

## 4. Diskussion.

Hinter der allgemeinen Beschreibung des Krankheitsbildes Epilepsie verbergen sich verschiedene Symptome und medizinische Befunde (siehe 1.). Allen gemeinsam ist das spontane Auftreten systematischer Hypersynchronisation von Nervenzellen im Gehirn. Um Epilepsie ursächlich verstehen zu können muss geklärt werden, warum Nervenzellen im Gehirn während eines Anfallereignisses synchronisiert Aktionspotentiale generieren und warum sich dieselben Nervenzellen zwischen den Anfallereignissen „normal“ verhalten. Aufgrund medizinischer und experimenteller Befunde wurden im Laufe der letzten Jahre eine Vielzahl von Modellen und Hypothesen entwickelt, die erklären könnten wie es zur Ausprägung einer für Epilepsie typischen Übererregbarkeit im Nervengewebe kommt (Taylor et al., 1971; Schwartzkroin et al., 1980; Johnston et al., 1981; Traub et al., 1982; Dichter et al., 1987; Sloviter, 1987; Freund et al., 1991; Sloviter, 1991b, Olsen, 1997; Bernard et al., 1999; Chen et al., 1999; Jacobs et al., 1999; McNamara, 1999; Parent, 2000a; Cohen et al., 2002; Schousboe et al., 2004b ). In der vorliegenden Arbeit wurden vor allem zwei Hypothesen untersucht:

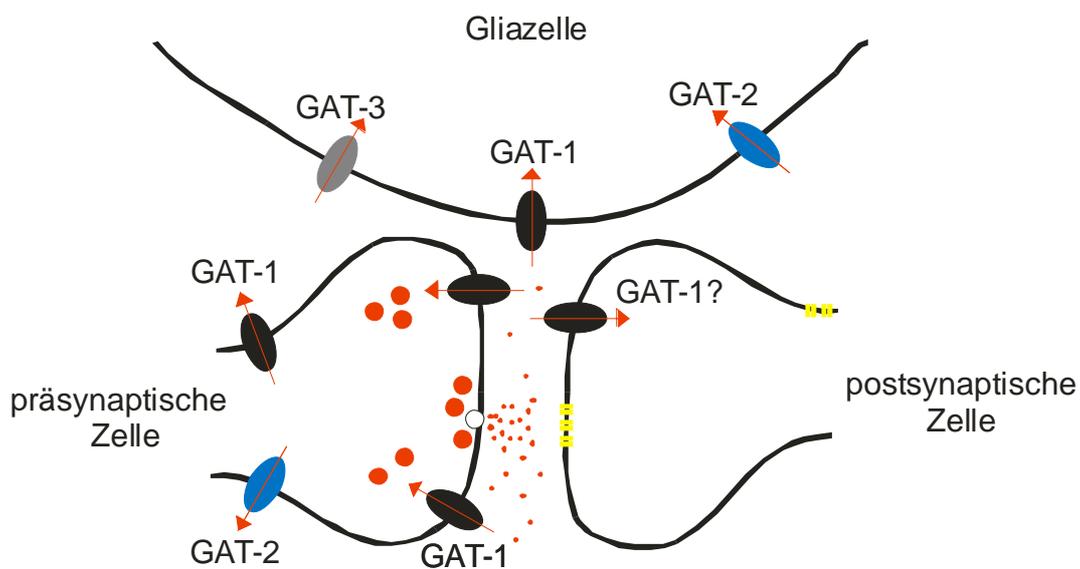
1. Ist die Wiederaufnahme von GABA im epileptischen Gewebe verändert?
2. Ist die Funktion inhibitorischer Interneurone im epileptischen Gewebe verändert?

### 4.1. Pathologie der GABA-Transportproteine.

Im adulten Gehirn von Säugetieren führt die präsynaptische Ausschüttung von GABA in den synaptischen Spalt durch Aktivierung postsynaptischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zu einer Erhöhung der Chloridleitfähigkeit. Durch Rücktransport in Neurone und Gliazellen wird der Neurotransmitter wieder aus der synaptischen Umgebung entfernt. Der Rücktransport, ein elektrogener Natrium-Chlorid-Symport (Kanner et al, 1987; Keros et al., 2005), wird durch spezifische, membranständige Proteine gewährleistet, die so genannten GAT- Proteine (GABA-Transporter-Proteinen). Bisher sind vier dieser Transport-Proteine bekannt, GAT-1, GAT-2, GAT-3 und BGT-1/GAT-4 (Borden et al., 1992; Borden, 1996; Clark et al., 1996; Guastella et al., 1990; Liu et al., 1993). Diese Proteine gehören mit den Monoamin- und Glycin-Transportern zur Familie der Na<sup>+</sup> / Cl<sup>-</sup>-abhängigen Symporttransporter (Richerson et al., 2003).

Im Hippocampus der Ratte dominiert der GAT-1 Transporter, wo man ihn überwiegend in Neuronen findet aber zum Teil auch in Astrocyten (Radian et al., 1990; Pietrini et al., 1994; Borden et al, 1995; Ribak et al., 1996; Conti et al., 1998; Chiu et al., 2002). In Neuronen

erscheint GAT-1 spezifisch und mit hoher Dichte an den Axonendigungen (Chiu et al, 2002). Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass das GAT-1 Protein auch in Neuronen vorkommt, die nicht als Interneurone identifiziert werden konnten (Swan et al., 1994; Yasumi et al., 1997; Frahm et al, 2001b). Neben GAT-1 wurden auch die GABA-Transporter GAT-2 und GAT-3 im Hippocampus nachgewiesen. GAT-3 wurde in Gliazellen nachgewiesen (Ribak et al., 1994; Minelli et al., 1995; Minelli et al., 2003), das sehr schwach exprimierte GAT-2-Protein kommt ausschließlich extrasynaptisch vor (Conti et al., 1998; Minelli et al., 2003; Conti et al., 2004). Die funktionale Rolle des GABA- und Betain-Transporters BGT für das Nervensystem ist noch nicht geklärt (Matskevitch et al., 1999). Die genannten GAT-Proteine besitzen nicht nur eine selektive Lokalisation (Abb. 24), sondern verfügen auch über unterschiedliche Transport-Effizienzen (Sarup et al., 2003; Sarup et al., 2004; Schousboe et al., 2004).



**Abb. 24. Lokalisation der GAT-Proteine, schematische Darstellung.**

Eine Akkumulation der basalen GABA-Hintergrund-Konzentration wird durch die Wiederaufnahme des Transmitters in die Zellen verhindert. Im Hippocampus erfolgt die Wiederaufnahme von GABA in die Zellen vor allem durch synaptisch lokalisierte GAT-1 Proteine. Auch die Existenz von postsynaptisch lokalisierten GAT-1 Transportern wird diskutiert. GAT-3 Transporter kommen in wesentlich geringerer Abundanz und ausschließlich in Astrocyten vor. Die geringste Dichte erreichen die GAT-2 Proteine, sie wurden bisher ausschließlich extrasynaptisch nachgewiesen. **Rot:** GABA bzw. GABA-gefüllte Vesikel; **gelb:** synaptische und extrasynaptische GABA-Rezeptoren.

Die physiologische Bedeutung der GAT-Proteinfamilie besteht, soweit bekannt a) in der zeitlichen Einschränkung der Signalübertragung (Dingledine et al, 1985; Roepstorff et al.,

1994; Draguhn et al., 1996; Engel et al., 1998), dient b) der Rückgewinnung von GABA in die präsynaptischen Interneurone (Schousboe et al., 1983) und verhindert c) die Diffusion des Transmitters und damit eine unspezifische Transmitterwirkung an anderer Stelle (Frahm et al., 2001a). Unter besonderen Bedingungen ist sogar eine Umkehrung der Transport-Funktion bei GAT-Proteinen beobachtet worden (Schwartz et al., 1987; Belhage et al., 1993; Gaspary et al., 1998). Statt einem Rücktransport des Transmitters in die Zellen sind die GAT-Proteine auch zu einer aktiven Sezernierung von GABA in der Lage (Abb. 26). Die vielfältigen Funktionen der GABA-Transporter, sowie deren differentielle Lokalisation haben in der Vergangenheit die Frage aufgeworfen, ob ein Zusammenhang zwischen einer pathologischen Veränderung der Funktion der GAT-Proteinfamilie und der inhibitorischen GABAergen Transmission im epileptischen Gewebe existiert (Krogsgaard-Larsen et al., 1987). Da die GAT-Proteine sowohl synaptisch als auch extrasynaptisch heterogen lokalisiert sind, kontrollieren diese Proteine die tonische und phasische GABAerge Inhibition. Die extrasynaptisch-tonische Inhibition betrifft vor allem die basale GABA-Konzentration in der extrasynaptischen Matrix und damit verknüpft, die Wirkung von extrasynaptischem GABA auf extrasynaptische GABA-Rezeptoren (Mody et al., 2001). Die phasische Komponente der GABAergen Inhibition bezieht sich auf die synaptische Inhibition. Unter phasisch versteht man hauptsächlich den zeitlichen Verlauf der GABAergen postsynaptischen Potentiale, wobei man davon ausgeht, dass der größte Einfluss auf diese Komponente von der präsynaptischen GABA-Ausschüttung ausgeht, ohne dass ein Einfluss der extrasynaptischen, basalen GABA-Konzentration gänzlich ausgeschlossen wird (Fueta et al., 2003).

Den Anlass für die hier vorgelegten Untersuchungen zur GABA-Recycling-Funktion im epileptischen Gewebe bildeten Veröffentlichungen, die eine quantitative Veränderung der GABA-Transportproteine im epileptischen Gewebe postulierten (Akbar et al., 1998; Andre et al., 2001) oder von einer Veränderung des Wirkungsgrads der Wiederaufnahme-Funktion der GABA-Transport-Proteine im epileptischen Gewebe berichteten (Janjua et al., 1991; Jefferys et al., 1991; During et al., 1995; Patrylo et al., 2001).

Die pathophysiologischen Konsequenzen solcher strukturellen oder funktionalen Veränderungen im GABA-Recycling sind jedoch nicht eindeutig geklärt (During et al., 1995; Fueta et al., 2003; Conti et al., 2004). Postuliert man beispielsweise eine Abnahme der Dichte präsynaptischer GAT-1 Proteine (Akbar et al., 1998), würde man erwarten, dass pro Freisetzungseignis mehr GABA-Moleküle, länger im synaptischen Spalt verbleiben. Dies würde zu einer Akkumulation des Neurotransmitters im synaptischen Spalt führen. In erster Konsequenz würde man eine verlängerte inhibitorische Transmission pro

Transmitterfreisetzung erwarten, also einen tendenziell potenzierenden Effekt auf die GABAerge Inhibition. Eine Verringerung der Expression von GABA-Transportern, könnte aber über einen längeren Zeitraum sekundär zu einer Transmitter-Verarmung in den präsynaptischen Endigungen der Interneurone führen. Eine präsynaptische Transmitterverarmung würde langfristig die Effizienz der GABAergen Inhibition beeinträchtigen. Diese Schlussfolgerungen stellen aber nur eine sehr grobe Vereinfachung der Folgen einer pathologisch veränderten Funktion der GABA-Transporter dar. Selbst die beispielhaft postulierte Abnahme in der Dichte präsynaptischer GAT-1 Proteine könnte theoretisch durch die verbleibenden GABA-Transporter kompensiert werden. Eine strukturelle Veränderung muss nicht notwendigerweise auch mit einer funktionalen Veränderung einhergehen. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass das pathologische Gewebe auf eine Veränderung des GABA-Recyclings an anderer Stelle mit Kompensationsmechanismen reagiert. Denkbar wäre eine solche Kompensation in der postsynaptischen Zelle, beispielsweise in der Regulation der Dichte der postsynaptisch exprimierten GABA-Rezeptoren. An dieser Stelle setzten die hier vorgelegten Studien zur tonischen und phasischen GABAergen Inhibition im epileptischen Gewebe an. Um eine mögliche pathologische Veränderung der GABAergen Inhibition festzustellen, wurde eine direkte Messung der Netto-Konsequenz der GABAergen Inhibition in postsynaptischen Zellen gemessen. Die primäre Fragestellung lautete: gibt es überhaupt pathologische Unterschiede in der tonischen oder phasischen GABAergen Inhibition, unabhängig von der GABA-Transportfunktion der GAT-Proteine? Zusätzlich wurde dann geprüft, ob die Blockade des GAT-1 zu einem Unterschied in der GABAergen Inhibition zwischen Kontrollgewebe und epileptischen Gewebe führte.

#### **4.1.1. Tonische GABAerge Inhibition.**

Um den Einfluss der GAT-1 vermittelten Kontrolle auf die tonische Komponente der GABAergen Inhibition zu messen, wurden Ganzzellaufzeichnungen an Pyramidenzellen im Gyrus dentatus und an Pyramidenzellen in CA1 durchgeführt. Diese Neurone dienten gleichsam als Monitor der GABAergen Transmission. Pharmakologisch wurden Rezeptoren und Ionenkanäle so blockiert, dass eine Verengung der Restleitfähigkeit der Zellmembranen auf die Chloridleitfähigkeit erreicht wurde. Im Fokus standen die durch GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vermittelten postsynaptischen Chloridströme. Diese Chloridströme wurden einmal unter Bedingungen mit 10 µM extrazellulär appliziertem GABA und anschließend mit 10 µM GABA und 20 µM Tiagabin gemessen. Tiagabin wurde als selektiver Inhibitor von GAT-1

verwendet (Borden et al., 1994). Die Wahl der extrazellulär applizierten GABA Konzentration fiel auf 10  $\mu\text{M}$ , weil dieser Wert für das hippocampale Gewebe der Ratte einen möglichst großen Effekt auf die Chloridleitfähigkeit versprach, ohne dass das GABA-Transportsystem sich bereits in Sättigung befand (Frahm et al., 2001a). Durch die diffuse Applikation von GABA wurde die GABA-Konzentration in der extrazellulären Matrix erhöht. Dies sollte die extrasynaptische-tonische GABAerge Inhibition aktivieren. Diente also der Überprüfung des Einflusses der basalen GABA Hintergrundkonzentration auf die extrasynaptische GABAerge Inhibition im pathologischen und gesunden Gewebe.

Insgesamt zeigten CA1-Pyramidenzellen auf die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  GABA eine 3-4-fach höhere Chloridleitfähigkeit als Körnerzellen des Gyrus dentatus. Da CA1 Pyramidenzellen in der Regel größer sind als Körnerzellen und eine höhere Dichte an extrasynaptischen GABA<sub>A</sub> Rezeptoren aufweisen (Banks et al., 2000) verwunderte dieser Umstand kaum. Die relative Größe der Körnerzellen lässt sich über die Leitfähigkeit der Zellmembran abschätzen. Große Zellen, besitzen in der Regel einen kleineren Membranwiderstand (Kehrwert der Leitfähigkeit) als kleine Zellen. Das gemessene Chloridumkehrpotential wich mit ca. 61 mV bei Pyramidenzellen und ca. 58 mV bei Körnerzellen deutlicher als erwartet vom theoretisch berechneten Wert von 66 mV ab. Zu einem kleineren Teil mag das Abweichen an einer nicht 100%igen Kontrolle des Offsetstroms gelegen haben. Dies würde bedeuten, dass das gemessene Umkehrpotential nicht exakt bestimmt werden konnte. Der weitaus größere Teil der Abweichung dürfte sich aber durch eine eingeschränkte Spannungsklemme, bzw. eingeschränkte Diffusion der Intrazellulärlösung in den dendritischen Verzweigungen erklären (Verheugen et al., 1999). Dies könnte wiederum dazu geführt haben, dass in den Dendriten Chloridströme bei einem anderen Wert umkehrten als bei dem theoretisch berechneten Chlorid-Umkehrpotential. Schließlich dürfte die pharmakologische Einengung auf eine Chloridleitfähigkeit vermutlich nicht zu 100 % möglich gewesen sein. Die Restleitfähigkeit der Membran für andere Ionen als Chlorid führt ebenfalls zu einem Abweichen des gemessenen vom tatsächlichen Umkehrpotential. Ein systematisches Abweichen des Umkehrpotentials in Pilocarpin-behandelten Neuronen konnte aber weder für Körnerzellen noch für Pyramidenzellen festgestellt werden. Deshalb konnte auch davon ausgegangen werden, dass die Messungen der GABAergen Inhibition nicht bereits durch ein systematisches Abweichen des Chloridumkehrpotentials zwischen Kontrollzellen und Zellen aus epileptischem Gewebe beeinträchtigt war.

Der gemessene Chlorid-Ladungstransfer als Antwort auf 10  $\mu\text{M}$  GABA erhöhte sich scheinbar bei den CA1 Pyramidenzellen im epileptischen Gewebe um ca. 20% im Vergleich

zur Kontrolle. Diese Abweichung erwies sich aber nicht als statistisch signifikant. Somit geben die hier vorgelegten Untersuchungen keinen Hinweis auf eine pathologische Veränderung der tonischen GABAergen Inhibition. Wie bereits angedeutet lässt sich allerdings von einem unveränderten tonischen Einfluss auf die GABAerge Inhibition im epileptischen Gewebe nicht unmittelbar auf eine unveränderte Funktion der GABA-Transporter im epileptischen Gewebe schließen. So wurde im Zusammenhang mit Epilepsie bereits mehrfach von einer veränderten Expression der GABA<sub>A</sub> Rezeptoren im Hippocampus berichtet (Wolf et al., 1994; Kampuis et al., 1995; Buhl et al., 1996., Schwarzer et al., 1997., Brooks-Kayal et al., 1998; Sperk et al., 1998; Shumate et al., 1998; Bouilleret et Poulter et al., 1999; al., 2000; Loup et al., 2000). Eine verminderte Affinität und / oder Dichte extrasynaptischer GABA<sub>A</sub> Rezeptoren im epileptischen Gewebe (Gibbs et al., 1997) ließe sich bei gleich bleibender tonischer GABAergen Inhibition unter anderem auch mit einer veränderten Kontrolle der basalen GABA-Konzentration durch GAT-Proteine erklären. In diesem Fall müsste man annehmen, dass sich eine pathologisch verminderte Effektivität der durch GABA<sub>A</sub> Rezeptoren vermittelten extrasynaptischen Inhibition durch eine veränderte Effektivität an anderer Stelle, z.B. in der Funktion der GABA Transporter wieder ausgleicht. Dann würde die eine pathologische Veränderung eine andere pathologische Veränderung so kompensieren, dass der Netto-Effekt, gemessen als Chlorid-Ladungstransfer, neutral bliebe. Neben der grundsätzlichen Frage, ob die GABA-Transport-Aktivität im epileptischen Gewebe verändert war (siehe 4.1.1.1.), wurde durch die Blockade des GAT-1 auch überprüft ob kompensatorische Mechanismen durch einen Unterschied zwischen der Antwort auf die GABA-Applikation und die GABA- und Tiagabin-Applikation festzustellen waren (siehe 4.1.1.3).

