

1. Einleitung.

Die Epilepsie wird als die am häufigsten auftretende chronische Erkrankung des zentralen Nervensystems beschrieben. Etwa jeder zwanzigste Mensch weltweit erleidet statistisch gesehen mindestens einmal in seinem Leben einen epileptischen Anfall. An einer chronischen epileptischen Erkrankung, mit sich wiederholenden Anfallsereignissen, leiden ca. ein Prozent der Weltbevölkerung (McNamara, 1999; <http://www.who.int/mediacentre/en>). Die Diagnose Epilepsie ist weder geschlechts-, alters-, oder rassenabhängig, noch mit der kulturellen Herkunft oder sonstigen Charakteristika der Patienten verknüpft – für eine kleine Gruppe von Patienten wurde eine familiäre Prädisposition beschrieben (Gu et al., 2002; Depondt et al., 2002). Schilderungen der epileptischen Symptomatik reichen bis ins Altertum zurück und die Betroffenen wurden lange Zeit stigmatisiert. Bis heute gibt es jedoch wenig Hinweise auf eine Beeinträchtigung der geistigen Leistungsfähigkeit. Lediglich bei sehr schwerwiegender Erkrankung mit hoher Anfallshäufigkeit und ausgeprägtem Nervenzellsterben kann eine Verminderung im Memorieren verbaler Inhalte und semantischer Zusammenhänge auftreten (Rausch et al., 1993). Als Auslöser eines epileptischen Anfalls wurden unter anderem, Gehirntumore, Schlaganfall, Hirnblutungen, Fieberkrämpfe, Stromschlag, Stroboskop-Lichteffekte, Drogenkonsum, Schlafmangel oder Hyperventilation beschrieben. Anfälle können mit unterschiedlichem Ausmaß an Bewusstseinstörung einhergehen, mit und ohne Krämpfe verlaufen oder sich über einige Sekunden bis hin zu mehreren Minuten erstrecken (Gastaut, 1970; Stefan, 1998).

Entsprechend der Vielschichtigkeit von Anfallsauslösern und Symptomen existiert für die Epilepsie eine komplexe Klassifikation. Je nach dem Ausmaß der beteiligten Hirnstrukturen unterscheidet man fokale / partiale Anfälle von generalisierten Anfällen. Je nach Ursache unterteilt man in symptomatische, idiopathische und kryptogene Epilepsie. Symptomatisch, wenn die Epilepsie einer bestimmten Ursache zugeordnet wird, idiopathisch, wenn ein genetischer Hintergrund vermutet wird, oder kryptogen, wenn die Ursache unbekannt ist. Je nach Heilungsaussichten spricht man von benigner oder maligner Epilepsie und unterteilt nach dem Zeitpunkt des Ausbruchs der Krankheit in frühkindliche und adoleszente Epilepsie (Gastaut, 1970). Die beschriebene Vielschichtigkeit von Anfallsauslösern und Symptomen führte dazu, dass einige Formen der Epilepsie lange Zeit gar nicht als epileptische Erkrankung betrachtet wurden (Stefan, 1998). Tatsächlich zeigt eine „Absence“-Epilepsie auf den ersten Blick wenige äußerliche Gemeinsamkeiten mit einem „grand-mal“-Anfall (Duus, 1995). Erst durch die Entwicklung der EEG-Technik, in den zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts,

wurde die Gemeinsamkeit aller epileptischen Anfallsereignisse offensichtlich. Durch die Ableitung von „Gehirnströmen“ (Potentialen) konnte den pathologischen Symptomen eine temporäre Hypersynchronisation von Nervenzellaktivität zugeordnet werden. Bei einer EEG-Ableitung während epileptischer Nervenzellaktivität führt die gleichzeitige Aktivität vieler Nervenzellen (die Hypersynchronisation) zu einem typischen, durch Stromspitzen (Spikes) gekennzeichneten Aktivitäts-Muster. Die von der Synchronisation der neuronalen Aktivität betroffenen Gehirnregionen, beziehungsweise deren Funktionen entscheiden letztlich darüber, von welcher Symptomatik ein epileptischer Anfall begleitet wird.

