

2. Material und Methoden.

Bei den verschiedenen, hier vorgestellten Untersuchungen basierte die experimentelle Methodik immer auf einer Kombination von morphologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen. Methodische Abläufe, die sich zwischen den einzelnen Experimenten nicht unterscheiden, werden unter 2.1.-2.6. aufgeführt.

Um pathologische Veränderungen in der Morphologie der hippocampalen Struktur zu dokumentieren, die sich durch einen Pilocarpin-induzierten Status epilepticus manifestiert hatten, wurde bei allen Untersuchungen eine Nissl-Färbung durchgeführt (siehe 2.5.). Die Morphologie einzelner Neurone wurde mit Hilfe konfokaler Laser-Mikroskopie aufgeklärt (siehe 2.6.).

2.1. „Patch-clamp“-Technik.

Bei den elektrophysiologischen Untersuchungen wurden mit der so genannten „patch-clamp“-Technik (Hamill et al., 1981) bioelektrische Signale einzelner Neurone gemessen. Ein besonderes Charakteristikum bei der Messung dieser Signale in einzelnen Zellen oder in Zellkompartimenten ist, dass die zu messenden Ströme, relativ klein sind. Die Messgrößen bewegen sich für gewöhnlich im Bereich zwischen 10^{-8} und 10^{-12} Ampere. Während einer Messung wird nicht nur die erwünschte elektrische Messgröße aufgezeichnet, sondern auch unspezifische elektromagnetische Eigenschaften der Umgebung, man spricht in diesem Zusammenhang auch vom „Hintergrundrauschen“. Um nun sehr kleine und lokale biophysikalische Veränderungen an einer Zellmembran messen zu können, ist es notwendig das Rauschen zu minimieren, und das zu untersuchende Signal zu verstärken. Bei Ganzzelleableitungen wird durch vorsichtiges Anlegen eines Unterdrucks an eine hohlwandige Glaspipette (Ableitungselektrode), ein Membranflecken („patch“) der Zellmembran angesaugt und schließlich durchbrochen. Für die Qualität der Ableitung ist entscheidend, dass zwischen Membran und Pipette ein elektrisch hochohmiger Abdichtungs-Widerstand entsteht, der das Auftreten unspezifischer Leckströme minimiert. Zwischen der Ableitungselektrode und dem intrazellulären Milieu entsteht hingegen ein relativ niederohmiger Widerstand, der Zugangswiderstand. Hochohmiger Abdichtungs-Widerstand und niederohmiger Zugangswiderstand sorgen gemeinsam für ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis. Da die Ableitungselektrode hohl ist, kann durch ihr Lumen eine artifizielle Intrazellulär-Lösung bekannter Zusammensetzung in die Zelle eingebracht werden. Kennt man die Zusammensetzung der intra- und extrazellulären Lösung, kann man für jede Form geladener

Teilchen eine Vorhersage treffen, mit welcher elektrischen Kraft (Nernst-Gleichung) Ionen in die Zelle hinein, oder aus der Zelle heraus diffundieren, sollte die Membran, aktivitätsabhängig, einen solchen Durchfluss ermöglichen. Wenn man über die Ableitungselektrode eine bestimmte Spannung, das so genannte Haltepotential vorgibt, ist es möglich spannungsabhängige Diffusion von Ionen durch geöffnete Kanäle in der Zellmembran zu detektieren. Der Verstärker, mit dessen Hilfe man ein Haltepotential vorgibt, appliziert regelmäßig einen Korrekturstrom in die Zelle, um das vorgegebene Haltepotential aufrecht zu erhalten (Methode der Spannungsklemme). Gleichzeitig wird dieser Korrekturstrom verstärkt und als Messgröße erfasst (Abb. 3). So ist es möglich eine experimentelle Manipulation an einer Zelle vorzunehmen, und anschließend zu messen, wie die Zellmembran darauf elektrisch reagiert. Aber nicht nur durch das Haltepotential können Manipulationen an der elektrischen Leitfähigkeit der Zellmembran durchgeführt werden. Auch die Wirkung verschiedener Pharmaka, die die Funktion von Rezeptoren, Ionenkanälen oder Ionenporter beeinflussen, können untersucht werden.

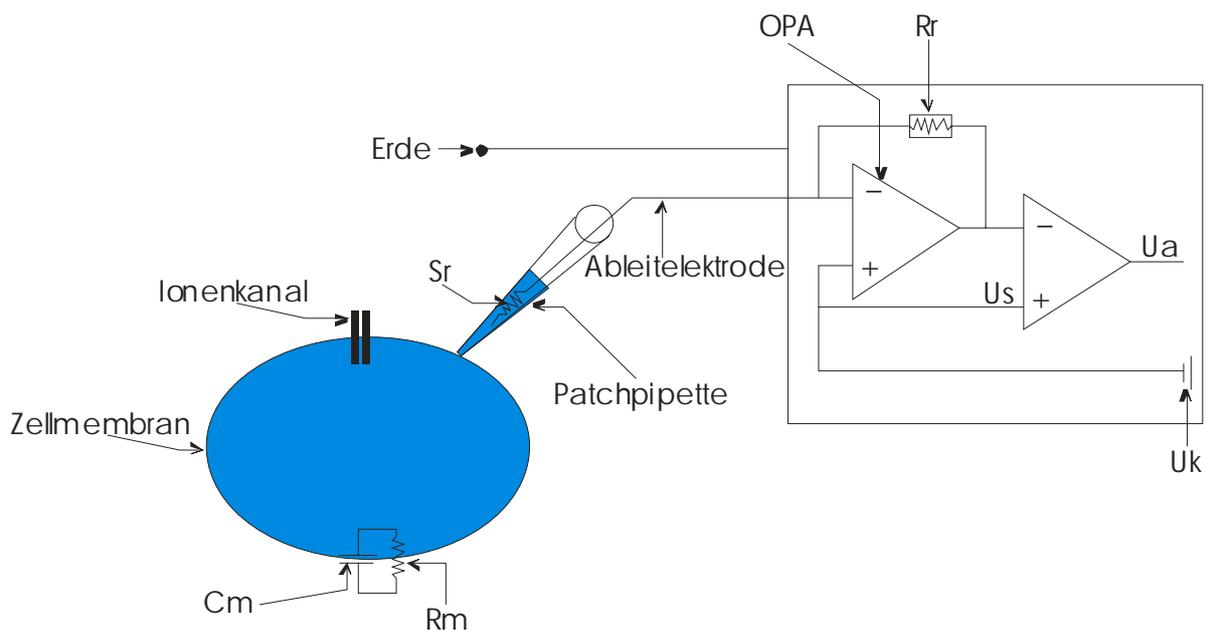


Abb. 3. Vereinfachtes Schema der Ganzzelleableitung in der „patch-clamp“-Technik.