#### **4.1.1.1. Wirkung von Tiagabin auf die extrasynaptische Hemmung.**

Die Blockade von GAT-1 durch Tiagabin führte, wie erwartet, zu einem dramatischen Anstieg des gemessenen Chlorid-Ladungstransfers (Dingledine et al., 1985; Roepstorff et al., 1992; Thompson et al., 1992; Isaacson et al., 1993; Overstreet et al., 1999). Bei CA1 Pyramidenzellen betrug der prozentuale Anstieg im Vergleich zur Messung ohne Tiagabin ca. 400 %, bei den Körnerzellen ca. 650 % in den Kontrollen und über 1100 % in der Gruppe Pilocarpin-behandelter Tiere. Die Körnerzellen im Gyrus dentatus reagierten demzufolge wesentlich empfindlicher auf die Blockade des GABA-Transporters. Möglicherweise spielt GAT-1 für Körnerzellen im Gyrus dentatus eine noch herausragendere Rolle in der Kontrolle der tonischen GABAergen Inhibition, als für CA1 Pyramidenzellen. Dies könnte mit einer

geringeren Ausprägung der alternativen GABA-Transporter GAT-2 und GAT-3 zusammenhängen, oder mit einer höheren Dichte extrasynaptischer GAT-1 in umliegenden Astrocyten. Allerdings fehlen für eine solche Vermutung immunohistochemisch validierte Belege. Für die Körnerzellen im Gyrus dentatus gibt es bereits einen immunohistochemischen Hinweis auf eine erhöhte Dichte an GAT-1 Proteinen in der inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus im epileptischen Gewebe (Andre et al., 2001). Der vermeintlich erhöhte Tiagabin-Effekt bei den Körnerzellen (+1100 %; Kontrolle: 650%) könnte eine Folge dieser Beobachtung sein, also ein prozentualer Anstieg des Tiagabin-Effekts aufgrund einer erhöhten Dichte an GAT-1 Proteinen in Körnerzellen aus pathologischem Gewebe. Der scheinbar erhöhte Tiagabin-Effekt bei Körnerzellen aus epileptischem Gewebe erwies sich jedoch statistisch als nicht signifikant ( $p = 0,082$ ; Mann-Whitney-U-Test). Möglicherweise spielte für die statistische Signifikanzberechnung auch die große Variabilität der Antworten auf Tiagabin in den Körnerzellen, eine Rolle. Ursache der hohen Variabilität könnte unter anderem die grundsätzlich veränderte Konnektivität der Gyrus dentatus Körnerzellen im epileptischen Gewebe sein (Nadler et al, 1980; Buckmaster et al; 2002). Eine wie auch immer geartete Veränderung von GAT-1 im epileptischen Gewebe, welche nicht durch kompensatorische, pathologische Mechanismen reguliert würde, hätte sich in jedem Fall auf einen Unterschied des Tiagabin-Effekts, zwischen Kontroll- und epileptischen Gewebe, niederschlagen müssen. Eine verringerte Dichte, vornehmlich in der Astrocytenmembran exprimierter GAT-1, hätte sich, im Vergleich zur Kontrollgruppe, durch einen kleineren Tiagabin-Effekt auf die GABAerge Inhibition im epileptischen Gewebe widerspiegelt.

#### **4.1.1.2. Unspezifische Tiagabin-Wirkung auf die tonische und phasische Komponente der GABAergen Inhibition.**

Die präferentielle Lokalisation verschiedener GAT-Typen erschwert die Zuordnung der GAT-Funktion auf eine phasische und eine tonische Komponente. Dies gilt umso mehr, wenn eine pathophysiologisch bedeutsame Veränderung sich nur auf einen GAT-Typus beziehen würde (Frahm et al., 2001b; Keros et al., 2005). Wie oben erwähnt, spielt der GAT-1 Transporter vor allem für die synaptische Kontrolle der GABA-Konzentration eine entscheidende Rolle (Borden et al, 1995; Pietrini et al., 1994; Radian et al., 1990; Ribak et al., 1996; Chiu et al., 2002). Durch die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  GABA wurde hauptsächlich die extrasynaptische, tonische GABAerge Inhibition aktiviert. Die unspezifische Blockade sowohl synaptisch, als auch extrasynaptisch lokalisierter GAT-1-Proteine dürfte aber auch einen Einfluss auf die gemessene phasische Komponente der GABAergen Transmission nehmen (Chiu et al., 2002

und siehe 4.1.2.). Denn ein Anstieg der extrasynaptischen GABA-Konzentration durch die Blockade extrasynaptischer, an Astrocyten gebundener GAT-1-Proteine, muss nicht nur auf extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren wirken. In Abhängigkeit vom extrasynaptischen GABA-Konzentrationsanstieg, der mit einer GAT-1 Inhibition in Astrocyten einhergehen könnte, ist auch eine verifizierbare Wirkung auf synaptisch lokalisierte GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren denkbar. Entscheidend für solch eine synaptische Wirkung dürfte der Beitrag sein, den GAT-1 extrasynaptisch zur Kontrollfunktion der GABA-Konzentration besitzt und natürlich auch davon, wie effizient GAT-2 und GAT-3, auch bei einem Ausfall von GAT-1, die extrazelluläre GABA-Konzentration zu kontrollieren imstande sind. Umgekehrt trägt die Blockade des synaptisch lokalisierten GAT-1 nicht nur zu einer Erhöhung der synaptischen GABA-Konzentration bei, sondern, es ist davon auszugehen, dass synaptisch akkumulierte GABA-Moleküle auch in die extrazelluläre Matrix diffundieren, nachdem sie nicht mehr von einem funktionsfähigen GABA-Transporter absorbiert werden. Treffen diese Moleküle auf extrazelluläre GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, kann es auch auf diese Weise zu einer Erhöhung der tonischen GABAergen Inhibition kommen.

Ein pathologischer Effekt auf die tonische GABAerge Inhibition durch GABA-Transporter könnte spezifischer durch eine selektive Blockade von GAT-2 und / oder GAT-3 überprüft werden, da diese beiden GABA-Transporter ausschließlich für die Kontrolle der extrasynaptischen GABA-Konzentration sorgen. Optimal wäre für die Beurteilung einer pathologischen Veränderung der tonischen GABAergen Inhibition eine selektive Inhibition extrasynaptischer GAT-1, GAT-2 und GAT-3. Leider ist bis zur Niederschrift dieser Arbeit weder ein selektiver GAT-2 oder / und GAT-3 Inhibitor bekannt, noch ein selektiver GAT-1 Inhibitor für Astrocyten. Mit dem Inhibitor SNAP-5114 steht lediglich ein GAT-Inhibitor zur Verfügung, der für GAT-2 und GAT-3 eine höhere Affinität besitzt als für GAT-1 (Borden et al., 1996; Thomsen et al., 1997; Schousboe et al., 2004).

Die Begriffe phasisch und tonisch beziehen sich in erster Linie auf die Kinetik der postsynaptischen Ströme und sind in einem strengen Sinn letztlich nur auf die Lokalisation der GABA-Rezeptoren anwendbar. Eine Erhöhung der Chloridleitfähigkeit extrasynaptisch lokalisierter GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren beträfe dementsprechend die tonische GABAerge Komponente. Die phasische GABAerge Komponente würde sich auf eine Veränderung der Chloridleitfähigkeit synaptischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren beziehen. Eine pharmakologische Trennung extrasynaptisch von synaptisch lokalisierten GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren ist jedoch (noch) nicht möglich. Demzufolge kann auch nicht beurteilt werden zu welchem Anteil vornehmlich als tonische GABAerge Inhibition gemessene IPSC von einer phasischen Komponente

kontaminiert sein könnten. Die in der hier vorgelegten Studie gemachte Aussage zu einer nicht beeinträchtigten Kontrolle der tonischen Komponente der GABAergen Inhibition, bezieht sich auf den zwischen Kontrollgruppe und pathologischer Gruppe unveränderten Chlorid-Ladungstransfer a) als Antwort auf 10  $\mu\text{M}$  GABA-Applikation; und b) eine unveränderte, in Astrocyten lokalisierte GAT-1 Effektivität im epileptischen Gewebe.

#### **4.1.1.3. Maskierung pathologischer Veränderungen im GABA-Transport durch kompensatorische Effekte.**

Es kann davon ausgegangen werden, dass eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  GABA nicht zur Sättigung der GAT-1-Transportkapazität führt (Frahm et al., 2001a). In Abwesenheit von Tiagabin können die entsprechenden Ergebnisse also nahezu als rein tonische GABAerge Inhibition gewertet werden. In Anwesenheit von Tiagabin stellt sich vor allem die Frage nach einer pathologisch veränderten Funktion des GAT-1 Proteins und weniger die Frage nach einer Zuordnung zur phasischen oder tonischen inhibitorischen Komponente (siehe 4.1.3.). Zusammen mit der rein tonischen GABAergen Inhibition ohne Tiagabin-Wirkung lassen die unter Tiagabin-Wirkung gewonnenen Daten keine Veränderung der Kontrolle der GABAergen Inhibition im epileptischen Gewebe erkennen. Eine verringerte Expression oder Dichte des hauptsächlich synaptisch exprimierten GAT-1 Proteins im epileptischen Gewebe hätte a) bereits eine Veränderung des Chloridstroms ohne Tiagabin oder b) eine Veränderung der Wirksamkeit von Tiagabin erwarten lassen. Bei einer Herabregulierung der GAT-1 Effektivität im epileptischen Gewebe müsste man erwarten, dass Tiagabin im Kontrollgewebe einen wesentlich stärkeren Effekt zeigt, da dort dann mehr oder effektivere GAT-1 Proteine zu vermuten wären. Insbesondere die oben angeführte Hypothese einer Maskierung einer veränderten GABA-Transport-Aktivität im epileptischen Gewebe durch kompensatorische Mechanismen, wie eine verminderte Affinität und / oder Dichte extrasynaptischer GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (Gibbs et al., 1997) konnte aufgrund der hier dargelegten Befunde nicht bestätigt werden. Kompensatorische Effekte, die unter der Wirkung von 10  $\mu\text{M}$  GABA zu einer Verschleierung einer pathologischen Veränderung der GAT-Funktion geführt hätten, wären nach Applikation von Tiagabin demaskiert worden. Umgekehrt wäre eine Maskierung des Tiagabineffekts bereits durch die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  GABA auffällig geworden. Kompensatorische Mechanismen des epileptischen Gewebes, die eine veränderte GAT-Aktivität sowohl in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  GABA, als auch in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  GABA und Tiagabin überlagern, wurden bisher zumindest noch nicht beschrieben.

#### **4.1.2. Effizienz der Kontrolle der phasischen GABAergen Inhibition im epileptischen Gewebe.**

Um den Einfluss der GAT vermittelten Kontrolle auf die phasische Komponente der GABAergen Inhibition zu messen, wurden Ganzzellableitungen an hippocampalen CA1 Pyramidenzellen durchgeführt. Die GABAerge Inhibition wurde hier durch elektrische Stimulation inhibitorischer Fasern aktiviert. Nach Blockade der Glutamatrezeptoren sollte dies zu einer spezifisch synaptischen GABA-Transmission führen. Wieder dienten Pyramidenzellen als Monitor dieser GABAergen Transmission, indem die postsynaptischen eIPSCs aufgezeichnet wurden, die auf ein Stimulationsereignis folgten. Diese Versuche wurden mit einer Kontrollgruppe und mit einer Gruppe Pilocarpin-behandelter Tiere durchgeführt. Die Kinetik der eIPSCs wurde als Halbwertsbreite kalkuliert, um eine Veränderung in der phasischen GABAergen Inhibition untersuchen zu können. Durch die Applikation des GAT-1 Inhibitors Tiagabin wurde eine mögliche pathologische Veränderung der GABAergen Inhibition im Zusammenhang mit der Wiederaufnahmefunktion der GAT Proteine überprüft.

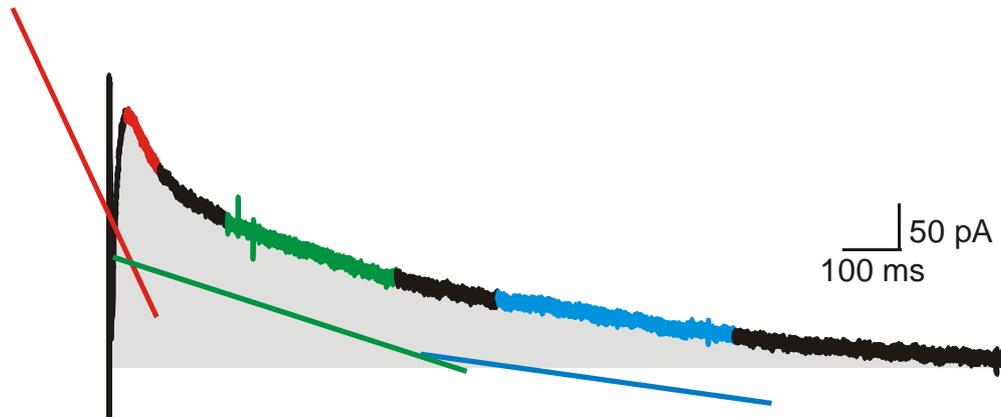
Ohne die Inhibition des GAT-1 durch Tiagabin waren die gemittelten IPSC-Halbwertsbreiten in Pyramidenzellen aus epileptischem Gewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe um ca. 25 % verringert. Die Applikation von Tiagabin führte bei Kontrolltieren wie bei Pilocarpin-behandelten Tieren zu einer Verlängerung der IPSC-Halbwertsbreite. In Pyramidenzellen aus epileptischem Gewebe fielen die IPSC-Halbwertsbreiten geringer aus, als in der Kontrollgruppe. Unter Tiagabinwirkung betrug die Differenz in der IPSC-Halbwertsbreite ca. 15 %. Weder mit, noch ohne Tiagabinwirkung erwiesen sich die Differenzen in der Halbwertsbreite zwischen Kontroll- und Pilocarpin-Gruppe als statistisch signifikant. Tiagabin verlängerte die IPSC-Halbwertsbreiten in beiden Versuchgruppen unterschiedslos um einen Faktor von ca. 2,5. Die Wirkung von Tiagabin hatte keinen Einfluss auf die Amplituden der gemittelten IPSCs. Auch zwischen der Kontrollgruppe ( $161 \text{ pA} \pm 36 \text{ pA SEM}$ ) und der Pilocarpin-Gruppe ( $174 \pm 58 \text{ pA SEM}$ ) konnte kein Amplitudeneffekt durch Tiagabin-Applikation festgestellt werden. Der Ladungstransfer während eines IPSC wurde durch Integration der gemittelten IPSCs kalkuliert. Die Applikation von Tiagabin führte zu einer Erhöhung des Ladungstrfers um einen Faktor von ca. 2,5, vergleichbar mit dem Tiagabin-Effekt auf die Halbwertsbreiten. Auch der durchschnittliche Ladungstransfer der sich während eines IPSC vollzog zeigte sich im epileptischen Gewebe unverändert. So konnte, zusammenfassend, für keinen der gemessenen Parameter ein Unterschied zwischen

Kontrolltieren und mit Pilocarpin behandelten Tieren festgestellt werden. Insbesondere die Blockade des GAT-1 ließ keine pathologischen Besonderheiten erkennen. Die Effektivität der Kontrolle der GABAergen Inhibition scheint somit auch im epileptischen Gewebe intakt.

#### **4.1.2.1. Beurteilung der sIPSC-Kinetik.**

Die verlängernde Wirkung von Tiagabin auf die phasische GABAerge Inhibition wurde bereits mehrfach und in ähnlicher Weise beschrieben (Dingledine et al., 1985; Rekling et al., 1990, Thomson et al., 1992; Roepstorff et al., 1992; Mager et al., 1993; Lambert et al., 1996; Engel et al., 1998;). In einer, zu der hier vorgelegten Untersuchung, methodisch sehr ähnlichen Studie, – allerdings ohne Bezug auf Epilepsie – kalkulierten Roepstorff und Lambert (Roepstorff et al., 1994) den Einfluss von Tiagabin auf die Halbwertsbreite der postsynaptisch gemessenen IPSCs in CA1 Pyramidenzellen auf einen Faktor  $\sim 2,1$ , im Vergleich zur Kontrollmessung ohne Tiagabin. Dieser Wert ist mit dem Wert vergleichbar, der in den hier vorgelegten Ergebnissen für die Verlängerung der IPSC-Halbwertsbreite unter Tiagabinwirkung festgestellt wurde. Roepstorff und Lambert verwendeten dabei Tiagabin-Konzentrationen im Bereich zwischen 20-50  $\mu\text{M}$ . Anstieg und Abfall der IPSC wurden von Roepstorff und Lambert an mathematisch kalkulierte Kurvenverläufe angepasst und ausgewertet. So stellten sie fest, dass der erhöhte Wert der Halbwertsbreite und die damit verbundene verlängerte Abklingdauer ausschließlich auf die späte, langsame Komponente der IPSC-Abklingdauer zurückzuführen war. Dieser Befund steht im Einklang mit der mutmaßlichen Wirkung von Tiagabin (Rekling et al., 1990; Borden, 1996; Schousboe et al., 2004a). Bei unveränderter Funktion und Ausstattung der Postsynapse mit GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, führt ein zeitlich verzögerter Rücktransport der GABA-Moleküle aus dem synaptischen Spalt zu einer Amplituden-neutralen Verlängerung der postsynaptischen GABA-Wirkung. Auf eine mathematische Abschätzung des zeitlichen Verlaufs der IPSCs wurde in der hier vorgelegten Untersuchung absichtsvoll verzichtet. Erste Versuche den zeitlichen Verlauf der IPSCs mathematisch zu beschreiben, lieferten unbefriedigende Ergebnisse. Vor allem in Bezug auf eine gewisse Unsicherheit bei der Wahl der mathematischen Grundfunktion erschien diese Methodik hier als zu subjektiv. So ließen sich in ein und derselben Testgruppe einige IPSCs besser durch eine einwertige Exponentialfunktion, andere besser durch ein zwei- oder dreiwertige Exponentialfunktion beschreiben (Abb. 25). In beiden Studien wurde jedoch kein Einfluss der Tiagabin-Applikation auf die IPSC-Amplitude festgestellt, so dass ein Amplitudeneffekt auf die Halbwertsbreite ausgeschlossen werden kann. Das Abweichen in der prozentualen Größe des Tiagabin-Effekts auf die Länge der

Halbwertsbreite, mit Faktor 2,1 (Roepstorff und Lambert) gegenüber  $\sim 2,5$  in der hier vorgelegten Studie, ist am plausibelsten mit Unterschieden in der Stimulation (räumlich, Stärke der Stimulation, Typ der Stimulationseinheit) der Interneurone zu erklären.



**Abb. 25. Mathematische Analyse der IPSC-Kinetik.**

Schematisierte Darstellung eines Original-IPSC. Für den zeitlichen Verlauf des Abklingens eines IPSC kann eine Kurvenfunktion gefunden werden. Dabei können einzelne Phasen im Verlauf eines IPSC besondere Berücksichtigung finden. Hier ist beispielhaft die Dynamik einer frühen Phase in Rot, einer mittleren Phase in Grün und einer späten Phase in Blau dargestellt. Die Kinetik eines IPSC könnte sich eventuell nur in einer Phase zwischen zwei Testgruppen unterscheiden. Grau unterlegt ist das Kurvenintegral des IPSC. Das Integral gibt einen Aufschluss über den Netto-Ladungstransfer während eines IPSC.

Im Gegensatz zu der Untersuchung der tonischen GABAergen Inhibition konnte bei der phasischen Komponente nur eine relativ kleine Stichprobe erstellt werden – sieben Kontrollzellen wurden mit fünf Zellen aus mit Pilocarpin behandelten Tieren verglichen. Es stellte sich heraus, dass Stimulationsexperimente im epileptischen Gewebe adulter Tiere wesentlich schwieriger durchzuführen waren, als Experimente bei denen die Aktivierung der GABAergen Inhibition durch direkte Applikation von GABA herbeigeführt wurde. Während sich bei vielen Messungen an CA1-Pyramidenzellen die zellulär-physiologischen Bedingungen noch in den ersten Minuten als stabil erwiesen, hielt eine außerordentlich große Zahl an Zellen (ca. 70 - 80%) die Stimulation im Stratum radiatum nicht über einen längeren Zeitraum ohne merkliche negative physiologische Folgen aus (beobachtet als Veränderungen im Eingangs- und Serienwiderstand). Da jedoch evozierte IPSCs über einen längeren Zeitraum gemittelt werden sollten, um qualitativ hochwertige gemittelte eIPSC's mit möglichst geringer Varianz zu messen, musste ein Verlust der individuellen Ableitung häufig in Kauf genommen werden. Eine lange individuelle Messdauer war aber auch deshalb angebracht, damit sichergestellt war, dass die Wirkung des applizierten Tiagabins nach

ausreichender Gewebepenetranz gemessen wurde. Tatsächlich veränderte sich der Tiagabin-Effekt noch bis zu 20-30 Minuten nach der Applikation. Weshalb sich die Experimente mit stimulierter GABAerger Inhibition um so viel schwieriger gestalteten als die Experimente mit Aktivierung der GABAergen Inhibition durch direkte GABA-Applikation konnte nicht ermittelt werden. Möglicherweise verursacht das Einbringen der Stimulationselektrode in das ohnehin schon geschädigte, epileptische Gewebe einen erheblichen, zusätzlichen Stressfaktor, der die maximale Dauer einer elektrophysiologischen Ableitung in akuten Gewebeschnitten limitierte.