Die EEG-Methodik erlaubt es allerdings nicht, Aussagen über die zellulären Mechanismen der Epilepsie zu treffen. Eine weiterführende Alternative zu EEG-Ableitungen an Epilepsiepatienten stellen Tiermodelle dar, in denen die, allen epileptischen Anfällen innewohnende Hypersynchronisation des Nervengewebes nachgestellt und elektrophysiologisch detaillierter (auch invasiver) untersucht werden kann. Hierbei kann Epilepsie *in vivo* pharmakologisch oder elektrisch induziert werden, um anschließend einzelne Zellen oder Zellgruppen *in vitro* elektrophysiologisch untersuchen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde das Pilocarpin-Modell für Temporallappenepilepsie (TLE) genutzt, um insbesondere pathologische Veränderungen in der Morphologie und Elektrophysiologie an Neuronen aus der CA1-Struktur des Hippocampus zu studieren.

1.1. Der Hippocampus.

Als „grand lobe limbique“ beschrieb Broca 1878 einen Gürtel (Limbus) von Rindenfeldern, die an der medialen Hemisphärenwand zwei parallel aneinander liegende Ringsysteme bilden. Die Architektur dieses limbischen Systems unterscheidet sich vom Isocortex insbesondere im Zellschicht-Aufbau. Der Iso- oder Neocortex ist durchgehend sechsschichtig, den Archikortex beschrieb Broca als vierschichtig. Basierend auf dieser Erkenntnis definierte Broca das limbische Ringsystem als Allocortex und als Übergang zwischen dem evolutionsgeschichtlich älteren Hirnstamm und dem Neocortex (Broca, 1878). Heute werden dem limbischen System die Hirnstrukturen Hippocampus (Abb. 1a), Amygdala, entorhinaler-, perirhinaler- und piriformer Cortex, Gyrus cinguli und die Mamillarkörper zugeordnet (MacLean, 1952). Die Komplexität der Verbindungen zwischen diesen Strukturen veranlasste Papez einen Erregungskreis, den „Papez-circuit“ zu postulieren, und darin ein anatomisches Substrat für Ausdrucksmechanismen und Affektgestaltung, mithin einen Mechanismus der Emotionen beim Menschen anzunehmen (Papez, 1937). Der ursprüngliche „Papez-circuit“ wurde mittlerweile jedoch mehrfach ergänzt und erweitert (MacLean, 1952; Schwartzkroin et al.,

1997). Wie so oft in der Hirnforschung, waren es Patienten mit einer Schädigung des limbischen Systems, die eine Korrelation von Struktur und Funktion ermöglichten. Man nimmt heute an, dass dem limbischen System eine Teilhabe an Funktionen wie Gedächtnisbildung, Orientierung, Motivation, Affektverhalten oder vegetativer Modulation zugeschrieben werden kann (Duus, 1995).

