungen zwischen niederen und höheren stimulus- und iontophoretisch induzierten Signalen der $[\text{K}^+]_o$ und IFP (durchschnittlich je zwei Messungen pro experimentellem Abschnitt) nicht unterscheidbar waren (ohne Abb.) und deshalb gepoolt wurden. Die Irrtumswahrscheinlichkeit der abhängigen Vergleiche (Bestimmung der K2P-Blocker-Wirkung, Abbildung 3.1., 3.2., 3.3., 3.4., 3.6., 3.7.) wurden mit dem Friedman-Test für gepaarte Stichproben bestimmt. Die der unabhängigen Vergleiche (Vergleiche der unterschiedlichen K2P-Blocker bzw. der unterschiedlichen Gewebe untereinander, Abbildung 3.5. und 3.8.) erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben. Die Bestimmung der Kontrollwerte erfolgte nach ca. 60 min Perfusion mit je 30 μM 2-APV und CNQX

enthaltender ACSF, alle Substanzen wurden mittels desselben Mediums ein- und wieder ausgewaschen.

4.2. Zusammenfassung der Befunde

- a) Die durch repetitive Reizung im Alveus ausgelösten Anstiege der $[K^+]_o$ in der Pyramidenzellschicht der Region CA1 des Hippocampus wurden unter Einfluß von Quinin oder dessen Stereoisomer Quinidin sowohl im Kontrollgewebe, im Gewebe des Epilepsiemodells als auch im humanen epileptischen Gewebe konzentrations- und zeitabhängig deutlich gemindert.
- b) Unter zusätzlicher Gabe von 2 mM des Kir-Kanal-Blockers Ba^{2+} wurden diese Anstiege der $[K^+]_o$ in allen Geweben nahezu komplett blockiert.
- c) Bupivacain verursachte eine vollständige Auslöschung entsprechender Anstiege der $[K^+]_o$ während repetitiver Reizung im Alveus. Dies blieb durch zusätzliche Gabe von 2 mM Ba^{2+} unbeeinflusst.
- d) Die durch repetitive Reizung im Alveus verursachten Anstiege der $[K^+]_o$ stiegen unter 2 mM Ba^{2+} auf über das doppelte an und wurden nach Zugabe von 500 μ M Quinin ebenfalls komplett blockiert.
- e) Die begleitenden negativen Verschiebungen der IFP waren unter dem Einfluß von Quinin und Quinidin vermindert. Die Zugabe von Ba^{2+} minderte dies zusätzlich oder kehrte die Verschiebungen in positive Signale um.
- f) Die Amplituden der SAP auf Einzelstimuli wurden durch niedrige Konzentrationen von Quinin kaum, durch höhere Konzentrationen (wie auch durch Quinidin) deutlich erkennbar gemindert. Im Zusammenspiel mit 2 mM Ba^{2+} waren die SAP kaum mehr auslösbar.
- g) Bupivacain hatte einen deutlich hemmenden Effekt auf die Amplitudengröße der SAP auf Einzelstimuli, nach Zugabe von 2 mM Ba^{2+} waren auch diese kaum mehr auslösbar.
- h) Für alle genutzten K2P-Blocker war eine lange Auswaschzeit nötig. Die induzierten Signale erreichten selbst nach mehreren Stunden nicht das Ausgangsniveau bei einer durchschnittlichen Applikationszeit von max. 120 min.

- i) Die iontophoretisch verursachten Anstiege der $[K^+]_o$ wurden durch Quinin dosis- und zeitabhängig erhöht. Auch Quinidin zeigte eine Zeitabhängigkeit, eine Dosisabhängigkeit wurde nicht getestet.
- j) Der Effekt von Quinin auf die Anstiege der $[K^+]_o$ in den epileptischen Geweben war weniger ausgeprägt als im Kontrollgewebe. Die zusätzliche Gabe von 2 mM Ba^{2+} erhöhte die iontophoreseabhängigen Anstiege der $[K^+]_o$ nochmals deutlich.
- k) Bupivacain hatte keinen Effekt auf die durch Iontophorese induzierten Anstiege der $[K^+]_o$. Die Zugabe von 2 mM Ba^{2+} erhöhte die Anstiege der $[K^+]_o$ wieder auf nahezu doppelte Werte.
- l) Die negativen Verschiebungen der die iontophoretisch bedingten Anstiege der $[K^+]_o$ begleitenden IFP wurden unter jedem K2P-Blocker weniger negativ, wurden unter zusätzlichem Ba^{2+} -Einfluss noch weniger negativ und kehrten teilweise in positive um. Dies gilt sowohl für das Kontroll- wie auch für das epileptische Gewebe.

4.3. Methodenkritik

Im Hippocampus ließen sich bisher folgende K2P-Kanäle nachweisen:

TASK-1, TASK-2 und TASK-3 (Duprat et al. 1997; Rusznak et al. 2004; Taverna et al. 2005),

THIK-1 und THIK-2 (Rajan et al. 2001),

TWIK-1 (Lesage et al. 1996; Ma et al. 2012),

TREK-1 und TREK-2 sowie TRAAK (Talley et al. 2001).

Davon wurden TASK-1 (Kindler et al. 2000), TASK-1, TASK-2 und TASK-3 (Rusznak et al. 2004), TWIK-1 und TREK-1 (Zhou et al. 2009) und TWIK-1, TREK-1 und TREK-2 (Seifert et al. 2009) explizit auf Astrozyten des Hippocampus mit jedoch nur moderater Expression nachgewiesen.

Einzelzelleableitungen zeigten, daß TASK-Kanäle durch Bupivacain, Quinin und Quinidin, TREK-1 und TREK-2 durch Quinin, Quinidin und Ba^{2+} und TWIK-1 ebenfalls durch Quinin, Quinidin und Ba^{2+} inhibiert werden. Dabei werden in der Literatur jedoch deutliche Konzentrationsunterschiede angegeben. Es zeigt sich leider, daß im angewandten experimentellen Modell allenfalls K2P-Kanalgruppen inhibiert werden können, da sich für einzelne K2P-Kanäle bisher keine spezifischen Blocker anbieten. Ebenso ist keine selektive Inhibition der

glialen K2P-Kanäle möglich. Zudem erfolgten die meisten Untersuchungen zur Wirksamkeit der potentiellen Blocker in transfizierten Zellen, so daß die komplette Übertragbarkeit auf das hier angewandte Akutschchnittmodell fraglich ist.

Weiterhin sind Quinin und Quinidin neben den K2P-Kanälen schon in niedrigen Dosierungen auf einige spannungsabhängige K-Kanäle (Kva) (Gutman et al. 2005) und Bupivacain auf die Kir-Kanäle 3.1 und 3.2 sowie Kva 1.5 und 4.3 wirksam (Kubo et al. 2005; Gutman et al. 2005).

4.4. Ergebnisse im Kontrollgewebe und Schlußfolgerungen

Zusammengefaßt zeigen die Daten im Kontrollgewebe, daß aktivitätsabhängige lokale Anstiege der $[K^+]_o$, wie sie bspw. durch repetitive Reizung verursacht werden können, durch Bupivacain, Quinin und Quinidin deutlich vermindert werden. Demgegenüber werden künstlich erzeugte Anstiege der $[K^+]_o$, wie bspw. durch Kalium-Iontophorese, durch Quinin und Quinidin, jedoch nicht durch Bupivacain erhöht.

Die Minderung der durch repetitive Reizung ausgelösten Anstiege der $[K^+]_o$ kann auf eine Blockade von K^+ -Kanälen hinweisen, die für den Kaliumausstrom von entladenden Neuronen verantwortlich sind. Das gegensätzliche Ergebnis, daß zur gleichen Zeit iontophoretisch induzierte Anstiege der $[K^+]_o$ verstärkt wurden, deutet auf eine Reduktion der glialen Kaliumaufnahme und damit -pufferung hin. Räumliche K^+ -Pufferströme (spatial buffering) führen zu einer Nettoaufnahme von K^+ in Astrocyten an Orten maximaler Kaliumanhäufung und resultieren in der Generation von langsamen negativen Feldpotentialen (Dietzel et al. 1989; Lothman und Somjen 1975). Diese Feldpotentialänderungen wurden durch Quinin, Quinidin und Ba^{2+} im Sinne eines reduzierten glialen Kaliumpuffers vermindert.

