

Dynamik somatodendritischer
Aktionspotenziale in hippocampalen CA1-
Pyramidenzellen der Maus
(*Mus musculus*; Linné, 1758) nach Kainat-
induziertem *Status epilepticus* und unter
Einfluss von NS5806

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften, der Universität Hamburg

vorgelegt von

Daniel Minge

aus Braunschweig

Hamburg, Juni 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. R. BÄHRING
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. C. LOHR
Tag der Disputation: 20. April 2012

Hamburg, den 29. März 2012



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

Zusammenfassung

Die intrinsische Erregbarkeit von Neuronen unterliegt einer fortwährenden physiologischen Regulation. Eine Fehlanpassung dieser Regulation während pathophysiologischer Prozesse kann epileptische Anfälle begünstigen und zur Entstehung einer chronischen Epilepsie beitragen. Die frühen molekularen Umstrukturierungsprozesse zum Beginn einer Epileptogenese sind für die spätere Ausprägung der Epilepsie ausschlaggebend, bisher jedoch wenig verstanden. In dieser Arbeit wurde die Epileptogenese im Kainat-Maus-Modell durch einen initialen *Status epilepticus* (SE) experimentell induziert. In hippocampalen CA1-Pyramidenzellen aus einer Hirnschnitt-Präparation von Kontrolltieren (Sham-Zellen) und direkt nach dem Kainat-induzierten SE (KA-Zellen) wurde nach Unterschieden in der Dynamik von Aktionspotenzialen (APs) gesucht, um diese als Indikatoren für frühe Veränderungen der neuronalen Erregbarkeit zu nutzen.

KA-Zellen zeigten in somatischen *Whole-Cell-Patch-Clamp*-Ableitungen nach kurzen Depolarisationen eine längere AP-Latenzzeit als Sham-Zellen und einen Trend zu größeren Chronaxie-Werten, die auf Einschränkungen in der AP-Entstehung schließen lassen. Der AP-Verlauf zeigte in KA-Zellen einen flacheren Aufstrich und war insgesamt deutlich breiter als in Sham-Zellen. Zwischen Repolarisation und Nachdepolarisation zeigten die somatischen APs aller Sham-Zellen eine deutliche Kerbe (*notch*), die in den APs von 44 % aller KA-Zellen fehlte. Die Abwesenheit des *notch* korrelierte mit besonders breiten APs und einer erhöhten Amplitude von AP-assoziierten Ca^{2+} -Transienten, die in Ca^{2+} -*Imaging*-Experimenten am Soma gemessen wurden. Die SE-induzierten Veränderungen des AP-Verlaufs hatten aber keine Auswirkungen auf das Entladungsmuster von repetitiven APs in CA1-Pyramidenzellen.

Ca^{2+} -Transienten, die bei der retrograden AP-Weiterleitung im Apikaldendriten der CA1-Pyramidenzellen entstehen, wurden in KA-Zellen stärker abgeschwächt als in Sham-Zellen. Dies deutet auf eine geringere dendritische Erregbarkeit nach dem SE hin, die möglicherweise durch eine erhöhte Verfügbarkeit des $\text{K}_{\text{v}4.2}$ -vermittelten somatodendritischen A-Typ K^+ -Stroms (I_{SA}) hervorgerufen wurde.

In pharmakologischen Experimenten wurde bei Anwesenheit des " $\text{K}_{\text{v}4}$ -Aktivators" NS5806 ebenfalls eine verstärkte Abschwächung von dendritischen Ca^{2+} -Transienten beobachtet, die dem Effekt eines SE ähnelte. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der erwarteten Potenzierung des $\text{K}_{\text{v}4.2}$ -vermittelten I_{SA} durch NS5806.

Abstract

The intrinsic excitability of neurons is subject to continuous physiological regulation. Maladjustment of this regulation during pathophysiological processes can promote epileptic seizures and contribute to the formation of chronic epilepsy. Early molecular remodeling processes towards the beginning of epileptogenesis are a determining factor for the characteristics of subsequent epilepsy, but are not well understood. The present work utilizes the kainic acid mouse model to induce epileptogenesis via an initial *status epilepticus* (SE). Hippocampal CA1 pyramidal neurons out of a slice preparation of sham-treated animals (sham cells) and immediately after SE (KA cells) were tested for differences in action potential (AP) dynamics to be used as an early indicator for changes in neuronal excitability.

After short depolarisations in somatic whole-cell patch-clamp recordings KA cells showed a longer AP latency than sham cells and a trend towards increased chronaxy values, suggesting an impairment of AP generation. APs in KA cells showed a reduced upstroke velocity and were collectively broader than APs in sham cells. The notch typically observable between terminating AP repolarization and beginning AP afterdepolarization in all sham cells was absent in 44 % of the APs in KA cells. The absence of the notch correlated with exceptionally broad APs and increased AP induced Ca^{2+} influx, determined in Ca^{2+} imaging experiments near the soma. SE induced changes in AP shape had no influence on repetitive AP firing pattern in CA1 pyramidal cells.

Ca^{2+} transients, which arise from retrograde spread of APs along the apical dendrite, were attenuated more robustly in KA than in sham cells. This points to a reduced dendritic excitability after SE, that may be due to an increased availability of $\text{K}_v4.2$ -mediated somatodendritic A-type K^+ current (I_{SA}).

In pharmacological experiments an increased attenuation of dendritic Ca^{2+} transients, that resembles SE mediated effects, was also observed in the presence of the " K_v4 activator" NS5806. This result is consistent with an anticipated potentiation of $\text{K}_v4.2$ -mediated I_{SA} by NS5806.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Epilepsie und <i>Status epilepticus</i> -Modelle.....	1
1.2 Signalfluss in der Hippocampusformation	2
1.3 Erregungskontrolle in CA1-Pyramidenzellen.....	3
1.4 Regulation des I_{SA}	9
1.5 Ziel der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Verwendete Tiere.....	13
2.2 Injektion von KA und Bewertung des <i>Status epilepticus</i>	13
2.3 Präparation hippocampaler Schnitte	15
2.4 Die <i>Patch-Clamp</i> -Technik.....	18
2.5 Die Ca^{2+} - <i>Imaging</i> -Methode	22
2.6 Aufbau des Messstandes.....	24
2.7 Versuchsdurchführung.....	27
2.7.1 Optische Auswahl und Ausrichtung der hippocampalen Schnitte	27
2.7.2 Befüllen von CA1-Pyramidenzellen in der <i>Whole-Cell</i> -Konfiguration	28
2.7.3 CC-Protokolle.....	29
2.7.4 <i>Imaging</i> des b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Einstroms	32
2.8 Pharmaka	33
2.9 Auswertung der Messdaten.....	35

2.9.1 Auswertung der CC-Experimente	35
2.9.1.1 Membraneigenschaften.....	36
2.9.1.2 AP-Latenzzeit und AP-Frequenz.....	37
2.9.1.3 Rheobase- und Chronaxie-Werte.....	38
2.9.1.4 Entstehung und Verlauf einzelner APs.....	38
2.9.2 Auswertung der Ca ²⁺ -Imaging-Experimente.....	40
2.9.2.1 Rohdatenauswertung mit TILLvisION.....	40
2.9.2.2 Weiterverarbeitung der Daten mit Excel	43
2.10 Statistik	45
3 Ergebnisse.....	46
3.1 Kainat-induzierter <i>Status epilepticus</i> in Mäusen	46
3.1.1 Dosisfindungs-Experimente	46
3.1.2 Zeitlicher Verlauf des initialen SE	46
3.1.3 Abweichungen vom erwarteten KA-Wirkmuster.....	50
3.2 Erregbarkeit von CA1-Pyramidenzellen nach SE-Induktion	50
3.2.1 Membraneigenschaften	51
3.2.2 AP-Latenzzeit und AP-Frequenz.....	52
3.2.3 Rheobase- und Chronaxie-Werte	54
3.2.4 Entstehung und Verlauf einzelner APs	57
3.3 Dendritische Erregungsausbreitung in CA1-Pyramidenzellen.....	61
3.3.1 Erfassung der Abschwächung b-AP-assoziierter Ca ²⁺ -Transienten in Sham- und KA-Zellen	61
3.3.2 Gesamtauswertung der Abschwächung b-AP-assoziierter Ca ²⁺ - Transienten in Sham- und KA-Zellen.....	63
3.3.3 Statistische Betrachtung der Abschwächung b-AP-assoziierter Ca ²⁺ - Transienten in Sham- und KA-Zellen.....	66
3.4 Pharmakologische Beeinflussungen der AP-Dynamik von CA1-Pyramidenzellen.....	68
3.4.1 Effekte von NS5806 auf somatische APs.....	68
3.4.1.1 Veränderung von AP-Aufstrich, -Amplitude und -Breite durch NS5806	68
3.4.1.2 Veränderung der AP-N durch NS5806.....	71
3.4.2 Effekte von 4-AP und NS5806 auf die Abschwächung b-AP- assoziierter Ca ²⁺ -Transienten	71

4 Diskussion.....	78
4.1 Epilepsie-Modelle.....	78
4.2 Somatodendritische Erregbarkeit nach SE-Induktion	81
4.2.1 Entstehung von somatischen APs nach SE-Induktion	81
4.2.2 Verlauf von somatischen APs nach SE-Induktion	87
4.2.3 Abschwächung von b-APs nach SE-Induktion	93
4.3 Wirkung von NS5806 auf die AP-Dynamik von CA1-Pyramidenzellen.....	100
4.4 Ausblick.....	108
5 Literatur	109
6 Anhang.....	126
6.1 Zusammenfassende Ergebnis-Tabellen	126
6.2 Häufig verwendete Abkürzungen	129
6.3 Wissenschaftlicher Werdegang	131
6.4 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	132
6.5 Danksagung	133

1 Einleitung

1.1 Epilepsie und *Status epilepticus*-Modelle

Epilepsie ist eine chronische neurologische Erkrankung, die durch das wiederholte und unvermittelte Auftreten von Krampfanfällen definiert wird (Williams *et al.*, 2009). In der Patientenbehandlung wird grundlegend zwischen der erbten Epilepsie, die z.B. auf Mutationen einzelner Ionenkanäle zurückzuführen ist, und der erworbenen Epilepsie unterschieden (Berg *et al.*, 2010; Capovilla *et al.*, 2009). In schätzungsweise 30-50 % aller Fälle sind die Patienten von einer erworbenen Epilepsie betroffen, die im Laufe des Lebens durch ein initial schädigendes Ereignis ausgelöst wurde (Herman, 2002). Zu diesen Ereignissen zählen Hirnverletzungen durch Schlaganfälle, Hirntraumata, Hirntumore oder Entzündungen des Gehirns (Herman, 2002; DeLorenzo *et al.*, 2005). Die Entstehung einer Epilepsie (Epileptogenese) gliedert sich in drei Phasen: Eine initiale Phase, in der zelluläre Schädigungen eintreten, die Latenzphase ohne äußere Symptome und die chronische Epilepsie mit spontan auftretenden, wiederkehrenden Anfällen (DeLorenzo *et al.*, 2005). Zur Erforschung der Epileptogenese werden unter anderem *in vivo*-Modelle verwendet, in denen durch einen lang anhaltenden epileptischen Anfall, dem *Status epilepticus* (SE), eine initiale Zellschädigung erzeugt wird. Der SE kann durch direkte elektrische oder pharmakologische Stimulation einer spezifischen Hirnregion oder durch systemische Applikation von konvulsiven Substanzen hervorgerufen werden (McNamara *et al.*, 2006). Dem Ort der Schädigung entsprechend kann es in der chronischen Phase zur so genannten partiellen Epilepsie mit lokal begrenzten Anfällen in einzelnen Hirnarealen kommen (Walker *et al.*, 2002; Capovilla *et al.*, 2009). Die Temporallappen Epilepsie (TLE) ist beim Menschen die am häufigsten auftretende Form der partiellen Epilepsie und betrifft ca. 40 % der erwachsenen Epilepsie-Patienten (McNamara *et al.*, 2006). Als etablierte TLE-Modelle werden Kainat- oder Pilocarpin-Injektionen bei Ratte oder Maus verwendet (Ben Ari & Cossart, 2000; Curia *et al.*, 2008). Der Tierversuch gliedert sich, analog zur Epileptogenese von TLE-Patienten, in eine initiale Schädigung (durch den SE), eine Latenzphase (ohne äußere Anzeichen von Epilepsie) und eine chronische Phase (Epilepsie mit spontan auftretenden, wiederkehrenden Anfällen). Meistens werden die Auswirkungen einer TLE in der chronischen Phase untersucht. Zu diesem Zeitpunkt kann bereits ein massiver Zelltod

eingetreten sein (Covolan & Mello, 2000; Walker *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2009; Ben Ari & Dudek, 2010), der mit einer pathophysiologischen Anpassung der Proteinexpression (Laurén *et al.*, 2010) und der Erregbarkeit der überlebenden Zellen einhergeht (Beck & Yaari, 2008). Prinzipiell können *in vivo*-Modelle jedoch auch zur Untersuchung eines sehr frühen Epileptogenese-Stadiums verwendet werden (Lugo *et al.*, 2008; Shruti *et al.*, 2008). Die TLE betrifft primär die Regionen der Hippocampusformation (Spencer & Spencer, 1994), die im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

1.2 Signalfluss in der Hippocampusformation

Die Hippocampusformation kann als eine Gruppe benachbarter Hirnregionen mit jeweils spezifischer Zellanatomie definiert werden: dem entorhinalen Kortex, dem *Gyrus dentatus* (GD), dem Hippocampus (*Cornu ammonis*, CA) und dem *Subiculum* (Amaral & Lavenex, 2007; Abb. 1).

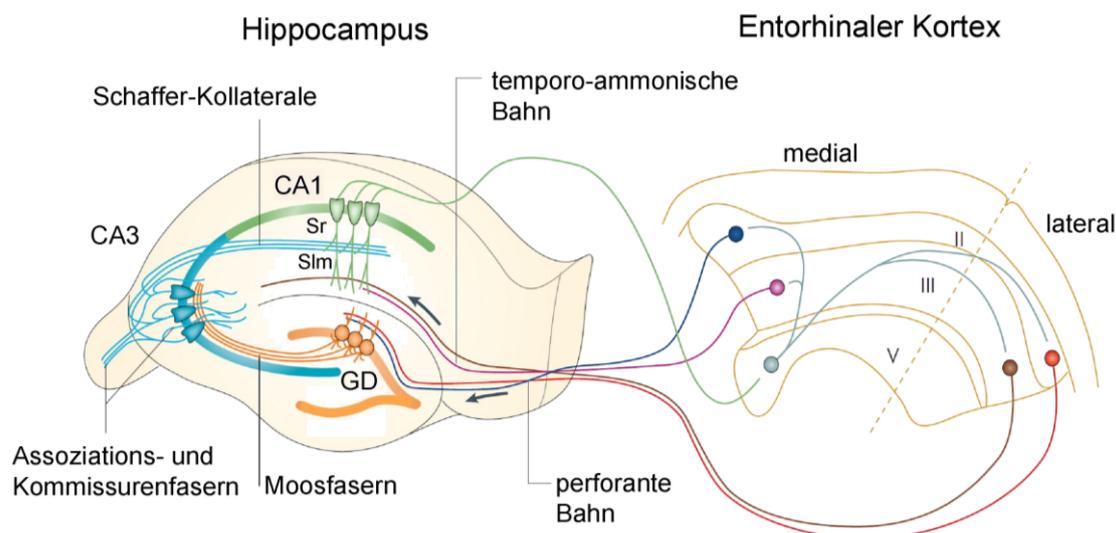


Abbildung 1: Darstellung der wichtigsten hippocampalen Bereiche und ihre kortikalen Eingänge.

Schema eines Hippocampuschnitts. Die Zellen sind planar in einem trisynaptischen Schaltkreis verbunden: Körnerzellen des *Gyrus dentatus* (GD) erhalten über die perforante Bahn Eingang aus dem medialen und lateralen entorhinalen Kortex (Schicht II). Die Moosfasern der Körnerzellen innervieren die Pyramidenzellen der CA3-Region, diese leiten die Erregung über die Schaffer-Kollaterale weiter in die CA1-Region. Über die Assoziations- und Kommissurenfasern stehen die Zellen der CA3-Region außerdem in Kontakt mit lateral benachbarten Zellen bzw. Zellen des kontralateralen Hippocampus. Während die Schaffer-Kollaterale die Dendriten der CA1-Pyramidenzellen im *Stratum radiatum* (Sr) queren, erhalten diese Zellen auch einen monosynaptischen entorhinal-kortikalen Eingang (aus der Schicht III) über die temporo-ammonische Bahn, deren Synapsen weiter distal im *Stratum lacunosum-moleculare* (Slm) liegen. Das *Subiculum* (in der Zeichnung nicht berücksichtigt) erhält seinen Eingang von den CA1-Pyramidenzellen und leitet die Informationen in den entorhinalen Kortex (Schicht V) zurück. Modifiziert nach Neves *et al.*, 2008.

Die Neurone dieser Regionen kommunizieren über synaptische Verbindungen miteinander. Die meisten Erregungen werden aus dem entorhinalen Kortex über einen Schaltkreis aus drei glutamatergen Synapsen weitergeleitet (trisynaptischer Schaltkreis; Andersen *et al.*, 1971). Die Axone der Zellen aus der Schicht II des medialen und lateralen entorhinalen Kortex projizieren über die perforante Bahn in den GD (Abb. 1; Neves *et al.*, 2008). Die Körnerzellen des GD innervieren über die Moosfasern die Dendriten der Pyramidenzellen in der CA3-Region des Hippocampus. Diese Zellen senden Axone aus, die sich gabeln und einerseits benachbarte Zellen des ipsi- bzw. kontralateralen Hippocampus ansteuern (Assoziations- bzw. Kommissurenfasern) und andererseits als Schaffer-Kollaterale die CA1-Region erreichen (Amaral & Lavenex, 2007). CA1-Pyramidenzellen besitzen einen dominanten Apikaldendriten, der mehrere 100 μm lang ist (Bannister & Larkman, 1995; vgl. Abb. 2B). Der proximale Abschnitt des Apikaldendriten durchläuft vom Soma aus das *Stratum radiatum* (Sr), in dem die synaptische Verbindungen mit den Schaffer-Kollateralen der CA3-Zellen liegen. Beim Übergang in weiter distal gelegene Bereiche trifft der Dendrit im *Stratum lacunosum-moleculare* (Slm) auf Axone aus der Schicht III des medialen und lateralen entorhinalen Kortex, die über die temporo-ammonische Bahn direkt in die CA1-Region des Hippocampus verlaufen (monosynaptischer Schaltkreis; Remondes & Schuman, 2002; Ang *et al.* 2006). Die CA1-Pyramidenzellen verarbeiten demzufolge die synaptischen Eingänge der Schaffer-Kollateralen und der temporo-ammonischen Bahn (Remondes & Schuman, 2002). Die Axone der CA1-Pyramidenzellen verlaufen zum größten Teil in das *Subiculum*, dessen Neurone unter anderem in die Schicht V des entorhinalen Kortex projizieren (Amaral & Lavenex 2007). CA1-Pyramidenzellen weisen eine spezifische Morphologie und Erregungsphysiologie auf (Amaral & Lavenex, 2007; Spruston & McBain, 2007), die im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

1.3 Erregungskontrolle in CA1-Pyramidenzellen

Die Erregbarkeit einer CA1-Pyramidenzelle hängt von ihren passiven und aktiven Membraneigenschaften ab (Spruston & McBain, 2007). Passive Eigenschaften, wie die Membrankapazität (C_m), werden durch die individuelle Zell-Morphologie bestimmt und unterscheiden sich daher auch in den verschiedenen Teilabschnitten der CA1-Pyramidenzelle (Vetter *et al.*, 2001). Die aktiven Membraneigenschaften hängen maßgeblich

von der kooperativen Aktivität vieler verschiedener Ionenströme ab. Diese Ströme verleihen der CA1-Pyramidenzelle eine spezifische intrinsische Erregbarkeit (Migliore & Shepherd, 2002; Lai & Jan, 2006). Zusammen bestimmen passive und aktive Membraneigenschaften ob ein Aktionspotenzial (AP) entsteht, welchen Verlauf es zeigt und wie es weitergeleitet wird (Spruston & McBain, 2007). Vor, während und nach einem AP aktivieren verschiedene Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ströme (Bean, 2007; Baranauskas, 2007). Sie werden von Na^+ -, K^+ - oder Ca^{2+} -selektiven Ionenkanalproteinen vermittelt, die in der Regel in Abhängigkeit vom Membranpotenzial (spannungsabhängig) und mit einer spezifischen Geschwindigkeit (Kinetik) aktivieren und inaktivieren (Hille, 2001; Gutman *et al.*, 2005; Catterall *et al.*, 2005a; Dolphin, 2009). Änderungen in diesen biophysikalischen Eigenschaften von Ionenkanälen oder deren Anzahl in der Zellmembran (Kanaldichte) führen zu Veränderungen in der intrinsischen Erregbarkeit von Neuronen, man spricht von "intrinsischer Plastizität" (Schulz, 2006; Remy *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2010). Unter physiologischen Bedingungen wird intrinsische Plastizität in CA1-Pyramidenzellen durch die Aktivität postsynaptischer Glutamatrezeptoren und nachgeschalteter Signalkaskaden ausgelöst (Xu *et al.*, 2005; Frick & Johnston, 2005). Sie wird daher als eine zelluläre Grundlage von Lernen und Gedächtnis angesehen, die parallel und synergistisch zu Änderungen der synaptischen Übertragung zwischen hippocampalen Neuronen vorkommt (synaptische Plastizität; Daoudal & Debanne, 2003; Schulz, 2006). Unter pathophysiologischen Bedingungen kann eine Fehlregulation der intrinsischen Erregbarkeit epileptische Anfälle begünstigen und wahrscheinlich zur Entstehung einer chronischen Epilepsie beitragen (McNamara *et al.*, 2006; Beck & Yaari, 2008; Remy *et al.*, 2010). Generell kann intrinsische Plastizität in verschiedenen Abschnitten der CA1-Pyramidenzelle auftreten (Daoudal & Debanne, 2003; Beck & Yaari, 2008). Die erregbare Membranoberfläche einer CA1-Pyramidenzelle ist in axonale Schnürringe, AIS (*axon initial segment*), Soma, Apikaldendrit und distalen Apikaldendrit untergliedert (Beck & Yaari, 2008; Abb. 2A). Jeder Membranabschnitt einer CA1-Pyramidenzelle besitzt spezialisierte Funktionen und eine spezifische Ionenkanal-Ausstattung (Lai & Jan, 2006; Vacher *et al.*, 2008). Die physiologische Verteilung von spannungsabhängigen Ionenkanälen innerhalb einer CA1-Pyramidenzelle ist in Abbildung 2A schematisch zusammengefasst.

Die Entstehung von APs ist aufgrund der besonders hohen Anzahl spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle (Na_v) im AIS der CA1-Pyramidenzelle am wahrscheinlichsten, aber

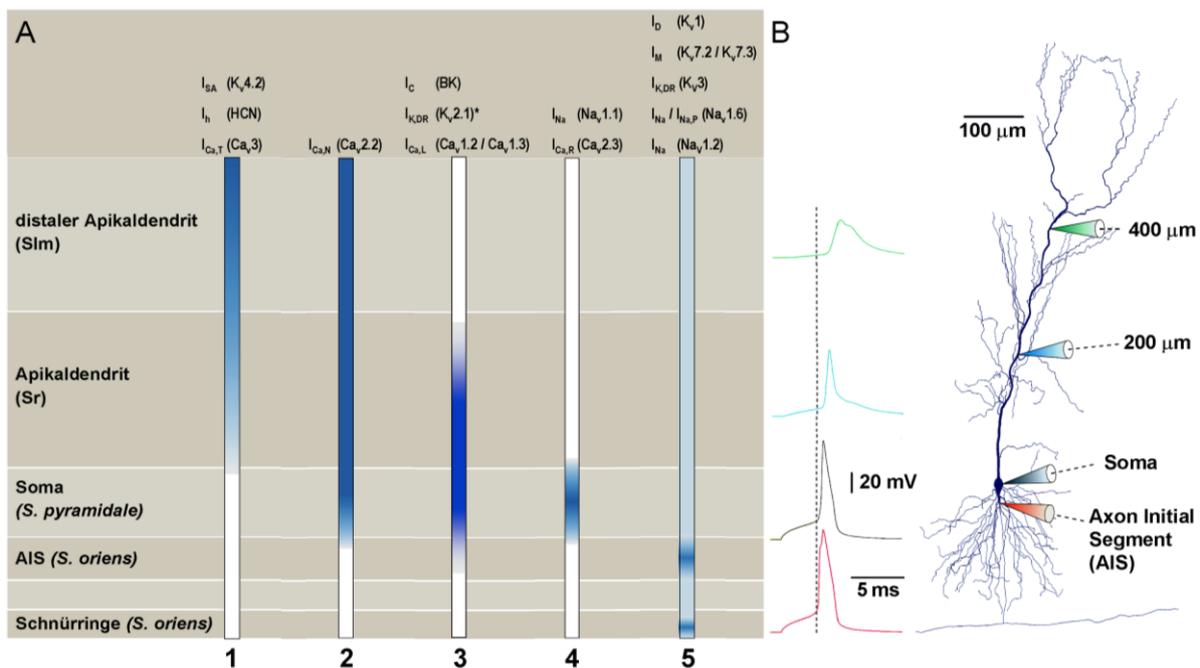


Abbildung 2: Ionenkanal-Verteilung und b-AP-Abschwächung in einer CA1-Pyramidenzelle.

A: Die intrinsische Erregbarkeit einer CA1-Pyramidenzelle wird maßgeblich von Na⁺, K⁺- und Ca²⁺-Stromkomponenten bestimmt, die von spannungsgesteuerten Ionenkanalproteinen (Na_v, K_v, Ca_v, HCN und BK) mit einer spezifischen Verteilung vermittelt werden: (1) Ansteigende Kanaldichte im Apikaldendriten: I_{SA} (K_v4.2), I_h (HCN), $I_{Ca,T}$ (Ca_v3). (2) Gleichbleibende Kanaldichte im Soma und im gesamten Apikaldendriten: $I_{Ca,N}$ (Ca_v2.2). (3) Vorkommen von Kanalproteinen im Soma und in abnehmender Kanaldichte im proximalen Apikaldendriten: I_C (BK), eine Komponente des $I_{K,DR}$ (K_v2.1 * = abweichend von Abbildung auch im AIS angereichert), $I_{Ca,L}$ (Ca_v1.2 und Ca_v1.3). (4) Kanalproteine kommen nur im Soma vor: eine Komponente des I_{Na} (Na_v1.1), $I_{Ca,R}$ (Ca_v2.3). (5) Kanalproteine sind in AIS und Ranvier'schen Schnürringen angereichert (beeinflussen die AP-Entstehung im AIS und die AP-Ausbreitung im Axon), aber auch in allen somatodendritischen Bereichen vorhanden: I_D (K_v1), I_M (Heteromere aus K_v7.2 und K_v7.3), eine Komponente des $I_{K,DR}$ (K_v3), weitere Komponenten des I_{Na} (Na_v1.2 und Na_v1.6), persistierender Anteil im gesamten Na⁺-Strom $I_{Na,P}$ (vor allem Na_v1.6). **B:** Morphologie einer CA1-Pyramidenzelle: Soma im *Stratum pyramidale* mit zahlreichen Basaldendriten und einem Axon (verläuft im *Stratum oriens*), der dominante Apikaldendrit verläuft im *Stratum radiatum* (Sr) und *Stratum lacunosum-moleculare* (Slm). Schematische Patch-Pipetten zeigen die Ableitpunkte für die b-AP Kurven im gleichen Farbcode. Modifiziert nach Beck & Yaari 2008.

grundsätzlich auch im Soma und Dendriten möglich (Kole *et al.*, 2008; Gasparini *et al.*, 2004). Die Gesamtamplitude aller Na_v-Kanal-vermittelten transienten Na⁺-Ströme (I_{Na}) enthält auch persistierende Na⁺-Ströme ($I_{Na,P}$, *persistent*; etwa 0,5-5 %; Goldin, 1999; Bean, 2007). Da der $I_{Na,P}$ bereits bei stark hyperpolarisierten Potenzialen aktivierbar ist, beschleunigt er die Depolarisation bis zur Aktivierung des transienten I_{Na} , durch die das AP schließlich ausgelöst wird (Royeck *et al.*, 2008). Na⁺-Ströme, die von Na_v-Kanälen der Familie 1, Isoform 6 (Na_v1.6) vermittelt werden, besitzen einen besonders hohen $I_{Na,P}$ -Anteil (Burbidge *et al.*, 2002). Na_v1.6-Kanäle sind wie die Na_v1.2-Kanal-Isoform ubiquitär in der CA1-Pyramidenzelle verteilt, aber besonders stark im AIS und den Schnürringen des Axons

angereichert. Das Vorkommen von $\text{Na}_v1.1$ ist hingegen auf die somatische Membran beschränkt (Lorincz & Nusser, 2010; Abb. 3A). K^+ -Ströme, die unterhalb der AP-Schwelle aktivieren, können die AP-Entstehung durch einen hyperpolarisierenden Einfluss verzögern. Der I_D (Dendrotoxin-sensitiver K^+ -Strom) wird wahrscheinlich von verschiedenen Isoformen innerhalb der Familie 1 spannungsabhängiger K^+ -Kanäle (K_v1) vermittelt (Storm, 1988; Metz *et al.*, 2007), die vor allem im AIS lokalisiert sind (Vacher *et al.*, 2008; Abb. 2A). Dem I_{SA} (somatodendritischer A-Typ K^+ -Strom) liegen in CA1-Pyramidenzellen hingegen ausschließlich K_v4 -Kanäle der Isoform 2 zugrunde ($\text{K}_v4.2$ -Kanalkomplex; Serôdio & Rudy, 1998; Maffie & Rudy, 2008; vgl. Abschnitt 1.4). Die $\text{K}_v4.2$ -Kanaldichte nimmt ausgehend vom Soma entlang des Apikaldendriten stetig zu (Abb. 2A; Hoffman *et al.*, 1997). Da sowohl I_D als auch I_{SA} inaktivieren, ist ihre AP-verzögernde Wirkung jedoch nur transient vorhanden (Storm *et al.*, 1990).

Im Experiment können durch kurze somatische Strominjektionen einzelne APs evoziert werden. Diese APs weisen in CA1-Pyramidenzellen am Ende der Repolarisation typischerweise eine deutliche Kerbe (*notch*) auf, die von einer AP-Nachdepolarisation (AP-N) gefolgt wird (Storm, 1987; Storm *et al.*, 1990).

Die AP-Repolarisation wird vor allem durch spät rektifizierende K^+ -Ströme $\text{I}_{K,DR}$ (*delayed rectifier*) und den Ca^{2+} -sensitiven I_C (*Ca^{2+} -dependent K^+ current*) hergestellt (Golding *et al.*, 1999; Hille, 2001; Bean, 2007). Der $\text{I}_{K,DR}$ besteht aus einer K_v3 - und einer $\text{K}_v2.1$ -vermittelten Komponente (Baranauskas, 2007). K_v3 -Kanäle kommen vor allem in den Schnürringen des Axons vor, weisen aber auch eine ubiquitäre somatodendritische Verteilung auf (Abb. 2A; Vacher *et al.*, 2008). $\text{K}_v2.1$ -Kanäle sind im AIS angereichert, aber auch im Soma und proximalen Apikaldendriten lokalisiert (Abb. 2A; Vacher *et al.*, 2008). Die Expression von K_v3 -Kanälen ist in CA1-Pyramidenzellen insgesamt um ein vielfaches geringer als die von $\text{K}_v2.1$ -Kanälen (Baranauskas, 2007; Vacher *et al.*, 2008). Der I_C wird durch BK-Kanäle (*big conductance K^+ channel*) im Soma und im proximalen Apikaldendriten vermittelt (Abb. 2A; Sah & Louise Faber, 2002; Vacher *et al.*, 2008). Die schnelle Aktivierung des I_C ist für den *notch* eines einzelnen somatischen APs verantwortlich (Storm, 1987). Die AP-N wird zu einem Teil durch den anhaltend aktiven $\text{I}_{\text{Na,P}}$ gebildet (Yue *et al.*, 2005), enthält jedoch auch eine Ca^{2+} -getragene Komponente, die von der Aktivierung des $\text{I}_{\text{Ca,R}}$ abhängt (Metz *et al.*, 2005). Der $\text{I}_{\text{Ca,R}}$ (*resistant*; da gegenüber vielen Ca^{2+} -Kanal-Blockern unempfindlich) wird von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen

der Familie 2, Isoform 3 ($Ca_v2.3$) vermittelt. Die Expression von $Ca_v2.3$ ist auf das Soma beschränkt (Yokoyama *et al.*, 1995; Abb. 2A). Das Ausmaß der AP-N wird durch die Aktivierung des durch M1-muskarinische Acetylcholinrezeptoren inhibierbaren I_M (M-Strom; Brown & Passmore, 2009) und des I_D (Metz *et al.*, 2007) begrenzt. Der I_M wird durch $K_v7.2/K_v7.3$ -Heteromere vermittelt, die in geringer Dichte ubiquitär verteilt sind und im AIS akkumulieren (Vacher *et al.*, 2008; Abb. 2A).