Über die Ableitelektrode kann der Zelle eine Spannung vorgegeben werden. Kommt es aktivitätsabhängig zu einem Ladungsfluss durch Ionenkanäle weicht die Kommandospannung von der Ist-Spannung ab. Diese Spannungsveränderung wird durch den Verstärker wieder korrigiert. Über den Operationsverstärker und die Schaltung eines Rückkopplungswiderstandes wird ein Korrekturstrom induziert. Die elektrische Spannung fällt aber nicht nur über Ionenkanälen ab, sondern auch über den Serienwiderstand, den Membranwiderstand oder bei Umladungsvorgängen an der Membran selbst. **Cm:** Membrankapazität, **OPA:** Operationsverstärker, **Rm:** Membranwiderstand, **Rr:** Rückkopplungswiderstand, **Sr:** Serienwiderstand, **Ua:** Messgröße, **Uk:** Kommandospannung und **Us:** Sollspannung.

Um Fehler bei der Durchführung elektrischer Ableitungen zu vermeiden oder um diese Fehler wenigstens sehr klein zu halten, ist es notwendig den Korrekturstrom genau zu analysieren. Die elektrische Spannung fällt nicht nur über den Summenwiderstand aller geöffneten Kanäle ab, sondern über weitere intrinsische Serienwiderstände und durch Umladeprozesse an der Zellmembran. Das zeitliche Auflösungsvermögen der Ableitung wird durch den Takt der Korrekturstrom-Applikation vorgegeben.

2.2. Induktion des Status epilepticus.

Die Aufprägung des Status epilepticus wurde im Alter von 6 Wochen an den Tieren vorgenommen und erfolgte nach dem Protokoll von Mello (1993) und Arida (1999). Das Gewicht der Ratten betrug zu diesem Zeitpunkt zwischen 118 g und 166 g.

Eine halbe Stunde vor der Pilocarpin-Injektion wurde den Tieren Methylscopolamine (1mg / kg) verabreicht, um spätere, unerwünschte Pilocarpin-Nebenwirkungen zu minimieren. Das Pilocarpin wurde intraperitoneal in einer Dosis von 350 mg pro kg Körpergewicht injiziert. Zehn Minuten bis maximal eine halbe Stunde nach der Pilocarpin-Applikation zeigten die Ratten erste Krampfanfälle. 15 Minuten nach der Pilocarpin-Applikation wurde eine zweite Dosis Methylscopolamine (1 mg / kg), sowie Atropinsulfat (0,5 mg) verabreicht, um den starken Speichelfluss und die damit verbundene Erstickungsgefahr für die Tiere zu beseitigen. 80 Minuten nach dem Auftreten des ersten Krampfanfalls wurde der Status epilepticus durch die Injektion von Diazepam (10 mg / kg) beendet. Da die Ratten nach dieser Prozedur oftmals zu erschöpft waren, um in den folgenden Stunden ausreichend Nahrung und Wasser zu sich zu nehmen, wurde abschließend eine Depot-Injektion von 10 ml physiologischer Kochsalzlösung (inklusive 27,2 mM Lactat und 71 mM Hydrogencarbonat) subkutan verabreicht.

Die Ratten waren während der gesamten Induktionsphase des Status epilepticus unter Beaufsichtigung. Die Krampfanfälle konnten teilweise von lebensbedrohlicher Heftigkeit sein, weshalb es in ca. 50 % der Fälle nötig war, die Ratten zu beatmen und Herzmassage zu leisten. Die Mortalitätsrate betrug Jahreszeit abhängig bis zu 30 %.

In der Folge durchlebten die mit Pilocarpin behandelten Tiere eine anfallsfreie Zeit von ca. drei bis vier Wochen. Dann entwickelten die Tiere sich unregelmäßig wiederholende, spontane Krampfanfälle, welche als typisches Zeichen für den Eintritt in die chronische Phase der epileptischen Erkrankung gedeutet wurden (Mello et al, 1993). Die Ratten wurden tageweise videoüberwacht, um auftretende Anfallsereignisse zu protokollieren. Versuche wurden nur an solchen Ratten durchgeführt, deren Anfallshäufigkeit im Durchschnitt

mindestens einen Anfall pro Tag betrug und die während der Induktionsphase der Epilepsie Krampfanfälle zeigten.

Kontrolltiere und mit Pilocarpin behandelte Tiere wurden bis auf die Injektion von Pilocarpin gleich behandelt. Die Pilocarpin-Injektion wurde bei den Kontrolltieren durch eine Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung ersetzt.

2.3. Versuchstiere und Präparation.

Als Versuchstiere wurden erwachsene, männliche Wistar Ratten verwendet. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten – 12 Stunden Tag- und Nachtrhythmus – und hatten freien Zugang zu Wasser und Trockenfutter. Das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Präparation hing von der jeweiligen experimentellen Fragestellung ab (siehe 2.7. und 2.8.).

Zur Durchführung der Gehirn-Präparation wurden die Versuchstiere intraperitoneal mit Chloralhydrat (360mg / kg Körpergewicht) anästhesiert. Unter Narkose wurde der Brustraum geöffnet, das Zwerchfell durchtrennt und unmittelbar folgend eine Perfusionskanüle über die linke Herzkammer der Ratte in die Aorta vorgeschoben. Zur Druckentlastung wurde nahezu zeitgleich die große Leberhohlvene durchtrennt. Die Perfusion des Gehirns erfolgte mit 200 ml eiskalter, Carbogen gesättigter Saccharose-ACSF-Lösung (siehe unten).

Im Anschluß an die Perfusion wurden die Versuchstiere durch Dekapitation (unter fortwährender Narkose) getötet und das Gehirn aus der Kalotte entnommen. Die durchtrennten Gehirnhälften wurden auf eine Schnittkammer aufgeklebt und mit eiskalter Saccharose-ACSF-Lösung (nach Richerson et al, 1995) überschichtet. Mittels eines Vibratoms (Campden Instruments, UK) wurden serielle, horizontale, 300 µM starke Schnittpräparate angefertigt. Die so gewonnenen Gehirn-Schnitte beinhalteten den entorhinalen, perirhinalen und temporalen Cortex, sowie den Hippocampus. Jedes neu gewonnene Schnittpräparat wurde unmittelbar in eine Aufbewahrungskammer überführt. Die Aufbewahrungskammer wurde in Anlehnung an die Bauanleitung von Croning et al (1998) konstruiert und beinhaltete 600 ml, auf 35°C erwärmte Saccharose-ACSF-Lösung (360 mosmol). Hier lagerten die Schnitte auf einem Nylonnetz nahe der Lösungsoberfläche. Nach ca. einer halben Stunde wurde die hochmolare Saccharose-Lösung durch Carbogen gesättigte ACSF-Lösung substituiert. Die Substitution erfolgte durch eine Pumpe (Gilson Medical Instruments, USA), das Substitutionsvolumen betrug ca. vier Liter, die Dauer des Lösungsaustausch betrug ca. 1 – 1 ½ Stunden, dann war die Saccharose-Lösung zu 95 % durch die ACSF-Lösung ersetzt. Bis zur Messung erfolgte die Aufbewahrung der Schnittpräparate bei Raumtemperatur.