Beachtet man, daß das Lokalanästhetikum Bupivacain die SAP komplett unterdrückte (Abb. 3.3.), ergibt sich die (komplette) Auslöschung der reizinduzierten Anstiege der $[K^+]_o$ nach Applikation von Bupivacain einfach durch den Block der axonalen Übertragung durch Inhibition von offenen und geschlossenen Na^+ -Kanälen (Courtney et al. 1978; Hille 1966) wie auch durch spannungsunabhängige K^+ -Kanäle (Bräu et al. 1995) und/oder durch den Ausfall der Aktionspotentialgenerierung an der Nervenkörpermembran (Tabatabai et al. 1989). Taverna et al. (2005) zeigten, daß Pyramidenzellen des Hippocampus die K2P-Kanäle TASK-1 und TASK-3 enthalten. Diese Kanäle haben die niedrigsten IC50-Werte (41 μ M und \sim 100 μ M) für Bupivacain (Kim et al. 2000; Kindler et al. 1999). In Spannungsklemm-Experimenten in Schnitten des

Hippocampus (Taverna et al. 2005) konnte der isolierte Leckstrom um rund 28 % blockiert werden und die Zelle depolarisierte um weniger als 10 mV innerhalb von 2 Minuten nach Applikation von 500 μM Bupivacain. Hierbei bleibt unklar, ob wie in den hier durchgeführten Experimenten für 60 Minuten appliziertes Bupivacain mit 200 μM zu einer großen Depolarisation und starken Blockade von TASK-Kanälen führen würde, was in einer depolarisationsabhängigen Inaktivierung von Na^+ -Kanälen und der Unterdrückung des Kaliumausstroms resultieren würde. Solche großen Depolarisationen wurden in isolierten retinalen Müller-Zellen nach kurzer Applikation von 200 μM Bupivacain gesehen (Skatchkov et al. 2006).

Da Bupivacain mit 200 μM keinen Effekt auf die iontophoretisch induzierten Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ hatte, konnte hier die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß TASK-Kanäle in Astrocyten des Hippocampus zur glialen Kaliumaufnahme beitragen.

Dafür unterstützen die hier vorliegenden Daten die Vermutung, daß sowohl die Freisetzung als auch die gliale Aufnahme von K^+ durch Blockade von Quinin- und Quinidin-sensitiven K^+ -Kanälen beeinflusst werden.

4.4.1. Beteiligung von K2P-Kanälen an der neuronalen Kaliumfreisetzung

Eine Verminderung der Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ durch Quinin während repetitiver Reizung wurde bereits beschrieben (Bikson et al. 2002; Smirnov et al. 1999). Bikson et al. nutzten 100-Hz Stimulus-Folgen, um Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ zu erzeugen. Sie erklärten, daß die Quinin-verursachte Reduktion der Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ der Limitierung der neuronalen Entladungsfrequenz als Antwort auf die konstante Depolarisation zugeschrieben werden kann. Sie betonten zudem, daß Quinin nicht die Fähigkeit der Neurone zur Generierung von Aktionspotentialen als Antwort auf Pulsstimuli mit Frequenzen bis zu 50 Hz beeinflusst. In unseren Experimenten wird gezeigt, daß 200 μM Quinin (nach 60 Minuten) die Gipfel der Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ stark reduziert, welche durch Stimulusfolgen mit niedrigerer Frequenz von 20 Hz induziert sind. Dabei werden die Amplituden der SAP nicht relevant beeinflusst. Vielmehr ergänzen wir, daß sowohl Quinin als auch Quinidin in einer Konzentration von 500 μM die stimulusinduzierten Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ um rund 90 % unterdrücken, dabei jedoch die Amplituden der SAP nur um rund 30 % oder weniger reduzieren. Die Daten über die Intensitätsabhängigkeit der Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ unter Kontrollbedingungen zeigten, daß die Verminderung der Anstiege der $[\text{K}^+]_o$ durch Quinin/Quinidin um mindestens 40 % größer ist als durch die Reduktion der Amplituden der SAP vorhergesagt. Dies

stützt die Schlußfolgerung, daß die beiden Substanzen K^+ -Kanäle blockieren, die für den Ausstrom von Kalium nach neuronaler Aktivierung verantwortlich sind.

Quinin und Quinidin blockieren eine große Anzahl verschiedener K^+ -Kanäle wie beispielsweise: spannungsabhängige K^+ -Kanäle wie die K_{va} 1.3, 1.4, 1.5, 1.7, 2.2, 10.1 und 10.2 (Gutman et al. 2005), Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle (K_{ca}) (Ishikawa und Cook 1993; Yamamoto et al. 1997), welche in Pyramidenzellen des Hippocampus lokalisiert sind (Bowden et al. 2001; Sailer et al. 2006) und K_{2P} -Kanäle (Goldstein et al. 2005; Lesage et al. 1996; Lesage et al. 1997; Lesage und Lazdunski 2000; Patel et al. 1998).

Obwohl der Block von verzögert gerichteten K^+ -Kanälen (delayed rectifier) und K_{ca} durch 4-AP oder TEA die antidrom stimulierten Anstiege der $[K^+]_o$ nicht beeinflussten (Jones und Heinemann 1987), muß man die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle beachten, welche hoch sensibel auf Quinin (K_{va} 1.3 und 2.2) oder auf Quinidin (K_{va} 1.4 und 1.5, K_{va} 10.1) sind, aber eine viel niedrigere oder keine Sensitivität für 4-AP und TEA zeigen. Da K_{va} 1.4 präsynaptisch exprimiert wird, spielt es bei antidromer Reizung keine Rolle. Die nur auf Mikrogliazellen vorkommenden K_{va} 1.3 beeinflussen die hier induzierten Kaliumanstiege ebenfalls nicht. Die niedrigen IC_{50} -Werte in der Größenordnung von 0,6 – 14 μM für Quinin und Quinidin (Gutman et al. 2005) lassen vermuten, daß die voll ausgeprägten Effekte von 200 μM Quinin oder 500 μM Quinidin innerhalb von mindestens 30 Minuten wie bei Ba^{2+} auftreten sollten. Die Effekte von Quinin entwickeln sich erst langsam innerhalb von 60 Minuten, wie in den Abbildungen 3.1. und 3.2. gezeigt wird. Darum erscheint es unwahrscheinlich, daß die Blockade von spannungs- oder Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen zur Verminderung der Anstiege der $[K^+]_o$ durch Quinin oder Quinidin beiträgt. Vielmehr kann die Behauptung aufgestellt werden, daß die Freisetzung von K^+ hauptsächlich durch einen Ionenfluß durch K_{2P} -Kanäle erfolgt. Der Fakt, daß Quinin und Quinidin die Kaliumfreisetzung, aber nicht die SAP-Antwort unterdrücken, stimmt mit dieser Idee überein.

Zum aktuellen Kenntnisstand bestehen die Kandidaten der K_{2P} -Kanäle, welche die Kaliumfreisetzung vermitteln, aus TWIK-1, TREK-1 und TREK-2. TWIK-1 wird durch Quinin und Quinidin (IC_{50} -Wert zwischen 50 und 100 μM (Lesage et al. 1996; Lesage et al. 1997)) blockiert. TREK-1 wird durch 41 μM Quinin (Zhou et al. 2009) und TREK-2 durch Quinidin (IC_{50} -Wert von 100 μM (Lesage et al. 2000; Patel et al. 1998)) inhibiert. Da sich die Effekte von Quinin und Quinidin statistisch nicht unterscheiden, kann hier nicht weiter zwischen den K_{2P} -Kanälen unterschieden werden, welche zur Kaliumfreisetzung beitragen.

