

Aus dem
Charité Centrum 2 für Grundlagenmedizin
Institut für Neurophysiologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zum Einfluss von Stickstoffmonoxid auf
epileptiforme Aktivität am akuten Hirnschnitt der Maus**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Leonard Rabanus

aus Berlin

Datum der Promotion: 30.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	5
Abstract	6
Einleitung	7
Epileptische Anfälle, Epilepsien und Status Epilepticus	7
Epileptischer Anfall	7
Epilepsie	8
Status epilepticus	9
Anatomische und physiologische Grundlagen	13
Die Hippocampusformation	13
Ammonshorn und Gyrus Dentatus	14
Der entorhinale Cortex (EC)	15
Pathophysiologie der Hippocampusformation	18
Biochemische Grundlagen	20
Stickstoffmonoxid (NO)	20
NO-Synthasen (NOS)	21
NOS-Expression in der Hippocampusformation	24
NO in der Epilepsie	24
Fragestellungen der Arbeit	26
Ist Stickstoffmonoxid in die Entstehung von epileptiformer Aktivität im Niedrig-Magnesium-Modell involviert und über welchen Mechanismus wird der Einfluss vermittelt?	26
Ist der bei Ratten bekannte Einfluss von NO auf die Epileptogenese auch in Mäusen reproduzierbar?	26
Welches Isoenzym der NO-Synthase ist entscheidend für die Entwicklung epileptiformer Aktivität?	27

Material und Methoden	28
Versuchsprotokoll	28
Versuchstiere	28
Präparation und Anfertigung der akuten entorhinalen - hippocampalen Hirnschnitte	29
Perfusion der Hirnschnitte	32
Perfusionskammern	32
Perfusionslösungen	33
Das Niedrig-Magnesium-Modell der Epilepsie	34
Elektroden	36
Kaliumsensitive Mikroelektroden	36
Bipolare Reizelektroden	37
Versuchsaufbau	38
Pharmakologie	40
Datenerfassung und Analyse	42
Statistik und Datenpräsentation	43
Ergebnisse	44
Kontrollversuche	44
Entstehung epileptiformer Aktivität im Niedrig-Magnesium-Modell	44
Pharmakologische Studien	46
NOS-Inhibition zeigt keinen Effekt auf bereits entwickelte anfallsartige Ereignisse	46
Effekte der NO-Deprivation auf epileptiforme Aktivität in hippocampalen - entorhinalen Hirnschnitten der Maus	48
Effekte spezifischer NOS-Inhibitoren auf die epileptiforme Aktivität	50
Wirkung von exogen zugeführten NO bei supprimierter endogener NO-Produktion	55

Experimente an nNOS defizienten Knock Out Mäusen	57
Epileptiforme Aktivität in hippocampalen - entorhinalen Hirnschnitten von nNOS (-/-) Mäusen	57
Stimulusinduzierte Potentiale in Akutschnitten von nNOS (-/-) Mäusen	60
NO-Deprivation in nNOS (-/-) Mäusehirnschnitten	60
Diskussion	62
Methodenkritik	62
Kombiniertes entorhinales-hippocampales Hirnschnittpräparat	62
In vitro-Modell fokaler Anfälle	63
Beurteilung der Ergebnisse	65
Quellen von endogenem NO in Hirnschnittpräparaten	65
Ziele von endogenem NO	66
Effekte von NO auf die Initiation anfallsartiger Ereignisse	68
Langzeiteffekte von NO in der Epilepsie	70
Perspektiven	71
Anhang	72
Literaturverzeichnis	72
Abkürzungsverzeichnis	90
Lebenslauf	92
Publikation	95
Eidesstattliche Versicherung	96
Danksagung	98

Abstrakt

Einleitung

Stickstoffmonoxid (NO) moduliert synaptische Transmission und seine Konzentration ist in verschiedenen Tiermodellen der Epilepsie erhöht. Nach wie vor bleibt die Rolle von NO in der Entstehung und Aufrechterhaltung von epileptischer Aktivität unklar.

Material und Methoden

Der Einfluss von NO auf epileptiforme Aktivität wurde im Niedrig-Magnesium-Modell für Epilepsie in akuten Hirnschnitten von Wildtyp und nNOS(-/-) Knock Out Mäusen mit elektrophysiologischen Messmethoden untersucht. Durch pharmakologische Hemmung der verschiedenen NO-Synthasen sollte herausgefunden werden, welches Isoenzym für die Entstehung von NO während epileptiformer Aktivität verantwortlich ist.

Ergebnisse

NO-Deprivation durch verschiedene NOS-Inhibitoren und NO-Fängersubstanzen verhinderte die Entwicklung anfallsartiger Ereignisse in akuten Hirnschnitten. Hierbei zeigte sich, dass speziell nNOS Aktivität essentiell für die Entwicklung von anfallsartigen Ereignissen zu sein scheint. Hirnschnitte von nNOS(-/-) Knock Out-Mäusen entwickelten signifikant seltener epileptiforme Aktivität als von Wildtyp Tieren und die anfallsartigen Ereignisse zeigten eine im Vergleich prolongierte Anfallslatenz sowie eine höhere Variabilität der interiktalen Intervalle.

Schlussfolgerung

Die vorliegenden Daten erlauben die Schlussfolgerung, dass die durch NO gesteigerte synaptische Transmission einen positiven Feedbackmechanismus für die Entwicklung anfallsartiger Ereignisse in dem verwendeten Epilepsiemodell darstellt. Hierfür scheint besonders die neuronale Isoform der NO-Synthase verantwortlich zu sein.

Vor dem Hintergrund dieser Beobachtung könnten in Zukunft neue Optionen für die Behandlung von Epilepsiepatienten, besonders bei den therapieresistenten Temporallappenepilepsien, entstehen.

Abstract

Introduction

Nitric oxide (NO) modulates synaptic transmission and its concentration is increased in several animal models of epilepsy. Thus far the role of NO for the initiation and maintenance of epileptic activity is still unclear.

Material and Methods

The influence of NO on epileptiform activity was investigated in the low-magnesium-model of epilepsy in acute brain slices of wildtype and nNOS(-/-) knock out mice by electrophysiological methods. The main source for NO formation during epileptiform activity was determined by pharmacologic inhibition of the different NO-synthase isoenzymes.

Results

NO-deprivation by different NOS-inhibitors and NO-scavengers suppressed the development of epileptiform activity in acute brain slices. It was shown that especially nNOS activity seems to be essential for the development of epileptiform activity. Seizure-like events (SLEs) were present in a significantly smaller portion of the brain slices of nNOS (-/-) than of wildtype animals. Also, seizure like events showed a prolonged latency and higher variability of interictal intervals in slices from nNOS (-/-) mice.

Conclusion

The present data suggest that NO mediated increase in synaptic transmission under epileptic conditions presents a positive feedback mechanism for seizure-induction in the used epilepsy model. The neuronal isoform of NO-synthase seems to be the main source of increased NO levels.

Based on these findings new options in the treatment of epilepsy patients, especially with therapy resistant temporal lobe epilepsy, may be developed.

Einleitung

Epileptische Anfälle, Epilepsien und Status Epilepticus

Epileptischer Anfall

Als epileptischer Anfall wird die klinische Manifestation einer exzessiven und synchronisierten Entladung von Neuronenverbänden im Gehirn bezeichnet. Epileptische Anfälle können sehr unterschiedliche Erscheinungsformen aufweisen, deren gemeinsame Merkmale ein plötzliches Auftreten und eine zeitliche Begrenzung auf Sekunden bis Minuten darstellen (1 Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1981). Erworbene pathologische Veränderungen oder genetische Faktoren, welche unter anderem zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Einflüssen auf einzelne Neurone im Netzwerk führen, können das Entstehen solcher abnormer Entladungsmuster begünstigen.

Typische klinische Erscheinungsformen des epileptischen Anfalls sind, neben Bewusstseinsveränderungen, motorische und sensorische Ereignisse. Auch kann es zu Störungen des autonomen Nervensystems und zu psychischen Symptomen kommen. Die Dauer der Anfälle reicht von wenigen Sekunden bis zu mehreren Minuten.

Als typische Auslöser für epileptische Anfälle wurden unter anderem Gehirntumore, zerebrale Ischämien oder Blutungen, Fieberkrämpfe, Stromschlag, Lichteffekte, Drogenkonsum, Schlafmangel oder Hyperventilation beschrieben.

Die Klassifikation der International League Against Epilepsy (ILAE) teilt epileptische Anfälle wie folgt ein:

Bei fokalen (partiellen) epileptischen Anfällen geht die epileptische Aktivität von einer umschriebenen Region aus. Hierbei wird zwischen einfach fokalen Anfällen, ohne Beeinträchtigung des Bewusstseins, und komplex fokalen Anfällen mit Bewusstseinsstörung unterschieden. Geht ein fokaler Anfall in einen generalisierten Anfall über, so wird er als einfach- oder komplex-fokaler Anfall mit sekundärer Generalisierung bezeichnet.

Primär generalisierte Anfälle sind durch eine initiale Beteiligung beider Hemisphären gekennzeichnet. Diese werden in drei Subtypen eingeteilt:

1. Generalisiert-convulsive Anfälle mit überwiegend atonischer, tonischer, klonischer oder tonisch-klonischer Manifestation
2. Generalisierte, nicht-convulsive Anfälle, welche sich als Absenzen darstellen
3. Myoklonische Anfälle

(1 Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1981).

Epilepsie

Eine Epilepsie liegt bei einem wiederholten Auftreten epileptischer Anfälle, welche nicht in unmittelbarem Zusammenhang zu einer erkennbaren Ätiologie stehen, vor. Die Klassifikation der ILAE teilt Epilepsien und Epilepsiesyndrome in lokalisationsbezogene und generalisierte Formen ein (2 Commission on Classification and Terminology of the ILAE, 1989). In diesen Gruppen wird weiter zwischen symptomatischen, idiopathischen und kryptogenen Epilepsien unterschieden.

Symptomatische Epilepsien sind klar mit einer definierten Erkrankung oder Läsion des Gehirns assoziiert. Epilepsien ohne erkennbare Ursache werden hingegen als idiopathisch bezeichnet. Idiopathische Epilepsien treten meist in Abhängigkeit vom Lebensalter auf und sind in der Regel genetisch bedingt. Einer kryptogenen Epilepsie liegt eine vermutete symptomatische Ursache zugrunde, diese lässt sich jedoch mit den gängigen Methoden nicht nachweisen.

Die Temporallappenepilepsie stellt die mit 60 bis 70% häufigste lokalisationsbezogene Epilepsieform des Erwachsenen dar. Der Großteil der Anfälle (87%) aus diesem Krankheitsbild wird im Hippocampus generiert (3 Spencer, 1994). Hierbei treten vorwiegend komplex-fokale Anfälle auf, welche sich häufig als pharmakoresistent erweisen: 70 bis 80 % der Patienten mit Temporallappenepilepsie zeigen entweder ein unzureichendes oder kein Ansprechen auf eine medikamentöse antikonvulsive Therapie (4 Leppik, 1992). Eine wichtige Behandlungsoption dieser Epilepsieform ist somit die operative Resektion des epileptogenen Gewebes. Jedoch profitiert hiervon lediglich eine kleine, nach strengen Kriterien ausgewählte Gruppe der Patienten mit

pharmakoresistenter Temporallappenepilepsie (5 Engel, 2001).

Die Anfallshäufigkeit und Krankheitsdauer der therapierefraktären Temporallappenepilepsien stellen eine außerordentliche physische, psychische und soziale Belastung für die Patienten und deren Angehörige dar. Ebenso ergeben sich hieraus erhebliche Kosten für das Gesundheitssystem.

Status epilepticus

Die extremste Form eines epileptischen Anfalls wird durch den Status epilepticus repräsentiert. Als Status epilepticus definiert die International League Against Epilepsy (ILAE) seit 1981 einen „Anfall von ausreichender Länge oder mehrere Anfälle, die mit hoher Frequenz ohne interiktale Erholung auftreten“ (1 Commission on Classification and Terminology of the ILAE, 1981). Aus Untersuchungen zur Ätiologie des Krankheitsbildes ergibt sich, dass die Gesamtheit der Fälle zu gleichen Anteilen von akut symptomatischem, verzögert symptomatischem („remote symptomatic“) und idiopathischem Status epilepticus gebildet wird. Die häufigste Ursache des symptomatischen Status epilepticus stellt laut einer prospektiven, bevölkerungsbezogenen Studie ein zu niedriger Serumspiegel antikonvulsiver Substanzen bei vorbestehender Epilepsie dar, gefolgt von länger zurückliegenden ZNS-Schädigungen und dem akuten zerebrovaskulärem Insult (6 DeLorenzo et al., 1996).

In der Literatur wird die Inzidenz des Krankheitsbildes mit Werten zwischen 10 pro 100000 Einwohner in den französischsprachigen Kantonen der Schweiz (7 Coeytaux et al., 2000) und 41 pro 100000 Einwohner in Richmond/USA (6 DeLorenzo et al., 1996) angegeben.

Pathophysiologie der Epilepsie

Vereinfacht kann die Entstehung fokaler epileptischer Aktivität auf ein gestörtes Gleichgewicht zwischen neuronaler Erregung und Hemmung zurückgeführt werden.

Hierbei kann sowohl die zelluläre Membranerregbarkeit als auch das neuronale Netzwerk betroffen sein (8 Heinemann und Eder, 1997). Die Steuerung der zellulären Erregbarkeit der Nervenzelle erfolgt durch membranständige hyperpolarisierende K^+ - und Cl^- -Kanäle und depolarisierende Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle.

Eine Veränderung der Leitfähigkeit dieser Kanäle, aber auch der extrazellulären Ionenkonzentration, können daher die neuronale Erregbarkeit beeinflussen.

Auf synaptischer Ebene wird die neuronale Erregbarkeit über die Aktivierung hemmender und erregender Rezeptorproteine bestimmt.

Wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter im Gehirn ist Gamma-Amino-Buttersäure (GABA). Zwei Typen von GABA-Rezeptoren werden als $GABA_A$ - und $GABA_B$ -Rezeptor unterschieden. Eine Isoform des $GABA_A$ -Rezeptors wird als $GABA_C$ -Rezeptor beschrieben (9 Cutting et al., 1991). Der $GABA_A$ -Rezeptor führt als vorwiegend für Cl^- -Anionen durchlässiger ligandengesteuerter Ionenkanal zu einer Hyperpolarisation der Neuronen. Der $GABA_B$ -Rezeptor ist ein metabotroper Rezeptor und vermittelt neben einer postsynaptischen Erhöhung der Leitfähigkeit für K^+ -Ionen eine präsynaptische Autoinhibition durch Verminderung der Freisetzung GABAerger Vesikel (10 Misgeld et al., 1995).

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des Gehirns. Es werden die ligandengesteuerten, inotropen NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat), AMPA- (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure), und Kainat-Kanäle sowie die metabotropen Glutamat-Rezeptoren unterschieden.

Der NMDA-Rezeptor hebt sich von den anderen Glutamatrezeptoren durch besondere Eigenschaften ab (11 McBain und Mayer, 1994). Der Ionenkanal des Rezeptors ist im Ruhepotential durch Mg^{2+} -Ionen blockiert. Bei einer Depolarisation wird diese Blockierung aufgehoben und der Kanal öffnet sich für positiv geladene Ionen wie beispielsweise Ca^{2+} . Die sekundäre Aktivierung biochemischer Kaskaden führt zu einer lang andauernden Veränderung der zellulären Erregbarkeit. Der Rezeptor ist hierdurch an der Induktion synaptischer Plastizität beteiligt.

Aufgrund der oben genannten Eigenschaften besitzt der NMDA-Rezeptor eine bedeutende Rolle in der Epileptogenese (12 Nateri et al, 2007).

Auf Ebene des neuronalen Netzwerks scheinen Zelluntergänge eine erhöhte Synaptogenese zu induzieren und so zu einer abnormalen Erregbarkeit zu führen. Im humanen Hippocampusgewebe von Patienten mit Temporallappenepilepsie (13 Du et al., 1993; 14 Babb und Brown, 1987; 15 Babb et al., 1984, 16 Lehmann et al., 2000) aber auch in verschiedenen Tiermodellen (17 Ben-Ari et al., 1986; 18 Nadler et al., 1978, 19 Lehmann et al., 2001) entstehen erhebliche neuronale Verluste, einhergehend mit einer Reorganisation des neuronalen Netzwerks. Diese führt zu einer erhöhten Erregbarkeit der hippocampalen Strukturen.

Entstehung und Ausbreitung epileptischer Aktivität sind Folge kombinierter Veränderungen auf zellulärer Ebene und auf Ebenen des neuronalen Netzwerks. Während die Erregbarkeit einer einzelnen Zelle wesentlich von ihren Membraneigenschaften und ihren exzitatorischen und inhibitorischen Rezeptoren abhängt, ist für ein synchronisiertes epileptiformes Entladungsmuster in einem neuronalen Netzwerk eine rekurrente Verschaltung wesentlich.

Zusätzlich spielt die veränderte gliale Pufferung der extrazellulären K^+ -Konzentration im sklerotischen Gewebe eine bedeutende Rolle bei der Synchronisierung neuronaler Aktivität (20 David et al. 2009, 21 Seifert et al., 2010).

Obwohl einige der astrozytären Mechanismen wie die lokale K^+ -Pufferung, NO-, Adenosin- und Glutamatrezeptor-vermittelte Signalkaskaden bei der Epilepsie verändert sind, ist wenig darüber bekannt wie diese Veränderungen die neurovaskuläre Kopplung in chronisch epileptischem Gewebe beeinflussen. Die durch die Aktivierung von Astrozyten veränderte neuronale Funktion könnte einen kritischen Einfluss auf die Epileptogenese ausüben (22 Kovács et al., 2012)

Als weiterer Faktor für die Epileptogenese, aber auch für die Entwicklung der anfallsassoziierten Langzeitschäden, kommen die Mitochondrien in Frage, wofür folgende Befunde sprechen. Mitochondrien sind die primäre Energiequelle der Nervenzellen (23 Erecinska und Silver, 2001), folglich sind neuronale Aktivität und Mitochondrienfunktion eng miteinander gekoppelt (24 Kann et al., 2003). Zusätzlich sind Mitochondrien auch an der zellulären Kalziumhomöostase beteiligt, wodurch sie einen wesentlichen Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit und die synaptische Transmission ausüben. Dieser Einfluss wird als ein weiterer Faktor für die Epileptogenese

angesehen.

Zytotoxische freie Sauerstoffradikale entstehen an mehreren Enzym-Komplexen der mitochondrialen Atmungskette (25 Adam-Vizi und Chinopoulos, 2006), wobei dem Komplex III eine besondere Rolle zugeschrieben werden kann (26 Kunz 2002, 27 Kudin et al. 2009).

Die mitochondriale DNS kodiert wichtige Enzyme des Energiemetabolismus und befindet sich in unmittelbare Nähe zum Entstehungsort freier Radikale.

Mitochondrien wird eine entscheidende Rolle bei der Apoptose zugeschrieben (28 Dawson und Dawson, 2004). Der durch die mitochondriale Dysfunktion vermittelte neuronale Zelltod wird als Hauptbestandteil der Genese der therapieresistenten Temporallappenepilepsie vermutet. Zudem werden verschiedene Mitochondriopathien mit der Manifestation epileptischer Anfälle assoziiert (26 Kunz 2002, 27 Kudin et al. 2009).

Anatomische und physiologische Grundlagen

Die Hippocampusformation

Die Hippocampusformation wird durch die Strukturen entorhinaler Cortex (EC), Subiculum (Sub), Ammonshorn (Cornu ammonis = CA) und Gyrus dentatus (dentate gyrus = DG) gebildet (29 Johnston und Amaral, 1998). Sie befindet sich zum größten Teil im Temporallappen und grenzt von medial an das Unterhorn des Seitenventrikels wo sie am temporalen Pol endet. Im humanen Gehirn erstreckt sich die Hippocampusformation bis zum kaudalen Ende des Balkens. Entlang des Balkens reduziert sich die hippocampale Formation zu einer feinen Schicht grauer Substanz (Indusium griseum) und endet an seinem rostralen Ende im Bereich der Septumregion (septaler Pol). Die Längsachse der Hippocampusformation wird dementsprechend als septotemporale Achse bezeichnet, die Querachse als transversale Achse.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hirnschnittpräparate der Maus kennzeichnen sich als Horizontalschnitte durch das Bild zweier ineinandergreifender, c-förmiger Zellschichten: Die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus und die Pyramidenzellschicht des Ammonshorns. Dabei umschließt der Gyrus dentatus das mediale Ende des Ammonshorns.

Unter physiologischen Bedingungen kann die neuronale Aktivität im Elektroencephalogramm (EEG) des Hippocampus von Säugetieren in zwei Zustände unterteilt werden, welche sich in ihrem Auftreten gegenseitig ausschließen. Bei Ratten dominieren während räumlicher Exploration und im REM-Schlaf Theta-Oszillationen von 5 - 10 Hz und Gamma-Oszillationen mit Frequenzen zwischen 30 und 100 Hz.

Im wachen und entspannten Zustand sowie im Tiefschlaf dominieren im EEG des Hippocampus sogenannte sharp waves mit aufgelagerten 200 Hz ripples (30 Csicsvari et al. 1999).

Nach dem „Zwei-Stufen-Modell der Gedächtnisbildung“ werden in den Theta-Phasen Informationen in den Hippocampus aufgenommen. Die Konsolidierung der neu aufgenommenen Informationen erfolgt dann in der durch die sharp wave ripples charakterisierten Phase (Übersicht: 31 Buzsáki, 1989, 32 Hasselmo, 1999). Die sharp wave ripples gelten als elektrophysiologisches Korrelat für den Transfer von intermediär

gespeicherten Informationen in das kortikal lokalisierte Langzeitgedächtnis (33 Siapas und Wilson, 1998).