#### **4.1.3. Vergleich mit anderen Untersuchungen.**

Inwieweit widersprechen die hier vorgelegten Ergebnisse den Forschungsergebnissen, die einen strukturellen oder funktionalen Unterschied im GABA-Wiederaufnahme-System postulierten (z.B. Akbar et al, 1991; Jefferys et al., 1991; During et al., 1995; 1998; Andre et al., 2001; Janjua et al.; Patrylo et al., 2001)?

Die Mehrzahl der Studien, die sich mit dem Zusammenhang zwischen der Funktion der GAT-Proteine und Epilepsie beschäftigten, nutzten genetische und morphologische Methoden. Dementsprechend wird von einem erhöhten (z.B. Akbar et al., 1991; Orozco-Suarez et al., 2000, Hirao et al., 1998), oder verringerten (z.B. Janjua et al., 1991; Bouilleret et al., 2000; Andre et al., 2001; Patrylo et al., 2001; Fueta et al., 2003) Vorkommen von GABA-Transportern im epileptischen Gewebe, berichtet - oftmals noch mit einer regionalen Präferenz innerhalb des Säuger-Nervensystems. Hinzu kommen noch Veröffentlichungen, die eine veränderte Expression von GAT-Proteinen gentechnisch herbeiführten und von einer (Ma et al., 2001; Hua et al., 2001) oder keiner (Chiu et al., 2005) Konsequenz im Zusammenhang mit Epilepsie berichteten.

Akbar und Kollegen (1991) beschrieben einen quantitativen Unterschied im Vorkommen von GAT-Proteine codierender mRNA im Kainat- und Pilocarpinmodell. Eine Gleichsetzung von erhöhter GAT-mRNA mit einem erhöhten Vorkommen der entsprechenden Proteine in den axonalen Endigungen der GABAergen Neurone haben die Autoren aber selbst ausdrücklich nicht vorgenommen und wird auch andernorts bezweifelt (Conti et al, 2004). Mit immunohistochemischen Methoden wurde auch auf Proteinebene ein Verlust an GAT-1 Immunoreaktivität im Hippocampus nachgewiesen (Mathern et al., 1999; Andre et al., 2001). Im Vergleich zu mRNA-Untersuchungen stellte diese Methodik einen wesentlich direkteren Zusammenhang zu einem Verlust an GAT-1 dar. Aber auch hier weisen die Autoren selbst auf ein Grundproblem in der Untersuchung epileptischen Gewebes hin. Der typische

Zellverlust, welcher im Laufe einer chronischen Epilepsieerkrankung auftritt (Tauck et al., 1985; Ben-Ari, 1985; Sutula et al., 1989; Cronin et al., 1988; Houser et al., 1990; Babb et al., 1990; Cavazos et al., 2004), würde auch dann zu einem Verlust an immunohistochemisch detektiertem GAT-1 Signal führen, wenn die GAT-1 Dichte in den überlebenden Zellen konstant geblieben wäre. Patrylo und Kollegen (2001) applizierten mittels einer Mikropipette eine hohe GABA-Konzentration (5 mM) und einen unspezifischen GAT-Blocker (5 mM NPA). Durch eine solche Mikroinjektion kann der Transportmechanismus der GAT-Proteine umgekehrt werden, ohne dass es zur Blockade der GABA-Transporter kommt (Solis et al., 1992 und 4.1.5.). Auf diese Weise stellten Patrylo und Kollegen fest, dass es im Kainat-Modell für Epilepsie zu einer pathologischen Umkehrung der GABA-Transportfunktion kommt. Die Veränderungen in der GABAergen Inhibition die dort festgestellt wurden, bezogen sich nicht auf die tonische extrazelluläre Transport-Kapazität, sondern auf die maximale GABA-Transport-Kapazität der GAT-Proteine, bzw. ein Überschreiten und eine Umkehr dieser Transportkapazität. Im Gegensatz zu der hier vorgelegten Arbeit, nutzten Thompson und Gahwiler (1992) Gewebeschnitt-Kulturen. Veränderungen die die Autoren in der Funktion von GAT-1 fanden, wurden nicht an einem mit dem hier verwendeten vergleichbaren Epilepsie-Modell überprüft. Der wesentlich stärkere Tiagabin Effekt in der Kontrollgruppe mag einerseits methodisch bedingt sein, andererseits auf die Aktivierung der GABAergen Inhibition durch elektrische Stimulation zurückzuführen sein. During und Kollegen (1995) beschrieben einen Unterschied zwischen Kontroll- und epileptischem Gewebe in der invertierten Transportfunktion der GAT-Proteine. Die aktive Sezernierung von GABA durch GAT-Proteine setzt allerdings besondere Bedingungen voraus, so war z.B. eine aktive Sezernierung nur dann möglich, wenn die Zellen sehr stark depolarisiert wurden. Diese experimentellen Bedingungen waren mit den in der vorgelegten Studie gewählten Bedingungen nicht vergleichbar.

Wird das GAT-1 codierende Gen in Mäusen ausgeschaltet, überleben die Tiere zwar, aber mit neurophysiologischen Konsequenzen, wie Ataxie, Tremor, gesteigerter Grundnervosität im Verhalten und einer erhöhten tonischen GABAergen Inhibition im Kleinhirn (Chiu et al., 2005). Diese Tiere entwickeln aber keine Epilepsie. Erstaunlicherweise konnten auch keinerlei kompensatorische Effekte auf Proteinbasis festgestellt werden, weder für GAT-3 Proteine noch für die Glutamatdecarboxylase (GAD 65), welche zur Synthese von GABA notwendig ist. Auch die Zahl der Interneurone blieb unverändert. Eine durch genetische Manipulation erreichte Überexpression von GAT-1 in Mäusen führte jedoch zu einer erhöhten epileptischen Anfallsrate im Kainat-Modell für Epilepsie (Ma et al., 2000; Hua et al., 2001).

Lambert und Kollegen fanden in der Ratte denselben Tiagabin-Effekt auf die phasische GABAerge Inhibition, wie er in der hier vorliegenden Arbeit beschrieben wurde, also eine amplitudenneutrale Verlängerung der phasischen Inhibition. In einem Mausmodell (EL Maus), bei dem die Mäuse eine genetische Prädisposition für Epilepsie besaßen, fand dieselbe Arbeitsgruppe allerdings eine veränderte Anstiegs- (-25 % Anstiegszeit) und Abklingkinetik (- 50 % Abklingdauer) in stimulierten IPSCs (Lambert et al., 1996). In einigen Fällen könnten sich widersprechende Ergebnisse auch auf die Verwendung unterschiedlicher Epilepsie-Modelle zurückzuführen sein.

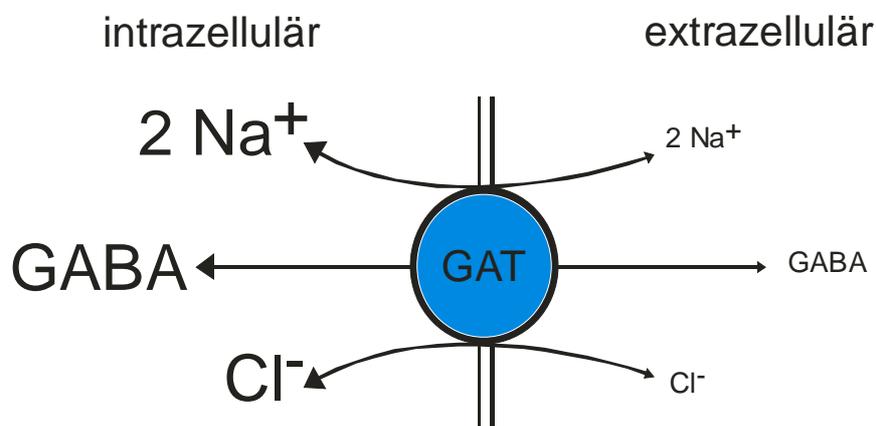
#### **4.1.4. GABA-Transport Funktion und heterosynaptische Transmission.**

Die Wiederaufnahme von GABA durch GAT-Proteine in Neurone und Gliazellen schränkt das Überspringen der spezifischen synaptischen Freisetzung des Transmitters, hin zu einer zellübergreifenden Wirkung auf synaptische und extrasynaptische GABA-Rezeptoren ein. Die zellübergreifende Transmitterwirkung ist als heterosynaptische Transmission beschrieben (Isaacson et al., 1993; Stasheff et al., 1993). Insbesondere die Kontrolle der tonischen, extrasynaptischen GABAergen Inhibition ist von entscheidender Rolle für die heterosynaptische Transmission. Ist der Rücktransport von GABA in die Zellen schwerwiegend gestört, kann eine Akkumulation von GABA zu einem Anstieg der heterosynaptischen Transmission führen. Durch die diffuse extrazelluläre Applikation von 10  $\mu\text{M}$  GABA, in der hier vorgelegten Studie, wurde eine Akkumulation von GABA simuliert. Allerdings führte eine diffuse Applikation von 10  $\mu\text{M}$  GABA zu keinem Unterschied zwischen Kontroll- und epileptischem Gewebe. Wenn ein solcher Effekt für epileptische Phänomene typisch wäre, müsste man lokale GABA-Konzentration im epileptischen Gewebe von weit mehr als 10  $\mu\text{M}$  vermuten. Unter Einfluss von 10  $\mu\text{M}$  GABA wurde auch keine epileptische Aktivität im Gewebeschnitt beobachtet, so dass ein prokonvulsiver Effekt heterosynaptischer GABAerger Transmission insgesamt betrachtet unwahrscheinlich erscheint. Erstaunlicherweise führt Tiagabin auch in Abwesenheit von artifiziell appliziertem GABA oder einer Stimulation von Interneuronen bereits zu einer erhöhten Chloridleitfähigkeit (Frahm et al., 2001a). Wie schon bei der Beurteilung, ob die tonische oder phasische Komponente der GABAergen Inhibition durch Tiagabin-Applikation beeinflusst wird (siehe 4.1.1.2.), so gilt auch für die Beurteilung einer pathologisch relevanten Auswirkung der tonischen GABA-Konzentration auf die heterosynaptische Transmission, dass letztendlich nur ein Experiment mit spezifischer Blockade der GAT-2 und GAT-3 Proteine aufschlussreich sein kann (Richerson et al., 2003). Die Blockade des ohnehin

vornehmlich synaptisch exprimierten GAT-1 zeigte in den hier vorgelegten Ergebnissen keine pathologische Veränderung.

#### 4.1.5. Umkehr der GAT-vermittelten GABA-Transportfunktion.

Eine invertierte Transportrichtung der GAT Proteine, also eine von Aktionspotentialen unabhängige Freisetzung von GABA aus Neuronen (Schwartz et al., 1987; Belhage et al., 1993; Cammack et al., 1994; Gaspary et al 1998) könnte unabhängig von der Struktur und Dichte der GAT Proteine eine pathologische Konsequenz besitzen (Patrylo et al., 2001). Zumindest könnte man vermuten, dass die Bedingungen einer solchen GABA-Freisetzung, nämlich eine andauernde Depolarisierung der Zelle, durchaus typisch sein könnten für ein epileptisches Ereignis.



**Abb. 26. Elektrogenen Symport von GABA durch GAT.**

Mit jedem GABA-Molekül werden zwei Natriumionen und ein Chloridion mit durch die Membran transportiert. Der Transport von GABA durch GAT-Proteine ist also elektrogen, mit je einem GABA-Molekül wird auch netto eine positive Ladung verschoben.

Die Umkehrung der GAT-Transportfunktion ist auch durch eine intrazelluläre Erhöhung der Kaliumkonzentration möglich (Gaspary et al., 1998). Eine solche Erhöhung der Kaliumkonzentration wurde während akuter epileptischer Anfallsereignisse im Hippocampus beobachtet (Krnjevic et al., 1982; Somjen et al., 1985; Heinemann et al., 1986). Möglicherweise reagieren Neurone, als eine Art Schutzmechanismus, mit der aktiven, kalziumunabhängigen Sezernierung von GABA als Antwort auf Hypererregung. Allerdings müsste man auch für diesen Fall feststellen, dass eine Blockade des dominierenden GAT-1 Proteins eine Umkehrung der GAT Transportrichtung teilweise simuliert, jedenfalls wird die Rückgewinnung von GABA in die Neurone in beiden Fällen quantitativ massiv

beeinträchtigt. Doch wie bereits beschrieben, führte, in den hier vorgestellten Ergebnissen, eine Blockade des GAT-1 zu keinem Unterschied zwischen Kontroll- und epileptischem Gewebe. Dies ist selbstverständlich kein Indiz dafür, dass es im epileptischen Gewebe nicht zu einer pathologischen Veränderung der Transportrichtung der GAT-Proteine kommen könnte, allerdings darf bezweifelt werden, dass solch eine Veränderung einen primären prokonvulsiven Effekt hätte. Eine parallel einhergehende Transmitter-Verarmung inhibitorischer Synapsen könnte jedoch zu einer Dysfunktion der Inhibition führen und einen sekundär prokonvulsiven Mechanismus darstellen (Schousboe et al., 1983). Einen solchen Mechanismus haben Patrylo und Kollegen beschrieben. Sie stellten im epileptischen Gewebe von Mensch und Ratte eine ca. 40%ige Reduktion in der Umkehrbarkeit der GAT-Transporter fest. (Patrylo et al., 2001). Daraus schlossen sie, dass es im epileptischen Gewebe bereits zu einer signifikanten Umkehr der Transportfunktion der GABA-Transporter gekommen sein muss.

Eine sehr starke Depolarisation von Interneuronen weist noch einen weiteren Aspekt im Hinblick auf Epilepsie und die GABA Transportfunktion der GAT-Proteine auf. GABA wirkt nicht grundsätzlich hyperpolarisierend, auch im adulten Gewebe nicht (Staley et al., 1995; Perkins et al., 1997). In humanen Körnerzellen des Gyrus dentatus kann lang anhaltende GABA-Transmission zu einer Depolarisierung der Zellen bis hin zur Überschreitung der AP-Schwelle führen (Williamson et al., 1995). Dasselbe Phänomen wurde auch für CA1 Pyramidenzellen adulter Ratten berichtet (Taira et al., 1997). Eine Blockade des GAT-1 durch Tiagabin forciert diese atypische Depolarisation durch GABA (Jackson et al., 1999). Auf diese Weise könnte eine drastische Veränderung in der Funktion des GAT-1 Proteins dramatische Effekte im epileptischen Gewebe herbeiführen. Interessanterweise ist der GABA Transport mittels GAT-Proteinen intrinsisch elektrogen (Abb. 26). Die Transportrichtung wird thermodynamisch durch den elektrochemischen Gradienten vorgegeben, der in unmittelbarer Nähe der Membran herrscht. Mit jedem transportierten GABA-Molekül wird auch eine positive Ladung in der GABA-Transportrichtung verschoben (Kinney et al., 2002; Richerson et al., 2003). Möglicherweise ist dies der Grund, warum eine starke und anhaltende Depolarisierung zur Umkehr der Transportrichtung führt.

Geht man davon aus, dass es im Vorfeld eines epileptischen Anfallereignisses zu einer Störung in der Balance zwischen Inhibition und Exzitation kommt, und in der Folge zu Kompensationsmechanismen, wie zum Beispiel einer Umkehrung der GAT vermittelten GABA Transportfunktion, so wäre es durchaus vorstellbar, dass sich ein epileptisches Anfallereignis in dem Moment vollzieht, indem eine präsynaptische Transmitterverarmung

zum teilweisen Zusammenbrechen der GABAergen Inhibition beiträgt. Diese Überlegung ist natürlich rein hypothetisch und liefert auch keine Erklärung für die initialen Ereignisse, die überhaupt erst zu einer Störung der Balance zwischen Inhibition und Exzitation führen.

#### **4.1.6. Pro- oder antikonvulsive Wirkung der GAT-Inhibition.**

Im Gegensatz zu der beschriebenen antikonvulsiven Wirkung von GAT-1 Blockern wie Tiagabin (Braestrup et al., 1990; Suzdak et al., 1995; Schmidt et al., 2000; Kalviainen et al., 2002) wurden auch prokonvulsive Tiagabin Effekte gefunden - beispielsweise bei Verabreichung von Tiagabin an Adoleszente (Blalslev et al, 2000) oder bei Verabreichung in sehr hohen Dosen (Trinka et al., 1999) oder, wie unter 4.1.6. beschrieben, durch die Umkehr der Transportwirkung, bzw. einer Transmitterverarmung der inhibitorischen Präsynapse. Zusätzlich wird die Beurteilung der Wirkung von GAT-Proteinen dadurch verkompliziert, dass es mittlerweile Indizien für einen kooperativen Effekt zwischen GAT-1 und GAT-2 gibt (Schousboe et al., 2004a). Schousboe und Kollegen konnten zeigen, dass der nicht-selektive GAT-1 und GAT-2 Inhibitor EF1502 zusammen mit den selektiven GAT-1 Inhibitoren Tiagabin oder LU-32-176B einen synergistischen, antikonvulsiven Effekt ausübte. Schousboe und Waagepetersen (2004b) zeigten des Weiteren, dass es unter pathophysiologischen Bedingungen zu einer Verschiebung der GABA-Wiederaufnahme zwischen Neuronen und Astrocyten kommen kann. Als Konsequenz, postulieren die Autoren, dass von Astrocyten aufgenommenen GABA nicht wieder für den Transmissions-Kreislauf der GABAergen Inhibition in den Interneuronen zur Verfügung steht. Auch dies wäre ein mögliches Modell der Verarmung inhibitorischer Präsynapsen. Allerdings nur dann, wenn der Nachweis gelänge, dass der pathophysiologische Verlust von GABA durch eine erhöhte Aufnahmekapazität von Astrocyten verursacht wird, welche nicht durch eine GABA-Neusynthese in den präsynaptischen Interneuronen kompensiert werden kann. Unter nicht-pathologischen Bedingungen wird der bei weitem überwiegende Anteil des freigesetzten GABA wieder zurück in die Präsynapse transportiert (Schousboe et al., 2004b). Dieser Umstand macht noch einmal die exklusive Stellung des GAT-1 Proteins klar. Hinzu kommt, dass alle anderen GAT-Proteine räumlich entfernter zum Freisetzungsort des Transmitters liegen, GAT-3 in Astrocytenmembranen und GAT-2 extrasynaptisch in Astrocyten und Neuronen (Minelli et al, 2003; Richerson, 2003; Cioni et al, 2004). Veränderungen in der Transport-Funktion von GAT-2 und GAT-3 sollten sich deshalb vornehmlich auf die tonische Komponente der GABAerge Inhibition bemerkbar machen. Vergleicht man die Befunde über den Zusammenhang zwischen Epilepsie und GABA-Transport mit Ischämie und GABA-

Transport, so konnte bei der Ischämie eine deutliche und selektive regionale Reduktion an GAT-3 Proteinen festgestellt werden, während hauptsächlich kortikale Pyramidenzellen, die sonst GAT-negativ sind pathologisch GAT-3 positiv werden (Melone et al., 2003). Blut- bzw. Sauerstoffmangel können tatsächlich auch Auslösefaktor eines epileptischen Anfalls sein. Tiagabin wird sowohl bei Epilepsie, als auch bei Ischämie als Therapeutikum eingesetzt.

Die Annahme einer unveränderten Effektivität der GABA-Wiederaufnahme durch GAT Proteine im epileptischen Gewebe, so wie sie in den hier vorgelegten Studien unterstellt wird, gilt natürlich nur mit der Einschränkung, dass Veränderungen in der tonischen GABAergen Inhibition im epileptischen Gewebe nicht durch andere pathologische Prozesse nivellierend kompensiert werden. Wenn auch, wie beschrieben, hierfür keinerlei Hinweise gefunden wurden.

Gerade die Veröffentlichungen sich scheinbar widersprechender Ergebnisse geben ein Zeugnis von der Komplexität der GAT vermittelten Wirkung auf die GABAerge Inhibition. Zusammen mit den Befunden, die eine vornehmlich antikonvulsive Wirkung von GAT Proteinen vermuten, insbesondere eine zeitliche Verlängerung der GABAergen synaptischen Transmission (Dingledine et al., 1985; Roepstorff et al., 1992; Thompson et al., 1992; Isaacson et al., 1993; Draguhn et al., 1996; Engel et al., 1998.; Overstreet et al., 1999), ergibt sich letztlich kein monokausaler Zusammenhang der GAT-Funktion im Bezug zur Epilepsie.