Saccharose-ACSF-Lösung:

NaCl (87 mM), NaHCO₃ (26 mM), KCl (2,5 mM), NaH₂PO₄ (1,25 mM), Glucose (25 mM), Saccharose (75 mM), MgCl₂ (7 mM), CaCl₂ (0,5 mM); Carbogengas mit 95 % O₂ und 5 % CO₂; pH 7,4; 360 mosmol).

ACSF-Lösung:

NaCl (129 mM), KCl (3 mM), MgSO₄ (1,8 mM), CaCl₂ (1,6 mM), Glucose (10 mM), NaH₂PO₄ (1,25 mM), NaHCO₃ (26 mM), pH 7,4; 300 mosmol)

2.4. Versuchsapparatur.

Um elektrophysiologische Ableitungen vornehmen zu können, wurden die akuten Gehirnschnittpräparate (Skrede et al., 1971) in eine Messkammer überführt (die Gewebeschnitte wurden vorher auf einen mit Polylysin beschichteten Objektträger aufgebracht). Das Volumen der Messkammer betrug ca. 1 ml. Diese Messkammer war ebenfalls mit Carbogen-gesättigter ACSF-Lösung gefüllt. Durch einen Zu- und Ablauf war die Messkammer mit einem ACSF-Lösungs-Reservoir verbunden, in welchem das Carbogen-Gas eingeleitet wurde. Die ACSF-Lösung befand sich mittels einer Pumpe in einem Kreislauf zwischen Messkammer und Reservoir. Bei einer minimalen Durchflussrate von 2 ml / min. wurde sichergestellt, dass sich die absolute Carbogen-Sättigung und somit der pH-Wert der ACSF-Lösung, während der Messdauer nicht veränderte. Die Messkammer war in einem vom Mikroskop unabhängigen Objektivtisch eingelassen, das Mikroskop ruhte auf einem zweidimensional, horizontal beweglichen Kreuztisch. Es wurde ein aufrechtes Mikroskop (Olympus Optical GmbH, Deutschland) verwendet, zur Übersicht diente ein 10x Objektiv, zur Betrachtung einzelner Neurone ein 100x Immersionsobjektiv. Durch Infrarot-Videomikroskopie (Hamamatsu Phototonics GmbH, Deutschland) wurden Objektbilder auf einem Monitor (Blaupunkt, Deutschland) übertragen. Die Schärfenauflösung wurde durch einen Polarisator und der Methode des differentiellen Interferenzkontrastes erhöht (Dodt, 1992). Alle elektrophysiologischen Messungen wurden nach dem Prinzip der „patch-clamp“-Technik (siehe 2.1.) durchgeführt.

Die Steuerung der Position der Ableitungselektrode wurde durch einen analogen oder digitalen Mikromanipulator (Luigs & Neumann, Deutschland) vorgenommen. Die Ableitungselektroden waren aus Borosilikat (Hilgenberg GmbH, Deutschland), 140 mm lang und besaßen einen Außendurchmesser von 2 mm und einen Innendurchmesser von 1mm. Um die jeweils gewünschte Spitzenform zu modulieren, wurde ein horizontales

Elektrodenziehgerät (Sutter Instruments, USA) verwendet. Die Elektroden wurden in drei Schritten gezogen, um einen Öffnungswiderstand von 3-5 Megaohm zu erreichen. Die Elektrodenspitzen wurden feuerpoliert (Micro-Forge MF 800, Narishige Comp., Japan). Die Ableitungselektroden waren je nach Fragestellung mit einer spezifischen Intrazellulärlösung gefüllt, teilweise erfolgte auch die Beimischung eines Intrazellulärfarbstoffs (detaillierte Angaben wurden bei der Erläuterung der jeweiligen Einzelexperimente gemacht). Als Referenzelektrode diente ein mit Silber / Silberchlorid legierter Draht, der in die Badlösung der Messkammer getaucht wurde. Referenz- wie Ableitungselektrode waren an einen EPC7-Verstärker (List Electronics, Deutschland) oder Axon-multiclamp-700A-Verstärker (Axon Instruments, USA) angeschlossen. Die zu messenden Ströme wurden durch einen internen Besselfilter des Verstärkers bei 3 kHz, bzw. 10 kHz gefiltert.

2.4.1. Datenverarbeitung.

Die Versuchssteuerung und Auswertung erfolgte per Computer, wobei zwischen Computer und Verstärker ein Analog-Digital-Wandler (Cambridge Electronic Design Ltd, UK) geschaltet war. Daten wurden mit einem Takt zwischen 50 und 100 μ S aufgezeichnet. Zur zeitnahen Versuchsüberwachung wurde ein Oszilloskop (HAMEG GmbH, Deutschland) verwendet. Versuchsprotokolle wurden mit einer speziellen Software erstellt (Tida, HEKA, Deutschland oder IGOR, Wavemetrics, USA) und gespeichert. Zur Auswertung wurden die Daten konvertiert und mit handelsüblicher oder selbst erstellter Software (siehe 2.2.3.2.) bearbeitet. Die Ergebnisse der Analyse wurden mit SPSS-, Excel- oder GPIS-Statistiksoftware (Microsoft, USA) analysiert. Testverfahren und Signifikanzaussagen wurden für die jeweiligen Ergebnisse im Ergebnisteil dieser Arbeit einzeln aufgeführt.

2.5. Nissl-Färbung

Um die typischen Merkmale der Pilocarpin Behandlung im Zusammenhang mit Epilepsie zu dokumentieren wurde an jeweils jedem fünften Hirnschnitt eines präparierten Gehirns (von dorsal nach ventral gezählt) eine Nissl-Färbung durchgeführt. Entsprechend wurde mit Hirnschnittpräparaten von Kontrolltieren verfahren.