Beim Menschen ist die Hippocampusformation von großer Bedeutung für das Gedächtnis. Hierbei besetzt der entorhinale Cortex eine Schlüsselfunktion in der Weiterleitung neokortikaler Informationen zum Hippocampus. Man geht davon aus, dass der entorhinale Cortex eine wichtige Funktion für das Kurzzeitgedächtnis sowie für die Übertragung von Informationen in das Langzeitgedächtnis besitzt (34 Eichenbaum et al., 1994; Übersicht: 35 Eichenbaum et al., 1992). Weitere Studien kommen zu dem Ergebnis, dass die Hippocampusformation insbesondere für das Ortsgedächtnis und das episodische Gedächtnis eine Rolle spielt (Übersicht: 36 Burgess et al., 2002).

Ammonshorn und Gyrus Dentatus

Während der Neocortex durch einen typischen sechsschichtigen Aufbau gekennzeichnet ist, lassen sich in den Strukturen Ammonshorn und Gyrus dentatus nur drei Zellschichten abgrenzen. Die Übergangszone zwischen entorhinalen Cortex und Ammonshorn wird durch das Subiculum gebildet.

Folgende Schichten lassen sich im Ammonshorn abgrenzen: Als tiefste Schicht grenzt der Alveus hippocampi mit seinen efferenten Fasern der Pyramidenzellen des Ammonshorn an die Ventrikeloberfläche. Das Stratum oriens schließt sich mit seiner zellarmen Schicht an. Hier finden sich inhibitorische Interneurone deren Axone an den Pyramidenzellen enden. Als Prinzipalzellen des Ammonshorns bilden die Pyramidenzellen das angrenzende Stratum pyramidale.

Das Ammonshorn wird, nach Größe und Dichte der Pyramidenzellen, in drei Abschnitte unterteilt: Die CA1-Region mit ihren kleinen Pyramidenzellen grenzt an das Subiculum. Ihr folgt die Region CA2, ein schmales, dichtes Band aus großen Pyramidenzellen. Angrenzend an den Gyrus dentatus ist die Region CA3 durch ein breites, lockeres Band großer Pyramidenzellen gekennzeichnet (37 Lorente de Nó, 1934). Das Stratum radiale trennt die Pyramidenzellschicht von der äußersten Schicht, dem Stratum lacunosum moleculare. wo die Dendriten der Pyramidenzellen in Richtung Gyrus dentatus verlaufen. Hier befinden sich außerdem weitere inhibitorische Interneurone. Die Pyramidenzellen der CA3-Region bilden unter anderem zusätzliche rückläufige

Axonkollateralen aus (Schaffer-Kollateralen), welche mit den Dendriten der CA1-Region synaptisch verbunden sind (Übersicht: 29 Johnston und Amaral, 1998).

Im Gegensatz zum Ammonshorn wird im Gyrus dentatus die Prinzipalzellschicht nicht von Pyramidenzellen sondern von Körnerzellen gebildet. Die an der Zellbasis entspringenden Axone der Körnerzellen werden als Moosfasern bezeichnet. Die Zielzellen der Moosfasern sind die Pyramidenzellen der CA3-Region des Ammonshorns.

Der entorhinale Cortex (EC)

Im entorhinalen Cortex (Brodmann Area 28) werden die oberflächlichen (I, II, und III) und die tiefen (IV, V, VI) Schichten von der Lamina dissecans getrennt. Die Lamina dissecans ist nur im medialen Anteil identifizierbar und lässt sich im lateralen entorhinalen Cortex nicht von Schicht III abgrenzen.

Der Tractus perforans ist das wichtigste efferente System des entorhinalen Cortex. Er entspringt aus den Schichten II und III des entorhinalen Cortex und „perforiert“ das Subiculum. Die Faserbündel aus Schicht II enden sowohl in der Molekularschicht (Dendritenschicht der Körnerzellen) des Gyrus dentatus als auch im Ammonshorn in der CA3-Region (Übersicht: 38 Lopes da Silva et al., 1990), die aus Schicht III stammenden Fasern enden in CA1 und im Subiculum.

Die über den Tractus perforans laufenden Fasern werden in zwei Anteile unterteilt. Ein Faserbündel entspringt dem medialen Anteil des entorhinalen Cortex und projiziert in das mittlere Drittel des Stratum lacunosum moleculare, ein weiteres Faserbündel verbindet den lateralen entorhinalen Cortex mit dem äußeren Drittel des Stratum lacunosum moleculare.

Desweiteren entspringt der Schicht III des entorhinalen Cortex ein als temporoammonische Projektion bezeichnetes Faserbündel, welches monosynaptische Kontakte mit Pyramidenzellen der Area CA1 und des Subiculus, sowie mit regionalen Subpopulationen von inhibitorischen Interneuronen unterhält (39 Witter, 1993).

Der wichtigste exzitatorische Schaltkreis der Hippocampusformation wird durch die trisynaptische Verschaltung von Tractus perforans auf die Körnerzellen, von dort über die Moosfasern auf die Pyramidenzellen in CA3 und schließlich über die Schaffer-

Kollateralen auf die Pyramidenzellen der CA1-Region gebildet. Kommend von der Region CA1 und aus dem Subiculum enden die Afferenzen des entorhinalen Cortex in den tiefen Schichten V und VI und schließen so den hippocampalen Schaltkreis (siehe Abbildung 1).

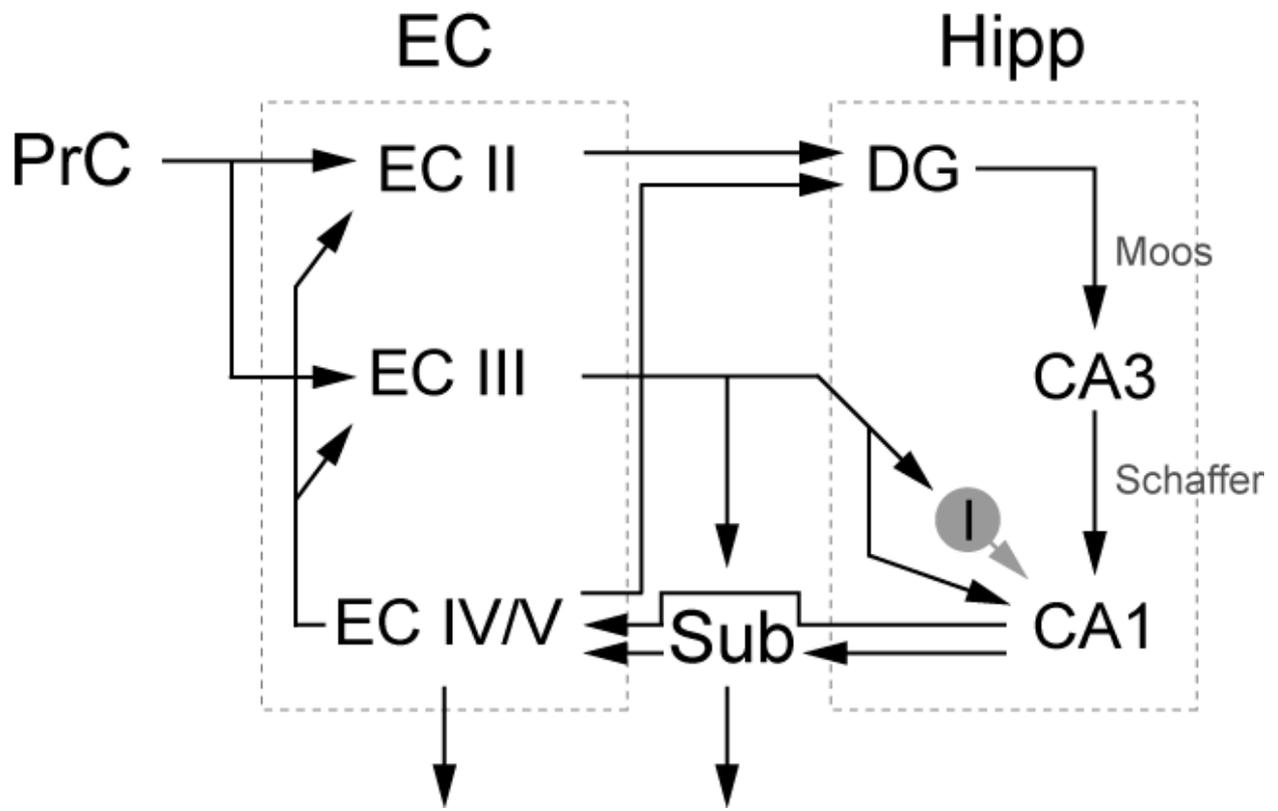


Abbildung 1

Schematische Darstellung der wichtigsten neuronalen Verbindungen der entorhinalen-hippocampalen Formation. Durch Efferenzen der Schicht II des entorhinalen Cortex (EC) zum Hippocampus (Hipp) werden einerseits die Körnerzellen des Gyrus dentatus (DG) erregt, andererseits projizieren Zellen der Schicht III in das Subiculum (Sub) und die Area CA1. Dort werden sie vorwiegend über inhibitorische Interneurone (I) verschaltet. Die Zellen der tiefen Schichten des entorhinalen Cortex (IV/V) bilden eine zusätzliche Projektion zum Gyrus dentatus.

Von dort aus wird die Erregung über die Moosfasern zu den Pyramidenzellen der Area CA3 und von dort entlang der Schaffer Kollateralen zur Area CA1 weitergeleitet. Die Pyramidenzellen in CA1 projizieren ihrerseits über das Subikulum in die tiefen Schichten des entorhinalen Cortex, womit sich der Schaltkreis schließt.

Der entorhinale Cortex steht über den perirhinalen Cortex (PrC) mit kortikalen Neuronen in Verbindung (40 Modifiziert nach Heinemann et al., 2000).

Pathophysiologie der Hippocampusformation

Entsprechend ihrer physiologischen Funktionsweise führen pathologische Veränderungen der Hippocampusformation unter anderem zu Störungen der Gedächtnisleistung. Bereits die Schädigung der CA1-Region durch einen ischämischen Insult ruft eine ausgeprägte anterograde Amnesie hervor, während kognitive Funktion und Langzeitgedächtnis erhalten bleiben (41 Zola-Morgan et al., 1986). Aber auch eine retrograde Amnesie kann Folge einer Schädigung des Hippocampus sein (42 Rempel-Clower et al., 1996). Der Hippocampus spielt zudem eine Rolle bei der Depression (Übersicht: 43 Campbell und MacQueen, 2003), aber auch bei den neuropsychologischen Symptomen der Schizophrenie (Übersicht: 44 Harrison, 2004) und bei neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer (Übersicht: 45 Panegyres, 2004). Neben den genannten Störungen ist die Generierung epileptischer Anfälle die wichtigste pathophysiologische Veränderung der Hippocampusformation. Der Hippocampus besitzt, im Vergleich zu anderen Hirnregionen, die niedrigste Schwelle für das Auftreten epileptischer Entladungen (46 Green, 1964).

Bei der Temporallappenepilepsie (TLE), der häufigsten Form der chronischen Epilepsien, werden 87 % der Anfälle in der Hippocampusformation generiert. Hierbei besitzt der entorhinalen Cortex eine besondere Bedeutung. Er zeigt sowohl bei Patienten mit TLE als auch in verschiedenen Tiermodellen eine erhöhte Anfallsbereitschaft (47 Spencer und Spencer, 1994; 48 Collins et al., 1983; 49 Dasheiff und McNamara, 1982). Eine hochfrequente synaptische Stimulation führt über die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren in den tiefen Schichten des entorhinalen Cortex zu einer gesteigerten Erregbarkeit (50 Heinemann et al., 1993). In elektrophysiologischen *in vitro* Untersuchungen konnte eine Beteiligung des entorhinalen Cortex an epileptiformen Anfallsereignissen nachgewiesen werden (51 Jones und Heinemann, 1988; 52 Jones und Lambert, 1990; 53 Behr et al., 1996; 54 Bertram et al., 1998; 55 Scharfman, 1996). Die epileptiforme Aktivität wird hierbei vorwiegend in den tiefen Schichten des entorhinalen Cortex generiert (56 Walther et al., 1986; 51 Jones und Heinemann, 1988) und induziert synchronisierte Entladungen in den oberflächigen Schichten (52 Jones und Lambert, 1990).

In neuroradiologischen und neuropathologischen Untersuchungen an Patienten mit

Temporallappenepilepsie wurden Atrophien und Zelluntergänge im Bereich des entorhinalen Cortex nachgewiesen (57 Bernasconi et al., 1999; 58 Bernasconi et al., 2001; 13 Du et al., 1993). Die chirurgische Entfernung der hippocampalen Formation ist eine effektive Strategie zur Behandlung von therapierefraktären Temporallappenepilepsien (5 Engel, 1993). In über 80 % der Resektate finden sich pathologische Veränderungen im Sinne von Neuronenverlusten und reaktive Gliose mit Verhärtung und Schrumpfung des Gewebes (59 Williamson et al., 1993), weshalb sich die Bezeichnung Ammonshornsklerose etabliert hat. Diese wurde erstmalig bereits im Jahre 1825 von Bouchet und Cazauvieilh beschrieben. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass raumfordernde Prozesse in der Region des entorhinalen Cortex auch bei Patienten ohne Ammonshornsklerose ebenfalls Temporallappenanfälle auslösen können (47 Spencer, 1994; 60 Lévesque et al., 1991; 61 Kim et al., 1990). Darüber hinaus konnte eine Beteiligung des entorhinalen Cortex an Epilepsieerkrankungen auch in weiteren Studien nachgewiesen werden (62 Rutecki et al., 1989; 63 Wilson et al., 1990).

Biochemische Grundlagen

Stickstoffmonoxid (NO)

Das gasförmige freie Radikal, Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiges Signalmolekül im zentralen Nervensystem (64 Garthwaite et al, 1988; 65 Bredt und Snyder, 1989) und an vielen physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen im Organismus beteiligt.

Neben seinem modulatorischen Einfluss auf synaptische Transmission und Plastizität (66 Prast und Philippu, 2001; 67 Bon und Garthwaite, 2003) reguliert NO den Gefäßwiderstand und eventuell auch den mitochondrialen oxidativen Metabolismus (68 Iadecola et al., 1995; 69 Brown, 2001). NO spielt aber auch eine wichtige Rolle in inflammatorischen Prozessen (70 Good et al., 1996; 71 Calabrese et al., 2000).

Aufgrund seiner hohen Diffusionsrate sowohl in wässrigen Lösungen als auch in Lipiden, ist NO in der Lage sich schnell über Zellgrenzen hinaus zu bewegen und ist daher trotz seiner kurzen Halbwertszeit sowohl intra- als auch interzellulärer Messenger. Eine funktionelle Koppelung zwischen der Stimulation von NMDA Rezeptoren und der Aktivierung der neuronalen NO-Synthase wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (64 Garthwaite, 1988; 68 Iadecola, 1995).

Die Bindung der exzitatorisch wirkenden Aminosäure Glutamat an NMDA Rezeptoren fördert über einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg die Produktion von NO. Durch die Stimulation der Guanylatcyclase und einem daraus resultierenden Anstieg der cGMP-Konzentration beeinflusst NO verschiedene zelluläre Mechanismen (65 Bredt und Snyder, 1989; 72 Garthwaite et al., 1989).

Über cGMP werden Proteinkinasen stimuliert, welche wiederum die synaptische Neurotransmission und Plastizität modifizieren. Darüber trägt NO zum exzitotoxischen Einfluss exzessiver NMDA-Rezeptor-Stimulation bei (73 Dawson et al., 1994).

Als endothelial derived relaxing factor (EDRF) führt in den Endothelzellen der Blutgefäße gebildetes NO über eine cGMP-abhängige Signalkaskade zu einer Entspannung der glatten Gefäßmuskulatur und somit zu einer gesteigerten Perfusion des nachfolgenden Gewebes. Daher haben sich NO-haltige Präparate schon seit langem zur Therapie der akuten Angina pectoris und der koronaren Herzkrankheit

etabliert (Übersicht: 74 Thadani, 1997)

R. Furchgott, L. Ignarro und F. Murad erhielten 1998 den Nobelpreis für die Identifizierung von NO als den biologischen Mediator EDRF (75 Smith, 1998).

NO-Synthasen

Die Bildung von NO aus L-Arginin und O₂ im menschlichen Organismus wird durch das Enzym NO-Synthase katalysiert (76 Zang und Snyder, 1995), wobei NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) als Elektronendonator dient:



NO-Synthasen wurden zuerst im Jahre 1989 beschrieben. Verschiedene Isoformen dieses Enzyms wurden identifiziert, welche sich in ihrer Lokalisation, Regulation, katalytischen Funktion und ihrer Sensitivität gegenüber einzelner Inhibitoren unterscheiden. Die drei wichtigsten bekannten Isoenzyme werden nach der gängigsten Nomenklatur als nNOS (auch bekannt als Typ I, NOS-I oder NOS-1), iNOS (Typ II, NOS-II, NOS-2) und eNOS (Typ 3, NOS-III, NOS-3) bezeichnet. Ihnen gemeinsam ist der Aufbau der Aktiven Form aus zwei NOS Monomeren und zwei Calmodulinen (CaM). Zudem enthalten sie verschiedene Kofaktoren wie Tetrahydrobiopterin (BH₄), FAD (Flavinadenindinukleotid), FMN (Flavinadeninmononukleotid) und Häm (siehe auch Abbildung 2).

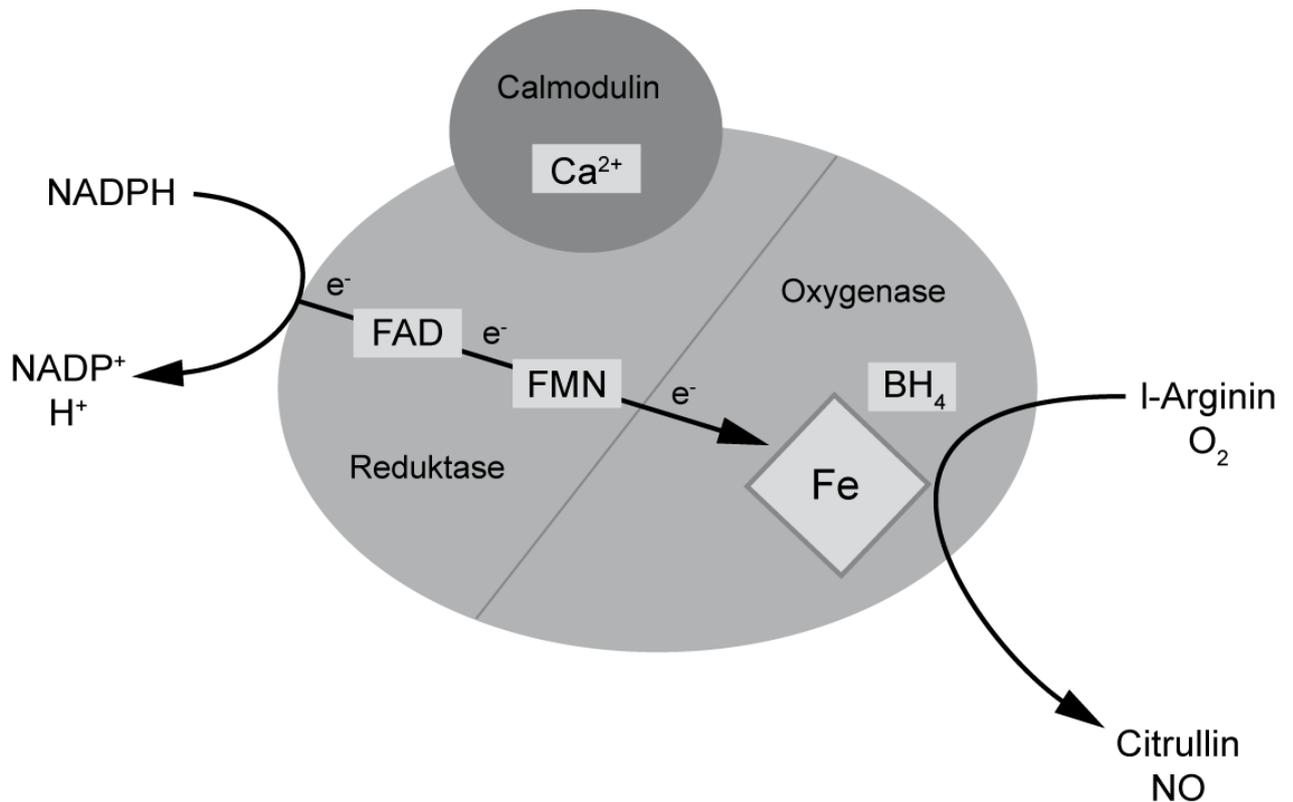


Abbildung 2

Katalysierte Reaktionen und Cofaktoren von NO-Synthase. Die Reduktase-Untereinheit nutzt NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) als Elektronendonator und leitet die Elektronen über FAD und FMN über auf die Oxygenase-Untereinheit. Dort reagieren die Elektronen mit dem Häm-Eisen und BH₄ um die Reaktion von Sauerstoff mit I-Arginin zu katalysieren. Hierbei entstehen die Produkte Citrullin und freies NO. Der Elektronenfluss erfordert die Anwesenheit von Calmodulin und Ca²⁺ (Modifiziert nach Alderton et al., 2001).

Die neuronale NO-Synthase (nNOS) wurde zuerst und vorwiegend im Nervengewebe nachgewiesen, die endotheliale NO-Synthase (eNOS) konnte primär aus den Endothelzellen des Gefäßsystems isoliert werden. Ihnen gemeinsam ist die kalziumabhängige Regulation der Syntheseleistung und eine konstitutive Expression.