#### **4.2. Persistierende Pathologie in nicht-rekurrenten neuronalen Verbindungen.**

Eine der am häufigsten zitierten Hypothesen zur Entstehung von epileptischen Anfallsereignissen ist die, dass die für die Epilepsie typische Hypersynchronisation des Nervengewebes durch ein Umkippen der Balance zwischen Inhibition und Exzitation erklärt werden kann (Sloviter, 1987; Nakajima et al., 1991; Jefferys et al., 1996; Bernard et al., 1999; Maglóczky et al., 2000; Andre et al., 2001). Diese tendenziell bildhafte Anschauung soll kein, wie auch immer geartetes, feststehendes Grundverhältnis zwischen Inhibition und Exzitation im gesamten Nervengewebe postulieren, sondern weist auf ein Abweichen von einem funktionalen zu einem pathologischen Verhältnis zwischen Inhibition und Exzitation hin. Die Balance-Hypothese wird gestützt durch Studien an gesundem Gewebe mit experimentell induzierten Verringerungen der inhibitorischen oder Steigerungen der exzitatorischen Transmission. Als Folge der Manipulationen traten auch im gesunden Gewebe epileptiforme, synchrone Entladungen auf, wie man sie bereits in vivo beobachtet hatte (Johnston et al., 1981; Traub et al., 1982; Karnup et al., 2001). Man nimmt dabei an, dass die Exzitation

während eines Anfallereignisses temporär und fokal zunimmt und zu einer mehr oder minder starken Ausweitung der Synchronisation beiträgt.

Als pathophysiologisches Korrelat einer Verschiebung der Balance zugunsten der Exzitation wurden immer wieder exzitatorische Neurone auf eine erhöhte Exzitation und inhibitorische Neurone auf eine verringerte Inhibition im epileptischen Gewebe untersucht (Sloviter, 1987; Williams et al., 1993; Williamson et al., 1995; Vida et al., 1998; Cossart et al., 1999; Hirsch et al., 1999; Wierenga et al., 1999; Andre et al., 2001; Dinocourt et al., 2003). Auf diese Weise sucht man sozusagen nach den Zellen, die die Hypererregbarkeit initiieren und auf die umliegenden exzitatorischen Neurone übertragen. Die komplexe Konnektivität des Nervengewebes macht es aber nach wie vor schwer, einer postulierten pathologischen Veränderung in der Balance zwischen Inhibition und Exzitation eine eindeutig prokonvulsive Wirkung zuzuschreiben. In vielen Fällen sind exzitatorische Neurone mit inhibitorischen Interneuronen direkt und rekurrent verbunden. In solchen neuronalen Netzwerken führt beispielsweise eine erhöhte Aktivität von exzitatorischen Neuronen auch zu einer erhöhten Aktivierung der inhibitorischen Neurone, welche wiederum die exzitatorischen Neurone verstärkt inhibiert (Morimoto et al., 2004). Das paradoxe Resultat ist eine Art Neutralisation, jedenfalls keine selbstverständliche Erklärung für eine temporär auftretende Hypererregbarkeit des Nervengewebes. Um dieser Krux zu entgehen, wurden in der hier vorliegenden Arbeit solche Interneurone untersucht, die nicht-rekurrent mit exzitatorischen Neuronen verbunden sind: Interneurone aus der Grenzschicht zwischen Stratum radiatum und Stratum lacunosum moleculare (SRL-Interneurone) in der der hippocampalen CA1-Struktur (Lacaille et al, 1988a; Cobb et al, 1997; Bertrand et al, 2001). Unter Verwendung des Pilocarpin-Modells für Temporallappenepilepsie (TLE) wurden die SRL-Interneurone elektrophysiologisch und morphologisch charakterisiert. Afferente Signale wurden als inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSC) und exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSC) gemessen. Die resultierende Aktivität der SRL-Interneurone wurde als Aktionspotential-Frequenz (AP-Frequenz) aufgezeichnet. Afferenzen und AP-Frequenz wurden anschließend zwischen Interneuronen aus gesundem und epileptischem Gewebe quantitativ und qualitativ verglichen. Abschließend wurden die elektrophysiologisch gewonnen Daten mit der morphologischen Charakterisierung verglichen. Gesucht wurde nach Unterschieden zwischen pathologischem Gewebe und Kontrollgewebe, welche auch noch bis zu 40 Wochen nach der Induktion des Status epilepticus persistierten.

#### 4.2.1. Verminderte inhibitorischer Innervation in SRL-Interneuronen im epileptischen Gewebe.

Die Frequenz der mIPSCs und sIPSCs war sowohl im Mittelwert, als auch in der kumulativen Betrachtung signifikant im epileptischen Gewebe verringert. Die Mittelwerte der Amplituden waren von dieser Veränderung nicht betroffen. Die kumulative Betrachtung der Amplituden wies für die sIPSC's eine pathologisch verminderte Anzahl von Amplituden zwischen 15 – 40 pA auf. Die kumulative Betrachtung der mIPSC-Amplituden zeigte hingegen keine Veränderung zwischen Kontroll- und epileptischem Gewebe. Weder für mIPSCs noch für sIPSCs konnte ein Unterschied in der Kinetik zwischen beiden Testgruppen festgestellt werden.

Die exzitatorische Innervation der SRL-Interneurone wurde als mEPSCs aufgezeichnet. Weder für die Frequenz, noch für die Amplitude der gemessenen mEPSCs konnte ein Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Pilocarpingruppe festgestellt werden. Auch die Halbwertsbreite der mEPSCs differierte nicht zwischen beiden Testgruppen. Auf die Aufzeichnung spontaner EPSCs (sEPSC) in denselben Interneuronen, in denen auch die mEPSCs, mIPSCs und sIPSCs aufgezeichnet wurden, musste aus methodischen Gründen verzichtet werden (siehe 2.2.3.1.). In Vorversuchen, bei denen die Trennung inhibitorischer und exzitatorischer Potentiale allein durch die Wahl des Haltepotentials erfolgte, somit kein Gabazin (GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonist) eingesetzt wurde, konnten auch sEPSC gemessen werden. In diesen Versuchen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Frequenz und Amplitude der sEPSC (+ sIPSC) zwischen Interneuronen aus epileptischem und Kontrollgewebe festgestellt werden.

Aus dem Verhältnis mEPSC / mIPSC ließ sich für die Frequenz der PSCs eine Verschiebung der Balance zwischen Inhibition und Exzitation zugunsten der Exzitation von  $\Delta +281\%$  in SRL-Interneuronen aus epileptischen Gewebe, im Vergleich zum Kontrollgewebe ableiten. Die Verhältnisse sIPSC / mIPSC-Frequenz waren im Kontrollgewebe und im mit Pilocarpin behandelten Gewebe identisch.

Zudem zeigten SLR-Interneurone aus epileptischem Gewebe eine um  $\Delta +223\%$  erhöhte AP-Frequenz. Ansonsten wurde für keinen der messtechnischen Parameter, wie Serien- und Eingangswiderstand oder die Rauschamplitude ein Abweichen zwischen beiden Testgruppen festgestellt. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die festgestellten Abweichungen zwischen Kontroll- und Pilocarpingruppe auf methodische oder analytische Abweichungen zurückzuführen waren.

Morphologische Abweichungen im epileptischen Gewebe wurden, durch Neurobiotin-Markierung und dreidimensionale Rekonstruktion der elektrophysiologisch charakterisierten SRL-Interneurone, mittels Sholl-Analyse untersucht. Hier zeigten SRL-Interneurone im Vergleich zu SRL-Interneuronen aus dem Kontrollgewebe eine erhöhte Anzahl (+35%) dendritischer Verzweigungen und eine abweichende Orientierung der Dendriten von radial nach horizontal. Neurobiotin-Farbstoffkopplung wurde für 4 Kontrollzellen und 12 Zellen aus epileptischem Gewebe festgestellt. Darüber hinaus wurden im gesunden und epileptischen Gewebe mikroskopische Zellzählungen durchgeführt. Dabei wurde ein Verlust von Zellen pro Auszählungsvolumen festgestellt. Für das Stratum oriens und Stratum pyramidale erwies sich der Zellverlust zwischen Kontroll- und Pilocarpingruppe als signifikant. Im Stratum radiatum und Stratum lacunosum moleculare, den Schichten in denen sich die SRL-Interneurone befinden, konnte keine pathologisch veränderte Zelldichte festgestellt werden.

#### **4.2.2. Prä- oder postsynaptischer Effekt?**

Prinzipiell lässt sich die verminderte inhibitorische Innervation der SRL-Interneurone aus epileptischem Gewebe auf zwei Ursachen zurückführen - eine pathologische Veränderung in der präsynaptischen Zelle und / oder in der postsynaptischen Zelle. Postsynaptisch ist bereits eine pathologische Veränderung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im epileptischen Gewebe beschrieben. Und zwar sowohl im humanen Gewebe, wie in Epilepsie Tiermodellen (Wolf et al., 1994; Kamphuis et al., 1995; Buhl et al., 1996; Gibbs et al., 1997; Schwarzer et al., 1997; Brookas-Kayal et al., 1998; Sperk et al., 1998; Shumate et al., 1998; Bouilleret et al., 2000; Loup et al., 2000). Weniger, mehr oder strukturell veränderte GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren haben vor allem einen Einfluss auf die Amplitude einzelner IPSCs, durch ein Weniger oder Mehr an Chloridleitfähigkeit, beziehungsweise eine veränderte IPSC-Kinetik. Die IPSC-Kinetik in der hier vorgelegten Studie, gemessen als Halbwertsbreite war aber weder für mIPSCs noch sIPSCs zwischen Kontroll- und Pilocarpin-Gruppe verändert. Und auch die Mittelwerte der Amplituden für mIPSCs und sIPSCs differierten nicht zwischen beiden Testgruppen. Als Ursache für die verminderte inhibitorische Innervation der SRL-Interneurone können postsynaptische Veränderungen an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren nahezu ausgeschlossen werden. Dieser Ausschluss als Ursache der verminderten Inhibition ist selbstverständlich nicht gleichbedeutend damit, dass eine Veränderung an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren nicht unabhängig von der pathologisch verminderten Inhibition stattgefunden haben könnte. Da die IPSC-Halbwertsbreiten kein Indiz für eine solche Pathologie erkennen ließen, müsste man dann von einer durch kompensatorische Mechanismen maskierten Veränderung der GABA<sub>A</sub>-

Rezeptoren ausgehen. Einen Sonderfall postsynaptischer Veränderungen stellen pathologisch induzierte Autapsen dar. Cobb und Kollegen (1997) fanden im Stratum lacunosum moleculare gesunden, hippocampalen CA1-Gewebes, in zwei untersuchten Interneurontypen, bei 12 von 12 Korbzellen und 6 von 6 Interneuronen mit symmetrischem Dendritenmuster (beschrieben als „bistratified“) elektronenmikroskopisch identifizierte Autapsen (Cobb et al., 1997). Der pathologische Verlust von Autapsen an einem Interneuron könnte eine verminderte Inhibition auch durch postsynaptische Ursachen erklären. Allerdings wäre dies ein überraschender Befund, da man eher annimmt, dass durch „sprouting“-Mechanismen (siehe 4.2.4) tendenziell neue und mehr Autapsen entstehen (Lehmann et al., 2001; Cavazos et al., 2004).

Inwieweit die mehr als verdoppelte AP-Frequenz in SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe auf eine Veränderung in den SRL-Interneuronen selbst zurückzuführen war, konnte hier nicht beurteilt werden. Da aber auch die Aktionspotential-Schwelle keinen Unterschied zwischen Kontroll- und Pilocarpin-Gruppe aufzeigte, muss man davon ausgehen, dass ein nicht unerheblicher Anteil an der Erhöhung der AP-Frequenz auf die verminderte Inhibition der SRL-Interneurone zurückzuführen war. Eine pathologische Veränderung der Aktionspotentialschwelle in Zusammenhang mit einer veränderten Funktion oder Abundanz von Natriumkanälen wurde bisher nur für exzitatorische Zellen beschrieben (Vreugdenhil, et al., 1998; Ketelaars et al., 2001; Ellerkmann et al., 2003).

In der Summe sprechen die hier vorgelegten Befunde gegen eine postsynaptische Ursache der verminderten Inhibition bei SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe.

#### **4.2.3. Präsynaptische Ursachen verminderter inhibitorischer Innervation.**

Weshalb wurden SRL-Interneurone im epileptischen Gewebe weniger stark inhibiert als die SRL-Interneurone im Kontrollgewebe? Ließen sich diese Unterschiede ursächlich eher auf eine verringerte systemische Inhibition oder eher auf zelluläre, Mechanismen in den afferenten Interneuronen zurückführen? Der festgestellte Zelltod in CA1 könnte, soweit er sich auf inhibitorische Afferenzen der SRL-Interneurone bezieht, einen solchen Netzwerk-Effekt darstellen. Eine Reduktion der inhibitorischen Afferenzen würde die festgestellte Reduktion der sIPSC- und mIPSC-Frequenzen bei gleich bleibenden Amplituden-Mittelwerten erklären. Allerdings gilt diese Vermutung nur im Sinne einer Hypothese. Die somatische Ganzzelleableitung an den SRL-Interneuronen machte eine Beurteilung der afferenten inhibitorischen Zellen nicht möglich. So könnte beispielsweise die signifikant verringerte Repräsentanz für sIPSC-Amplituden im Bereich zwischen 15 bis 40 pA im epileptischen Gewebe sowohl durch intrazelluläre Veränderungen in afferenten

Interneuronen, als auch durch das Absterben afferenter Interneurone erklärt werden. Dass die mIPSC-Messungen, im Gegensatz zu den sIPSC Messungen, keinen Unterschied der kumulativen Verteilung der mIPSC-Amplituden erkennen ließen, kann aber als Indiz gegen intrazelluläre Veränderungen in den afferenten Interneuronen aufgefasst werden. Eine Verminderung in der Frequenz der spontanen, quantalen Freisetzung von Transmittern, wie es bei den mIPSC-Messungen festgestellt wurde, ist kompatibel mit der Zelltodtheorie. Bei einer gleich bleibenden Anzahl afferenter Interneurone, würde man hingegen keine Verringerung der mIPSC-Frequenz erwarten, da es sich dabei um stochastische Effekte handelt, die, soweit bekannt, unabhängig von Aktionspotentialen auftreten. Allerdings ist die physiologische Funktion der quantalen Transmitterfreisetzung bisher noch weitestgehend ungeklärt (Sutton et al., 2004). Die Unabhängigkeit der mIPSCs von Aktionspotentialen lässt deshalb nur eingeschränkte Aussagen über Netzwerkeffekte zu. Nichtsdestotrotz, kann das nahezu konstante Verhältnis mIPSC / sIPSC-Frequenz, im pathologischen wie im gesunden Gewebe, als ein weiteres Indiz für eine systemische Ursache der Verminderung der inhibitorischen Innervation der SRL-Interneurone im epileptischen Gewebe gewertet werden. Wenn sich z.B. durch Zelltod die Zahl der afferenten Interneurone halbieren würde, so würde sich das gleichmäßig auf die mIPSC- und sIPSC-Frequenzen auswirken, genauso, wie es in der hier vorgelegten Studie beobachtet wurde. Bei gleich bleibender Anzahl an Afferenzen, wäre die lineare Reduktion der mIPSCs im Vergleich zu den sIPSCs zumindest sehr überraschend. Theoretisch könnte die verminderte inhibitorische Innervation auch durch depolarisierende, exzitatorische GABA-Wirkung erklärt werden, was auch im Zusammenhang mit Epilepsie diskutiert wird (Cohen et al., 2002; Köhling, 2002; Woo et al., 2002; Velasques et al., 2003). Durch die Applikation des GABA<sub>A</sub>-Antagonisten Gabazin während der Messung der EPSCs konnte diese These in der hier vorgelegten Arbeit nicht überprüft werden. Man kann aber trotzdem vermuten, dass eine pathologische Umkehr inhibitorischer Innervation in exzitatorische Innervation durch eine depolarisierende Wirkung von GABA zu einer insgesamt erhöhten exzitatorischen Innervation hätte führen müssen. Insbesondere wäre eine Zunahme der EPSC-Frequenz in SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe eine logische Folge. Aber selbst wenn man unterstellt, dass eine exzitatorische Wirkung von GABA durch kompensatorische Effekte ausgeglichen wurde, müsste sich die exzitatorische GABA-Wirkung in der Kinetik der entsprechenden EPSCs widerspiegeln. Denn die durchschnittliche Halbwertsbreite der GABAergen IPSCs war doppelt so lang wie die der durchschnittlichen EPSCs. Die exzitatorische Innervation in SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe

wurde aber in Amplitude, Frequenz und Halbwertsbreite der EPSCs als unverändert gemessen.

Dass sich die exzitatorische Innervation in keinem der gemessenen Parameter zwischen Kontroll- und epileptischem Gewebe unterschieden hat, könnte von der Zelltothypothese nur durch ein selektives Absterben von Interneuronen im pathologischen Gewebe erklärt werden. Die Hypothese eines selektiven Zelltods von Interneuronen im epileptischen Gewebe im Zusammenhang mit Epilepsie wird im Kapitel 4.2.6. besprochen.

#### **4.2.4. „Sprouting“-Prozesse in CA1 Stratum radiatum / Stratum lacunosum moleculare.**

Die nachfolgenden Beschreibungen zum Ausmaß des Zelltods in epileptischem Gewebe können nur als Abschätzung verstanden werden. Zellzählungen an markierten oder unmarkierten Zellen finden üblicherweise in Gewebeschnitten statt. Dies ist nicht zuletzt auch den Einschränkungen mikroskopischer Verfahren geschuldet. Die Präparation und Aufbewahrung der Gewebeschnitte führt jedoch ebenfalls zu Zellschädigung bis hin zum Zelltod (Schwartzkroin et al., 1986; Lipton et al., 1995; Aitken et al., 1995; Richerson et al., 1995; Croning et al., 1998). Bezüglich Präparation und Aufbewahrung der Gewebeschnitte wurde nicht zwischen Kontroll- und Pilocarpin- behandeltem Gewebe unterschieden. Der sekundäre, durch die Präparation verursachte Zelltod sollte also das Kontrollgewebe wie das epileptische Gewebe gleichermaßen betroffen haben. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Pilocarpin-Behandlung einen zusätzlichen negativen Faktor auf das Überleben bereits vorgeschädigter Zellen aus epileptischem Gewebe ausübte (Schwartzkroin et al., 1986; Richerson et al., 1995).