Die Gehirnschnitte (300 μ m) wurden über Nacht in Paraformaldehyd (4 % in 0,1 M Phosphatpuffer (PB)) fixiert, anschließend 12 Stunden in Saccharose-Lösung (30 % in 0,1 M PB gelöst) aufbewahrt. Am Gefriermikrotom wurden 20 μ m Schnitte erstellt. Vor dem Aufziehen auf Gelatine-beschichtete Objektträger wurden die Schnitte in 0,1 M PB, und

danach in 0,05 M PB gewaschen. Die Schnitte trockneten über Nacht, dann wurde die Färbung durchgeführt.

Wasch- und Färbeschritte:

- Ethanol (99,6%)	3 min.
- Ethanol (96%)	3 min.
- Ethanol (90%)	3 min.
- Ethanol (70 %)	3 min.
- Ethanol (50%)	3 min.
- Ethanol (30 %)	3 min.
- A. Dest.	10 sec.
- Cresyl Violet Lösung	90 sec.
- A.dest.	10 sec.
- Ethanol (50%)+100µl Eisessig (100%)	1-3min.
- Ethanol (70%)	3 min.
- Ethanol (90%)	3 min.
- Ethanol (96%)	3 min.
- Ethanol (99,6%)	3 min.
- 2x Isopropanol (100%)	3 min.
- 2x Xylol (100%)	3 min.
- Überschichtung mit Depex	

Cresyl Violet Lösung:

- 4,5 g Cresyl Violet
- 900 ml A. dest.

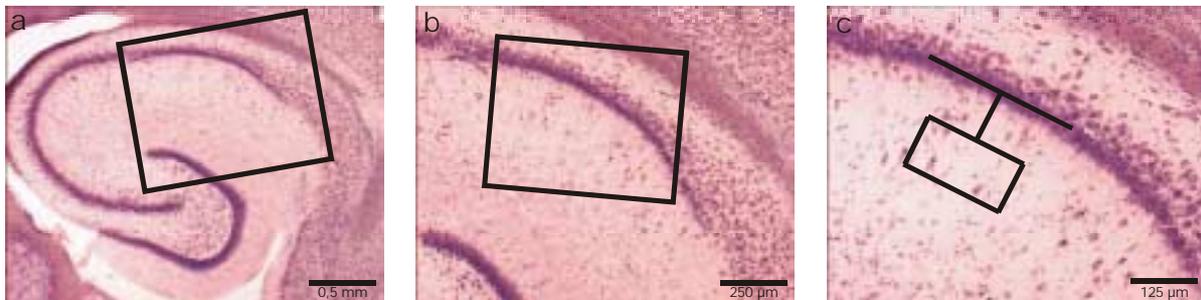


Abb. 4. Zellzählungsverfahren.

Um den typischen Zellverlust im mit Pilocarpin behandelten Gewebe zu untersuchen, wurde ein Zählfenster definierter Größe verwendet. Die Abbildungen a-c zeigen in unterschiedlicher Vergrößerung Teile des Hippocampus eines 20µm Schnittpräparats. In c ist ein Beispiel für die Auszählung von Zellen im Stratum radiatum in der CA1-Region des Hippocampus gegeben. Vier Zellen wurde hier innerhalb des Zählfensters identifiziert. Für jedes präparierte Gehirn wurden mehrere (2-5) Auszählungen dieser Art vorgenommen.

Der mit der Pilocarpin-Behandlung einhergehende Zellverlust wurde durch ein Mikroskopgestütztes Zellzählungsverfahren dokumentiert. Diese Auszählung erfolgte mittels eines Zählfeldes. Das Zählfeld umfasste eine Fläche von 100 µm x 200 µm. Gezählt wurden alle deutlich erkennbaren Zellen (putative Neurone und Gliazellen) die ganz oder teilweise innerhalb der Zählfläche aufzufinden waren (Abb. 4).

2.6. Dreidimensionale Rekonstruktion der elektrophysiologisch charakterisierten Neurone.*

Durch die Ableitungselektrode wurde jede elektrophysiologisch untersuchte Zelle mit Neurobiotin (0,5 M) gefüllt. Anschließend wurden die 300 µm Schnittpräparate in 4 % Paraformaldehyd und 0,1 % Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) über Nacht fixiert und dann in 2 % Paraformaldehyd gelagert. Die Schnittpräparate wurden über Nacht mit einem an Streptavidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff inkubiert (Alexa 488) und daraufhin zwischen zwei Objektträgern eingebettet. Die Visualisierung erfolgte an einem konfokalen Laser-Mikroskop (Leica SP2, Leica, Deutschland). Das Einlesen der Bilder mit den fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgte unter 10-facher oder 20-facher Vergrößerung und in axialer Richtung in Schritten von 1 µm - 2,5 µm. Detaillaufnahmen wurden unter 40-facher und 63-facher Vergrößerung aufgenommen und in axialen Richtung in Schritten von 0,5 µm - 1 µm. Für die Bildbearbeitung wurde die Software Adobe Photoshop 6.0 (Adobe, USA) verwendet und damit jede markierte Zelle dreidimensional rekonstruiert.

* Die dreidimensionale Rekonstruktion der mit Neurobiotin markierten Zellen wurde im Rahmen einer Kooperation von Dr. Werner Zuschratter (Leibnitz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg) durchgeführt.

2.7. Messung der Effektivität der GAT-1 vermittelten GABA-Transportfunktion.

Für die Experimente die zur Aufklärung des GABA-Recyclings im Hippocampus dienen, wurde an Pyramidenzellen der Pyramidenzellschicht in der CA1-Region und / oder an Körnerzellen des Gyrus dentatus Ganzzellableitungen (siehe 2.1.) durchgeführt. Auch hier diente das Pilocarpin-Model als Model für Temporallappenepilepsie. Kontrolltiere wurden bis auf die Pilocarpin-Injektion genauso behandelt wie die Tiere aus der pathologischen Gruppe (siehe 2.2.). Die Präparation (2.3.) der Gehirne erfolgte 8-11 Wochen nach dem durch Pilocarpin induzierten Status epilepticus.