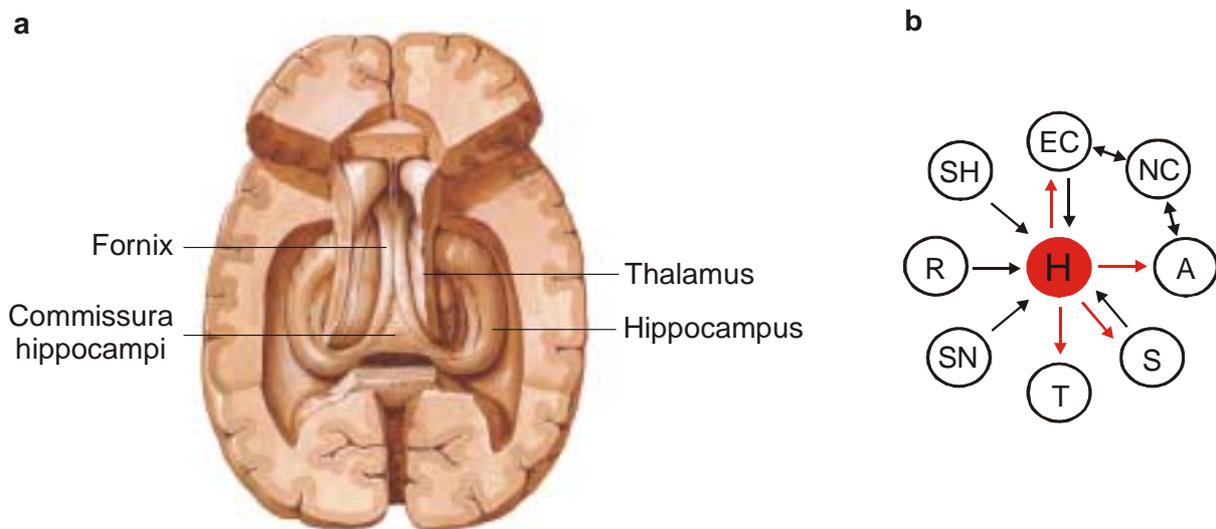


Abb. 1. Lage und Konnektivität des Hippocampus.

a) Der Hippocampus liegt paarig in den Temporallappen und ist ein Teil des limbischen Ringsystems (nach Netter, F., 1986; © Novartis). b) Efferente (schwarz) und afferente (rot) Verbindungen des Hippocampus. Direkte Verbindungen existieren zum Hirnstamm und anderen Strukturen des limbischen Systems. Mit dem Neocortex ist der Hippocampus indirekt über die Amygdala und den entorhinalen Cortex verbunden. **A:** Amygdala; **EC:** entorhinaler Cortex; **H:** Hippocampus; **NC:** Neocortex; **R:** Raphe-Kerne; **S:** Septum; **SH:** Stammhirn; **SN:** Substantia nigra; **T:** Thalamus.

Der Hippocampus, als Teil des limbischen Systems, wird wiederum in vier Regionen unterteilt, Subiculum, Cornu ammonis regio superior (CA1), Cornu ammonis regio inferior (CA3) und den Gyrus dentatus (siehe Abb. 2a). Diese vier Strukturen sind miteinander und mit dem entorhinalen Cortex trisynaptisch verbunden (Andersen et al., 1971), der entorhinale Cortex über den Traktus perforans mit dem Gyrus dentatus, der Gyrus dentatus über die Moosfasern mit CA3, und CA3 über die Schaffer-Kollateralen mit CA1 (Abb. 2b). Darüber hinaus besitzt der Hippocampus Efferenzen zum Stammhirn, den Raphe Kernen und Teilen des limbischen Systems. Mit dem Neocortex ist der Hippocampus indirekt verbunden, z.B. über den entorhinalen Cortex oder über die Amygdala (Abb. 1b).

Bei der Hälfte aller epileptischen Anfälle Erwachsener ist der Hippocampus involviert und stellt somit die Hirnstruktur mit der geringsten Anfallsschwelle im gesamten Gehirn dar (Rutecki et al., 1987). Durch die Lokalisation des Hippocampus im Temporallappen, spricht man bei Beteiligung des Hippocampus auch von Temporallappenepilepsie (TLE). Innerhalb

des Hippocampus repräsentiert die CA1-Struktur eine Relaisstation zu den extrahippocampalen Gehirnstrukturen (Scotti et al., 1997). Im Hinblick auf die Ausbreitung der epilepsietypischen Hypersynchronisation innerhalb des Temporallappens besitzt die CA1-Region somit eine besondere Bedeutung.