Sowohl in humanem, epileptischem Gewebe (Tauck et al., 1985; Ben-Ari, 1985; Sutula et al., 1989; Houser et al., 1990; Babb et al., 1990), als auch in Tiermodellen der Epilepsie (Cronin et al., 1988; Sutula et al., 1988; Cavazos et al., 1990; Mello et al., 1993; Cavazos et al., 2004) wurde ein massiver Zellverlust, einhergehend mit Veränderungen im Verschaltungsmuster der überlebenden Neurone beobachtet. Die pathophysiologische Konsequenz veränderter axonaler und dendritischer Wachstumsprozesse wurde bereits sehr früh beschrieben (Zurabashvili et al., 1965). Es wird vermutet, dass Neurone, deren Innervation teilweise durch das Absterben innervierender Fasern beeinträchtigt ist, mit einem Mechanismus reagieren, den man „sprouting“ nennt (Nadler et al., 1980; Frotscher et al., 1983). Unter „sprouting“ im Zusammenhang mit Epilepsie versteht man vor allem eine Veränderung des axonalen und dendritischen Verzweigungsmusters der überlebenden Neurone, angeregt durch die Suche nach neuen Kontakten zu anderen überlebenden Neuronen (Sutula et al., 1988; Melo et al.,

1983; Sloviter et al., 1994; Prince et al., 1997; Dalby et al., 2001; Sutula et al., 2003;). Im Pilocarpin-Modell für Temporallappenepilepsie findet ein ausgeprägter Zellverlust statt, so wie er auch in schwer geschädigtem humanem epileptischem Gewebe zu beobachten ist (Turski et al., 1989; Mello et al., 1993; Arida et al., 1999). Auch in der hier vorgelegten Arbeit wurde der durch die Pilocarpin-Behandlung eingetretene Zellverlust abgeschätzt. Dabei zeigte sich, dass die jeweils vier homologen Schichten der CA1- und CA3-Struktur in ähnlicher Weise vom Zelltod betroffen waren. Der größte Verlust an Zellen wurde im Stratum oriens mit ca. -45 % im Vergleich zum Kontrollgewebe festgestellt. In absteigender Ausprägung waren das Stratum pyramidale (ca. -30 %) und das Stratum radiatum (ca. -20%) vom Zellsterben in epileptischem Gewebe betroffen. Im Stratum lacunosum moleculare konnte überhaupt keine verminderte Zelldichte festgestellt werden. Signifikant war nur der Zellverlust im Stratum oriens und Stratum pyramidale. Der gefundene zellschichtspezifische Zellverlust deckt sich weitestgehend mit dem, was auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde. Für CA1 Pyramidenzellen wurde berichtet, dass die Überlebensrate vom Ausmaß der Sklerotisierung des Gewebes abhängt. In geringfügig sklerotisiertem Gewebe wurde fast kein Pyramidenzellverlust festgestellt, in sehr stark sklerotisiertem Gewebe eine Verlust bis zu 90% aller Calbindin-positiven, putativen Pyramidenzellen (Wittner et al., 2002). Cossart, Dinocourt sowie Esclapez und Kollegen berichten von einem 50%igen Verlust an Interneuronen im Stratum oriens (Esclapez et al., 1997; Cossart et al., 2001; Dinocourt et al., 2001). Cossart und Kollegen untersuchten die Synapsendichte im Stratum lacunosum moleculare. In dieser Schicht bilden die Interneurone aus dem Stratum oriens Synapsen mit den apikalen Dendriten der CA1 Pyramidenzellen, weshalb sie auch OLM-Interneurone genannt werden. Trotz des Absterbens der Hälfte aller OLM-Interneuronen im Stratum oriens fanden Cossart und Kollegen keine verringerte Synapsendichte im Stratum lacunosum moleculare. Berücksichtigt man den Verlust von Synapsen zwischen OLM-Interneuronen und CA1 Pyramidenzellen, ergibt sich über die Synapsendichte im Stratum lacunosum moleculare kein Hinweis auf ein Zellsterben in dieser Schicht, sondern auf eine Zunahme synaptischer Verbindungen unbekannter Herkunft. Morin und Kollegen fanden ebenfalls Hinweise auf eine erhöhte Dichte inhibitorischer somatischer Synapsen im epileptischen Gewebe (Morin et al., 1999).

Zur Bestimmung einer pathologischen Veränderung im dendritischen Verzweigungsmuster der SRL-Interneurone wurden die elektrophysiologisch charakterisierten Interneurone mit Neurobiotin markiert. Durch eine dreidimensionale Rekonstruktion der Zellen wurde mittels Sholl-Analyse (siehe 2.1.7.) das Verzweigungsmuster der Zellen analysiert. Mit Pilocarpin

behandelte Tiere zeigten in ihren SRL-Interneuronen eine um ca. +35 % signifikant erhöhte dendritische Verzweigungsrate. Und auch das Verzweigungsmuster hatte sich deutlich verändert. SRL-Interneurone aus epileptischem Gewebe wiesen im Durchschnitt ca. 70 % horizontale und 30 % radiale Verzweigungen auf. Interneurone aus Kontrollgewebe zeigten eine ausgeglichene bis leicht umgekehrte Verzweigungspräferenz, hier wurden ca. 40 % horizontale und ca. 60 % radiale Verzweigungen gezählt.

Die elektrophysiologische und morphologische Charakterisierung der SRL-Interneurone aus epileptischem Gewebe lieferte Indizien, dass SRL-Interneurone vom Zelltod der sie innervierenden Interneurone betroffen waren. Die Folge war ein verändertes dendritisches Verzweigungsmuster und eine verringerte inhibitorische Innervation. Die Balance zwischen Inhibition und Exzitation dieser Zellen war auf afferenter Seite im Vergleich zu Kontrollzellen zugunsten der Exzitation verschoben, und diese Verschiebung führte wiederum vermutlich zu einem signifikanten Anstieg der AP-Frequenz. Eine Korrelation der morphologischen Veränderung mit den elektrophysiologischen Veränderungen einzelner Interneurone aus epileptischem Gewebe zeigte aber, dass zwischen Morphologie und veränderter inhibitorischer Innervation kein direkter Zusammenhang hergestellt werden konnte. Die Interneurone wiesen als Gruppe eine signifikante und plausible pathologische Veränderung auf, die sich auf der Ebene einzelner Interneurone nicht mehr nachvollziehen ließ. Warum? Die Signalkaskade die zur Apoptose und zu „sprouting“-Mechanismen führt, ist noch weitestgehend unbekannt, wenn (siehe unten), überhaupt ein direkter Zusammenhang besteht. Fest steht, dass für das „sprouting“, in das extrazelluläre Medium freigesetzte Neurotrophine (NGF, BDNF, NT-3, GDNF) eine entscheidende Rolle spielen (Ernfors et al., 1991; Kokaia et al., 1996; Dudek et al., 2002). Diese biochemischen Signalträger diffundieren durch die extrazelluläre Matrix und stellen somit, im Gegensatz zu synaptischen Prozessen, einen unspezifischen Signalübertragungs-Mechanismus dar. Es ist möglich, dass sich einige Neurone unabhängig vom Verlust ihrer Afferenzen veränderten, weil sie mit unspezifisch diffundierenden Neurotrophinen wechselwirkten. Außer den Neurotrophinen dürften aber noch weitere Proteine die apoptotische Signalkaskade erweitern und verkomplizieren. Angaben über differentiell expremierte Gene zwischen gesundem und krankem Gewebe schwanken beträchtlich. Zwischen 12 Genen im Kindling-Modell für Epilepsie (Liang et al., 2001); 92 Genen im Kainat-Modell für Epilepsie (Hendriksen et al., 2001); 282 Genen bei durch elektrischer Stimulation verursachter Epilepsie (Lukasiuk et al., 2003) bis hin zu 700 Genen allein in CA1 im Pilocarpin-Modell für Epilepsie (Becker et al., 2003). Bisher ist es

noch nicht gelungen aus dem Ensemble differentiell exprimierter Gene einen apoptotischen Mechanismus zu rekonstruieren (Morimoto et al., 2004).

Ob „sprouting“-Mechanismen ursächlich-prokonvulsiv (Sloviter, 1991; Buckmaster et al., 2002; Sayin et al., 2003; Cavazos et al., 2004) oder kompensatorisch-antikonvulsiv (Sloviter, 1992; Raol et al., 2003.) oder gar für Epilepsie irrelevant (Longo et al., 1997; Buckmaster, 2004) sind, ist nach wie vor umstritten. Pathologische „sprouting“-Prozesse wurden auch für CA1-Pyramidenzellen festgestellt, allerdings ohne Konsequenz auf die Balance zwischen Inhibition und Exzitation in den Pyramidenzellen (Lehmann et al, 2001; Perez et al, 1996). Esclapez und Kollegen wiesen aberante Axon-Kollateralen von CA1-Pyramidenzellen aus epileptischem Gewebe im Stratum lacunosum moleculare nach, konnten aber keinen Effekt auf OLM-Interneurone feststellen (Esclapez et al., 1999). Und auch in der hier vorgelegten Studie wurde keine veränderte afferente Exzitation der SRL-Interneuronen festgestellt. Longo und Kollegen nutzen Cyclohexamide, Proteine, die als Biosynthese-Inhibitoren „sprouting“-Prozesse im epileptischen Gewebe blockieren. Doch weder im Pilocarpin-, noch im Kainat-Modell für Temporallappenepilepsie (TLE) reduzierte sich die Anfallshäufigkeit. Longo und Kollegen stellten deshalb einen direkten Zusammenhang zwischen „sprouting“ und Epilepsie auf ursächlicher Ebene in Frage (Longo et al., 1997). Buckmaster blockierte mit Tetrodotoxin innerhalb der ersten drei Tage nach der initialen Pilocarpin-Applikation im Pilocarpin-Modell das Auftreten hypererregter Neurone *in vivo*. Durch eine anschließende morphologische Untersuchung stellte er im Gyrus dentatus den Verlust von Interneuronen und das Auftreten von „sprouting“ fest, so wie man es üblicherweise als Folge der Pliocarpin-Wirkung erwartet. Dieses Experiment warf die Frage auf, ob Hypererregbarkeit überhaupt initial zu Zelltod und „sprouting“ führt (Buckmaster, 2004).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass weder in Stratum radiatum noch im Stratum lacunosum moleculare innerhalb von CA1 in der hier vorgelegten Studie ein signifikanter Hinweis auf Zelltod-Ereignisse im epileptischen Gewebe gefunden wurde. Dieser Befund deckt sich weitestgehend mit anderen Veröffentlichungen zu diesem Thema. Die SRL-Interneurone zeigten eine pathologische Veränderung in ihrem vornehmlich dendritischen Verzweigungsmuster. Eine Korrelation zwischen den morphologisch und elektrophysiologisch festgestellten Veränderungen im epileptischen Gewebe konnte nicht festgestellt werden.

Im Stratum radiatum und Stratum lacunosum moleculare wurden Interneurone beschrieben, die ausschließlich andere Interneurone inhibieren (Freund et al., 1996; Gulyàs et al., 1996)

und solche die nicht-rekurrent die CA1 Pyramidenzellen inhibieren. Zu welchem Typ gehörten die SRL-Interneurone in der hier vorgelegten Studie?

#### 4.2.5. Interneuronen-spezifischer Zelltod im epileptischen Gewebe.

Die Klassifikation von Neuronen folgt keinem einfachen Schema. CA1-Neurone wurden nach a) Kalzium bindenden Proteinen, b) Expression von Neurotrophinen, c) Efferenzen, d) Afferenzen, e) Lage der Somata, f) Expression von Glutamatrezeptoren, g) elektrophysiologischen Eigenschaften, h) nach dem Erscheinungsbild ihrer Dendriten, i) nach der Projektion ihrer Dendriten und j) nach ihrem Aussehen (Größe, Silhouette) charakterisiert (Sik et al., 1995). Im Zusammenhang mit Epilepsie wurde die Anatomie und Konnektivität von Interneuronen überwiegend nach dem Vorkommen verschiedener kalziumbindender Proteinen klassifiziert. Dieser Umstand ist vor allem der Beobachtung geschuldet, dass das Überleben von Neuronen und Interneuronen von der Pufferkapazität für Kalziumionen durch verschiedene kalziumbindende Proteine beeinflusst wird (Meldrum, 1981; Griffith et al., 1982; Sloviter, 1987; Sloviter, 1989). In der hier vorliegenden Arbeit ist eine solche Klassifikation nicht systematisch gelungen, da sich die Penetration der Antikörper zum Nachweis kalziumbindender Proteine, im adulten epileptischen Gewebe der Ratte als nicht ausreichend erwies. So konnte nicht festgestellt werden, ob einzelne, auf den Gehalt kalziumbindender Proteine untersuchte Interneurone, nicht positiv markiert waren, weil die Antikörper-Penetration nicht ausreichte, oder weil sie tatsächlich für dieses kalziumbindenden Protein als negativ einzustufen waren. Die Lokalisation kalziumbindender Proteine in der hippocampalen CA1 Struktur wurde in vielen Veröffentlichungen beschrieben, dabei treten Abweichungen lediglich in Aussagen zur zellschichtspezifischen Dichte einzelner kalziumbindender Proteine auf (Tab.7). Für CA1 ergibt sich im gesunden Gewebe folgendes Bild:

- **Calbindin**-positive Neurone befinden sich hauptsächlich im Stratum oriens und Stratum radiatum (Celio, 1990; Sloviter et al., 1989; Tòth et al., 1992). Calbindin-positive Interneurone wurden bereits mehrfach als resistent gegen durch Epilepsie verursachten Zelltod beschrieben und zwar sowohl in humanem epileptischen Gewebe für CA1 (Wittner et al., 2002;) wie auch im humanen Gyrus dentatus (Sloviter et al., 1991; Maglóczky et al., 2000; Suckling et al., 2000), als auch in Tiermodellen für Epilepsie in CA1 (Sloviter, 1989; Freund et al., 1991; Houser, 1990; Maglóczky et al., 1993; Maglóczky et al., 2000; Suckling et al., 2000; Freund et al., 2001). Allerdings gibt es für Calbindin auch Hinweise auf eine

veränderte Immunoreaktivität im epileptischen Gewebe (Montpied et al., 1995; Magloczky et al., 1997).

- **Parvalbumin**-positive Neurone finden sich hauptsächlich im Stratum pyramidale und Stratum oriens aber auch im Stratum radiatum (Kosaka et al., 1987; Katsamura et al., 1988; Celio et al., 1990; Sloviter et al., 1989) Im Zusammenhang mit Epilepsie wurde eine Reduktion der Parvalbumin-Immunoreaktivität im Stratum radiatum um 70 – 97 % gefunden (Best et al., 1993, Scotti et al., 1997; van Vliet et al., 2004).

- **Calretinin**-positive Interneurone, die hauptsächlich andere Interneurone inhibieren, finden sich vor allem im Stratum lacunosum moleculare und Stratum radiatum (Gulyàs et al., 1992; Gulyàs et al., 1996). Im Zusammenhang mit Epilepsie wurde eine Reduktion der Calretinin-Immunoreaktivität im Stratum radiatum festgestellt (van Vliet et al., 2004).

- **Somatostatin**-positive Interneurone befinden sich ausschließlich im Stratum oriens und Stratum pyramidale (Kosaka et al., 1988; Somogyi et al., 1984; Kunkel et al 1988). Eine pathologische Reduktion von Somatostatin-immunoreaktiven Interneuronen wurde im Stratum oriens / alveus beobachtet (Esclapez et al., 1997, Tuunanen et al., 1997; Cossart et al., 2001; Dinocourt et al., 2003).

	<b>Stratum oriens</b>	<b>Stratum pyramidale</b>	<b>Stratum radiatum</b>	<b>Stratum lacunosum</b>
<b>Calbindin</b>	+		+	
<b>Parvalbumin</b>	++	++ / -	+ / ---	+
<b>Calretinin</b>			+ -	+
<b>Somatostatin</b>	+ -	+		

**Tab. 7. Diversität von Neuronen und Immunoreaktivität kalziumbindender Proteine in CA1.**

In CA1 kommen kalziumbindende Proteine in Neuronen der vier Zellschichten in unterschiedlicher Ausprägung vor. Zwei Pluszeichen verweisen auf ein ausgeprägtes Vorkommen, ein Pluszeichen auf ein prinzipielles Vorkommen in den entsprechenden Zellschichten. Ein Verlust von Immunoreaktivität für kalziumbindende Proteine im Zusammenhang mit Epilepsie wurde ebenfalls in CA1 nachgewiesen. Zwei rote Minuszeichen zeigen einen ausgeprägten Verlust an (50 % und mehr), ein Minuszeichen einen prinzipiellen Verlust an Immunoreaktivität.

Das Stratum lacunosum moleculare ist bisher die einzige CA1-Zellschicht, in der sich kein Zusammenhang zwischen Epilepsie und Verlust von Immunoreaktivität kalziumbindender Proteine ergibt (Esclapez et al, 1997; Andre et al., 2001; van Vliet et al., 2004). Bestätigt sich dieser Verdacht, würde man vermuten, dass die SRL-Interneurone im gesunden Gewebe

Parvalbumin- oder Calretinin-positiv waren. Bereits durch die Beschreibung der Immunoreaktivität wird die Unterstellung eines direkten Zusammenhangs zwischen Zelltod und kalziumbindenden Proteinen schon rein sprachlich vermieden. Sind beispielsweise Calretinin-positive Interneurone auch noch im epileptischen Gewebe als Calretinin-positiv identifizierbar? Es existieren Hinweise darauf, dass ein Verlust der Immunoreaktivität tatsächlich nur die entsprechenden Proteine betreffen könnte, aber nicht die Neurone. Sloviter und Kollegen konnten zeigen, dass ein Verlust von Parvalbumin-Immunoreaktivität nicht mit einem Verlust von Interneuronen im epileptischen Gyrus dentatus einhergeht (Sloviter et al., 2003). Im Kindling-Modell für Epilepsie wurde sowohl eine Erhöhung der Somatostatin codierenden mRNA (Shinoda et al., 1989; Bendotti et al., 1993), als auch eine erhöhte Somatostatin-Immunoreaktivität im pathologischen Gewebe festgestellt (Shinoda et al., 1989; Wanscher et al., 1990; Vezzani et al., 1996). Buckmaster und Dudek beobachteten im Hilus des Gyrus dentatus den Verlust von Somatostatin-Immunoreaktivität im Kainat-Modell für TLE. Eine Ableitung von den Körnerzellen, auf die die Hilus-Interneurone projizieren zeigte, dass die Körnerzellen stärker inhibiert wurden, als im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe. Buckmaster und Dudek führten die erhöhte Inhibition der Körnerzellen eher auf „sprouting“-Prozesse zurück, einer pathologischen Überkompensation des Zelltods unter Hilus-Interneuronen (Buckmaster et al., 1997). Denkbar ist allerdings auch, dass die Hilus-Interneurone unter pathologischen Bedingungen nicht sterben, sondern einfach nur weniger Somatostatin exprimierten. In jedem Fall muss man konstatieren, dass der Verlust von Immunoreaktivität nicht mit Zelltod gleichzusetzen ist. Möglicherweise lagen die Schwierigkeiten bei der Charakterisierung der SRL-Interneurone nach ihrer Immunoreaktivität für kalziumbindende Proteine, in der hier beschriebenen Arbeit, auch zum Teil daran, dass sich die Immunoreaktivität unabhängig vom Zelltod in epileptischem Gewebe veränderte. Unabhängig von der Klassifikation der Interneurone, gibt es darüber hinaus Hinweise darauf, dass auch eine als identisch beschriebene Morphologie von Interneuronen im gesunden Gewebe, nicht gleichbedeutend ist mit einer ähnlichen GABAergen Inhibition durch diese Interneurone (Hajos et al., 1997).

Interneurone in der Grenzschrift zwischen Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare wurden überwiegend als Interneurone mit horizontal orientierten dendritischen Verzweigungen beschrieben (Kunkel et al., 1988; Lacaille et al., 1988b; Williams et al., 1994; Freund et al., 1996). Unter den SRL-Interneuronen wurde lediglich eine Gruppe als Interneurone mit überwiegend radiärem dendritischem Verzweigungsmuster beschrieben, die Calretinin-positiven Interneurone, die ausschließlich andere Interneurone inhibieren. Alle

andere SRL-Interneurone wurden mit horizontal verzweigenden Dendriten beschrieben (Freund et al., 1996; Gulyàs et al., 1996). In der hier vorgelegten Studie konnte ein solches dendritisches Verzweigungsmuster im gesunden Gewebe nicht festgestellt werden (siehe 4.2.4.). Im chronisch epileptischen Gewebe wurde eine signifikante Veränderung im Verzweigungsmuster festgestellt. Das pathologische Gewebe wies nicht nur ca. 35 % mehr Verzweigungen auf, sondern die Verzweigungsdominanz hatte sich von leicht radial im gesunden Gewebe zu horizontal im epileptischen Gewebe verändert. Wie ist diese Veränderung zu deuten? Es könnten zum Beispiel Interneurone mit vorwiegend horizontal orientierten Dendriten abgestorben sein. Allerdings würde das a) weder die verringerte Inhibition oder b) den Anstieg an dendritischen Verzweigungen in den überlebenden Zellen erklären, noch c) die Beobachtung, dass SRL-Interneurone kaum oder zumindest nicht signifikant vom Zelltod betroffen waren (siehe 4.2.2, 4.2.3). Eine andere Erklärung könnte darin liegen, dass die SRL-Interneurone ihre Verzweigungsdominanz wechselten ohne selbst von Zelltodereignissen betroffen gewesen zu sein. Eine solche Veränderung könnte erhebliche Folgen für die Konnektivität haben, die dann nicht mehr mit den Verhältnissen im gesunden Gewebe zu vergleichen wäre. Die positive Korrelation zwischen einer pathologisch veränderten Verzweigungsdominanz und der erhöhten Anzahl an dendritischen Verzweigungen insgesamt, lassen darauf schließen, dass von der Zunahme an dendritischen Verzweigungen im epileptischen Gewebe vor allem horizontale dendritische Verzweigungsmuster betroffen waren. „Sprouting“-Mechanismen die zu einer prinzipiell veränderten Konnektivität inklusive ganz neuer Verbindungen führen, sind im Zusammenhang mit Epilepsie bereits mehrfach beschrieben worden (Chen et al., 1996; Perez et al., 1996; Esclapez et al., 1999; Lehman et al., 2001; Buckmaster et al., 2002; Shetty, 2002; Sayin et al., 2003; Cavazos et al., 2004).