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird in vielen verschiedenen Zellen, vorwiegend in Makrophagen wie zum Beispiel den Mikrogliazellen exprimiert. Im Gegensatz zu nNOS und eNOS wird sie zytokingesteuert über ihre Transkription reguliert. Nach induzierter Expression synthetisiert iNOS Stickstoffmonoxid unabhängig von Ca^{2+} und kontinuierlich in hohen Konzentrationen (Übersicht: 77 Alderton et al., 2001).

Bezeichnung	Molekulargewicht	Regulation	Genlokus
nNOS	161	Ca^{2+} ; CaM	12q24.2 - 12q24.3
iNOS	131	Zytokine	17cen - 17q11.2
eNOS	133	Ca^{2+} ; CaM	7q35 - 7q36

Tabelle 1

Übersicht über die wichtigsten bekannten Isoformen der NO-Synthase (77 Alderton et al., 2001)

NOS-Expression in der Hippocampusformation

NO-Synthasen werden von unterschiedlichen Zelltypen der Hippocampusformation exprimiert. Untersuchungen an Mäusen und im humanen Hippocampus zeigten eine deutliche Expression von nNOS und eNOS in diesem Hirnareal. Durch *in situ* Hybridisation konnte in Pyramidenzellen von CA1 und CA3 nNOS nachgewiesen werden. Auch Körnerzellen im Gyrus dentatus und hippocampale Interneurone exprimieren nNOS (78 Blackshaw et al., 2003; 79 Fuentealba et al., 2008).

Aktivierte Mikrogliazellen konnten im Gewebe von Patienten mit chronischer Temporallappenepilepsie und epileptischen Tieren nachgewiesen werden (80 Beach et al. 1995, 81 Vezzani und Granata, 2005).

Die Expression von eNOS ist offenbar sowohl bei der Maus als auch beim Menschen ausschließlich auf die Endothelzellen der Blutgefäße beschränkt (78 Blackshaw et al., 2003). In der Ratte konnten mittels immunhistochemischer Nachweismethoden nNOS positive Zellen im Hippocampus und im entorhinalen Cortex nachgewiesen werden (82 Kovács et al., 2009). Diese Beobachtung deckt sich mit älteren Ergebnissen, wo nNOS in Zellen des Neocortex und des entorhinalen Cortex entdeckt wurde (83 Valtschanoff et al., 1993). Keynes et al. fanden nNOS in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen, wobei ein bevorzugtes Vorkommen im Gyrus dentatus und im Bereich des Subiculums nachgewiesen werden konnte (84 Keynes et al. 2004).

NO in der Epilepsie

Während epileptischer Anfälle kommt es zu einer gesteigerten Bildung von Stickstoffmonoxid (NO). In früheren Arbeiten wurde eine Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von endothelialen und neuronalen NO-Synthasen während Kainat- und Pentylentetrazol-induzierter epileptischer Anfälle *in vivo*, sowie im Niedrig-Magnesium-Modell *in vitro* nachgewiesen.

Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass die Anfallsaktivität in Kainat-behandelten Ratten über NO vermittelt wird (85 Mülsch et al., 1994) und diese Aktivität durch den nNOS Inhibitor 7-Nitroindazol unterdrückbar ist (86 Gupta und Dettbarn, 2003).

Im Kainat-Epilepsiemodell an Mäusen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass

Konvulsionen eine gesteigerte NO-Produktion nach sich ziehen. Anfälle und NO-Synthese ließen sich in dieser Studie durch Phenobarbital supprimieren (87 Kato et al. 2005). Die Applikation von Pentylentetrazol führte bei Ratten zu einer gesteigerten NO-Produktion, wobei während tonischer Anfälle mehr NO entstand als bei klonischer Aktivität (88 Kaneko et al., 2002). In der gleichen Studie wurde bei dem Vergleich der anfallsassoziierten NO-Produktion in verschiedenen Hirnarealen die höchste NO-Konzentration in der Hippocampusformation gefunden.

Schuchmann et al. haben im Niedrig-Magnesium-Epilepsiemodell nachgewiesen, dass anfallsartige Ereignisse mit einem signifikanten Anstieg der NO-Konzentration in akuten entorhinalen - hippocampalen Hirnschnitten assoziiert sind und ein direkter Zusammenhang zwischen NO-Produktion und epileptiformer Aktivität besteht (89 Schuchmann et al., 2002).

Fokale Anfälle bewirken eine lokale Steigerung der Gewebepfusion. Die Isoenzyme eNOS und wahrscheinlich nNOS sind an anfallsassoziierten Änderungen des zerebralen Blutflusses beteiligt (90 De Vasconcelos et al., 2005), wodurch eine erhöhte Bereitstellung von Sauerstoff und Glukose in Gebieten mit gesteigerter neuronaler Aktivität vermittelt wird. Der Zusammenhang zwischen epileptischen Krankheitsbildern und NO wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht, teilweise mit sehr kontroversen Ergebnissen (91 Kirkby et al., 1996; 92 Wojtal et al., 2003). Da jede Manipulation der NO-Konzentration *in vivo* eine Veränderung der Perfusion und dadurch unmittelbare metabolische Konsequenzen mit sich zieht, konnte bisher nicht hinreichend geklärt werden, welche Mechanismen die Interaktion zwischen NO und der Epileptogenese vermitteln.

Fragestellungen der Arbeit

Ist Stickstoffmonoxid in die Entstehung von epileptiformer Aktivität im Niedrig-Magnesium-Modell involviert und über welchen Mechanismus wird der Einfluss vermittelt?

Bisher ist wenig darüber bekannt, ob ein erhöhter NO Spiegel im Gewebe die Entstehung epileptischer Anfälle fördert oder hemmt. Hierzu wurden gegensätzliche Ergebnisse *in vivo* publiziert. Manipulation der Gewebekonzentration von NO hatte entweder pro- oder anticonvulsiven Einfluss, je nach verwendetem Epilepsiemodell (91 Kirkby et al., 1996; 92 Wojtal et al., 2003).

NO steigert *in vivo* die arterielle Blutversorgung, wodurch Oxygenierung und Glukosekonzentration im Gewebe beeinflusst werden. Jede Manipulation des nitrogenen Systems führt also über die Verfügbarkeit von Sauerstoff, Glukose und weiterer Stoffe zu einer Änderung des Energiemetabolismus und somit auch der epileptischen Aktivität. Mit den akuten entorhinalen-hippocampalen Hirnschnitten der Maus wurde ein *in vitro* Modell ohne NO-abhängige Änderung der Gewebepfusion genutzt, in dem sich der unmittelbare Einfluss von NO auf die Entstehung epileptiformer Aktivität untersuchen lässt.

Durch pharmakologische Manipulation der NO Gewebekonzentration im Niedrig-Magnesium-Epilepsiemodell sollte näher untersucht werden, welchen Effekt NO auf die Entwicklung epileptiformer Aktivität ausübt.

Ist der bei Ratten bekannte Einfluss von NO auf die Epileptogenese auch in Mäusen reproduzierbar?

In einer vorangegangenen Studie konnte eine gesteigerte NO-Produktion während epileptiformer Aktivität in akuten Hirnschnitten der Ratte nachgewiesen und gezeigt werden, dass NO für die Aufrechterhaltung der anfallsartigen Ereignisse von Bedeutung ist (89 Schuchmann et al., 2002). Die Expression von nNOS ist im entorhinalen Cortex

der Ratte allerdings höher als in der Maus (78 Blackshaw et al., 2003).

Daher sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob die Freisetzung von NO zur Bildung und Aufrechterhaltung epileptiformer Aktivität einen generellen Mechanismus darstellt oder Unterschiede zwischen den Spezies (Ratte und Maus) vorhanden sind.

Welches Isoenzym der NO-Synthase (NOS) ist entscheidend für die Entwicklung epileptiformer Aktivität?

Zwar wurde eine Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der endothelialen (eNOS) und neuronalen (nNOS) NO-Synthase während epileptischer Anfälle *in vivo* (85 Mülsch et al., 1994; 88 Kaneko et al., 2002; 86 Gupta und Dettbarn, 2003) und *in vitro* (89 Schuchmann et al., 2002) nachgewiesen, bisher ist aber unklar, von welchem NOS Isoenzym genau die gesteigerte NO-Bildung während epileptischer Aktivität ausgeht. Die unmittelbare Nähe zwischen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren und nNOS (93 Burette et al., 2002) erlaubt eine Kopplung von neuronaler Aktivität und NO-Produktion (94 Namicki et al., 2005; 95 Sato et al., 2006), was die Vermutung nahelegt, dass besonders durch nNOS gebildetes NO den Einfluss auf epileptiforme Aktivität ausübt. Jedoch konnte *in vivo* ein Beitrag von eNOS nicht ausgeschlossen werden (de Vasconcelenos). Daher soll in der vorliegenden Studie, zum einen durch die Verwendung verschiedener selektiver NOS-Inhibitoren und zum anderen durch Experimente an nNOS defizienten Knock-Out Mäusen (96 Huang et al., 1993), die Rolle von nNOS in der Bildung und Aufrechterhaltung epileptiformer Aktivität untersucht werden.

Material und Methoden

Versuchsprotokoll

Mit Hilfe von elektrophysiologischen Messmethoden wurde epileptiforme Aktivität in akuten entorhinalen-hippocampalen Hirnschnittpräparaten von Wildtyp Mäusen im Niedrig-Magnesium-Modell untersucht. Hierbei kamen verschiedene Pharmaka zur Beeinflussung des nitrogenen Systems zum Einsatz. Außerdem wurden einige Experimente an akuten Hirnschnitten von nNOS defizienten Knock Out Mäusen durchgeführt.

Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten C57BL/6 Mäuse beiderlei Geschlechts sowie nNOS (-/-) Knock Out Mäuse (Aktenzeichen: T0291/04, T0003/06).

129S Nos1^{tm1Plh} nNOS (-/-) Knock Out und B6129F2/J Wildtyp Mäuse wurden über The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Die Pflege und Präparation der Mäuse erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS). Die homozygoten nNOS (-/-) Knock Out Mäuse stammten aus der Zucht von heterozygoten (+/-) Tieren. Hierfür wurden 129S Nos1^{tm1Plh} und B6129F2/J gekreuzt. Die Zucht wurde kontinuierlich durch Untersuchungen des genetischen Status der Tiere kontrolliert. Die Genotypisierung erfolgte im Alter von 14 bis 20 Tagen mittels PCR aus den Schwanzspitzen der Mäuse (97 Patzak et al., 2008).

Präparation und Anfertigung der akuten entorhinalen - hippocampalen Hirnschnitte

20 bis 28 Tage alte Versuchstiere wurden unter tiefer Äthernarkose dekapitiert und die Kopfhaut entlang der Mittellinie von rostral nach occipital durchtrennt, um freien Zugang zum Schädelknochen zu erhalten. Die Occipitalschuppe wurde ebenfalls mit einem Skalpell mobilisiert und nach kaudal weggeklappt.

Von diesem Zeitpunkt an wurde das Gehirn kontinuierlich mit eisgekühlter und oxygenierter (Carbogen; 95 % O₂, 5 % CO₂) artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) beträufelt. Nach Eröffnung der Sagittalnaht mit einer Präzisionsschere wurden die Parietalschuppen vorsichtig mit einer feinen anatomischen Pinzette getrennt und zur Seite weggeklappt. Schließlich wurde das Gehirn mittels eines Spatels entfernt und bis zur weiteren Präparation in gekühltes ACSF (4°C) gegeben.

Die folgenden Schritte erfolgten auf einem in ACSF getränktem Filterpapier und einer gefrorenen umgekehrten Petrischale. Mit einer Rasierklinge wurden das Kleinhirn und der Frontalpol abgesetzt und die beiden Hemisphären voneinander getrennt, die anschließend vorsichtig auf die mediale Schnittfläche gedreht wurden. Parallel zur Hippocampusformation wurde nun durch einen Transversalschnitt jeweils der hochparietale Anteil der Hemisphäre abgetrennt.

Die hierdurch entstandene Fläche wurde genutzt, um die Gehirnhälften auf der zuvor mit Klebstoff (Cyanacrylat) präparierten Plattform in der Schneidekammer (Eigenbau des Instituts) nebeneinander zu fixieren.

Die Kammer wurde unverzüglich mit eisgekühlter ACSF aufgefüllt, bis beide Hemisphären einschließlich der nun nach oben ausgerichteten Hirnbasis bedeckt waren. Über einen Plastikschlauch erfolgte während des gesamten Schneidevorgangs die Oxygenierung der ACSF mit Carbogen.

Zunächst wurde mit einem Vibratom (Vibroslice 752 M, Campden Instruments; Sileby, UK) bei horizontaler Schnitfführung eine dickere Gewebeschicht ausgehend von der Hirnbasis abgetragen. Es folgte die Anfertigung von Hirnschnitten mit einer Schichtdicke von jeweils 400 µm, die einzeln mit Hilfe eines feinen Pinsels und eines kleinen Spatels vorsichtig aus der Schneidekammer gehoben und in eine Aufbewahrungskammer transferiert wurden. Die Schnitte enthielten den Gyrus dentatus, Cornu ammonis (CA1,

CA2 und CA3), das Subiculum, den entorhinalen und perirhinalen Cortex sowie Anteile des temporalen Cortex (siehe Abbildung 3).

Mit dieser Methode wurden pro Hemisphäre zwei bis vier Hirnschnitte gewonnen, welche bis zu den Messungen in der mit ACSF gefüllten Aufbewahrungskammer (Eigenbau des Instituts) unter ständiger Oxygenierung ruhen konnten.

Zur Optimierung der Gewebshomöostase begannen die Experimente frühestens zwei Stunden nach der Präparation.

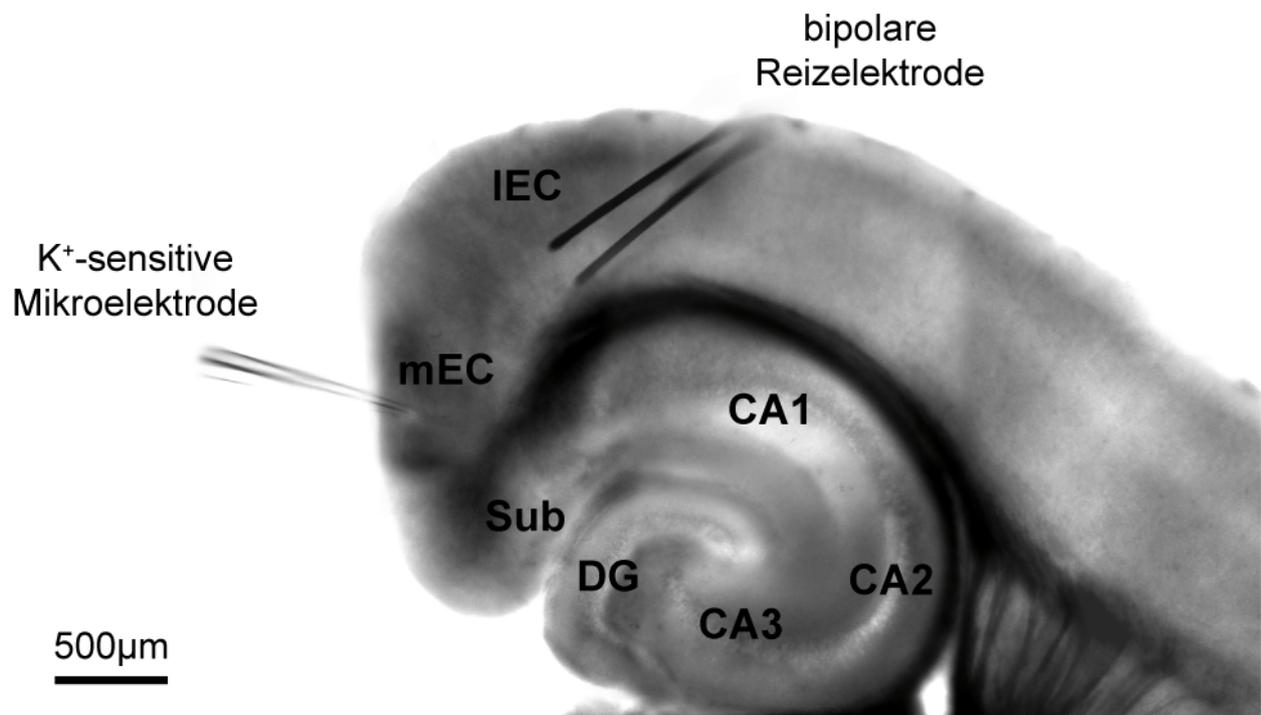


Abbildung 3

Beispiel eines akuten entorhinalen - hippocampalen Hirnschnitts der Maus: Der 400µM dicke Hirnschnitt zeigt die hippocampale Formation mit Gyrus dentatus (dentate gyrus; DG), Cornu ammonis (CA1, CA3), Subiculum (Sub), medialer entorhinaler Cortex (mEC) und lateraler entorhinaler Cortex (IEC). Die K^+ -sensitive Mikroelektrode wurde in den Schichten IV bis V des medialen entorhinalen Cortex positioniert, die bipolare Reizelektrode zur Überprüfung der Vitalität weiter lateral (zusammengefügte Abbildung aus mehreren Einzelfotos).

Perfusion der Hirnschnitte

Perfusionskammern

Die Aufbewahrung der Hirnschnitte bis zur Messung und die Durchführung der Experimente erfolgte unter Submerged-Bedingungen in ACSF. Aufbewahrungs- und Messkammer (beide Eigenbau des Instituts) waren so konzipiert, dass eine kontinuierliche Oxygenierung mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) gewährleistet war.

In der Aufbewahrungskammer ruhten die Schnitte auf Linsenpapier (TIFFEN lens cleaning paper, The Tiffen Company, Hauppauge, USA) bei Raumtemperatur. Für die Experimente wurden einzelne Schnitte individuell in die Messkammer transferiert. Diese wurde kontinuierlich mit frischem, auf 33±1°C beheiztem, ACSF über eine Schlauchpumpe versorgt. Nach Durchlaufen der Perfusionskammer wurde die Perfusionslösung abgeleitet und entsorgt. Bei einer Durchflussrate von 4–5 ml/min konnte über das Schlauchsystem ein schneller Austausch der Perfusionslösungen, und somit der gelösten Pharmaka, erzielt werden.

Perfusionslösungen

Sowohl in der Aufbewahrungskammer als auch in der Messkammer wurden die akuten Hirnschnitte kontinuierlich mit oxygenierter ACSF versorgt, welche in ihrer Ionenzusammensetzung weitgehend mit dem natürlichen Liquor der Maus übereinstimmt. Die für die Herstellung der Perfusionslösungen notwendigen Inhaltstoffe wurden in folgenden Konzentrationen zusammengefügt:

NaCl	129 mM
NaH ₂ PO ₄	1,25 mM
Glucose	10 mM
MgSO ₄	1,8 mM
KCl	3,0 mM
CaCl ₂	1,6 mM
NaHCO ₃	21 mM

(Chemikalien von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland).

Während der Magnesium-Auswaschphasen kam magnesiumfreies ACSF zur Anwendung (Niedrig-Magnesium-ACSF).

Die Osmolalität und der pH-Wert des oxygenierten ACSF lagen mit 300 ± 10 mosmol/kg bzw. $\text{pH } 7,4 \pm 0,5$ im physiologischen Bereich. Die Osmolarität wurde hierzu durch ein Osmometer (Osmomat 030, Gonotec; Berlin, Deutschland), der pH-Wert mit Hilfe eines pH-Meters (pH-Meter 761 Calimatic, Knick; Berlin, Deutschland) bestimmt.

Das Niedrig-Magnesium-Modell der Epilepsie

Ein etabliertes Modell der Temporallappenepilepsie *in vitro* stellt das Niedrig-Magnesium-Modell dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion von Magnesium in der ACSF zu einem Auftreten von epileptiformer Aktivität im Hirnschnittpräparat führt. Als epileptiforme Aktivität werden anfallsähnliche Ereignisse und interiktale Aktivität zusammengefasst. Durch die Abnahme der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration kommt es zu einer Negativierung des zellulären Oberflächenpotentials, wodurch das transmembranöse Potential in depolarisierende Richtung verschoben wird. Zusätzlich wird die Mg^{2+} -Blockierung der NMDA-Rezeptoren aufgehoben, was zu einer erleichterten Einstrom von mono- und bivalenten Kationen und dadurch zu einer gesteigerten Transmitterfreisetzung führt. Der transmembranäre Ionenkanal dieses Glutamaterezeptors ist bei hyperpolarisiertem Membranpotential durch Mg^{2+} -Ionen geblockt. Der Entzug von Mg^{2+} hebt demzufolge diese Blockade auf und führt damit zur Öffnung des Ionenkanals. Mit zunehmender Dauer der Auswaschphase von Mg^{2+} steigt somit die Wahrscheinlichkeit für eine spontane Depolarisation der Neurone (98 Heinemann und Jones, 1990).

Die niedrig-Magnesium-induzierte epileptiforme Aktivität zeigt in den einzelnen Regionen unterschiedliche zeitliche Verlaufsformen. In der Area CA3 und CA1 des Hippocampus treten kurze rekurrente Entladungen von 3 - 120 ms Länge auf. Im Gegensatz dazu entwickeln sich im Subiculum und entorhinalen Cortex bis zu Minuten andauernde tonisch-klonische Entladungen (56 Walther et al., 1986; 51 Jones und Heinemann, 1988; 99 Dreier und Heinemann, 1991). Diese anfallsartigen Ereignisse sind durch einen negativen Abfall des Feldpotentials gekennzeichnet, welcher von schnellen Aktionspotentialen überlagert wird. Gleichzeitig kommt es zu einem deutlichen Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration.