Überraschenderweise resultierte die zusätzliche Gabe von 2 mM Ba^{2+} zusätzlich zu Quinin oder Quinidin in Gegenwart der Glutamat-Rezeptor-Antagonisten in einer kompletten Unterdrückung sowohl stimulusinduzierter Anstiege der $[K^+]_o$ als auch der SAP. Die alleinige Applikation von Ba^{2+} führte zu einer kräftigen Verstärkung der Anstiege der $[K^+]_o$ trotz einer konstanten Größe der SAP-Amplituden. Frühere Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten eine Erhöhung der SAP-Amplituden in Kontrollgewebe der Ratte und der Pilocarpin-behandelten Ratte (Gabriel et al. 1998). In sklerotischem und nicht-sklerotischem resezierten Gewebe bei Temporallappen-epilepsie konnte keine signifikante Vergrößerung der Amplitude nachgewiesen werden (Kivi et al. 2000) bei jeweils bestehender Verbreiterung des ausgelösten Aktionspotentials. Betrachtet man alternativ die Fläche unter der Kurve statt der Amplitude des Aktionspotentials als Maß der aktivierten Neurone (vergleiche Abb. 3.4.B.a und b), ergäbe sich hier in allen Fällen eine Erhöhung durch Ba^{2+} . Diese erhöhte Erregbarkeit beruht auf der Blockade der Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Kaliumkanäle durch Ba^{2+} nach Eintritt ins Zellinnere. Diese Aktionspotentialverbreiterung und damit Vergrößerung der Fläche unter der Kurve ist andeutungsweise auch unter dem Einfluß von 200 μ M Quinin und deutlicher unter 500 μ M Quinin sowie 200 μ M Bupivacain zu erkennen (Abb. 3.2.B und 3.3.B).

Die Unterdrückung der Amplituden der SAP ist möglicherweise eine Konsequenz der depolarisationsabhängigen Inaktivierung von Na^+ -Kanälen. Quinin depolarisiert das Membranpotential der Pyramidenzellen nicht (Bikson et al. 2002; Smirnov et al. 1999) und die Membrandepolarisation durch Ba^{2+} in Gegenwart von CNQX und 2-APV bleibt unter der Aktionspotentialschwelle (nicht publizierte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe). Deshalb müssen mögliche Interaktionen von Ba^{2+} und Quinin/Quinidin Ziele der Aufklärung künftiger Experimente bleiben.

4.4.2. Beitrag der K2P-Kanäle zur glialen Kaliumaufnahme und zum spatial K^+ -buffering

Es ist sehr wahrscheinlich, daß ein großer Anteil des freigesetzten Kaliums durch in Astrocyten exprimierte bariumsensitive Kir-Kanäle aufgenommen wird. Hier bewiesen Nicholson et al. (1979) durch Messungen des Extrazellulärraums und der Tortuosität mit ionensensitiven Mikroelektroden, daß extrazellulär akkumulierende Kaliumionen in intrazelluläre Kompartimente aufgenommen bzw. durch intrazelluläre Kompartimente transportiert werden müssen, da im Hirngewebe der Anstieg der $[K^+]_o$ deutlich niedriger ausfiel als durch Berechnungen im Agar erwartet. Dies stützte die Theorie des spatial buffering. Frühere (Jauch et al. 2002) und aktuellere

Ergebnisse unserer Gruppe (Päsler et al. 2007) unterstützten diese These ebenfalls, da gezeigt wurde, daß 2 mM Ba^{2+} die iontophoretisch induzierten Anstiege der $[K^+]_o$ in etwa verdoppeln. Weitere Versuche mit Experimenten an knock-out-Tieren konnten einen sehr großen Anteil des Kir4.1 an der Regulation der $[K^+]_o$ zeigen (Neusch et al. 2005 in vitro; Chever et al. 2010 in vivo). Der IC50-Wert für den hemmenden Effekt von Ba^{2+} auf Kir-Kanäle ist im Bereich von unter 10 μ M (Ransom und Sontheimer 1995; Kubo et al. 2005). 100 μ M Ba^{2+} führen zu einer Erhöhung der iontophoretisch induzierten Anstiege der $[K^+]_o$ von ~70 % (Ivens et al. 2007). In höheren Konzentrationen (2 mM) blockiert Ba^{2+} auch K2P-Kanäle (Lesage und Lazdunski 2000; Rajan et al. 2001) und verstärkt Anstiege der $[K^+]_o$ um ~100 %. Dies läßt vermuten, daß der hemmende Effekt von Ba^{2+} auf K2P-Kanäle um mindestens 30 % Zuwachs beitragen kann.

Die aktuellen Ergebnisse zeigen, daß Quinin und Quinidin in Konzentrationen von 500 μ M die iontophoretisch induzierten Anstiege der $[K^+]_o$ signifikant um ~40 % und ~28 % erhöhen. Zusammengefaßt deuten diese Ergebnisse auf die Beteiligung von Quinin- und Quinidin-sensitiven K2P-Kanälen an glialen K^+ -Aufnahmeprozessen hin. K2P-Kanäle zeigen nur eine schwache einwärts- oder lineare Richtung (Lesage und Lazdunski 2000). Deshalb stellt sich die Frage, ob die durch repetitive Reizung oder Iontophorese generierten kleinen Anstiege der $[K^+]_o$ von ~2 mM hoch genug sind, um einen signifikanten Einwärtsstrom in Glia zu erzeugen. Tatsächlich deuten Studien in kultivierten Astrocyten und Expressionssystemen (Ferroni et al. 2003; Gnatenco et al. 2002; Seifert et al. 2009) darauf hin, daß der Anteil von K2P-Kanälen an der glialen Kaliumaufnahme klein ist. Die Vermutung, daß Quinin durch Blockade von K2P-Kanälen die gliale Kaliumaufnahme reduziert, benötigt weitere Bestätigung durch direkte Studien der Leckstromeigenschaften in gekoppelten und ungekoppelten Astrocyten in Hippocampusschnitten. Solche Studien wären geeignet darzustellen, ob Einwärtsströme solche Kanäle passieren, wenn die $[K^+]_o$ nur gering erhöht ist.

Die Beobachtung, daß die kombinierte Applikation mit Ba^{2+} die Effekte von Quinin und Quinidin um etwa den Faktor drei erhöht, betont die Wichtigkeit von Kir-Kanälen bei der glialen Kaliumaufnahme. Auch impliziert der Fakt, daß die Effekte der jeweils kombinierten Applikation Quinin/Quinidin und Ba^{2+} und von Ba^{2+} allein nicht signifikant unterschiedlich waren, daß

1. die K2P-Kanäle, welche vorrangig involviert waren, sensitiv auf Ba^{2+} sind und
2. daß es keine additiven Effekte von Ba^{2+} und Quinin/Quinidin auf diese Kanäle gibt.

Welches sind die K2P-Kanäle, die durch Quinin und/oder Quinidin und Ba^{2+} blockiert werden? Die vorhandenen pharmakologischen Ergebnisse deuten auf die Kanäle TWIK-1, TREK-1,

TREK-2 und TASK-3 hin. Diese sind sensitiv auf Quinin, Quinidin und Ba^{2+} (Ferroni et al. 2003; Gnatenco et al. 2002; Kim et al. 2000; Lesage et al. 1996; Lesage et al. 1997; Lesage et al. 2000; Lesage und Lazdunski 2000; Rajan et al. 2000). Die Expressionsergebnisse zeigen Produkte von TASK-1 auf hippocampalen Astrocyten (Kindler et al. 2000), und solche wie TASK-1, TASK-3 und TREK-2 co-lokalisiert mit Kir-Kanälen auf kultivierten corticalen Astrocyten (Gnatenco et al. 2002). TWIK-1, TREK-1 und TREK-2 werden auf Astrocyten (Seifert et al. 2009) und TASK-1 und -3 auf glialen Müller-Zellen (Skatchkov et al. 2006) exprimiert.

Bemerkenswerterweise fanden wir heraus, daß TASK-ähnliche Kanäle in der CA1 des Hippocampus von der Kandidatenliste ausgeschlossen werden sollten, da der potente TASK-Kanal-Blocker Bupivacain die iontophoretisch induzierten Anstiege der $[K^+]_o$ nicht beeinflusste. Die elektrophysiologischen Untersuchungen von Wang et al. 2013 und Seifert et al. 2009 deuteten auf einen ebenfalls unbedeutenden Beitrag durch TWIK-1 hin.