Im gesunden Gewebe wurden außer den SRL-Interneuronen alle anderen CA1-Interneurone bisher immer als rückgekoppelt zu CA1-Pyramidenzellen beschrieben (Knowles et al., 1981; Alger et al., 1982; Lacaille et al., 1987; Megias et al., 2001). In keinem SRL-Interneuron, auch nicht in Calretinin-positiven, konnte ein exzitatorischer Einfluss der CA1-Pyramidenzellen nachgewiesen werden (Knowles et al., 1981; Lacaille et al., 1987; Kunkel et al., 1988; Lacaille et al., 1988a; Cobb et al., 1997; Vida et al., 1998; Bertrand et al., 2001). Hätten die pathologischen Veränderungen im Gewebe nicht zu einer exzitatorischen Innervation der SRL-Interneurone durch die CA1-Pyramidenzellen geführt, müsste man beide Kandidaten, Interneurone inhibierende Interneurone und CA1-Pyramidenzellen inhibierende Interneurone, weiterhin als nicht rekurrent mit den CA1-Pyramidenzellen verbundene

Interneurone ansehen. Eine Bestätigung dieser Vermutung kann in der unveränderten exzitatorischen Innervation der SRL-Interneurone gesehen werden, wo weder die Frequenz, noch die Amplitude, noch die Halbwertsbreite der EPSC's pathologische Veränderungen aufwies (Rempe et al., 1997). Der Umstand, dass in keiner CA1-Zellschicht in der Calretinin-positive Interneurone Verbindungen zu anderen Interneuronen besitzen (Freund et al., 1996; Gulyàs et al., 1996) ein signifikanter Zelltod im epileptischen Gewebe festgestellt werden konnte, kann als Indiz gewertet werden, dass die in dieser Arbeit charakterisierten SRL-Interneurone nicht dem Calretinin-positiven SRL-Interneuronen-Typus angehörten - vergleichbar mit der Beschreibung dieses Interneuron-Typus im gesunden Gewebe. Die hier vorgestellten SRL-Interneurone zeigten eine verminderte inhibitorische Innervation, die möglicherweise auf dem Absterben afferenter Interneurone beruhte. Die überwiegend horizontale Ausrichtung der Dendriten in SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe muss zumindest als Hinweis gewertet werden, dass die betroffenen SRL-Interneurone eine pathologisch veränderte Konnektivität aufweisen, die nicht mehr den Verhältnissen im gesunden Gewebe entsprach. Lediglich die unveränderte Ausprägung der mEPSCs spricht dafür, dass die SRL-Interneurone, gleich welchem Typus sie im gesunden Gewebe angehörten, nach wie vor nicht-rekurrent mit den CA1-Pyramidenzellen verbunden waren.

Die Charakterisierung der Interneurone nach ihrem dendritischen Verzeigungsmuster scheint auf den ersten Blick geeigneter zu sein, um im epileptischen Gewebe Interneurone zu charakterisieren. Allerdings gestattet diese Methode auch keine Aussage darüber, ob die hier untersuchten SRL-Interneurone dem im gesunden Gewebe charakterisierten Typ nicht-rekurrent mit Pyramidenzellen verbundener Interneurone angehörten oder nicht. Letztlich scheint es so, als könnten nur Doppelableitungen von SRL-Interneuronen und CA1 Pyramidenzellen im epileptischen Gewebe diese Frage klären. Aber selbst diese, im adulten, epileptischen Gewebe sehr anspruchsvolle Methode, hätte einen entscheidenden Nachteil. Die zusätzliche Ableitung einer oder gar mehrerer Pyramidenzellen, würde, für den Fall dass keine Verbindung zwischen SRL-Interneuron und der / den gemessenen Pyramidenzellen festgestellt werden könnte, nicht bedeuten, dass nicht eine der vielen anderen Pyramidenzellen doch mit diesem SRL-Interneuron verbunden ist, oder vor der Pilocarpin-Applikation verbunden war. Und selbst wenn es methodisch möglich wäre, alle Pyramidenzellen auf eine Verbindung zu einem SRL-Interneuron zu überprüfen, könnte man im Falle eines negativen Ergebnisses nicht davon ausgehen, dass es sich bei dem SRL-Interneuron um einen andere Interneurone inhibierenden Interneuronentypus handelt. Aufgrund der dargelegten methodischen Schwierigkeiten konnte in der hier vorgelegten

Studie nicht bestimmt werden, welchem Interneuronen-Typus die SRL-Interneurone angehören. Das Fehlen dieser wichtigen Information ist weniger der hier angewandten experimentellen Methodik zuzuschreiben, denn einem grundsätzlichen Mangel an Wissen über die Architektur epileptischen Gewebes. Aufgrund der mannigfachen pathologischen Veränderungen, wie Verlust der Immunoreaktivität, Zelltod oder „sprouting-Mechanismen“ erscheint das Wissen über die Architektur des gesunden Gewebes nur eingeschränkt hilfreich.

#### **4.2.6. Hypothese der verminderten Inhibition durch selektives Absterben von Interneuronen.**

Wie oben beschrieben, gilt das Auftreten ausgeprägter Zelltod-Ereignisse bei der Entwicklung einer epileptischen Erkrankung als sicher. Nicht zuletzt durch Magnet-Resonanz-Bildgebungsverfahren *in vivo*, also unabhängig von Artefakten der Gewebeschnitttechnik, konnte gezeigt werden, dass Pilocarpin zu Schädigungen der Amygdala, des piriformen und entorhinalen Cortex und des Hippocampus führen (Roch et al., 2000a; Roch et al., 2000b). Die Immunoreaktivität kalziumbindender Proteine in Interneuronen scheint wenig geeignet um Interneurone aus gesundem und krankem Gewebe miteinander zu vergleichen, da sich im pathologischen Gewebe die Immunoreaktivität selbst zu verändern scheint (siehe 4.2.3.). Eindeutiger sind Befunde die den Verlust von Glutamat-Decarboxylase nachweisen, dem Enzym das aus Glutamat GABA bildet und für Interneurone typisch ist (z.B. Ribak et al., 1982; Obenaus et al., 1993; Olsen et al., 1997; Akbar et al., 1998)

Im Zusammenhang mit Epilepsie gibt es Hinweise, dass vom Zelltod überwiegend Interneurone betroffen sein könnten. Befunde dieser Art haben zur Hypothese der verminderten Inhibition im epileptischen Gewebe durch selektives Absterben von Interneuronen geführt (Sloviter et al, 1987; de Lanerolle et al, 1989; Nakajima et al, 1991; Mello et al, 1996; Williamson et al., 1999; Bouilleret et al, 2000; Sayin et al, 2003; Dinocourt et al, 2003; van Vliet et al, 2004). Nissl-Färbungen, wie sie auch in der hier vorgestellten Arbeit durchgeführt wurden, zeigen aber auch eine deutliche Schrumpfung der CA1-Pyramidenzellschicht. Durch Zellzählung wurde ein ca 30 %iger Zellverlust im Stratum pyramidale festgestellt. Da Übererregbarkeit des Gewebes ohne eine temporäre Übererregung exzitatorischer Neurone kaum vorstellbar ist, stellt sich die Frage, ob der selektive Zelltod in CA1 tatsächlich zu einer verringerten Inhibition der Pyramidenzellen führt. Auf den ersten Blick ist der Verlust von Interneuronen mit reduzierter Inhibition vereinbar. Elektrophysiologische Untersuchungen an CA1 Pyramidenzellen und DG Körnerzellen geben aber keinen Hinweis auf reduzierte Inhibition (Nakajima et al, 1991; Williams et al, 1993;

Esclapez et al, 1997, Rempe et al, 1997; Morin et al, 1999). Esclapez und Kollegen haben sowohl den Zelltod im Stratum oriens von CA1 untersucht (Zelltodrate von 50%, bezogen auf somatostatin-positive CA1-Interneurone, siehe 4.2.2.) als auch Ganzzelleableitungen an CA1-Pyramidenzellen durchgeführt. Die somatostatin-positiven Interneurone wurden als OLM-Interneurone (siehe 4.2.5.) beschrieben, das Zellsoma befindet sich im Stratum oriens und die Axonausläufer bilden mit den CA1-Pyramidenzellen inhibitorische Synapsen im Stratum lacunosum moleculare. Eine verringerte Inhibition der Pyramidenzellen konnte aber nicht festgestellt werden (Esclapez et al., 1997). Cossart und Kollegen fanden zwar eine pathologische Veränderung der Inhibition von CA1 Pyramidenzellen im epileptischen Gewebe, allerdings nur in einer Verschiebung der inhibitorischen Synapsen von distal nach proximal. Eine Störung der Balance zwischen Inhibition und Exzitation in den Pyramidenzellen konnten sie aber nicht feststellen (Cossart et al., 2001). In ähnlicher Weise beschrieben Wierenga und Kollegen eine Veränderung der IPSC-Kinetik in CA1-Pyramidenzellen aus epileptischem Gewebe, aber wiederum ohne Auswirkung auf die AP-Frequenz dieser Zellen (Wierenga et al, 1999).

Auch eine gesteigerte Inhibition wurde bereits mehrfach im epileptischen Gewebe beobachtet (King et al., 1985; Haas et al., 1996; Swanson et al., 1998; Wilson et al., 1998). Spiller und Racin fanden im Kindling-Modell der TLE eine zeitabhängige Veränderung der Inhibition, angefangen mit einer verstärkten Inhibition der Gyrus dentatus Körnerzellen, die sich bei anhaltender Induktion des Kindlings wieder abschwächte (Spiller et al., 1994). Für CA1-Pyramidenzellen wurde die Hypothese der verminderten Inhibition durch selektives Absterben von Interneuronen bisher eher widerlegt als bestätigt (Nakajima et al, 1991; Williams et al, 1993; Esclapez et al, 1997, Rempe et al, 1997; Morin et al, 1999). Die möglicherweise stärkere Ausprägung des Verlusts von Interneuronen, verglichen mit Pyramidenzellen, im epileptischen Gewebe führt nicht unmittelbar zur Hyperexzitabilität des gesamten Gewebes. Entscheidend scheint viel eher, welche Konnektivität vom Zelltod betroffen ist. Sind es Interneurone die auf Pyramidenzellen projizieren, dürfte die Konsequenz eine andere sein, als bei Interneuronen, die andere Interneurone inhibieren. Der hier beobachtete Verlust an Inhibition in CA1 SRL-Interneurone, sei er nun auf Zelltod oder andere Prozesse zurückzuführen, kann unterschiedliche Folgen für das nachgeschaltete neuronale Netzwerk haben. Auf welche Zellen projizieren die CA1 SRL-Interneurone und von welchen Zellen erhalten sie ihre Eingänge?

#### **4.2.7. Konnektivität der SRL-Interneurone.**

Erkenntnisse über die Konnektivität der SRL-Interneurone wurden vor allem durch gepaarte Ableitungen mit scharfer Mikroelektrode oder als Ganzzellausleitung mittels „patch-clamp“-Technik gewonnen. Die festgestellten Konnektivitäten beziehen sich ausschließlich auf gesundes Gewebe. Die initialen Arbeiten zu diesem Thema stammen von Lacaille und Kollegen (Lacaille et al., 1988a, Lacaille et al., 1988b).

##### **1. Afferenzen innerhalb von CA1:**

Lacaille und Kollegen untersuchten CA1-Pyramidenzellen und verschiedene CA1-Interneurone auf Konnektivität. In 26,6 % aller Paarableitungen zwischen Pyramidenzellen und SRL-Interneuronen bewirkte eine Stimulation der Interneurone eine somatisch gemessene und in 21,4% eine dendritisch gemessene Hyperpolarisation der Pyramidenzellen. Einen Unterschied in der Kinetik der somatisch und dendritisch gemessenen Hyperpolarisation konnten sie nicht feststellen. Eine Stimulation der Pyramidenzellen führte aber nie zu einer Depolarisation der SRL-Interneurone. Aufgrund dieses Sachverhalts beschrieben Lacaille und Kollegen die SRL-Interneurone erstmals als „feedforward“-inhibierende Interneurone, welche nicht rekurrent mit den Pyramidenzellen verschaltet sind. Disinhibition, im Sinne von Inhibition der Inhibition über zwischengeschaltete Interneurone wurde in der zitierten Arbeit ebenfalls nicht beobachtet. Gepaarte Ableitungen zwischen SRL-Interneuronen und Interneuronen aus dem Stratum oriens zeigten in 50% der Fälle eine Konnektivität, die aber wieder als rein „feedforward“ für die SRL-Interneurone beschrieben wurde (Lacaille et al., 1988a). Gestützt auf elektrophysiologische und morphologischen Befunde beschrieben Lacaille und Kollegen die Afferenzen der SRL-Interneurone innerhalb des Hippocampus wie folgt: Die Axone der SRL-Interneurone ziehen radiär durch CA1 bis ins Stratum oriens / alveus. Gemessen wurde a) Inhibition von CA1-Pyramidenzellen, b) Inhibition von Interneuronen des Korbzellentypus im Stratum pyramidale, c) Inhibition von Interneuronen im Stratum oriens und d) Inhibition der Körnerzellen im Gyrus dentatus. Eine exzitatorische Wirkung der SRL-Interneurone wurde in keinem der untersuchten Fälle beobachtet (Lacaille et al., 1988b). Cobb und Kollegen untersuchten ebenfalls die Konnektivität der SRL-Interneurone mit scharfer Mikroelektrode und bestätigten die Ergebnisse von Lacaille und Kollegen. Darüber hinaus führten sie Dreifachableitungen an SRL-Interneuronen, SOM-Interneuronen und Pyramidenzellen durch. Eine Stimulation der SRL-Interneurone führte sowohl bei den SOM-Interneuronen als auch bei den Pyramidenzellen zu einer Hyperpolarisation. Die Stimulation der SOM-Interneurone führte lediglich bei den Pyramidenzellen zu einer Hyperpolarisation, was sowohl den reinen „feedforward“-

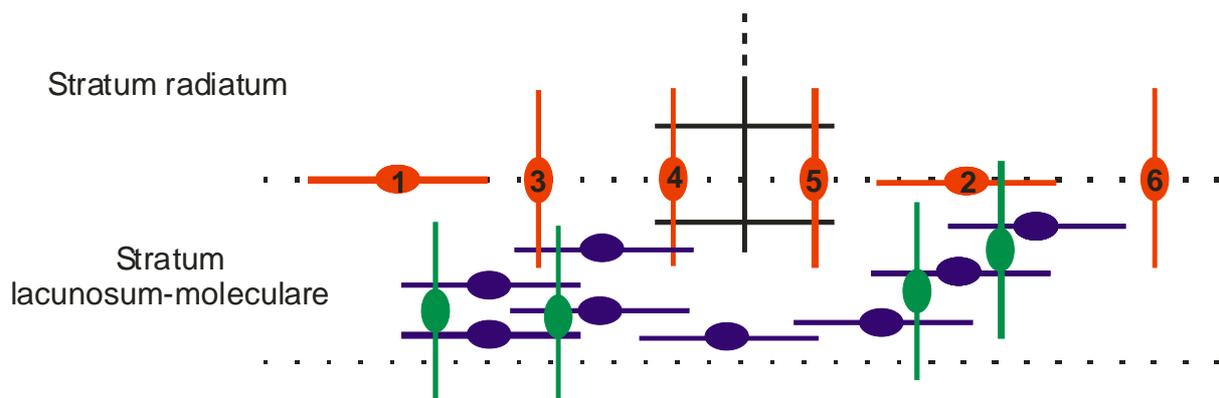
Mechanismus der SRL-Interneurone bestätigte, als auch das Ausbleiben von einer Disinhibition der Pyramidenzellen durch zwischengeschaltete OLM-Interneurone (Cobb et al., 1997). Bertrand und Kollegen untersuchten 295 gepaarte Ganzzelleableitungen von SRL-Interneuronen und Pyramidenzellen. In 11,2 % der Fälle konnten sie eine Projektion der SRL-Interneurone auf Pyramidenzellen feststellen. In diesen Fällen beruhte die stimulierte Reaktion der Pyramidenzellen auf einer veränderten Chloridleitfähigkeit. Auch hier wurde die Inhibition als rein „feedforward“ ohne Disinhibition festgestellt (Bertrand et al., 2001). Vida und Kollegen unterschieden 4 Typen von SRL-Interneuronen, 1) Korbzellen, 2) Schaffer-Kollateral / Kommissural-assoziierte Interneurone, 3) Neuroglia ähnelnde Interneurone und 4) Tractus perforans-assoziierte Interneurone. Nur für die vierte Klasse von Interneuronen wurde in Pyramidenzellen keine hyperpolarisierende Antwort gefunden, diese Interneurone schienen nicht auf Pyramidenzellen zu projizieren (Vida et al., 1998).

Gulyàs und Kollegen fanden im Stratum lacunosum moleculare Interneurone die ausschließlich andere Interneurone inhibierten, diese Interneurone waren durchweg Calretinin-positiv, was ihre Immunoreaktivität auf kalziumbindende Proteine betraf. Diese Schlussfolgerung bezog sich auf die Beobachtung, dass Synapsen zwischen Calretinin-positiven Interneuronen und Calbindin-positiven Pyramidenzellen nicht entdeckt wurden. Calretinin-positive Interneurone wurden mit und ohne synaptische Dornen beschrieben, in CA1 wurden nur solche ohne synaptische Dornen gefunden, diese aber in allen vier Zellschichten. Ihre Axone durchzogen CA1 radial bis ins Stratum oriens / alveus. Im Gegensatz zu den SRL-Interneuronen führten keine Axonkollaterale in den Gyrus dentatus. Calretinin-positive Interneurone bildeten mit Anderen axo-dendritische Synapsen aus (Gulyàs et al., 1992). Fasst man die Ergebnisse von Lacaille, Cobb und Gulyàs und Kollegen zusammen, so würde man vermuten, dass SRL-Interneurone tatsächlich nur, wie bereits beschrieben (siehe 4.2.5.) entweder vom Typ

1. CA1-Pyramidenzellen, Gyrus dentatus Körnerzellen und Interneurone „feedforward“-inhibierender Interneurone, oder
2. ausschließlich auf andere Interneurone projizierende Calretinin-positive Interneurone sind (Abb. 27).

Unter Berücksichtigung der unter 4.2.5. gemachten Einschränkungen zur Vergleichbarkeit von gesundem und epileptischem Gewebe, ist nicht auszuschließen, dass sich die hier beschriebenen SRL-Interneurone aus Interneuronen beider Gruppen zusammensetzen. Die verminderte inhibitorische Innervation und die verminderte AP-Frequenz in SRL-Interneuronen aus epileptischem Gewebe war innerhalb der Pilocarpin-Gruppe heterogen

verteilt und die genannten Effekte waren nicht bei allen SRL-Interneurone gleichmäßig stark ausgeprägt. Einzelne SRL-Interneurone zeigten auch keine verminderte Inhibition und / oder verminderte AP-Frequenz. Dass diese Effekte im Mittelwert trotzdem signifikant waren, kann sowohl daran gelegen haben, dass selektiv eine der beiden SRL-Interneuron-Typen besonders stark davon betroffen war, als auch daran, dass beide Interneuron-Typen in jeweils unterschiedlicher Weise davon betroffen waren. Im Fall der Calretinin-positiven Interneurone wäre die verminderte inhibitorische Innervation aber vermutlich nicht auf den Zelltod ihrer inhibitorischen Afferenzen zurückzuführen (siehe 4.2.5.).