Nach ca. 60 min geht diese epileptiforme Aktivität in schnelle rekurrente Entladungen über, welche durch die derzeit gebräuchlichen Antikonvulsiva nicht beeinflussbar sind (100 Dreier und Heinemann, 1990; 101 Zhang et al., 1995). Die auftretenden anfallsartigen Ereignisse im Niedrig-Magnesium-Modell sind mit elektrophysiologischen Veränderungen während epileptischer Aktivität *in vivo* vergleichbar. Dies gilt sowohl für die Ionenverschiebung im Hirnschnittpräparat (102 Heinemann et al., 1977) als auch die

Synchronizität epileptiformer Entladungen (51 Jones und Heinemann, 1988).

Die epileptiforme Aktivität wurde über Änderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration $[K^+]_o$ (o = outside) in den tiefen Schichten (IV und V) des medialen entorhinalen Cortex der akuten Hirnschnitte registriert. Dreier und Heinemann beschrieben hier einen Fokus für die Entstehung von niedrig-Magnesium-induzierten anfallsartigen Ereignissen (99 Dreier und Heinemann, 1991).

Elektroden

Kaliumsensitive Mikroelektroden

Zur Aufzeichnung der extrazellulären Kaliumkonzentrationsänderungen $[K^+]_o$ kamen doppellumige kaliumsensitive und Referenz Mikroelektroden zum Einsatz.

Die Elektroden wurden nach beschriebener Methode (103 Heinemann und Arens, 1992) hergestellt. Mit einem Elektrodenziehgerät (vertikaler Chicago-Puller, Eigenbau der technischen Abteilung des Instituts) wurden die Mikroelektroden aus doppellumigem Thetaglass (Sience Products, Hofheim; Deutschland) gezogen und die Spitze auf $3\mu\text{m}$ Durchmesser gebrochen. Die Referenzseite wurde mit 154 mM NaCl Lösung befüllt, die kaliumsensitive Seite mit 100 mM KCl. Die Spitze der kaliumsensitiven Seite wurde zunächst mit einer Lösung von 5 % Trimethyl-1-Chlorsilan (FLUKA Chemie, Buchs, Schweiz) in 95 % Cl_4 lipophilisiert und anschließend mit dem K^+ -selektiven Ionenaustauscher (Potassium Ionophore I Cocktail A60031; FLUKA Chemie, Buchs, Schweiz) befüllt. In beide Schenkel wurden chlorierte Silberdrähte eingebracht und mit heißem Dentalwachs fixiert. Die auf diese Weise hergestellten Mikroelektroden ermöglichen eine Umsetzung von Ionenkonzentrationsänderungen in elektrische Potentialänderungen. Durch, in dem Ionenaustauscher gelöste, K^+ -spezifische Carriermoleküle erfolgt ein selektiver Ionentransport zwischen Extrazellulärraum und Kaliumchlorid-Lösung. Diese, entlang eines Konzentrationsgefälles verlaufende, Ionenverschiebung und damit einhergehende Ladungsverschiebung resultiert in einem Nettostrom. Der Strom fließt so lange, bis ein Gleichgewicht zwischen den Diffusionskräften und einem sich entgegengesetzt aufbauenden Potential erreicht ist. Im Gleichgewichtszustand lässt sich $[K^+]_o$ nach der modifizierten Nernst-Gleichung ermitteln:

$$\log[lon]_1 = E_M / S + \log[lon]_0$$

E_M entspricht der gemessenen extrazellulären Potentialänderung und S der Anstiegssteilheit der Mikroelektrode in Bezug auf definierte Kalibrierlösungen (beide Angaben in mV). V gibt die Valenz des spezifischen Ions an, $[lon]_1$ steht für die

Ionenkonzentration bei Aktivität und $[Ion]_0$ in Ruhe.

Die Elektroden wurden individuell in Kalibrierlösungen mit 3 und 30 mM K^+ getestet.

Mikroelektroden mit einer Anstiegssteilheit von 58 ± 2 mV auf einen zehnfachen Anstieg der Kaliumkonzentration wurden für die Experimente zugelassen.

Bipolare Reizelektroden

Zur Überprüfung der Vitalität der Hirnschnitte wurden bipolare Platindrahtelektroden lateral der Messelektrode positioniert und die Hirnschnitte vor und nach Applikation von Niedrig-Magnesium-ACSF stimuliert.

Die Reizelektroden wurden ebenfalls aus doppellumigen Thetaglas-Kapillaren gezogen und auf einen Spitzendurchmesser über 100 μm gebrochen. Zwei Silberdrähte wurden mit je einem 30 μm dicken Platin-Iridium-Draht (Goodfellow; Cambridge, UK) verlötet und in die Lumina eingeführt. Die Platindrähte wurden an der Elektrodenspitze in einem Abstand von maximal 100 μm mit Schellack fixiert und mit einer feinen Schere auf 2 mm Länge gekürzt. Am hinteren Ende der Kapillaren wurden die herausragenden Silberdrähte mit Dentalwachs fixiert.

Mittels der bipolaren Reizelektrode im lateralen entorhinalen Cortex erfolgte ein Teststimulus mit 20 Hz, 10s, 2,5 - 5 V. Es wurden nur Schnitte mit einem stimulusinduzierten $[K^+]_0$ Anstieg von mindestens $1,5 \pm 0,2$ mM auf oben genannte Reizintensität für die Messungen zugelassen.

Versuchsaufbau

Der Messplatz basierte auf einem Lichtmikroskop (Axioskop; Zeiss, Jena, Deutschland) mit einem 10x Wasserimmersionsobjektiv (Numerische Apertur 0,3). Das System befand sich in einem Faraday'schen Käfig und wurde von einem IBM-kompatiblen Computer über eine kommerzielle Software (Felix; PTI, Wedel, Deutschland) gesteuert. Diese Software diente ebenfalls zur Aufzeichnung der Daten. Auf dem Objektisch des Mikroskops befand sich die Messkammer mit den zu- und abführenden Perfusionsschläuchen. Die Perfusionslösung wurde über eine Heizung (Eigenbau des Instituts) am zuführenden Schlauch auf eine Temperatur von 33 ± 1 °C erwärmt. Über zwei magnetisch am Objektisch fixierte Mikromanipulatoren (mechanisch und hydraulisch) konnten die Reiz- und Messelektroden im Hirnschnitt platziert werden. Die Steuerung der bipolaren Reizelektrode erfolgte über ein Reizstromgerät, welches durch einen programmierbaren Impulsgenerator aktiviert wurde (MASTER 8; A.M.P.I., Jerusalem, Israel). Die durch die Messelektrode registrierten Feldpotentiale wurden über einen Verstärker 1000 x amplifiziert auf einem Oszilloskop dargestellt. Die Kaliumpotentiale wurden 200 x oder 500 x verstärkt. Zur Speicherung der Daten wurden diese mittels eines Analog-Digital-Konverter auf den PC übertragen und dort mit einer Aufzeichnungsrate von 10Hz gespeichert. Der Versuchsaufbau wird in Abbildung 4 schematisch Dargestellt.

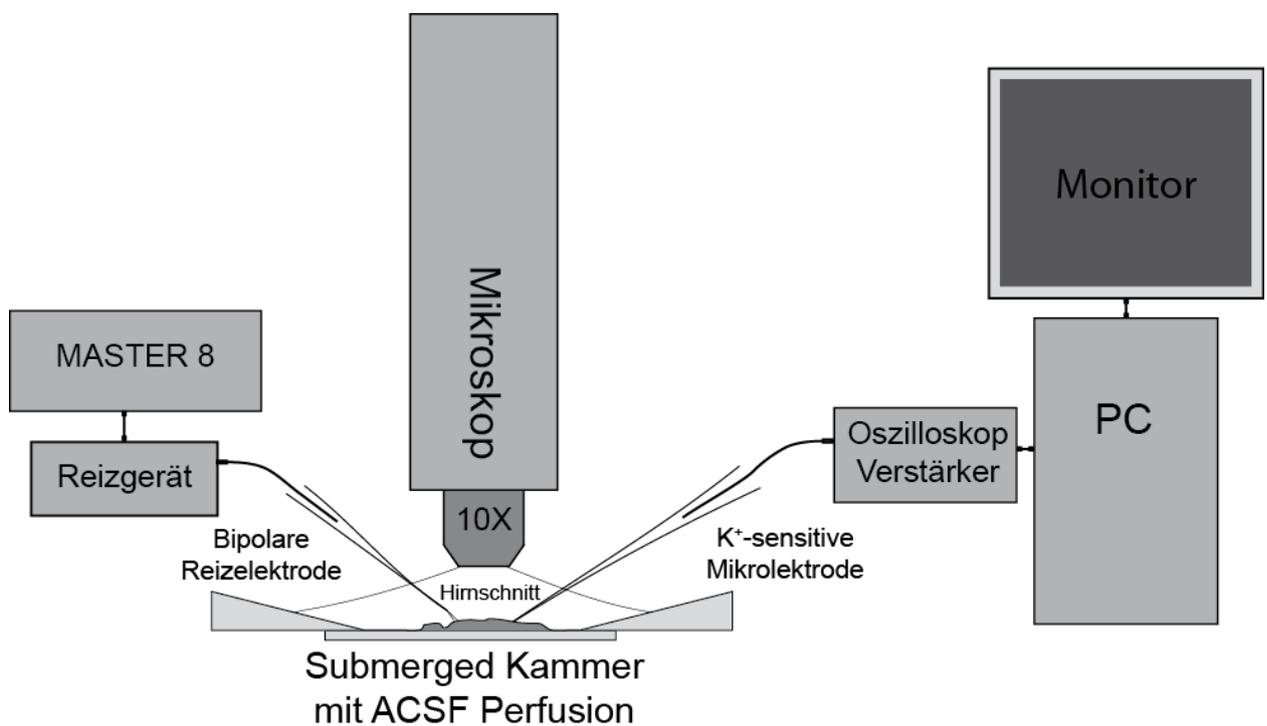


Abbildung 4

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Der Hirnschnitt befand sich in einer Submerged Kammer und wurde kontinuierlich mit oxygeniertem ACSF bei $33 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ perfundiert (aus Gründen der Übersichtlichkeit ist das Perfusionssystem nicht abgebildet). Die elektrophysiologischen Messungen erfolgten mit Hilfe einer K⁺-sensitiven Mikroelektrode (die Referenzseite ist nicht dargestellt), deren Signal über einen Verstärker auf einem Oszilloskop abgebildet wurde. Die registrierten Daten wurden von einem PC aufgezeichnet und zur späteren Analyse gespeichert

Pharmakologie

Um die Wirkung von Stickstoffmonoxid auf die epileptiforme Aktivität der akuten Hirnschnitte zu untersuchen, wurde eine Reihe verschiedener Pharmaka mit Einfluss auf das nitrege System über die Perfusionslösung appliziert:

Aminoguanidin	200 μ M
N-Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME)	200 - 600 μ M
N-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA)	200 μ M
7-Nitroindazol (7-NI)	100 - 200 μ M
4,4,5,5-Tetramethylimidazol-1-Oxyl-3-Oxid (PTIO)	300 μ M
S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penizillamin (SNAP)	200 - 600 μ M

(PTIO von ALEXIS Corporation; Lausen, Schweiz. Alle anderen Chemikalien von Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland).

Während es sich bei L-NAME und L-NMMA um Breitspektrum NOS-Inhibitoren handelt, weisen 7-NI und Aminoguanidin eine gewisse Selektivität für einzelne Isoenzyme auf. Aminoguanidin inhibiert vorwiegend iNOS und 7-NI besitzt eine relative Spezifität für nNOS (Übersicht: 77 Alderton et al., 2001). PTIO fungiert als NO-Fängermolekül und wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt um freies NO aus dem Hirnschnittpräparat zu eliminieren (104 Goldstein et al., 2003). Freies NO kann enzymunabhängig zum Beispiel während der Reaktion von Peroxynitrit mit Glucose (105 Moro et al., 1995) oder durch S-Nitrosogluthathion freigesetzt werden. S-Nitrosogluthathion bildet ca. 4 % des mitochondrialen Glutathion-Pools (106 Steffen et al., 2001). Der NO-Donor SNAP diente als exogene Quelle für Stickstoffmonoxid, wobei die Applikation von 1mM SNAP zu einem NO-Konzentrationsanstieg in der Perfusionslösung von $\sim 0,5 \mu$ M für mindestens 15 min führt (107 Brorson et al., 1999). Die Inkubation mit 600 μ M SNAP resultiert also in einer Freisetzung von ca. 300 nM NO. Da die Applikation über die Perfusion erfolgte und davon auszugehen ist, dass in akuten Hirnschnitten

Mechanismen existieren, die NO eliminieren können, kann die tatsächliche Konzentration in einem 400 µm dicken Akutschnitt um ein vielfaches geringer ausfallen (108 Hall und Garthwaite, 2006).

Datenerfassung und Analyse

Die während den Messungen erhobenen Daten wurden mittels einer speziellen Software (Felix; PTI; Wedel, BRD) erfasst und gespeichert.

Folgende experimentelle Gruppen wurden in die Analyse einbezogen: Niedrig Magnesium (+ L-NAME), Niedrig Magnesium + L-NMMA + PTIO (+ SNAP), Niedrig Magnesium + Aminoguanidin + PTIO, Niedrig Magnesium + 7NI + PTIO (+ SNAP). Insgesamt wurden 72 Schnitte von 31 Wildtyp Mäusen und 33 Schnitte von 9 nNOS (-/-) Knock Out Mäusen (Niedrig Magnesium, Niedrig Magnesium + 7NI + PTIO) untersucht, wobei mit den Schnitten aus einem Tier teilweise jeweils unterschiedliche Experimente durchgeführt wurden. In die Auswertung wurden insgesamt 60 Schnitte aus 29 Wildtyp Mäusen und alle Schnitte aus den Knock Out Mäusen übernommen (Übersicht siehe Tabelle 2).

	Wildtyp		nNOS (-/-) KO	
	Versuchstiere	Schnitte	Versuchstiere	Schnitte
Niedrig-Magnesium (+ L-NAME)	n = 16 (4)	n = 30 (6)	n = 9	n = 25
Niedrig-Magnesium + L-NMMA + PTIO (+SNAP)	n = 5 (3)	n = 11 (7)		
Niedrig-Magnesium + Aminoguanidin + PTIO	n = 4	n = 9		
Niedrig-Magnesium + 7-NI + PTIO (+ SNAP)	n = 4 (2)	n = 10 (2)	n = 5	n = 8

Tabelle 2

Übersicht über die Anzahl der statistisch ausgewerteten Experimente. Die Zahlen in Klammern repräsentieren Untergruppen, in denen die Hirnschnitte nach einem vollständig durchgeführten Versuchsprotokoll noch zusätzlich mit weiteren Pharmaka (L-NAME, SNAP) behandelt wurden.

Statistik und Datenpräsentation

Statistisch ausgewertet wurde die Latenz vom Beginn der Auswaschphase von Mg^{2+} bis zum ersten Auftreten epileptiformer Aktivität, sowie die Amplitude der Kaliumanstiege während der anfallsartigen Ereignisse, die Anfallsdauer und das Intervall zwischen den einzelnen Ereignissen. Im Falle einer vollständigen Blockade der Anfallsaktivität, wurden die NO-Synthase-Hemmer nach einer Stunde ausgewaschen und für die jeweilige experimentelle Gruppe die vollständige Latenzzeit (Blockade + Auswaschzeit) angerechnet. Jedem Schnitt wurde ein einzelner Latenzwert zugeordnet, während die anfallsassoziierten Parameter aus mehreren Ereignissen abgeleitet wurden. Die statistischen Differenzen unter den einzelnen experimentellen Gruppen (Übersicht der experimentellen Gruppen siehe Tabelle 2) im Mittelwertvergleich wurden mittels univariater ANOVA nach Untersuchung der Varianzgleichheit (Levene Test) getestet. Im Falle eines signifikanten Unterschiedes in der ANOVA ($F > 1$ und $p < 0,05$) und fehlender Varianzgleichheit wurden die paarweise Vergleiche der Gruppen mit dem Dunnett T3 Post Hoc Test ermittelt, da dieser sich für kleine Stichproben mit ungleicher Stichprobengröße bei fehlender Varianzhomogenität eignet. Zeigte der Levene Test eine homogene Varianz wurde der Bonferroni Test angeschlossen.

Bei der Gegenüberstellung von zwei Stichproben kam der Mann-Whitney U-Test zur Anwendung.

Die Verteilung der Anfallshäufigkeiten in unterschiedlichen Tiergruppen (Wildtyp und Knock Out) wurde mit dem exakten Chi-Quadrat Test (exakter Test nach Fischer) berechnet da dieser auch bei einer geringen Anzahl von Experimenten noch zuverlässige Ergebnisse liefert.

Als signifikant galten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mit $p < 0,05$. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung präsentiert. Signifikanzen auf dem Niveau von $p < 0,05$ werden in den graphischen Abbildungen mit einem Stern gekennzeichnet.

Ergebnisse

Kontrollversuche

Entstehung epileptiformer Aktivität im Niedrig-Magnesium-Modell

Unter Niedrig-Magnesium-Bedingungen entwickelten 100 % der akuten hippocampalen-entorhinalen Hirnschnitte von C57BL/6 Mäusen epileptiforme Aktivität. Hierbei kam es in 27 der 30 untersuchten Schnitte aus 16 Tieren zu vollständig ausgeprägten anfallsartigen Ereignissen, während in den restlichen Hirnschnitten interiktale Aktivität zu beobachten war. Als anfallsartige Ereignisse wurden Entladungsserien mit einer Dauer über 10 s und einem Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration über 1 mM bei gleichzeitigem Abfall des Feldpotentials über 0,5 mV definiert. Die Latenz bis zum Einsetzen der epileptiformen Aktivität betrug 35 ± 4 min ($n = 27$). Im Durchschnitt dauerten die anfallsartigen Ereignisse 45 ± 9 s ($n = 177$ Ereignisse in 27 Schnitten) und führten zu einem Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration um $4,1 \pm 1,1$ mM ($n = 177$). Die Intervalle zwischen den einzelnen Ereignissen dauerten durchschnittlich 198 ± 92 s ($n = 152$). Siehe hierzu auch Abbildung 5.

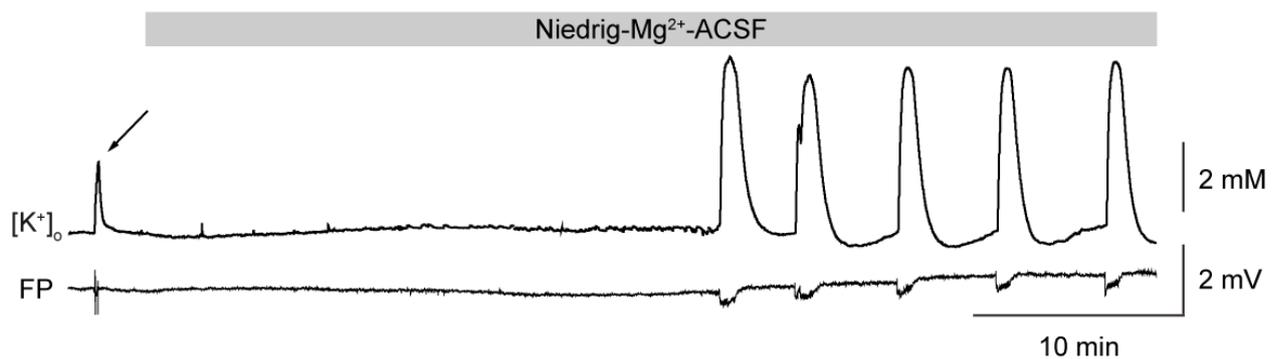


Abbildung 5

Niedrig-Magnesium-induzierte epileptiforme Aktivität. Charakteristische Darstellung der Änderung von extrazellulärer K^+ -Konzentration ($[K^+]_o$) und Feldpotential (FP) während niedrig-Magnesium-assoziierten anfallsartiger Ereignisse. Zu Beginn der Experimente wurde die Vitalität des Hirnschnittes durch einen Teststimulus (2,5 – 5 V; 20 Hz; 10 s) überprüft (Pfeil).

Pharmakologische Studien

Verschieden Pharmaka mit Einfluss auf die NO-Synthase und ihre unterschiedlichen Isoenzyme wurden getestet und mit der Niedrig-Magnesium-Kontrollgruppe verglichen. Ausgewertet wurden jeweils die Anfallslatenz, die Anstiege der extrazellulären Kaliumkonzentration (ANOVA $F = 3,695$; Levene Test $p = 0,000$), die Anfallsdauer (ANOVA $F = 14,646$; Levene Test $p = 0,106$) und die Intervalle zwischen den einzelnen Anfallsartigen Ereignissen (ANOVA $F = 9,548$; Levene Test $p = 0,002$).

NOS-Inhibition zeigt keinen Effekt auf bereits entwickelte anfallsartige Ereignisse

In einer vorangegangenen Studie wurde gezeigt, dass durch den Einsatz des Breitspektrum-NOS-Inhibitors L-NAME (200 μM) bestehende niedrig-Magnesium-induzierte epileptiforme Aktivität in hippocampalen - entorhinalen Hirnschnitten der Ratte gestoppt werden konnte (89 Schuchmann et al., 2002). Dieses Ergebnis ließ sich im hier angewandten Mausmodell nicht reproduzieren. So hatte die Applikation von L-NAME (200 bis 600 μM) in 100 % der getesteten Mäusehirnschnitten ($n = 6$) keinen Effekt auf bereits etablierte epileptiforme Aktivität. Die anfallsartigen Ereignisse traten auch unter L-NAME unverändert auf (siehe Abbildung 6). Die Anstiege der extrazellulären K^+ -Konzentration betragen $4,13 \pm 1,1 \text{ mM}$ ($n = 34$; $p = 1,000$; Dunnett T3 Post Hoc Test), die Dauer der Ereignisse glich mit $45 \pm 9 \text{ s}$ ($n = 34$; $p = 1,000$; Bonferroni Post Hoc Test) der Kontrollgruppe. Das dazwischenliegenden Intervall war mit $195 \pm 68 \text{ s}$ ($n = 28$; $p = 1,000$; Dunnett T3 Post Hoc Test) gleich.