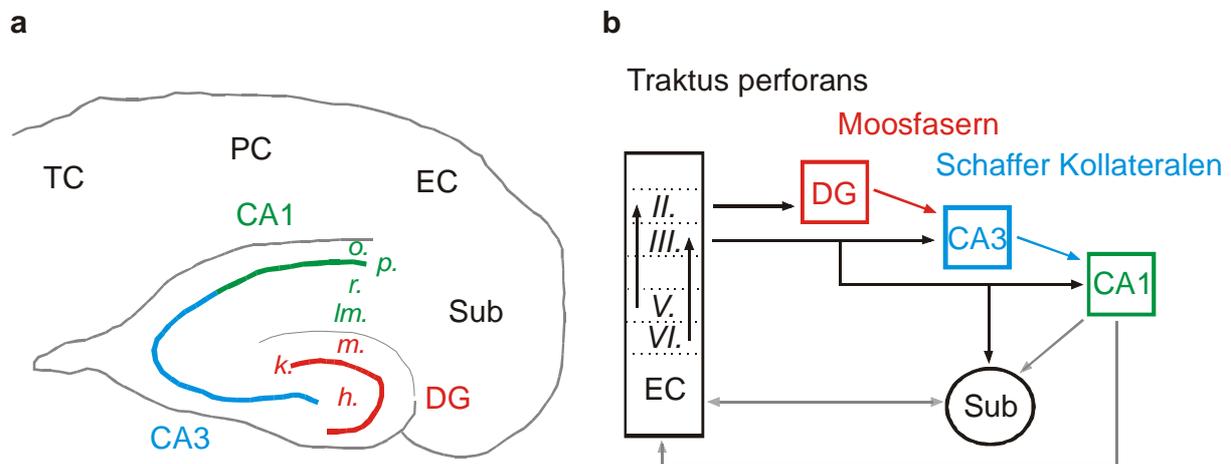


Abb. 2. Laminarer Aufbau des Hippocampus und trisynaptischer Schaltkreis.

Schematische Darstellung des Hippocampus. a), Strukturelle Organisation mit Cornu ammonis regio superior (CA1 in grün), der Cornu ammonis regio inferior (CA3 in blau), dem Gyrus dentatus (DG in rot) und dem Subiculum (Sub); b) trisynaptischer hippocampaler Schaltkreis. Signale des entorhinalen Cortex erreichen über den Traktus perforans die Mossfasern und über die Schaffer-Kollaterale das Subiculum. Das Subiculum besitzt seinerseits Afferenzen und Efferenzen zum entorhinalen Cortex. **EC:** entorhinaler Cortex; **h.:** Hilus; **k.:** Körnerzellschicht; **lm.:** Stratum lacunosum moleculare; **m.:** Stratum moleculare; **o.:** Stratum oriens; **p.:** Stratum pyramidale; **PC:** perirhinaler Cortex; **r.:** Stratum radiatum; **TC:** temporaler Cortex (nach Amaral, 1993)

1.2. Das Pilocarpin-Modell.

Bei der TLE handelt es sich um eine primär fokale Epilepsieform. Anfälle sind typischerweise von emotionslosem Starren und automatisierten Kaubewegungen begleitet, ca. 60 % der TLE Patienten erleiden trotz pharmakologischer Behandlung Rückfälle (Shumate et al, 1998; Heineman, 2004; Moromoto et al., 2004). Die operative Resektion des Hippocampus führt in 80% der Fälle zu einer völligen Anfallsfreiheit für mindestens ein Jahr (Mc Lachlan et al, 1997). In den meisten Fällen wird der Krankheitsverlauf von einem massiven Zellsterben, Zell-Dispersion und der Sklerotisierung des betroffenen Gewebes begleitet. Besonders stark ist das Zellsterben in den Regionen CA1 und CA3 des Hippocampus ausgeprägt, sowie im Hilus des Gyrus dentatus und den mittleren Schichten des entorhinalen Cortex (Sutula et al., 2003). Im humanen pathologischen Gewebe führen Zelltod und Sklerose zu einer ausgeprägten Reorganisation des neuronalen Netzwerks. Es entstehen anatomisch aberante Konnektivitäten zwischen den Neuronen und es kommt zu einer überdurchschnittlichen Neosynaptogenese (Sutula et al., 1989; Mikkonen et al., 1998; Houser et al., 1996; Blümcke et al., 1999; Coulter, 1999). Diese typischen pathologischen Veränderungen werden durch das