Auch die Membran der Apikaldendriten von CA1-Pyramidenzellen besitzt durch die ubiquitäre Verteilung von Na_v -Kanalproteinen aktive Eigenschaften (Spruston & McBain, 2007; Lorincz & Nusser, 2010; Abb. 2A). Die Dichte der Ca_v -Kanäle bleibt im Verhältnis zu den Na_v -Kanälen entlang des Dendriten insgesamt konstant, es gibt jedoch Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Ca_v -Kanal-Isoformen (Magee & Johnston, 1995; Migliore & Shepherd, 2002; Johnston *et al.*, 1996). $Ca_v2.2$ -Kanäle vermitteln den $I_{Ca,N}$ (*neuron*) und kommen im Soma und entlang des gesamten Apikaldendriten von CA1-Pyramidenzellen vor (Mills *et al.*, 1994; Abb. 2A). $Ca_v1.2$ - und $Ca_v1.3$ -Kanaluntereinheiten kommen ebenfalls somatisch vor, sind jedoch auf den proximalen Apikaldendriten beschränkt und vermitteln dort den $I_{Ca,L}$ (*longlasting*; Hell *et al.*, 1993; Abb. 2A). Der $I_{Ca,T}$ (*transient*) wird von Isoformen der Ca_v3 -Familie vermittelt (Talley *et al.*, 1999), deren Verteilungsdichte in einem Gradienten entlang des Dendriten zunimmt (Vacher *et al.*, 2008). Der Anteil des $I_{Ca,T}$ am gesamten dendritischen Ca^{2+} -Strom steigt daher mit zunehmendem Abstand vom Soma an (Christie *et al.*, 1995; Magee & Johnston, 1995). Auch HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated*)- und $K_v4.2$ -Kanäle sind in CA1-Pyramidenzellen in einem steilen Gradienten entlang des Apikaldendriten verteilt (Vacher *et al.*, 2008). HCN-Kanäle vermitteln den I_h (*hyperpolarization activated current*) aus den monovalenten Kationen Na^+ und K^+ (Biel *et al.*, 2009). Der I_h aktiviert bei Potenzialen unterhalb von -65 mV; inaktiviert aber nicht und kann daher das Ruhemembranpotenzial (RMP) und den Eingangswiderstand (R_{in}) der Zelle beeinflussen (Surges *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2008). Zudem ist der I_h an der zeitlichen Integration von exzitatorischen postsynaptischen Potenzialen (EPSPs), die bei synaptischer Aktivität an glutamatergen Synapsen entstehen, beteiligt (Magee, 1998; Tsay *et al.*, 2007; George *et al.*, 2009). Der $K_v4.2$ -vermittelte I_{SA} wirkt transienten Depolarisationen entgegen und verhindert so eine unkontrollierte dendritische Erregung (Yuste, 1997). Auf diese Weise begrenzt der I_{SA} einerseits die räumliche Summation von EPSPs (Ramakers & Storm, 2002) und dämpft andererseits die retrograde Ausbreitung von Aktionspotenzialen aus dem Soma ab (Hoffman *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 1999). Die Amplitude eines solchen

b-APs (*backpropagating action potential*) ist nicht vollständig regenerativ und nimmt mit Abstand vom Soma ab (Golding *et al.*, 2001; Migliore & Shepherd, 2002). Das Ausmaß der b-AP-Abschwächung wird über das Verhältnis von verfügbaren Na^+ - und K^+ -Strömen kontrolliert (Bernard & Johnston, 2003). Da die I_{Na} -Dichte entlang des Dendriten konstant bleibt, ist für die b-AP-Abschwächung die ansteigende Dichte des I_{SA} direkt verantwortlich (Magee & Johnston, 1995; Johnston *et al.*, 1996; Hoffman *et al.*, 1997; Migliore *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2011). Durch die unterschwellige I_{SA} -Aktivität nimmt die Amplitude des b-APs entlang des Dendriten stetig ab, bis die Depolarisation der Membran nicht mehr ausreicht, um weiter distal gelegene Na_v -Kanäle zu aktivieren (Abb. 2B). An diesem Punkt schaltet die b-AP-Fortleitung gleichsam von aktiv auf passiv um und verebbt sehr schnell (Bernard & Johnston, 2003).

Aufgrund dieser zentralen Schlüsselrolle bei der Kontrolle der dendritischen Erregbarkeit von CA1-Pyramidenzellen führt eine permanente Beeinträchtigung des I_{SA} zu neuronaler Übererregbarkeit. So sind $\text{K}_v4.2$ -knockout-Mäuse gegenüber KA empfindlicher und zeigten schon in geringeren Dosen als Wildtyp-Mäuse einen SE (Barnwell *et al.*, 2009). In einem klinischen Fall wurde eine C-terminale Deletion des humanen $\text{K}_v4.2$ -Kanalproteins als Ursache einer erblichen Epilepsie beschrieben (Singh *et al.*, 2006). Der $\text{K}_v4.2$ -Kanal wird aber auch vermehrt mit erworbenen Epilepsien in Verbindung gebracht. Im Pilocarpin-Modell für chronische TLE wurde eine verringerte $\text{K}_v4.2$ -Expression im Dendriten von CA1-Pyramidenzellen beobachtet, die mit einem Verlust der b-AP-abschwächenden Wirkung im distalen Dendriten einherging (Bernard *et al.*, 2004; Monaghan *et al.*, 2008). Eine klinische Untersuchung lieferte zudem Hinweise auf eine verminderte dendritische I_{SA} -Dichte in CA1-Pyramidenzellen von Patienten mit Epilepsie-verursachenden fokalen Läsionen (Aronica *et al.*, 2009). Demnach liegt im chronischen Modell und bei Epilepsie-Patienten offenbar eine Reduktion des I_{SA} vor. Über akute Veränderungen des I_{SA} während der Epileptogenese ist hingegen wenig bekannt. Möglicherweise finden Prozesse zur Regulationen des I_{SA} schon zu einem früheren Zeitpunkt, während der initialen Phase der Epileptogenese, statt. So besteht eine Koinzidenz zwischen der vermehrten Aktivierung einer Neuron-spezifischen Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK; *extracellular signal-regulated kinase*, ERK) und einer zunehmenden Phosphorylierung des $\text{K}_v4.2$ -Kanalkomplexes kurz nach einem KA-vermittelten SE (Lugo *et al.*, 2008, vgl. Abschnitt 1.4). Die funktionellen Auswirkungen auf die b-AP-Abschwächung im

Apikaldendriten der CA1-Pyramidenzellen wurden akut nach einem SE bisher nicht untersucht.

Für die lang- und kurzfristige Regulation des I_{SA} könnten verschiedene Mechanismen verantwortlich sein, die im nächsten Abschnitt beschrieben werden.

1.4 Regulation des I_{SA}

Die molekulare Identität des I_{SA} ist der $K_v4.2$ -Kanalproteinkomplex (Abb. 3). Funktionelle $K_v4.2$ -Kanäle werden aus vier unabhängigen α -Untereinheiten mit jeweils 6 transmembranalen Abschnitten gebildet (Jerng *et al.*, 2004b; Abb. 3). Die Schleifen zwischen dem jeweils fünften und sechsten Transmembranabschnitt kleiden die Pore aus und bilden den Selektivitätsfilter, durch den K^+ die Zellmembran passieren kann (Hille, 2001). Der jeweils vierte Transmembranabschnitt enthält mehrere positiv geladene Aminosäuren und fungiert als Spannungssensor, der bei Depolarisationen des Neurons zu einer

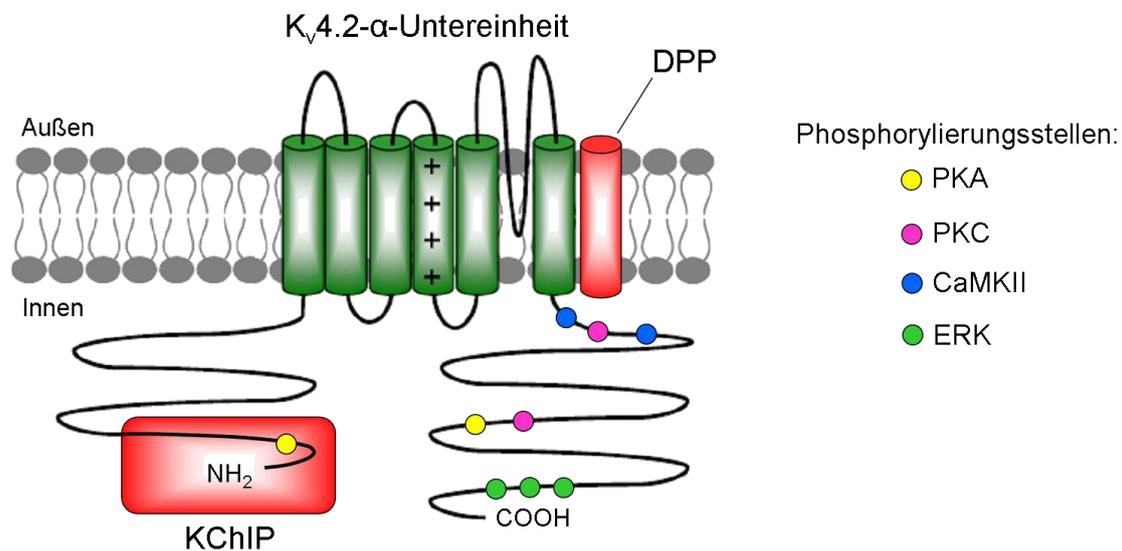


Abbildung 3: Schematische Darstellung des $K_v4.2$ -Kanalproteinkomplexes.

$K_v4.2$ -Kanäle bestehen aus vier einzelnen α -Untereinheiten (grün) mit Spannungssensor (+ Symbole) und einer Porenschleife (zwischen dem 5. und 6. Transmembranabschnitt). Am nativen $K_v4.2$ -Kanalproteinkomplex in CA1-Pyramidenzellen sind die β -Untereinheiten (rot) KChIP (K_v -Kanal-Interagierendes Protein) und DPP (Dipeptidylaminopeptidase-verwandtes Protein) beteiligt (Maffie & Rudy, 2008). $K_v4.2$ -Kanalproteine besitzen mehrere Phosphorylierungsstellen für PKA, PKC, CaMKII und ERK. Abbildung modifiziert nach Vacher *et al.*, 2008; Phosphorylierungsstellen von $K_v4.2$ aus Jerng *et al.*, 2004b.

Konformationsänderung des Kanalproteins und zur Öffnung der Pore führt (Bezanilla, 2000). Die biophysikalischen Eigenschaften der $K_{v4.2}$ - α -Untereinheiten und die Dichte der $K_{v4.2}$ -Kanäle in der Zellmembran können durch akzessorische β -Untereinheiten und durch Phosphorylierung verändert werden (Seikel & Trimmer, 2009; Abb. 3).

Die grundlegenden Eigenschaften des I_{SA} werden durch zwei Klassen akzessorischer β -Untereinheiten mitbestimmt, die in CA1-Pyramidenzellen mit den $K_{v4.2}$ - α -Untereinheiten einen ternären Proteinkomplex bilden (Jerng *et al.*, 2005; Maffie & Rudy, 2008). K_v -Kanal-Interagierende Proteine (KChIPs) und Dipeptidylaminopeptidase-verwandte Proteine (DPPs) fördern zum einen die Oberflächenexpression von K_v4 -Kanälen, indem sie den Transport der Kanäle in das dendritische Kompartiment (*trafficking*) und deren Verweildauer in der dendritischen Membran (*turnover*) positiv beeinflussen (Shibata *et al.*, 2003; Jerng & Pfaffinger, 2008; Kim *et al.*, 2008; Seikel & Trimmer, 2009; Sun *et al.*, 2011). Zum anderen modulieren die β -Untereinheiten die Kinetik der K_v4 -vermittelten Ströme (Jerng *et al.*, 2004b). Vier KChIP- und zwei DPP-Familien existieren in verschiedenen Isoformen und *splice*-Varianten, mit spezifischen Unterschieden in der jeweiligen Wirkung auf K_v4 -vermittelte Ströme (Covarrubias *et al.*, 2008). In CA1-Pyramidenzellen kommen $K_{v4.2}$ -Kanäle hauptsächlich zusammen mit KChIP2, KChIP4 und DPP6 vor (Rhodes *et al.*, 2004; Vacher *et al.*, 2008). Im Allgemeinen verschieben KChIPs die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Inaktivierung von K_v4 -Kanälen in Richtung depolarisierter Potenziale und verlangsamen zudem die Inaktivierungs-Kinetik der K_v4 -vermittelten Ströme (An *et al.*, 2000; Bähring *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den KChIP-Effekten bewirken DPPs bei K_v4 -Kanälen eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und Inaktivierung in Richtung hyperpolarisierter Potenziale und zudem eine massive Beschleunigung der Inaktivierung (Nadal *et al.*, 2003; Jerng *et al.*, 2004a). Die Effekte der KChIPs und DPPs verhalten sich additiv (Barghaan *et al.*, 2008) und führen in CA1-Pyramidenzellen zu einem transienten $K_{v4.2}$ -vermittelten I_{SA} mit einer Aktivierung unterhalb der AP-Schwelle und einer sehr schnellen Inaktivierung (Birnbaum *et al.*, 2004; Jerng *et al.*, 2005; Amarillo *et al.*, 2008).

Eine dynamische Regulation der I_{SA} -Eigenschaften ist durch die Phosphorylierung der ternären $K_{v4.2}$ -Kanalproteinkomplexe möglich (Hoffman & Johnston, 1998; Jerng *et al.*, 2004b; Schrader *et al.*, 2008). In der Aminosäuresequenz von $K_{v4.2}$ finden sich Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinasen A und C (PKA und PKC), die

Ca²⁺/Calmodulin abhängige Kinase II (CaMKII) und die ERK (Isbrandt *et al.*, 2000; Jerng *et al.*, 2004b; Abb. 3). Die Phosphorylierung durch ERK, PKA und PKC führt zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des K_v4.2-Kanals in Richtung depolarisierter Potenziale, die eine effektive Reduktion der I_{SA}-Amplitude zur Folge hat (Jerng *et al.*, 2004b). PKA und PKC liegen in der zellulären Signalkaskade stromaufwärts von der ERK, können diese aktivieren und dadurch einen zusätzlichen indirekten Effekt auf den I_{SA} ausüben (Schrader *et al.*, 2008). Eine Phosphorylierung der K_v4.2-Kanäle durch die CaMKII führt in CA1-Pyramidenzellen zu einer langfristigen Erhöhung der funktionellen I_{SA}-Dichte, jedoch ohne die biophysikalischen Eigenschaften des I_{SA} zu beeinflussen (Varga *et al.*, 2004). Aktuelle *in vitro*-Untersuchungen weisen auf eine rasche Internalisierung von K_v4.2-Kanalproteinkomplexen aus der Membran dendritischer Dornen (*spines*) bei stark erhöhter synaptischer Aktivität hin (Kim *et al.*, 2007; Lei *et al.*, 2008). Diese Prozesse sind vom postsynaptischen Ca²⁺-Einstrom über ionotrope Glutamatrezeptoren der NMDA-Unterfamilie abhängig und werden wahrscheinlich über eine direkte Phosphorylierung von K_v4.2-Kanälen vermittelt (Kim *et al.*, 2007; Hammond *et al.*, 2008; Mulholland & Chandler, 2010).

Im Experiment bietet sich die Möglichkeit einer pharmakologischen Beeinflussung des I_{SA}. K_v4-blockierende Substanzen wie 4-Aminopyridin (4-AP) und Flecainid sind jedoch nicht völlig spezifisch und zeigen auch auf K_v1- bzw. Na_v1-Kanal-vermittelte Ströme eine inhibierende Wirkung (Camerino *et al.*, 2007). Die Substanz NS5806 (N-[3,5-bis (Trifluoromethyl)Phenyl]-N'-[2,4-Dibromo-6-(1H-Tetrazol-5-yl)Phenyl]-Harnstoff) wurde als "K_v4-Aktivator" beschrieben (Callee *et al.*, 2009). Die Wirkung von NS5806 wurde bisher ausschließlich in Herzmuskelzellen und heterologen Expressionssystemen untersucht (Callee *et al.*, 2009, 2010, 2011; Lundby *et al.*, 2010; Szlachta, 2010). Aufgrund der weitgehenden Homologie zwischen kardialen und neuronalen K_v4-Kanalproteinkomplexen (Isbrandt *et al.*, 2000; Birnbaum *et al.*, 2004) wurde in dieser Arbeit ein potenzierender Effekt von NS5806 auf den I_{SA} in CA1-Pyramidenzellen erwartet.

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beschreibung akuter Veränderungen der somatodendritischen Erregbarkeit von CA1-Pyramidenzellen während der initialen Phase der Epileptogenese. Zu diesem Zweck wurde die Entstehung und der Verlauf von somatischen APs sowie die Abschwächung von b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Transienten innerhalb weniger Stunden nach einem KA-induzierten SE untersucht. Besonderes Augenmerk galt solchen Veränderungen, die auf eine veränderte physiologische Funktion des somatodendritischen A-Typ K^+ -Stroms I_{SA} schließen lassen.

Der $\text{K}_{v4.2}$ -vermittelte I_{SA} ist für die Kontrolle der dendritischen Erregbarkeit essentiell (Yuste, 1997; Hoffman *et al.*, 1997; Schrader *et al.*, 2002). Deshalb sollte in dieser Arbeit zusätzlich überprüft werden, ob sich die als "K_{v4}-Aktivator" beschriebene Substanz NS5806 (Calloe *et al.*, 2009) auf die dendritische Erregungsausbreitung auswirkt.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Tiere

Für die Messungen in dieser Arbeit wurden ausschließlich Wildtyp-Mäuse der Linie C57BL/6 verwendet (zu ~ 90 % männlich). Um eine gute Vergleichbarkeit zwischen der Sham-Gruppe (*sham* = "nur zum Schein") und der KA-Gruppe (KA, *kainic acid*) zu gewährleisten, wurden Tiere gleichen Alters und gleichen Gewichts verwendet (Sham: $22,8 \pm 0,7$ Tage, $10,4 \pm 0,5$ g, $n = 10$; KA: $23,3 \pm 0,4$ Tage, $10,8 \pm 0,3$ g, $n = 24$). Für pharmakologische Experimente wurden teilweise Schnitte der gleichen Tiere als Kontrolle und für Messungen nach der Zugabe von Pharmaka (Abschnitt 2.8) genutzt, so dass keine gesonderten Angaben über das Gewicht und Alter dieser Tiere gemacht wurden.

2.2 Injektion von KA und Bewertung des *Status epilepticus*

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden bei der Hamburger Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz (Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen) beantragt und genehmigt (Genehmigungsnummer: G09/085). Der *Status epilepticus* (SE) wurde in den Mäusen durch die Injektion von KA induziert. Dazu wurde eine isotone NaCl-Lösung (0,9 %) mit KA versetzt und mit 1M NaOH bzw. HCl auf einen pH-Wert von ca. 7 eingestellt (Indikatorpapier). Aufgrund der geringen Liefermengen für KA wurde diese Lösung einmal angesetzt, zu je 0,8 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße abgefüllt und bei -20 °C gelagert. Für die Experimente wurde eine Wirkstoffmenge von 30 mg/kg (bzw. 30 μ g/g) Mausgewicht festgelegt. Mögliche Varianzen der KA-Wirkung wurden durch das geringe Gewicht der Mäuse begünstigt (vgl. Abschnitt 2.1). Um die Dosierung zu erleichtern, wurde das Injektionsvolumen mit 0,05 ml pro g Maus vergleichsweise hoch angesetzt und eine sehr präzise Waage verwendet. KA wurde dementsprechend so verdünnt, dass 30 μ g pro 0,05 ml in der NaCl-Lösung enthalten waren. Um die gewünschte Dosis zu erhalten, wurde das Gewicht der Maus (in g) mit 0,05 multipliziert. Der Vorgang des Wiegens war für die Mäuse mit einem gewissen Maß an Stress verbunden. Das Mausgewicht wurde daher 30-45 Minuten vor der Injektion bestimmt,

so dass die Tiere sich vor der Injektion wieder beruhigen konnten. Für die Injektion der KA-Lösung wurden 1 ml Einwegspritzen mit einer möglichst dünnen Kanüle (0,4 mm x 20 mm = 27 G) verwendet. Die Sham-Gruppe erhielt eine äquivalente Menge NaCl-Lösung (0,9 %) ohne KA. Das Ergebnis der Dosisberechnung wurde entsprechend der Genauigkeit der Eichstriche des Spritzenzylinders auf eine Nachkommastelle gerundet. Da die KA-Lösung bei -20 °C bzw. die NaCl-Lösung bei 4 °C aufbewahrt wurden, mussten sie vor der Injektion aufgewärmt werden. Dazu wurde die aufgezugene Spritze kurz vor der Injektion für 1-2 Minuten zwischen eine Styroporunterlage und ein Wärmekissen (37 °C) gelegt. Das Tier wurde mit der linken Hand am Nacken gepackt und das Fell soweit gerafft, dass die Maus weitgehend bewegungsunfähig war. Die Maus wurde leicht kopfüber gehalten, die Injektion erfolgte rechtwinklig ca. 0,5 cm tief in den Bauchraum (intraperitoneal).

Tabelle 1: Bewertungskriterien des initialen SE.

Stufe	Verhalten (modifiziert nach Morrison <i>et al.</i> , 1996)
0	normales Verhalten: Laufen, Erkunden, Schnüffeln, Putzen, Schlafen usw.
1	Unbeweglichkeit, Erstarren, kauernde Haltung, Zuckungen, Ohren anlegen, leichte Gleichgewichtsstörungen
2	Vorderläufe und / oder Schwanz ausstrecken, starre Körperhaltung bzw. gestrecktes Liegen auf dem Bauch
3	Automatismen: Kopfwackeln, einzelne Kloni, wiederholtes Kratzen, im Kreis laufen bzw. um eigene Achse drehen
4	unterbrochene Vorderbein-Kloni, Aufrichten (Kloni am Hinterbein können zu rückwärtigem Gang führen)
5	Anhaltende Vorderbein-Kloni, Aufrichten und Umfallen
6	schwerste Anfälle mit tonischem Klonus, motorische Anfälle am ganzen Körper (teilweise plötzlich auftretende Sprünge)
7	Tod

Die Wirkung von KA wurde mit einer Videokamera dokumentiert und die auftretenden Verhaltensmuster später anhand einer Skala in 8 Stufen eingeteilt (Morrison *et al.*, 1996). Die ursprüngliche Einteilung aus der Literatur wurde basierend auf eigenen Beobachtungen erweitert (Tab. 1). Die Zeitpunkte der Verhaltensänderungen wurden notiert, gegen die Zeit aufgetragen und so ein SE-Profil erstellt. Tiere, die für die KA-Studie verwendet wurden, mussten innerhalb von 2 Stunden nach der Injektion mindestens die Stufe 5 (Aufrichten und Umfallen) erreichen. Der Zeitraum zwischen dem ersten und dem letzten Auftreten eines Verhaltens der Stufe 5 oder 6 wurde als SE mit generalisierten Anfällen definiert. Des Weiteren wurde die Dauer der progressiven Phase (Zeit bis zum Erreichen der ersten Stufe 5) und die Gesamtzahl der Anfallsspitzen (\geq Stufe 5) aufgelistet. Die allgemeine Schwere des KA-induzierten SE wurde durch das Integral des SE-Profiles quantifiziert, wobei dem Zeitpunkt der Präparation willkürlich ein Verhalten der Stufe 0 zugeordnet wurde.

2.3 Präparation hippocampaler Schnitte

Die Versuchstiere wurden in einem geschlossenen Becherglas mit Isofluran betäubt und mit einer mittelgroßen Schere dekapitiert. Das Kopffell wurde längs mit einem Skalpell aufgetrennt und der Schädelknochen mit einer speziellen, seitlich abgewinkelten Schere (Fine Science Tools Nr. 14082-09) sagittal aufgeschnitten. Mit einer abgerundeten, relativ breiten Pinzette mit gezackten Flächen (FST Nr. 11006-12) wurden von der Schnittkante aus die Schädelplatten lateral weggeklappt. Gegebenenfalls wurde mit einer feineren Pinzette (Dumont Nr.2) Hirnhaut, spitze Knochenfragmente an den Bruchkanten bzw. Knochensplitter entfernt. Das Gehirn wurde dann mit einem kleinen, abgerundeten Spatel von der rostralen Seite vorsichtig herausgehoben und in eiskalte CS (*cutting solution*, Tab. 2) überführt. Das Gehirn wurde weniger als 1 Minute in der Lösung belassen und auf ein CS-getränktes Filterpapier ($d = 90$ mm) in einer eisgekühlten Glaspetrischale überführt. Mit einer Rasierklingenhälfte wurde das Kleinhirn und Reste des Hirnstamms entfernt und die Hemisphären separiert. Um eine Orientierung der Dendritischen Ausläufer in paralleler Ausrichtung zur Schnittoberfläche zu erreichen wurde ein weiterer Schnitt an der dorsalen Seite der Hemisphäre, in einem geschätzten Winkel von $10-15^\circ$ lateral zur Mittellinie, gemacht. Durch diesen „magischen Schnitt“ (Bischofberger *et al.*, 2006; Abb. 4) entstanden die Auflageflächen, um die Hemisphären auf den Probenhalter des Vibratoms (VT1000,

Leica) mit Sekundenkleber (Cyanacrylat) zu befestigen. Dabei wurde das Gewebe so aufgeklebt, dass die Klinge des Vibratoms auf den ursprünglich lateralen Hirnseiten schräg auftraf (Abb. 4A). Der Probenteller wurde zügig in die mit eiskalter und begaster CS gefüllte Pufferwanne des Vibratoms eingetaucht. Dem Schliff einer längsseits halbierten Rasierklinge (Wilkinson Classic) entsprechend, wurde die Klinge in einem fest eingestellten Winkel von ca. 17° in die Halterung des Vibratoms eingespannt. Um die Präparationszeit nicht unnötig zu verlängern, wurde der Schnittbereich des Vibratoms möglichst schmal definiert und der Probenteller bis knapp unter die Kante der Klinge angehoben. Die Klinge bewegte sich bei 85 Hz in einer fest eingestellten Amplitude von einem Millimeter. Der Vortrieb während des Schneidens wurde auf Stufe 0.5 eingestellt (0.05 mm/s), um nicht zu stark gegen das Gewebe zu drücken (Geiger *et al.*, 2002).

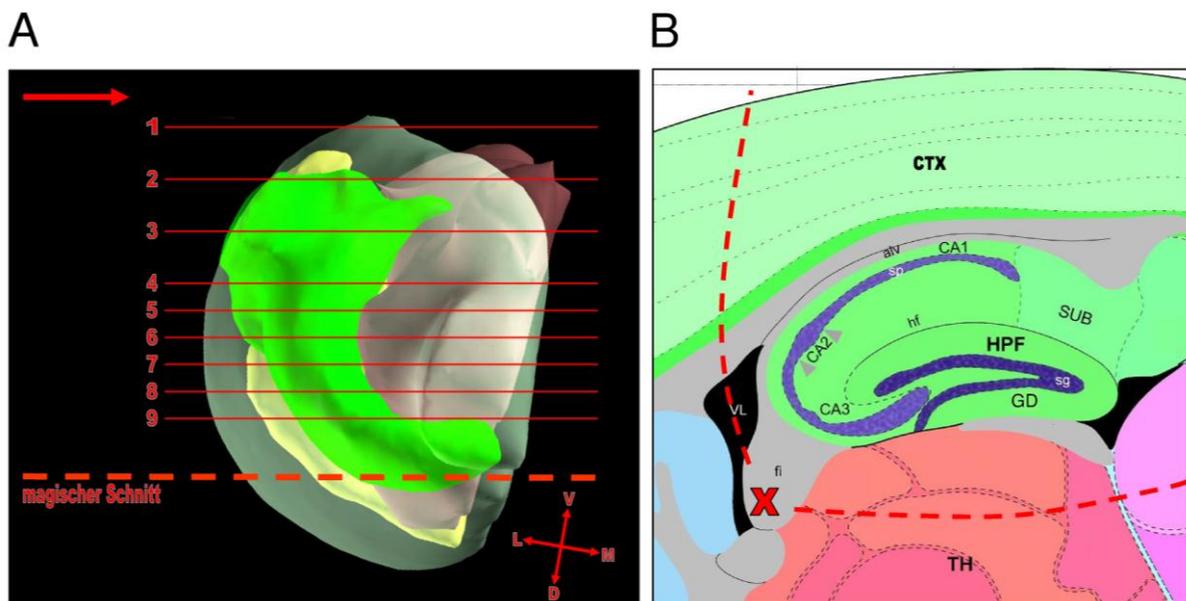


Abbildung 4: Schema der Präparationsschritte im Vibratom.

A und B: modifizierte Darstellungen aus dem Allen Brain Explorer (Version 1.3) Seattle (WA): Allen Institute for Brain Science, <http://mouse.brain-map.org/brainExplorer/index>. **A:** Schnittfolge bei der Präparation, frontaler Blick auf eine Hemisphäre. Der „magische Schnitt“ wurde in einem Winkel von $10-15^\circ$ durch den dorsalen Cerebralkortex (blau-grün) geführt (rot gestrichelte Linie). Im Vibratom lagen die Hemisphären mit der ventralen Seite nach oben. Die Klinge traf von der ursprünglich lateralen Seite her schräg auf die Hemisphäre (roter Pfeil). Der Hippocampus (grell-grün) beschreibt eine Bogenform und wurde, je nach genauem Winkel des „magischen Schnitts“, während der Schnitte 4-9 rechtwinklig getroffen. Koordinatenkreuz: ventral (V), dorsal (D), medial (M), lateral (L) Hirnstamm (aubergine), Cerebellum (gelb). **B:** Schnitt einer Hemisphäre; der Hippocampusschnitt wurde entlang der gestrichelten Linie vom umgebenden Gewebe getrennt. CTX: Cerebralkortex; TH: Thalamus; HPF: Hippocampusformation; GD: *Gyrus dentatus*; sg: *Stratum granulosum*; sp: *Stratum pyramidale*; CA1, CA2 und CA3: Regionen 1,2 und 3 des Hippocampus *Cornu ammonis*; SUB: *Subiculum*; hf: Hippocampusfissur; alv: Alveus; VL: lateraler Ventrikel; fi: Fimbria.

Tabelle 2: Gegenüberstellung von ACSF und CS.

	Molekulargewicht (g/mol)	ACSF (mM)	CS (mM)
NaCl	58,44	125,0	87,0
NaHCO ₃	84,01	26,0	25,0
NaH ₂ PO ₄	156,01	1,25	1,25
KCl	74,55	2,5	2,5
CaCl ₂	147,02	2,5	0,5
MgCl ₂	120,40	1,5	4,0
Glucose	180,16	25,0	25,0
Saccharose	342,30	-	75,0
Osmolarität (mosmol/l)		346,5	345,0

Sobald die Klinge beim Überqueren der Hemisphären das erste Gewebe abgetrennt hatte (Abb. 4A, Schnitt Nr.1), wurde das Zählwerk des Vibratoms auf Null zurückgestellt. Von diesem Punkt aus konnten Schnitte reproduzierbarer Dicke erstellt werden. Zunächst wurden die für die Experimente irrelevanten Bereiche in 600 µm Abständen entfernt (Abb. 4A, Schnitt Nr. 2, 3 u. 4) und danach auf 300 µm Schnittdicke umgestellt. Die folgenden Schnitte (Schnitt Nr. 5-9) wurden für die weiteren Experimente aufbewahrt. Um die Hippocampus-umgebenden Hirnareale zu entfernen, wurde die Klinge des Vibratoms kurz bevor der Schnitt vom restlichen Gewebe getrennt wurde, angehalten. Mit dem Schliff einer dünnen Injektionskanüle wurde die Hippocampusformation vorsichtig aus dem restlichen Gewebe ausgeschnitten, während der Schnitt noch auf der Rasierklingenfläche lag. (Abb. 4B, gestrichelte Linie). Um möglichst wenig mechanische Kräfte auf den dünnen Schnitt auszuüben, wurde der Schnitt dabei mit einer feinen Pinzette im Bereich der *Fimbria* festgehalten (Abb. 4B, rote Markierung). Die Schnitte wurden dann mit einer großlumigen Glaspipette (umgedrehte Pasteurpipette) in begaste CS transferiert, die in einem Wasserbad bei 34 °C warm gehalten wurde. Die Schnitte verblieben dort für 30 Minuten und wurden dann in ein weiteres Glasgefäß mit begaster CS unmittelbar neben dem Messstand überführt. Dort wurden die Schnitte bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis sie für das Experiment in die Messkammer mit einem kontinuierlichen Fluss (ca. 1 ml / min) ACSF (artifizielle

cerebrospinale Flüssigkeit, Tab. 2) überführt wurden. ACSF und CS enthielten Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) und erreichten den gewünschten pH Wert von 7,2 - 7,3 erst nach ausreichender Begasung mit Carbogen (95 % O_2 / 5 % CO_2). Es sollte verhindert werden, dass Ca^{2+} und Mg^{2+} als Carbonate ausfallen. Dazu wurden ACSF und CS vor den Versuchen zunächst aus fünffach konzentrierten Vorratslösungen ohne CaCl_2 und MgCl_2 hergestellt. Diese Lösungen wurden ca. 45 Minuten mit Carbogen begast und erst dann aus separaten 1 M Vorratslösungen mit CaCl_2 und MgCl_2 versetzt. Der hohe O_2 -Anteil im Gas war nötig, um die Zellen im inneren des Hippocampuschnitts über Diffusion mit O_2 zu versorgen. So konnte ein Überleben der Neurone über mehr als 6 Stunden gewährleistet werden. Die Begasung wurde daher während aller Präparationsschritte und während der Versuche ständig aufrechterhalten. Um die synaptische Aktivität der Neurone während des Schneidens und Aufbewahrens in der CS möglichst gering zu halten, war in der CS der Ca^{2+} -Anteil deutlich geringer, der Mg^{2+} -Anteil dagegen deutlich höher als in der ACSF (Tab. 2). Die erhöhte Mg^{2+} -Konzentration führte zu einer Blockade von NMDA-Glutamatrezeptoren. Eine niedrige extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration verringerte den Konzentrationsgradienten und damit die treibende Kraft für einen Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran. Saccharose wurde in der CS als Osmotikum verwendet, um die gegenüber ACSF geringere NaCl -Konzentration auszugleichen.

2.4 Die *Patch-Clamp*-Technik

Elektrophysiologische Ableitungen wurden in dieser Arbeit mit der *Patch-Clamp*-Technik durchgeführt (Neher & Sakmann, 1976). Dazu wurden elektrolytgefüllte Pipetten aus fein ausgezogenen Glaskapillaren auf die somatische Zellmembran der CA1-Pyramidenzellen aufgesetzt (Abb.5; vgl. Abschnitt 2.7.2 u. 2.4). Zwischen Zellmembran und dem Rand der Pipettenöffnung bildete sich daraufhin eine sehr dichte Verbindung (*seal*), so dass der elektrische Widerstand (R_g) auf mehr als 1000 M Ω anstieg (*giga-seal*). Nach Herstellung des *giga-seals* musste ein kapazitives Artefakt, das durch die Kondensatoreigenschaften der Pipettenwandung hervorgerufen wurde (C_p ; Abb. 5), kompensiert werden. Zwischen dem Zytosol der Zelle und der Lösung in der Pipette (intrazelluläre Lösung = IC, 2.4, Tab. 4) lag nun die Zellmembran als einzige Barriere. Durch Unterdruck im Pipetteninneren wurde die

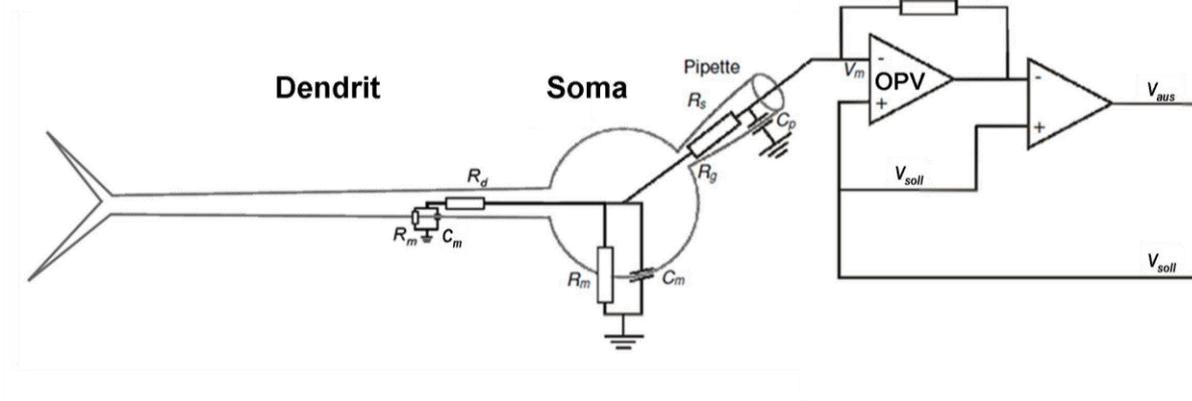


Abbildung 5: Grundlagen der Patch-Clamp-Technik.