Die Tatsache das sich die Ergebnisse in akuten Hirnschnitten von den in früheren Studien an Rattenhirnschnitten gefundenen Ergebnissen unterscheidet könnte einen Hinweis auf mögliche Unterschiede in der Wirkung von NO auf voll etablierte epileptiforme Aktivität zwischen den Spezies Maus und Ratte geben.

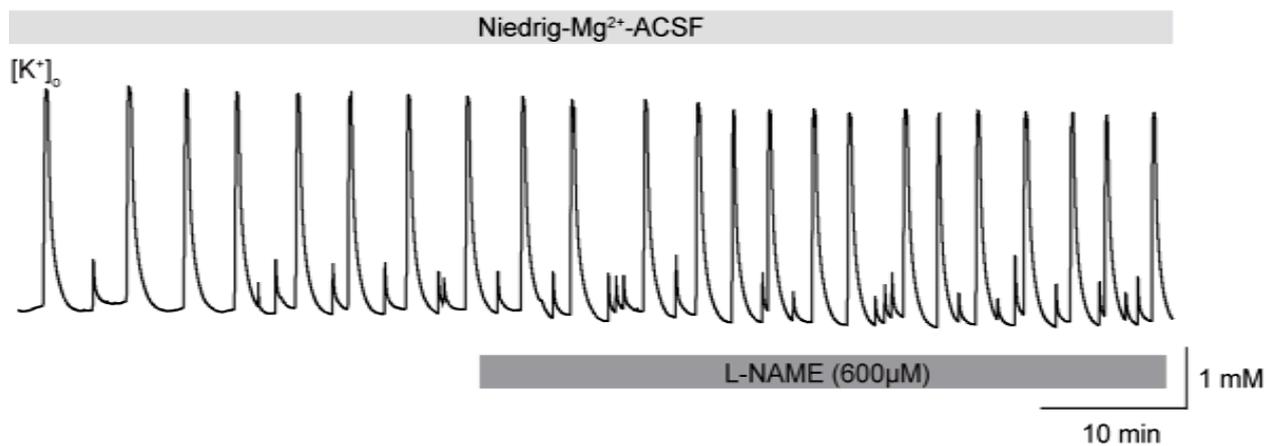


Abbildung 6

Voll etablierte epileptiforme Aktivität lässt sich im Niedrig-Magnesium-Modell am akuten Mäusehirnschnitt nicht durch NOS-Inhibition unterbrechen:

Der Breitspektrum NOS Inhibitor L-NAME (600 µM) konnte anfallsartige Ereignisse während bereits induzierter epileptiformer Aktivität nicht mehr verhindern. Auch nach seiner Applikation zeigten sich anfallsassoziierte Anstiege der extrazellulären K⁺-Konzentration ($[K^+]_o$).

Effekte der NO-Deprivation auf epileptiforme Aktivität in hippocampalen - entorhinalen Hirnschnitten der Maus

NO-Deprivation durch den Breitspektrum NOS-Inhibitor L-NMMA (200 μ M) und PTIO (300 μ M) supprimierte die Initiation epileptiformer Aktivität in 100% der Akutschnitte (n = 11) für mindestens eine Stunde ($p = 0,000$; Dunnett T3 Post Hoc Test) in Niedrig-Magnesium-ACSF. Durch den Einsatz von PTIO sollte möglicherweise gebildetes NO anderer Quellen, zum Beispiel aus der Reaktion von Peroxynitrit und Glukose (105 Moro et al. 1995), aufgefangen werden. In einigen Experimenten wurden L-NMMA und PTIO später ausgewaschen (n = 4). Dies führte zu einem rapiden Einsetzen der Aktivität mit einer Latenz von 6 ± 1 min nach dem Auswaschen in 100 % der Schnitte (siehe Abbildung 7). Hier zeigte sich eine durchschnittliche Dauer der anfallsartigen Ereignisse von 54 ± 7 s, der Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration betrug $4,33 \pm 2,72$ mM (n = 20 Anfälle aus 4 Schnitten). Die einzelnen anfallsartigen Ereignisse traten durchschnittlich alle 299 ± 66 s auf (n = 16 Intervalle in 4 Schnitten). Die Kaliumanstiege unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe ($p = 1,000$; Dunnett T3 Post Hoc Test). Anfallsdauer ($p = 0,000$; Bonferroni Post Hoc Test) und interiktale Intervall ($p = 0,000$; Dunnett T3 Post Hoc Test) waren allerdings signifikant verlängert. In zwei weiteren Experimenten, in denen L-NMMA und PTIO nicht ausgewaschen wurden (nicht in der Übersichtstabelle 2 abgebildet), konnte die epileptiforme Aktivität für über 120 Minuten erfolgreich supprimiert werden (n = 2 Schnitte).

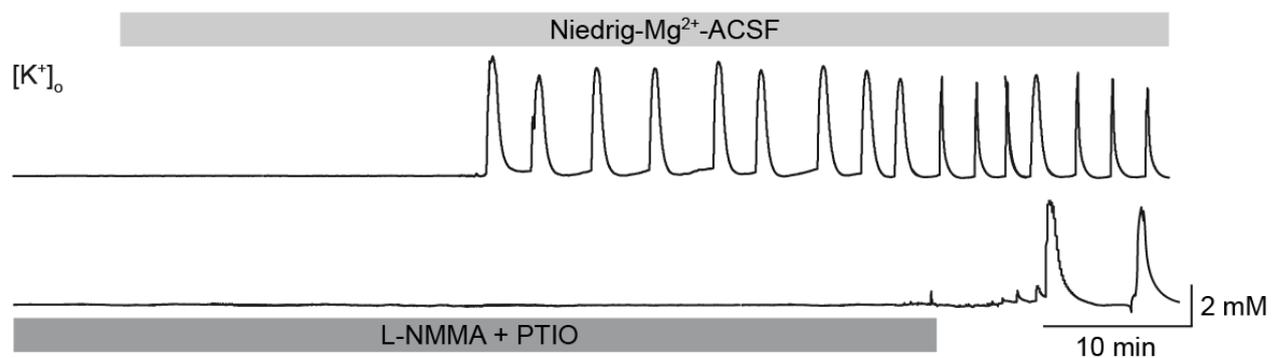


Abbildung 7

Einfluss von L-NMMA (200 μ M) und PTIO (300 μ M) auf die Induktion epileptiformer Aktivität im Niedrig-Magnesium-Modell. Vergleichende Darstellung der extrazellulären K^+ -Ionenkonzentration unter Niedrig-Magnesium-Bedingungen im Akutschritt mit und ohne blockierter NO-Synthese. Die obere Kurve zeigt den charakteristischen Verlauf der niedrig-Magnesium-induzierten Aktivität. L-NMMA und PTIO supprimierten die Initiation anfallsartiger Ereignisse effektiv für mindestens 60 min. Nach Auswaschen der Pharmaka kam es zu einem rapiden Einsetzen der epileptiformen Aktivität.

Effekte spezifischer NOS-Inhibitoren auf die epileptiforme Aktivität

Mit Hinblick auf die Frage, welches NOS Isoenzym Quelle der erhöhten NO-Produktion unter Niedrig-Magnesium-Bedingungen ist, wurden die Effekte des iNOS-spezifischen Inhibitors Aminoguanidin (200 μ M) und des nNOS-spezifischen Inhibitors 7-NI (100 bis 200 μ M) in Kombination mit PTIO (300 μ M) untersucht (siehe Abbildungen 8 und 9).

Der überwiegend iNOS spezifische NOS-Inhibitor Aminoguanidin zeigte keinen Einfluss auf die epileptiforme Aktivität, da 100 % der untersuchten Hirnschnitte ($n = 9$), trotz der Anwesenheit von PTIO, anfallsartige Ereignisse entwickelten. Zudem ließ sich bei einer Latenz bis zum Einsetzen der Aktivität von 29 ± 16 min kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen ($p = 0,859$). Auch die Änderungen der extrazellulären K^+ -Konzentration von $4,4 \pm 1,3$ mM ($n = 42$; $p = 1,000$; Dunnett T3 Post Hoc Test) waren im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert. Die Dauer der einzelnen anfallsartigen Ereignisse war mit 52 ± 7 s ($n = 42$; $p = 0,000$; Bonferroni Post Hoc Test) verlängert. Die interiktalen Intervalle unterschieden sich mit 205 ± 59 s ($n = 33$; $p = 1,000$; Dunnett T3 Post Hoc Test) nicht signifikant von der Kontrollgruppe (Dunnett T3 Post Hoc Test).

In dem verwendeten Modell kann also davon ausgegangen werden, dass iNOS nicht wesentlich in die Initiation epileptiformer Aktivität involviert ist.

Diese Ergebnisse weisen zusätzlich darauf hin, dass durch die Elimination von freiem NO ausschließlich mittels PTIO keine suffiziente Blockade von epileptiformer Aktivität erreicht werden kann.

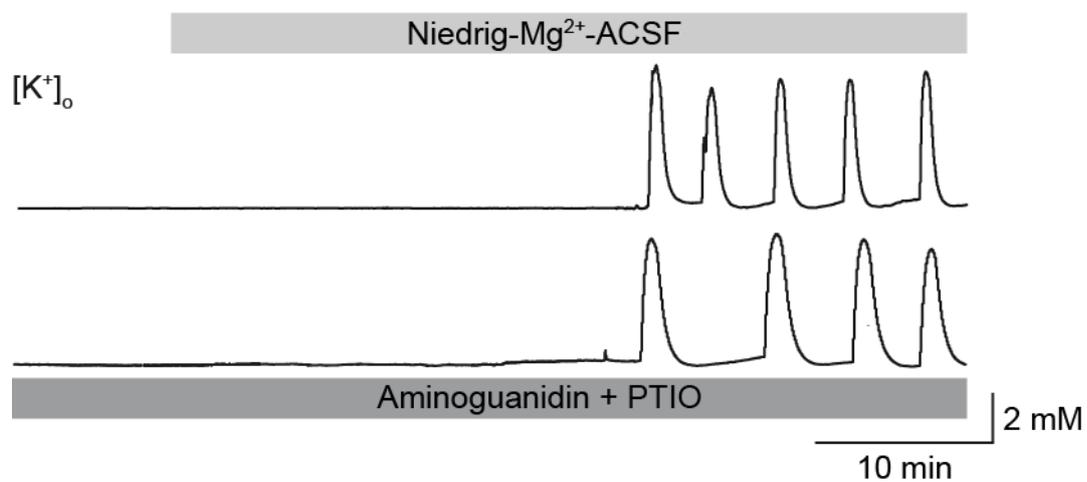


Abbildung 8

Wirkung von Aminoguanidin (200 μM) und PTIO (300 μM) auf niedrig-Magnesium-induzierte epileptiforme Aktivität im Akutschnitt. Dargestellt ist die extrazelluläre K^+ -Ionenkonzentration in Niedrig-Magnesium-ACSF. Die obere Kurve zeigt die Kontrollgruppe, in der unteren Kurve sind die anfallsartigen Ereignisse unter Einfluss des iNOS-spezifischen Inhibitors Aminoguanidin dargestellt. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Latenz bis zu Einsetzen der Aktivität.

Im Gegensatz zu Aminoguanidin supprimierte der spezifische nNOS-Inhibitor 7-Nitroindazol (7-NI) in Kombination mit PTIO das Einsetzen anfallsartiger Ereignisse in 100 % der Schnitte (n = 10) für mindestens 60 min (p = 0,000; Dunnett T3 Post Hoc Test). Nach den 60 min wurde 7-NI und PTIO in 8 der Schnitte ausgewaschen. Hierbei kam es, anders als bei dem unspezifischen NOS-Inhibitor L-NMMA, zu einer nachhaltigen Blockade der epileptiformen Aktivität. So entwickelte sich in nur zwei der untersuchten Schnitte mit einer Latenz von 7 und 9 min spontane epileptiforme Aktivität, welche durch eine deutlich verminderte Amplitude von $1,8 \pm 1,4$ mM der extrazellulären K^+ -Konzentration (n = 16; p = 0,042; Dunnett T3 Post Hoc Test), eine vergleichbare Dauer der anfallsartigen Ereignisse von 41 ± 13 s (n = 16; p = 0,931; Bonferroni Post Hoc Test) und ein verkürztes interiktales Intervall von 114 ± 42 s (n = 14; p = 0,000; Dunnett T3 Post Hoc Test) gekennzeichnet waren. In zwei Experimenten erfolgte eine Suppression der epileptiformen Aktivität durch 7-NI + PTIO über 120 min. Die Aktivität trat in diesen beiden Schnitten mit einer Latenz von 6 und 7 min nach Auswaschen der Pharmaka auf (nicht in der Übersichtstabelle abgebildet).

7-NI scheint also einen nachhaltigen Effekt auf die niedrig-Magnesium-induzierte epileptiforme Aktivität auszuüben. Die Vitalität der Hirnschnitte wurde am Ende der Messung nochmals durch einen Teststimulus nachgewiesen.

Die vorliegenden Daten liefern damit einen überzeugenden Hinweis dafür, dass besonders die neuronale Isoform der NO-Synthase als Quelle für die endogene NO-Produktion unter Niedrig-Magnesium-Bedingungen anzusehen ist. Die Abbildung 10 zeigt einen Vergleich der Latenzen bis zum Einsetzen anfallsartiger Ereignisse unter den verschiedenen NOS Inhibitoren.

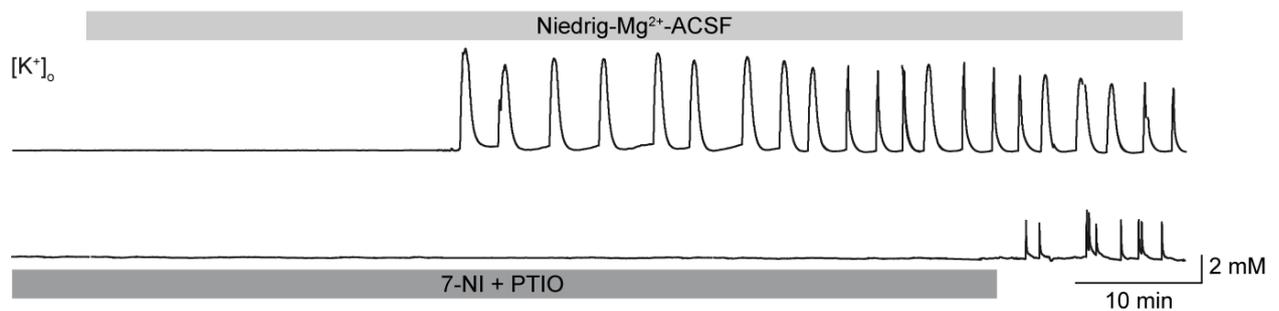


Abbildung 9

Effekte der NO-Deprivation durch 7-NI und PTIO auf die Entwicklung anfallsartiger Ereignisse in akuten hippocampalen-entorhinalen Hirnschnitten von Mäusen: Unter niedrig-Magnesium-Bedingungen betrug die Latenz bis zum Einsetzen der anfallsassoziierten $[K^+]_o$ -Anstiege ca. 30 min in unbehandelten entorhinalen-hippocampalen Hirnschnitten (oben).

Der nNOS selektive Inhibitor 7-NI (200 μ M) verhinderte in Kombination mit PTIO (300 μ M) die Entwicklung von anfallsartigen Ereignissen für mindestens 60 min.

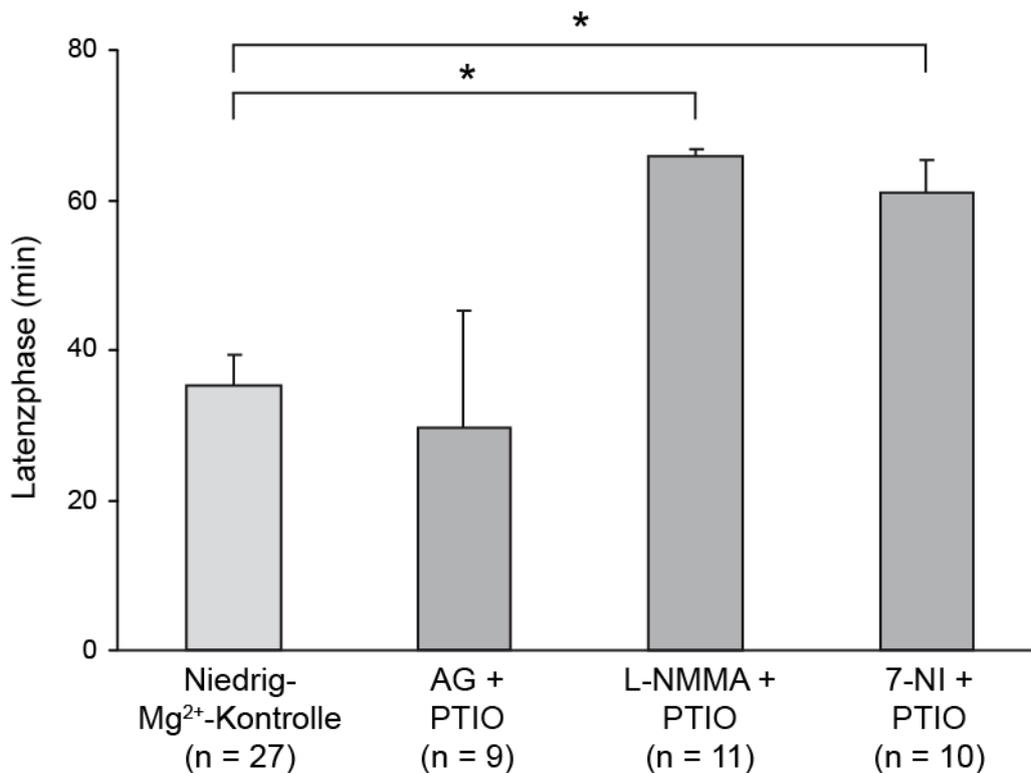


Abbildung 10

Vergleichendes Diagramm der Latenzen bis zum Einsetzen der epileptiformen Aktivität in der Niedrig-Magnesium-Kontrolle und den NO-deprivierten entorhinalen-hippocampalen Hirnschnitten. Der Vergleich der unterschiedlichen NOS Inhibitoren zeigte, dass nNOS, aber nicht iNOS, für die Bildung von NO in den untersuchten Hirnschnitten verantwortlich ist. Aminoguanidin (AG; 200 μ M) mit PTIO (300 μ M) bewirkten keine Blockade der anfallsartigen Ereignisse ($p = 0,476$), wohingegen L-NMMA (200 μ M) und 7-NI (200 μ M) mit PTIO die Aktivität über 60 Minuten supprimieren konnten ($p = 0,000$). Da der NO-Donor SNAP jeweils erst nach einer Messdauer von 60 min eingewaschen wurde sind hier die Versuche in denen später SNAP appliziert wurde mit in die Auswertung für die Latenz eingegangen.

Wirkung von exogen zugeführten NO bei supprimierter endogener NO-Produktion

Um auszuschliessen, daß die verwendeten Pharmaka einen von der NO-Deprivation unabhängigen antiepileptischen Nebeneffekt besitzen wurde die Induzierbarkeit anfallsartiger Ereignisse durch externes NO in Anwesenheit der NOS Inhibitoren getestet.

Durch Badapplikation des NO-Donors SNAP (600µM) konnten anfallsartige Ereignisse unter Anwesenheit von L-NMMA und PTIO in 100% der Schnitte (n = 7) induziert werden. In diesen Experimenten wurde die endogene NO-Produktion in den akuten Hirnschnitten durch L-NMMA und PTIO supprimiert. Dies führte, wie in den vorangegangenen Versuchen, zu einer Blockade der epileptiformen Aktivität. Nach einer Stunde erfolgte die Applikation von SNAP über die Perfusionspumpe. Bereits kurz nach der Aufsättigung mit SNAP konnten anfallsartige Ereignisse mit einer Latenz von 4 ± 2 min in den Akutschnitten registriert werden (siehe Abbildung 11). Die einzelnen Ereignisse waren durch einen extrazellulären K^+ -Ionenanstieg von $3,8 \pm 1,6$ mM (n = 35; p = 1,000; Dunett T3 Post Hoc Test) gekennzeichnet und dauerten durchschnittlich 56 ± 9 s (n = 35; p = 0,000; Bonferroni Post Hoc Test). Das interiktale Intervall war mit 226 ± 84 s (n = 28; p = 0,797; Dunett T3 Post Hoc Test) mit der Kontrollgruppe vergleichbar. Die Charakteristik der SNAP-induzierten Aktivität war also bis auf die verlängerte Anfallsdauer mit der aus den Kontrolluntersuchungen vergleichbar.

Die Tatsache, dass exogenes NO unter diesen Bedingungen in der Lage war epileptiforme Aktivität auszulösen, liefert einen klaren Hinweis dafür, dass der inhibitorische Effekt von L-NMMA und PTIO auf einer NO-Deprivation beruht und andere unspezifische antiepileptogene Effekte dieser Pharmaka unwahrscheinlich sind. Auch in Gegenwart von 7-NI und PTIO resultierte die Applikation von SNAP in einer rapiden Induktion epileptiformer Aktivität (n = 2), was die NO-Spezifität der Pharmaka in diesem Modell unterstreicht (109 Paul und Ekambaram, 2003; 110 Luszczki et al., 2006).