2.7.1. Messung der tonischen GABAergen Hemmung.

Geprüft werden sollte, ob Zellen in epileptischen Gewebe noch dieselbe Effizienz zur Wiederaufnahme des Transmitters GABA besitzen, wie die Zellen in gesundem Gewebe. Die Pyramidenzellen dienen dabei als eine Art Monitor. In die Extrazellulärlösung wurde GABA appliziert und dann die Leitfähigkeit für Chloridionen elektrophysiologisch gemessen, um festzustellen, ob der Transmitter GABA, der die Leitfähigkeit von Chloridionen steuert, in

ähnlicher oder unterschiedlicher extrazellulärer Konzentration im Gewebe beider Testgruppen vorlag. Ein veränderter Chloridstrom in Pyramidenzellen wurde somit als Indiz für eine veränderte extrazelluläre GABA-Konzentration gewertet, was wiederum als Hinweis auf eine veränderte Effektivität der GABA-Transportfunktion gedeutet wurde.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde getestet, ob sich zwischen beiden Testgruppen eine Veränderung in der Effektivität des GAT-1 vermittelten GABA-Transportes feststellen ließ. Hierzu wurde GABA und der GAT-1-GABA-Transporter-Antagonist Tiagabin in die Extrazellulärlösung eingewaschen. Entscheidend war hierbei, ob Tiagabin einen in den beiden Testgruppen unterschiedlichen Beitrag zur Wiederaufnahme von GABA leisten würde oder nicht.

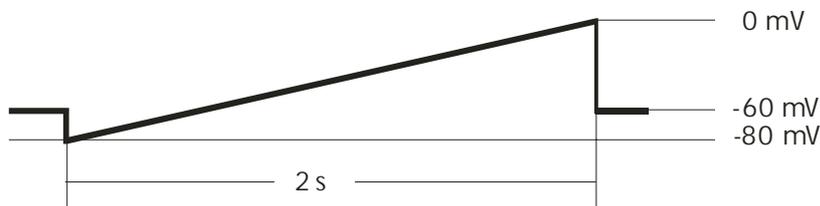


Abb. 5. Spannungsrampe

Die Steuerungssoftware (Tida) wurde so programmiert, dass der Verstärker die Haltespannung der Zelle innerhalb von zwei Sekunden von -80 mV auf 0 mV gleichförmig und kontinuierlich veränderte. Innerhalb dieser Zeitspanne wurden Chloridströme aufgezeichnet. Vor und nach der Messung wurde die Haltespannung auf -60 mV geklemmt.

Die Zellen wurden initial bei -60 mV in der Spannungs-klemme gehalten. 10-15 Minuten nach der Etablierung der Ganzzellableitung wurde computergestützt eine rampenförmig ansteigende Spannungsänderung vorgenommen. Beginnend mit einer Hyperpolarisierung der Zellmembran auf -80 mV wurde die Spannung innerhalb von zwei Sekunden gleichförmig auf 0 mV angehoben. Diese so genannte Spannungsrampe diente der Messung von Chloridströmen bei unterschiedlichen Haltepotentialen und der Ermittlung des Chloridstrom-Umkehrpotentials (Abb. 5).

Um den gemessenen Strom überhaupt identifizieren zu können, war es notwendig die Leitfähigkeit der Zellmembran für andere geladene Teilchen zu minimieren. Eine Kombination aus Antagonisten gegen spannungsabhängige Ionenkanäle sowie von transmitterabhängigen Rezeptoren sollte eine bevorzugte Messung von Chloridströmen ermöglichen. Hierzu wurden durch extrazelluläre Applikation Natriumströme mit 0,5 μM TTX (Tetrodotoxin) und Kalziumströme mit 200 μM Cadmium blockiert. Kaliumströme wurden intrazellulär durch 6 mM Cäsium in der Intrazellulärlösung blockiert. Darüber hinaus wurde die Wirksamkeit anderer Transmitter eingeschränkt, allen voran, die des Glutamat

durch 10 μM NBQX und 30 μM d-APV. Schließlich wurde der metabotrope GABA_B-Rezeptor mit 2 μM CGP 55845A blockiert.

Als Intrazellulärlösung wurde eine Cäsium-Gluconat basierte Lösung verwendet: Cs-Gluconat (135 mM), CsCl (6 mM), MgCl₂ (2 mM) und HEPES (10 mM). Der pH-Wert wurde mit CsOH auf 7,2 justiert, die Osmolarität der Lösung lag bei 290 mOsmol.

Um eine schnelle und vergleichbare Durchdringung des Gewebes mit den extrazellulär eingewaschenen Pharmaka zu erreichen, wurden ausschließlich solche Zellen zur elektrophysiologischen Messung ausgesucht, die maximal ~ 2 Zelldurchmesser von der Gewebeoberfläche entfernt lagen. Bei jedem Versuch wurde eine zehnminütige Diffusionsdauer für die Pharmaka berücksichtigt.

Unter diesen pharmakologischen Bedingungen wurde für jede Zelle die Antwort auf die oben beschriebene Spannungsrampe aufgezeichnet, und zwar nacheinander:

- a) drei Kontrollmessungen,
- b) drei Messungen mit 10 μM GABA,
- c) sowie drei Messungen mit 10 μM GABA + 20 μM Tiagabin.

Die drei Messungen einer jeden Messreihe wurden anschließend gemittelt. Die Antwort auf die Kontrollmessung wurde als Basisantwort definiert und von den Antworten auf 10 μM GABA-Applikation und 10 μM GABA + 20 μM Tiagabin Applikation subtrahiert. Dieses differentielle Verfahren sollte dazu führen, dass alle verbliebenen, nicht-GABAergen Stromkomponenten, die eventuell der pharmakologischen Isolierung entgangen waren, subtrahiert werden konnten.

2.7.2. Messung der phasischen GABAergen Hemmung.

Wie bei den Untersuchungen zur GAT-1 vermittelten Kontrolle der tonischen Inhibition im epileptischen Gewebe wurden auch hier CA1-Pyramidenzellen elektrophysiologisch abgeleitet. Diesmal dienten die Pyramidenzellen nicht als Indikator der extrazellulären GABA-Konzentration, sondern nun wurde direkt gemessen ob sich die GABAerge Inhibition postsynaptisch verändert hatte. Hierfür wurden inhibitorische postsynaptische Ströme (eIPSC) aufgezeichnet, die nicht durch eine extrazelluläre GABA-Applikation induziert wurden, sondern durch die Stimulation mit Hilfe einer unipolaren Stimulationselektrode und eines Stimulationstaktgebers (Master-8, Science Products GmbH, Deutschland). Stimuliert wurde

im Stratum radiatum der CA1-Region (0,05 Hz., 0,5 - 5 V). Die Aufzeichnung der evozierten Stromantworten der Zellen erfolgte mittels eines Verstärkers des Typs Axopatch multiclamp 700 (Axon Instruments, USA). Die Analyse der aufgezeichneten eIPSCs erfolgte mit Hilfe der Igor Pro Software (Wavemetrics, USA).