Vereinfachtes Schema einer *Whole-Cell-Patch-Clamp* Versuchsanordnung (modifiziert nach Numberger & Draguhn, 1996). Im *Voltage-Clamp*-Modus wird die Zelle durch Ausgleichsströme auf das Kommandopotenzial geklemmt. Im *Current-Clamp*-Modus führen Strominjektionen über die Pipette zur Änderungen im Membranpotenzial der Zelle. V_m : Membranpotenzial, V_{soll} : Kommandospannung, V_{aus} : Ausgangsspannung, OPV: Operationsverstärker, R_s : Serienwiderstand der Ableitung, R_g : Sealwiderstand C_m : Membrankapazität, R_m Membranwiderstand, R_d : dendritischer Längswiderstand, C_p : Kapazität an der Pipettenwandung

Membran unter der Pipettenöffnung aufgebrochen, so dass ein elektrischer Zugang zur gesamten Zelle hergestellt wurde (*Whole-Cell-Konfiguration*, Abb. 5). Nach dem Durchbruch der Zellmembran entstand durch die Ganzzellkapazität (C_m) ein weiteres kapazitives Artefakt, das ebenfalls kompensiert werden musste. Am engen Übergang zwischen dem Lumen der *Patch*-Pipette und der Zelle trat ein elektrischer Widerstand auf, der mit dem Widerstand der Zellmembran in Serie geschaltet war (Serienwiderstand R_s , Abb. 5). Wenn Membranfragmente oder Zellorganellen die Öffnung der Pipette teilweise versperren, stieg R_s an (*resealing*). Große Serienwiderstände konnten zu Artefakten führen (Abschnitt 2.9.1, Abb. 12). Durch das gegenüber dem Zellinneren vielfach größere Volumen innerhalb der *Patch*-Pipette wurde das Zytosol der Zelle in wenigen Minuten nahezu komplett durch IC ersetzt. Innerhalb von 15-20 Minuten diffundierte die IC bis in distal gelegene Dendriten-Abschnitte (Pusch & Neher, 1988). Auf diese Weise wurden in dieser Arbeit einzelne CA1-Pyramidenzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff bis-Fura 2 beladen (vgl. Abschnitt 2.7.2). Über die meiste Zeit wurde der Zelle dabei ein Haltepotenzial unterhalb von -70 mV aufgezwungen (Spannungsklemme, *Voltage-Clamp*, VC). Differenzen zwischen der aktuell anliegenden Spannung (V_m) und der vorgegebenen Kommandospannung (V_{soll}) wurden vom Operationsverstärker (OPV) gemessen und durch einen ausgleichenden Strom kompensiert (Numberger & Draguhn, 1996; Abb. 5). Allgemein dient bei Messungen im VC-Modus der Ausgleichsstrom, der benötigt wird um das V_m der Zelle konstant

aufrechtzuerhalten (zu klemmen), als das eigentliche Messsignal (V_{aus} ; Abb. 5). Die feinen Ausläufer der Neurone (z.B. Dendriten oder Axone) führen jedoch zu Längswiderständen innerhalb der Zelle (R_d ; Abb. 5), bewirken eine unvollkommene Spannungsklemme und können VC-Ableitungen dadurch stark verfälschen (Numberger & Draguhn, 1996). Für die Messungen in dieser Arbeit wurde der *Patch-Clamp*-Verstärker ausschließlich in der Stromklemmanordnung (*Current-Clamp*, CC) verwendet. Dabei wurden CA1-Pyramidenzellen in der *Whole-Cell*-Konfiguration fest eingestellte Strominjektionen appliziert (Abschnitt 2.7.3). Diese Strominjektionen führten einerseits zur passiven elektrotonischen Umladung der Zellmembran, deren Zeitkonstante τ von den Kondensator-Eigenschaften der Membran (C_m) und deren Leitfähigkeit (Kehrwert von R_m) abhängig war ($\tau = R_m \times C_m$; Hille, 2001). Die Änderungen des Membranpotenzials konnten andererseits dazu führen, dass spannungsabhängige Ionenkanäle aktivierten und sich die Leitfähigkeit der Membran aktiv änderte. So war es im CC-Modus beispielsweise möglich, durch positive Strominjektionen die Zellen bis über die Aktionspotenzial-Schwelle zu depolarisieren, ein Aktionspotenzial (AP) zu induzieren und gleichzeitig die Änderungen des Membranpotenzials während dieses APs aufzuzeichnen.

Die verwendeten *Patch*-Pipetten waren optimiert, um eine rasche Diffusion des Fluoreszenzfarbstoffs in die Zelle zu gewährleisten (siehe Abschnitt 2.7.2). Sie hatten daher steile Flanken, an der Spitze einen ungefähren Öffnungsdurchmesser von 1,3-2,0 μm und Pipettenwiderstände von 4-6 $\text{M}\Omega$.

Tabelle 3: Sechs Zug-Stufen lieferten *Patch*-Pipetten mit kurzen aber steilen Flanken.

Stufe	Hitze *	Zugkraft	Geschwindigkeit	Zeit
1	607	-	25	200
2	607	-	25	200
3	607	-	25	200
4	608	-	25	200
5	612	-	25	200
6	625	-	25	200
Polieren	530	-	-	200

* = die nötige Hitze ist bei jedem Filament verschieden und kann mit der zunehmender Abnutzung variieren.

Die Pipetten wurden in einem programmierbaren Pipettenziehgerät mit Box-Filament (P-97, Sutter Instruments; Tab. 3) aus dickwandigen Borosilikat Glaskapillaren (ID: 0.86 mm /OD: 1,5 mm, GB150-8P, Science Products) gezogen. Für feine Korrekturen war meistens eine Hitze-Anpassung der 6. Zug-Stufe ausreichend. Die ausgezogenen *Patch*-Pipetten wurden manuell in das Filament des Geräts eingeschoben und durch kurzes Aufheizen poliert (Tab. 3).

Durch das Kaliummethylsulfonat (K-MeSO₄) in der IC (Tab. 4) entstand ein *liquid junction* Potenzial von -8 mV, das in der Steuerungs-Software des *Patch-Clamp*-Verstärkers fest eingestellt und so kompensiert wurde.

Zum Befüllen der *Patch*-Pipetten mit IC wurde das stumpfe, hintere Ende mit einem Gummischlauch an eine 10 ml Spritze angeschlossen. Um die äußerste Spitze der Pipette luftblasenfrei zu füllen, wurde sie in normale IC getaucht und mit der Spritze ein Unterdruck erzeugt. Nach dem Entfernen der Spritze wurde mit einer Pipettierhilfe (0,5-10 µl; mit Microfill-Aufsätzen, Eppendorf) etwa 6 µl IC-Lösung (bis-Fura 2 Konzentration: 100 µM; siehe Abschnitt 2.5) von hinten in die Pipette gefüllt. Eventuell entstandene Luftblasen wurden durch seitliches Klopfen entfernt und die befüllte Pipette in die Halterung des Mikromanipulators eingespannt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der intrazellulären Lösung (IC).

	Molekulargewicht (g/mol)	Intrazelluläre Lösung (mM)
K-MeSO ₄	134,2	120,0
KCl	74,5	20,0
MgCl ₂	120,4	2,0
HEPES	238,3	10,0
Na ₂ -ATP	551,1	4,0
Na-GTP	523,2	0,3
Na ₂ -Phosphokreatin x H ₂ O	255,08	10,0
Na-L-Ascorbat	198,11	3,0
Osmolarität (mosmol/l)		344,6

2.5 Die Ca^{2+} -Imaging-Methode

In dieser Arbeit wurde bis-Fura 2-basiertes Ca^{2+} -Imaging als Methode verwendet, um die Abschwächung eines b-APs (*backpropagating action potential*) im Apikaldendriten von CA1-Pyramidenzellen zu verfolgen. Der Ca^{2+} -sensitive Farbstoff bis-Fura 2 besteht aus einer Komponente mit vier Carboxylgruppen, die Ca^{2+} kurzzeitig binden können. Für die fluoreszierenden Eigenschaften des Moleküls sind zwei fluorophore aromatische Gruppen (Stilbene) verantwortlich (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Ein b-AP führte durch die Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (Ca_v) zu einem starken dendritischen Ca^{2+} -Einstrom (Spruston *et al.*, 1995). Dadurch stieg die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von einem geringen Ruhewert (ca. 50-100 nM) bis in den mikromolaren Bereich an (Helmchen *et al.*, 1996; Waters *et al.*, 2005) und bis-Fura 2 veränderte sein Anregungsmaximum von ca. 365 auf ca. 340 nm (Abb. 6). Die Lichtemission von bis-Fura 2 lag dagegen konstant bei ca. 510 nm.

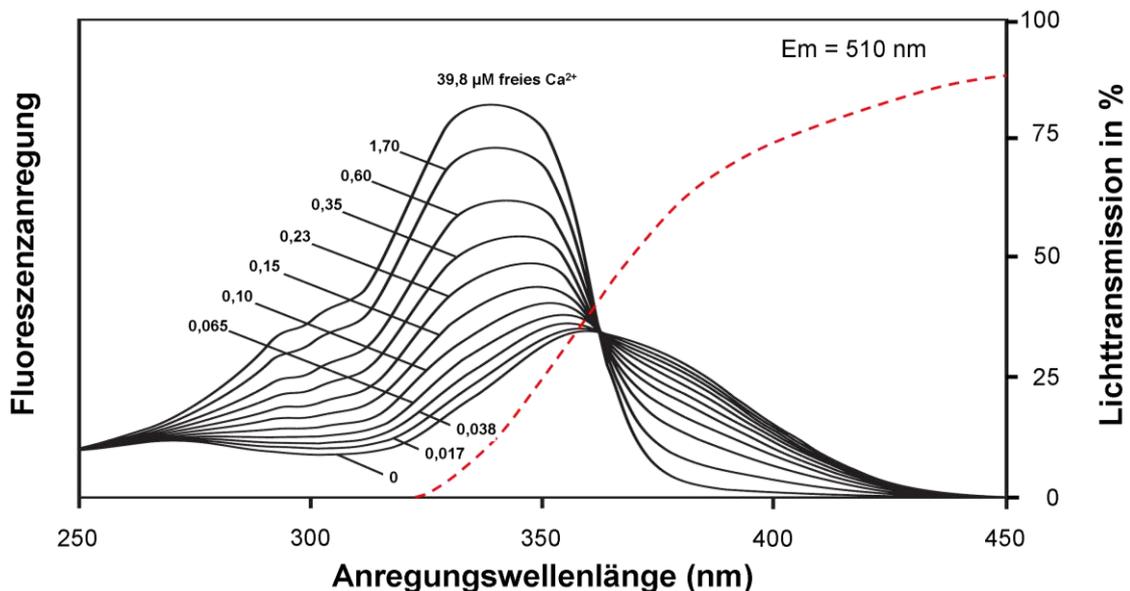


Abbildung 6: Anregungsspektrum von bis-Fura 2.

Ansteigende Ca^{2+} -Konzentrationen führen zu einer Verschiebung des bis-Fura 2 Anregungsmaximums von 365 nm hin zu 340 nm. Das verwendete Wasserimmersionsobjektiv (63x) zeigt einen starken Abfall in der Lichttransmission unterhalb von 400 nm Wellenlänge (rot-gestrichelte Kurve). Zur Messung von Ca^{2+} -Einstromen in CA1-Pyramidenzellen wurde daher Anregungslicht mit 395 nm Wellenlänge verwendet. Quellen: bis-Fura 2 Spektrum: Invitrogen, 2011; Objektiv Transmissionsrate: Zeiss (www.zeiss.de/objektive)

Zur Quantifizierung eines Ca^{2+} -Einstroms können grundsätzlich Anregungswellenlängen um 340 nm und/oder 380 nm verwendet werden. Eine Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration würde dabei als eine Zunahme der bis-Fura 2 Fluoreszenz bei 340 nm bzw. als Abnahme der Fluoreszenz bei 380 nm Anregungswellenlängen gemessen werden. In dieser Arbeit führte ein b-AP zu schnellen Ca^{2+} -Transienten (Abschnitt 2.7.4 u. 2.9.2). Um beim dendritischen Ca^{2+} -*Imaging* eine möglichst schnelle Aufnahme Frequenz zu gewährleisten wurde daher nur eine Anregungswellenlänge verwendet (395 nm, vgl. Abschnitt 2.7.4).

Das im Messstand verbaute Wasserimmersionsobjektiv (W Plan-Apochromat 63x/1,0, Zeiss; vgl. Abschnitt 2.6) zeigt im ultravioletten Bereich eine stark abfallende Lichttransmissionsrate (Abb. 6, rote Line). Aufgrund dieser Rahmenbedingungen wurde zur Quantifizierung des dendritischen Ca^{2+} -Einstroms in dieser Arbeit der langwellige Bereich des Absorptionsspektrums von bis-Fura 2 (um 380 nm) verwendet. Unter den praktischen Bedingungen am Messstand zeigte bis-Fura 2 bei einer Anregungswellenlänge von 395 nm die stärkste Lichtemission. Durch die geringe basale Ca^{2+} -Konzentration von Neuronen (50-100 nM; Helmchen *et al.*, 1996; Waters *et al.*, 2005) ergab sich mit 395 nm Anregungswellenlänge eine hohe Ruhe-Fluoreszenz von bis-Fura 2 (siehe Abb. 6), so dass die Morphologie der untersuchten Zelle gut zu erkennen war. Die Dissoziationskonstante von bis-Fura 2 für Ca^{2+} liegt bei 370 nM (Produktinformation MP01200; Invitrogen, 2011). Um eine übermäßige Pufferung des transienten Ca^{2+} -Einstroms durch den Farbstoff zu verhindern und gleichzeitig eine optimale Signalstärke zu erreichen, wurden 100 μM bis-Fura 2 in der IC verwendet (Helmchen *et al.*, 1996).

Die CCD-Kamera (iXon 885, Andor) verfügte über einen Aufnahmechip mit 1004 x 1002 Pixeln. Die Visualisierung der Zellen im Gewebe wurde bei voller Auflösung durch Infrarotlicht in Kombination mit einem differentiellen Interphasenkontrast-Filtersatz erreicht (IR-DIC, Zeiss; Stuart *et al.*, 1993). Auf diese Weise konnte der Kontrast bis ca. 50 μm Tiefe im Schnitt so stark verbessert werden, dass die Somata der CA1-Pyramidenzellen und der Verlauf der Apikaldendriten gut im Bild zu sehen waren (Abb. 7C). Die Pixel des CCD-Chips haben eine große Oberfläche und sind sehr lichtempfindlich. Für das Ca^{2+} -*Imaging* ließen sich zudem mehrere Pixel zusammenfassen (*binning*), so dass die Empfindlichkeit der Kamera um ein vielfaches gesteigert werden konnte (vgl. Abschnitt 2.9.2.1, Tab. 6). Für das Ca^{2+} -*Imaging* in dieser Arbeit wurden jeweils 8x8 Pixel zu einem Messpunkt vereinigt

(*binning*-Faktor 8, Gesamtauflösung 125x125 Pixel; vgl. 2.9.2.1, Tab. 6). Dies führte zu einer achtfachen Reduktion der Auflösung, erhöhte die Empfindlichkeit der Kamera aber um das 64-fache.

2.6 Aufbau des Messstandes

Die Verbindung zwischen *Patch*-Pipette und Zelle, der *giga-seal*, ist sehr anfällig gegenüber Erschütterungen. Daher war der Messplatz auf einem schwingungsgedämpften Tisch eingerichtet. Dieser Tisch war umgeben von einem Faraday'schen Käfig, um die *Patch-Clamp*-Messungen von elektromagnetischen Feldern (z.B. durch Netzstrom) abzuschirmen. Der Käfig hatte keine mechanische Verbindung zum restlichen Messplatz und auch die Kabel und Schläuche, die von außerhalb des Käfigs auf den Tisch verlegt wurden, waren gegen mögliche mechanische Schwingungen vom Tisch entkoppelt. Um störende Signale zu vermeiden, waren alle elektrischen Geräte innerhalb des Käfigs durch ein Kabel mit dem Erdungs-Anschluss des *Patch-Clamp*-Verstärkers (EPC10, HEKA) verbunden. Neben diesen generellen Merkmalen, die jeder *Patch-Clamp*-Arbeitsplatz besitzt, waren die weiteren Eigenschaften speziell darauf ausgerichtet, *Patch-Clamp*-Ableitungen in Gewebeschnitten zu ermöglichen und gleichzeitig Ca^{2+} -*Imaging*-Experimente durchzuführen.

Es wurde ein aufrechtes Fluoreszenzmikroskop (Zeiss 2FS) verwendet, das mit zwei Wasserimmersionsobjektiven (10- und 63-fache Vergrößerung, Zeiss) ausgestattet war, die von oben in die ACSF der Messkammer herabgelassen wurden (Abb. 7B). Die CCD-Kamera war auf einem Tubus an der Oberseite des Mikroskops angebracht und wurde sowohl für das Ca^{2+} -*Imaging*-Experiment als auch zur visuellen Kontrolle während der Bildung des *giga-seals* verwendet (vgl. Abschnitt 2.5 u. 2.7.1, 2.7.2). Da die Befestigung der schweren Kamera auf dem relativ dünnen Tubus zu einem ungünstigen Schwerpunkt führte, wurde eine unterstützende Konstruktion aus zwei X-Profilstützen und einer massiven Aluminiumquerstrebe verwendet (Abb. 7A). Der Lüfter im Gehäuse der Kamera erzeugte Vibrationen, so dass die Kühlung des CCD-Chips stattdessen durch einen Kreislauf aus destilliertem Wasser sichergestellt wurde. Dieser Wasserkreislauf bestand aus einem Kanister oberhalb des Messplatzes, von dem aus das Wasser zur Kamera geführt wurde und einem Kanister unterhalb des Messplatzes, in den das Wasser von der Kamera aus hineinlief. Eine Aquariumpumpe beförderte das Wasser vom tieferen zurück in den höheren Kanister.

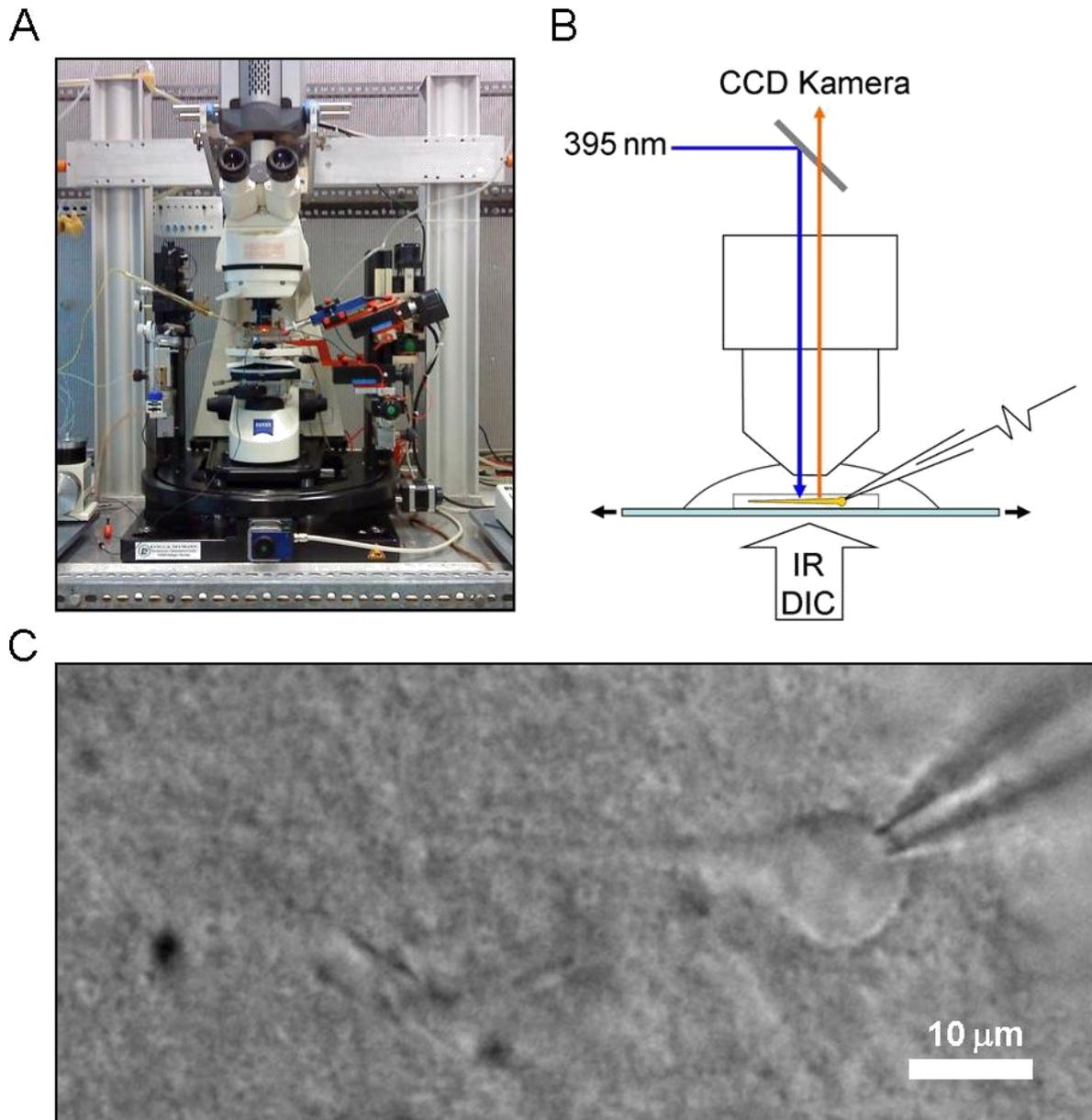


Abbildung 7: Kombinierte Patch-Clamp-Ableitung und Ca^{2+} -Imaging.

A: Foto des Mikroskops im Messstand; die Mikromanipulatoren und der Objektisch waren beweglich, die CCD-Kamera saß oben auf und wurde über eine Aluminiumbrücke gestützt. **B:** Schema der optischen Ausstattung des Fluoreszenzmikroskops; die Zelle im Schnitt konnte im Durchlicht (IR-DIC) betrachtet werden oder das Anregungslicht (395 nm) führte zu einer Fluoreszenz des Farbstoffes bis-Fura 2, die mit der CCD-Kamera detektiert werden konnte. Die Patch-Pipette lag von rechts an der Zelle an. **C:** IR-DIC Bild einer vitalen CA1-Pyramidenzelle in der *Whole-Cell-Patch-Clamp*-Konfiguration.

Das nötige Infrarotlicht für das IR-DIC Verfahren wurde von der Durchlichtlampe des Mikroskops mit einem entsprechenden Filter erzeugt und von unten durch den Schnitt gelenkt (Abb. 7B). Für das Ca^{2+} -Imaging war am Fluoreszenzstrahlengang des Mikroskops über einen Glasfaser-Lichtleiter ein Monochromator (Polychrome V, Till Photonics)

angeschlossen. Dieses Gerät kann das Licht einer 150 W Xenon Lampe computergesteuert auf eine bestimmte Wellenlänge reduzieren und für einen definierten Zeitraum abgeben. Im Mikroskop wurde das Anregungslicht (395 nm) an einem so genannten Farbteiler des Fura 2 Filtersatzes (Nr. 02, Zeiss) reflektiert und durch das Objektiv auf die mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff bis-Fura 2 gefüllte Zelle gelenkt. Der angeregte Farbstoff emittierte längerwelliges Fluoreszenzlicht (510 nm), das durch das Objektiv zurück auf den Farbteiler geworfen wurde. Da die Wellenlänge des Fluoreszenzlichts über 420 nm lag, konnte es den Farbteiler passieren und von der CCD-Kamera gemessen werden. Die Messwerte der Kamera wurden über eine Schnittstelle in einen Computer übertragen und zu einer Sequenz verrechnet. In der *Imaging*-Software (TILLvisION 4.5.50, Till Photonics) waren alle relevanten Steuerungsfunktionen integriert. Die Befehle der Software an den Monochromator und die CCD-Kamera mussten jedoch in einer zwischengeschalteten ICU (*imaging control unit*) synchronisiert werden. Von der ICU aus wurde vor einer Messung auch ein Signal (*trigger*) an den EPC10 gesendet, woraufhin die elektrophysiologische Messung zeitgleich gestartet wurde. Der EPC10 war über einen analog-digital Wandler mit einem PC verbunden. Die *Patch-Clamp*-Software (Pulse 8.8, HEKA) beinhaltete alle Steuerungs-Funktionen für den EPC10, die Aufnahmefunktionen und die einprogrammierten Protokolle für die Strominjektionen (siehe Abschnitt 2.7.3). Das eingehende elektrische Signal erhielt das System von einem Vorverstärker, der so genannten *headstage*. Sie war auf einem motorbetriebenen Mikromanipulator (Unit Mini 3 / SM-1, Luigs & Neumann) angebracht und beinhaltete je einen Anschluss für die *Patch-Clamp*- und die Referenzelektrode. Die *Patch*-Pipetten waren in einem luftdichten Pipettenhalter an der *headstage* eingespannt und mit einem Überdruck-System verbunden. Über einen Schlauch mit Mundstück konnten zwei unterschiedliche Drücke auf zwei separate Wassersäulen gegeben und gehalten werden. Mit Hilfe eines Dreiwegehahns konnten nun je nach Bedarf hohe oder niedrige Überdrücke auf das innere der *Patch*-Pipette im Pipettenhalter übertragen werden (vgl. Abschnitt 2.7.2).

Um den Schnitt in der Messkammer mit einem möglichst kontinuierlichen Fluss aus carbogenbegaster ACSF zu umspülen, wurde dieselbe peristaltische Pumpe (Minipuls 3, Gilson) zum Einleiten und Absaugen der ACSF verwendet. Über ein steuerbares Ventilsystem (Valvebank 8 II, AutoMate Scientific) konnte der Zulauf zur Kammer auf andere Kanäle umgeschaltet werden, die ACSF mit pharmakologischen Zusätzen enthielten (Abschnitt 2.8). Der Hirnschnitt wurde in der Kammer mit Hilfe eines Nylonnetzes

beschwert und in Position gehalten (Konnerth *et al.*, 1987). Der Arbeitsabstand des Objektivs war ausreichend, um die Zellen im Schnitt mit einer *Patch*-Pipette zu erreichen, jedoch musste der Mikromanipulator dazu in einem relativ flachen Winkel angebracht werden (Abb. 7B).

Der von der Kamera erfasste Bildausschnitt konnte verschoben werden, indem die Messkammer mit dem Schnitt unter dem fest angebrachten Mikroskop bewegt wurde. Die Halterung der Messkammer, der Zu- und Ablauf der ACSF sowie der Mikromanipulator mit der *Patch-Clamp*-Elektrode waren dabei als eine bewegliche Einheit auf einem motorgesteuert verschiebbaren Ring um das Mikroskop gelagert (380FM, Luigs & Neumann). Die Steuerung dieser speziellen Mikroskop-Grundplatte wurden über eine separate Steuerungseinheit gewährleistet (SM-6 / SM-5, Luigs & Neumann). Die Bewegungen waren dabei so präzise und erschütterungsarm, dass letztendlich die Zelle in der *Whole-Cell*-Konfiguration problemlos unter dem Objektiv bewegt werden konnte.

2.7 Versuchsdurchführung

2.7.1 Optische Auswahl und Ausrichtung der hippocampalen Schnitte

Für einheitliche Bedingungen beim Ca^{2+} -*Imaging* mussten die CA1-Pyramidenzellen einige Kriterien erfüllen, die vor dem Herstellen eines *giga-seals* im Durchlichtmodus (IR-DIC Bild) optisch überprüft wurden. Beim Schneiden der Hemisphären wurden Zellen nahe der Schnittebene unweigerlich geschädigt. Die Rasierklinge war im Vibratom in einem abfallenden Winkel von 17° eingespannt. Dadurch wurde das Gewebe der späteren Schnitt-Oberseite beim Schneiden nur minimal berührt. Das Gewebe auf der späteren Schnitt-Unterseite wurde hingegen über die Fläche der vibrierenden Klinge geschoben und war daher starken Scherkräften ausgesetzt. Die Zellen der jeweiligen Oberseite eines Schnitts waren daher in einem deutlich besseren Zustand als die Zellen auf dessen Unterseite und in der 10-fachen Vergrößerung optisch leicht zu unterscheiden. Durch die gebogene Form des Hippocampus innerhalb der Hemisphären veränderte sich mit jedem Schnitt auch der Winkel, in dem die Rasierklinge durch den Hippocampus geführt wurde (Abschnitt 2.3, Abb. 4A). Daher waren von den 8 bis 10 Schnitten, die pro Tier gewonnen werden konnten nur 2 bis 4 Schnitte ungefähr rechtwinklig. Bei diesen Schnitten war es sehr wahrscheinlich, auf Zellen zu treffen, die über eine weite Distanz mit dem Apikaldendriten nahe der

Schnittoberfläche lagen. Sie wurden in der Messkammer so ausgerichtet, dass ihr Apikaldendrit im *Stratum radiatum* möglichst horizontal im Bild lag und später im Experiment nicht von der *Patch*-Pipette verdeckt wurde (Abschnitt 2.6, Abb. 7B u. C). Um eine CA1-Pyramidenzelle für die spätere Messung auszusuchen, wurde das Objektiv mit 63-facher Vergrößerung verwendet. Die Somata gesunder Zellen sahen im IR-DIC Bild prall aus und hatten eine länglich-ovale Form (Abschnitt Abb. 7C). Stark angeschwollene, kreisrunde Zellen oder kollabierte, stark konturierte Zellen wurden dagegen nicht für die Experimente verwendet. Durch Auf- und Abfokussieren und unter Zuhilfenahme des verschiebbaren Objektisches wurde kontrolliert, ob der Dendrit einer CA1-Pyramidenzelle im *Stratum radiatum* parallel zur Schnittoberfläche verlief. An einer Zelle in gutem Zustand und in optimaler Ausrichtung wurde im nächsten Schritt eine *Whole-Cell-Patch-Clamp*-Konfiguration hergestellt.

2.7.2 Befüllen von CA1-Pyramidenzellen in der *Whole-Cell*-Konfiguration

Um sich den CA1-Pyramidenzellen mit der gefüllten *Patch*-Pipette schrittweise zu nähern, wurde zunächst möglichst viel Platz unter dem Objektiv benötigt. Daher wurde das Wasserimmersionsobjektiv mit 10-facher Vergrößerung gerade so tief in die Messkammer eingetaucht, dass es mit der ACSF Kontakt hatte. Ein leichter Überdruck von ca. 25 mbar (entspricht ca. 25 cm Wassersäule) wurde auf das Pipetteninnere gegeben und die *Patch*-Pipette in den Raum zwischen Objektiv und Hippocampuschnitt gefahren. Dabei wurde der Mikromanipulator zunächst mit schnellem, dann mit langsamem Vortrieb bewegt. Die Pipettenspitze wurde im IR-DIC Bild fokussiert. Die Pipette wurde durch abwechselndes Fokussieren und Herabfahren des Mikromanipulators sukzessive dem Schnitt angenähert. Kurz vor Erreichen der Schnittoberfläche wurde die Pipettenspitze auf eine zentrale Position im Monitorbild gebracht und auf das Objektiv mit 63-facher Vergrößerung gewechselt. Der Überdruck in der Pipette wurde, je nach Durchmesser der Pipettenöffnung, auf 40-100 mbar erhöht, um zu verhindern, dass sich die Pipettenspitze beim Vordringen im Gewebe mit Zellresten zusetzte. Nachdem die Pipette dem Soma bis auf wenige μm angenähert worden war, konnte der Überdruck wieder auf den vorherigen Wert von ca. 25 mbar reduziert werden. Durch den geringen Arbeitsabstand der Wasserimmersionsobjektive musste die *Patch*-Pipette in einem sehr flachen Winkel an die Zelle herangeführt werden. Dies führte dazu, dass die Pipettenspitze sehr tief in das Soma "versenkt" werden musste, um auch am oberen Rand der Pipettenöffnung Kontakt zur Zellmembran zu gewährleisten. Sobald eine

deutliche Vertiefung in die Membran des Somas erkennbar war, wurde der Überdruck komplett von der Pipette genommen. Daraufhin bildete sich der *giga-seal* spontan, oder der *seal*-Bildung wurde durch leichtes Saugen am Mundstück nachgeholfen. In dieser Konfiguration wurde die tiefe Einbettung der Pipette in das Soma mit minimalen Bewegungen des Mikromanipulators vorsichtig zurückgenommen. Das Haltepotenzial wurde auf -80 mV voreingestellt und die Zellmembran unterhalb der Pipettenöffnung mit leichtem Unterdruck und der "ZAP" Funktion des *Patch-Clamp*-Verstärkers durchbrochen. Direkt im Anschluss wurde kurz in den CC-Modus geschaltet. Der Verstärker wurde auf 0 pA eingestellt und das Ruhemembranpotenzial (RMP) der Zelle wurde zum späteren Vergleich notiert. Im Folgenden wurde die CA1-Pyramidenzelle die meiste Zeit im VC-Modus ca. 10 mV unterhalb des RMP geklemmt (Ausnahmen siehe Abschnitt 2.7.3), um die Zelle stabil zu halten. Zudem hatte sich herausgestellt, dass es auf diese Weise seltener zum *resealing* kam. Gegebenenfalls wurde die Verbindung zum Zellinneren durch leichtes Saugen und *Zappen* wieder hergestellt. Der Zugang zur Zelle wurde anhand des R_s -Wertes am *Patch-Clamp*-Verstärker regelmäßig kontrolliert. Bei R_s -Werten unterhalb von 15 M Ω füllte sich die Zelle zügig mit dem Fluoreszenzfarbstoff bis-Fura 2 aus der *Patch*-Pipette (Pusch & Neher, 1988). Bei ausgeschaltetem Durchlicht wurde die Ruhe-Fluoreszenz während des Füllprozesses mit der Einzelbildfunktion der *Imaging*-Software (*binning*-Faktor 8; vgl. Abschnitt 2.9.2.1, Tab. 6) von Zeit zu Zeit kontrolliert.