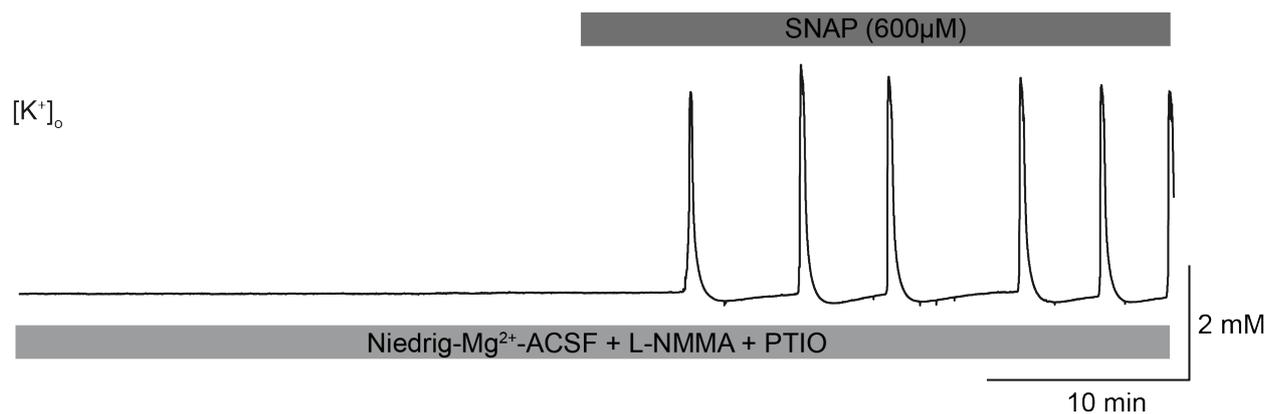


Abbildung 11

SNAP provoziert anfallsartige Ereignisse bei supprimierter endogener NO-Produktion. NO Deprivation durch L-NMMA (200 µM) und PTIO (300 µM) verhinderte die Entwicklung von niedrig-Magnesium-induzierter epileptiformer Aktivität im Akutschnitt. Unter diesen Bedingungen führte die Applikation des NO-Donors SNAP (600 µM) zu einem rapiden Auftreten anfallsartiger Ereignisse.

Experimente an nNOS defizienten Knock Out Mäusen

Epileptiforme Aktivität in hippocampalen - entorhinalen Hirnschnitten von nNOS (-/-) Mäusen

Um die vorangegangenen Ergebnisse aus den pharmakologischen Experimenten zu erhärten, wurden Versuche an akuten hippocampalen - entorhinalen Hirnschnitten von nNOS (-/-) Mäusen durchgeführt. In 64 % der Schnitte (n = 16 von 25) konnten anfallsartige Ereignisse nachgewiesen werden, also signifikant seltener ($p = 0,026$, exakter Test nach Fischer) als in Akutschnitten von Wildtyp Mäusen (n = 27 von 30).

Auffällig war auch eine signifikant verlängerte Latenz bis zum Einsetzen der epileptiformen Aktivität in den nNOS (-/-) Hirnschnitten mit 54 ± 8 min zu 35 ± 4 min in der Kontrollgruppe ($p = 0,027$, Dunnett T3 Post Hoc Test).

Weitere Unterschiede zeigten sich in den Charakteristika der epileptiformen Aktivität in den Akutschnitten der nNOS (-/-) Mäuse. Voll entwickelte anfallsartige Ereignisse alternierten oft mit weitaus schwächerer Aktivität, oder Perioden rekurrenter Anfälle veränderten sich zu klonischen Entladungen und umgekehrt (siehe Abbildung 12). Unter Verwendung der Standardabweichung von der durchschnittlichen Dauer der Intervalle zwischen den anfallsartigen Ereignissen als Maßstab für die Irregularität zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen nNOS (-/-) mit 264 ± 60 s und Wildtyp Mäusen mit 92 ± 24 s, (n = 16 und 27 Schnitte, $p = 0,022$, Mann-Whitney U-Test). Abbildung 13 zeigt eine graphische Darstellung der unterschiedlichen Latenz und der Standardabweichung der interiktalen Intervalle.

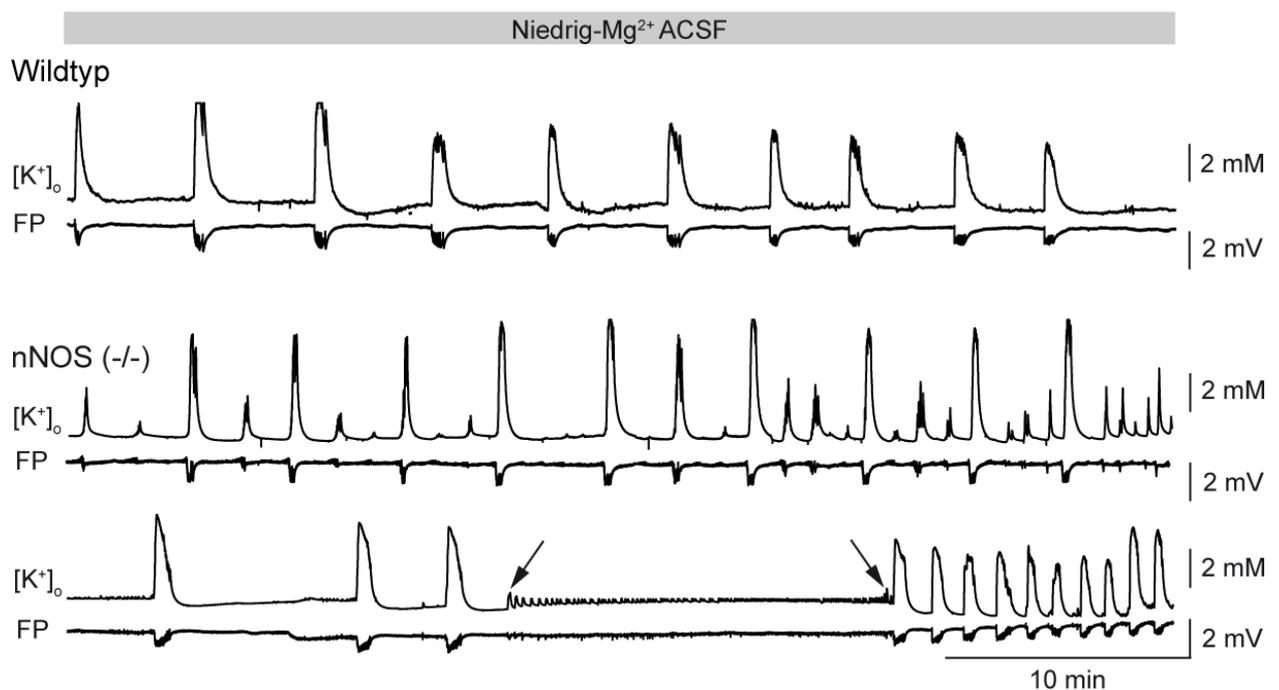


Abbildung 12

Vergleich der anfallsartigen Ereignisse in hippocampalen-entorhinalen Hirnschnitten von Wildtyp und nNOS (-/-) Knock Out Mäusen.

Dargestellt sind die charakteristischen Änderungen der extrazellulären K⁺-Ionenkonzentration und des Feldpotentials während niedrig-Magnesium-induzierter epileptiformer Aktivität. In den Hirnschnitten der Wildtyp Mäuse (oben) traten anfallsartige Ereignisse von ähnlicher Dauer und Amplitude regelmäßig auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Intervalle zwischen den einzelnen Ereignissen und deren assoziierten [K⁺]_o-Änderungen in den nNOS (-/-) Schnitten eine sehr viel größere Variabilität. Die Pfeile markieren den Übergang von rekurrenten anfallsartigen Ereignissen zu klonischen Entladungen und umgekehrt.

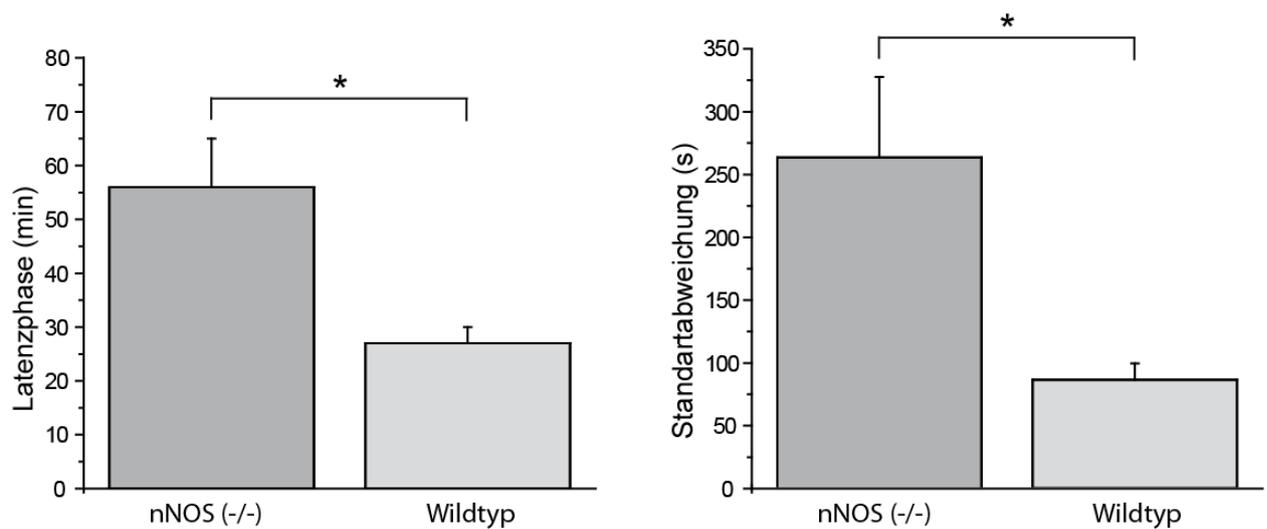


Abbildung 13

Unterschiede der epileptiformen Aktivität zwischen Wildtyp und nNOS (-/-) Mäusen im Niedrig-Magnesium-Modell. Die Latenzphase bis zum Auftreten anfallsartiger Ereignisse dauerte in den Akutschritten von nNOS defizienten Tieren signifikant länger als beim Wildtyp (linkes Diagramm, $p = 0,027$) und die Variabilität der einzelnen Ereignisse war deutlich höher. Als Maß für diese Irregularität wurde die Standardabweichung des durchschnittlichen Intervalls zwischen den anfallsartigen Intervallen von nNOS (-/-) und Wildtyp verglichen (rechtes Diagramm, $p = 0,022$).

Stimulusinduzierte Potentiale in Akutschnitten von nNOS (-/-) Mäusen

In den entorhinalen-hippocampalen Hirnschnitten der nNOS defizienten Knock Out Mäuse, die unter Niedrig-Magnesium-Bedingungen keine spontane Aktivität entwickelten, konnten durch Stimuli (20 Hz, 10 s) nach einer Stunde unter Niedrig-Magnesium-Bedingungen transiente $[K^+]_o$ Anstiege von $1,4 \pm 2$ mM induziert werden. Zwar konnte so die Vitalität der Schnitte belegt werden, die elektrische Stimulation induzierte aber im Gegensatz zu Akutschnitten von Wildtyp-Mäusen keine anfallsartigen Ereignisse.

NO-Deprivation in nNOS (-/-) Mäusehirnschnitten

Akutschnitte von nNOS (-/-) Mäusen sind nicht unbedingt komplett frei von NO, da eine Hochregulierung von eNOS (111 O-Dell et al. 1994) und alternativer Splicevarianten von nNOS (112 Eliasson et al., 1997) die nNOS-Deletion teilweise kompensieren könnten. Aus diesem Grund wurden in einer zusätzlichen Versuchsreihe die Experimente mit 7-NI und PTIO an nNOS (-/-) Tieren wiederholt. Hier zeigte sich, im Gegensatz zu der kompletten Blockade der epileptiformen Aktivität beim Wildtyp ($n = 10$), ein Auftreten von anfallsartigen Ereignissen in 37,5 % der Akutschnitte ($n = 8$; $p = 0,034$, exakter Test nach Fischer). Darüber hinaus entwickelte die Mehrzahl der nNOS (-/-) Schnitte, die in Gegenwart von 7-NI und PTIO keine Aktivität aufwiesen, auch nach Auswaschen der Pharmaka keine anfallsartigen Ereignisse. Generell ließ sich kein signifikanter Unterschied im Auftreten von anfallsartigen Ereignissen mit oder ohne der Anwesenheit von 7-NI und PTIO in den nNOS (-/-) Akutschnitten feststellen ($n=8$, 25, $p = 0,238$ exakter Test nach Fischer). In nNOS defizienten Tieren scheint die Initiation epileptiformer Aktivität also über einen NO-unabhängigen Weg vermittelt zu werden. Außerdem kann aufgrund dieser Beobachtung ein unspezifischer antiepileptischer Effekt von 7-NI und PTIO ausgeschlossen werden. Die erhobenen Daten zeigen, dass Hirnschnitte von nNOS defizienten Mäusen eine verminderte Anfallsneigung aufweisen und nNOS-vermittelte NO-Produktion eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung von anfallsartigen Ereignissen im entorhinalen Cortex darstellt.

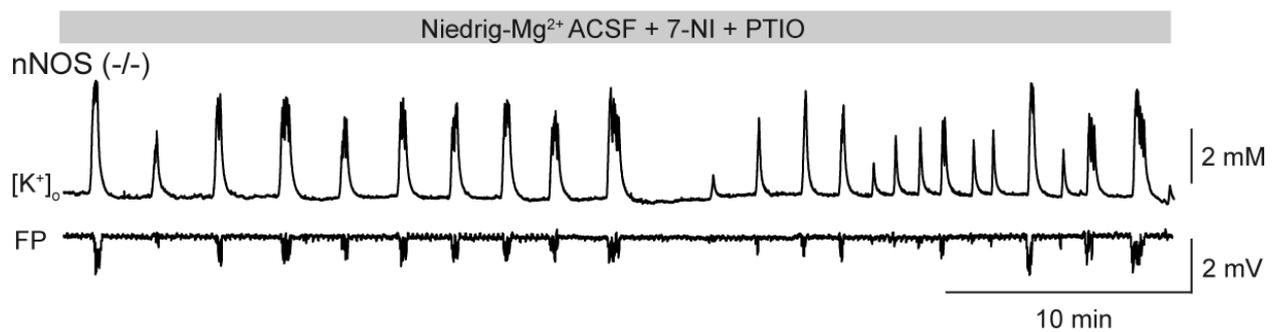


Abbildung 14

Representative Darstellung von niedrig-Magnesium-assoziierten Änderungen der extrazellulären K^+ -Konzentration ($[K^+]_o$) und des Feldpotentials (FP) von nNOS (-/-) Akutschnitten unter Einfluss von 7-NI und PTIO. Auffällig ist die Ähnlichkeit zu den Aufzeichnungen aus den Experimenten an nNOS (-/-) Mäusen ohne Einsatz von 7-NI und PTIO (vergleiche Abbildung 12).

Diskussion

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Bildung von NO unter Niedrig-Magnesium-Bedingungen einen essentiellen Faktor für die Entstehung von epileptiformer Aktivität in entorhinalen Cortex-Schnittpräparaten der Maus darstellt. Pharmakologische Blockade der NO-Bildung zusammen mit der Applikation von NO-Fängersubstanzen konnte die Initiierung epileptiformer Aktivität dauerhaft unterdrücken. Die besondere Rolle der neuronalen Isoform der NO-Synthase wurde mit Hilfe eines spezifischen nNOS-Inhibitors und mit einem Vergleich zwischen Wildtyp und nNOS (-/-) Mäusen nachgewiesen. Dagegen war die Blockade der induzierbaren Isoform der NO-Synthase im Hirnschnittpräparat ohne jegliche Wirkung. Die Entstehung epileptiformer Aktivität war in Schnitten von nNOS (-/-) Mäusen unregelmäßig und unabhängig von NO, da eine weitere NO-Deprivation hier keinerlei Effekt zeigte.

Zusätzlich ist noch zu vermerken, dass NO bei der Aufrechterhaltung der anfallsartigen Ereignisse in Mäusen eine weniger wichtige Rolle zu spielen scheint als bei Ratten, da bereits entwickelte Aktivität in Mäusen durch spätere NO-Deprivation nicht mehr unterdrückt werden konnte.

NO-Produktion steht in engem Zusammenhang mit einer gesteigerten synaptischen Aktivität unter Niedrig-Magnesium-Bedingungen (89 Schuchmann et al. 2002; 82 Kovács et al., 2009). Hier scheint ein positiver Feedbackmechanismus vorzuliegen, da es bereits in der Latenzphase vor Ausbildung von anfallsartigen Ereignissen zu einer vermehrten Synthese von NO kommt.

Methodenkritik

Kombiniertes entorhinales-hippocampales Hirnschnittpräparat

Durch den Schneidevorgang werden viele afferente und efferente Faserverbindungen zwischen dem Hirnschnittpräparat (400 µM Dicke) und dem angrenzenden Gewebe unterbrochen. In einer früheren Studie wurde die räumliche Ausdehnung inhibitorischer

Interneurone des Gyrus dentatus im Ganzhirnpräparat analysiert und mit der Situation im Hirnschnitt verglichen (113 Buckmaster und Schwarzkroin, 1995). Hierbei viel auf, dass weniger als 50 % der efferenten Axone der Interneurone innerhalb des Hirnschnittes erhalten bleiben. Somit werden also durch den Schneidevorgang die restlichen Fasern, deren Zielzellen zum Teil über die halbe Länge des Hippocampus entfernt liegen, unterbrochen. Gleiches gilt für die inhibitorischen Afferenzen der Körnerzellen.

In einer anderen Arbeit konnte allerdings nachgewiesen werden, dass die meisten bekannten Verbindungen zwischen entorhinalem Cortex, Ammonshorn und Gyrus dentatus erhalten bleiben (114 Boulton et al., 1992; 115 Empson und Heinemann, 1995). Damit besitzt das kombinierte Hirnschnittpräparat die entscheidenden Voraussetzungen für die Analyse epileptischer Aktivität in hippocampalen und parahippocampalen Strukturen.

***In vitro*-Modell fokaler Anfälle**

In der vorliegenden Arbeit wurde das Niedrig-Magnesium-Modell als Werkzeug genutzt, um den Einfluss von NO auf epileptiforme Aktivität zu untersuchen. Die anfallsartigen Ereignisse, die in diesem *in vitro*-Modell neben anderen Formen epileptischer Aktivität auftreten, weisen charakteristische pathophysiologische Veränderungen auf, die dem fokalen Anfall *in vivo* gleichen (116 Ayala, 1983). Es bestehen noch weitere Möglichkeiten zur Induktion epileptischer Ereignisse im kombinierten Hirnschnittpräparat, die fokalen Anfällen *in vivo* ähneln, zum Beispiel die Badapplikation von 4-Aminopyridin (117 Perreault und Avoli, 1991) oder die elektrische Stimulation spezifischer Areale (118 Wadman und Gutnick, 1993).

Ein wichtiger Grund für die Auswahl des Niedrig-Magnesium-Modells ist die Tatsache, dass auf den Einsatz prokonvulsiv wirkender Substanzen verzichtet werden kann. Somit sind auch keine Interaktionen zwischen einer solchen und den verwendeten Pharmaka zu erwarten.

Der Wirkmechanismus des Niedrig-Magnesium-Modells funktioniert über die Aktivierung von NMDA Rezeptoren, was nachweislich die Formation von NO fördert (63 Garthwaite et al., 1988). Hierbei werden die Mg^{2+} -Ionen aus dem transmembranären Ionenkanal

des NMDA-Rezeptors herausgewaschen und die, unter physiologischen Bedingungen bestehende, Blockade aufgehoben. Über eine gesteigerte Ca^{2+} -Permeabilität kommt es zu einer erhöhten Aktivität der neuronalen NO-Synthase, die sich in einer sehr engen Lagebeziehung mit den NMDA Rezeptoren befinden. Da in früheren Studien gezeigt wurde, dass in naivem Hirngewebe die überwiegende Mehrheit der anfallsartigen Ereignisse in den tieferen Schichten des entorhinalen Cortex generiert wird (119 Holtkamp et al., 2003; 120 Buchheim et al., 2000; 121 Meierkord et al., 1997), erfolgte die Positionierung der Kalium-Sensitiven Mikroelektroden in den Schichten IV und V.

Beurteilung der Ergebnisse

Quellen von endogenem NO in Hirnschnittpräparaten

Sowohl eNOS als auch nNOS werden in akuten Hirnschnitten der Maus exprimiert (78 Blackshaw et al., 2003). Durch den Vergleich der Effekte von iNOS- und nNOS-selektiven Inhibitoren in entorhinalen-hippocampalen Hirnschnitten der Maus lässt sich der Nachweis erbringen, dass nNOS die Hauptquelle für die gesteigerte NO-Produktion während epileptiformer Aktivität darstellt. Häufig debattiert wird allerdings die Frage nach der Subtyp-Spezifität der verwendeten NOS-Inhibitoren (77 Alderton et al., 2001). Vor diesem Hintergrund wurden zusätzliche Experimente an Hirnschnitten von nNOS (-/-) Mäusen durchgeführt. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten diese Tiere *in vitro* eine geringere Anfallsneigung und eine deutlich irregulärere Charakteristik hinsichtlich der einzelnen anfallsartigen Ereignisse.