4.5. Wirkungen auf die epileptischen Gewebe

Auffallend sind die deutlichen Größenunterschiede in den maximalen Amplituden der SAP auf antidrome Stimuli zwischen den Geweben ($-7,9 \pm 0,6$ mV in der Kontrollratte; $-3,5 \pm 0,7$ mV in der Pilokarpin-behandelten Ratte und $-1,9 \pm 0,6$ mV im Gewebe der Epilepsiepatienten). Dies ist jedoch durch die deutlich geringere Neuronendichte in den epileptischen Geweben erklärbar (Abb. 1.4.). Die Änderungen in den IFP und Anstiegen der $[K^+]_o$ sind demgegenüber deutlich ausgeglichener (reizinduzierte IFP bei niedrigerer Intensität: $-0,15$ mV; $-0,23$ mV; $-0,26$ mV (Ratte, Pilo, human)), allerdings auch bei etwas geringerer Reizintensität von 40 % im Kontrollgewebe gegenüber 58 % und 53 % im epileptischen Gewebe (Pilo, human); reizinduzierte Anstiege der $[K^+]_o$ bei niedrigerer Intensität: 1,02 mM; 0,81 mM; 0,98 mM (Ratte, Pilo, human, auf die Standardfehler wurde hier der Übersichtlichkeit wegen verzichtet). Dies weist auf die Hyperexzitabilität der verbleibenden Neurone und/oder auf die eingeschränkte Kaliumpufferfähigkeit der Glia hin. Auch bei den iontophoretisch induzierten Änderungen zeigte sich ein ausgeglichenes Bild. Ebenfalls bei niedrigerer Stromstärke waren hier IFP von $-0,19$ mV; $-0,15$ mV und $-0,15$ mV zu messen (Ratte, Pilo, human) und Anstiege der $[K^+]_o$ von 1,08 mM, 1,02 mM und 1,09 mM (Ratte, Pilo, human) bei applizierten Strömen von 178 nA, 185 nA und 243 nA.

Wurde danach der K2P-Blocker Quinin hinzugegeben, reagierten alle Gewebe qualitativ gleich mit einer Abnahme der extrazellulären Kaliumanstiege während repetitiver Reizung und einer

diskreten Abnahme der SAP-Amplituden auf Einzelstimulus. Auf iontophoretisch appliziertes Kalium reagierten die Gewebe leicht unterschiedlich, im Kontrollgewebe zeigte sich eine leicht signifikant erhöhte Zunahme der Anstiege der $[K^+]_o$, wohingegen im Pilocarpin-Modell und im Epilepsiegewebe diese Anstiege nahezu unbeeinflusst blieben. Möglicherweise liegt dies an einer unterschiedlichen Expression von Kalium-Kanälen in den Pilocarpin-behandelten Ratten und im humanen epileptischen Gewebe. Hierfür liegen bisher jedoch nur wenige Studien vor. In Astrozyten von Kontrolltieren zeigte sich eine starke TASK-1-Expression im Hippocampus. 4 Wochen nach Induktion eines Status epilepticus (Pilocarpin-Modell der Ratte) war diese in den Astrozyten der CA1 bei gleicher Zellzahl erhalten. Dagegen verminderte sich die TASK-1-Expression im GD deutlich, die Astrocytenzahl erholte sich nach zwischenzeitlicher Reduktion wieder (Kim et al. 2008). Kim et al. (2009) zeigten weiterhin im Pilocarpin-Epilepsie-Modell der Ratte eine verstärkte Expression von TASK-2-Kanälen in Neuronen des GD und der CA3, jedoch eine Verminderung in Neuronen der CA1. V. a. in den Endfüßen perivaskulärer Astrozyten zeigte sich jedoch eine verstärkte Expression von TASK-2-Kanälen. In parenchymatösen hippocampalen Astrozyten war die TASK-2-Expression nicht vom Normalgewebe zu unterscheiden. Auch für TASK-3-Kanäle liegen Expressionsanalysen an Pilocarpin-behandelten im Vergleich zu Kontrollratten vor. Im normalen Gewebe zeigte sich eine deutliche TASK-3-Expression in den Neuronen der CA1 – 3 und des GD, jedoch nicht in Astrocyten. 4 Wochen nach Status epilepticus zeigte sich jedoch eine Expression in einem Großteil (ca. 85 %) der GFAP-positiven Astrocyten im Bereich des Ammonshorns, jedoch wenig Expression im Bereich des GD (Kim et al. 2011). Auch der humane Hippocampus wurde auf TASK-1- und TASK-3-Kanäle untersucht (Kim et al. 2011). TASK-1-Kanäle fanden sich deutlich auf den Neuronen des Ammonshorn und des GD sowie auf Interneuronen, jedoch nicht auf Astrocyten in humanem Kontrollgewebe. Im nicht-sklerotischen resezierten humanen epileptischen Gewebe (cave n = 1) waren die TASK-1-Kanäle auf den Neuronen reduziert bei normaler Morphologie der Zellen. Auf Astrocyten waren diese nicht exprimiert. Im sklerotischen humanen Gewebe waren TASK-1-Kanäle auf Neuronen (Ammonshorn und GD) deutlich reduziert, auf Astrocyten im Ammonshornbereich jedoch deutlich (ca. 80 % der GFAP-positiven Astrocyten) und im GD-Bereich leicht erhöht (ca. 12 % der Astrocyten). Für TASK-3-Kanäle gilt nahezu das gleiche Expressionsmuster im humanen Gewebe bei etwas geringerer Ausprägung der Expression auf den Astrocyten im Bereich des Ammonshorn (ca. 67 %). Jedoch zeigten schon unsere Untersuchungen am Kontrollgewebe, daß Bupivacain-sensitive TASK-Kanäle nicht zur Kalium-pufferung beitragen.

Wie erklären sich dann die Unterschiede der iontophoretisch induzierten Anstiege der $[K^+]_o$ zwischen Kontrollgewebe und epileptischem Gewebe?

Young et al. (2009) beschrieben eine verstärkte Expression der Gruppe der Kir2-Kanäle (welche ebenfalls stark Ba^{2+} -sensitiv sind) in Neuronen des epileptischen GD im Kainat-Modell der Maus, wogegen Kir3-Kanäle nicht verstärkt exprimiert waren. TWIK-1-Kanäle waren im Bereich des GD so verstärkt exprimiert, daß aufgrunddessen die zelluläre Ebene nicht differenziert werden konnte. TWIK-2-Kanäle wurden hier im GD leicht verstärkt exprimiert nachgewiesen. Zur CA1 fanden sich keine Aussagen, in den Abbildungen der Veröffentlichung scheinen die TWIK-Kanäle jedoch nicht erhöht exprimiert. Da sich die iontophoretisch induzierten Anstiege der $[K^+]_o$ in beiden epileptischen Geweben unter Quinin-Einfluß jedoch nicht signifikant änderten, ist zu vermuten, daß die infrage kommenden TREK- und TWIK-Kanäle auf Glia nicht verstärkt exprimiert werden.