2.7.3 CC-Protokolle

Bis sich die Zelle ausreichend mit bis-Fura 2 gefüllt hatte, vergingen ca. 15-20 Minuten. Im CC-Modus wurden währenddessen einige Erregungseigenschaften der CA1-Pyramidenzelle durch verschiedene CC-Protokolle ermittelt. Zunächst wurden Strominjektionen zwischen -200 pA bis +100 pA in Abständen von 50 pA für 900 ms vorgenommen (Abb. 8). Der Abstand zwischen zwei Pulsen betrug bei diesem Protokoll 2 Sekunden (Interpulsintervall, IPI = 2 s). CA1-Pyramidenzellen zeigten bei Hyperpolarisationen durch stark negative Strominjektionen typischerweise eine ausgeprägte Senke (*sag*) in der Spannungsantwort. Ohne Strominjektion zeigten die Zellen ein konstantes RMP. Die schrittweise Steigerung der positiven Strominjektion führte zur Depolarisation der Zelle. Die AP-Schwelle wurde in den CA1-Pyramidenzellen entweder bereits bei der moderaten Depolarisation (durch +50 pA) oder erst bei der stärkeren Depolarisation (durch +100 pA) überschritten. Die Zellen zeigten daraufhin repetitive APs, die häufig eine leichte Frequenzabnahme aufwiesen. Mit Hilfe der

aufgezeichneten Potenzialänderungen und repetitiven APs konnten verschiedene passive Membraneigenschaften der Zelle sowie die AP-Latenzzeit und AP-Frequenz bestimmt werden (siehe Abschnitt 2.9.1.1 u. 2.9.1.2).

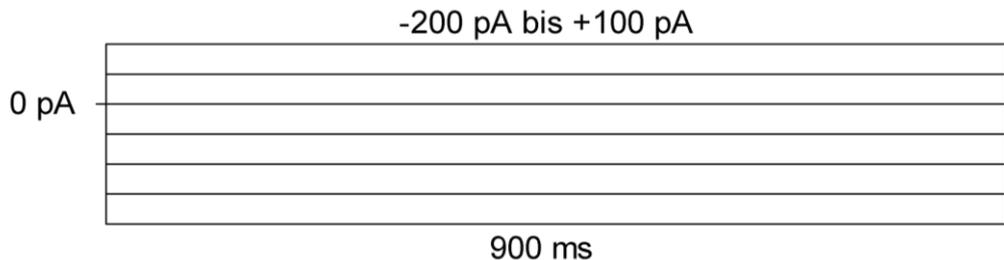


Abbildung 8: CC-Protokoll zur Messung passiver Membraneigenschaften und der Erregbarkeit.

Vom RMP aus (0 pA Strominjektion) wurde die Zelle durch negative Strominjektionen von -50, -100, -150 und -200 pA hyperpolarisiert bzw. durch positive Strominjektionen von +50 und +100 pA depolarisiert. Alle Strominjektionen erfolgten für 900 ms mit einem IPI von 2 s.

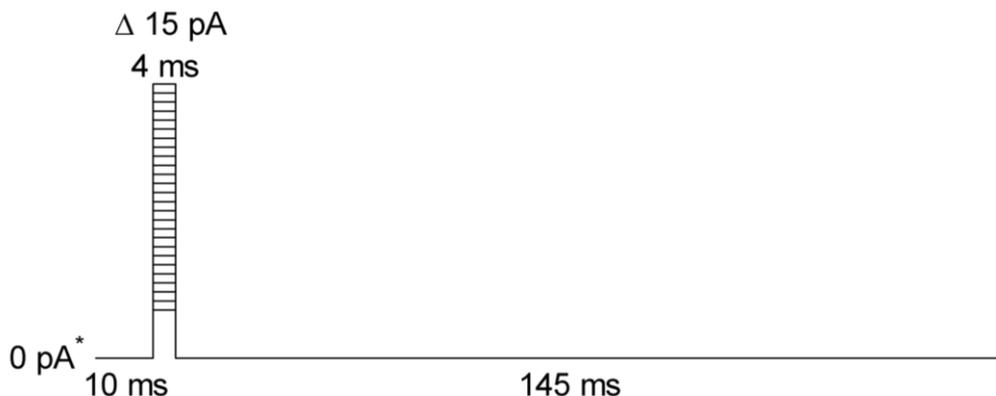


Abbildung 9: CC-Protokoll zur Messung des Verlaufs einzelner APs.

In Sham- und KA-Experimenten wurden ausgehend vom RMP der Zelle (0 pA Strominjektion) kurze Strominjektionen von 4 ms Dauer appliziert (* = in den pharmakologischen Experimenten wurde das Membranpotenzial der Zelle (wenn nötig) durch ausgleichende Strominjektionen auf -70 mV voreingestellt). Beginnend mit +80 pA wurde die Zelle bis zur Entstehung eines APs depolarisiert. Die Steigerung der Strominjektion erfolgte in Schritten von 15 pA mit einem IPI von 3 s. Die folgenden 145 ms ohne Strominjektion dienten der Beobachtung der AP-Repolarisation und AP-Nachdepolarisation (AP-N).

In einem weiteren Protokoll wurde durch 4 ms kurze Strominjektionen ein einzelnes AP erzeugt (Abb. 9). Die Strominjektion wurde dabei ausgehend von +80 pA solange jeweils um 15 pA gesteigert, bis ein somatisches AP innerhalb der Pulsdauer von 4 ms erschienen war. Das IPI betrug 3 s. Die aufgezeichneten einzelnen APs wurden später auf verschiedene Parameter hin untersucht (Abschnitt 2.9.1.4, Abb. 13).

Bei jeweils einem Tier der Sham- und KA-Gruppe wurden die Zellen, ausgehend von +30 pA und einer Steigerung der Strompulse um je 10 pA, bis zum Überschreiten der AP-Schwelle depolarisiert (Abb. 10). Dabei wurde die jeweilige Pulsdauer variiert. Das IPI betrug 3 s. Aus der Abhängigkeit von Reizstärke (Strominjektion) und Reizdauer (Pulsdauer) wurde eine Kurve erstellt und der Rheobase- bzw. Chronaxie-Wert von je 5 Zellen eines Tieres bestimmt (siehe Abschnitt 2.9.1.3).

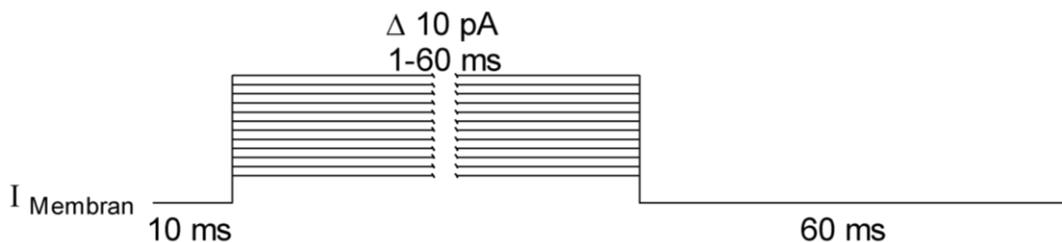


Abbildung 10: CC-Protokoll zur Bestimmung der Schwellenreizstärke bei unterschiedlicher Reizdauer.

Das Membranpotenzial der Zelle wurde (wenn nötig) durch ausgleichende Strominjektionen auf ca. -70 mV voreingestellt (I_{Membran}). Beginnend mit +30 pA wurde die Zelle mit zunehmender Strominjektion (Reizstärke) bis zur Entstehung eines APs depolarisiert. Die Steigerung der Strominjektion erfolgte in Schritten von 10 pA. Die Pulsdauer (Reizdauer) waren in die Schritte 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 8, 6, 4, 2 und 1 ms gestaffelt; das IPI betrug 3 s.

Bei den Ca^{2+} -*Imaging*-Experimenten wurde ein CC-Protokoll verwendet, das synchron zur Fluoreszenzaufnahme gestartet wurde (vgl. Abschnitt 2.7.4 u. 2.9.2.2, Abb. 15). Durch eine fest eingestellte Strominjektion (+1000 pA / 4 ms) wurde ein einzelnes AP erzeugt (Abb. 11). Zwischen zwei Messungen wurde ein Abstand von > 10 s eingehalten (vgl. Abschnitt 2.7.4). Das Membranpotenzial wurde zuvor durch ausgleichende Strominjektionen auf -70 mV voreingestellt.

Die CC-Protokolle wurden für die Experimente im KA-Modell und die pharmakologischen Untersuchungen in unterschiedlich großem Umfang eingesetzt. Passive Membraneigenschaften, AP-Latenzzeit, AP-Frequenz sowie Rheobase- und Chronaxie-Werte wurden nur in Sham- und KA-Zellen systematisch verglichen. Der Verlauf einzelner somatischer APs wurde in verschiedenen Zellen der Sham- und KA-Gruppe gemessen. Bei pharmakologischen Experimenten wurde hingegen der AP-Verlauf an derselben Zelle, zu verschiedenen Zeitpunkten mit und ohne NS5806, aufgezeichnet.

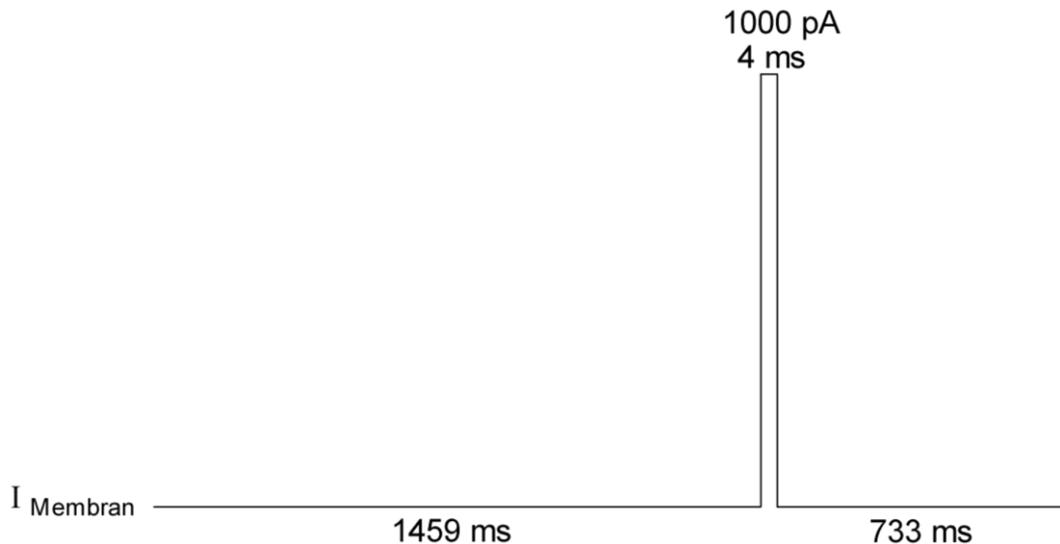


Abbildung 11: CC-Protokoll zur AP-Auslösung für das Ca^{2+} -Imaging-Experiment.

Das CC-Protokoll wurde von der *Imaging*-Software synchron zum Ca^{2+} -Imaging-Experiment gestartet. Das Membranpotenzial der Zelle wurde zuvor (wenn nötig) durch eine ausgleichende Strominjektion auf -70 mV voreingestellt (I_{Membran}). Durch eine konstante Strominjektion wurde I_{Membran} über 1459 ms kontinuierlich aufrechterhalten. Die folgende 4 ms lange Strominjektion von +1000 pA war in jedem Fall ausreichend, um ein AP zu erzeugen, das zeitgleich zum Beginn der 133. Fluoreszenzaufnahme erschien. Auf das AP folgten 733 ms, in denen die Zelle repolarisierte und der Ca^{2+} -Einstrom abklingen konnte.

2.7.4 *Imaging* des b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Einstroms

Mit der Messung des dendritischen Ca^{2+} -Einstroms wurde begonnen, sobald der Fluoreszenzfarbstoff ausreichend in den Dendriten der CA1-Pyramidenzelle diffundiert war. Der Verlauf des Dendriten im Schnitt war trotz optischer Vorauswahl (Abschnitt 2.7.1) von Zelle zu Zelle unterschiedlich. Die CA1-Pyramidenzelle wurde daher vor der Messung so fokussiert, dass möglichst lange Strecken des Apikaldendriten scharf eingestellt waren. Dazu wurden mit der "live"-Funktion der Kamera im Fluoreszenzmodus (*binning*-Faktor 8) kontinuierlich Bilder erstellt. Um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu minimieren, wurden relativ lange Bild-Abstände verwendet (> 1 s). Die Zelle wurde mit dem verschiebbaren Objektisch in die richtige Position gebracht und gleichzeitig mit dem Feintrieb am Mikroskop fokussiert. Nachdem die Zelle optimal eingestellt war, wurde in der *Imaging*-Software ein Protokoll gestartet und die eigentliche Messung begann. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit 395 nm Wellenlänge erfolgte kontinuierlich und das emittierte Fluoreszenzlicht wurde in Abständen von jeweils 10 ms gemessen. In der jeweils folgenden Millisekunde wurden die Daten des CCD-Chips ausgelesen und in den Speicher der Kamera übertragen. Diese einzelnen Messzeitpunkte mit einem Gesamtabstand

von 11 ms bzw. einer Frequenz von 91 Hz wurden 201-mal aufgenommen und von der Software zu einer Sequenz verrechnet. Zu Beginn des 3. Drittels der Sequenz (133. Aufnahme) wurde durch eine Strominjektion am Soma der Zelle ein AP ausgelöst (Abschnitt 2.7.3), das sich rückwärtig in den Dendriten ausbreitete. Die Gesamtdauer einer Sequenz wurde so kurz wie möglich gehalten, um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu minimieren. Das Ausbleichen wurde bei der Datenauswertung außerdem mathematisch ausgeglichen (vgl. Abschnitt 2.9.2.2, Abb. 15). Pro Dendritenabschnitt wurden drei Sequenzen aufgezeichnet und die Ergebnisse später gemittelt (Abschnitt 2.9.2.1 u. 2.9.2.2). Um den intrazellulären Ca^{2+} -Level wieder auf ein normales Maß abfallen zu lassen, wurde zwischen den Sequenzen eine Pause von mindestens 10 s eingehalten. Vor der ersten Messung wurde das Zählwerk an der Steuerung des verschiebbaren Objektisches auf $0 \mu\text{m}$ zurückgesetzt. Um das nächste Teilstück des Dendriten messen zu können, musste der verschiebbare Objektisch weiterbewegt und der Fokus so eingestellt werden, dass der nächstgelegene Dendritenabschnitt scharf eingestellt war. Um später einen lückenlosen Übergang zwischen einzelnen Messabständen vom Soma aus zu gewährleisten, wurde das Standbild mit den Einstellungen der vorherigen Messungen beibehalten und mit einem aktuellen Bild immer wieder abgeglichen. Die Wegstrecke, um die der Objektisch bis zum nächsten Dendriten-Teilstück verschoben wurde, wurde notiert. Diese Prozedur wurde wiederholt bis der Dendrit aufgrund der nachlassenden Füllung oder einer Richtungsänderung des Dendriten nicht mehr zu fokussieren war. Die Messungen konnten alternativ auch an einem möglichst weit distal vom Soma liegenden Dendritenabschnitt begonnen werden und schrittweise zum Soma geführt werden. Auf diese Weise entstanden zu jedem Teilstück des Dendriten drei Sequenzen und ein Standbild, das später für die Auswertung benötigt wurde (Abschnitt 2.9.2.1).

2.8 Pharmaka

Zur pharmakologischen Beeinflussung der Erregungs-Entstehung und -Ausbreitung in CA1-Pyramidenzellen wurden vor den Experimenten jeweils 50 ml Standard-ACSF entnommen und mit den verschiedenen Pharmaka aus Vorratslösungen versetzt (Tab. 5). Diese Lösungen wurden von nun an separat mit Carbogen begast.

Tab. 5: Verwendete pharmakologische Substanzen.

	Molekulargewicht (g/mol)	Vorratslösung (mM)	Verdünnung	Endkonzentration (μ M)
CNQX	232,15	10 / DMSO	1:1000	10
DL-AP5	197,13	50 / ACSF*	1:1000	50
4-AP	94,11	500 / ACSF*	1:100	5000
NS5806	574,0	20 / DMSO	1:1000	20

* ohne CaCl_2 , ohne MgCl_2

Einerseits wurde der bekannte A-Typ-Kanal-Blocker 4-Aminopyridin (4-AP) verwendet und andererseits die putativ K_v4 -modifizierende Substanz NS5806 (N-[3,5-bis(Trifluoromethyl)Phenyl]-N'-[2,4-Dibromo-6-(1H-Tetrazol-5-yl)Phenyl]-Harnstoff) auf ihre Wirkung getestet.

4-AP blockiert auch A-Typ K^+ -Kanäle der $\text{K}_v1.4$ -Familie in präsynaptischen Endigungen und Axonen hippocampaler Neurone. Dadurch führt 4-AP zu einer verstärkten präsynaptischen Glutamatausschüttung und letztendlich zu unkontrollierbaren AP-Salven in CA1-Pyramidenzellen (Perreault & Avoli, 1991; Sheng *et al.*, 1992). Durch Verwendung der Glutamatrezeptor-Blocker 6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion (CNQX) und DL-2-Amino-5-Phosphopentan-Säure (AP5) wurden die gemessenen CA1-Pyramidenzellen deshalb von exzitatorischen synaptischen Eingängen der umgebenen Zellen isoliert.

Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Gruppen in jedem Fall zu gewährleisten, wurden CNQX und AP5 auch bei Kontrollmessungen eingesetzt, sowie vor und während einer Zugabe von NS5806. In wenigen Fällen war die Ableitung so stabil, dass die Kontrollmessung und die Messung mit 4-AP oder NS5806 an derselben Zelle durchgeführt werden konnte. Der weitaus größere Teil der Messungen wurde nur unter einer Bedingung durchgeführt, auch um die Stichprobenzahl der experimentellen Gruppen (Kontrolle, 4-AP und NS5806) in einem ähnlichen Umfang zu halten.

2.9 Auswertung der Messdaten

2.9.1 Auswertung der CC-Experimente

Bei Ableitungen in der *Whole-Cell*-Konfiguration entsteht am engen Übergang zwischen dem Lumen der *Patch*-Pipette und der Zelle ein Serienwiderstand (R_s ; vgl. Abschnitt 2.4). Wenn ein Strom (I) über die Zellmembran fließt, führt R_s zu einer Diskrepanz zwischen dem gemessenen Membranpotenzial und der tatsächlichen Potenzialdifferenz über die Membran der Zelle.

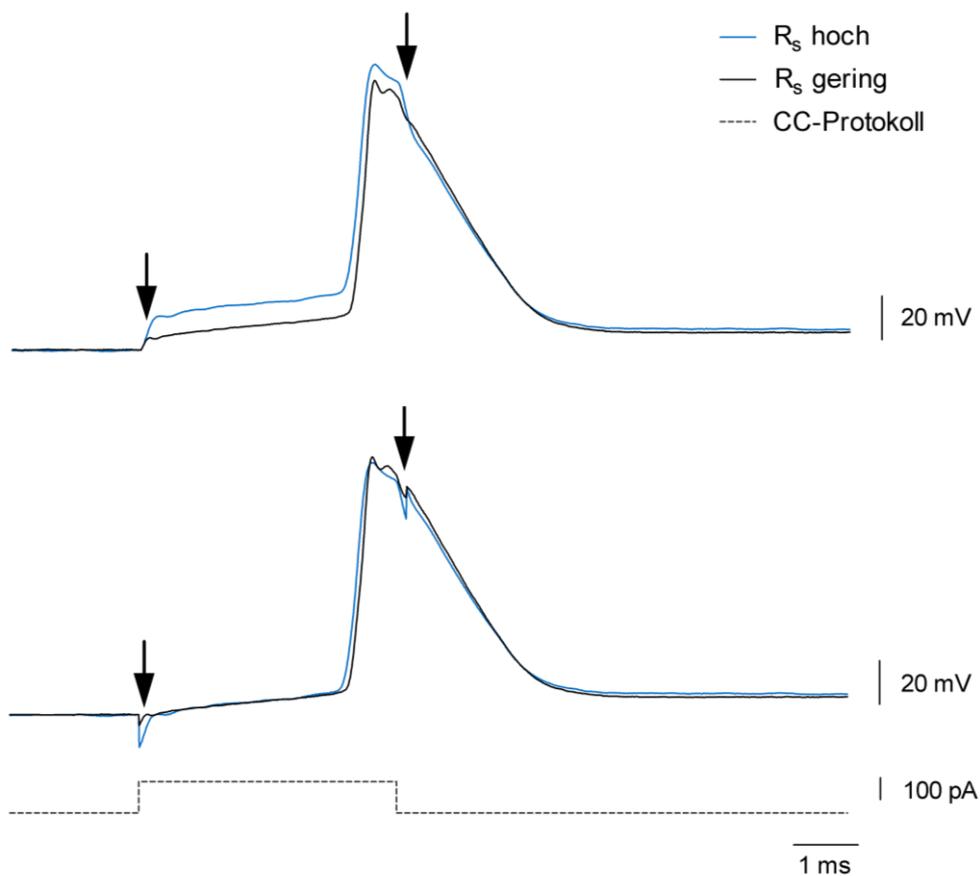


Abbildung 12: Kompensation des R_s -abhängigen Artefakts bei CC-Messungen einzelner APs.

Oben: Abhängig von dem Betrag der Strominjektion (I) und vom Serienwiderstand der *Patch-Clamp*-Ableitung (R_s) kam es während einer sprunghaften Anpassung der Strominjektion im CC-Modus zu einer sprunghaften Änderung des gemessenen Membranpotenzials. Dieses Artefakt trat etwa zeitgleich mit den Strom-Sprüngen des CC-Protokolls auf (Pfeile). **Unten:** Für die Auswertung wurde die Größe des Artefakts zu Beginn des 4 ms Strompulses gemessen. Dieser Betrag (in mV) wurde vor der Auswertung der AP-Parameter nur für den Zeitraum der Strominjektion (4 ms) von den CC-Rohdaten subtrahiert und das Artefakt so weitgehend aus der jeweiligen AP-Aufnahme entfernt.

Die Größe dieses Fehlers ergibt sich aus $I \times R_s$ (Odgen, 1994). Theoretisch führt unter CC-Bedingungen eine steile Änderung der Strominjektion daher zu einer gemessenen Spannungsantwort, die zuerst einen Potenzialsprung und dann eine allmähliche Potenzialänderung zeigt (Odgen, 1994). Auch bei den somatischen CC-Messungen in dieser Arbeit wurden diese R_s -abhängigen Artefakte beobachtet. Bei schnellen Änderungen der Strominjektion wie zu Beginn und am Ende eines überschwelligen Strompulses kam es zu einem plötzlichen Sprung des Membranpotenzials und zu einer verfälschten Darstellung des gemessenen Membranpotenzials. In Abbildung 12 sind APs aus einem Beispiel-Experiment gezeigt, bei dem es zufällig zu einem teilweisen *resealing* kam, woraufhin R_s stark anstieg (vgl. Abschnitt 2.4). Im Vergleich zum AP mit geringerem R_s sieht man deutlich, dass bei gleicher Strominjektion verschieden große Artefakte auftraten (Fehler = $I \times R_s$). Die Artefakte traten etwa zeitgleich mit der Veränderung der Strominjektion auf (Abb. 12, Pfeile). Das Artefakt zu Beginn des 4 ms Pulses war leicht zu erkennen, das Artefakt zum Ende des Pulses konnte jedoch die Aufstrichphase, den Gipfel oder die Abstrichphase des APs überlagern. Da bei dem verwendeten *Patch-Clamp*-Verstärker kein "Brückenabgleich" zur Kompensation des Artefakts zur Verfügung stand, wurde die Artefaktgröße gemessen und nur für den Zeitraum der Strominjektion nachträglich aus den AP-Messdaten subtrahiert (Abb. 12 unten). Das Ergebnis war ein "Artefakt-bereinigtes" AP, an dem die Membranpotenzial-abhängigen Parameter (AP-Schwelle, AP-Amplitude) bzw. die von der AP-Amplitude abhängigen Parameter (APD_{50}) ausgemessen werden konnten (vgl. Abschnitt 2.9.1.4, Abb. 13). Die Artefakt-Bereinigung der CC-Rohdaten erfolgte mit Excel (Microsoft), die Auswertung der AP-Parameter wurde mit Axograph X (John Clements; <http://axographx.com>) durchgeführt. Die Zusammenfassung und Weiterverarbeitung der CC-Daten erfolgte mit Excel und Prism 5 (GraphPad Software).

2.9.1.1 Membraneigenschaften

Das RMP wurde innerhalb von 900 ms als durchschnittlicher Wert bei 0 pA Strominjektion gemessen (Abschnitt 2.7.3, Abb. 8). Negative Strominjektionen gleicher Dauer führten zu einer Hyperpolarisation der Zelle (vgl. Abschnitt 2.7.3, Abb. 8; 900 ms, Pulse von -200 bis -50 pA). Bei -50 pA Strominjektion wurde der Verlauf der Hyperpolarisation durch eine einfache Exponentialfunktion nachgebildet, um die Membranzeitkonstante τ zu erhalten. Bei stärkeren Hyperpolarisationen (durch -100, -150 und -200 pA Strominjektion) führt eine zeitverzögerte anteilige Depolarisation in CA1-Pyramidenzellen zu dem charakteristischen

sag in der Potenzialspur. Der Eingangswiderstand (R_{in} in $M\Omega = U_{max} / I$; Numberger M. & Draguhn A., 1996) der Zelle wurde daher aus der linearen Steigung der Spannungsantwort (in mV) im Verhältnis zur Strominjektion (in nA) zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Messung ausgewertet: bei maximaler Hyperpolarisation und bei stabiler Hyperpolarisation. Die beiden R_{in} Messungen wurden als "*Peak*" und "*Steady-State*" bezeichnet (vgl. Abschnitt 3.2.1, Abb. 18). Da die Parameter der Membranerregbarkeit während eines andauernden Strompulses gemessen wurden, genügte es, den jeweiligen Betrag des R_s -abhängigen Artefaktes (vgl. Abschnitt 2.9.1) für alle relevanten Strominjektionsstufen (-200 bis -50 pA) manuell vom Betrag der *Peak*- und *Steady-State*-Potenzialänderung zu subtrahieren. Für die absolute Differenz zwischen *Peak*- und *Steady-State*-Potenzial bei -200 pA Strominjektion war das R_s -abhängige Artefakt dagegen gar nicht relevant. Die errechneten Differenz-Potenziale wurden gegen das jeweils erreichte *Peak*-Potenzial aufgetragen, wobei die Daten in *Peak*-Potenzial-Gruppen zu je 10 mV zusammengefasst ("gebinnt") wurden (-90 bis -100 mV; -100 bis -110 mV; -110 bis -120 mV; -120 bis -130 mV; -130 bis -140 mV; -140 bis -150 mV; siehe x-Achse in Abb. 18F).

2.9.1.2 AP-Latenzzeit und AP-Frequenz

Eine Depolarisation der Zellen wurde durch positive Strominjektionen für 900 ms erreicht (Abschnitt 2.7.3, Abb. 8, Pulse über 0 pA). In einigen Zellen führten Strominjektionen von +50 pA nicht zu Depolarisationen, die APs auslösten. In diesen Zellen kam es erst bei +100 pA Strominjektion zu repetitiven APs (vgl. Abschnitt 3.2.2, Abb. 19). Die Zeitdifferenz zwischen dem Beginn der Strominjektion und dem Erscheinen des ersten APs einer Reihe wurde als AP-Latenzzeit in Millisekunden gemessen. Die Anzahl der auftretenden APs innerhalb der Gesamtdauer einer Strominjektion (900 ms) wurde in eine AP-Frequenz in Hz umgerechnet. Die allmähliche Reduktion der AP-Frequenz, die normalerweise bei CA1-Pyramidenzellen zu beobachten ist, wurde dabei nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse für Sham- und KA-Tiere wurden je nach Größenordnung der Strominjektion (+50 oder +100 pA) separat gesammelt. Da die Eigenschaften der repetitiven APs nur zeitliche Komponenten enthielten, spielte das R_s -abhängige Artefakt (vgl. Abschnitt 2.9.1) für diese Auswertung keine Rolle.

2.9.1.3 Rheobase- und Chronaxie-Werte

Die Begriffe "Rheobase" und "Chronaxie" wurden 1909 von Louis Lapicque eingeführt (Irnich, 2010). In seinen Experimenten untersuchte Lapicque die Erregbarkeit von Nerven- und Muskelgewebe durch äußere elektrische Reize. Auf diese Weise war es schwierig vergleichbare Schwellenwerte für die Erregbarkeit (AP-Schwelle) zu finden, da die benötigte absolute Reizstärke vom Oberflächen-Kontakt der Elektrode abhängig war. Dieses Problem wurde von Lapicque umgangen indem er die Rheobase als die minimale Reizstärke zum Erreichen der AP-Schwelle bei (unendlich) langer Reizdauer definierte. Die Chronaxie, definiert als die Reizdauer bei doppelter Rheobase, konnte als charakteristischer Wert für die Erregbarkeit des untersuchten Gewebes festgehalten werden (Irnich, 2010).

Das Prinzip von Rheobase und Chronaxie wird auch heute noch angewendet, um die ektopische Erregbarkeit von Nervenfasern zu untersuchen. Im Fall von *Whole-Cell-CC*-Experimenten wird als Synonym für die minimal benötigte Strominjektion (= Reizstärke) bis zur AP-Entstehung häufig der Begriff Rheobase verwendet (Vervaeke *et al.*, 2006; Gu & Haddad, 2001). Es ist auch möglich, in CC-Experimenten einen Chronaxie-Wert für einzelne Neurone zu bestimmen (Barmashenko *et al.*, 2005). Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit CA1-Pyramidenzellen durch Strominjektionen mit 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 8, 6, 4, 2 und 1 ms Dauer bis zur AP-Schwelle depolarisiert (Abschnitt 2.7.3, Abb. 10). Diese Schwellenreizstärke (in pA) wurde gegen die jeweilige Pulsdauer (= Reizdauer) aufgetragen. Die Reizstärke-Reizdauer-Beziehung wurde mit der Summe aus zwei Exponentialfunktionen nachvollzogen. Die durchschnittliche Strominjektion bei langer Reizdauer (60, 50, 40 und 30 ms) wurde als Rheobase-Wert definiert. Der Schnittpunkt der Exponentialfunktionskurve und dem verdoppelten Rheobase-Wert wurde auf die Zeitachse abgetragen, um den Chronaxie-Wert der Zelle zu bestimmen. Da für diese Auswertung lediglich das Erscheinen eines APs eine Rolle spielte, wurde das R_s -abhängige Artefakt (vgl. Abschnitt 2.9.1) nicht berücksichtigt.

2.9.1.4 Entstehung und Verlauf einzelner APs

Mit sehr kurzen positiven Strominjektionen von 4 ms wurden die Zellen bis zur AP-Schwelle depolarisiert (Abschnitt 2.7.3, Abb. 9). Der AP-Verlauf wurde anhand mehrerer Kriterien beschrieben (Abb. 13). Das R_s -abhängige Artefakt wurde für jedes AP vor der Auswertung bestimmt und für die Zeit der Strominjektion von dem AP-Signal subtrahiert (Abschnitt 2.9.1). Die zeitliche Differenz zwischen dem Beginn der Strominjektion und dem

Erreichen der AP-Schwelle wurde als AP-Latenzzeit bestimmt (Abb. 13B). Die AP-Schwelle wurde als Potenzialwert definiert, an dem die Trajektorie (Bahnkurve) mit einer Steigung von mehr als 30 mV/ms in den AP-Aufstrich überging (Abb. 13B). Die Amplitude des APs wurde zwischen RMP und AP-Gipfel als absoluter Betrag gemessen (Abb. 13B). Bei der Hälfte dieser Amplitude wurde die APD_{50} bestimmt (Aktionspotenzialdauer bei 50 % der Amplitude; Abb. 13B). Die AP-Aufstrichphase wurde mit einer linearen Funktion nachgebildet und die Steigung der Geraden in mV/ms angegeben (Abb. 13B). Am Ende des AP-Abstrichs ging das Potenzial kurzzeitig auf einen Wert unterhalb der AP-Schwelle zurück (Abb. 13A und 13C) und von da in eine AP-Nachdepolarisation (AP-N) über.

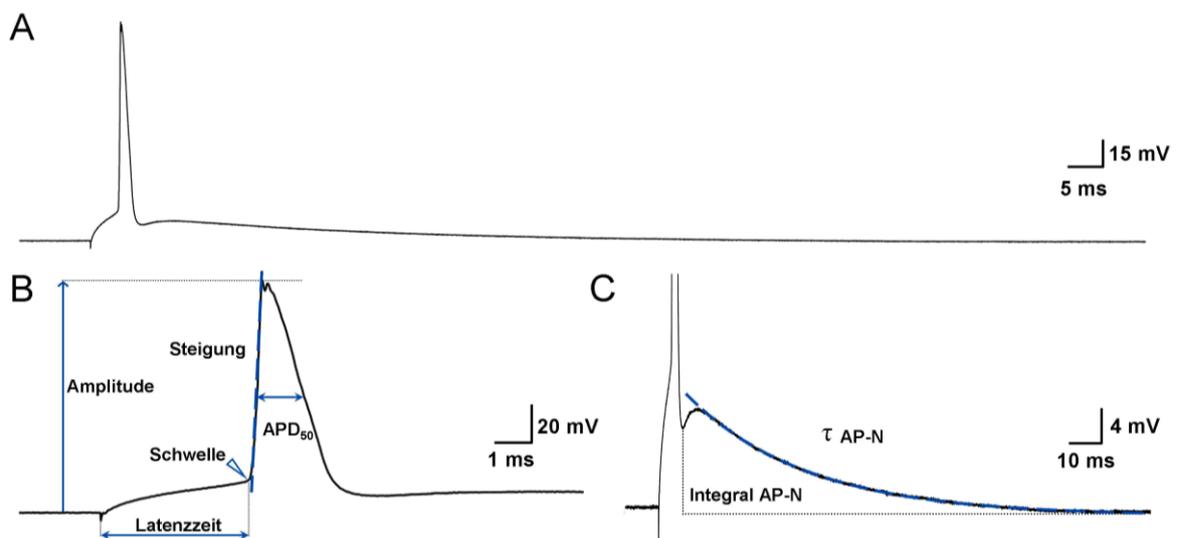


Abbildung 13: Auswertungs-Parameter des AP-Verlaufs.

A: Einzelnes somatisches AP einer CA1-Pyramidenzelle nach Artefakt-Bereinigung (Abschnitt 2.9.1). **B:** Ausschnitt aus A mit stark gestreckter Zeitachse. Die Amplitude wurde als absoluter Betrag zwischen RMP und AP-Gipfel gemessen. Die AP-Schwelle entsprach dem Potenzialwert, bei dem die Trajektorie (Bahnkurve) mit einer Steigung von mehr als 30 mV/ms in den AP-Aufstrich überging. Die AP-Latenzzeit entsprach der Zeitdifferenz zwischen dem Beginn der Strominjektion und dem Erreichen der AP-Schwelle. Die Steigung der Aufstrichphase wurde mit einer linearen Gleichung bestimmt. Auf halber Höhe der AP-Amplitude wurde die APD_{50} bestimmt. **C:** Ausschnitt aus A mit stark gestreckter Potenzialachse. An die Repolarisation des APs schließt sich eine Potenzialkerbe (*notch*) an, die als Begrenzung für die Bestimmung des Integrals unter der Nachdepolarisation (Integral AP-N) verwendet wurde. Die abfallende Flanke der AP-N wurde mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben (τ AP-N).