Um chloridbasierte Auswärtsströme zu isolieren, wurden Ionenkanäle oder transmittergesteuerte Kanäle der Zellmembran blockiert. Die Wirkung des Transmitters Glutamat wurde mit 10 μ M NBQX und 30 μ M d-APV blockiert. Als GABA_B-Rezeptor-Antagonist wurde 10 μ M SCH 50911 verwendet. Kaliumkanäle wurden durch 2,5 mM Cäsium und Natriumkanäle durch 5 mM QX314 intrazellulär blockiert.

Intrazellulärlösung:

Cs-Gluconat (117,5 mM), CsCl (2,5 mM), HEPES (10 mM), EGTA (10 mM), TEA (10 mM), MgATP (4 mM), Na₃GTP (0,3 mM) und QX314 (5 mM). Der pH-Wert wurde mit CsOH auf 7,2 justiert, die Osmolarität der Lösung lag bei 290 mOsmol.

IPSCs wurden unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von 20 μ M Tiagabin aufgezeichnet. Das Haltepotential während der Ganzzelleableitung betrug 0 mV. Wieder wurde eine mit Pilocarpin behandelte Tiergruppe mit einer gleichbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Einzelne aufgezeichnete eIPSC wurden pro Versuchsgruppe gemittelt, um die charakteristische Amplitude und Kinetik dieser eIPSCs zu untersuchen. Die Amplitude der gemittelten eIPSCs wurde über die gesamte Dauer der inhibitorischen Ereignisse integriert und als Ladungstransfer festgehalten. Die Kinetik der eIPSC wurde als Halbwertsbreite erfasst (Die Länge – x-Achse - des Zeitraums zwischen Anstieg und Abfall eines PSC auf der Höhe der halben Maximalamplitude – y-Achse).

2.8. Charakterisierung von hippocampalen CA1-Interneuronen.

Um Veränderungen im elektrophysiologischen Verhalten von Interneuronen im epileptischen Gewebe zu untersuchen, wurde die inhibitorische und exzitatorische Innervation der Zellen gemessen und quantifiziert. Als Konsequenz einer möglichen veränderten Innervation der Zellen wurde die Frequenz der spontan auftretenden Aktionspotentiale untersucht. Die elektrophysiologisch charakterisierten Zellen wurden mit Neurobiotin intrazellulär markiert und anschließend morphologisch untersucht. Von speziellem Interesse waren die Auswirkung des epilepsietypischen Zellsterbens und Veränderungen im dendritischen

Verzweigungsmuster der Interneuronen im Vergleich zu den Verhältnissen im Kontrollgewebe. Elektrophysiologische und / oder morphologische Unterschiede zwischen Kontroll- und pathologischem Gewebe wurden zum Abschluss miteinander korreliert.

2.8.1. Untersuchung zum Verhältnis zwischen Inhibition und Exzitation in SRL-Interneuronen.

An visuell identifizierten Interneuronen in der CA1-Schicht Stratum radiatum / Stratum lacunosum moleculare wurden vor dem Durchbruch zur Ganzzelleableitung Aktionspotentiale aufgezeichnet. Die Frequenz und Amplitude der Aktionspotentiale veränderte sich unmittelbar nach der Etablierung eines Abdichtwiderstands noch erheblich. Um zuverlässige und vergleichbare AP-Messungen zu realisieren, musste ein Zeitraum von 15 Minuten nach Initiation der elektrischen Abdichtung zwischen Elektrode und Zelle abgewartet werden (Abb. 6). Die Stabilität der Aufzeichnung von Aktionspotentialen hing vor allem vom Überdruck ab, der an die Ableitungselektrode angelegt wurde. Die Annäherung an die Zelle erfolgte für gewöhnlich mit 10 – 20 mBar über dem atmosphärischen Druck. Stabilisierte sich die Frequenz und Amplitude der Aktionspotentiale nicht, wurde die Zelle aufgegeben.

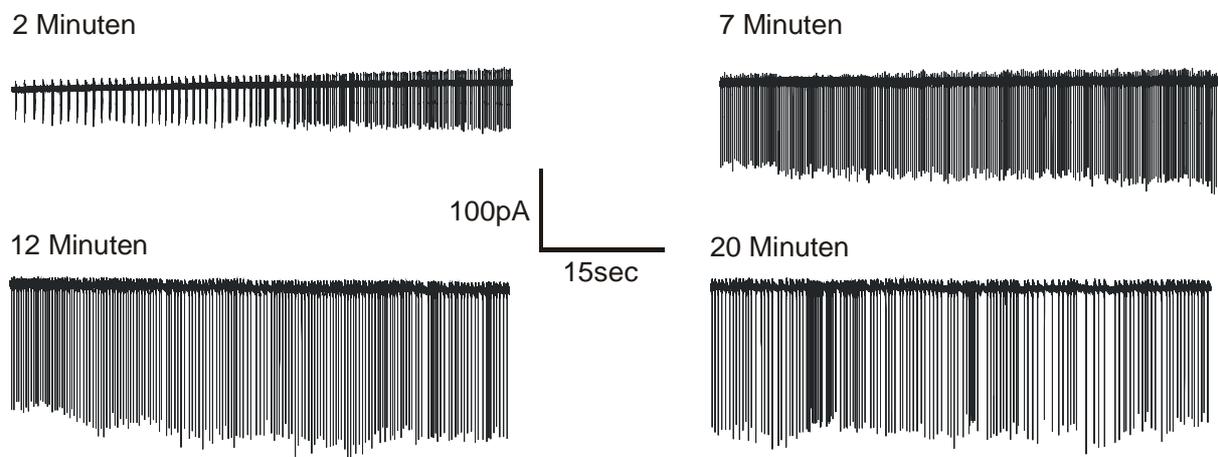


Abb. 6. Adaptionszeit des AP-Musters nach Etablierung des Gigaohm-Abdichtwiderstands.

Durch das Ansaugen der Zellmembran waren Messungen der Aktionspotential-Frequenz innerhalb der ersten 10-15 Minuten nach der Etablierung eines Gigaohm-Abdichtungswiderstands nicht aussagekräftig. Erst wenn sowohl die Amplitude als auch die Frequenz der AP-Aufzeichnung stabile Werte erreicht hatten, wurden die Werte als repräsentativ und zelltypisch angenommen.