Bezüglich der glialen Kir-Kanäle, hier insbesondere der Kir4.1, in epileptischem Gewebe gibt es unterschiedliche Daten: Das et al. (2012) zeigten in Expressionsanalysen nach Hippocampusresektion bei Temporallappenepilepsie eine deutliche Minderung von ca. 50 % (wohingegen Aquaporin-Kanal 4 (AQ4) und Connexin 43 nahezu verdoppelt sind). Die Minderung von Kir4.1 wird von Heuser et al. (2012) in humanem AHS-Gewebe bestätigt, in non-AHS- und Kontrollgewebe war Kir4.1 nicht vermindert. Dies bestätigt frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, in denen eine fehlende Bariumsensitivität im AHS-Gewebe sowie eine erhaltende Bariumsensitivität im non-AHS-Gewebe gezeigt wurde (Jauch et al. 2002; Kivi et al. 2000). Analysen im Hippocampus Pilokarpin-behandelter Ratten wiesen jedoch bei bestehender Astroglieose (verdoppelte Zellzahl pro Flächeneinheit) einen gleichen Zellgehalt an Kir4.1 nach (Nagao et al. 2013). Dies erhärtet Teilergebnisse früherer Studien, in denen eine Gruppe Pilokarpin-behandelter Ratten Ba^{2+} -sensitiv war (Gabriel et al. 1998; Heinemann et al. 2000), die zweite Gruppe jedoch nicht. Erstaunlicherweise waren in den hier durchgeführten Experimenten sowohl die Pilokarpin-behandelten Ratten als auch das humane Gewebe nach iontophoretischer Kaliumapplikation gut auf Ba^{2+} sensibel (Pilo: Anstiege der $[K^+]_o$ unter Ba^{2+} um mindestens 66,5 %, max. 312 %; human: Anstieg um mindestens 11,7 %, max. 267 %). Die Bariumgabe erfolgte jedoch in zeitgleicher Applikation mit Quinin, so daß hier einander beeinflussende Effekte nicht auszuschließen sind. Neuere Studien zeigten eine deutliche Downregulation von Kir4.1 auch nach Öffnung der Blut-Hirn-Schranke (David et al. 2009). Danach kann Serumalbumin ins Hirnparenchym übertreten, wird von den Astrocyten aufgenommen und beeinträchtigt deren spätere Fähigkeit zur Glutamat-Aufnahme und ist somit durch erhöhte synaptische Aktivität und damit

verminderte Kaliumpufferung einer Epileptogenese förderlich. Dies kann sogar zu „spreading“ Depolarisationen nach Blut-Hirn-Schranken-Öffnung aufgrund Ischämie/Infarkt führen (Lapilover et al. 2012).

4.6. Schlußfolgerungen

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß in Pyramidenzellen der CA1 Quinin- und Quinidin-sensitive K2P-Kanäle die Kalium-Freisetzung nach neuronaler Aktivierung vermitteln.

Es bleibt offen, ob Bupivacain-sensitive TASK-Kanäle auch involviert sind.

Zudem tragen astrocytäre Quinin- und Quinidin-sensitive K2P-Kanäle zur glialen Kaliumaufnahme bei, wenn auch weniger als Ba²⁺-sensitive Kir-Kanäle. Bupivacain-sensitive K2P-Kanäle tragen zur glialen Kaliumaufnahme nicht bei.

Die durch repetitive Reizung ausgelösten Anstiege der [K⁺]_o unterschieden sich in den Pilocarpin-behandelten Ratten von denen der Kontrollratten und dem humanen Gewebe (Abb. 3.8.B), was eine leicht verminderte Expression der Quinin-sensitiven K2P-Kanäle auf Neuronen der CA1 gegenüber dem Kontroll- und dem humanen Gewebe vermuten läßt.

Zusammenfassend kann somit geäußert werden, daß die Kaliumpufferung im epileptischen Gewebe hauptsächlich über gliale Kir-Kanäle erfolgt und gliale K2P-Kanäle nur einen nicht signifikanten Beitrag leisten. Da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geweben ergaben, kann zudem vermutet werden, daß sich Astrocyten im chronischen epileptischen Zustand nicht so stark von normalen Astrocyten unterscheiden. Ob dies durch eine geöffnete Blut-Hirn-Schranke verursacht wird, bleibt offen.

5. Literaturverzeichnis

AWMF-Leitlinie Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Erster epileptischer Anfall und Epilepsien im Erwachsenenalter; Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie; www.awmf.de 2012; 030/041

Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1985; 14: 375 – 403

Bikson M., Id Bihi R., Vreugdenhil M., Köhling R., Fox JE., Jefferys JG. Quinine suppresses extracellular potassium transients and ictal epileptiform activity without decreasing neuronal excitability in vitro. *Neuroscience* 2002; 115(1): 251 – 261

Binder DK., Steinhäuser C. Functional changes in astroglial cells in epilepsy. *Glia* 2006; 54: 358 – 368

Blümcke I., Pauli E., Clusmann H., Schramm J., Becker A., Elger C., Merschhemke M., Meencke HJ., Lehmann TN., Deimling A., Scheiwe C., Zentner J., Volk B., Stefan H., Hildebrandt M. A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis. *Acta Neuropathol* 2007; 113: 235 – 244

Bowden SE., Fletcher S., Loane DJ., Marrion NV. Somatic colocalization of rat SK1 and D class (Ca(v)1.2) L-type calcium channels in rat CA1 hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 2001 Oct 15; 21(20): RC175

Bräu ME., Nau C., Hempelmann G., Vogel W. Local anesthetics potently block a potential insensitive potassium channel in myelinated nerve. *J Gen Physiol* 1995 Apr; 105(4): 485 – 505

Brohawn SG., del Mármol J., MacKinnon R. Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science* 2012 Jan 27; 335(6067): 436 – 441

Butt AM., Kalsi A. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 33 – 44

Chever O., Djukic B., McCarthy KD., Amzica F. Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice. *J Neurosci* 2010 Nov 24; 30(47): 15769 – 15777

Courtney KR., Kendig JJ., Cohen EN. The rates of interaction of local anesthetics with sodium channels in nerve. *J Pharmacol Exp Ther* 1978 Nov; 207(2): 594 – 604

Das A., Wallace GC. 4th, Holmes C., McDowell ML., Smith JA., Marshall JD., Bonilha L., Edwards JC., Glazier SS., Ray SK, Banik NL. Hippocampal tissue of patients with refractory temporal lobe epilepsy is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors. *Neuroscience* 2012 Sep 18; 220: 237 – 246

David Y., Cacheaux LP., Ivens S., Lapilover E., Heinemann U., Kaufer D., Friedman A. Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: consequence of altered potassium and glutamate homeostasis? *J Neurosci* 2009 Aug 26; 29(34): 10588 – 10599

Dietzel I., Heinemann U., Lux HD. Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrolyte and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain. *Glia* 1989; 2: 25 – 44

Dlugos DJ. The early identification of candidates for epilepsy surgery. *Arch Neurol* 2001; 58 (19): 1543 – 1546

Dreier JP., Heinemann U. Regional and time dependent variations of low magnesium induced epileptiform activity in rat temporal cortex. *Exp Brain Res* 1991; 87: 581 – 596

Duprat F., Lesage F., Fink M., Reyes R., Heurteaux C., Lazdunski M. TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* 1997 Sep 1; 16(17): 5464 – 5471

El Falougy H., Benuska J. History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. *Bratisl Lek Listy* 2006; 107 (4): 103 – 106

Engel J. Jr, McDermott MP., Wiebe S., Langfitt JT., Stern JM., Dewar S., Sperling MR., Gardiner I., Erba G., Fried I., Jacobs M., Vinters HV., Mintzer S., Kieburtz K.; Early Randomized Surgical Epilepsy Trial (ERSET) Study Group. Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: a randomized trial. *JAMA* 2012 Mar 7; 307(9): 922 – 930

Enyedi P., Czirják G. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* 2010; Apr 90(2): 559 – 605

European Federation of Neurological Societies Task Force. Pre-surgical evaluation for epilepsy surgery – European Standards. *Eur J Neurol* 2000; 7 (1): 119 – 122

Federative Committee on Anatomical Terminology. Terminologia Anatomica. International anatomical terminology. Thieme, Stuttgart: 1998, 292 p.