Es entstand eine Art Kerbe (*notch*) zwischen AP und AP-N. Zur Quantifizierung der AP-N wurde ein Integral (ms * mV) verwendet, dass zeitlich vom Minimalwert des *notch* und vom Zeitpunkt der Rückkehr auf das RMP begrenzt wurde (Integral AP-N, Abb. 13C). Bei Zellen ohne *notch* wurde stattdessen das Ende der AP-Abstrichphase als Begrenzung verwendet.

Das Abklingen der AP-N wurde mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben (Zeitkonstante τ AP-N, Abb. 13C).

2.9.2 Auswertung der Ca^{2+} -Imaging-Experimente

2.9.2.1 Rohdatenauswertung mit TILLvision

Während des Experiments wurde das emittierte Fluoreszenzlicht von dem CCD-Chip in der Kamera gemessen. Dabei wurde für jeden Pixel des Chips ein Zahlenwert (in *counts*) generiert, der die Intensität des Fluoreszenzlichts über einen definierten Zeitraum (10 ms) wiedergab (Abb. 14A, links). In den Standbildern, die während des Experiments passend zu jeder Position des Objektstischs gespeichert worden waren, wurden zur Auswertung nachträglich Messfelder definiert (ROIs, *regions of interest*; Abb. 14A, rechts). Diese ROIs bestanden jeweils aus mehreren Pixeln bzw. Zahlenwerten (Abb. 14A, vgl. links und rechts), die zu Mittelwerten zusammengefasst wurden. Bei dem verwendeten Objektiv mit 63-facher Vergrößerung und einem *binning*-Faktor von 8 entsprach ein Pixel einer Strecke von 1,016 μm (Tab. 6).

Tabelle 6: Umrechnung von Pixelzahl in Abstände in μm .

<i>binning</i> - Faktor	Pixelzahl	10-fach Objektiv (μm / Pixel)	40-fach Objektiv (μm / Pixel)	63-fach Objektiv (μm / Pixel)
1 (1x1)	1004	0,80	0,20	0,13
2 (2x2)	502	1,59	0,40	0,25
4 (4x4)	251	3,18	0,79	0,51
8 (8x8)	125	6,36	1,58	1,02

Abhängig von der Verlaufsrichtung des Apikaldendriten im Bild wurde die Länge eines ROIs fest auf einen jeweils 10 μm langen Dendritenabschnitt eingestellt und betrug daher immer 10 Pixel. Die Breite des ROIs wurde dagegen individuell, aber immer möglichst schmal an die seitliche Ausdehnung des Dendriten angepasst (Abb. 14A, rechts). Für jedes ROI wurde die zeitliche Abfolge der absoluten Mittelwerte vom Programm als Ca^{2+} -Transiente in *counts* wiedergegeben (Abschnitt 2.9.2.2, Abb. 15).

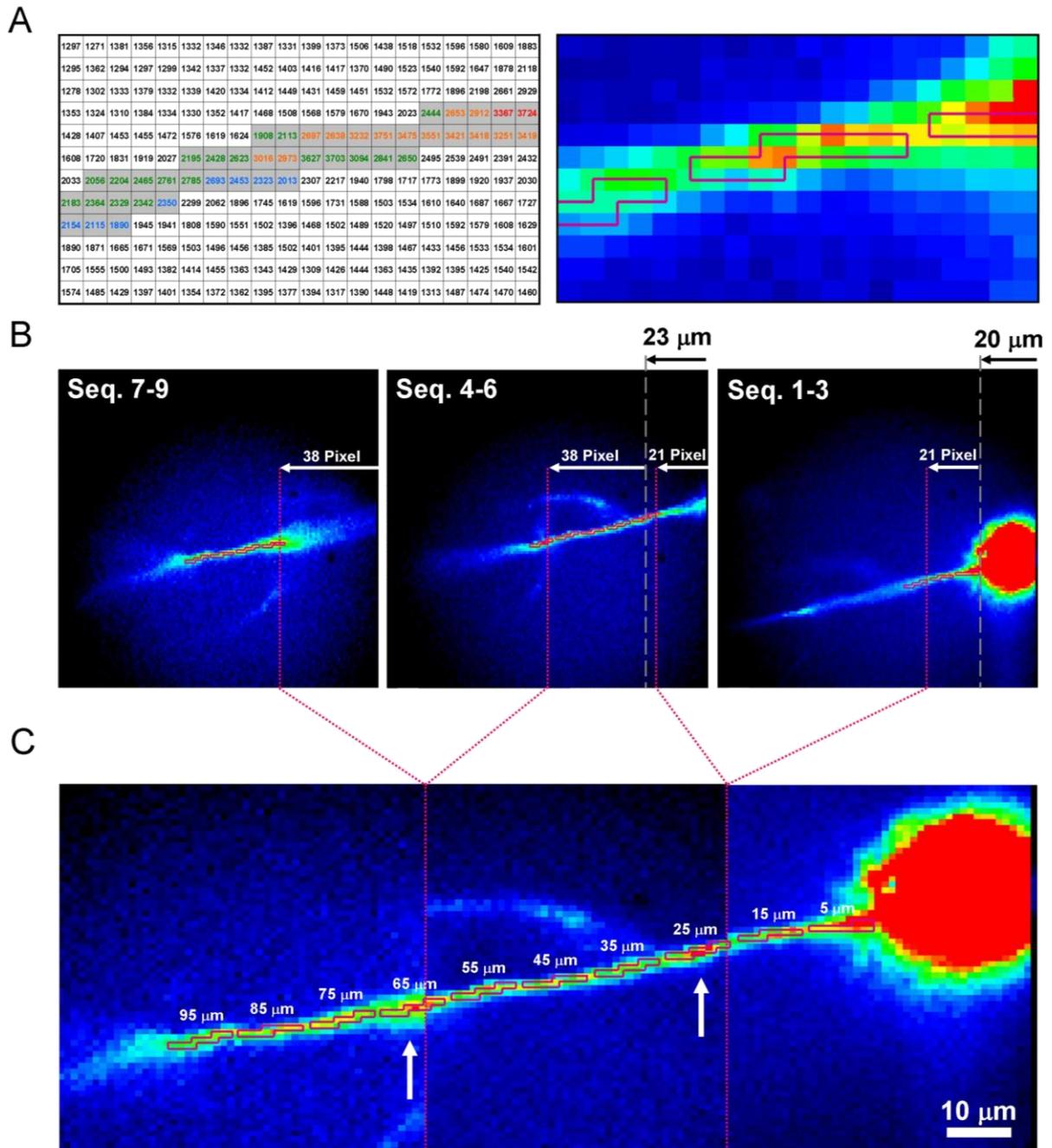


Abbildung 14: Auswertung der Rohdaten mit TILLvisION.

A: Für jeden Pixel der Kamera wurde bei der Fluoreszenzmessung ein Zahlenwert generiert. Mit ROIs (pink eingefasste Bereiche bzw. grau unterlegte Fluoreszenzwerte) wurden Dendriten-Teilstücke zu je $10\ \mu\text{m}$ in einem Mittelwert zusammengefasst. **B:** Drei Abschnitte des Dendriten wurden unter Berücksichtigung der Verschiebung des Objektstischs virtuell zusammengefügt. Zu jedem Bildausschnitt gehörten drei Sequenzen (Seq.; Nummerierung jeweils linke Ecke). Die Bewegungen des Objektstischs (in μm) und der ausgeählte Abstand zum rechten Bildrand (in Pixel) führten zu den exakten Überschneidungslinien (pink gepunktet), die als Fixpunkte dienten, um die ROIs auf die Sequenzen zu verteilen. **C:** Fotomontage der gesamten Zelle mit durchnummerierten ROIs; weiße Pfeile markieren die Positionen, an denen in jeweils zwei aneinander angrenzenden Sequenzen die Werte doppelt gemessen wurden.

Zur Definition der räumlichen ROI-Reihenfolge wurden die Messpunkte einer Dendritenlänge zugeordnet (Abb. 14B). Das erste ROI wurde als Messpunkt „5 μm “ bezeichnet, da es vom Dendritenansatz (0 μm) bis zu einem Abstand vom Soma von 10 μm reichte. Bei den folgenden ROIs erfolgte die Zuordnung nach demselben Prinzip (15, 25, 35 μm usw.). Um die Reihe der Messpunkte entlang des Dendriten von einer Objektisch-Position zur nächsten lückenlos fortzuführen, war die Wegdifferenz des Tisches während des Experiments notiert worden. Diese Strecke (in μm) wurde nun anhand des Größenmaßstabes in Tab. 6 in Pixel umgerechnet. In dem Beispiel in Abbildung 14B wurde der Objektisch zwischen den Aufnahmen in der ersten und der zweiten Position um 20 μm bewegt (grau gestrichelte Linie). Dieser Abstand, im Standbild der ersten drei Sequenzen (1-3) eingefügt, entsprach dem Anfang des zweiten Bildausschnitts (rechte Bildkante) während der Sequenzen 4-6. Da der Fokus auf den Dendriten in jedem Bildausschnitt unterschiedlich sein konnte, wurde nun nach einem sinnvollen Übergang gesucht. Im zweiten Bildausschnitt (Abb. 14B, Seq. 4-6) wurde der Abstand zwischen dem fokussierten Dendritenabschnitt und der rechten Bildkante in Pixeln ausgezählt und im ersten Bildausschnitt (Seq. 1-3) zu der zurückgelegten Strecke des Objektisches addiert. Im Beispiel von Abbildung 14B lagen die Bildpunkte, die im zweiten Bildausschnitt 21 Pixel von der rechten Bildkante entfernt waren, im selben Abstand vom Soma wie die Bildpunkte im ersten Bildausschnitt, die 21 Pixel und 20 μm Tischbewegung vom rechten Bildrand entfernt lagen. Beim Übergang zu weiteren Objektisch-Positionen wurde auf dieselbe Weise verfahren und je nach Fragmentierung des sichtbaren Dendriten noch mehrmals wiederholt. Im Beispiel von Abbildung 14B wurde der Tisch zwischen der zweiten und dritten Position 23 μm bewegt, der Abstand zwischen rechtem Bildrand und fokussiertem Dendritenabschnitt im dritten Bildausschnitt (Seq. 5-9) betrug 38 Pixel. Ausgehend von derart definierten Referenzabständen in den angrenzenden Bildausschnitten wurden die ROIs so gesetzt, dass der durchschnittliche Ca^{2+} -Einstrom nach einem b-AP in jedem Abschnitt des Dendriten ohne Unterbrechung gemessen werden konnte (Abb. 14C). Das jeweils letzte ROI eines Bildausschnitts wurde im folgenden Ausschnitt ein zweites Mal gemessen (Abb. 14C, weiße Pfeile). Von den doppelt erfassten Messpunkten wurde später einer verworfen. Die absoluten Ca^{2+} -Transienten zu den einzelnen ROIs entlang des Dendriten der Zelle wurden in Excel übertragen und weiter ausgewertet.

2.9.2.2 Weiterverarbeitung der Daten mit Excel

Zunächst wurden alle absoluten Ca^{2+} -Transienten (in *counts*) der jeweiligen ROIs in einer Excel-Tabelle gesammelt. Der zeitliche Ablauf des Experiments war immer exakt gleich, so dass die Transienten desselben ROIs aus drei Sequenzen gemittelt werden konnten. Diese Mittelwerte wurden dabei ihrem Abstand vom Soma entsprechend (5, 15, 25 μm usw.) sortiert. Zur Kompensation der Farbstoffausbleichung wurden die durchgängigen Sequenzen aus 201 Einzelbildern formal in drei gleich große Segmente von je 67 Bildern eingeteilt (Abb. 15, oben). Da die Fluoreszenz über die Zeit in einem linearen Verhältnis abnahm, konnte wie folgt verfahren werden: Ein beliebiger Zahlenwert (Flu_x) des 2. Segmentes wurde auf einen Zahlenwert im 1. Segment, mit einem relativen Abstand von 67 Bildern bezogen (Flu_{x-67}). Es entstand eine horizontal verlaufende Grundlinie aus Verhältniswerten (Flu_y).

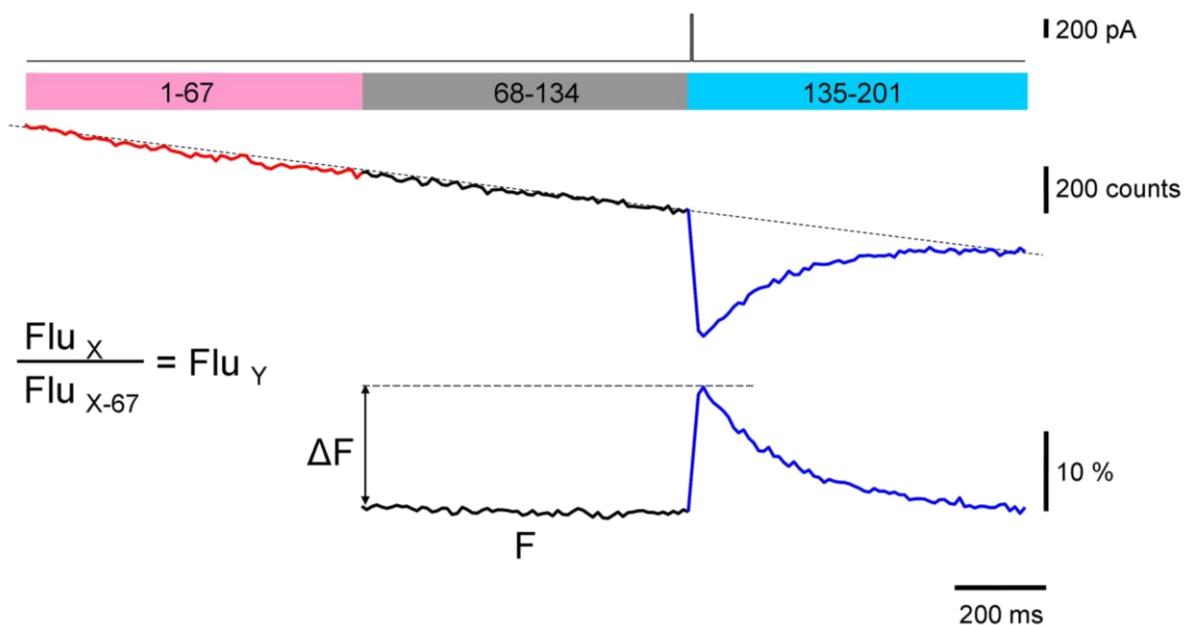


Abbildung 15: Korrektur des Ausbleichens von bis-Fura 2.

Der zeitliche Ablauf eines Ca^{2+} -Imaging-Experiments wurde formal in drei Segmente aus je 67 Einzelbildern untergliedert. Die Strominjektion von +1000 pA zur b-AP Induktion wurde im Experiment zu Anfang des dritten Segments durchgeführt (oben). Das Ausbleichen des Farbstoffs bis-Fura 2 verlief linear, der Ca^{2+} -Einstrom durch das b-AP führte zu einer Abnahme der absoluten Fluoreszenz (in *counts*, Mitte). Der Fluoreszenz-Mittelwert eines ROIs in einem Einzelbild (Flu_x) wurde auf den Wert des Einzelbildes 67 Positionen zuvor (Flu_{x-67}) bezogen. So entstanden Verhältnis-Zahlenwerte (Flu_y) aus denen eine begradigte Grundlinie und eine invertierte relative Ca^{2+} -Transiente entstanden (unten). Alle Werte dieser Grundlinie wurden gemittelt und als Ruhe-Fluoreszenzwert F verwendet, die maximale Fluoreszenzänderung ΔF wurde in % gegenüber der Grundlinie angegeben.

Auch die Werte des 3. Segmentes mit der Ca^{2+} -Transienten wurden auf diese Weise durch die entsprechenden Werte des 2. Segmentes dividiert. So entstand insgesamt eine "begradigte" Version des Ca^{2+} -*Imaging*-Experiments, die zeitlich ein Drittel kürzer war und aus der Grundlinie und einer in positive Richtung invertierten Ca^{2+} -Transiente bestand. Der Mittelwert der begradigten Grundlinie wurde als Grundfluoreszenzwert F verwendet und die Änderung der Fluoreszenz dazu als ΔF in % angegeben (Abb. 15, unten). Die Werte dieser relativen Ca^{2+} -Transienten wurden der jeweiligen Position des ROI am Dendriten zugeordnet (Abb. 16A). Für eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den experimentellen Gruppen wurden in einem weiteren Rechenschritt die prozentualen Werte aller einzelnen ROIs einer Zelle auf den jeweils ersten Messpunkt (5 μm) normiert (Abb. 16B). Ausgehend von 1 (bei 5 μm) nahmen die normierten Werte für gewöhnlich in einem exponentiellen Verlauf ab. Zur Quantifizierung dieses Abfalls wurden die normierten Werte durch Logarithmieren in einen linearen Zusammenhang gebracht und mit einer Regressionsgeraden in ihrer Steilheit bewertet (Abb. 16C). Diese Steigungen der Einzelgeraden wurden nach den experimentellen Gruppen sortiert und statistisch verglichen (siehe Abschnitt 2.10).

Um die somanahen Ca^{2+} -Transienten (bei 5 μm) weitergehend zu vergleichen, wurde in einem Teil der Experimente nicht nur die Amplitude ($\Delta F/F$ in %) ausgewertet, sondern zusätzlich die Geschwindigkeit der Signal-Rückbildung mit einer einfachen Exponentialfunktion nachvollzogen und als Zeitkonstante τ angegeben.

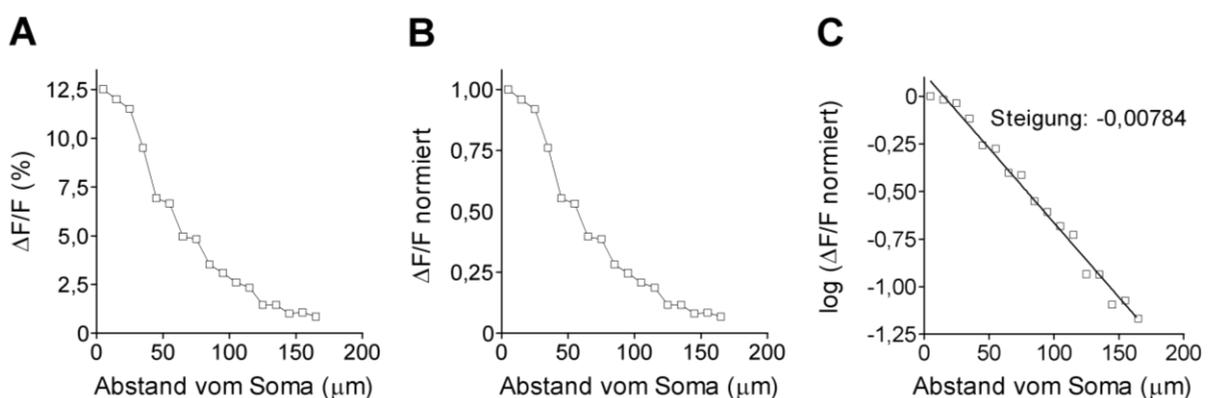


Abbildung 16: Beispielauswertung.

A: Darstellung der gemessenen Fluoreszenz $\Delta F/F$ in % gegen den Abstand des ROIs vom Soma. **B:** Normierte $\Delta F/F$ Werte aus A gegen den Abstand des ROIs vom Soma. **C:** Logarithmierte Daten aus B gegen den Abstand des ROIs vom Soma, die Steigung der linearen Regression wurde zur Bewertung der gesamten Ca^{2+} -Signal-Abschwächung verwendet.

2.10 Statistik

In dieser Arbeit sind alle Mittelwerte mit dem entsprechenden Standardfehler (SEM = *Standard Error of the Mean*) angegeben. Mit Hilfe der Software Prism 5 (GraphPad) wurden Ergebnisse mit mehr als zwei Vergleichsgruppen (Pharmakologie: Kontrolle, 4-AP und NS5806 bzw. SE-Modell: Sham, KA, KA[n] und KA[x]) durch eine Varianzanalyse (ANOVA) mit Tukey-Test getestet. Der Unterschied zwischen zwei Vergleichsgruppen wurde mit einem zweiseitigen t-Test verglichen. Dabei wurde bei allen Vergleichen zwischen verschiedenen Zellen aus unterschiedlichen Tieren (Sham- und KA-Zellen) ein ungepaarter t-Test verwendet. Beim direkten Vergleich von AP-Parametern derselben Zelle, vor und nach Zugabe von NS5806, wurde ein gepaarter t-Test angewendet. Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde ein etwaiger Unterschied als signifikant (*), bei $p < 0,001$ als höchstsignifikant (**) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Kainat-induzierter *Status epilepticus* in Mäusen

In dieser Arbeit wurde durch intraperitoneale Injektion des Glutamatrezeptor-Agonisten Kainat (KA, *kainic acid*) ein initialer *Status epilepticus* (SE) ausgelöst. Die Untersuchungen befassten sich mit möglichen Veränderungen der somatodendritischen Erregbarkeit von CA1-Pyramidenzellen kurz nach dem SE.

3.1.1 Dosisfindungs-Experimente

Da die Toleranz gegenüber KA von der verwendeten Zuchtlinie abhängig ist (McKhann *et al.*, 2003), wurden zunächst Dosisfindungs-Experimente durchgeführt. Je nach Zweck einer Studie liegen typische Literaturwerte für Mäuse der C57BL/6-Linie zwischen 20 und 30 mg KA pro kg Mausgewicht (Barnwell *et al.*, 2009; Weiergräber *et al.*, 2007). Um einen Effekt von KA auf einzelne Zellen zu erreichen, sollte ein möglichst massiver SE hervorgerufen werden. Zunächst wurde jedoch an drei Mäusen eine KA-Dosierung von 15 mg/kg Körpergewicht getestet. Keines dieser Tiere zeigte äußerlich markante Merkmale von epileptischen Anfällen. Die Mäuse verhielten sich allerdings etwas weniger aktiv als Sham-Tiere, denen nur 0,9%ige NaCl-Lösung gespritzt wurde. Eine Verdopplung der KA-Dosis auf 30 mg/kg Körpergewicht führte meist zu deutlich ausgeprägten generalisierten Anfällen, die als SE definiert wurden (Abschnitt 2.2). Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von ca. 3 Stunden traten typische Verhaltensweisen auf, die dem Acht-Stufen-Bewertungssystem (Stufe 0-7; vgl. Abschnitt 2.2, Tab. 1) zugeordnet werden konnten. Eine vergleichsweise hohe Toleranz der C57BL/6-Mauslinie gegenüber KA konnte somit, weitgehend übereinstimmend mit gängigen Literaturwerten, bestätigt werden (Weiergräber *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2008).

3.1.2 Zeitlicher Verlauf des initialen SE

Das KA-Modell konnte für die Experimente dieser Arbeit erfolgreich etabliert werden. In Abbildung 17A, B und C sind exemplarische SE-Profile (Verhaltensänderungen über die Zeit) von drei Mäusen dargestellt. Die beobachteten Verhaltensmerkmale nach der

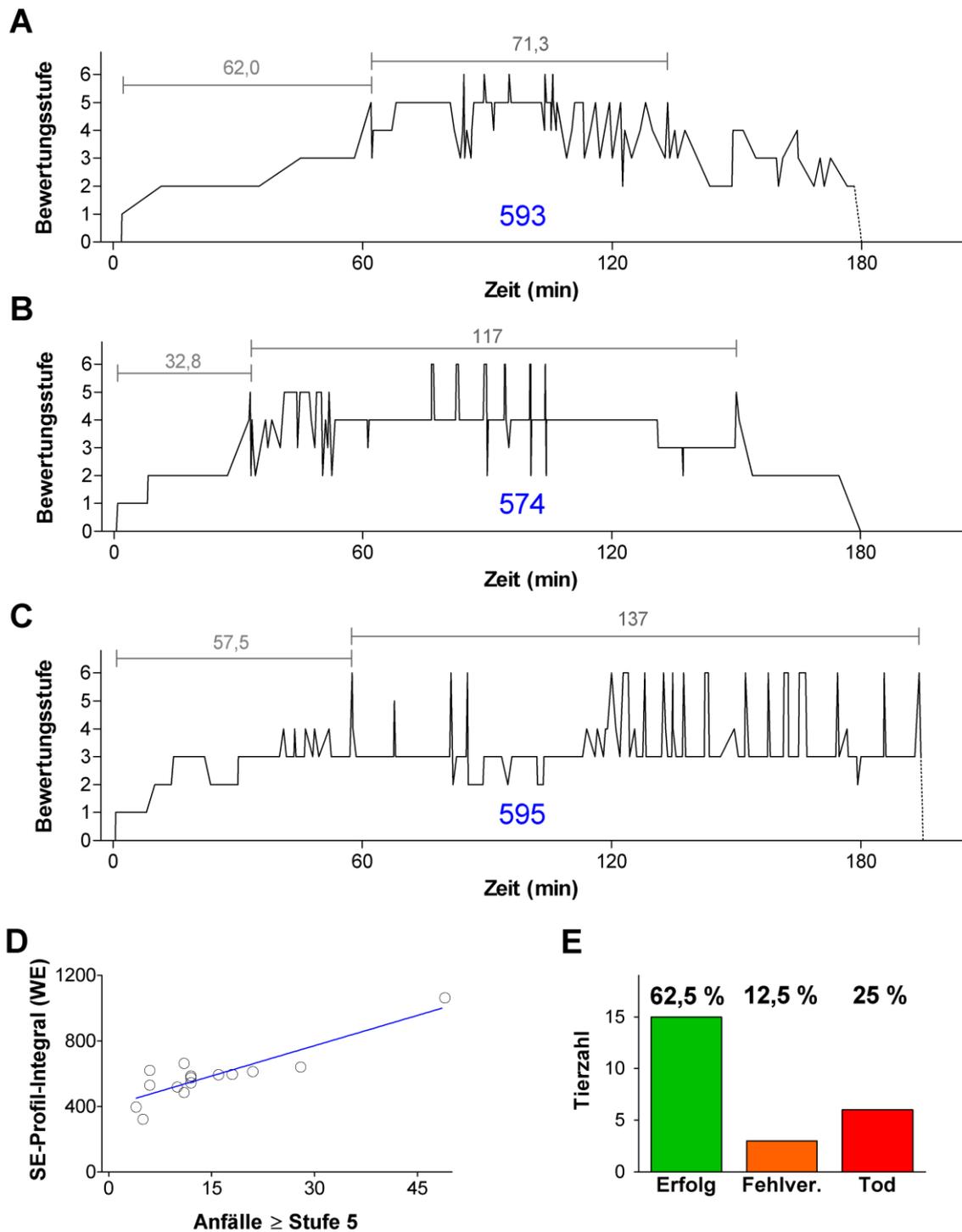


Abbildung 17: Wirkweise von 30 mg/kg KA auf C57BL/6 Wildtyp-Mäuse.

A, B und **C**: Auswertung der Verhaltensänderungen nach einer Acht-Stufen-Bewertung über die Zeit (SE-Profil). Die Ausprägung und Dauer des SE variierte zwischen den Tieren und wurde durch das Integral der SE-Profile (blaue Schrift) zusammenfassend bewertet. Der Präparationszeitpunkt wurde willkürlich als Stufe 0 bewertet. Grau gekennzeichnet: Zeit bis zum ersten Erscheinen der Bewertungsstufe \geq 5 bzw. Zeitraum mit Anfallsspitzen \geq Stufe 5 (generalisierte Anfälle = SE) in Minuten. **D**: Korrelation zwischen Anzahl der Anfallsspitzen (\geq Stufe 5) und Anfallsschwere (Bewertung durch das SE-Profil-Integral in willkürlichen Einheiten = WE). **E**: Erfolgsquote (63 %) und Mortalitätsrate (25 %) der Tiere nach KA-Injektion (Fehlversuche mit geringer KA-Wirkung = 13 %).

systemischen KA-Injektion (Abschnitt 2.2) entsprachen dem in der Literatur dokumentierten Zeitverlauf. Dieser wird zunächst mit einem unbewegten Verharren beschrieben, das zunehmend von einzelnen Muskelzuckungen abgelöst wird (Sperk, 1994). Auch in dieser Arbeit traten die Tiere kurz nach der KA-Injektion in eine progressive Phase ein. Die Unbeweglichkeit der Bewertungsstufe 1 (vgl. Abschnitt 2.2, Tab. 1) ähnelte in den ersten Minuten dem Stressverhalten von Sham-Mäusen nach der NaCl-Injektion. Während Sham-Mäuse jedoch nach spätestens fünf Minuten wieder ein normales Verhalten (Bewertungsstufe 0) zeigten, verblieben die KA-Mäuse in einer kauenden Haltung. Innerhalb von 10-20 Minuten erreichten die KA-Tiere die Bewertungsstufe 2 (Abb. 17, SE-Profil A, B und C; Tab. 1), wobei sie meist über mehrere Minuten nahezu regungslos in einer typischen Körperhaltung mit ausgestreckten Vordergliedmaßen, angelegten Ohren und gerade ausgestrecktem Schwanz verharrten. Einige Tiere lagen alternativ dazu mit lang ausgestrecktem Körper und Schwanz auf der Bauchseite. Diese unbewegten Verhaltensweisen wurden zunehmend von einzelnen Zuckungen an der Schnauze und nickenden Kopfbewegungen unterbrochen. Diese Zuckungen wurden heftiger und durch unwillkürliche Bewegungen der Vorderbeine ergänzt. Bei Auftreten dieses so genannten Vorderbein-Klonus wurde das Verhalten der Bewertungsstufe 3 zugeordnet (Tab. 1). Die einzelnen Tiere unterschieden sich dabei deutlich in der Ausprägung der Vorderbein-Kloni. Mäuse, die über den Gesamtzeitraum der Beobachtung häufiger zu Kloni neigten, bewegten sich dadurch weniger durch den Käfig. Andere Tiere liefen viel im Kreis oder zeigten ausgeprägte Kopfbewegungen, aber weniger Kloni. Ein Tier lief langsam rückwärts, da es zwanghaft die Hinterbeine bewegte. Weitere Automatismen wie wiederholtes Kratzen, Kopfnicken bzw. laterale Kopfbewegungen, Drehungen um die eigene Achse und kreisender Lauf im Käfig wurden ebenfalls als Stufe 3 bewertet. Diese heterogene Bewertungsstufe 3 ging teilweise plötzlich (SE-Profil C, ca. 40.-50. Minute), häufig aber auch fließend in die Bewertungsstufe 4 über. Für die Stufe 4 war ausschlaggebend, dass sich die Mäuse über längere Zeit aufrecht auf die Hinterbeine stellten (Tab. 1). Auch in Bewertungsstufe 4 kamen mehr oder weniger ausgeprägte Bewegungen der Vorderbeine vor. Anfälle der Bewertungsstufe 5 (Tab. 1) folgten häufig aus der aufgerichteten Haltung der Stufe 4 heraus, wenn die Mäuse seitlich oder nach hinten umfielen. In einigen Fällen kam es nach dem Umfallen zu kurzen aber heftigen motorischen Anfällen am ganzen Körper, die als Stufe 6 bewertet wurden (Tab. 1). Im Mittel vergingen zwischen der KA-Injektion und dem ersten

Tabelle 7: Gemittelte Parameter der Wirkung von 30 mg/kg KA auf C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (n = 15).

Zeit bis zum Erreichen der Stufe 5 (min)	Dauer des SE (min)	Anzahl der Ereignisse \geq Stufe 5	Integral des SE- Profils (WE)
57,1 \pm 3,6	91,7 \pm 13,8	15,5 \pm 2,9	589 \pm 39

Verhalten der Bewertungsstufe 5 oder höher 57,1 \pm 3,6 Minuten (Tab. 7, n = 15). Nach diesem ersten Höhepunkt traten die Tiere in eine kontinuierliche Phase ein, die immer wieder durch generalisierte Anfälle der Bewertungsstufe 5 und 6 gekennzeichnet war und daher als SE definiert wurde (Abschnitt 2.2). Die Gesamtdauer des SE (Zeitraum zwischen dem ersten und dem letzten Auftreten eines Verhaltens der Stufe 5 oder 6) lag im Mittel bei 91,7 \pm 13,8 Minuten (Tab. 7). Während des SE kamen durchschnittlich 15,5 \pm 2,9 Anfallspitzen der Stufe 5 bzw. 6 vor (Tab. 7). Dieses Verhaltensmuster entsprach genau dem für das KA-Modell beschriebenen Verlauf, nachdem es innerhalb einer Stunde durch eine Intensitäts- und Frequenz-Zunahme von individuellen epileptiformen Anfällen zu einem SE kommt, der etwa 2-3 Stunden andauert (Sperk, 1994). Während des SE konnte das Verhalten der Stufe 5, wie im SE-Profil A zu sehen, lang anhaltend sein (z.B. zwischen der 70. und 80. Minute) oder plötzlich auftreten (110.-135. Minute). Bei Tieren die den SE überlebten kamen die Anfallsspitzen der Bewertungsstufe 6 gewöhnlich nur für kurze Zeit vor (ca. 30 Sekunden; vgl. Abschnitt 3.1.3). Dabei kam es häufig zu einem Überspringen der Bewertungsstufen 4 und/oder 5 (Abb. 17, SE-Profil B und C). In diesen Fällen zeigten die Tiere beispielsweise in geduckter Haltung typische Verhaltenweisen der Bewertungsstufe 3, verkrampften einige Sekunden und brachen dann plötzlich in heftige Bewegungen der Vorderbeine aus. Meist fielen sie dabei um und bewegten auch die Hinterbeine. Viele SE-Profile zeigten individuelle Muster, die sich mehrmals wiederholten (SE-Profil B, 75.-105. Minute).

Die KA-Wirkung hielt unterschiedlich lang an, so dass die Mäuse zwischen der 2. und 3. Stunde nach der KA-Injektion in eine regressive Phase eintraten (SE-Profil A und B). Mäuse, die drei Stunden nach der KA-Injektion nicht zu normalem Verhalten zurückgekehrt waren, wurden in diesem Zustand betäubt und durch dekapitieren getötet (vgl. Abschnitt 2.3; SE-Profil A u. C, gestrichelte Linie). Das mittlere SE-Profil-Integral aller Tiere betrug 589 \pm 39 (angegeben in willkürlichen Einheiten = WE, Tab. 7). Die Anzahl der kurzen

Anfallsspitzen korrelierte dabei mit den jeweiligen Integralen der SE-Profile (Abb. 17D). Dies zeigt, dass die Gesamtauswirkung der KA-Behandlung, inklusive progressiver bzw. regressiver Phase, durch die Integral-Bildung trotz Varianzen bei der SE-Dauer gut in einem Zahlenwert zusammengefasst werden konnte.