Pilocarpin-Modell rekapituliert (Mello et al., 1993; Mello et al., 1996; Hamani et al., 1997; Arida et al., 1999; Covolan et al., 2000a). Das Pilocarpin Modell ist ein Status epilepticus Modell. Durch die Injektion von Pilocarpin werden epileptische Krampfanfälle ausgelöst, die sich in der Folge zu einem einzigen, andauernden Anfallsereignis ausweiten, beschrieben als Status epilepticus. Nach 90-120 Minuten wird der Status epilepticus wieder pharmakologisch unterbrochen. Die Versuchstiere durchlaufen eine anfallsfreie Latenzphase von 3-4 Wochen, bis dann erneut Anfallsereignisse auftreten und die chronische Phase der Epilepsie beginnt.

Der Wirkstoff Pilocarpin ist ein Alkaloid der Pflanze *Pilocarpus pennatifolius* welche zu den Rautengewächsen zählt und wirkt als Agonist auf muskarinische M₁- und M₂-Rezeptoren (Hoss et al., 1990). Die Bindung an M₁- und M₂-Rezeptoren erhöht die Ca²⁺- und K⁺-Leitfähigkeit in der Zellmembran und verstärkt das Auftreten von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP) in den entsprechenden Neuronen (Dichter et al., 1987; Segal et al., 1988). Als Resultat der Aktivierung von M₁- und M₂-Rezeptoren wurde eine erhöhte Erregbarkeit des Nervengewebes festgestellt (Cruickshank et al., 1994). Die durch Pilocarpin ausgelösten Anfallsereignisse können durch Phenobarbital, Diazepam, Trimethadion und Valproat wieder gestoppt werden (Turski et al., 1989). Elektronenmikroskopisch betrachtet führen die durch Pilocarpin induzierten Anfälle zum massiven Anschwellen von Zellsoma und Dendriten. Mit jedem Anfall steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Neurone durch das Anschwellen ihrer Kompartimente irreversibel geschädigt werden und absterben. (Clifford et al., 1987). Die Analyse der Protein-Expression hat weder einen qualitativen noch quantitativen Unterschied zwischen gesundem Gewebe und mit Pilocarpin behandelten Gewebe aus anfallsfreiem Versuchstieren zutage gefördert (Walton et al., 1990; Cavalheiro et al., 1994). Das hat zu der These geführt, dass auch unabhängig von Pilocarpin, ein epileptischer Anfall einen weiteren Anfall wahrscheinlicher werden lässt, egal wodurch der initiale Anfall verursacht wurde. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde bereits bei frühkindlichen, durch Fieber verursachten Anfällen und dem späteren Ausbrechen einer chronischen Epilepsieerkrankung aufgezeigt (Taylor et al., 1971; Sagar et al., 1987). Die Wirkung von Pilocarpin beruht also vermutlich in erster Linie darauf, initiale epileptische Anfälle herbeizuführen. Demnach würden erst die intrinsischen, nachgeschalteten Prozesse im Gewebe zur Ausbildung des chronisch epileptischen Krankheitsverlaufs führen (Mello et al., 1993; Arida et al., 1999). Untersuchungen welche am Pilocarpin-Modell durchgeführt werden, konzentrieren sich also in erster Linie auf die Konditionen, die zu einer Chronifizierung der Epilepsie führen und weniger auf die Ursachen initialer, epileptischer Anfälle.