Inhibitorische Ströme (0 mV) und exzitatorische Ströme (-70 mV) wurden bei unterschiedlichen Haltepotentialen aufgezeichnet. Voruntersuchungen hatten allerdings gezeigt, dass sich die inhibitorische Innervation eines Interneurons nicht allein auf Grund unterschiedlich vorgegebener Haltepotentiale von der exzitatorischen Komponente

vollständig trennen ließ. Versuche, einmal appliziertes TTX oder Gabazin wieder aus den Gewebeschnitten auszuwaschen, wurde aufgrund praktischer Erfahrungen mit diesen Pharmaka nicht unternommen. Eine komplette Entfernung dieser Pharmaka erschien durch lang andauernde Rezirkulation mit ACSF sehr unwahrscheinlich und durch die zeitlich limitierte Messdauer auch als eher kontraproduktiv. Deshalb wurden inhibitorische Ströme bei der Aufzeichnung der exzitatorischen Ströme mit dem GABA_A-Rezeptor-Antagonist Gabazin blockiert. Die Untersuchung der quantalen exzitatorischen und inhibitorischen Transmitterfreisetzung wurde durch die Blockade von Natriumkanälen mittels des Natriumkanal-Blockers TTX durchgeführt. Der experimentelle Ablauf einer Messung gestaltete sich wie folgt:

1. spontane IPSC (0 mV Haltepotential, 3 x 1 Minute),
- Applikation von 0,5 mM TTX,
2. miniatur-IPSC (0 mV Haltepotential, 3x1 Minute),
- Applikation von 1 mM Gabazin,
3. miniatur-EPSC (-70 mV Haltepotential, 3x1 Minute).

Die Verwendung von Gabazin gemeinsam mit TTX führte dazu, dass die Aufzeichnung von sIPSCs, mIPSCs, sEPSCs und mEPSCs in ein und derselben Zelle nicht möglich war. Auf die Aufzeichnung von sEPSCs musste verzichtet werden.

Nach jeder einminütigen Einzelmessung wurde der Serienwiderstand und der Eingangswiderstand mit Hilfe eines 10 mV-Testpuls bestimmt. Die Messung der Stabilität von Eingangs- und Serienwiderstand wurde als Kriterium für die Stabilität der Messbedingungen während der Ableitung an einer Zelle interpretiert. Veränderten sich die beiden Parameter um jeweils mehr als 10 % während einer Ableitung, wurden die betreffenden Daten verworfen. Betrug der Eingangswiderstand nicht mindestens das 10-fache des Serienwiderstands, wurde eine Datenaufzeichnung erst gar nicht begonnen. Verringerte sich der Faktor während der Ableitung an einer Zelle zu weniger als dem 10-fachen, wurden die Daten ebenfalls verworfen. Durch diese Praxis sollte ausgeschlossen werden, dass ein Verlust des Abdichtwiderstands oder ein spontanes Verschließen der Zellmembran während der Dauer der Ableitung, die gewonnenen Daten verfälschte.

Für 10 Kontroll-Interneurone und 9 Interneurone aus mit Pilocarpin behandeltem Gewebe wurde die Auslöseschwelle von Aktionspotentialen bestimmt. Vor dem Einwaschen von TTX wurde die Zelle bei -80 mV gehalten. In der Folge wurde das Haltepotential in 5 mV-

Schritten erhöht. Nachdem die Auslöseschwelle für Aktionspotentiale abgeschätzt worden war, wurden in der Stromklemme, wieder durch schrittweise Depolarisation, 8-10 Aktionspotentiale aufgezeichnet. Dies diente auch einer ersten, groben Bestätigung, dass es sich bei der jeweils abgeleiteten Zelle um ein putatives Interneuron handelte.

2.8.2. Erstellung eines Auswertungsprogramms.

Die Aufgabe des Auswertungsprogramms bestand darin, postsynaptische Stromschwankungen zu identifizieren und sie damit vom Hintergrundrauschen abzugrenzen. Der Versuch die Auswertung mit frei erhältlicher Software vorzunehmen, wie der von Dempster (Uni Strathclyde, GB) oder mit kommerzieller Software, wie Minianal (Intrasoft, USA) lieferte keine befriedigenden Ergebnisse. Das Hauptproblem bestand darin, eine Messgrundlinie („baseline“) zu finden, die die putativen postsynaptischen Ströme nicht mit einbezog. Eine solche Einbeziehung verringerte nicht nur die tatsächliche Amplitude der postsynaptischen Ströme sondern sie wirkte auch noch selektiv auf kleinere PSCs. Um das Rauschen während der Aufzeichnung trotzdem richtig zu ermitteln, wurde eine ereignisbereinigte Rauschanalyse durchgeführt.

A. Ereignisbereinigte Rauschanalyse:

Postsynaptische Ströme wurden pro Messung dreimal à eine Minute - bei 100 μ s Taktlänge - mit 1.800.000 Datenpaaren (Zeit / Amplitude) aufgezeichnet. In einem ersten Schritt wurde mittels einer Rauschanalyse das durchschnittliche Rauschen bestimmt. Potentielle PSCs wurden dabei wie Rauschen interpretiert. In einem zweiten Schritt wurden diejenigen Amplitudenzeitpunkte identifiziert, die mindestens das Zweifache des Rauschens übertrafen. Anschließend wurde eine erneute Rauschanalyse durchgeführt, nun aber um jene Punkte subtrahiert, die das Zweifache des Rauschens der ersten Rauschanalyse übertroffen hatten. Insgesamt wurden diese Schritte 10-mal iterativ wiederholt, um sicher zu gehen, dass potentielle PSCs keinen signifikanten Einfluss auf die Größe des Rauschens hatten.

B. Ereignisbereinigte Nullmesslinie:

Als potentielle PSCs wurden solche Ströme als Datenpunkte ausgeklammert, welche 20 msec vor und 50 msec nach einem Hochpunkt / Tiefpunkt auftraten, welcher das $\pm 1,8$ -fache des Rauschens der ereignisbereinigten Rauschanalyse übertraf. Die fehlenden Messpunkte in der Datenaufzeichnung wurden durch gemittelte Messpunkte ersetzt, welche aus 10 msec. vor und

10 msec. nach dem 70 msec. dauernden Datenausschnitt gemittelt wurden. Die entstehende Datenspur wurde als ereignisbereinigte Nullmesslinie interpretiert.

C. Echte Grundmesslinie:

Die ereignisbereinigte Nullmesslinie wurde zweifach gefiltert (mit einem über 200 Punkte verteilten gleitenden Filter), um eine Glättung herbeizuführen (Echte Grundmesslinie). Die echte Grundlinie wurde anschließend mit dem Originaldatensatz überlagert. Dann wurden solche Hoch / Tiefpunkte identifiziert, die das Zweifache des Rauschens der ereignisbereinigten Rauschanalyse in Verhältnis zur echten Grundlinie übertrafen.

D. Einbeziehung typischer PSC-Charakteristika.

Abschließend wurden schnelle hochamplitudige Rauschereignisse, sowie langsame unspezifische Stromschwankungen eliminiert, indem das Verhältnis zwischen Abklingdauer und der Anstiegszeit eines putativen Ereignisses mit minimal 1,8 definiert wurde. Die positiv identifizierten Ereignisse wurden als PSCs interpretiert.