3.1.3 Abweichungen vom erwarteten KA-Wirkmuster

Nach der Injektion von 30 mg KA pro kg Körpergewicht zeigten 63 % (15/24) der Mäuse innerhalb der drei Stunden unter Beobachtung generalisierte Anfälle (SE; Abschnitt 3.1.2, Abb. 17E). Bei den übrigen Mäusen kam es zu Abweichungen von der gewünschten KA-Wirkung. 25 % (6/24) der Tiere starben nach der KA-Injektion (Abb. 17E). Drei dieser Tiere durchliefen in schneller Abfolge die progressive Phase bis zur Bewertungsstufe 6 und starben innerhalb der ersten 40 Minuten nach der KA-Injektion. Zwei Tiere zeigten zunächst einen normalen Verlauf und starben nach ungewöhnlich lang anhaltenden motorische Anfälle am ganzen Körper (Stufe 6) während der kontinuierlichen Phase. Ein weiteres Tier wurde bei der Injektion verletzt und starb kurz darauf. Bei 13 % der Tiere (3/24) kam es nur zu geringen bzw. keinen sichtbaren Merkmalen epileptiformer Anfälle. Dies wurde als Fehlversuch bewertet und die Mäuse wurden für die weiteren Experimente nicht verwendet (Abb. 17E). Zwei dieser Tiere ähnelten in ihrem Verhalten dem von Tieren mit einer KA-Dosis von 15 mg/kg. Ein Tier zeigte Verhaltensänderungen bis zur Bewertungsstufe 4, die jedoch innerhalb von zwei Stunden wieder verschwanden.

3.2 Erregbarkeit von CA1-Pyramidenzellen nach SE-Induktion

Im direkten Anschluss an den SE und die Präparation der hippocampalen Schnitte wurden verschiedenen Parameter der Zellerregbarkeit durch *Whole-Cell-Patch-Clamp*-Ableitungen im CC-Modus (*Current-Clamp*) untersucht (Abschnitt 2.4). Das Ausmaß der evozierten Potenzialänderungen erlaubte Rückschlüsse auf mögliche Unterschiede in den Ionenkanal-Leitfähigkeiten von CA1-Pyramidenzellen aus Sham- und KA-behandelten Tieren (Sham- und KA-Zellen; Abschnitt 2.9.1.1). Zudem wurden verschiedene Eigenschaften von einzelnen somatischen Aktionspotenzialen (APs) bzw. von repetitiven AP-Reihen untersucht (Abschnitt 2.9.1.2-2.9.1.4).

3.2.1 Membraneigenschaften

In Abbildung 18 sind Potenzialsuren von CA1-Pyramidenzellen über einen Zeitraum von 900 ms dargestellt. Ohne Strominjektion (0 pA) entsprachen die Spannungswerte dem jeweiligen Ruhemembranpotenzial (RMP). Das mittlere RMP von KA-Zellen war signifikant weniger negativ als das von Sham-Zellen (Sham: $72,6 \pm 0,5$ mV, $n = 65$; KA: $-70,4 \pm 0,4$ mV, $n = 81$, $p = 0,001$, Abb. 18B; Tab. 9). Geringe negative Strominjektionen (-50 pA) führten zu einer Hyperpolarisation der CA1-Pyramidenzellen, die weitgehend der passiven elektrotonischen Umladung der Zellmembran entsprach.

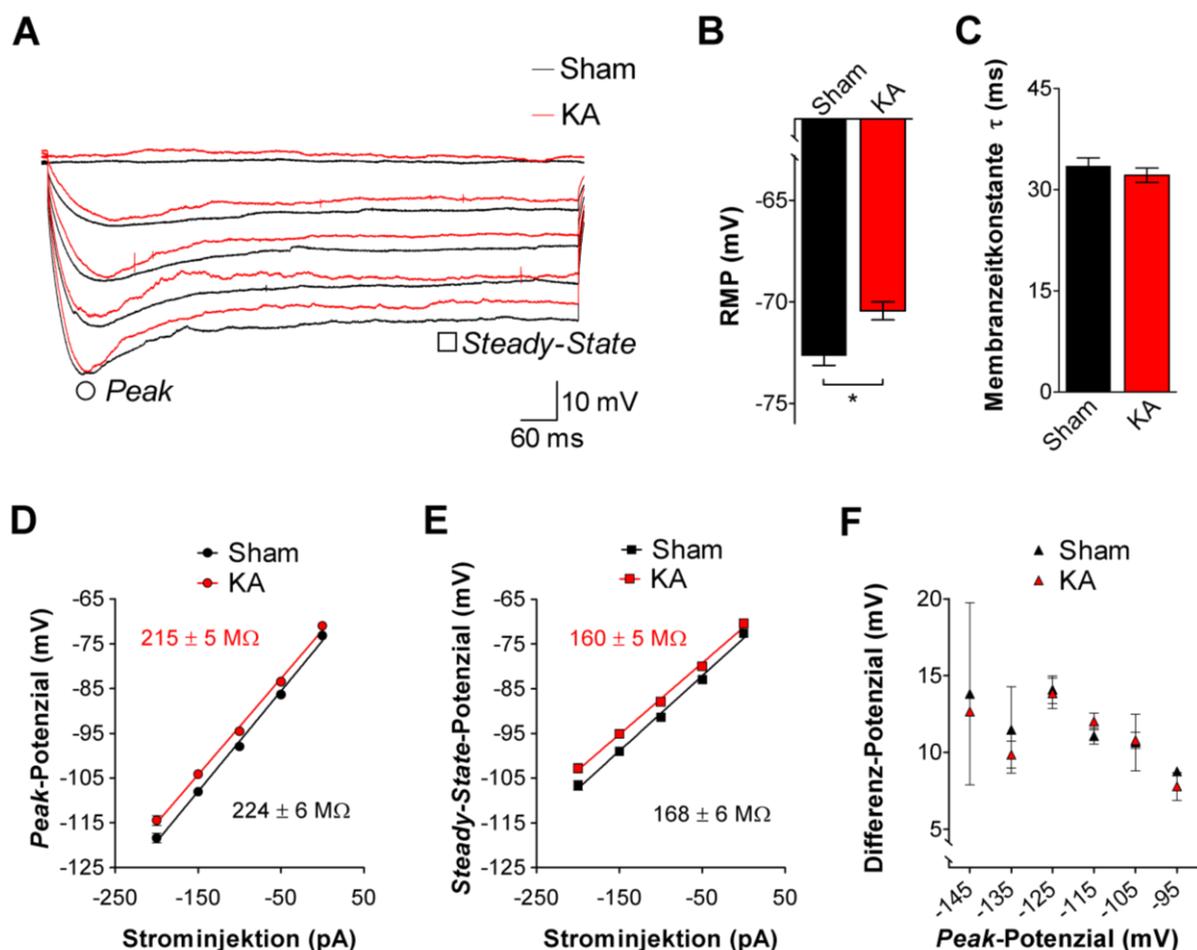


Abbildung 18: RMP und lang anhaltende Hyperpolarisationen von CA1-Pyramidenzellen.

A: Membranpotenzialänderungen durch 900 ms lange Strominjektionen zwischen -200 und 0 pA (in Schritten von je 50 pA). Bei Hyperpolarisation wird der I_h aktiviert und führt zu einer Potenzialsenke (*sag*). **B:** Das Ruhemembranpotenzial (RMP bei 0 pA Strominjektion) war in KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen signifikant depolarisiert. (* $p = 0,001$). **C:** Die Membranzeitkonstante war in Sham- und KA-Zellen identisch. **D:** Eingangswiderstand (R_{in}) der Zellen, ausgewertet bei maximaler Hyperpolarisation (*Peak*). **E:** R_{in} der Zellen, ausgewertet bei konstanter Hyperpolarisation (*Steady-State*). **F:** Das Verhältnis zwischen *sag* (Differenz-Potenzial zwischen *Peak* und *Steady-State* Bereich) und maximaler Hyperpolarisation (*Peak*-Potenzial bei -200 pA Strominjektion) änderte sich nicht.

Die Membranzeitkonstanten von Sham- und KA-Zellen waren nahezu identisch (Sham: $33,5 \pm 1,2$ ms, $n = 65$; KA: $32,2 \pm 1,1$ ms, $n = 80$; $p = 0,780$, Abb. 18C; Tab. 9). Bei stärkerer Hyperpolarisation durch -100, -150 und -200 pA Strominjektion kam es in zunehmendem Maße zur Aktivierung des HCN-Kanal-vermittelten I_h (*hyperpolarisation activated current*, vgl. Abschnitt 1.3). Durch den I_h kam es zeitverzögert zu einer anteiligen Depolarisation der CA1-Pyramidenzellen und es entstand die für CA1-Pyramidenzellen charakteristische Senke (*sag*) in der Potenzialspur. Der R_{in} wurde einerseits bei maximaler negativer Spannungsantwort (*Peak*, vor der I_h -Aktivierung) und andererseits im konstanten Bereich der Potenzialspur (*Steady-State*, anhaltende I_h -Aktivierung) bestimmt (Abschnitt 2.9.1.1). Der durchschnittliche Unterschied beim RMP (Abb. 18B) blieb bei ansteigender Hyperpolarisation zwischen Sham- und KA-Zellen gleichermaßen erhalten. Die Kennlinien der Sham- und KA-Zellen verliefen daher im *Peak*- bzw. *Steady-State*-Bereich parallel und es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im R_{in} von Sham- und KA-Zellen (Steilheit der Kennlinie, vgl. Abschnitt 2.9.1.1; Sham (*Peak*): 224 ± 6 M Ω , $n = 65$; KA (*Peak*): 215 ± 5 M Ω , $n = 81$; $p = 0,245$; Sham (*Steady-State*): 168 ± 6 M Ω , $n = 65$; KA (*Steady-State*): 160 ± 5 M Ω , $n = 81$; $p = 0,283$; Abb. 18D u. E; Tab. 9). Die Differenz zwischen *Peak*- und *Steady-State*-Potential bei -200 pA Strominjektion wurde für jede Zelle gesondert ausgewertet (siehe Abschnitt 2.9.1.1). Abbildung 18F zeigt in Sham- und KA-Zellen eine Korrelation zwischen dem individuellen Differenz-Potenzial und dem erreichten *Peak*-Potential (in Gruppen zu 10 mV zusammengefasst). Das Differenz-Potenzial steigt in beiden Gruppen bei maximalen Hyperpolarisationen zwischen -95 und -125 mV anteilig an, stagniert jedoch bei *Peak*-Potentialen von -135 und -145 mV. Im Verhältnis zum jeweiligen *Peak*-Potential entstand demnach in Sham- und KA-Zellen ein I_h -vermittelter *sag* in derselben Größenordnung (Abb. 18F).

3.2.2 AP-Latenzzeit und AP-Frequenz

Mit demselben CC-Protokoll, mit dem zuvor RMP, R_{in} und der I_h -vermittelte *sag* der Sham- und KA-Zellen bestimmt wurden, wurde durch positive Strominjektionen über 900 ms eine Depolarisation des Membranpotenzials erzeugt. Jeweils etwa zwei Drittel der Sham-Zellen (67 %, 43/64; Abb. 19B) bzw. KA-Zellen (62 %, 48/77) wurden durch eine moderate Strominjektion von +50 pA bis zur AP-Schwelle depolarisiert. In einem Beispiel (Abb. 19A, +50 pA) lag die AP-Schwelle der KA-Zelle bei einem stärker depolarisierten Potential als in der Sham-Zelle. Da in der Sham- und KA-Zelle die Bahnkurven der Aufladung der

Membran (Trajektorien) zunächst deckungsgleich verliefen, war die Zeit bis zum Erscheinen des ersten APs (AP-Latenzzeit) in der KA-Zelle durch die erhöhte AP-Schwelle länger als in der Sham-Zelle. Die durchschnittliche AP-Latenzzeit bei einer Strominjektion von +50 pA war mit 168 ± 30 ms in KA-Zellen ($n = 48$) gegenüber den Sham-Zellen ($n = 43$) mit $92,9 \pm 16,3$ ms signifikant erhöht ($p = 0,035$; Abb. 19B). Jeweils etwa ein Drittel der Sham- und KA-Zellen zeigte bei +50 pA Strominjektion keine APs (Sham: 33 %, 21/64; KA: 38 %, 29/77) und wurde daraufhin mit der nächst höheren Strominjektion von +100 pA depolarisiert. Die Verhältnisse kehrten sich in diesen Zellen gegenüber denen bei moderaten Strominjektionen (+50 pA) um.

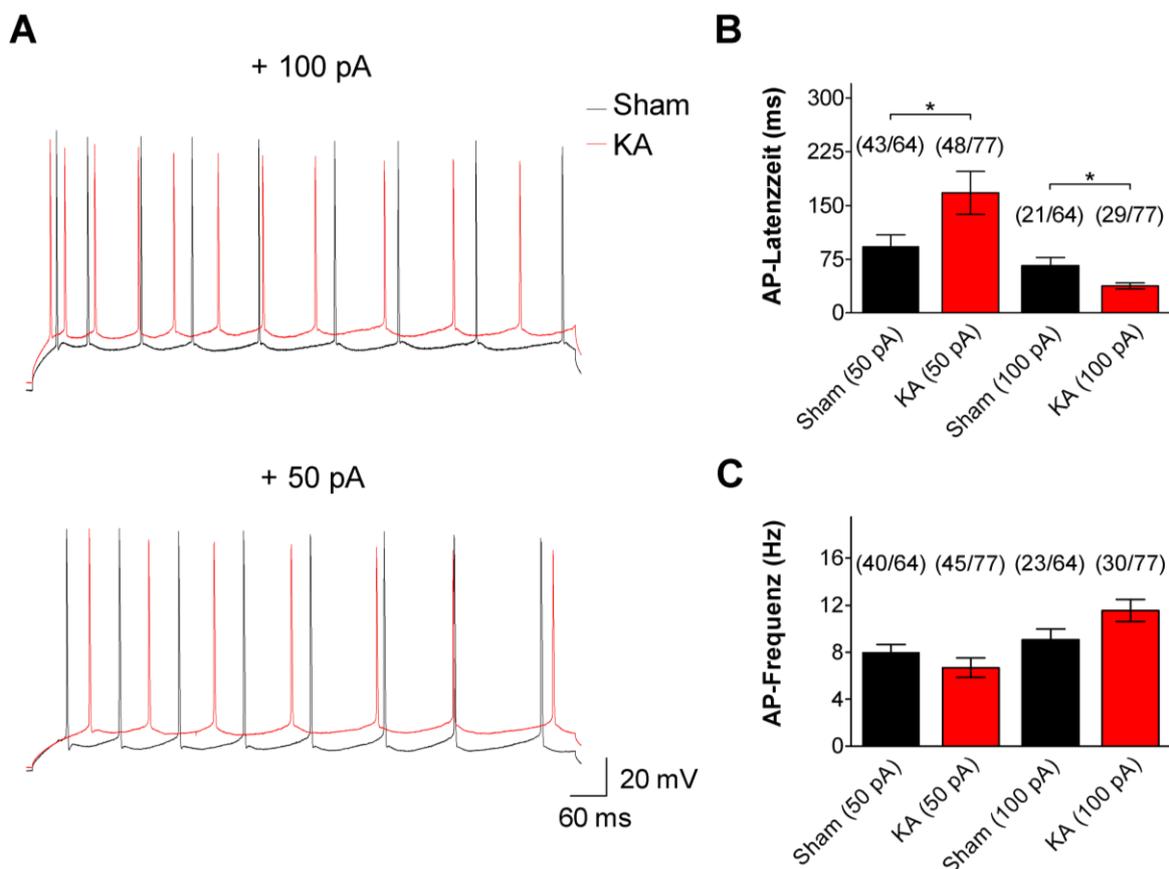


Abbildung 19: Erregungseigenschaften von CA1-Pyramidenzellen nach akutem SE.

A: Langanhaltende (900 ms) überschwellige Depolarisationen der Zellen führten zu mehreren APs. Der Großteil aller Sham-Zellen (67 %) bzw. KA-Zellen (62 %) zeigte bei +50 pA Strominjektion repetitive APs (unteres Beispiel). Die übrigen Zellen (Sham: 33 %; KA: 38 %) wurden daraufhin mit +100 pA depolarisiert (oberes Beispiel). **B:** Latenzzeit bis zum Erscheinen des ersten APs in einer AP-Reihe (AP-Latenzzeit) bei +50 und +100 pA Strominjektion. **C:** Frequenz der repetitiven APs bei +50 und +100 pA Strominjektion. **B** und **C:** ungepaarter t-Test jeweils bei +50 und +100 pA, * $p < 0,05$.

Die durchschnittliche AP-Latenzzeit bei +100 pA betrug in Sham-Zellen $66,2 \pm 11,0$ ms, in KA-Zellen hingegen nur $37,9 \pm 4,2$ ms. Dieser Unterschied war signifikant ($p = 0,010$; Abb. 19B). In dem Beispiel (Abb. 19A, +100 pA) lag die AP-Schwelle der KA-Zelle wiederum bei stärker depolarisierten Potenzialen als in der Sham-Zelle. Ein schnellerer Verlauf der Trajektorie schien diesen Effekt jedoch auszugleichen, so dass das erste AP in der KA-Zelle früher erschien als in der Sham-Zelle.

Die AP-Frequenzen von Sham- und KA-Zellen waren nicht signifikant verschieden. In der Tendenz bildeten sie jedoch die Veränderungen in der AP-Latenzzeit von Sham- und KA-Zellen spiegelbildlich ab. In den KA-Zellen war die AP-Frequenz bei +50 pA Strominjektion geringer als in Sham-Zellen (KA: $6,7 \pm 0,8$ Hz, $n = 40$; Sham: $8 \pm 0,7$ Hz, $n = 45$; $p = 0,232$; Abb. 19C). Bei +100 pA Strominjektion war dagegen die AP-Frequenz in KA-Zellen im Vergleich zu Sham-Zellen höher (KA: $11,6 \pm 0,9$ Hz, $n = 30$; Sham: $9,1 \pm 0,9$ Hz, $n = 23$; $p = 0,070$).

3.2.3 Rheobase- und Chronaxie-Werte

Um die Erregbarkeit hippocampaler CA1-Pyramidenzellen durch weitere Parameter zu charakterisieren, wurden bei unterschiedlich langer Reizdauer die jeweiligen Schwellenreizstärken bestimmt (vgl. Abschnitt 2.9.1.3 u. 2.7.3, Abb. 10). In Abbildung 20A und B sind je zwei Beispiele (sehr lange bzw. kurze Reizdauer) für eine Sham- und eine KA-Zelle dargestellt. Innerhalb einer sehr langen Reizdauer (60 ms) ging die Trajektorie in Sham- und KA-Zellen von einer kurzen exponentiellen Phase in eine langsam ansteigende Phase über. Blieb die Depolarisation der Zelle unterhalb der AP-Schwelle (blaue Kurven in Abb. 20A und B, jeweils linke Seite), musste eine größere Strominjektion erfolgen. Die minimale Reizstärke, die für ein AP benötigt wurde entsprach dem Rheobase-Wert. Bei kurzer Reizdauer (4 ms) musste die Strominjektion für das Erreichen der AP-Schwelle in Sham- und KA-Zellen um ein vielfaches gesteigert werden (Abb. 20A und B, jeweils rechte Seite). Die AP-Entstehung war bei 4 ms Strominjektionen stärker von der Membranzeitkonstante τ abhängig als bei der sehr langen Reizdauer (60 ms). Im Experiment wurden die Strominjektionen schrittweise verkürzt, so dass die Dauer der Trajektorie bis zur AP-Schwelle immer geringer wurde. In Abbildung 21A ist die Reizstärke-Reizdauer-Beziehung von je fünf Neuronen eines Sham- bzw. eines KA-behandelten Tieres dargestellt.

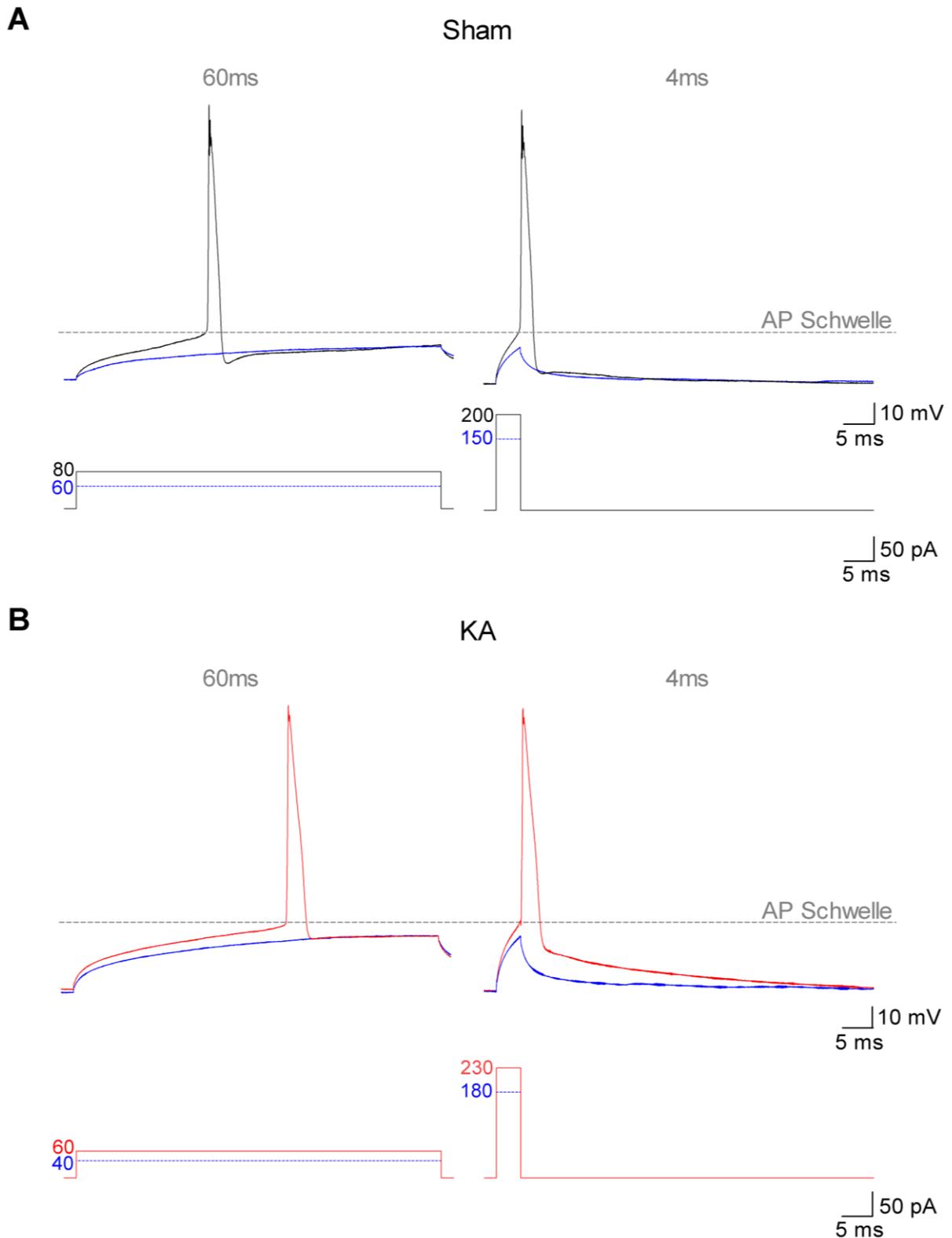


Abbildung 20: AP-Entstehung bei 60 und 4 ms Strominjektion.

A und **B**: Eine jeweils unterschwellige Depolarisation der Zellen (blau) und ein AP (schwarz: Sham, rot: KA) bei sehr langer (60 ms) bzw. relativ kurzer (4 ms) Reizdauer (Strominjektion). Im CC-Protokoll unter den Potenzialkurven sind die jeweils verwendeten Strominjektionen in pA angegeben.

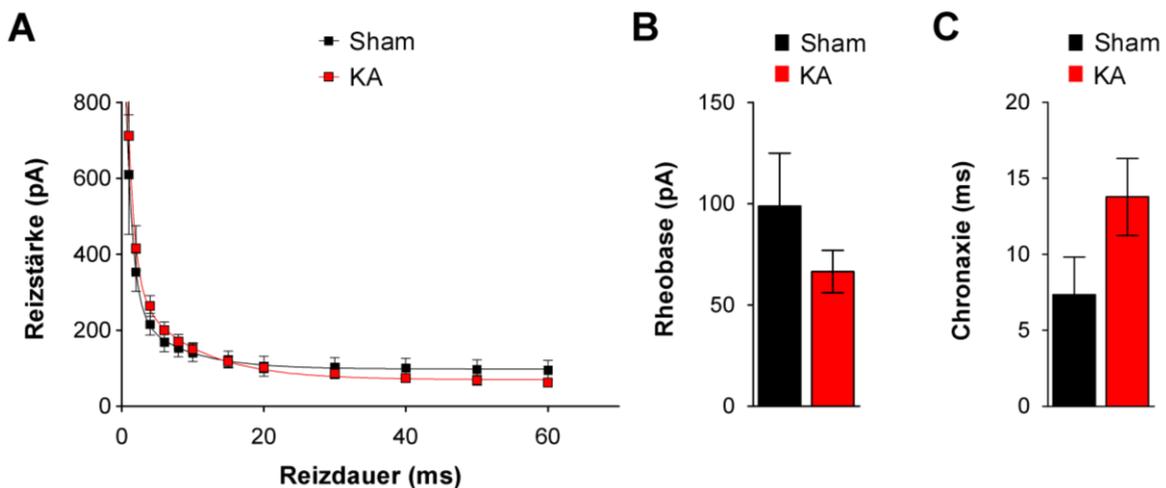


Abbildung 21: Rheobase- und Chronaxie-Werte.

A: Mittelwerte der Reizstärke-Reizdauer-Beziehung aus Zellen je eines Sham- und eines KA-Tieres (jeweils $n = 5$). **B:** Die Rheobase-Werte der KA-Zellen waren tendenziell geringer als in Sham-Zellen. **C:** Die Chronaxie-Werte waren in KA-Zellen tendenziell größer als in Sham-Zellen.

Bei einer Reizdauer von 60, 50, 40 und 30 ms waren KA-Zellen mit geringeren Strominjektionen zu erregen als die Sham-Zellen (vgl. auch pA-Werte in Abb. 20A gegenüber 20B). Der durchschnittliche Rheobase-Wert war daher in KA-Zellen tendenziell geringer als in Sham-Zellen (Abb. 21B, Sham: $98,8 \pm 26,1$ pA, $n = 5$; KA: $66,5 \pm 10,5$ pA, $n = 5$; $p = 0,284$). Der Chronaxie-Wert (Reizdauer bei doppeltem Rheobase-Wert; Abschnitt 2.9.1.3) war in den KA-Zellen dagegen tendenziell länger als in den Sham-Zellen (Abb. 21C, Sham: $7,3 \pm 2,5$ ms, $n = 5$; KA: $13,8 \pm 2,5$ ms, $n = 5$; $p = 0,108$). Durch diese entgegengesetzten Unterschiede zwischen Sham- und KA-Zellen überkreuzten sich die Kurven der Reizstärke-Reizdauer-Beziehung bei einer Reizdauer von 10 ms (Abb. 21A).

Der Verlauf der Beispiel-APs einer Sham- bzw. einer KA-Zellen (Abb. 20) zeigt noch weitere Unterschiede. Einerseits waren die APs der KA-Zelle ein wenig breiter als die APs der Sham-Zelle. Andererseits war besonders auffällig, dass die APs der Sham-Zelle am Ende der Repolarisation eine deutliche Kerbe (*notch*; vgl. Abschnitt 2.9.1.4) zeigten, die den APs der KA-Zelle fehlte. Auf diese Unterschiede wurde bei der Untersuchung von einzelnen APs aus Sham- und KA-Zellen im nächsten Abschnitt besonders geachtet.

3.2.4 Entstehung und Verlauf einzelner APs

Mit Strominjektionen von 4 ms Dauer wurden in CA1-Pyramidenzellen einzelne somatische APs erzeugt (Abschnitt 2.7.3, Abb. 9). In Abbildung 22A sind exemplarische APs einer Sham- und einer KA-Zelle im Vergleich dargestellt. Die leichte Depolarisation des RMP von KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen zeigte sich auch beim Vergleich der Einzel-APs (vgl. Abschnitt 3.2.1). Zudem konnten Unterschiede im AP-Verlauf, die sich schon in den Beispielen aus Abbildung 20 angedeutet hatten, bei einem systematischen Vergleich der Einzel-APs bestätigt werden. Während alle APs der Sham-Zellen ($n = 38$) einen ausgeprägten *notch* zeigten, war er nur in 55,7 % (34/61) der APs von KA-Zellen gut zu erkennen (KA *notch* = KA[n]). Der *notch* fehlte dagegen bei 44,3 % (27/61) aller APs von KA-Zellen (KA kein *notch* = KA[x]). In diesen Zellen ging die schnelle AP-Abstrichphase direkt in einen gleichmäßigen Rückgang des Potenzials über (Abb. 22A und 23E). Es traten APs mit und ohne *notch* in benachbarten CA1-Pyramidenzellen desselben Hippocampuschnitts einzelner KA-Tiere auf. Es war also kein direkter Zusammenhang zwischen der systemischen Ausprägung des SE (vgl. Bewertungssystem in Abschnitt 2.2 und 3.1) und den Veränderungen des AP-Verlaufs in einzelnen Neuronen zu erkennen. Für alle folgenden Parameter wurden KA[n] und KA[x] der Gesamtauswertung aller KA-Zellen bzw. der Sham-Zellen gegenübergestellt.

Bei der Auswertung wurde das R_s -abhängige Artefakt berücksichtigt, indem es manuell von den Messwerten subtrahiert wurde (vgl. Abschnitt 2.9.1, Abb. 12 u. 2.9.1.4, Abb. 13). Das Artefakt betrug in Sham-Zellen durchschnittlich $10,7 \pm 1,1$ mV ($n = 37$) und in KA-Zellen $10,7 \pm 0,8$ mV ($n = 61$, $p > 0,05$; im Vergleich KA[n]: $10,1 \pm 1,1$, $n = 34$, p gegenüber Sham $> 0,05$; KA[x]: $11,4 \pm 1,2$, p gegenüber Sham $> 0,05$; $n = 27$; siehe Tab. 9). Zur AP-Induktion wurde in Sham-Zellen eine etwas geringere Strominjektion benötigt, als in KA-Zellen (Sham: 244 ± 14 pA, $n = 37$; KA: 271 ± 13 pA, $n = 61$; p gegenüber Sham $> 0,05$, Abb. 22B). Dieser Trend gegenüber Sham-Zellen bestätigte sich in KA[n]- und KA[x]-Zellen gleichermaßen (KA[n]: 261 ± 17 pA, $n = 34$, p gegenüber Sham $> 0,05$; KA[x]: 283 ± 20 pA, $n = 27$, p gegenüber Sham $> 0,05$; siehe Tab. 9). Die AP-Schwelle war in KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen signifikant in Richtung depolarisierter Potenziale verschoben (Sham: $-56,4 \pm 0,9$ mV, $n = 37$; KA: $-51,7 \pm 0,8$ mV, $n = 61$; $p < 0,01$, Abb. 22C). Dabei zeigte sich ein geringer Unterschied zwischen KA[n]- und KA[x]-Zellen

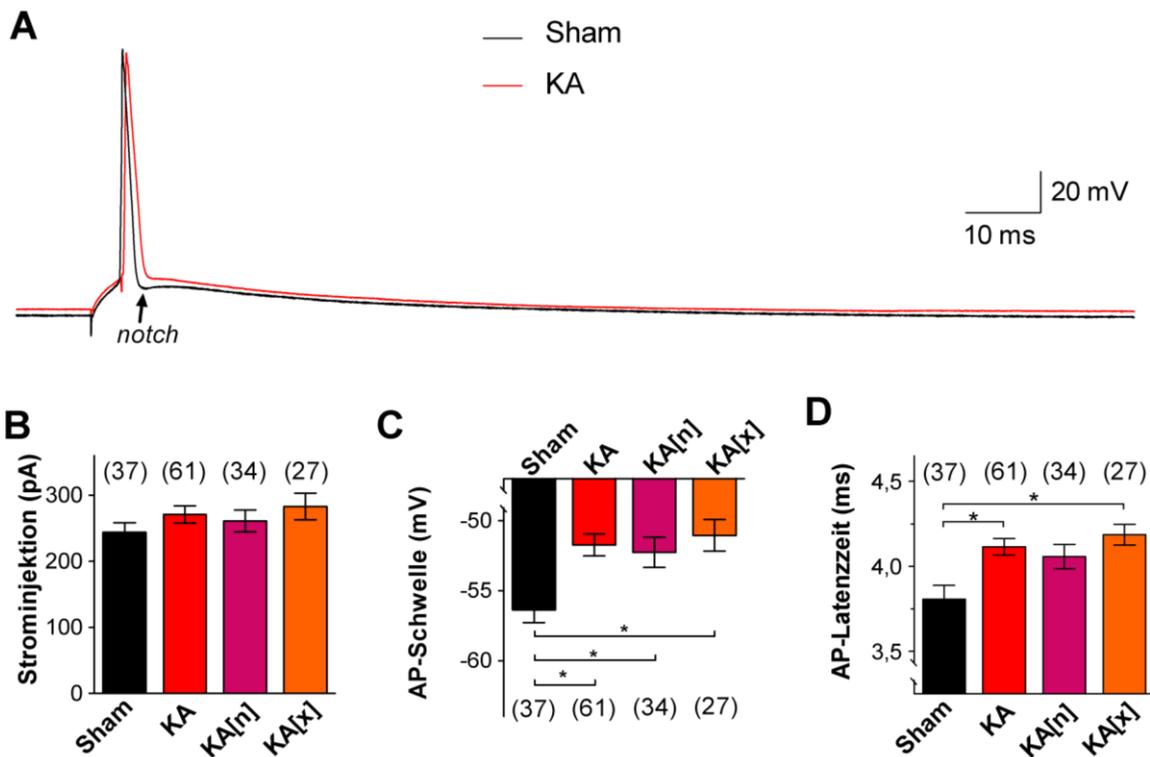


Abbildung 22: Entstehung einzelner APs in Sham- und KA-Zellen.