Diese Beobachtung unterstützt die Ergebnisse aus den pharmakologischen Versuchen, was darauf schließen lässt, dass die gesteigerte NO-Synthese während epileptiformer Aktivität durch nNOS katalysiert wird.

Diese Schlussfolgerung muss nicht auf das Niedrig-Magnesium-Modell beschränkt werden. Eine gesteigerte Synthese von NO als Konsequenz der Zunahme glutamaterger Neurotransmission wurde auch in anderen Epilepsiemodellen *in vivo* demonstriert (88 Kaneko et al., 2002; 86 Gupta und Dettbarn, 2003; 87 Kato et al., 2005). Daher ist davon auszugehen, dass die erhöhte NO-Produktion, zusätzlich zu dem permissiven metabolischen Effekt durch erhöhte Hirnperfusion, einen generellen prokonvulsiven Mechanismus darstellen dürfte.

Das Auftreten anfallsartiger Ereignisse in einer Subpopulation der Hirnschnitte von nNOS (-/-) Mäusen könnte zwei plausible Erklärungen haben. Entweder ist die Entstehung anfallsähnlicher Aktivität in diesen Tieren vollkommen unabhängig von der NO-Bildung oder in diesen Tieren existieren alternative NO-Quellen, wie zum Beispiel alternative Splicevarianten von nNOS. Das für nNOS codierende Gen kommt in drei Splicevarianten vor (α , β , γ). 90 % der NO-Produktion gehen von nNOS α und 10 % von nNOS β aus, nNOS γ besitzt hingegen keine katalytische Aktivität. In nNOS (-/-) Mäusen lässt sich keine nNOS α Aktivität nachweisen, dafür ist die Expression von nNOS β

hochreguliert (112 Eliasson et al., 1997). Allerdings ist nur nNOS α in der Lage über Proteine an NMDA-Rezeptoren in Dendriten und Spines zu binden (122 Langaese et al., 2007). Die Überexpression von nNOS β im Zytosol resultiert in einem veränderten räumlichen und zeitlichen Auftreten der NO-Produktion. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich dies in einer veränderten Entwicklung anfallsartiger Ereignisse in den akuten Hirnschnittpräparaten der nNOS (-/-) Mäuse. Alternativ könnten manche nNOS-vermittelte Effekte in den Knock Out Mäusen teilweise durch gesteigerte Expression von eNOS kompensiert werden (111 O'Dell et al., 1994). Dies könnte in einer veränderten Bereitstellung von NO im Gewebe und dadurch in einer Störung von Initiierung und Verlauf einzelner anfallsähnliche Ereignisse resultieren. Der Befund, dass weder der nNOS Inhibitor 7NI noch die NO-Fängersubstanz PTIO imstande waren die Aktivitätsmuster in nNOS (-/-) Mäusen zu verändern, weist eher auf die Möglichkeit einer NO-unabhängigen Epileptogenese in den Knock Out Mäusen hin.

Ziele von endogenem NO

Den wichtigsten Einfluss übt NO auf „second messenger“-Kaskaden durch die Aktivierung löslicher Guanylatzyklase (sGC) aus (123 Szabadits, 2007). Die darauffolgende Zunahme der zytosolischen cGMP Konzentration interferiert sowohl mit glutamaterger (124 Prast, 1998) als auch mit GABAerger (125 Wall, 2003) synaptischer Transmission. NO beeinflusst die Freisetzung von Neurotransmittern (126 Meffert et al., 1996; 127 Mironov und Langohr, 2007; 128 Wang et al., 2007). In vorherigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass NO, über die Modulation präsynaptischer N-Typ Ca²⁺-Kanäle, die Ausschüttung von Glutamat steigert (129 Huang et al., 2003) während die Freisetzung von GABA über eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration vermittelt wird (130 Wang et al., 2006). Die vermehrte Transmitterfreisetzung könnte auch mit einer NO-vermittelten Steigerung des Recyclings von synaptischen Vesikeln in Verbindung stehen, wie es in hippocampalen Neuronen beobachtet wurde (131 Michaeva et al., 2003). Die voran genannten Mechanismen werden alle über cGMP vermittelte Signaltransduktion gesteuert. In organotypischen Hirnschnittkulturen der Ratte wurde allerdings gezeigt, dass der sGC-Inhibitor ODQ (10 μ M) die Effekte einer NO-Deprivation auf anfallsartige Ereignisse nicht nachahmen konnte (82 Kovács

et al., 2009).

Der Einfluss von NO auf epileptiforme Aktivität dürfte also eher über alternative Wege vermittelt werden. Wahrscheinliche Mechanismen sind ADP-Ribosylierung und S-Nitrosylierung von Proteinen oder andere oxidative Interaktionen durch NO, respektive seiner, aus der Reaktion mit Superoxid stammenden, Derivaten (132 Schuman et al., 1994; 133 Kleppisch et al., 1999; 134 Jaffreys et al., 2001; 135 Trabace und Kendrick, 2000). Solche Reaktionen könnten, besonders unter epileptischen Bedingungen, in denen es zu einem signifikanten Anstieg der Superoxid-Bildung kommt, von Bedeutung sein (136 Kovács et al., 2002).

In den durchgeführten Experimenten wurde gezeigt, dass durch PTIO alleine keine suffiziente Blockade von anfallsartigen Ereignissen erzielt wird. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass PTIO vorwiegend die direkte Wirkung von NO auf die Guanylatcyklase hemmt, während andere NO-Derivate weiter aktiv bleiben können. Durch die Reaktion von NO mit PTIO kommt es zur Bildung eines NO₂-Radikals, welches ebenfalls in der Lage ist, Proteine zu nitrosylieren (104 Goldstein et al., 2003). Falls die proepileptische Wirkung durch zum Beispiel S-Nitrosylation ausgeübt wird, kann diese weder durch PTIO noch durch den Guanylatezyklase-Hemmer ODQ geblockt werden.

Verschiedene Mechanismen, in denen S-Nitrosylierung synaptische Aktivität steigern könnte, kommen hier in Frage: Eine Aktivierung von L-Typ Ca²⁺-Kanälen (137 Tjong et al., 2007). Die gesteigerte Expression von AMPA Rezeptoren (138 Huang et al., 2005). Persistierende Natriumströme können in hippocampalen Neuronen aktiviert werden, was zu einer gesteigerten Anfallsneigung führen könnte (139 Hammarström und Gage, 1999).

S-Nitrosylierung begünstigt die Kanalöffnung des Porenprotein Pannexin 1, was zu einer erleichterten Depolarisation von Neuronen führt (140 Zhang et al., 2008). Tatsächlich wurde in einer Studie von Thompson und MacVicar eine NMDA Rezeptor vermittelte Öffnung von Pannexin 1 unter Niedrig-Magnesium-Bedingungen nachgewiesen (141 Thompson et al., 2009).

Eine vermehrte Glutamatausschüttung wird über den direkten Einfluss durch S-Nitrosylierung auf präsynaptische Proteine vermittelt (126 Meffert et al., 1996).

Außerdem könnte die S-Nitrosylierung auch zu einer Inhibition der Komplex I Aktivität in der mitochondrialen Atmungskette und dadurch zu einem lokalen ATP-Mangel in der

Synapse führen, was durch Störung präsynaptischer Ca^{2+} -Pufferung und ATP-abhängige Ionenpumpaktivität proepileptisch wirken kann (142 Kunz et al., 2000, 144 Kudin et al., 2009).

Effekte von NO auf die Initiation anfallsartiger Ereignisse

Basierend auf *in vivo* Daten werden in der Literatur für NO entweder pro- oder antikonvulsive Effekte beschrieben (92 Wojtal et al., 2003). Breitspektrum NOS-Inhibitoren verstärkten Kainat-induzierte epileptische Anfälle (87 Kato et al., 2005). Im Gegensatz dazu konnte die Inhibition von nNOS das Auftreten von epileptischer Aktivität hinauszögern (144 Yasuda et al., 2001). Erhöhte nNOS-Aktivität wurde vor Pikrotoxin-induzierten Anfällen im Hippocampus der Ratte nachgewiesen, 7-NI verzögerte das Einsetzen des Status epilepticus und war mit reduzierter Aktivität assoziiert (145 Rajasekaran et al., 2003). In einer anderen Studie steigerten NOS-Inhibitoren die antikonvulsiven Eigenschaften von Adenosin im Pentylentetrazol-Epilepsie-Modell, wohingegen NO-Donoren diese verminderten (146 Akula et al., 2008). Interessanterweise waren in diesen Versuchen L-NAME und 7-NI gleich effektiv, während Aminoguanidin keine Wirkung zeigte. Die Interpretation von *in vivo* Daten ist aufgrund der komplexen Einflüsse von NO auf den cerebralen Blutfluss und somit auf die Gewebeoxygenierung generell als schwierig zu erachten.

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Epilepsiemodell ist eine konstante Perfusion mit definierten Konzentrationen des Nährmediums und der gelösten Pharmaka gewährleistet. Aus diesem Grund treten die oben genannten Effekte nicht auf. In den durchgeführten Experimenten zeigten sich für NO ganz klar prokonvulsive Eigenschaften. NO scheint, unter Niedrig-Magnesium-Bedingungen, die epileptiforme Aktivität bereits in der Latenzphase vor Auftreten des ersten anfallsartigen Ereignisses zu beeinflussen und weniger für deren Aufrechterhaltung nötig zu sein. Aufgrund der vorliegenden Daten kann davon ausgegangen werden, dass die gesteigerte NO-Produktion langanhaltende Veränderungen in der synaptischen Transmission induziert, welche nach bereits eingetretener epileptiformer Aktivität nicht mehr unterdrückbar sind. In früheren Studien konnte nachgewiesen werden, dass NO verschiedene Formen synaptischer Plastizität im Hippocampus über sGC-abhängige (67 Bon und Garthwaite,

2003; 147 Hopper und Garthwaite, 2006) oder sGC-unabhängige (132 Schuman et al., 1994; 133 Kleppisch et al., 1999; 148 Stanton et al., 2005) Wege vermittelt. Es ist also wahrscheinlich, dass auch eine langsame Steigerung der synaptischen Transmission während der Latenzphase vor dem Einsetzen epileptiformer Aktivität die Entwicklung anfallsartiger Ereignisse begünstigt. Die Initiation anfallsartiger Ereignisse könnte auch die selektive Aktivierung bestimmter Interneuron-Populationen beinhalten, was bei intracerebralen EEG-Daten von Patienten mit Temporallappenepilepsie beobachtet wurde (149 Wendling et al., 2005).

Langzeiteffekte von NO in der Epilepsie

Aus den vorliegenden Daten ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die NO-abhängige Steigerung der synaptischen Transmission eine Schlüsselrolle in der Initiation anfallsartiger Ereignisse spielt. Zudem könnte NO in der Epilepsie verschiedene längerfristige Auswirkungen auf das Gewebe erzielen. Brown beschreibt eine NO-abhängige reversible und irreversible Blockade der mitochondrialen Atmungskette. Nanomolare NO Konzentrationen hemmen die Cytochromoxidase spezifisch und reversibel kompetitiv zu O_2 . Höhere Konzentrationen von NO und seiner Derivate wie Peroxinitrit können eine irreversible Blockade der Atmungskette und den damit verbundenen Zelltod verursachen (69 Brown, 2001). Auch wurde eine Unterbrechung der mitochondrialen Netzwerke (150 Yuan et al., 2007) und eine Inhibition der mitochondrialen Mobilität (151 Rintoul et al., 2006) beschrieben. Diese Mechanismen könnten zu den metabolischen Dysfunktionen, wie sie für den epileptischen Hippocampus nachgewiesen wurden, führen (152 Kann et al., 2005; 153 Kunz et al., 2000). In Gegenwart von Superoxid entsteht aus NO zytotoxisches Peroxinitrit ($ONOO^-$). Diese freien Radikale können nach langanhaltender epileptischer Aktivität zu schweren Zellschäden führen (136 Kovács et al., 2002). NO ist also über verschiedene Mechanismen an der anfallsassoziierten langfristigen Schädigung des neuronalen Gewebes wie bei der chronischen Temporallappenepilepsie beteiligt.

Perspektiven

Aus dem Nachweis, dass NO einen essentiellen Faktor für die Entstehung von anfallsartigen Ereignissen darstellt, könnte in Zukunft ein neuer Therapieansatz zur Behandlung epileptischer Erkrankungen entstehen.

Um aus den vorliegenden Ergebnissen eine klinische Anwendbarkeit abzuleiten, müssen vorher jedoch eine Reihe wichtiger Fragestellungen geklärt werden.

Offen bleibt beispielsweise, inwieweit eine selektive Inhibition der neuronalen NO-Synthase überhaupt *in vivo* durchführbar ist und welche Serumkonzentration die Initiation epileptischer Aktivität zwar ausreichend supprimieren würde ohne jedoch die Gewebepfusion und die neuronale Plastizität in pathologischer Weise zu beeinflussen. Außerdem müsste überprüft werden, ob die Ergebnisse dieser und anderer tierexperimenteller Arbeiten in humanem Gewebe reproduzierbar sind.

Als Gegenstand weiterer Studien wäre genauer zu definieren, über welche Signalkaskaden NO seinen Einfluss auf die Epileptogenese beim Menschen ausübt. Sind die zugrunde liegenden Mechanismen erst einmal ausreichend verstanden, entsteht, als weiterer Aspekt, die Frage nach der direkten Beeinflussbarkeit der physiologischen Ziele von endogenem NO. Wäre es möglich, diese unmittelbar pharmakologisch zu blockieren, könnten die, durch eine inhibierte NO-Synthese zu erwartenden, unerwünschten Nebenwirkungen voraussichtlich umgangen werden. Mögliche vielversprechende Ansätze wären hier eine Hemmung der erwähnten S-Nitrosylierung oder der Pannexin 1 Öffnung.

Werden die aufgeführten offenen Fragestellungen zukünftig anhand weiterer experimenteller und klinischer Studien näher beantwortet, ließe sich aus der medikamentösen Beeinflussung des neuronalen NO-Stoffwechsels möglicherweise eine interessante Alternative zur Behandlung mit konventionellen Antiepileptika etablieren. Besonders für Patienten, die an einer pharmakoresistenten Temporallappenepilepsie leiden, könnte hierdurch eine äußerst vielversprechende Therapieoption entstehen.

Anhang

Literaturverzeichnis

- 1 Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 1981;22:489-501.
- 2 Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1989;30:389-99.
- 3 Spencer DD. Classifying the epilepsies by substrate. *Clin Neurosci* 1994;2:104-109.
- 4 Leppik IE. Intractable epilepsy in adults. *Epilepsy Res Suppl* 1992;5:7-11.
- 5 Engel J Jr. Clinical neurophysiology, neuroimaging, and the surgical treatment of epilepsy. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1993;6:240-249.
- 6 DeLorenzo RJ, Hauser WA, Towne AR, Boggs JG, Pellock JM, Penberthy L, Garnett L, Fortner CA, Ko D. A prospective, population-based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia. *Neurology* 1996;46:1029-35.
- 7 Coeytaux A, Jallon P, Galobardes B, Morabia A. Incidence of status epilepticus in French-speaking Switzerland: (EPISTAR). *Neurology* 2000;55:693-697.
- 8 Heinemann U, Eder C. Control of neuronal excitability. In: *Epilepsy: A Comprehensive Textbook* (Engel J. Jr., Pedley T. A.). Philadelphia, New York: Lippincott-Raven 1997;237-250.

- 9 Cutting GR, Lu L, O'Hara BF, Kasch LM, Montrose-Rafizadeh C, Donovan D M, Shimada S, Antonarakis SE, Guggino WB, Uhl GR, Kazazian HH Jr. Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2673-2677.
- 10 Misgeld U, Bijak M, Jarolinek W. A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1995;46:423-462.
- 11 McBain CJ, Mayer ML. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* 1994;74:723-760.
- 12 Nateri AS, Raivich G, Gebhardt C, Da Costa C, Naumann H, Vreugdenhil M, Makwana M, Brandner S, Adams RH, Jefferys JG, Kann O, Behrens A. ERK activation causes epilepsy by stimulating NMDA receptor activity. *EMBO J* 2007;26:4891-901.
- 13 Du F, Whetsell WO Jr, Abou-Khalil B, Blumenkopf B, Lothmann EW, Schwarcz R. Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 1993;16:223-233.
- 14 Babb TL, Brown WJ. Pathological findings in epilepsy. In: *Surgical Treatment of the Epilepsies* (Engel ., Jr.). New York: Raven Press 1987;511-540.
- 15 Babb TL, Brown WJ, Pretorius JK, Davenport CJ, Lieb JP, Crandall PH. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1984;25:729-740.
- 16 Lehmann TN, Gabriel S, Kovács 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;41:190-194.

- 17 Ben-Ari Y, Represa A, Tremblay E, Nitecka L. Selective and non-selective seizure related brain damage produced by kainic acid. In: Excitatory amino acids and epilepsy (Schwarcz R., Ben-Ari Y.). New York, London: Plenum Press 1986;647-657.
- 18 Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 1978;271:676-677.
- 19 Lehmann TN, Gabriel S, Eilers A, Njunting M, Kovács R, Schulze K, Lanksch WR, Heinemann U. Fluorescent tracer in pilocarpine-treated rats shows widespread aberrant hippocampal neuronal connectivity. *Eur J Neurosci* 2001;14:83-95.
- 20 David Y, Cacheaux LP, Ivens S, Lpilever E, Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: consequence of altered potassium and glutamate homeostasis? *J Neurosci* 2009;26:10588-10599.
- 21 Seifert G, Carmignoto G, Steinhäuser C. Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Res Rev* 2010;63:212-221.
- 22 Kovács R, Heinemann U, Steinhäuser C. Mechanisms underlying blood–brain barrier dysfunction in brain pathology and epileptogenesis: Role of astroglia. *Epilepsia* 2012;53:53-59.
- 23 Erecinska M, Silver IA. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* 2001;128:263-276.
- 24 Kann O, Schuchmann S, Buchheim K, Heinemann U. Coupling of neuronal activity and mitochondrial metabolism as revealed by NAD(P)H fluorescence signals in organotypic hippocampal slice cultures of the rat. *J Neuroscience* 2003;119:87-100.
- 25 Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:639-645.

- 26 Kunz WS. The role of mitochondria in epileptogenesis. *Curr Opin Neurol* 2002;15:179-184.
- 27 Kudin AP, Zsurka G, Elger CE, Kunz WS. Mitochondrial involvement in temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 2009;218:326-32.
- 28 Dawson VL, Dawson TM. Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr* 2004;36:287-294.
- 29 Johnston, D, Amaral, DG. Hippocampus. In: Shepherd, G. M.: *The Synaptic Organisation of the Brain*. 4. Oxford University Press, New York, Oxford 1998;417-458.
- 30 Csicsvari J, Hirase H, Czurkó A, Mamiya A, Buzsáki G. Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving rat. *J Neurosci* 1999;19:274-287.
- 31 Buzsáki G. Two-Stage Model of Memory Trace Formation: A Role for "Noisy" Brain States. *Neuroscience* 1989;31:551-570.
- 32 Hasselmo ME. Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn Sci* 1999;3:351-359.
- 33 Siapas AG, Wilson MA. Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep. *Neuron* 1998;21:1123-1128.
- 34 Eichenbaum H, Otto T, Cohen NJ. Two functional components of the hippocampal memory system. *Behav Brain Sci* 1994;17:449-518.
- 35 Eichenbaum H, Otto T und Cohen NJ. The hippocampus - what does it do? *Behav Neural Biol* 1992;57:2-36.
- 36 Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 2002;35:625-641.

- 37 Lorente de Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* 1934;46:113-177.
- 38 Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH, Lohman, AH. Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev* 1990;70:453-511.
- 39 Witter MP. Organization of the entorhinal-hippocampal system: A review of current anatomical data. *Hippocampus* 1993;3:33-44.
- 40 Heinemann U, Schmitz D, Eder C, Gloveli T. Properties of Entorhinal Cortex Projection Cells to the Hippocampal Formation. *Ann N Y Acad Sci* 2000;911:112-126.
- 41 Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 1986;6:2950-67.
- 42 Rempel-Clower NL, Zola SM, Squire LR, Amaral DG. Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J Neurosci* 1996;15:5233-55.
- 43 Campbell S, MacQueen G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J Psych Neurosci* 2003;29:417-426.
- 44 Harrison PJ. The hippocampus in schizophrenia: a review of the neurophysiological evidence and its patho-physiological implications. *Psychopharmacology* 2004;174:151-162.
- 45 Panegyres PK. The contribution of the study of neurodegenerative disorders to the understanding of human memory. *Q J Med* 2004;97:555-567.
- 46 Green, JD. THE HIPPOCAMPUS. *Physiol Rev* 1964;44:561-608.

- 47 Spencer DD, Spencer SS. Hippocampal resections and the use of human tissue in defining temporal lobe epilepsy syndromes. *Hippocampus* 1994;4:243-249.
- 48 Collins RC, Tearse RG, Lothman EW. Functional anatomy of limbic seizures: focal discharges from medial entorhinal cortex in rat. *Brain Res* 1983;280:25-40.
- 49 Dasheiff RM, McNamara JO. Electrolytic entorhinal lesions cause seizures. *Brain Res* 1983;231:444-450.
- 50 Heinemann U, Zhang CI, Eder C. Entorhinal cortex-hippocampal interactions in normal and epileptic temporal lobe. *Hippocampus* 1993;3:89-98.
- 51 Jones RSG, Heinemann U. Synaptic and intrinsic responses of medial entorhinal cortical cells in normal and magnesium-free medium in vitro. *J Neurophysiol* 1988;59:1476-1497.
- 52 Jones RSG., Lambert JDC. Synchronous discharges in the rat entorhinal cortex in vitro: Site of initiation and the role of excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 1990;34:657-670.
- 53 Behr J, Gloveli T, Gutierrez R, Heinemann U. Spread of low Mg²⁺ induced epileptiform activity from the rat entorhinal cortex to the hippocampus after kindling studied in vitro. *Neurosci Lett* 1996;216:41-44.
- 54 Bertram EH, Zhang DX, Mangan P, Fountain N, Rempe D. Functional anatomy of limbic epilepsy: a proposal for central synchronization of a diffusely hyperexcitable network. *Epilepsy Res* 1998;32:194-205.
- 55 Scharfman HE. Hyperexcitability of entorhinal cortex and hippocampus after application of aminoxyacetic acid (AOAA) to layer III of the rat medial entorhinal cortex in vitro. *J Neurophysiol* 1996;76:2986-3001.