Die Auswahl der Parameter die bei diesem Verfahren verwendet wurden, erfolgte nach subjektiver, experimenteller Identifikationen von PSCs. Die Größe der Parameter wurde dabei solange optimiert, bis mindestens 95% der PSCs jedes beliebigen, getesteten Datensatzes durch die Software richtig ermittelt wurde. Kommerzielle, wie frei erhältliche Software erfassten maximal 80% der subjektiv identifizierten PSC richtig und wiesen zusätzlich 40 % – 60 % falsch positive Ereignisse auf.

Die Messungen wurden so ausgewertet, dass jedes PSC in der Datenspur erfasst und dessen Amplitude bestimmt wurde. Des Weiteren wurden die Frequenz und die Inter-Ereignisintervalle innerhalb einer Aufzeichnungsminute errechnet. Für die 50 größten Potentiale einer Messung wurde die Kinetik anhand der Halbwertsbreite ermittelt

2.8.3. Morphologische Untersuchung an SRL-Interneuronen mittels Sholl-Analyse.*

Wie bereits unter 2.6. beschrieben, wurden mit Neurobiotin gefüllten Interneurone durch einen an Streptavidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff an einem konfokalen Laser-Mikroskop visualisiert. Die Lage der Interneurone wurde in einer Skizze dokumentiert, und der Abstand zur CA1-Pyramidenzellschicht vermessen. Mit Hilfe der Sholl-Analyse (Sholl, 1953) wurden die zelltypischen Verzweigungsmuster quantifiziert. Hierzu wurden die dendritischen Verzweigungen eines Neurons nach der Länge und geographischen Ausrichtung

erfasst. Dazu wurden Kreise verschiedener Radien im Abstand von jeweils 50 μm um das Zellsoma konstruiert, und die Schnittpunkte der Dendriten mit den Kreisradien ausgezählt. Das Kreismuster war wiederum in acht Quadranten unterteilt, die eine Zuordnung der Dendriten in horizontale und vertikale Ausläufer ermöglichte (Abb. 7). Die dendritischen Schnittpunkte mit den Grenzen der Quadranten wurden nicht erfasst.

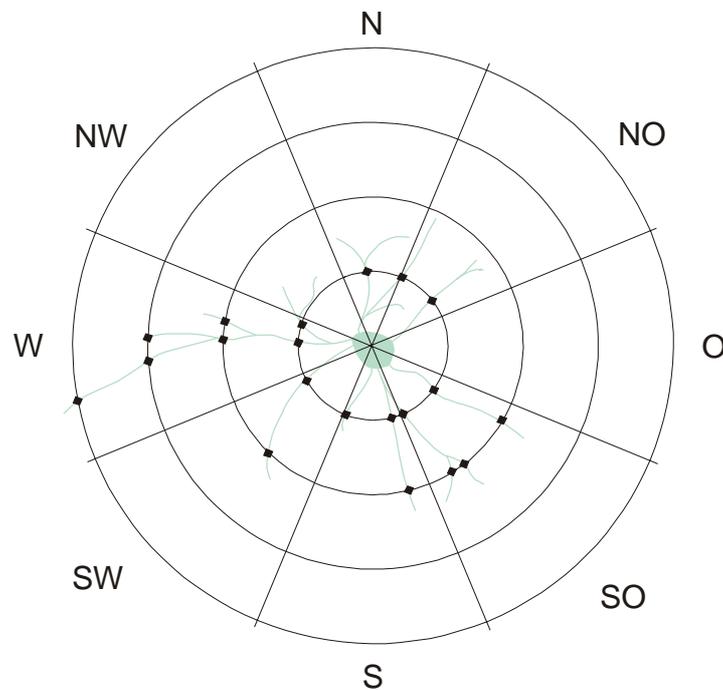


Abb. 7. Schematische Darstellung der Sholl-Analyse-Methode.

Die Umgebung des Zellsoma wurde in konzentrisch angeordnete Quadranten eingeteilt. Anschließend wurden die Kreuzungspunkte der Dendriten mit den konstruierten Kreisradien markiert und ausgezählt. Die Sektorgrenzen dienen hierbei lediglich der Orientierung. Neuritische Schnittpunkte mit den Sektorgrenzen wurden also nicht gezählt. Auf diese Weise war es möglich das zelltypische Dendritenmuster zu quantifizieren. Insgesamt wurden drei Parameter gemessen, die Anzahl der Verzweigungen pro Radius, der Radius des Verzweigungsmaximums und die Verzweigungsdominanz nach der Summe der Verzweigungen in den Süd-Ost-Quadranten, bzw. Nord-Süd-Quadranten.

Für jede Zelle wurden insgesamt drei Parameter erfasst:

1. Die Anzahl der dendritischen Verzweigungen pro Radius.
2. Der Radius des Verzweigungsmaximums.
3. Die Verzweigungsdominanz.

Als Verzweigungsmaximum wurde derjenige Sholl-Radius definiert, welcher die meisten Kreuzungspunkte mit den dendritischen Zellausläufern aufwies. Um Aussagen über die Verzweigungsdominanz treffen zu können, wurden nur horizontale Schnittpunkte in den

Sektoren West und Ost, sowie radiale Schnittpunkte in den Sektoren Süd und West ausgezählt.

* Die Sholl-Analyse wurde im Rahmen einer Kooperation von Dr. Werner Zuschratter (Leibnitz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg) durchgeführt.

2.9. Chemikalien / Pharmaka.

Chemikalien wurden hier nur insoweit aufgeführt, als dass sie nicht den üblichen Laborchemikalien entsprachen.

Substanz:	Firma:
Alexa 488	Bio-Rad,
d-APV	Sigma
Atropinsulfat	Sigma
Cadmium	Merck
Cäsium-Gluconat	Merck,
CGP 55845A	Sigma
Chloralhydrat	Sigma
Cresyl Violett	Sigma,
Depex	Roth
Diazepam	Sigma
EGTA	Merck
GABA	Sigma
Gabazin	Sigma
Lactat	Roth
Methylscopolamine	Sigma
MgATP	Sigma
Na ₃ GTP	Sigma
NBQX	Sigma
Neurobiotin	Tocris
Paraformaldehyd	Merck
Pilocarpin	Sigma
Pikrinsäure	Merck
Polylysin	Sigma
QX314	Tocris
SCH 50911	Tocris
TEA	Sigma
Tiagabin	Sanofi-Synthelabor
TTX	Tocris
Xylol	Merck