A: Gegenüberstellung von somatischen APs einer Sham- und einer KA-Zelle. Dem AP der KA-Zelle fehlt der *notch*. Er war dagegen bei den APs aller Sham-Zellen vorhanden. **B:** Um ein AP zu induzieren, waren in KA-Zellen größere Strominjektionen nötig als in den Sham-Zellen. Diese Tendenz war in KA-Zellen, deren APs einen *notch* hatten (KA[n]) weniger stark; in KA-Zellen mit APs ohne *notch* (KA[x]) dagegen stärker ausgeprägt. **C:** Die AP-Schwelle lag bei KA-, KA[n]- und KA[x]-Zellen gegenüber der AP-Schwelle in Sham-Zellen bei signifikant stärker depolarisierten Membranpotenzialen. **D:** Die Latenzzeit der einzelnen APs war in KA-Zellen signifikant länger als in Sham-Zellen. Die AP-Latenzzeit war in KA[x]-Zellen besonders lang; in KA[n]-Zellen war der Unterschied zu Sham-Zellen hingegen geringer. **B-D:** Alle Parameter der AP-Entstehung bei 4 ms Strominjektionen zeigten keine signifikante Fraktionierung zwischen KA[n] und KA[x]; Gesamtheit aller KA-Zellen = KA; Stichprobenanzahl n ist jeweils in Klammern angegeben. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

(KA[n]: $-52,3 \pm 1,1$ mV, $n = 34$, p gegenüber Sham $< 0,05$; KA[x]: $-51,1 \pm 1,1$ mV, $n = 27$, p gegenüber Sham $< 0,01$; siehe Tab. 9). Aufgrund der knapp überschwelligen Depolarisation wurde die AP-Schwelle meist erst gegen Ende des 4 ms CC-Pulses erreicht (vgl. Abb. 20 A und B jeweils rechts). Dennoch zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der AP-Latenzzeit von Sham- und KA-Zellen (Sham: $3,81 \pm 0,08$ ms, $n = 37$; KA: $4,12 \pm 0,05$ ms, $n = 61$, $p < 0,01$, Abb. 22D). Die AP-Latenzzeit war in KA[n]-Zellen gegenüber Sham-Zellen etwas weniger verlängert als in KA[x]-Zellen. Dadurch war ein signifikanter Unterschied gegenüber Sham-Zellen nur in KA[x]-Zellen vorhanden (KA[x]: $4,19 \pm 0,06$ ms, p gegenüber Sham $< 0,01$; KA[n]: $4,06 \pm 0,07$ ms, p gegen Sham $> 0,05$; Abb. 22D). Insgesamt scheint die AP-Entstehung bei kurzen Depolarisationen in KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen eingeschränkt zu sein (vgl. Abschnitt 3.2.3, Abb. 21A).

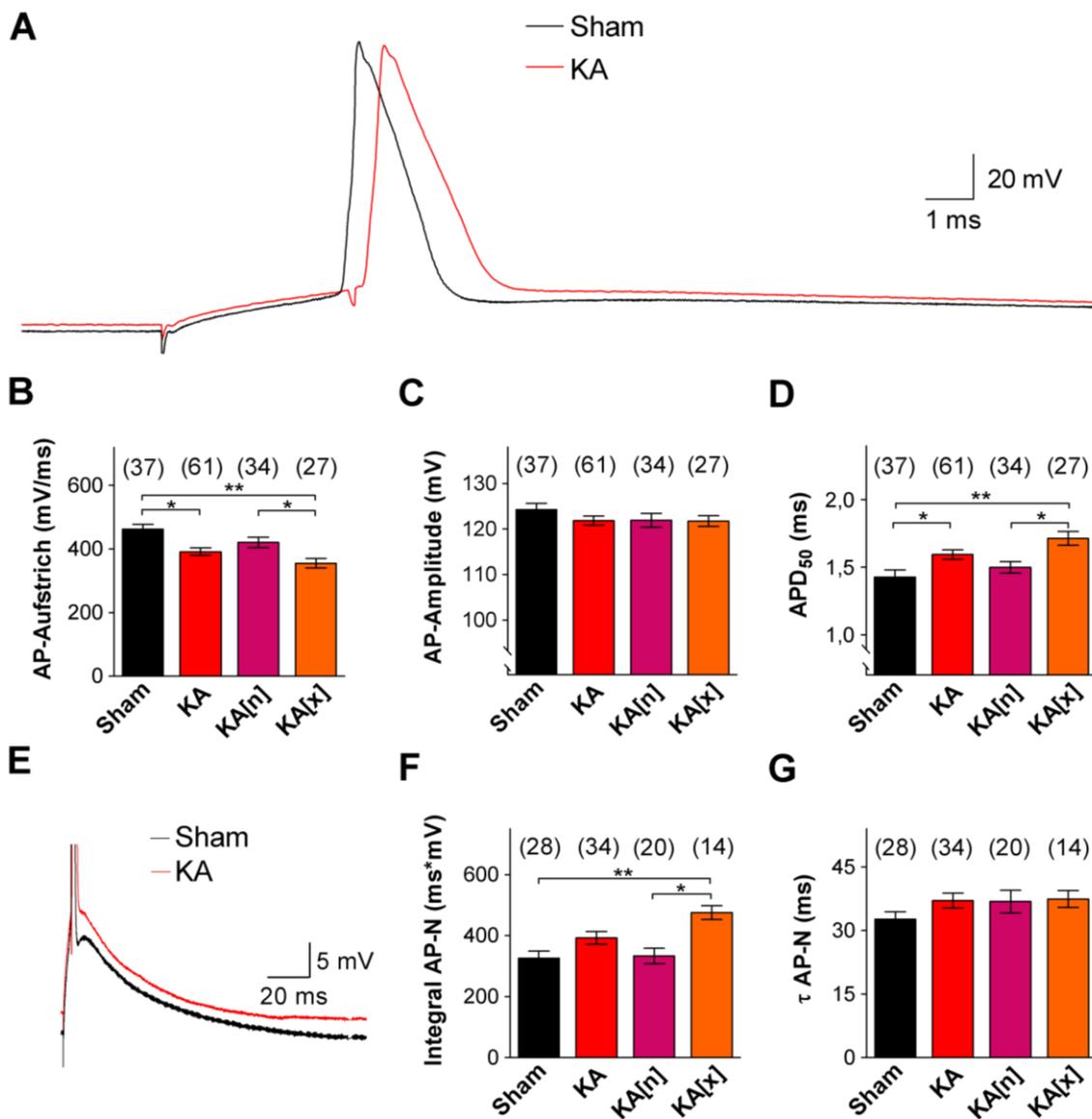


Abbildung 23: Verlauf einzelner APs in Sham- und KA-Zellen.

A: Dieselben APs wie in Abbildung 22A: Betonung des AP-Aufstrichs und der AP-Dauer durch Streckung der Zeitachse. **B:** Die AP-Aufstrichphase war in KA-Zellen flacher als in Sham-Zellen. Der größte Unterschied zu Sham-Zellen trat bei den KA[x]-Zellen auf. **C:** Die AP-Amplituden waren in KA-Zellen marginal geringer als in Sham-Zellen. Es gab keinen Unterschied zwischen KA[n]- und KA[x]-Zellen. **D:** Die APD₅₀ war bei KA-Zellen länger als in Sham-Zellen. Die Fraktionierung der KA-Gruppe (KA[n] und KA[x]) zeigte, dass die APD₅₀ vor allem bei APs ohne *notch* zugenommen hatte. **E:** Betonung der AP-Nachdepolarisation durch Stauchung der Zeitachse und Streckung der Y-Achse. **F:** Die KA-Behandlung führte gegenüber den APs in Sham-Zellen zu einem vergrößerten Integral der AP-N, jedoch ausschließlich in den KA[x]-Zellen. **G:** Die Gesamtauswertung von τ AP-N zeigte, dass der Zugewinn im Integral der AP-N in KA[x]-Zellen (siehe F) nicht mit einem veränderten Auslaufen der AP-N Flanke einherging. In **B-D**, **F** und **G**: Stichprobenanzahl n ist über den Balken in Klammern angegeben; * p < 0,05; ** p < 0,001

Auch der weitere Verlauf einzelner APs von KA-Zellen zeigte gegenüber den APs von Sham-Zellen Unterschiede. Abbildung 23A zeigt dieselben APs wie Abbildung 22A, jedoch

in einem anderen Bildausschnitt. Durch Streckung der Zeitachse werden feine Unterschiede im AP-Verlauf sichtbar. In der Gesamtauswertung ergab sich eine signifikant flachere AP-Aufstrichphase in KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen (Sham: 462 ± 15 mV/ms, $n = 37$; KA: 391 ± 12 mV/ms, $n = 61$; $p < 0,01$; Abb. 23B). Die Unterschiede gegenüber Sham-Zellen waren bei KA[n] nur tendenziell, bei KA[x] dagegen höchstsignifikant (KA[n]: 420 ± 16 mV/ms, $n = 34$; p gegenüber Sham $> 0,05$; KA[x]: 355 ± 15 mV/ms, $n = 27$; p gegenüber Sham $< 0,001$, siehe Tab. 9). Es gab daher auch einen signifikanten Unterschied zwischen den Fraktionen der KA-Gruppe (Abb. 23B, KA[n] gegenüber KA[x]; $p < 0,05$). Die Artefakt-korrigierte AP-Amplitude war in KA-Zellen ($n = 61$) mit 124 ± 1 mV in etwa gleich groß wie in Sham-Zellen ($n = 37$) mit 122 ± 1 mV ($p > 0,05$; Abb. 23C). Auch die Amplituden von APs mit und ohne *notch* waren identisch groß (KA[n]: 122 ± 2 mV, $n = 34$; KA[x]: 122 ± 1 mV, $n = 27$; Tab. 9). Die APs der KA-Zellen waren meist deutlich breiter als in Sham-Zellen (Abb. 23A). Die Gesamtauswertung zeigte, dass sich die APD_{50} von KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen signifikant unterschied und in den KA[x]-Zellen gegenüber KA[n] zudem überproportional verlängert war (Abb. 23D; Sham: $1,43 \pm 0,06$ ms, $n = 37$; KA: $1,59 \pm 0,04$ ms, $n = 61$, p gegenüber Sham $< 0,05$; KA[n]: $1,50 \pm 0,04$ ms, $n = 34$, p gegenüber Sham $> 0,05$, KA[x]: $1,71 \pm 0,05$ ms, $n = 27$, p gegenüber Sham $< 0,001$, Tab. 9). Die Fraktionierung innerhalb der KA-Gruppe war so deutlich, dass ein signifikanter Unterschied zwischen KA[n] und KA[x] bestand ($p < 0,05$, Abb. 23D). In Abbildung 23E sind die Beispiel-APs aus Abbildung 22A und 23A mit einer gestauchten Zeitachse dargestellt. Die Abwesenheit des *notch* im AP der KA-Zelle ging mit einem gegenüber dem AP der Sham-Zelle vergrößerten Integral der Nachdepolarisation (Integral AP-N) einher (Sham: 326 ± 24 mV*ms, $n = 28$; KA: 393 ± 21 mV*ms, $n = 34$, p gegenüber Sham $> 0,05$; Abb. 23F). Bei der Gesamtauswertung des Integrals von AP-N fiel die Fraktionierung der KA-Gruppe besonders stark ins Gewicht. Allein das Integral AP-N der KA[x]-Zellen war gegenüber der Sham-Gruppe signifikant erhöht. Das mittlere Integral AP-N für KA[n]-Zellen unterschied sich dagegen kaum vom Mittelwert der Sham-Zellen (KA[n]: 334 ± 25 mV*ms, $n = 20$, p gegenüber Sham $> 0,05$, KA[x]: 476 ± 23 mV*ms, $n = 14$, p gegenüber Sham $< 0,001$; Tab. 9). Die abfallende Flanke der AP-N wurde mit einer einfach exponentiellen Funktion ausreichend gut beschreiben. Die mittlere Zeitkonstante (τ AP-N) der KA-Zellen wurde dabei unabhängig von einem vorhandenen *notch* im AP-Verlauf gegenüber der Sham-Gruppe tendenziell größer (Sham: $32,7 \pm 1,8$ ms, $n = 28$; KA: $37,1 \pm 1,8$ ms, $n = 34$; KA[n]: $36,9 \pm 2,7$ ms, $n = 20$; KA[x]: $37,4 \pm 2,0$ ms, $n = 14$; alle $p > 0,05$

gegenüber Sham; Abb. 23G und Tab. 9). Dies könnte bedeuten, dass der starke Zugewinn im Integral AP-N von KA[x]-Zellen im Wesentlichen durch die Abwesenheit des *notch* hervorgerufen wurde und nicht an einen verlangsamten Rückgang der AP-N gekoppelt war (vgl. Abb. 23E und F).

3.3 Dendritische Erregungsausbreitung in CA1-Pyramidenzellen nach SE-Induktion

Für die Ca^{2+} -*Imaging*-Experimente wurde durch eine kurze Strominjektion (4 ms; +1000 pA; Abschnitt 2.7.3, Abb. 11) ein einzelnes somatisches AP erzeugt. Das AP führte sekundär durch die Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle (Abschnitt 1.3). Das AP setzte sich rückwärtig entlang des Dendriten fort, wobei sich der Ca^{2+} -Einstrom äquivalent zur Amplitude des b-APs (*backpropagating action potential*) verhielt (Waters *et al.*, 2005). So konnten Veränderungen der b-AP-Amplitude entlang des Dendriten mit Hilfe der Ca^{2+} -*Imaging*-Technik abgebildet werden (vgl. Abschnitt 2.5).

3.3.1 Erfassung der Abschwächung b-AP-assoziierter Ca^{2+} -Transienten in Sham- und KA-Zellen

Der Ca^{2+} -Einstrom wurde entlang des Dendriten in aufeinander folgenden ROIs durchgängig gemessen (Abschnitt 2.7.4 u. 2.9.2). In Abbildung 24A und C sind Gesamtaufnahmen von zwei CA1-Pyramidenzellen zu sehen. Die Schwarz-Weiß Aufnahmen zeigen die Füllung des Dendriten mit bis-Fura 2 in Ruhe. Ausgehend vom Soma der CA1-Pyramidenzellen wiesen die Apikaldendriten in distaler Richtung einen typischen Diffusionsgradienten in der bis-Fura 2-Konzentration auf. Die Grundfluoreszenz war jedoch auch in weiter distal gelegenen Dendritenabschnitten (> 200 μm) deutlich detektierbar. Auch durch kleine Änderungen im Dendritenverlauf konnte es in Teilabschnitten zu einer erhöhten bzw. verminderten Grundfluoreszenz kommen (z.B. Abb. 24A, ca. 90-100 μm). Bei der Auswertung wurde die jeweilige Ruhe-Fluoreszenz eines ROIs berücksichtigt und durch die Umrechnung in prozentuale Ca^{2+} -Transienten ausgeglichen (vgl. Abschnitt 2.9.2). Die farbigen Darstellungen der Zellen in Abbildung 24A und 24C (jeweils rechts) vernachlässigen die zeitliche Dynamik des Ca^{2+} -Einstroms, indem sie die absolute Differenz

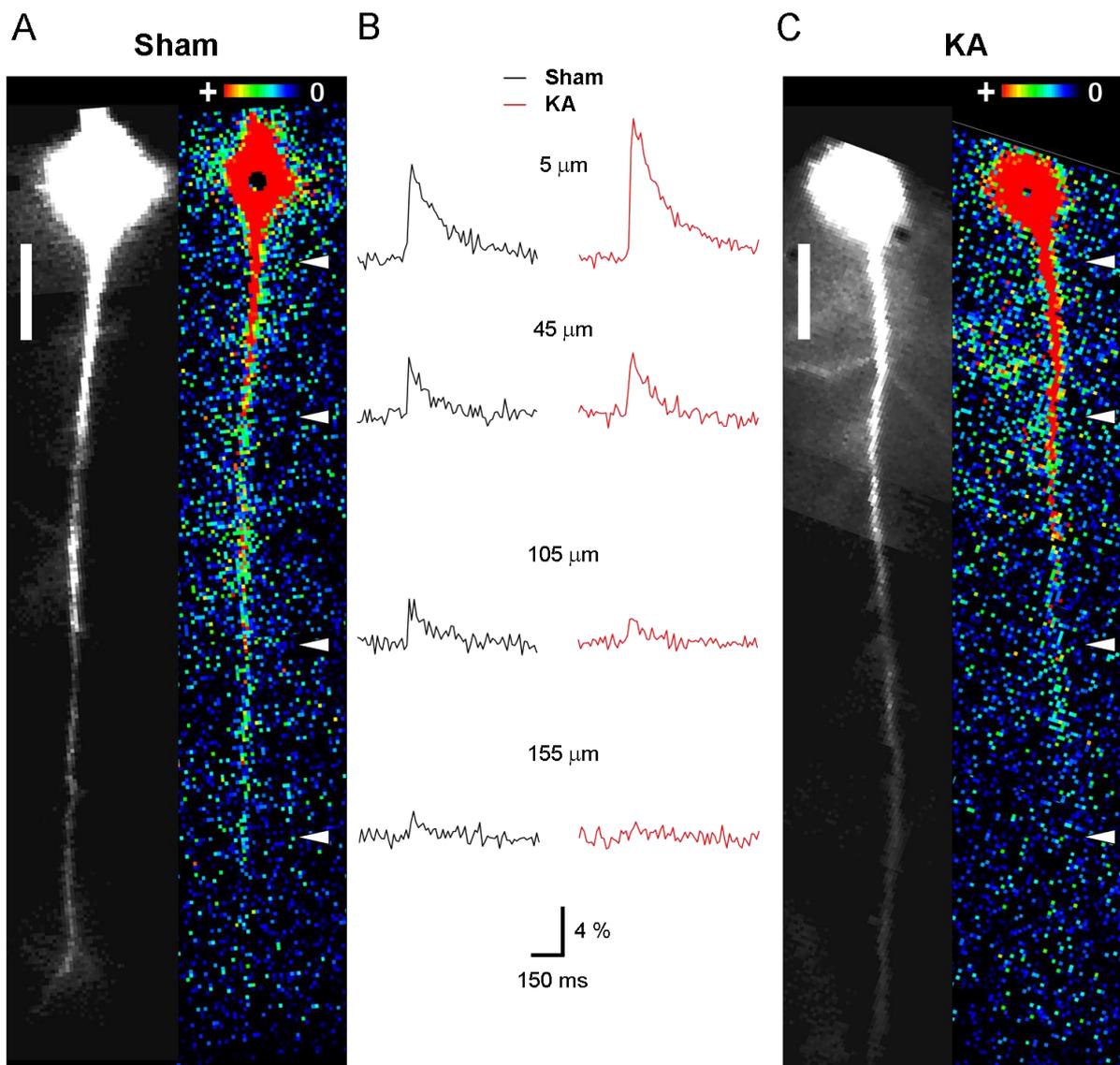


Abbildung 24: Beispiele von Fluoreszenz-Messungen an einer Sham- und einer KA-Zelle.

A: Grundfluoreszenz einer Sham-Zelle durch Füllung mit bis-Fura 2 im Ruhezustand (Schwarz-Weiß); rechts daneben: Darstellung der absoluten Fluoreszenz-Differenz derselben Zelle bei maximalem Ca^{2+} -Einstrom gegenüber dem Ruhezustand (farbig). Große Differenzen (+) sind in rot dargestellt, niedrigere Werte erscheinen in abfallender Reihenfolge in gelb > grün > blau > dunkelblau > schwarz (0). Die Distanzskalierung (weißer Balken) entspricht $25 \mu\text{m}$, weiße Pfeilspitzen weisen auf die Position der Beispielmesspunkte in B. **B:** Exemplarische Ca^{2+} -Transienten der Sham- und KA-Zelle aus A und C, gemessen in $5, 45, 105$ und $155 \mu\text{m}$ Abstand vom Soma. **C:** Vergleichend zu A: Grundfluoreszenz einer KA-Zelle und Fluoreszenz-Differenz durch den b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Einstrom.

der Fluoreszenz in Ruhe und bei maximaler Fluoreszenzabnahme während des Ca^{2+} -Einstroms zeigen (ΔF). Im Vergleich erscheinen die Intensitäten des Ca^{2+} -Signals im ersten Drittel des Apikaldendriten ($50 - 75 \mu\text{m}$ Abstand vom Soma) in der KA-Zelle größer als in der Sham-Zelle (Abb. 24A und C). Im Gegensatz dazu verschwindet das Ca^{2+} -Signal in der

KA-Zelle bereits bei einem Abstand vom Soma von ca. 130 μm , bleibt im Dendriten der Sham-Zelle jedoch bis ca. 170 μm vom Soma detektierbar. In Abbildung 24B sind vier ausgewählte prozentuale Ca^{2+} -Transienten ($\Delta\text{F}/\text{F}$ in %) der Zellen aus Abbildung 24A und C gezeigt. Im proximalen Dendritenabschnitt nahe dem Soma (5 μm) zeigte die KA-Zelle gegenüber der Sham-Zelle tatsächlich eine größere Ca^{2+} -Transiente. Dieser Unterschied relativierte sich mit einigem Abstand vom Soma (45 μm) und kehrte sich in weiter distal gelegenen Dendritenabschnitten um. Die b-AP-assoziierte Ca^{2+} -Transiente war in der KA-Zelle bei gleichem Abstand vom Soma (105 μm) nun kleiner als in der Sham-Zelle. Trotz ausreichender Grundfluoreszenz war bei 155 μm Abstand vom Soma in der KA-Zelle keine eindeutige Ca^{2+} -Transiente mehr zu erkennen, die Sham-Zelle zeigte dagegen eine kleine aber eindeutige Ca^{2+} -Transiente (vgl. Abb. 24B bei 155 μm).

3.3.2 Gesamtauswertung der Abschwächung b-AP-assoziiierter Ca^{2+} -Transienten in Sham- und KA-Zellen

In Abbildung 25A sind die gesammelten prozentualen Amplituden der Ca^{2+} -Transienten ($\Delta\text{F}/\text{F}$ in %) aller gemessenen Sham- und KA-Zellen aufgetragen (Sham: $n = 41$ zusammenhängende b-AP Messungen; KA: $n = 39$ zusammenhängende b-AP Messungen). An der Basis des Apikaldendriten (ROI bei 5 μm) betrug $\Delta\text{F}/\text{F}$ in KA-Zellen $11,1 \pm 1,1$ % gegenüber $9,5 \pm 0,5$ % in Sham-Zellen (Abb. 25A). Die Werte der KA-Zellen fielen von diesen unterschiedlichen Basiswerten zunächst steiler ab als die der Sham-Zellen, so dass sich die beiden Kurven bei etwa 25 μm Abstand vom Soma überkreuzten (Abb. 25A). Auch die weitere Abschwächung der Ca^{2+} -Transienten erfolgte in KA-Zellen stärker und vollständiger als in Sham-Zellen. Ab einem Abstand vom Soma von 75 μm lagen die Werte der KA-Zellen in etwa parallel unter denen der Sham-Zellen. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Daten der Einzel-Experimente in KA- und Sham-Zellen auf den jeweils ersten Messpunkt (5 μm) normiert (Abb. 25B; siehe Abschnitt 2.9.2.2). Die Kurve der gemittelten normierten Daten aller KA-Zellen fiel deutlich schneller ab als die Kurve der Sham-Zellen. Die normierten $\Delta\text{F}/\text{F}$ -Werte halbierten sich bei Sham-Zellen nach ca. 45 μm bei KA-Zellen schon nach 33 μm Abstand vom Soma. Die Strecke bis zur halben Signalstärke war demnach in den KA-Zellen etwa ein Viertel kürzer als in den Sham-Zellen. Bei 145 μm Abstand vom Soma entsprach die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten in der Sham-Gruppe noch $0,19 \pm 0,02$ des Ausgangswertes, bei den KA-Tieren nur noch $0,11 \pm 0,02$.

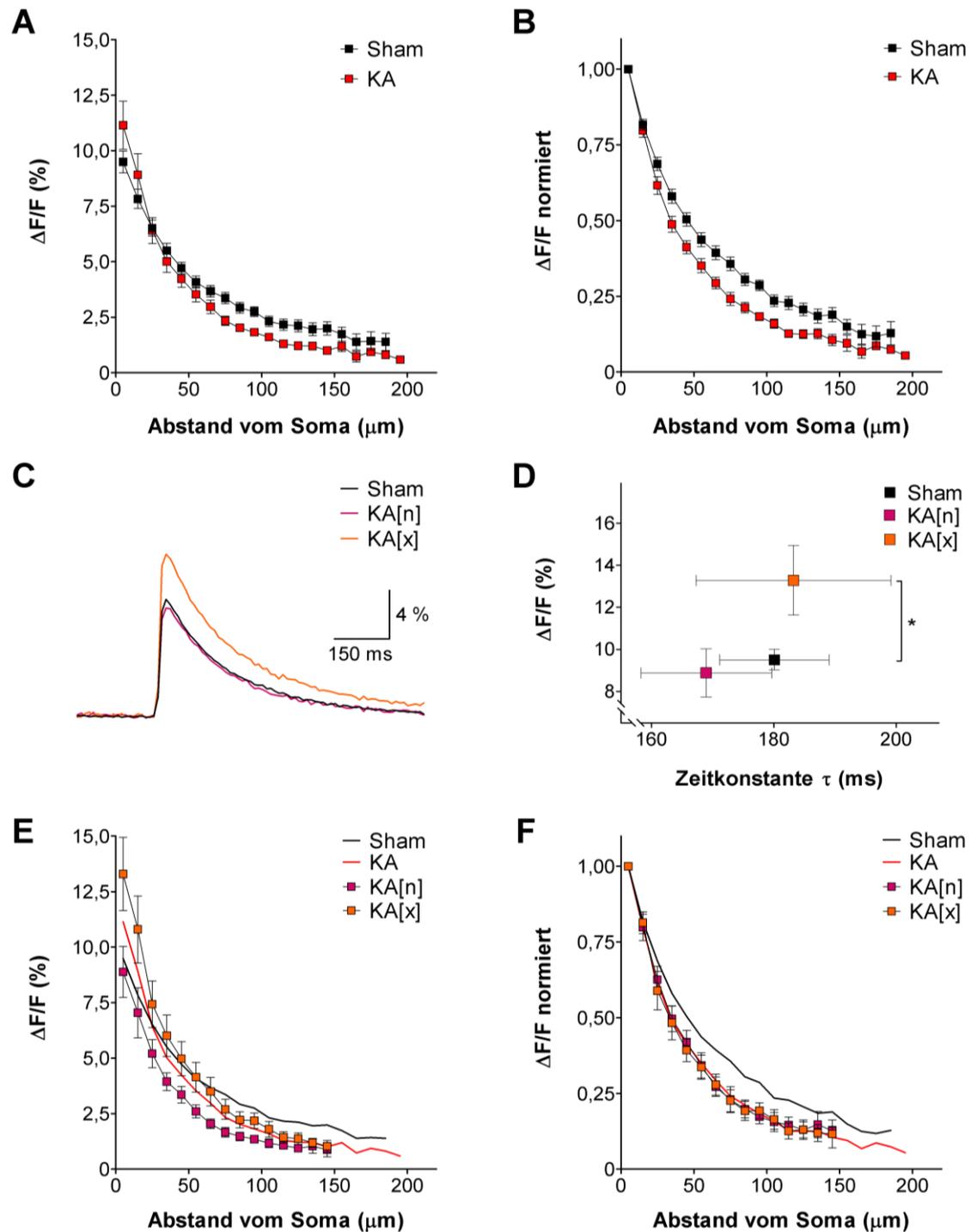


Abbildung 25: Abschwächung des b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Signals in Sham- und KA-Zellen.

A: Fluoreszenzänderung $\Delta F/F$ in % entlang des Apikaldendriten von KA- und Sham-Zellen. **B:** Fluoreszenzänderung der Zellen aus A, normiert auf den jeweils ersten Messpunkt, 5 μm vom Soma der Zelle entfernt. **C:** Gemittelte somanaher Ca^{2+} -Transienten (5 μm Abstand vom Soma) aller Sham-Zellen gegenüber KA[n] und KA[x]. **D:** Amplitude der somanahen Ca^{2+} -Transienten aus C gegen die Zeitkonstante τ des Rückgangs der Ca^{2+} -Transienten. **E:** Separate Darstellung der Fluoreszenzwerte ($\Delta F/F$ in %) von KA[n] und KA[x] im Vergleich zu allen KA- und Sham-Zellen aus A. **F:** Separate Darstellung der normierten Fluoreszenzwerte von KA[n] und KA[x] im Vergleich zu allen KA- und Sham-Zellen aus B. **A bis F:** Sham: $n = 41$; KA: $n = 39$; KA[n]: $n = 17$; KA[x]: $n = 12$ (eine separate Betrachtung der Daten von KA[n] und KA[x]-Zellen war bei 10 Fluoreszenz-Experimenten nicht möglich, da keine Einzel-APs gemessen wurden; Summe $n = 29$), * $p < 0,05$.

Insgesamt schien die b-AP-Abschwächung in CA1-Pyramidenzellen von KA-Tieren daher stärker ausgeprägt zu sein als in Zellen von Sham-Tieren.

Um mögliche Auswirkungen der beobachteten Unterschiede im Verlauf der somatischen APs von KA- und Sham-Zellen auf die b-AP-Abschwächung entlang des Apikaldendriten zu untersuchen, wurden die Fluoreszenzdaten der KA-Gruppe in die Untergruppen KA[n] und KA[x] aufgeteilt (vgl. Abschnitt 3.2.4). Für alle KA-Zellen, bei denen eine Messung des somatischen APs und ein folgendes Ca^{2+} -*Imaging*-Experiment durchgeführt wurde, konnte eine Korrelation zwischen der Abwesenheit des *notch* im AP der KA[x]-Zellen ($n = 12$ zusammenhängende b-AP Messungen, vgl. Abschnitt 3.2.4, Abb. 23D) und einer besonders großen Amplitude der somanahen Ca^{2+} -Transiente (ROI $5 \mu\text{m}$; $\Delta\text{F}/\text{F}$: $13,3 \pm 1,7 \%$, Abb. 25C und D) festgestellt werden. In KA[n]-Zellen, deren APs nach einem SE weiterhin einen *notch* zeigten, waren die somanahen Ca^{2+} -Transienten dagegen mit denen von Sham-Zellen identisch (Abb. 25C und D, KA[n]: $\Delta\text{F}/\text{F}$ $8,9 \pm 1,1 \%$, $n = 17$ zusammenhängende b-AP Messungen; Sham: $9,5 \pm 0,5 \%$, $n = 41$ zusammenhängende b-AP Messungen). Der Amplituden-Unterschied der somanahen Ca^{2+} -Transiente war zwischen Sham-Zellen und KA[x]-Zellen signifikant ($p < 0,05$), während der Amplituden-Unterschied zwischen Sham und KA[n] gering war ($p > 0,05$). Die Geschwindigkeit, mit der sich die Ca^{2+} -Transienten zurückbildeten (Zeitkonstante τ), war weder in KA[n]-Zellen noch in KA[x]-Zellen gegenüber den Sham-Zellen signifikant verändert (Sham: $180 \pm 9 \text{ ms}$, $n = 41$; KA[n]: $169 \pm 11 \text{ ms}$, $n = 17$, $p > 0,05$; KA[x]: $184 \pm 16 \text{ ms}$, $n = 12$, $p > 0,05$; Abb. 25D). In Abbildung 25E sind die Mittelwerte der prozentualen Ca^{2+} -Transienten entlang der Dendriten von KA[n] und KA[x] separat im Vergleich zu den Mittelwerten aller Sham- und KA-Zellen aus Abbildung 25A aufgetragen. Die mittleren Amplituden der Ca^{2+} -Transienten von KA[n]-Zellen lagen bereits somanah leicht unterhalb der Werte der Sham-Zellen (vgl. Abb. 25C und D) und unterliefen mit wachsendem Abstand vom Soma zunehmend die Werte der Sham-Zellen (Abb. 25E). Die Amplituden der KA[x]-Zellen lagen dagegen zu Beginn deutlich über den Werten der Sham-Zellen (vgl. Abb. 25C und D), fielen dann aber stärker ab und kreuzten die Kurve der Sham-Zellen bei einem Abstand vom Soma von $55 \mu\text{m}$ (Abb. 25E). Die Abschwächung der Ca^{2+} -Transienten war demnach sowohl in KA[n]-Zellen als auch in KA[x]-Zellen stärker ausgeprägt als in den Sham-Zellen. Die normierten Kurven der KA[n]- und KA[x]-Zellen waren daher mit der Kurve aller KA-Zellen deckungsgleich (Abb. 25F). Offenbar trugen KA[n]- und KA[x]-Zellen gleichermaßen zu der gegenüber

Sham-Zellen verstärkten Abschwächung b-AP-assoziierter Ca^{2+} -Transienten bei (vgl. Abb. 25B und F).

3.3.3 Statistische Betrachtung der Abschwächung b-AP-assoziierter Ca^{2+} -Transienten in Sham- und KA-Zellen

Um die Abschwächung der b-AP-assozierten Ca^{2+} -Transienten statistisch bewerten zu können, wurden die annähernd exponentiellen Verlaufskurven der normierten Ca^{2+} -Imaging-Daten durch Logarithmieren der einzelnen Messpunkte in einen linearen Zusammenhang gebracht. An die jeweiligen Daten einer Zelle wurde eine Regressionslinie angepasst. Mit dem Zahlenwert ihrer negativen Steigung konnte die Abschwächung der Ca^{2+} -Transienten in einer Zelle insgesamt bewertet werden (vgl. Abschnitt 2.9.2.2, Abb. 16). In Abbildung 26A sind Beispiele von linearisierten Daten einer Sham- und einer KA-Zelle zu sehen.

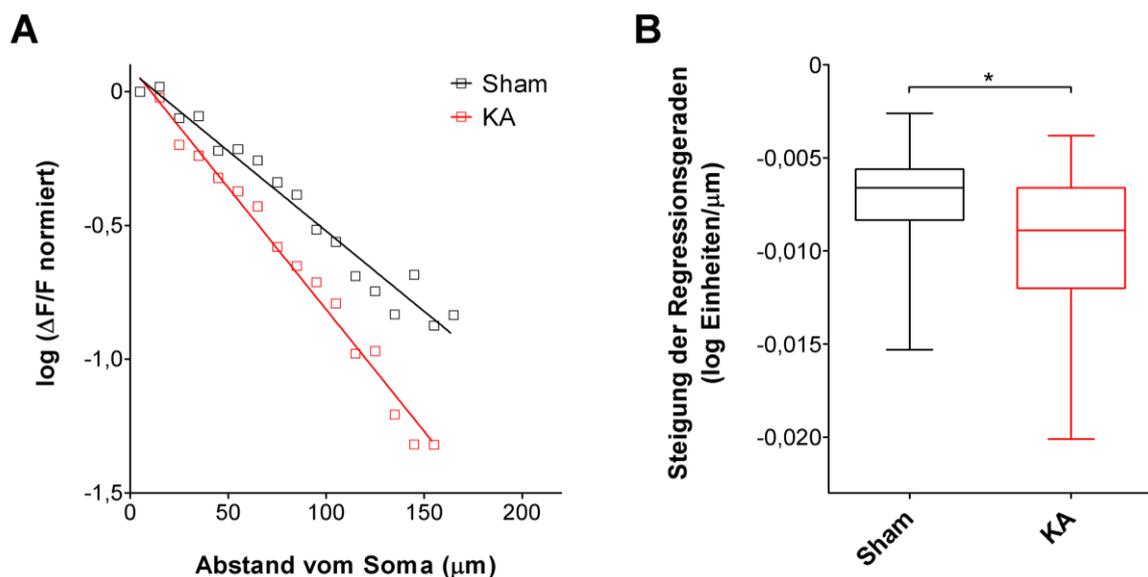


Abbildung 26: Statistische Auswertung der Abschwächung von b-AP-assozierten Ca^{2+} -Transienten in Sham- und SE-Zellen mit Hilfe von logarithmierten Fluoreszenzdaten.