Ferroni S., Valente P., Caprini M., Nobile M., Schubert P., Rapisarda C. Arachidonic acid activates an open rectifier potassium channel in cultured rat cortical astrocytes. *J Neurosci Res* 2003; 72: 363 – 372

Gabriel S., Eilers A., Kivi A., Kovács R., Schulze K., Lehmann T.-N., Heinemann U. Effects of barium on stimulus induced changes in extracellular potassium concentration in area CA1 of hippocampal slices from normal and pilocarpine-treated epileptic rats. *Neurosci Lett* 1998; 242: 9 – 12

Gabriel S., Njunting M., Pomper JK., Merschhemke M., Sanabria ER., Eilers A., Kivi A., Zeller M., Meencke HJ., Cavalheiro EA., Heinemann U., Lehmann TN. Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis. *J Neurosci* 2004 Nov 17; 24(46): 10416 – 30

Gnatenco C., Han J., Snyder AK., Kim D. Functional expression of TREK-2 K⁺ channel in cultured rat brain astrocytes. *Brain Res* 2002; 931: 56 – 67

Goddard GV., McIntyre DC., Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 1969; 25: 295 – 330

Goldstein SA., Bayliss DA., Kim D., Lesage F., Plant LD., Rajan S. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005 Dec; 57(4): 527 – 540

Gutman GA., Chandy KG., Grissmer S., Lazdunski M., McKinnon D., Pardo LA., Robertson GA., Rudy B., Sanguinetti MC., Stühmer W., Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005 Dec; 57(4): 473 – 508

Heinemann U., Arens J. Production and calibration of ion-sensitive microelectrodes. In: Grantyn, R., Kettenmann, H. (Eds.), *Practical Electrophysiological Methods: A Guide For In Vitro Studies in Vertebrate Neurobiology*, Wiley-Liss, New York, 1992, pp. 206 – 212

Heinemann U., Gabriel S., Jauch R., Schulze K., Kivi A., Eilers A., Kovacs R., Lehmann TN. Alterations of glial cell function in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2000; 41 Suppl 6: S185 – 189

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

Heinemann U., Lux HD. Ceiling of stimulus induces rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat. *Brain res* 1977; 120: 231 – 249

Heuser K., Eid T., Lauritzen F., Thoren AE., Vindedal GF., Taubøll E., Gjerstad L., Spencer DD., Ottersen OP., Nagelhus EA., de Lanerolle NC. Loss of perivascular Kir4.1 potassium channels in the sclerotic hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012 Sep; 71(9): 814 – 825

Hille B. Common mode of action of three agents that decrease the transient change in sodium permeability in nerves. *Nature* 1966 Jun 18; 210(5042): 1220 – 1222

Hinterkeuser S., Schroder W., Hager G., Seifert G., Blumcke I., Elger CE., Schramm J., Steinhauser C. Astrocytes in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy display changes in potassium conductances. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 2087 – 2096

Hodgkin AL., Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952; 117(4): 500 – 544

Ishikawa T., Cook DI. Effects of K⁺ channel blockers on inwardly and outwardly rectifying whole-cell K⁺ currents in sheep parotid secretory cells. *J Membr Biol* 1993 Apr; 133(1): 29 – 41

Ivens S., Kaufer D., Flores LP., Bechmann I., Zumsteg D., Tomkins O., Seiffert E., Heinemann U., Friedman A. TGF- β receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain* 2007; 130: 535 – 547

Jauch R., Windmüller O., Lehmann TN., Heinemann U., Gabriel S. Effects of barium, furosemide, ouabaine and 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) on ionophoretically-induced changes in extracellular potassium concentration in hippocampal slices from rats and from patients with epilepsy. *Brain Res* 2002; 925: 18 – 27

Jones RSG., Heinemann U. Pre- and postsynaptic K⁺ and Ca²⁺ fluxes in area CA1 of the rat hippocampus in vitro: effects of Ni²⁺, TEA and 4-AP. *Exp Brain Res* 1987; 68: 205 – 209

Kim JE., Kwak SE., Choi SY., Kang TC. Region-specific alterations in astroglial TWIK-related acid-sensitive K⁺-1 channel immunoreactivity in the rat hippocampal complex following pilocarpine-induced status epilepticus. *J Comp Neurol* 2008 Oct 10; 510(5): 463 – 474

Kim JE., Kwak SE., Kang TC. Upregulated TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel-2 in neurons and perivascular astrocytes in the hippocampus of experimental temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2009 Apr; 50(4): 654 – 663

Kim JE., Yeo SI., Ryu HJ., Chung CK., Kim MJ., Kang TC. Changes in TWIK-related acid sensitive K⁺-1 and -3 channel expressions from neurons to glia in the hippocampus of temporal lobe epilepsy patients and experimental animal model. *Neurochem Res* 2011 Nov; 36(11): 2155 – 2168

Kim Y., Bang H., Kim D. TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family. *J Biol Chem* 2000; 275: 9340 – 9347

Kindler CH., Pietruck C., Yost CS., Sampson ER., Gray AT. Localization of the tandem pore domain K⁺ channel TASK-1 in the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 80: 99 – 108

Kindler CH., Yost CS., Gray AT. Local anesthetic inhibition of baseline potassium channels with two pore domains in tandem. *Anesthesiology* 1999; 90: 1092 – 1102

Kivi A., Lehmann TN., Kovács R., Eilers A., Jauch R., Meencke HJ., von Deimling A., Heinemann U., Gabriel S. Effects of barium on stimulus-induced rises of [K⁺]_o in human epileptic non-sclerotic and sclerotic hippocampal area CA1. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 2039 – 2048

Kofuji P., Newman EA. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 2004; 129: 1045 – 1056

Kraig RP., Nicholson C. Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience* 1978; 3: 1045 – 1059

Krnjevic K., Morris ME. Correlation between extracellular focal potentials and K⁺ potentials evoked by primary afferent activity. *Can J Physiol Pharm* 1975; 53: 912 – 922

Kubo Y., Adelman JP., Clapham DE., Jan LY., Karschin A., Kurachi Y., Lazdunski M., Nichols CG., Seino S., Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005 Dec; 57(4): 509 – 526

Kwan P., Arzimanoglou A., Berg AT., Brodie MJ., Allen Hauser W., Mathern G., Moshè SL., Perucca E., Wiebe S., French J. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 2010 Jun; 51(6): 1069 – 1077

Kwan P., Brodie MJ. Refractory epilepsy: a progressive, intractable but preventable condition? *Seizure* 2002; 11: 77 – 84

Lapilover EG., Lippmann K., Salar S., Maslarova A., Dreier JP., Heinemann U., Friedman A. Peri-infarct blood-brain barrier dysfunction facilitates induction of spreading depolarization associated with epileptiform discharges. *Neurobiol Dis* 2012 Dec; 48(3): 495 – 506

Lehmann TN., Gabriel S., Kovacs R., Eilers A., Kivi A., Schulze K., Lanksch WR., Meencke HJ., Heinemann U. Alterations of Neuronal Connectivity in Area CA1 of Hippocampal Slices from Temporal Lobe Epilepsy Patients and from Pilocarpine-Treated Epileptic Rats. *Epilepsia* 2000; 41(Suppl. 6): S190 – S194

Lesage F., Guillemare E., Fink M., Duprat F., Lazdunski M., Romey G., Barhanin J. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J* 1996; 15(5): 1004 – 1011

Lesage F., Lauritzen I., Duprat F., Reyes R., Fink M., Heurteaux C., Lazdunski M. The structure, function and distribution of the mouse TWIK-1 K⁺ channel. *FEBS Lett* 1997 Jan 27; 402(1): 28 – 32

Lesage F., Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 2000; 279: F793 – F801

- Lesage F., Terrenoire C., Romey G., Lazdunski M.** Human TREK-2, a 2P domain mechanosensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 2000 Sep 15; 275(37): 28398 – 28405
- Lorente de Nó R.** Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol Lpz* 1934; 46: 113 – 117
- Lothman EW., Somjen GG.** Extracellular potassium activity, intracellular and extracellular potential responses in the spinal cord. *J Physiol* 1975 Oct; 252(1): 115 – 136
- Lotshaw DP.** Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K⁺ channels. *Cell Biochem Biophys* 2007; 47: 209 – 256
- Lux HD., Neher E.** The equilibration time course of [K⁺]_o in cat cortex. *Exp Brain Res* 1973; 17: 190 – 205
- Ma BF., Xie MJ., Zhou M.** Bicarbonate efflux via GABA(A) receptors depolarizes membrane potential and inhibits two-pore domain potassium channels of astrocytes in rat hippocampal slices. *Glia* 2012 Nov; 60(11): 1761 – 1772
- Miller AN., Long SB.** Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. *Science* 2012 Jan 27; 335(6067): 432 – 436
- Nagao Y., Harada Y., Mukai T., Shimizu S., Okuda A., Fujimoto M., Ono A., Sakagami Y., Ohno Y.** Expressional analysis of the astrocytic Kir4.1 channel in a pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy model. *Front Cell Neurosci* 2013 Jul 5; 7: 104
- Neusch C., Papadopoulos N., Müller M., Maletzki I., Winter SM., Hirrlinger J., Handschuh M., Bähr M., Richter DW., Kirchhoff F., Hülsmann S.** Lack of the Kir4.1 channel subunit abolishes K⁺ buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K⁺ regulation. *J Neurophysiol* 2006 Mar; 95(3): 1843 – 1852
- Nicholson C., Phillips JM., Gardner-Medwin AR.** Diffusion from an iontophoretic point source in the brain: role of tortuosity and volume fraction. *Brain Res* 1979 Jun 29; 169(3): 580 – 584