- 56 Walther H, Lambert JDC, Jones RSG, Heinemann U, Hamon B. Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with low magnesium medium. *Neurosci Lett* 1986;69:156-161.
- 57 Bernasconi N, Bernasconi A, Andermann F, Dubeau F, Feindel W, Reuters DC. Entorhinal cortex in temporal lobe epilepsy: a quantitative MRI study. *Neurology* 1999;52:1870-1876.
- 58 Bernasconi N, Bernasconi A, Caramanos Z, Dubeau F, Richardson J, Andermann F, Arnold DL. Entorhinal cortex atrophy in epilepsy patients exhibiting normal hippocampal volumes. *Neurology* 2001;56:1335-1339.
- 59 Williamson PD, French JA, Thadani VM, Kim JH, Novelly RA, Spencer SS, Spencer DD, Mattson RH. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: II. Interictal and ictal scalp electroencephalography, neuropsychological testing, neuroimaging, surgical results, and pathology. *Ann Neurol* 1993;34:781-787.
- 60 Lévesque MF, Nakasato N, Vinters HV, Babb TL. Surgical treatment of limbic epilepsy associated with extrahippocampal lesions: the problem of dual pathology. *J Neurosurg* 1991;75:364-370.
- 61 Kim JH, Guimaraes PO, Shen MY, Masukawa LM, Spencer DD. Hippocampal neuronal density in temporal lobe epilepsy with and without gliomas. *Acta Neuropathol Berl* 1990;80:41-45.
- 62 Rutecki PA, Grossman RG, Armstrong D, Irish-Loewen S. Electrophysiological connections between the hippocampus and entorhinal cortex in patients with complex partial seizures. *J Neurosurg* 1989;70:667-675.
- 63 Wilson CL, Isokawa M, Babb TL, Crandall PH. Functional connections in the human temporal lobe I. Analysis of limbic system pathways using neuronal responses evoked by electrical stimulation. *Exp Brain Res* 1990;82:279-292.

- 64 Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988;336:385-388.
- 65 Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9030-9033.
- 66 Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* 2001;64:51-68.
- 67 Bon C, Garthwaite J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 2003;23:1941-1948.
- 68 Iadecola C, Li J, Ebner TJ, Xu X. Nitric oxide contributes to functional hyperemia in cerebellar cortex. *Am J Physiol* 1995;268:1153-1162.
- 69 Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 2001;1504:46-57.
- 70 Good PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW, Perl DP. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1996;149:21-28.
- 71 Calabrese V, Bates TE, Stella AM. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res* 2000;25:1315-1341.
- 72 Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 1989;172:413-416
- 73 Dawson TM, Zhang J, Dawson VL, Snyder SH. **Nitric oxide: cellular regulation and neuronal injury.** *Prog Brain Res* 1994;103:365-369.

- 74 Thadani U. Oral Nitrates: More Than Symptomatic Therapy in Coronary Artery Disease? *Cardiovasc Drugs Ther* 1997;11:213-218.
- 75 Smith O. Nobel prize for NO research. *Nat Med* 1998;4:1215.
- 76 Zhang J, Snyder SH. Nitric oxide in the nervous system. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:213-233.
- 77 Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.
- 78 Blackshaw S, Eliasson MJ, Sawa A, Watkins CC, Krug D, Gupta A, Arai T, Ferrante RJ, Snyder SH. Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxidedependent synaptic plasticity. *Neuroscience* 2003;119:979-990.
- 79 Fuentealba P, Begum R, Capogna M, Jinno S, Márton LF, Csicsvari J, Thomson A, Somogyi, P, Klausberger T. Ivy cells: A population of nitric-oxide-producing, slow-spiking GABAergic neurons and their involvement in hippocampal network activity. *Neuron* 2008;57:917-929.
- 80 Beach TG, Woodhurst WB, MacDonald DB, Jones MW. Reactive microglia in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett* 1995;19:27-30.
- 81 Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: Experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 2005;46:1724-1743.
- 82 Kovács R, Rabanus A, Otáhal J, Patzak A, Kardos J, Albus K, Heinemann U, Kann O. Endogenous Nitric Oxide is a Key Promoting Factor for Initiation of Seizure-Like Events in Hippocampal and Entorhinal Cortex Slices. *J Neurosci* 2009;29:8565-8577.

- 83 Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Kharazia VN, Nakane M, Schmidt HH. Neurons in rat hippocampus that synthesize nitric oxide. *J Comp Neurol* 1993;331:111-121.
- 84 Keynes RG, Duport S, Garthwaite J. Hippocampal neurons in organotypic slice culture are highly resistant to damage by endogenous and exogenous nitric oxide. *Eur J Neurosci* 2004;19:1163-1173.
- 85 Mülsch A, Busse R, Mordvintcev PI, Vanin AF, Nielsen EO, Scheel-Kruger J, Olesen SP. Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. *Neuroreport* 1994;5:2325-2328.
- 86 Gupta RC, Dettbarn WD. Prevention of kainic acid seizures-induced changes in levels of nitric oxide and high-energy phosphates by 7-nitroindazole in rat brain regions. *Brain Res* 2003;981:184-192.
- 87 Kato N, Sato S, Yokoyama H, Kayama T, Yoshimura T. Sequential changes of nitric oxide levels in the temporal lobes of kainic acid-treated mice following application of nitric oxide synthase inhibitors and phenobarbital. *Epilepsy Res* 2005;65:81-91.
- 88 Kaneko K, Itoh K, Berliner LJ, Miyasaka K, Fujii H. Consequences of nitric oxide generation in epileptic-seizure rodent models as studied by in vivo EPR. *Magn Reson Med* 2002;48:1051-1056.
- 89 Schuchmann S, Albrecht D, Heinemann U, von Bohlen und Halbach O. Nitric oxide modulates low-Mg²⁺-induced epileptiform activity in rat hippocampal entorhinal cortex slices. *Neurobiol Dis* 2002;11:96-105.
- 90 De Vasconcelos AP, Bouilleret V, Riban V, Wasterlain C, Nehlig A. Role of nitric oxide in cerebral blood flow changes during kainate seizures in mice: genetic and pharmacological approaches. *Neurobiol Dis* 2005;18:270-281.

- 91 Kirkby RD, Carroll DM, Grossman AB, Subramaniam S. Factors determining proconvulsant and anticonvulsant effects of inhibitors of nitric oxide synthase in rodents. *Epilepsy Res* 1996;24:91-100.
- 92 Wojtal K, Gniatkowska-Nowakowska A, Czuczwar SJ. Is nitric oxide involved in the anticonvulsant action of antiepileptic drugs? *Pol J Pharmacol* 2003;55:535-542.
- 93 Burette A, Zabel U, Weinberg RJ, Schmidt HH, Valtschanoff JG. Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J Neurosci* 2002;22:8961-8970.
- 94 Namiki S, Kakizawa S, Hirose K, Iino M. NO signalling decodes frequency of neuronal activity and generates synapse-specific plasticity in mouse cerebellum. *J Physiol* 2005;566:849-863.
- 95 Sato M, Nakajima T, Goto M, Umezawa Y. Cell-based indicator to visualize picomolar dynamics of nitric oxide release from living cells. *Anal Chem* 2006;78:8175-8182.
- 96 Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 1993;75:1273-1286.
- 97 Patzak A, Steege A, Lai EY, Brinkmann JO, Kupsch E, Spielmann N, Gericke A, Skalweit A, Stegbauer J, Persson PB, Seeliger E. Angiotensin II response in afferent arterioles of mice lacking either the endothelial or neuronal isoform of nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;294:429-437.
- 98 Heinemann U, Jones RSG. Neurophysiology. In: *Comprehensive Epileptology* (Dam M, Gram L) New York: Raven Press 1990;17-42.
- 99 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.

- 100 Dreier JP, Heinemann U. Late low-magnesium-induced epileptiform activity in rat entorhinal cortex slices becomes insensitive to the anticonvulsant valproic acid. *Neurosci Lett* 1990;119:68-70.
- 101 Zhang CL, Dreier JP, Heinemann U. Paroxysmal epileptiform discharges in temporal lobe slices after prolonged exposure to low magnesium are resistant to clinically used anticonvulsants. *Epilepsy Res* 1995;20:105-111.
- 102 Heinemann U, Lux HD, Gutnick MJ. Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp. Brain Res* 1977;27:237-243.
- 103 Heinemann U, Arens J. Production and calibration of ion-sensitive microelectrodes. In: *Practical electrophysiological methods* (Kettenmann H, Granty R.) New York: Wiley-Liss 1992;206-212.
- 104 Goldstein S, Russo A, Samuni A. Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with *NO, *NO₂, and O₂*. *J Biol Chem* 2003;278:50949-50955.
- 105 Moro MA, Darley-Usmar VM, Lizasoain I, Su Y, Knowles RG, Radomski MW, Moncada S. The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite. *Br J Pharmacol* 1995;116:1999-2004.
- 106 Steffen M, Sarkela TM, Gybina AA, Steele TW, Trasseth NJ, Kuehl D, Giulivi C. Metabolism of S-nitrosoglutathione in intact mitochondria. *Biochem J* 2001;356:395-402
- 107 Brorson JR, Schumacker PT, & Zhang H. Nitric oxide acutely inhibits neuronal energy production. *J Neurosci* 1999;19:147-158.
- 108 Hall CN, Garthwaite J. Inactivation of nitric oxide by rat cerebellar slices. *J. Physiol* 2006;577:549-67.

- 109 Paul V, Ekambaram P. Effect of 7-nitroindazole alone and in combination with phenobarbitone and diazepam on picrotoxin-induced convulsions in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 2003;47:400-406.
- 110 Luszczki JJ, Sacharuk A, Wojciechowska A, Andres-Mach MM, Dudra-Jastrzebska M, Mohamed M, Sawicka KM, Kozinska J, Czuczwar SJ. (2006). 7-Nitroindazole enhances dose-dependently the anticonvulsant activities of conventional antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock-induced seizure model. *Pharmacol Rep* 2006;58:660-671.
- 111 O'Dell TJ, Huang PL, Dawson TM, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel ER, Fishman MC. Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science* 1994;265:542-545.
- 112 Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:396-401.
- 113 Buckmaster PS, Schwartzkroin PA. Interneurons and inhibition in the dentate gyrus of the rat in vivo. *J Neurosci* 1995;15:774-789.
- 114 Boulton CL, von Haebler D, Heinemann U. Tracing of axonal connections by rhodamine-dextran-amine in the rat hippocampal-entorhinal cortex slice preparation. *Hippocampus* 1992;2:99-106.
- 115 Empson RM, Heinemann U. Perforant path connections to area CA1 are predominantly inhibitory in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice preparation. *Hippocampus* 1995;5:104-107.
- 116 Ayala GF. The paroxysmal depolarizing shift. *Prog Clin Biol Res* 1983;124:15-21.
- 117 Perreault P, Avoli M. Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 1991;65:771-785.

- 118 Wadman WJ, Gutnick, MJ. Non-uniform propagation of epileptiform discharge in brain slices of rat neocortex. *Neuroscience* 1993;52:255-262.
- 119 Holtkamp M, Buchheim K, Siegmund H, Meierkord H. Optical imaging reveals reduced seizure spread and propagation velocities in aged rat brain in vitro. *Neurobiol Aging* 2003;24:345-353.
- 120 Buchheim K, Schuchmann S, Siegmund H, Weissinger F, Heinemann U, Meierkord H. Comparison of intrinsic optical signals associated with low Mg^{2+} -and 4-aminopyridine-induced seizure-like events reveals characteristic features in adult rat limbic system. *Epilepsia* 2000;41:635-641.
- 121 Meierkord H, Schuchmann S, Buchheim K. und Heinemann U. Optical imaging of low Mg^{2+} -induced spontaneous epileptiform activity in combined rat entorhinal cortex-hippocampal slices. *Neuroreport*1997;8:1857-1861.
- 122 Langnaese K, Richter K, Smalla KH, Krauss M, Thomas U, Wolf G, Laube G. Splice-isoform specific immunolocalization of neuronal nitric oxide synthase in mouse and rat brain reveals that the PDZ-complex-building nNOSalpha beta-finger is largely exposed to antibodies. *Dev Neurobiol* 2007;67:422-437.
- 123 Szabadits E, Cserép C, Ludányi A, Katona I, Gracia-Llanes J, Freund TF, Nyíri G. Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signalling. *J Neurosci* 2007;27:8101-8111.
- 124 Prast H, Tran MH, Fischer H, Philippu A. Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA. *J Neurochem* 1998;71:266-273.
- 125 Wall MJ. (2003). Endogenous nitric oxide modulates GABAergic transmission to granule cells in adult rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 2003;18:869-878.

- 126 Meffert MK, Calakos NC, Scheller RH, Schulman H. Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking fusion reactions. *Neuron* 1996;16:1229-1236
- 127 Mironov SL, Langohr K. Modulation of synaptic and channel activities in the respiratory network of the mice by NO/cGMP signalling pathways. *Brain Res* 2007;1130:73-82.
- 128 Wang S, Paton JF, Kasparov S. Differential sensitivity of excitatory and inhibitory synaptic transmission to modulation by nitric oxide in rat nucleus tractus solitarii. *Exp Physiol* 2007;92: 371-382.
- 129 Huang CC, Chan SH, Hsu KS. cGMP/protein kinase G-dependent potentiation of glutamatergic transmission induced by nitric oxide in immature rat rostral ventrolateral medulla neurons in vitro. *Mol Pharmacol* 2003;64:521-532.
- 130 Wang S, Teschemacher AG, Paton JF, Kasparov S. Mechanism of nitric oxide action on inhibitory GABAergic signaling within the nucleus tractus solitarii. *FASEB J* 2006;20:1537-1539.
- 131 Micheva KD, Buchanan J, Holz RW, Smith SJ. Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nat Neurosci* 2003;6:925-932.
- 132 Schuman EM, Meffert MK, Schulman H, Madison DV. An ADPribosyltransferase as a potential target for nitric oxide action in hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11958-11962.
- 133 Kleppisch T, Pfeifer A, Klatt P, Ruth P, Montkowski A, Fässler R, Hofmann F. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMPdependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J Neurosci* 1999;19:48-55.

- 134 Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol* 2001;3:193-197.
- 135 Trabace L., Kendrick K. M. (2000). Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation. *J Neurochem* 75: 1664-1674.
- 136 Kovács R, Schuchmann S, Gabriel S, Kann O, Kardos J, Heinemann U. Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol* 2002;88:2909-2918.
- 137 Tjong YW, Jian K, Li M, Chen M, Gao TM, Fung ML. Elevated endogenous nitric oxide increases Ca^{2+} flux via L-type Ca^{2+} channels by S-nitrosylation in rat hippocampal neurons during severe hypoxia and in vitro ischemia. *Free Radic Biol Med* 2007;42:52-63.
- 138 Huang Y, Man HY, Sekine-Aizawa Y, Han Y, Juluri K, Luo H, Cheah J, Lowenstein C, Huganir RL, Snyder SH. S-nitrosylation of N-ethylmaleimide sensitive factor mediates surface expression of AMPA receptors. *Neuro* 2005;46:533-540.
- 139 Hammarström AK, Gage PW. Nitric oxide increases persistent sodium current in rat hippocampal neurons. *J Physiol* 1999;520:451-461.
- 140 Zhang L, Deng T, Sun Y, Liu K, Yang Y, Zheng X. Role for Nitric Oxide in Permeability of Hippocampal Neuronal Hemichannels During Oxygen Glucose Deprivation. *J Neurosci Res* 2008;86:2281-2291.
- 141 Thompson RJ, Jackson MF, Olah ME, Rungta RL, Hines DJ, Beazely MA, MacDonald JF, MacVicar BA. Activation of Pannexin-1 Hemichannels Augments Aberrant Bursting in the Hippocampus. *Science* 2009;322:1555-1559.

142 Kunz WS, Kudin AP, Vielhaber S, Blümcke I, Zusratter W, Schramm J, Beck H, Elger CE. Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2000;48:766-773.

143 Kudin AP, Zsurka G, Elger CE, Kunz WS. Mitochondrial involvement in temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 2009;218:326-332.

144 Yasuda H, Fujii M, Fujisawa H, Ito H, Suzuki M. Changes in nitric oxide synthesis and epileptic activity in the contralateral hippocampus of rats following intrahippocampal kainate injection. *Epilepsia* 2001;42:13-20.

145 Rajasekaran K, Jayakumar R, Venkatachalam K. Increased neuronal nitric oxide synthase (nNOS) activity triggers picrotoxin-induced seizures in rats and evidence for participation of nNOS mechanism in the action of antiepileptic drugs. *Brain Res* 2003;979:85-97.

146 Akula KK, Dhir A, Kulkarni SK. Nitric oxide signaling pathway in the anti-convulsant effect of adenosine against pentylenetetrazol-induced seizure threshold in mice. *Eur J Pharmacol* 2008;587:129-134.

147 Hopper RA, Garthwaite J. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 2006;26:11513-11521.

148 Stanton PK, Winterer J, Zhang XL, Müller W. Imaging LTP of presynaptic release of FM1-43 from the rapidly recycling vesicle pool of Schaffer collateral-CA1 synapses in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 2005;22:2451-2461.

149 Wendling F, Hernandez A, Bellanger JJ, Chauvel P, Bartolomei F. Interictal to ictal transition in human temporal lobe epilepsy: insights from a computational model of intracerebral EEG. *J Clin Neurophysiol* 2005;22:343-356.

150 Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Lipton SA, Ellisman M, Perkins GA, Bossy-Wetzel E. Mitochondrial fission is an upstream and required event for bax foci formation in response to nitric oxide in cortical neurons. *Cell Death Differ* 2007;14:462-471.

151 Rintoul GL, Bennett VJ, Papaconstantinou NA, Reynolds IJ. Nitric oxide inhibits mitochondrial movement in forebrain neurons associated with disruption of mitochondrial membrane potential. *J Neurochem* 2006;97:800-806.

152 Kann O, Kovács R, Njunting M, Behrens CJ, Otahal J, Lehmann TN, Gabriel S, Heinemann U. Metabolic dysfunction during neuronal activation in the ex vivo hippocampus from chronic epileptic rats and humans. *Brain* 2005;128:2396-2407.

153 Kunz WS, Kudin AP, Vielhaber S, Blümcke I, Zusratter W, Schramm J, Beck H, Elger CE. Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2000;48:766-773.

Abkürzungsverzeichnis

7-NI	7-Nitroindazol
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
BH₄	Tetrahydrobiopterin
CA	Cornu ammonis
CaM	Calmodulin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DG	Gyrus dentatus (dentate gyrus)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EC	entorhinaler Cortex
EDRF	endothelial derived relaxing factor
EEG	Elektroencephalogramm
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinadeninmononukleotid
GABA	Gammaaminobuttersäure
ILEA	International League Against Epilepsy
[K⁺]_o	extrazelluläre Kaliumkonzentration
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin Methylester
L-NMMA	N-Monomethyl-L-Arginin
Mg²⁺	Magnesium
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase

eNOS	endothelale NOS
iNOS	induzierbare NOS
nNOS	neuronale NOS
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo-[4,3,-a]Quinoxalin-1-on
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PTIO	4,4,5,5-Tetramethylimidazol-1-Oxyl-3-Oxid
REM	rapid eye movement
sGC	lösliche (solulable) Guanylatcyklase
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penizillamin
Sub	Subiculum
TLE	Temporallappenepilepsie
ZNS	Zentralnervensystem

Lebenslauf

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

Publikation

Richard Kovács, Alexander Rabanus, Jakub Otáhal, Andreas Patzak, Julianna Kardos, Klaus Albus, Uwe Heinemann, Oliver Kann (2009).

Endogenous Nitric Oxide is a Key Promoting Factor for Initiation of Seizure-Like Events in Hippocampal and Entorhinal Cortex Slices.

The Journal of Neuroscience 29: 8565-8577.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alexander Leonard Rabanus, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zum Einfluss von Stickstoffmonoxid auf epileptiforme Aktivität im Niedrig-Magnesium-Modell am akuten Hirnschnitt der Maus“ 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/der Betreuer/in, 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

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Alexander Leonard Rabanus hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Richard Kovács, Alexander Rabanus, Jakub Otáhal, Andreas Patzak, Julianna Kardos, Klaus Albus, Uwe Heinemann, Oliver Kann.

Endogenous Nitric Oxide is a Key Promoting Factor for Initiation of Seizure-Like Events in Hippocampal and Entorhinal Cortex Slices.

The Journal of Neuroscience 29: 8565-8577. 2009

Beitrag im Einzelnen:

Konzeption, Präparation der akuten Mäusehirnschnitte, elektrophysiologische Messungen an Akutschnitten von Wildtyp- und KnockOut-Tieren mit pharmakologischen Untersuchungen, Datenauswertung.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Personen, die mich bei der Durchführung meiner Promotion unterstützt haben, vor allem natürlich bei meiner Familie.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Richard Kovács, Professor Dr. Oliver Kann, sowie Professor Dr. Uwe Heinemann für die hervorragende Betreuung.

Vielen Dank.