1.3. GABAerge Inhibition.

Spricht man von Hypersynchronisation der Nervenzellen als physiologisches Korrelat der Epilepsie, impliziert dieser Gedanke ein lokales, zumindest zeitlich befristetes Überwiegen der Exzitation über die Inhibition (Zur näheren Erläuterung dieses Konzepts siehe 4.2.) Nach dieser Überlegung ergeben sich zwei experimentelle Ansätze, entweder nach einer pathologisch erhöhten Exzitation oder nach einer pathologisch verminderten Inhibition zu suchen. Auf Seiten der Inhibition fällt dem Transmitter GABA (γ -Aminobuttersäure) eine besondere Bedeutung zu, da GABA als der dominierende inhibitorische Transmitter im menschlichen Gehirn gilt.

Die γ -Aminobuttersäure wurde zuerst 1910 von Ackermann in Bakterien nachgewiesen (Ackermann, 1910). 1949 beschrieben Steward und Kollegen in einem Artikel der Fachzeitschrift Science das Vorkommen von GABA in Pflanzen (Stewart et al., 1949). Drei Jahre zuvor wurde bereits die Glutamat-Decarboxylase (GAD) entdeckt, die die Synthese von GABA aus Glutamat katalysiert (Gale, 1946). In drei unabhängig voneinander entstandenen Veröffentlichungen wurde 1950 das Vorkommen von GABA und GAD im Gehirn beschrieben (Roberts et al., 1950; Udendriend, 1950; Awapara et al, 1950). Nachdem Eccles, Hodgkin und Huxley die durch den Nobelpreis für Medizin gekrönte grundlegende Entdeckung der synaptischen Transmission gelungen war, stellten Killam und Kollegen 1957 als erste, einen Zusammenhang zwischen GABA und der synaptischen Transmission fest (Killam et al, 1957a; Killam et al, 1957b). Sie hatten entdeckt, dass Hydrazide, die unter anderem die GABA-Synthese inhibieren auf das Gehirn einen proconvulsiven Effekt ausüben. Im selben Jahr erkannten Bazemore und Kollegen, dass es GABA war, welches einen inhibitorischen Effekt auf den Streckrezeptor des Flusskrebsses ausübte (Bazemore, 1957). Den Beweis für die inhibitorische Wirkung von GABA lieferten elektrophysiologische Messungen (Curtis et al., 1959; Krnjevic et al., 1966). Nachdem geklärt war, dass GABA ein inhibitorischer Transmitter ist, stellte sich die Frage, wie werden Transmitter wie GABA wieder aus dem synaptischen Spalt entfernt, bzw. wie wird die Transmitterwirkung beendet? Henn und Kollegen wiesen 1971 nach, dass Gliazellen in der Lage sind ausgeschütteten Transmitter wieder aufzunehmen und so aus dem Extrazellulärraum zu entfernen (Henn et al., 1971). Durch radioaktiv markiertes ^3H -GABA wurde in der Folge der Wirkungszyklus von GABA intra- und extrazellulär verfolgt und Transportmechanismen zwischen beiden Kompartimenten gefunden (Iversen et al, 1972). Die Idee, dass die GABAerge Inhibition bei Epilepsie eine wichtige Rolle spielen könnte, wurde bereits 1969 durch pharmakologische Experimente mit GABA-Rezeptor Antagonisten wie Penicillin, Picrotoxin oder Bicucullin

aufgebracht (Ajmone-Marsan, 1969). Die Blockade der GABA-Rezeptoren führte zu epilepsietypischen Anfallsereignissen. In der Folge bestand ein therapeutischer Ansatz darin, die GABAerge Inhibition im Gehirn moderat zu erhöhen, um eine erhöhte generelle Anfallsschwelle aufzubauen. Der einfachste Weg die GABAerge Transmission zu steigern, bestand in der Entwicklung von GABA-Analoga (Krogsgaard-Larsen, 1983). Vielen dieser Analoga wurden lipophile Seitenketten angehängt, um eine Passage der Blut-Hirn-Schranke zu erreichen. Es zeigte sich jedoch schnell, dass sich die GABA-Analoga, mit den teilweise sehr langen lipophilen Seitenketten, weniger als Ersatz für GABA eigneten, denn als Effektoren im GABA-Metabolismus oder als Inhibitoren der GABA-Transporter (Yunger et al., 1984; Ali et al., 1985).