- Nicholson C., Phillips JM.** Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. *J Physiol* 1981 Dec; 321: 225 – 257
- Nieuwenhuys R., Voogd J., van Huijzen C.** The Human Central Nervous System, 4th edition, Springer eBook Collection, 2008, Kapitel 3
- Nixdorf-Bergweiler BE., Albrecht D., Heinemann U.** Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. *Glia* 1994 Nov; 12(3): 180 – 195
- Orkand RK., Nicholls JG., Kuffler SW.** Effects of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 1966; 29: 788 – 806
- Päsler D., Gabriel S., Heinemann U.** Two-pore-domain potassium channels contribute to neuronal potassium release and glial potassium buffering in the rat hippocampus. *Brain Res* 2007 Oct 10; 1173: 14 – 26
- Patel AJ., Honore E., Maingret F., Lesage F., Fink M., Duprat F., Lazdunski M.** A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J* 1998; 17: 4283 – 4290
- Payne JA.** Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K⁺]_o regulation. *Am J Physiol* 1997 Nov; 273(5 Pt 1): C1516 – 1525
- Perez-Pinzon MA., Tao L., Nicholson C.** Extracellular potassium, volume fraction, and tortuosity in rat hippocampal CA1, CA3, and cortical slices during ischemia. *J Neurophysiol* 1995; 74: 565 – 573
- Rajan S., Wischmeyer E., Karschin C., Preisig-Muller R., Grzeschik KH., Daut J., Karschin A., Derst C.** THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J Biol Chem* 2001; 276: 7302 – 7311
- Rajan S., Wischmeyer E., Xin Liu G., Preisig-Müller R., Daut J., Karschin A., Derst C.** TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J Biol Chem* 2000 Jun 2; 275(22): 16650 – 16657
- Ràmon y Cajal.** Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Paris: Maloin, 1911

- Ransom BR., Goldring S.** Ionic determinants of membrane potential of cells presumed to be glia in cerebral cortex of cat. *J Neurophysiol* 1973 Sep; 36(5): 855 – 868
- Ransom CB., Sontheimer H.** Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K⁺ currents in rat spinal cord astrocytes. *J Neurophysiol* 1995 Jan; 73(1): 333 – 346
- Rusznák Z., Pocsai K., Kovács I., Pór A., Pál B., Bíró T., Szücs G.** Differential distribution of TASK-1, TASK-2 and TASK-3 immunoreactivities in the rat and human cerebellum. *Cell Mol Life Sci* 2004 Jun; 61(12): 1532 – 1542
- Sailer CA., Kaufmann WA., Kogler M., Chen L., Sausbier U., Ottersen OP., Ruth P., Shipston MJ., Knaus HG.** Immunolocalization of BK channels in hippocampal pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* 2006 Jul; 24(2): 442 – 454
- Sarkisian MR.** Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders. *Epilepsy Behav* 2001; 2(3): 201 – 216
- Seifert G., Hüttmann K., Binder DK., Hartmann C., Wyczynski A., Neusch C., Steinhäuser C.** Analysis of astroglial K⁺ channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1 subunit. *J Neurosci* 2009 Jun 10; 29(23): 7474 – 7488
- Skatchkov SN., Eaton MJ., Shuba YM., Kucheryavykh YV., Derst C., Veh RW., Wurm A., Iandiev I., Pannicke T., Bringmann A., Reichenbach A.** Tandem-pore domain potassium channels are functionally expressed in retinal (Müller) glial cells. *Glia* 2006; 53: 266 – 276
- Smirnov S., Paalasmaa P., Uusisaari M., Voipio J., Kaila K.** Pharmacological isolation of the synaptic and nonsynaptic components of the GABA-mediated biphasic response in rat CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 1999 Nov 1; 19(21): 9252 – 9260
- Sofroniew MV., Vinters HV.** Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010 Jan; 119(1): 7 – 35
- Sontheimer H., Waxman SG.** Expression of voltage-activated ion channels by astrocytes and oligodendrocytes in the hippocampal slice. *J Neurophysiol* 1993; 70: 1863 – 1873
- Tabatabai M., Booth AM., Kirimli B.** Effects of bupivacaine on the membrane properties of nerve cell soma. *Arch Int Physiol Biochim* 1989 Oct; 97(5): 409 – 415

- Talley EM., Solorzano G., Lei Q., Kim D., Bayliss DA.** CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci* 2001; 21: 7491 – 7505
- Taverna S., Tkatch T., Metz AE., Martina M.** Differential expression of TASK channels between horizontal interneurons and pyramidal cells of rat hippocampus. *J Neurosci* 2005 Oct 5; 25(40): 9162 – 9170
- Turski W.A., Cavaleiro E.A., Schwarz M., Czuczwar S.L.J., Kleinrok Z., Turski L.** Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 1983; 9: 315 – 335
- Wallraff A., Kohling R., Heinemann U., Theis M., Willecke K., Steinhauser C.** The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci* 2006; 26: 5438 – 5447
- Walz W.** Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int* 2000; 36: 291 – 300
- Wang W., Putra A., Schools GP., Ma B., Chen H., Kaczmarek LK., Barhanin J., Lesage F., Zhou M.** The contribution of TWIK-1 channels to astrocyte K(+) current is limited by retention in intracellular compartments. *Front Cell Neurosci* 2013 Dec 9; 7: 246
- Wiebe S., Blume WT., Girvin JP., Eliasziw M. Effectiveness and Efficiency of Surgery for Temporal Lobe Epilepsy Study Group.** A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med* 2001 Aug 2; 345(5): 311 – 318
- Witter MP., Amaral DG., Paxinos G.** Hippocampal formation. The Rat Nervous System. San Diego, CA: Elsevier Academic Press. 2004: p 635 – 704
- Yaari Y., Konnerth A., Heinemann U.** Nonsynaptic epileptogenesis in the mammalian hippocampus in vitro. II. Role of extracellular potassium. *J Neurophysiol* 1986 Aug; 56(2): 424 – 438
- Yamamoto T., Kakehata S., Yamada T., Saito T., Saito H., Akaike N.** Effects of potassium channel blockers on the acetylcholine-induced currents in dissociated outer hair cells of guinea pig cochlea. *Neurosci Lett* 1997 Oct 31; 236(2): 79 – 82
- Young CC., Stegen M., Bernard R., Müller M., Bischofberger J., Veh RW., Haas CA., Wolfart J.** Upregulation of inward rectifier K⁺ (Kir2) channels in dentate gyrus granule cells in temporal lobe epilepsy. *J Physiol* 2009 Sep 1; 587(Pt 17): 4213 – 4233

Zhou M., Xu G., Xie M., Zhang X., Schools GP., Ma L., Kimelberg HK., Chen H. TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 2009 Jul 1; 29(26): 8551 – 8564

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Veröffentlichungen

U Heinemann, A Eilers, S Gabriel, K Jandova, R Jauch, HJ Meencke, M Njunting, D Päsler, K Schulze, TN Lehmann. Gliafunktionsänderungen in epileptischem Hirngewebe: Störung der glialen Kaliumpufferung. *Klin Neurophysiol* 2002; 33: 128 – 136