**Abb. 27. SRL-Interneurone.**

Schematische Darstellung verschiedener SRL-Interneurone (rot). Mit horizontaler oder radialer dendritischer Orientierung, als Teil eines Interneuron-Netzwerks oder auf CA1-Pyramidenzellen projizierend oder Projektion unbekannt. Typ 1: horizontal, Projektion unbekannt; Typ 2: horizontal, Teil eines Interneuronnetzwerks, Typ 3 radial, Teil eines Interneuronnetzwerks; Typ 4: radial, auf Pyramidenzellen projizierend; Typ 5: radial, auf Pyramidenzellen projizierend, ohne Kontakt zum Interneuronennetzwerk; Typ 6: radial, Projektion unbekannt. Die vornehmlich mit horizontaler dendritischer Orientierung beschriebenen Stratum lacunosum moleculare Interneurone in blau, die Interneuronnetzwerke ausbildenden, vornehmlich Calretinin-positiven Interneurone in grün. In Schwarz, die apikale Dendritenverzweigung einer Pyramidenzelle.

## 2. Efferenzen innerhalb von CA1 und der parahippocampalen Struktur:

Die Dendriten der SRL-Interneurone durchziehen wie ihre Axone CA1 radial, passieren die Fissur und enden im Stratum moleculare des Gyrus dentatus (Lacaille et al., 1988a; Williams et al., 1994). In keinem der oben beschriebenen Studien konnte eine CA1-assozierte Efferenz in SRL-Interneuronen gefunden werden (Lacaille et al., 1988a; Cobb et al., 1997; Vida et al., 1998; Bertrand et al., 2001). Kunkel und Kollegen wiesen Axone aus der kontra- und ipsilateralen CA3-Struktur und aus dem ipsilateralen entorhinalen Cortex nach, mit inhibitorischen Synapsen auf SRL-Interneurone (Kunkel et al., 1988; siehe auch Vida et al., 1998). Auch über den perforanten Pfad wurde ein möglicher exzitatorischer Einfluss auf SRL-Interneurone beschrieben (Empson et al., 1995; Denslow et al., 2001; Dvorak-Carbone et al., 1999).

### **3. Extraparahippocampale Afferenzen.**

#### **A. Septum.**

Fraser und Kollegen beschreiben inhibitorische Eingänge in die SRL-Interneurone aus dem Septum. Der Transmitter Acetylcholin vermittelt über muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren Inhibition. Über eine solche Erregungsleitung kommt es zum Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen, was zu Membranoszillationen und schließlich zur Generierung von Theta-Rhythmen (4-10 Hz) führt (Fraser et al., 1991, siehe auch Chapman et al., 1999). Daoyum und Kollegen spezifizierten die septale Inhibition als vom medialen Septum Diagonal-Band-Komplex ausgehend. Nach Applikation von Acetylcholin reagierten 82% der SRL-Interneurone in Ganzzellmessungen mit einer erhöhten AP-Frequenz. Aktionspotentiale wurden in 70% der Acetylcholin-Rezeptoren-positiven SRL-Interneurone festgestellt. Gepaarte Ableitungen von Acetylcholin-Rezeptor-positiven SRL-Interneuronen und Pyramidenzellen führte in 30 % der Paare zu einer inhibitorischen Antwort der Pyramidenzellen (Toth et al., 1997; Daoyum et al., 2000; Alkondon et al., 2000).

#### **B. Nucleus reuniens thalami.**

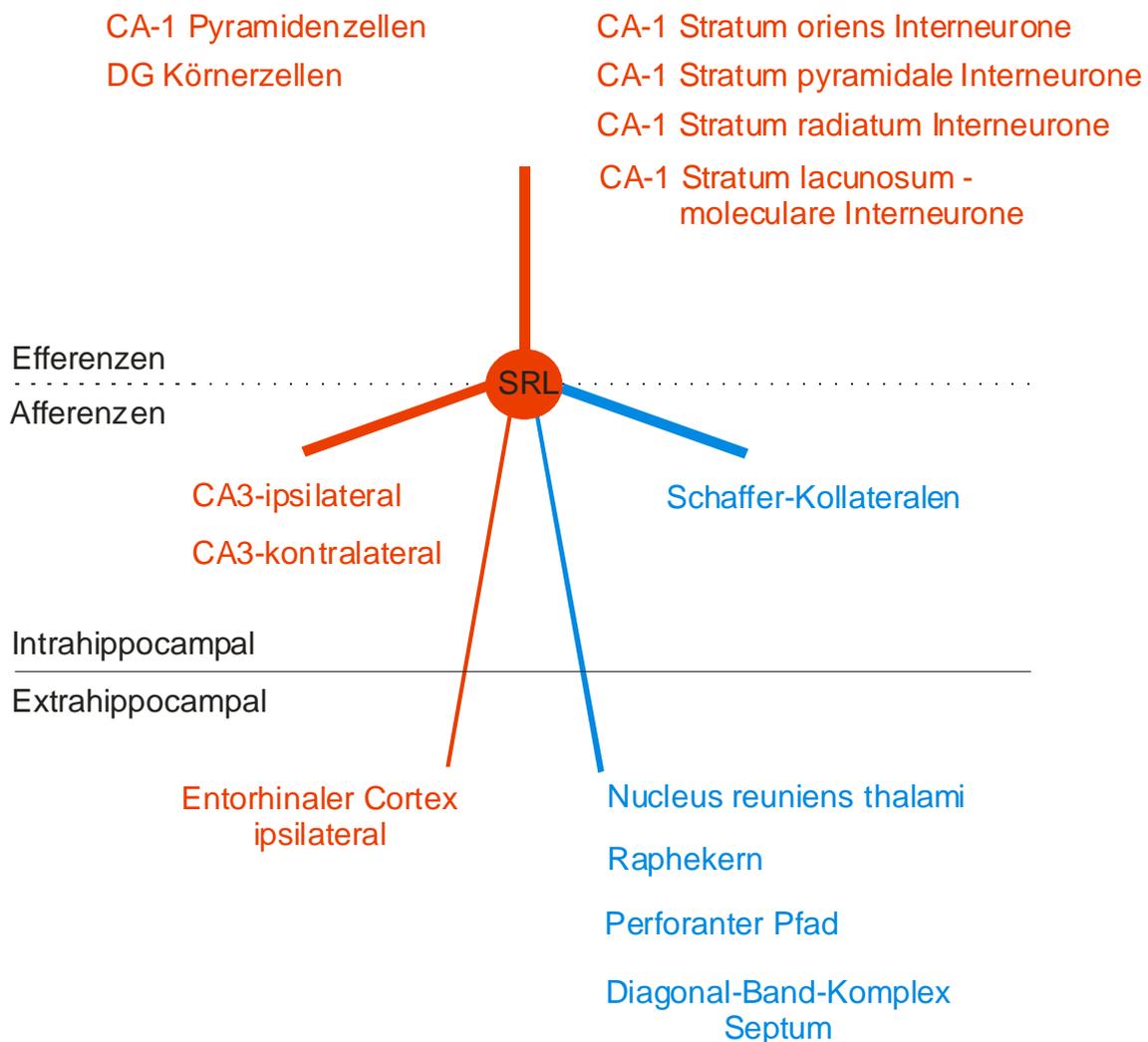
Axonterminale aus dem Nucleus reuniens thalami enden im Stratum lacunosum moleculare und zeigen dort exzitatorische Synapsen auf die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen und auf lokale Interneurone, die wiederum die Pyramidenzellen inhibieren (Wouterlood et al., 1990; Dollemann-Van der Weel et al., 1997).

#### **C. Raphekern.**

SRL-Interneurone erhalten serotonerge, exzitatorische Innervation aus dem medianen Raphekern, vermittelt durch den ionotropen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor. Durch eine Senkung der extrazellulären Kalziumkonzentration verstärken sich die entsprechenden EPSCs. In den CA1-Pyramidenzellen führen die serotonergen Eingänge in SRL-Interneurone zu einer Hyperpolarisation (McMahon et al., 1997).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass insbesondere die inhibitorischen Afferenzen der SRL-Interneurone kaum bekannt sind. Atzori führte Ganzzellaufnahmen an CA1 Pyramidenzellen und SRL-Interneuronen durch. Er applizierte verschiedene, die GABAerge Inhibition beeinflussende Pharmaka und korrelierte die Antworten der Pyramidenzellen mit denen der SRL-Interneurone. So stellte er fest, dass beide Neuronentypen von denselben Interneuronen inhibiert wurden, allerdings erlaubte diese Methode nicht festzustellen von welchen Interneuronen (Atzori et al., 1996). Calretinin-positive SRL-Interneurone die ausschließlich andere Interneurone inhibieren können es allerdings nicht gewesen sein, da

diese ja eben keine Pyramidenzellen inhibieren. Afferenzen vom Septum, dem Nucleus reuniens thalami und dem Raphekern scheinen ausschließlich exzitatorischer Natur zu sein. Lediglich die Afferenzen aus der kontra- und ipsilateralen CA3-Struktur und dem entorhinalen Cortex kommen als inhibitorische Afferenzen in Betracht (Kunkel et al., 1988; Vida et al; 1998). Leider ist weder bekannt, um welche Interneurone es sich dabei handelt, noch, ob diese Interneurone vom pathologischen Zelltod betroffen sind.



**Abb. 28. Bekannte Efferenzen und Afferenzen der SRL-Interneurone.**

In Rot: inhibitorische Afferenzen und Efferenzen, in Blau: exzitatorische Afferenzen und Efferenzen der SRL-Interneurone.

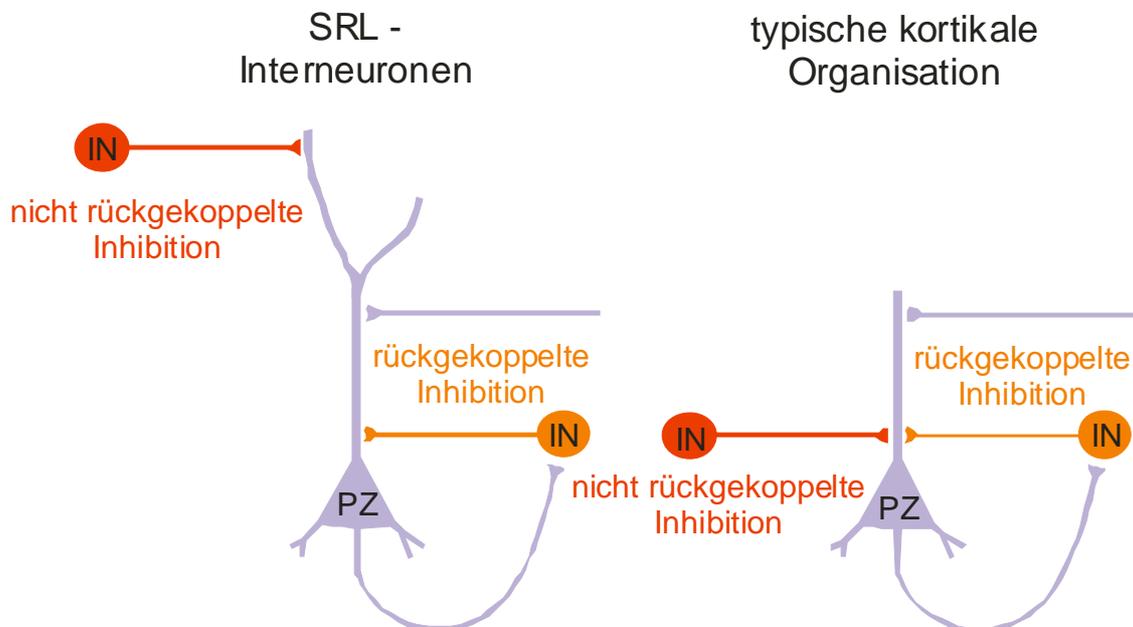
Die in der hier vorgelegten Studie durchgeführten Zellzählungen im gesunden und epileptischen Gewebe haben keinen signifikanten Zelltod im Stratum radiatum und Stratum lacunosum moleculare der CA3-Struktur für das epileptische Gewebe erkennen lassen, so dass ein Verlust an inhibitorischer Innervation durch das Absterben von Interneuronen aus dieser Region ebenfalls unwahrscheinlich ist. Ansonsten bleiben als inhibitorische Afferenzen

noch die Gruppe der SRL-Interneurone selbst. Für diese Interneurone wurde aber weder in der hier vorgelegten Studie noch in anderen entsprechenden Publikationen (Esclapez et al, 1997; Andre et al., 2001; van Vliet et al., 2004) ein signifikanter Zelltod im epileptischen Gewebe festgestellt. Insgesamt lassen die bisher bekannten inhibitorischen Afferenzen der SRL-Interneurone (Abb. 28) und die Beschreibung der vom Zelltod im epileptischen Gewebe betroffenen Interneurone keine Aussage über einen Zusammenhang von zellschichtspezifischem Zelltod (siehe 4.2.5.) und verminderter Inhibition von SRL-Interneuronen im epileptischen Gewebe zu. Der Mangel an Information beruht vor allem darauf, dass Untersuchungen zur grundlegenden Konnektivität im Nervengewebe, welche über den Hippocampus, das limbische System oder den Temporallappen hinausgehen, initial natürlich erst einmal nicht in epileptischem Gewebe stattfinden und somit auch kaum ein Zusammenhang zum epileptischen Zelltod hergestellt wurde.

#### **4.2.8. Rekurrente und nicht-rekurrente Verbindungen zwischen Interneuronen und Pyramidenzellen.**

SRL-Interneurone wurde als nicht-rückgekoppelt zu CA1-Pyramidenzellen beschrieben (Lacaille et al, 1988a; Cobb et al, 1997; Bertrand et al, 2001). Die Beschreibung der SRL-Interneurone als nicht-rekurrent gilt selbstverständlich nur innerhalb der CA1-Struktur im Bezug auf Pyramidenzellen (Abb. 29). Worin liegt die Besonderheit nicht-rekurrenter Verschaltungen zwischen Interneuronen und Pyramidenzellen? Wie bereits unter 4.2. angedeutet ist eine Veränderung der Balance zwischen Inhibition und Exzitation für rekurrente Verbindungen nur schwer abschätzbar. Man kann in rekurrenten Verbindungen zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen sogar eine Art Schutzmechanismus sehen, der ein Ausbrechen der Netzwerkaktivität aus einer funktionalen Balance verhindert (Lawrence et al., 2003). Vermindert sich beispielsweise die Inhibition auf exzitatorische Neurone, weil die entsprechenden Interneurone weniger stark erregt werden, kann die rekurrente Verschaltung der weniger inhibierten exzitatorischen Neurone auf eben jene Interneurone dazu führen, dass deren exzitatorische Efferenz wieder gestärkt wird. Pathologische Veränderungen müssen nicht zwangsläufig auf ein Mehr oder Weniger an Exzitation oder Inhibition hinauslaufen. Es wurden auch subtilere Veränderungen im epileptischen Gewebe festgestellt, die eher die Qualität der Innervation veränderten, wie z.B. Veränderungen der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten (Nusser et al., 1998, Sperk et al., 1998; Hirsch et al., 1999; Poulter et al., 1999; Aradi et al., 2002) oder die Verlagerung inhibitorischer Synapsen an den Dendriten von Pyramidenzellen von proximal nach distal

oder umgekehrt (Morin et al., 1999, Maglóczy et al., 2000) Im Unterschied zu diesen eher subtilen Veränderungen die sich auf die bestehenden Netzwerkeigenschaften auswirken, führen Zelltod und „sprouting“-Mechanismen, wie sie in der hier vorgelegten Arbeit beobachtet wurden, zu einer neuen Netzwerkarchitektur.



**Abb. 29. Rückgekoppelte und nicht rückgekoppelte Inhibition.**

Auf der rechten Seite ist die typische Organisation kortikaler Interneurone-Pyramidenzellen Kopplungen dargestellt. Inhibitorische Synapsen befinden sich zumeist proximal-dendritisch / somatisch. Auf der linken Seite ist die Inhibition durch SRL-Interneurone auf CA1-Pyramidenzellen (rot) in der hippocampalen CA1-Struktur dargestellt. SRL-Interneurone bilden im gesunden Gewebe hauptsächlich distal-dendritische Synapsen mit den CA1-Pyramidenzellen aus.

Wenn nicht-rekurrent verschaltete Interneurone, wie die SRL-Interneurone eine verringerte inhibitorische Innervation aufweisen, kann diese nicht direkt durch eine Verringerung der exzitatorischen Innervation ausgeglichen werden, der für rekurrente Verschaltungen postulierte Schutzmechanismus kann nicht greifen. Tatsächlich zeigten die SRL-Interneurone weder in der Frequenz noch in der Amplitude eine Veränderung in der exzitatorischen Innervation im epileptischen Gewebe. Man muss davon ausgehen, dass der Einfluss der SRL-Interneurone auf die gesamte Netzwerkaktivität persistiert, was im Falle der pathologisch veränderten SRL-Interneurone bedeutet, dass sie die efferent nachgeschalteten Zellen stärker inhibieren. Dies zeigte sich auch durch eine erhöhte AP-Frequenz in den pathologisch veränderten SRL-Interneuronen. Nach eben solchen persistierenden Veränderungen des epileptischen Gewebes wurde durch die Wahl von adultem Gewebe in einer fortgeschrittenen Phase der chronischen Erkrankung gesucht, also nach immanenten pathologischen Veränderungen des neuronalen Netzwerks. Da es aus verschiedenen, bereits genannten

Gründen nicht möglich war, die SRL-Interneurone aus dem pathologischen Gewebe mit dem bestehenden Wissen über die Konnektivität im gesunden Gewebe zu identifizieren, muss die Frage nach dem Netto-Effekt der festgestellten pathologischen Veränderungen offen bleiben. Grundsätzlich könnte die verringerte Inhibition der SRL-Interneurone zu einem pro- oder antikonvulsiven Ergebnis führen - primär antikonvulsiv, falls die SRL-Interneurone direkt die CA1-Pyramidenzellen inhibieren, primär prokonvulsiv, falls sie Interneurone inhibieren, die wiederum direkt die CA1-Pyramidenzellen inhibieren. Eine Verkomplizierung der Verhältnisse durch Disinhibitions-Effekte wurde bisher für die SRL-Interneurone nicht beschrieben (Lacaille et al., 1988a; Cobb et al., 1997; Vida et al., 1998; Bertrand et al., 2001). Aber selbst eine eindeutige Verifizierung der Reaktion der CA1-Pyramidenzellen auf eine verringerte inhibitorische Afferenz kann ohne Kenntnis des Status des gesamten hippocampalen Netzwerks nicht eindeutig beurteilt werden. Bezüglich der SLR-Interneurone konnte die hier vorgelegte Arbeit lediglich eine von vermutlich mehreren persistierenden, pathologischen Veränderungen nachweisen. Möglicherweise konnte damit auch ein Hinweis gegeben werden, dass nicht-rekurrent verschaltete Interneurone im epileptischen Gewebe besondere Beachtung verdienen.

#### **4.2.9. Alternativen zur Balance-Hypothese.**

Soweit SRL-Interneurone CA1-Pyramidenzellen inhibitorisch innervieren, geschieht das vermutlich über Synapsen im distalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen und nicht proximal-dendritisch oder am Soma (Kunkel et al., 1988; Lacaille et al., 1988a; Lacaille et al., 1988b; Bertrand et al., 2001;) Es wurde unter anderem darüber diskutiert, welchen Einfluss SRL-Interneurone über die Inhibition an distalen Dendriten auf die Gesamt-Inhibition der CA1-Pyramidenzellen haben (Kunkel et al., 1988; Sloviter et al., 1991; Karnup et al., 1999; Megias et al., 2001) Fraser und Kollegen haben exzitatorische Afferenzen auf die SRL-Interneurone aus dem Septum, vermittelt durch den Transmitter Acetylcholin über muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren beobachtet. Über diese Erregungsleitung kann es zur Generierung von Theta-Rhythmen kommen (siehe oben).