Bei der Entwicklung von Antiepileptika und der Erforschung der Epilepsie stehen einer strikten methodischen Trennung von Inhibition und Exzitation nicht zuletzt die verknüpften Pfade der Biosynthese von Glutamat und GABA im Wege. Die Glutamatdecarboxylase decarboxyliert Glutamat direkt zu GABA. Die GABA-Transaminase baut GABA zu Bernsteinsäurealdehyd ab. Die Übertragung der Aminofunktion durch eine Transaminase auf Ketoglutarat führt erneut zur Bereitstellung von Glutamat. Eine Erhöhung der GABA-Konzentration lässt sich also auch indirekt durch eine Aktivierung der Glutamatdecarboxylase, beziehungsweise eine Inhibierung der GABA-Transaminase erreichen. Das Antiepileptikum Vigabatrin blockiert beispielsweise das Enzym GABA-Transaminase irreversibel und stoppt auf diese Weise vorübergehend den GABA-Abbau (Saber et al., 1992). Tiagabin ((R)-N-[4,4-bis(3-methyl-2-thienyl)but-3-en-1-yl]nipecotische Säure), ein in der vorliegenden Arbeit genutztes Antiepileptikum, ist ein spezifischer Antagonist des GABA-Transporter-Proteins I (GAT-1). Die Blockade von GAT-1 durch Tiagabin führt zu einer verlängerten Wirkung von GABA im synaptischen Spalt (Braestrup et al., 1990; Suzdak et al., 1995; Kalviainen et al., 2002; Schousboe et al., 2004).

1.4. Zielsetzung.

Eine generelle Störung der Balance zwischen Inhibition und Exzitation wird bis heute ursächlich für die Entwicklung einer chronischen epileptischen Erkrankung diskutiert. So existieren Hinweise darauf, dass die Kontrolle der extrazellulären GABA-Konzentration im Zusammenhang mit einer pathologischen Veränderung des GABA-Transporters I, im epileptischen Gewebe gestört sein könnte (Akbar et al., 1998; Andre et al., 2001; Janjua et al., 1991; Jefferys et al., 1991; During et al., 1995; Patrylo et al., 2001). In der hier vorgelegten Arbeit sollte deshalb festgestellt werden, ob die Kontrolle der extrazellulären GABA-

Konzentration im Zusammenhang mit der Funktion von GAT-1 im epileptischen Gewebe noch effizient ist oder nicht.

Das Balancemodell wurde darüber hinaus an bestimmten Interneuron-Typen überprüft. Es handelte sich dabei um GABAerge, hippocampale CA1-Interneurone aus der Grenzschicht Stratum radiatum / Stratum lacunosum moleculare (hier kurz SRL-Interneurone genannt). Diese Interneurone sind im gesunden Gewebe nicht-rekurrent mit Pyramidenzellen verbunden (Lacaille et al, 1988a; Cobb et al, 1997; Bertrand et al., 2001). Veränderungen der Balance zwischen Inhibition und Exzitation könnten sich in diesen Zellen manifestieren, da auch die Schicht in der die Interneurone liegen nicht vom epilepsietypischen Zelltod betroffen zu sein scheint (Esclapez et al, 1997; Andre et al., 2001; van Vliet et al., 2004). An epileptischen Versuchstieren mit einem vergleichsweise langen Krankheitsverlauf wurde die inhibitorische und exzitatorische Innervation von SRL-Interneurone elektrophysiologisch untersucht und diesbezüglich mit SRL-Interneuronen aus gesundem Gewebe verglichen. Anschließend wurden diese Interneurone morphologisch charakterisiert. So sollte festgestellt werden, ob sich auf elektrophysiologischer und / oder morphologischer Ebene ein Unterschied in der Balance zwischen Inhibition und Exzitation im epileptischen Gewebe feststellen ließ.