Jandová K, Päsler D, Antonio LL, Raue C, Ji S, Njunting M, Kann O, Kovács R, Meencke HJ, Cavalheiro EA, Heinemann U, Gabriel S, Lehmann TN. Carbamazepine-resistance in the epileptic dentate gyrus of human hippocampal slices. *Brain* 2006 Dec; 129(Pt 12): 3290 – 306

Päsler D, Gabriel S, Heinemann U. Two-pore-domain potassium channels contribute to neuronal potassium release and glial potassium buffering in the rat hippocampus. *Brain Res* 2007 Oct 10; 1173: 14 – 26

Päsler D, Baldauf J, Runge U, Schroeder HW. Intrameatal thrombosed anterior inferior cerebellar artery aneurysm mimicking a vestibular schwannoma. *J Neurosurg* 2011 Apr; 114(4): 1057 – 60

Sandow, Nora; Kim, Simon; Raue, Claudia; Päsler, Dennis; Kluft, Zin-Juan; Antonio, Leandro; Raza, Muhammad Liaquat; Hollnagel, Jan-Oliver; Kovács, Richard; Kann, Oliver; Horn, Peter; Vajkoczy, Peter; Holtkamp, Martin; Meencke, Heinz-Joachim; Cavalheiro, Esper; Gabriel, Siegrun; Lehmann, Thomas-Nicolas; Heinemann, Uwe. Transporter-hypothesis of drug resistance in epilepsy: no support from resected tissue of epilepsy patients. *Brain* (submitted)

Kongreßteilnahme mit Posterpräsentation

April 2002 und

Berlin Neuroscience Forum in Liebenwalde und

Juni 2003

29. Göttinger Neurobiologentagung mit Posterpräsentation:
„Potassium release likely mediates spread of seizure like events under conditions of blocked chemical synaptic transmission“

Sept. 2003

Euroglia 2003 Berlin mit Posterpräsentation:

„Effects of quini(di)ne on ionophoretically induced potassium signals may indicate implication of background K⁺-channels in glial K⁺-regulation“

Beteiligung an Postern oder Vorträgen von Kollegen

Raue C, Päsler D, Leite Antonio L, Gabriel S, Heinemann U, Lehmann TN. (Mai 2006) Lokalisation ATP-abhängiger Transportproteine und Pharmakoresistenz : Regionale Expression im humanen Hippokampus (Poster und Abstract) Zeitschrift für Epileptologie 19 (2): 163; 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Epilepsie/Straßburg

Raue C, Leite Antonio L, Päsler D, Heinemann U, Gabriel S, Lehmann TN. (Juni 2006) Drug transporters and pharmacoresistance in epilepsy: Regional and cellular distribution of MRP1, MRP2 and PGP in human hippocampus (Poster) Berlin Neuroscience Forum

Kim S, Leite Antonio L, Kovács R, Päsler D, Raue C, Heinemann U, Gabriel S, Lehmann TN. (Juni 2006) Block of drug transporter activity and efficacy of antiepileptic drugs in human epileptic hippocampus (Poster) Berlin Neuroscience Forum

Raue C, Leite Antonio L, Päsler D, Heinemann U, Gabriel S, Lehmann TN. (Oktober 2006) Drug transporters and pharmacoresistance in epilepsy: Regional and cellular distribution of MRP1, MRP2 and PGP in human hippocampus (Vortrag); 17. European Students Conference (ESC)/Berlin

Kim S, Kovács R, Raue C, Päsler D, Leite Antonio L, Huchzermeyer C, Kann O, Heinemann U, Cavalheiro EA, Lehmann TN, Gabriel S. (März 2007) Block of drug transporter activity and efficacy of antiepileptic drugs in human epileptic hippocampus and temporal cortex (Poster); 7. Tagung der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft/Göttingen

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Dennis Päsler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, daß ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluß glialer Background-Kalium-Kanäle auf die Kalium-Homöostase im gesunden und epileptischen Hippocampus“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewußt.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Dennis Päsler hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

U Heinemann, A Eilers, S Gabriel, K Jandova, R Jauch, HJ Meencke, M Njunting, D Päsler, K Schulze, TN Lehmann. Gliafunktionsänderungen in epileptischem Hirngewebe: Störung der glialen Kaliumpufferung. *Klin Neurophysiol* 2002; 33: 128 – 136

Beitrag im Einzelnen: Durchführung und Auswertung eines Teils der Experimente

Anhang

Jandová K, Päsler D, Antonio LL, Raue C, Ji S, Njunting M, Kann O, Kovács R, Meencke HJ, Cavalheiro EA, Heinemann U, Gabriel S, Lehmann TN. Carbamazepine-resistance in the epileptic dentate gyrus of human hippocampal slices. *Brain* 2006 Dec; 129(Pt 12): 3290 – 306

Beitrag im Einzelnen: Durchführung und Auswertung des Großteils der elektrophysiologischen Experimente, Mitarbeit an der Manuskripterstellung

Päsler D, Gabriel S, Heinemann U. Two-pore-domain potassium channels contribute to neuronal potassium release and glial potassium buffering in the rat hippocampus. *Brain Res* 2007 Oct 10; 1173: 14 – 26

Beitrag im Einzelnen: Durchführung und Auswertung aller Experimente, Manuskript-erstellung

Sadow, Nora; Kim, Simon; Raue, Claudia; Päsler, Dennis; Kluft, Zin-Juan; Antonio, Leandro; Raza, Muhammad Liaquat; Hollnagel, Jan-Oliver; Kovács, Richard; Kann, Oliver; Horn, Peter; Vajkoczy, Peter; Holtkamp, Martin; Meencke, Heinz-Joachim; Cavalheiro, Esper; Gabriel, Siegrun; Lehmann, Thomas-Nicolas; Heinemann, Uwe. Transporter-hypothesis of drug resistance in epilepsy: no support from resected tissue of epilepsy patients. *Brain* (submitted)

Beitrag im Einzelnen: Durchführung eines Teils der elektrophysiologischen Experimente

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Uwe Heinemann für die Überlassung des Themas, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die großzügige Unterstützung danken.

Ein großer Dank geht natürlich an Frau Dr. Siegrun Gabriel, die mich in nie nachlassender Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Dissertation begleitete. Ihre Hartnäckigkeit war dabei Fluch und Segen zugleich.

Herrn Dr. Thomas-Nicolas Lehmann danke ich für die Vermittlung in die Neurophysiologie. In der klinischen Arbeit war und ist er ein Vorbild, das mir den Weg in die Neurochirurgie als richtig bestätigte.

Für Hilfe in vielerlei technischen und computerisierten Belangen gilt mein Dank den Herren Dr. Hans-Jürgen Gabriel, Dr. Herbert Siegmund und Bernd Schacht.

Auch ohne die Hilfe und Mitarbeit von Frau Dr. Katrin Schulze und Frau Susanne Rieckmann (Walden) wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen, deshalb geht auch ein großer Dank an sie.

Für den erleichterten Ablauf im Labor danke ich unseren fleißigen Helfern Frau Antje Fortströer (Piechotta), Frau Petra Rohrmoser, Frau Kristin Fröhlich und Frau Vera Werner.

Ein Danke auch an Herrn Dr. Anatol Kivi, er wies mich anfänglich in die experimentellen Abläufe ein.

Ich danke meinen Kollegen Dr. Olaf Windmüller, Dr. Stephan Haack und Dr. Agustin Liotta, ohne deren Unterstützung, Genauigkeit und Hilfsbereitschaft beim Elektrodenbau die Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Freunden Frau Dr. Ulrike Hoffmann, Frau Dr. Marleisje Njunting, Frau Dr. Katerina Jandova, Frau Dr. Anne Boehlen, Frau Dr. Nora Sandow, Herrn Dr. Leandro Leite Antonio und Herrn Simon Kim danke ich für ihre Freundschaft und die gemeinsam durchstandenen Nächte.

Und natürlich danke ich meiner Freundin Melanie und vor allem meinen Eltern für ihre immerwährende und andauernde Unterstützung und Motivation. Ohne sie wäre ich jetzt nicht da, wo ich bin.