Ein lokales Interneuronen Netzwerk, wie es für das Stratum lacunosum-moleculare postuliert wird (Knowles et al., 1991; Gulyàs et al., 1992; Freund et al., 1996; Gulyàs et al., 1996; Morimoto et al., 2004) könnte über gemeinsame, koordinierte Membran-Oszillationen Pyramidenzellen zwischen Hyperpolarisation und Depolarisation zum Schwingen bringen. Ein Schwingungsphänomen, welches unabhängig von der Balance zwischen Inhibition und Exzitation, zur Generierung epileptischer Anfälle führt, ist ein diskutiertes Alternativmodell

zum „Balance“-Modell. Interneuronen-Netzwerke sind grundsätzlich in der Lage Gamma-Oszillationen zu generieren, unabhängig von exzitatorischen Einflüssen (Traub et al., 1996; Whittington et al., 2000; Perkins, 2002; Whittington et al., 2003). Möglicherweise hat eine pathologische Veränderung in Interneuronen-Netzwerken auch Konsequenzen für die Generierung der Hypersynchronisation im epileptischen Gewebe (Traub et al., 1982). Eventuell haben dabei Interneurone die ausschließlich Interneurone inhibieren eine Schlüsselrolle (Hajos et al., 1997). Die hier vorgestellten Veränderungen im dendritischen Verzweigungsmuster der SRL-Interneurone im epileptischen Gewebe könnten ein Kandidat für ein verändertes Verhalten von Neuronen-Netzwerken aufgrund von „sprouting“-Prozessen darstellen (Prince, 1997). Die pathologisch auftretende, dominant horizontale Orientierung der Dendriten der SRL-Interneurone, könnte beispielsweise auch Folgen haben für die Verteilung distaler und proximaler inhibitorischer Synapsen auf den Dendriten der Pyramidenzellen. Im Gyrus dentatus wird ein ähnlicher pathologischer Mechanismus diskutiert. Allerdings wird hier vermutet, dass die „sprouting“-Prozesse zur Neubildung von rückgekoppelter Inhibition führen (Buckmaster et al., 2002). Aber auch unabhängig von „sprouting“-Prozessen wurden *in vivo* bei EEG-Ableitungen rhythmische Entladungsereignisse beobachtet und auf den mit Epilepsie einhergehenden Zelltod zurückgeführt. Cohen und Kollegen haben im epileptischen Gewebe einen Zusammenhang zwischen Zelltod und rhythmischer Aktivität im humanen epileptischen Gewebe gefunden. Dabei glichen die spontanen, synchronen Entladungen im Gewebe EEG-Aufzeichnungen an Patienten (Cohen et al., 2003). Ein ausgeprägter Zelltod im epileptischen Gewebe könnte zu einer Destabilisierung des gesamten Netzwerks führen, während diese Stabilisierung im gesunden Gewebe noch durch wesentlich mehr Zellen gewährleistet wird. Möglicherweise ist auch der in der hier beobachteten Studie eingetretene pathologische Zelltod alleine ausreichend, um entweder die Balance zwischen Inhibition und Exzitation zu stören oder über Netzwerk-Oszillationen Anfallsereignisse zu provozieren.

Koordinierte Oszillationen über multisynaptische Transmission gilt eher als unwahrscheinlich, wegen der mangelnden zeitlichen Präzision, die mit der synaptischen Signalweiterleitung verbunden ist. Als wahrscheinlicher gilt die Ausbreitung koordinierter Oszillationen über elektrische Synapsen, den sogenannten „gap-junctions“ (Bragin et al., 1999; Galaretta et al., 1999; Gibson et al., 1999; Traub et al., 1999). Aber nicht nur Oszillationen können sich durch „gap-junctions“ ausbreiten, sondern auch der Farbstoff Neurobiotin (Hymes et al., 2000). In der hier vorgelegten Studie wurde ein Abweichen in der Farbstoffkopplung zwischen Kontroll- und epileptischem Gewebe festgestellt. In der

Kontrollgruppe wurden 4 Farbstoffkopplungen festgestellt, im epileptischen Gewebe hingegen 12, davon in 9 Fällen mit putativen Interneuronen im Stratum radiatum und in 3 Fällen mit CA1-Pyramidenzellen. Möglicherweise könnte in dieser Beobachtung eine Voraussetzung für pathologische Oszillationen zu sehen sein. Einen Beweis für eine pathologische Zunahme von „gap-junctions“ stellen die hier gefundenen Verhältnisse in der Farbstoffkopplung allerdings nicht dar. Während der Ableitungen wurden auch keine augenscheinlichen Oszillationen in den SRL-Interneuronen beobachtet.

Im Pilocarpin-Modell nehmen die CA1 SRL-Interneurone eine Sonderstellung ein. Pilocarpin wirkt exzitatorisch, als Agonist muskarinischer M1- und M2-Rezeptoren (Hoss et al., 1990). Durch die Bindung an muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren kommt es zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zellen (siehe oben). Fraser, Chapman und Kollegen beschrieben Membranoszillationen als Folge acetylcholinerg, exzitatorischer Innervation septaler Afferenzen der SRL-Interneurone (Fraser et al., 1991, siehe auch Chapman et al., 1999). In gepaarten Ableitungen zwischen Acetylcholin-Rezeptor-positiven SRL-Interneuronen und CA1 Pyramidenzellen wurden ausschließlich hyperpolarisierende Antworten in den Pyramidenzellen gemessen (siehe 4.2.5.3. und Daoyum et al., 2000; Toth et al., 1997; Alkondon et al., 2000). Ein primär prokonvulsiver Mechanismus der Pilocarpin-Wirkung scheint auf diesem Weg somit erst einmal als eher unwahrscheinlich. Alternativ zur Theorie der veränderten Balance zwischen Inhibition und Exzitation könnte Pilocarpin exklusiv in SRL-Interneurone durch pathologische Rhythmogenese seine prokonvulsiven Eigenschaften übertragen. Exklusiv, weil zumindest für CA1 bisher keine weiteren Acetylcholin-Rezeptoren gefunden wurden (Fraser et al., 1991). Smolders und Kollegen haben die Wirkung von Pilocarpin im Cerebellum durch Mikrodialyse der interstitiellen Flüssigkeit überprüft (Smolders et al., 1997). Sie führen aus, dass die unmittelbare Wirkung von Pilocarpin in einer Verringerung der extrazellulären Glutamat- und Aspartatkonzentration liegt. Im humanen hippocampalen epileptischen Gewebe kommt es unmittelbar vor einem Anfallsereignis zu einer Erhöhung der Glutamat- und Aspartatkonzentration (During et al., 1993; Massieu et al., 1995). Smolders und Kollegen folgern deshalb, dass weder Glutamat noch Aspartat für die Auslösung eines Anfallsereignisses verantwortlich gemacht werden könnten (Massieu et al., 1995). Während der Anfallsereignisse kommt es im Pilocarpin-Modell zu einer Erhöhung der extrazellulären GABA-, Glutamat- und Aspartatkonzentration im Cerebellum. Auch dieser Befund, spricht erst einmal gegen eine veränderte Balance zwischen Inhibition und Exzitation als pathologische Ursache einer epileptischen Erkrankung. Die geschilderten Abweichungen zwischen der initialen Pilocarpinwirkung und den initialen Glutamat- und

Aspartatkonzentrationen im humanen epileptischen Gewebe könnten darauf schließen lassen, dass die durch Pilocarpin-Injektion herbeigeführten Anfallsereignisse einen Sonderfall der Epilepsie darstellen. Eventuell sind Zelltod, „sprouting“-Mechanismen, Netzwerk-Oszillationen und eine Inbalance zwischen Inhibition und Exzitation unabhängige pathologische Ereignisse, die je nach Spezies, Epilepsie-Modell und untersuchtem Gewebe eine eigene Bedeutung besitzen.

#### **4.3. Pathophysiologische Ursachen der Epilepsie.**

Allen Epilepsie-Modellen gemein ist die gewebespezifische Ausprägung des Zelltods, der mit einer Chronifizierung der Epilepsie einhergeht. Ob „sprouting“-Mechanismen unmittelbar durch den Zelltod ausgelöst werden oder prokonvulsiv sind, ist weiterhin ungeklärt (siehe auch 4.2.2. und Sloviter, 1992; Longo et al., 1997; Raol et al., 2003; Buckmaster, 2004). Die entscheidende Frage, ob der Zelltod Ursache oder Begleiterscheinung einer epileptischen Erkrankung ist, oder notwendige Voraussetzung einer Manifestation der Epilepsie, wird weiterhin kontrovers diskutiert. (Babb et al., 1984; Bertram et al., 1990; Mello et al., 1993). Covolan und Kollegen zeigten mittels Silberfärbung für das Pilocarpin- und das Kainat-Modell für TLE, dass Zellschädigungen bereits 2,5 Stunden nach der Induktion des Status epilepticus auftreten (Covolan et al., 2000). Hingegen fanden Fujikawa sowie Hsieh bei Mäusen keinen Zellverlust, wenn der Status epilepticus bis zu 60 Minuten nach seiner Induktion pharmakologisch wieder unterbrochen wurde (Fujikawa et al., 1996; Hsieh, 1997; Hsieh 1999). Mello und Kollegen beobachteten bei Tieren mit sehr stark ausgeprägtem Zellverlust, dass epileptische Anfälle ab einem gewissen Grad an Zellverlust sich nicht mehr fortsetzen. Sie mutmaßten, dass ab einem bestimmten Ausmaß des Zellverlusts die Ausbreitung der epileptischen Übererregung beeinträchtigt sein könnte (Mello et al., 1993). Bezüglich des Zusammenhangs zwischen Zelltod und Epilepsie scheint es aber nicht nur zwischen Ratten und Mäusen Unterschiede zu geben, sondern sogar innerhalb einer Art. Ratten der Rasse Long-Evans scheinen resistenter gegen Zelltod zu sein und eine höhere Anfallsschwelle zu besitzen, als Ratten der Rasse Wistar (Hort et al., 2000; Xu et al., 2004;). Dasselbe Phänomen wurde auch für Ratten der Rasse Sprague-Dawley und Wistar beobachtet (Mello et al., 1993). Bei den in der hier vorgelegten Arbeit genutzten Wistar Ratten führte die Pilocarpin-Injektion in 12,7 % der Fälle nicht zum Auftreten eines Status epilepticus. Bei 85% aller mit Pilocarpin behandelten Tiere, also auch der Tiere, die unmittelbar während der Induktionsphase verstarben, kam es zur Ausprägung eines Status epilepticus (83 % wurden von Mello et al., 1993 beschrieben). Die Reaktion auf die Pilocarpin-Applikation führte in der

stärksten Ausprägung, wie beschrieben, zum Tod der Tiere noch während der Induktionsphase (13,5 %), zum Status epilepticus ohne beobachtete Anfälle (10,3 %), zum Status epilepticus mit seltenen Anfallsereignissen (23,4 %) und zum Status epilepticus mit hoher Anfallsrate mit durchschnittlich mehr als einem Anfall pro Tag (48,2 %).

Welche Mechanismen könnten zu Epilepsie-spezifischem Zelltod führen? Das mit einer epileptischen Übererregung freiwerdende Glutamat wird mittlerweile als Ursache für den Zelltod nahezu ausgeschlossen (Milan et al., 1993; Wasterlein et al., 1993; Cavalheiro et al., 1994; Smolders et al., 1997;). Toxisch wirkt Glutamat in einer Konzentration zwischen 10-100  $\mu\text{M}$  (Choi, 1988), eine Konzentration die aber auch im epileptischen Gewebe durch das Wirken von Glutamattransportern nicht erreicht wird (Bruhn et al., 1992). In der hier vorgelegten Studie zeigten dreidimensional rekonstruierte Interneurone aus epileptischem Gewebe ausgeprägte dendritische Varikositäten. Varikositäten sind Schwellungsprozesse entlang der Dendriten in Bereichen in denen sich Mitochondrien aufhalten (Kunz, 2002). Während eines Anfallsereignisses steigt die intrazelluläre und intra-mitochondriale Kalziumkonzentration an (Kovacs et al., 2001; Kovacs et al., 2002). Man nimmt an, dass die Erhöhung der intra-mitochondrialen Kalziumkonzentration eine zelluläre Antwort auf einen veränderten elektrochemischen Gradienten der Membran darstellt. Das intra-mitochondriale Kalzium wird benötigt, um den elektrochemischen Gradienten nach einem Anfallsereignis wieder herzustellen, dazu wird die mitochondriale ATP-Produktion hochgeregelt (Kann et al., 2003) Ist die mitochondriale ATP-Produktion durch andauernde Anfallsereignisse ausgelastet, kann der oxidative Stress zu einem Anstieg freier Radikale führen und schließlich den Tod der Zelle verursachen (Cock, 2002).

Die Beobachtung, dass Zellschädigungen und Zelltod bei Ratten bereits relativ früh nach der Injektion von Pilocarpin auftreten (siehe oben) steht, bezüglich einer ursächlichen Wirkung des Zelltods auf eine Chronifizierung der Epilepsie, im scheinbaren Widerspruch zur Latenzphase im Pilocarpin-Modell. Die anfallsfreie Latenzphase im Pilocarpin-Modell beträgt ca. 3-4 Wochen. Es ist die Zeit zwischen initialer Pilocarpin-Applikation und dem Auftreten sich unregelmäßig wiederholender Anfallsereignisse (Mello et al., 1993; Arida et al., 1999; Covolan et al., 2000b). Zwischen dem Zeitpunkt, da bereits Zelltod größtenteils stattgefunden hat (Arida et al., 1999) und dem zeitlich unscharf abgegrenzten Eintritt in die chronische Phase der Epilepsie liegen also noch mehrere Wochen. Diese relativ lange Latenz führte dazu, dass auch der gegenteilige Prozess von Zelltod, nämlich die Glia- und Neurogenese, als pathogene Entwicklung diskutiert wird (Tooyama et al., 2002; Parent et al., 2002a; Jang et al., 2003). Elliott und Kollegen zeigten, dass sich die Genexpression in der Ontogenese und bei

Epilepsie sehr stark ähneln (Elliot et al., 2003). Eine Verringerung der konstitutiven Neurogenese in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus konnte als Folge von epileptischen Anfällen nicht beobachtet werden (Gray et al., 2002). Neben der grundsätzlichen Annahme, dass Neurogenese die Netzwerkarchitektur pathologisch verändert, (Parent et al., 2002b) könnte die Neurogenese im adulten Gewebe zu einer erhöhten Netzwerk-Exzitation führen, da neu gebildete Neurone auf GABA-Transmission mit einer Depolarisation reagieren. Dies beruht auf einem Unterschied im Chlorid-Gradienten, welcher in einem frühen Zellstadium durch den Kalium-Chloridtransporter I (KCC1) eingestellt wird, und zellgenetisch später vom KCC2-Transporter kontrolliert wird (Clayton et al., 1998; Lu et al., 1999; Rivera et al., 1999). Die Konsequenzen depolarisierender GABA-Transmission wurden bereits unter 4.2.3. besprochen. Als Auslöser für Epilepsie kommt aber auch die pathologische Neurogenese nicht in Frage. Zumindest führt die Applikation von neurotrophen Faktoren zu Neurogenese aber nicht zu Epilepsie (Pencea et al., 2001).

Durch die Anamnese von Patienten mit TLE wurde versucht einen möglichen Zusammenhang zwischen Epilepsie und Ereignissen vor der Entstehung erster Anfälle aufzuklären. Unter anderem stieß man dabei auf die Beobachtung, dass Patienten mit TLE in ihrer Kindheit überdurchschnittlich häufig Fieberkrämpfe hatten (Gloor, 1991; Cendes et al., 1993; French et al., 1993). Gesundheitsstatistiken für die Durchschnittsbevölkerung lassen allerdings keinen Zusammenhang zwischen frühkindlichen Fieberkrämpfen und TLE erkennen (Annegers et al., 1987; Verity et al., 1991; Berg et al., 1997). So bleibt letztendlich festzuhalten, dass TLE-Patienten häufig in ihrer Kindheit Fieberkrämpfe hatten, aber dass Patienten die in ihrer Kindheit Fieberkrämpfe hatten, nicht überdurchschnittlich häufig eine Temporallappenepilepsie entwickeln. Missbildungen während der Entwicklung des Nervensystems können allerdings sowohl zu frühkindlichen Fieberkrämpfen, als auch zu TLE führen (Chen et al., 1999; Jacobs et al., 1999; Dube et al., 2000), wobei die Missbildungen so vielgestaltig sein können, dass sie in keinerlei offensichtliches Schema einzuordnen sind (Dube et al., 1999).

Zusammenfassend betrachtet wurden bisher mit Epilepsie morphologische, pharmakologische, biochemische und elektrophysiologische Veränderungen in Verbindung gebracht (Westrum et al., 1964; Heineman et al., 1977; French et al., 1980; Schwartzkroin et al., 1980; Johnston et al., 1981; Ribak et al., 1982; Traub et al., 1982; DeLorenzo et al. 1984; Somjen, 1984.; Ben-Ari, 1985; Tauck et al., 1985; Clifford et al., 1987; Schwartz et al., 1987; Sloviter et al., 1987; Turski et al., 1989; Freund et al., 1991; Gulyàs et al., 1992; Isaacson et

al., 1993; Massieu et al., 1995; Buhl et al., 1996; Longo et al., 1997; Perkins et al., 1997; Arida et al., 1999; Chen et al., 1999; McNamara, 1999; Parent, 2000a; Cohen et al., 2002; Klausberger et al., 2003; Heinemann 2004; Morimoto et al., 2004). Für keine der bisher gefundenen Abweichungen zwischen gesundem und epileptischem Gewebe konnte ein ursächlicher, Modell- und Art-übergreifender Zusammenhang nachgewiesen werden (Dalby et al., 2001). Paradoxerweise kann man in gesundem Gewebe durch eine Veränderung der Balance zwischen Inhibition und Exzitation Epilepsie auslösen, hingegen findet man in Schnittpräparaten aus epileptischem Gewebe kaum spontane epileptiforme Entladungen (Cohen et al., 2003). An Epilepsie erkrankte Patienten leiden nicht an ununterbrochenen Anfallsereignissen. Es scheint vielmehr so zu sein, dass die Hypersynchronisation des Nervensystems nur temporär auftritt (Gastaut, 1970). Zwischen den Anfällen sind die Patienten weitestgehend beschwerdefrei. Diese Beobachtung stellt für die Epilepsieforschung eine wichtige Implikation dar. Welche Mechanismen könnten dazu führen, dass eine, wie auch immer geartete, pathologische Veränderung einmal zur Hypersynchronisation und zur Generierung von Anfallsereignissen beiträgt, aber ansonsten die normale Gehirnleistung kaum beeinträchtigt?

Die hier vorgelegte Studie, sowie nahezu ausnahmslos alle Untersuchungen zur Epilepsie gehen wie selbstverständlich von einer von zwei möglichen Grundannahmen aus, nämlich:

1. Zwischen gesundem und epileptischem Gewebe gibt es einen für die Epilepsie typischen Unterschied. Dieser Unterschied ist der Grund der Manifestation einer epileptischen Erkrankung.

Theoretisch denkbar ist aber auch die gegensätzliche Grundannahme, nämlich:

2. Zwischen gesundem und epileptischem Gewebe gibt es keinen für die Epilepsie typischen Unterschied.

Epilepsie könnte auch als Ausnahmeerscheinung synaptischer Plastizität entstehen, mit großer individueller Variabilität. Weltweit leiden ca. ein Prozent der Bevölkerung an Epilepsie, unabhängig von der Rasse, dem Geschlecht sowie Kultur- oder Umwelteinflüssen (siehe 1.). Obwohl dieser Umstand stark gegen eine genetische Ursache der Epilepsie spricht, setzen eventuell allgemeine genetische Prädispositionen verschiedener Art die Grundbedingungen einer epileptischen Erkrankung fest. Kommt es erst einmal zu einem Anfallsereignis, ist die Wahrscheinlichkeit einen zweiten Anfall zu erleiden bereits erhöht (Sagar et al., 1987). Der Ausdruck „Lernen und Gedächtnis“ stellt letztendlich einen Euphemismus dar. Möglicherweise liegt auch darin die Ursache, dass die grundlegendste Eigenschaft des

Nervengewebes, die Plastizität als pathologischer Auslöser für Epilepsie selten diskutiert wurde.