A: Beispiele von linearisierten Daten, die durch Logarithmieren der normierten Fluoreszenzdaten einer Sham- und einer KA-Zelle hergeleitet wurden. Das Wertegefälle der KA-Zelle war steiler als das der Sham-Zelle. **B:** Box-Diagramm der statistischen Auswertung: das Rechteck wird jeweils nach oben und unten durch die Quantile begrenzt und vom Median in zwei Teile geteilt, die verlängerten Antennen stehen für die jeweiligen Extremwerte der Datensätze. * $p < 0,05$; Sham: $n = 41$; KA: $n = 39$.

Tabelle 8: Regressionsgerade der Ca²⁺-Signal-Abschwächung (Arithmetische Mittelwerte)

	Steigung der Regressionsgeraden (log Einheiten/ μm)	SE-Profil-Integral (WE)	Zellzahl (n)
Sham	$-0,00711 \pm 0,00045$ *		41
KA	$-0,00934 \pm 0,00058$ *	vgl. Tab. 6	39
KA[n]	$-0,00981 \pm 0,00094$ *	518 ± 27	17 ‡
KA[x]	$-0,00970 \pm 0,00117$ *	577 ± 11	12 ‡

* $p < 0,05$ gegenüber Sham; ‡ Bei 10 *Imaging*-Experimenten wurde kein AP-Verlauf gemessen ($\sum n = 29$).

Die gegenüber der Sham-Zelle stärkere Signal-Abschwächung kam in der KA-Zelle in einem wesentlich steileren Gefälle der logarithmierten Werte zum Ausdruck. Die Werte aller KA- und Sham-Zellen waren insgesamt signifikant unterschiedlich (arithmetisches Mittel, $p < 0,05$; vgl. Tab. 8). In Abbildung 26B sind weitere relevante Parameter der statistischen Auswertung der Regressionsgeraden aller Sham- und KA-Zellen in einem so genannten Box-Diagramm zusammengefasst. Die Streuung der Daten in beiden Gruppen war asymmetrisch verteilt, die Extremwerte (Antennen) und Quantile waren in Sham- und KA-Zellen jeweils in Richtung steilerer Regressionsgeraden, die für eine besonders starke Ca²⁺-Signal-Abschwächung stehen, stärker ausgeprägt. Die KA-Gruppe zeigte allerdings häufiger als die Sham-Gruppe solche steilen Regressionswerte. Die oberen Antennen des Box-Diagramms in der KA-Gruppe ähnelten dagegen den Antennen der Sham-Gruppe. Ähnlich wie bei den Eigenschaften einzelner APs könnte es zu einer unterschiedlich starken Ausprägung der KA-Effekte auf die Abschwächung b-AP-assoziiertes Ca²⁺-Transienten in einzelnen Zellen eines KA-Tieres gekommen sein (vgl. Abschnitt 3.2.4). Eine Korrelation zur äußerlichen Ausprägung der Anfallsschwere eines Tieres (Integral des SE-Profiles) oder der Anwesenheit des *notch* im AP der entsprechenden Zelle konnte jedoch nicht hergestellt werden (Tab. 8).

3.4 Pharmakologische Beeinflussungen der AP-Dynamik von CA1-Pyramidenzellen

Um den $K_{v4.2}$ -vermittelten I_{SA} in CA1-Pyramidenzellen zu beeinflussen, wurden der A-Typ-Kanal-Blocker 4-Aminopyridin (4-AP; Camerino *et al.*, 2007) und die K_{v4} -potenzierende Substanz NS5806 (N-[3,5-bis(Trifluoromethyl)Phenyl]-N'-[2,4-Dibromo-6-(1H-Tetrazol-5-yl)Phenyl]-Harnstoff; Calloe *et al.*, 2009) verwendet. Die potenzierende Wirkung von NS5806 auf K_{v4} -vermittelte Ströme wurde bisher in heterologen Systemen und kardialen Myozyten beschrieben (Calloe *et al.*, 2009; Calloe *et al.*, 2010; Lundby *et al.*, 2010; Calloe *et al.*, 2011). Die Wirkung von NS5806 auf hippocampale CA1-Pyramidenzellen wurde dagegen bislang nicht untersucht. Im Fokus der pharmakologischen Untersuchungen standen mögliche Veränderungen in der b-AP-Abschwächung entlang des Apikaldendriten durch NS5806. Der Verlauf einzelner somatischer APs wurde auf ähnliche Weise, jedoch in einem geringeren Umfang als akut nach einem KA-induzierten SE untersucht (Abschnitt 2.9.1.4; vgl. Abschnitt 3.2)

3.4.1 Effekte von NS5806 auf somatische APs

Einzelne APs wurden in den CA1-Pyramidenzellen durch knapp überschwellige Depolarisationen nach kurzen Strominjektionen ausgelöst (4 ms; vgl. Abschnitt 2.7.3, Abb. 9). Anders als in Sham- und KA-Zellen wurde das Membranpotenzial wenn nötig durch ausgleichende Strominjektionen auf -70 mV voreingestellt. Unter Kontrollbedingungen waren Glutamatrezeptor-Blocker in der Badlösung vorhanden (10 μ M CNQX / 50 μ M AP5; Abschnitt 2.8). Die Messungen wurden 5 und 10 Minuten nach Zugabe von 20 μ M NS5806 durchgeführt.

3.4.1.1 Veränderung von AP-Aufstrich, -Amplitude und -Breite durch NS5806

In Abbildung 27A sind einzelne APs einer Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten der NS5806 Einwirkung dargestellt. Obwohl sich die Trajektorie bis zur AP-Schwelle durch die NS5806-Zugabe offenbar nicht veränderte, wurde unter NS5806-Einwirkung zur AP-Induktion eine etwas geringere Strominjektion als zuvor unter Kontrollbedingungen benötigt (Kontrolle: 290 ± 82 pA, $n = 4$; 5 Minuten NS5806: 231 ± 80 pA, $n = 4$; 10 Minuten NS5806: 235 ± 75 pA, $n = 4$, p gegenüber Kontrolle = 0,212; Abb. 27B). Die Steigung der

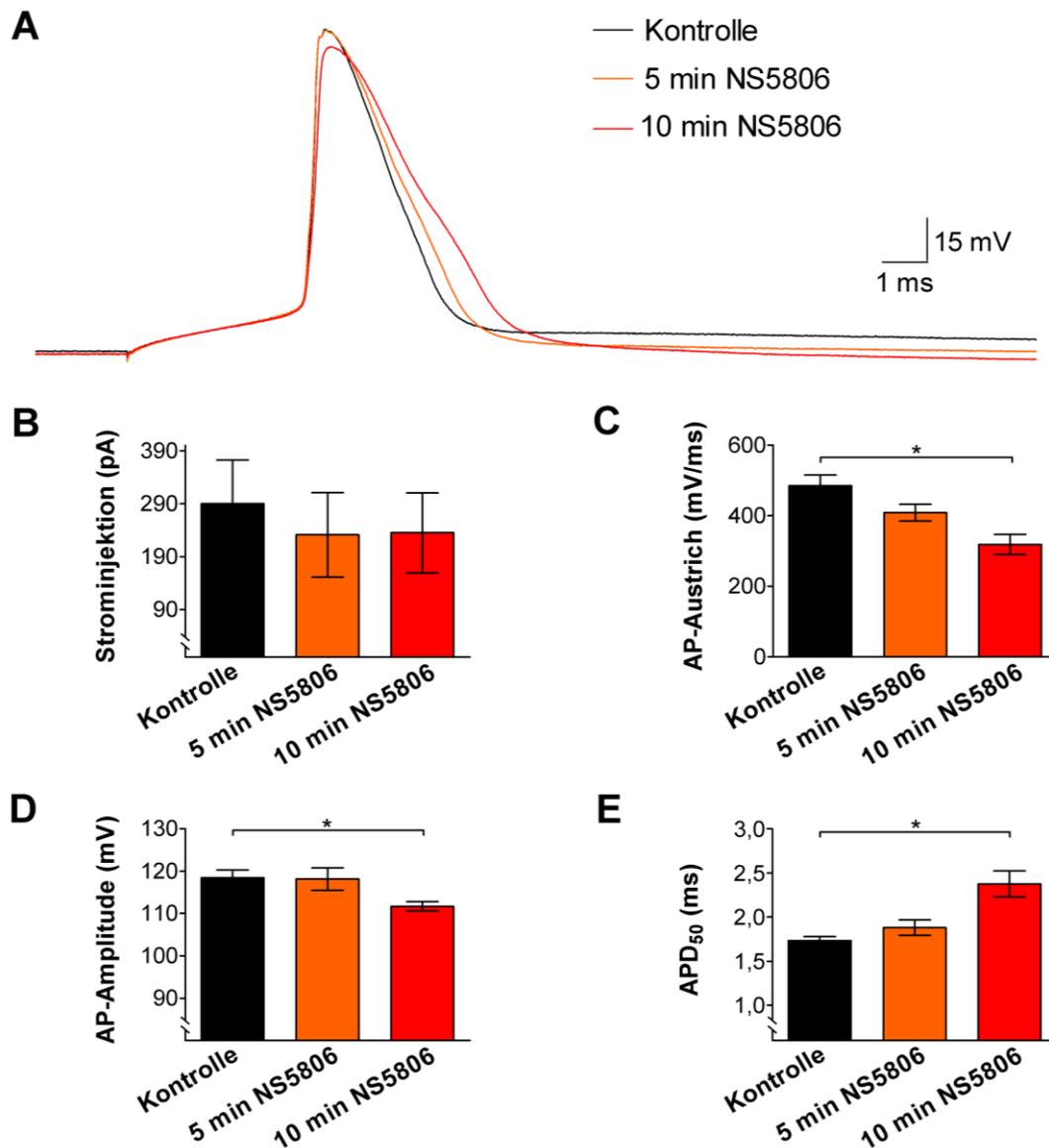


Abbildung 27: Veränderungen des AP-Verlaufs durch NS5806.

A: Somatische APs einer Zelle unter Kontrollbedingungen (10 μ M CNQX / 50 μ M AP5) und 5 bzw. 10 Minuten nach Zugabe von 20 μ M NS5806. **B:** Die nötige Strominjektion bis zur AP-Entstehung war nach 5 bzw. 10 Minuten NS5806 nicht signifikant verändert. **C:** Die Steilheit der AP-Aufstrichphase nahm nach 10 Minuten NS5806 signifikant ab. **D:** Die absolute AP-Amplitude ging nach 10 Minuten NS5806 signifikant zurück. **E:** Die APD₅₀ nahm nach 10 Minuten mit NS5806 signifikant zu. **B-E:** Es wurde ein gepaarter t-Test zwischen Kontrolle und 10 Minuten NS5806 verwendet: * $p < 0,05$; Kontrolle: $n = 4$; NS5806: $n = 4$.

AP-Aufstrichphase war nach 5 Minuten NS5806-Einwirkung zunächst gegenüber der Kontrolle unverändert jedoch nach 10 Minuten NS5806 signifikant flacher (Kontrolle: 485 ± 30 mV/ms, $n = 4$; 5 Minuten NS5806: 408 ± 24 mV/ms, $n = 4$; 10 Minuten NS5806: 319 ± 28 mV/ms, $n = 4$, p gegenüber Kontrolle = 0,049; Abb. 27A und C). Die zeitliche

Entwicklung der Effekte von NS5806 auf die AP-Amplitude waren ähnlich: Die AP-Amplitude war nach 5 Minuten NS5806-Einwirkung unverändert aber nach 10 Minuten signifikant kleiner als in der Kontrolle (Abb. 27A und D; Kontrolle: 118 ± 2 mV, $n = 4$; 5 Minuten NS5806: 118 ± 3 mV, $n = 4$; 10 Minuten NS5806: 111 ± 1 mV, $n = 4$, gegenüber Kontrolle $p = 0,004$). Eine zeitliche Steigerung der NS5806-Wirkung auf das AP der Zellen bestätigte sich auch bei der AP-Breite. Sie nahm gegenüber der Kontrolle nach 5 Minuten NS5806 zunächst nur wenig, nach 10 Minuten jedoch deutlich zu (Abb. 27A). Dementsprechend war die APD_{50} nach 5 Minuten Wirkdauer von NS5806 nur minimal verlängert, aber nach 10 Minuten signifikant größer als in der Kontrolle (Abb. 27E; Kontrolle: $1,74 \pm 0,04$ ms, $n = 4$; 5 Minuten NS5806: $1,88 \pm 0,09$ ms, $n = 4$; 10 Minuten NS5806: $2,38 \pm 0,15$ mV, $n = 4$, gegenüber Kontrolle $p = 0,015$).

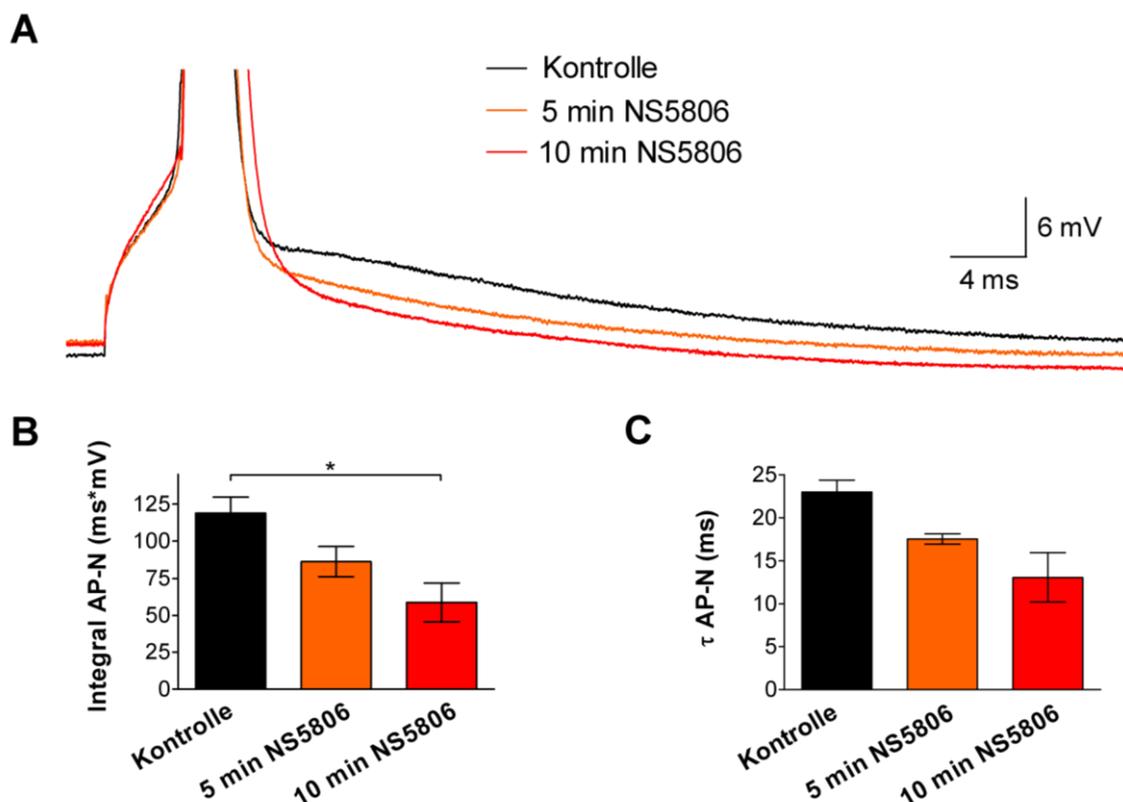


Abbildung 28: Veränderungen der AP-N durch NS5806.

A: AP-N in einer Zelle unter Kontrollbedingungen ($10 \mu\text{M}$ CNQX / $50 \mu\text{M}$ AP5) und 5 bzw. 10 Minuten nach Zugabe von $20 \mu\text{M}$ NS5806. **B:** Das Integral der AP-N nahm nach 10 Minuten NS5806 signifikant ab. **C:** Die Zeitkonstante τ AP-N wurde nach 5 und 10 Minuten NS5806 tendenziell kleiner als in der Kontrolle. **B** und **C:** Es wurde ein gepaarter t-Test zwischen Kontrolle und 10 Minuten NS5806 verwendet: * $p < 0,05$; Kontrolle: $n = 4$; NS5806: $n = 4$.

3.4.1.2 Veränderung der AP-N durch NS5806

Abbildung 28A zeigt den Ausschnitt der AP-N einzelner APs einer CA1-Pyramidenzelle in der Kontrollsituation und nach 5 bzw. 10 Minuten in Gegenwart von 20 μM NS5806. Dabei war schon nach 5 Minuten NS5806-Einwirkdauer ein moderater Rückgang der AP-N zu erkennen, der nach 10 Minuten jedoch noch stärker sichtbar wurde. In der Gesamtauswertung des Integrals von AP-N waren die Werte nach 5 Minuten um mehr als ein Viertel reduziert und nach 10 Minuten gegenüber der Kontrolle signifikant unterschiedlich (Abb. 28B; Kontrolle: 119 ± 11 ms, $n = 4$; 5 Minuten NS5806: $86,2 \pm 10,1$ ms, $n = 4$; 10 Minuten NS5806: $58,7 \pm 13,2$ mV, $n = 4$, gegenüber Kontrolle $p = 0,002$). In der Gesamtauswertung der Zeitkonstante τ der AP-N waren die Werte dagegen nach 5 Minuten etwas weniger als ein Viertel reduziert und auch nach 10 Minuten NS5806 Einwirkung nicht signifikant kleiner als in der Kontrolle (Abb. 28C; Kontrolle: $23,0 \pm 1,4$ ms, $n = 4$; 5 Minuten NS5806: $17,5 \pm 0,6$ ms, $n = 4$; 10 Minuten NS5806: $13,1 \pm 2,9$ ms, $n = 4$, gegenüber Kontrolle $p = 0,075$). Insgesamt wurde die AP-N durch 20 μM NS5806 innerhalb von 10 Minuten jedoch so stark reduziert, dass am Ende des AP-Abstrichs kein Wiederanstieg des Membranpotenzials mehr zu beobachten war (Abb. 28A).

3.4.2 Effekte von 4-AP und NS5806 auf die Abschwächung b-AP-assoziierter Ca^{2+} -Transienten

Das Beispiel in Abbildung 29A und B zeigt eine CA1-Pyramidenzelle unter Kontrollbedingungen (10 μM CNQX und 50 μM AP5) und nach Zugabe des A-Typ-Kanal-Blockers 4-AP (5 mM). Dabei sind jeweils die absoluten Differenzen zwischen der Ruhe-Fluoreszenz und der maximalen Fluoreszenz-Abnahme während des b-AP-assozierten Ca^{2+} -Einstroms dargestellt (vgl. Abschnitt 3.3.1, Abb. 24). Während in der Kontrolle die Intensität des Ca^{2+} -Signals entlang des Dendriten graduell abnahm, war die Abschwächung des Signals nach 4-AP-Zugabe drastisch verringert (Abb. 29A und B). In der Kontrolle war das Ca^{2+} -Signal bis zu einem Abstand vom Soma von ca. 235 μm detektierbar und mit 4-AP bis zu einem Abstand vom Soma von ca. 285 μm (vgl. Abb. 29A und B). In Abbildung 29C sind vier exemplarische Ca^{2+} -Transienten ($\Delta\text{F}/\text{F}$ in %) der CA1-Pyramidenzelle aus Abbildung 29A und B mit Abständen zwischen 5 und 165 μm vom Soma dargestellt. Unter Kontrollbedingungen war die kontinuierliche Abnahme der Ca^{2+} -Transienten zu erkennen. Sie verringerte sich von 10,2 % (5 μm) bis auf 5,4 % (165 μm).

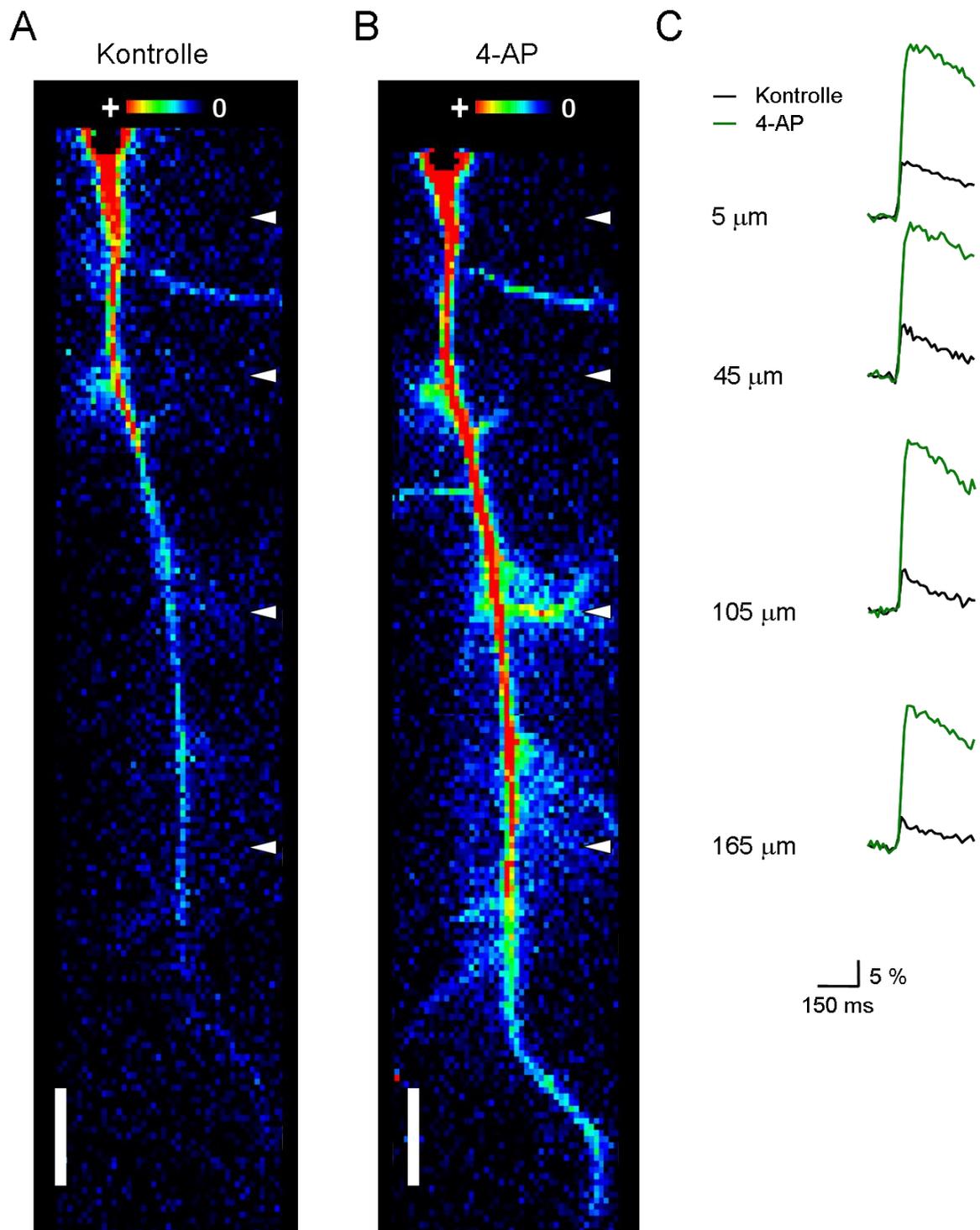


Abbildung 29: Beispiel einer Fluoreszenzmessung unter Beeinflussung durch 4-AP.

A und B: Darstellung der Fluoreszenz-Differenz bei maximalem Ca²⁺-Einstrom gegenüber dem Ruhezustand für eine CA1-Pyramidenzelle unter Kontrollbedingungen (10 μM CNQX / 50 μM AP5) und unter Einfluss von zusätzlich 5 mM 4-AP. Große Differenzen (+) sind in rot dargestellt, niedrigere Werte erscheinen in abfallender Reihenfolge in gelb > grün > blau > dunkelblau > schwarz (= 0). Die Distanzskalierung (weißer Balken) entspricht 25 μm; weiße Pfeilspitzen weisen auf die Position der Beispielmesspunkte in C.

C: Exemplarische Ca²⁺-Transienten der Zelle aus A und B, gemessen in 5, 45, 105 und 165 μm Abstand vom Soma. Die b-AP-Abschwächung im Dendriten der CA1-Pyramidenzelle war unter 4-AP-Einfluss offenbar sehr viel weniger ausgeprägt.

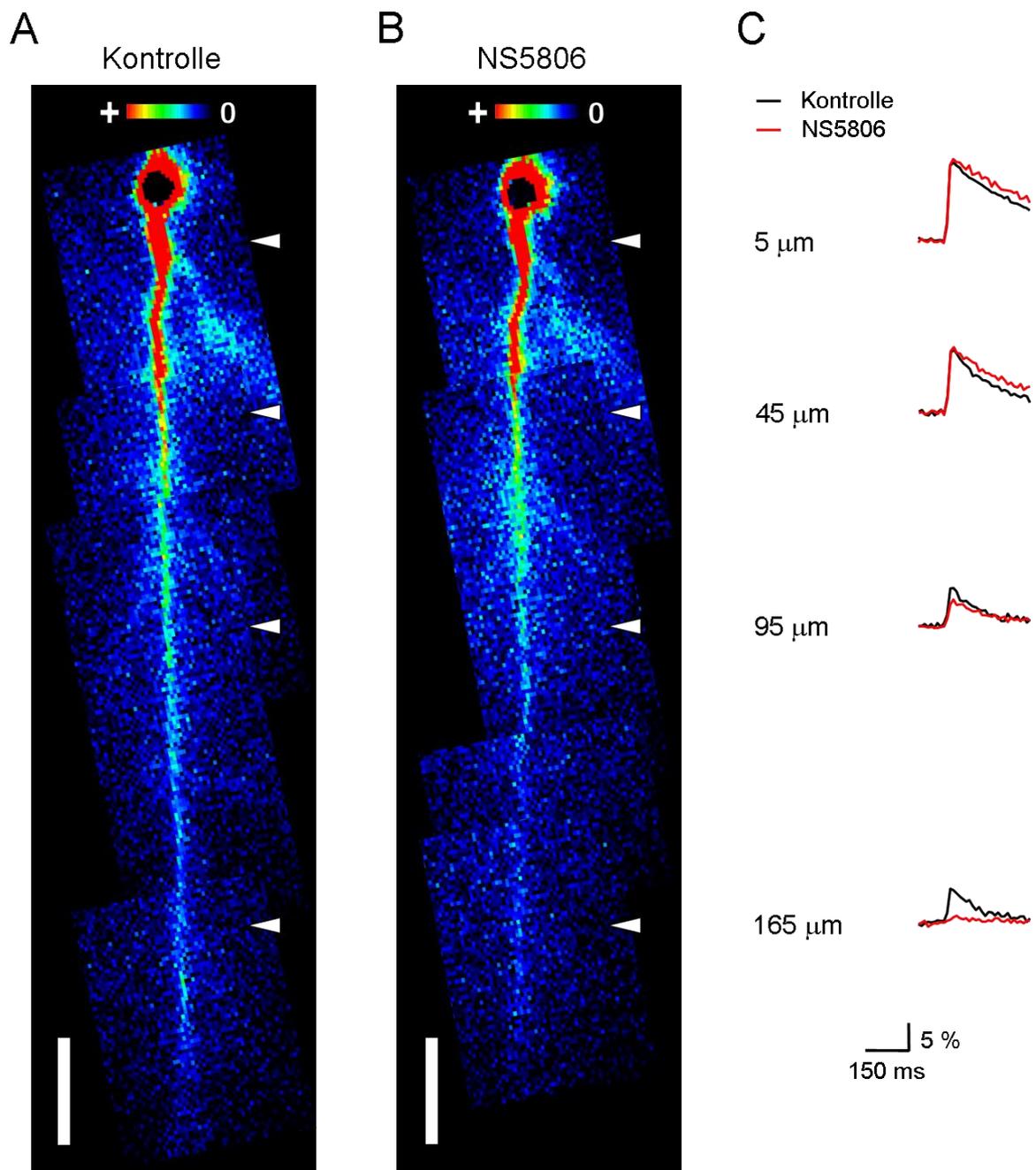


Abbildung 30: Beispiel einer Fluoreszenzmessung unter Beeinflussung durch NS5806.

A und **B**: Darstellung der Differenz der Fluoreszenz bei maximalem Ca^{2+} -Einstrom gegenüber dem Ruhezustand für eine gesamte CA1-Pyramidenzelle unter Kontrollbedingungen (10 μM CNQX / 50 μM AP5) und unter Einfluss von zusätzlich 20 μM NS5806. Große Differenzen (+) sind rot dargestellt, niedrigere Werte in gelb > grün > blau > dunkelblau > schwarz (= 0). Die Distanzskalierung (weißer Balken) entspricht 25 μm ; weiße Pfeilspitzen weisen auf die Position der Beispielmesspunkte in **C**. **C**: Exemplarische Ca^{2+} -Transienten der Zelle aus **A** und **B**, gemessen bei 5, 45, 105 und 165 μm Abstand vom Soma. Die b-AP-Abschwächung im Dendriten der CA1-Pyramidenzelle war unter NS5806-Einfluss offenbar stärker ausgeprägt.

Unter Einfluss von 4-AP war diese Abnahme der Ca^{2+} -Transienten weitgehend aufgehoben (31,9 %, 5 μm und 25,8 %, 165 μm). Die Zugabe von 4-AP führte demnach zu einem insgesamt größeren somatodendritischen Ca^{2+} -Einstrom und vermutlich zu einer drastisch verringerten b-AP-Abschwächung im Apikaldendriten von CA1-Pyramidenzellen.

In Abbildung 30A und B sind die Fluoreszenz-Differenzwerte während des b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Einstroms in einer CA1-Pyramidenzelle unter Kontrollbedingungen (CNQX und AP5) und nach Zugabe von 20 μM NS5806 dargestellt (vgl. Abb. 29A und B). In der Kontrolle kam es zu der typischen graduellen Abnahme des Ca^{2+} -Signals entlang des Apikaldendriten. Die Zugabe von NS5806 führte zu einer deutlichen Verstärkung dieser graduellen Signal-Abschwächung. Dadurch war das Signal mit NS5806 bereits bei einem Abstand vom Soma von ca. 130 μm nur noch sehr schwach ausgeprägt, wohingegen es zuvor in der Kontrolle bis zu einem Abstand von ca. 200 μm vorhanden war (Abb. 30A gegenüber 30B). In Abbildung 30C sind vier Fluoreszenzkurven von Messpunkten am Apikaldendriten der CA1-Pyramidenzelle aus Abbildung 30A und B mit Abständen zwischen 5 und 165 μm vom Soma dargestellt (vgl. Abb. 29C). Das Fluoreszenzsignal zeigte in der Kontrolle eine kontinuierliche Abnahme von 13,5 % (5 μm) bis auf 3,7 % (165 μm). Nach der Zugabe von NS5806 war die Abnahme der Ca^{2+} -Transienten stärker ausgeprägt (von 14,1 % bei 5 μm auf 1,5 % bei 165 μm). Dabei war das Signal mit NS5806 gegenüber der Kontrollbedingung nahe dem Soma und im proximalen Dendriten weitgehend unverändert (Abb. 30C, 5 und 45 μm). Im weiter distal gelegenen Dendritenabschnitt (95 μm) lagen die Werte mit NS5806 jedoch bereits unter denen der Kontrolle. Bei 165 μm Abstand vom Soma war die Ca^{2+} -Transiente mit NS5806 kaum noch von der Fluoreszenz in Ruhe zu unterscheiden, während unter Kontrollbedingungen zuvor ein deutlicher Ca^{2+} -Einstrom stattfand. Die Zugabe von NS5806 führte demnach vor allem in weiter distal gelegenen Abschnitten des Apikaldendriten von CA1-Pyramidenzellen zu einem geringeren b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Einstrom und lässt auf eine insgesamt verstärkte b-AP-Abschwächung schließen.

In Abbildung 31A sind alle gemittelten prozentualen Fluoreszenzsignale ($\Delta\text{F}/\text{F}$ in %) für Kontrolle, mit 4-AP und mit NS5806 zusammenfassend dargestellt. Die Gesamtauswertung

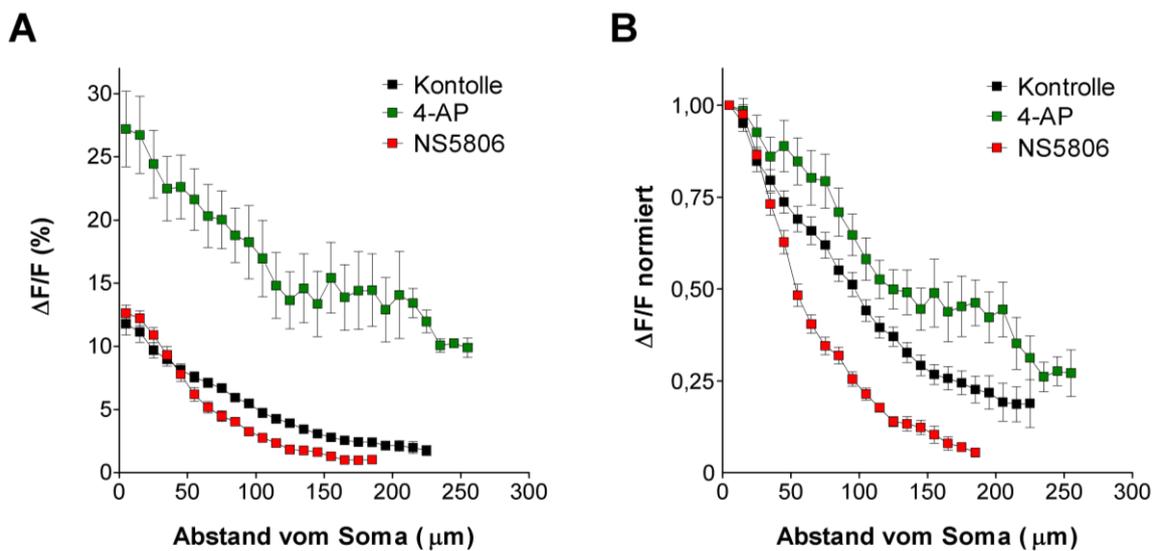


Abbildung 31: Durch 4-AP und NS5806 veränderte Abschwächung des b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Signals in CA1-Pyramidenzellen.

A: Fluoreszenzänderung $\Delta F/F$ in % entlang des Apikaldendriten von Zellen unter Kontrollbedingungen (10 μM CNQX / 50 μM AP5) bzw. mit zusätzlichen 5 mM 4-AP oder 20 μM NS5806. **B:** Fluoreszenzänderung der Zellen aus **A**, normiert auf den jeweils ersten Messpunkt, 5 μm vom Soma der Zelle entfernt. **A** und **B:** Die b-AP-Abschwächung war mit 4-AP gegenüber der Kontrolle weitgehend gehemmt, mit NS5806 dagegen stärker ausgeprägt. Kontrolle: $n = 36$; 4-AP: $n = 15$; NS5806: $n = 15$.

beinhaltet dabei auch Experimente, bei denen die Fluoreszenzmessung nur unter NS5806- oder 4-AP-Bedingungen ohne vorherige Kontrollmessung durchgeführt wurde (vgl. Abschnitt 2.8). In den Kontrollmessungen lagen die somanahen Werte (5 μm) bei $11,8 \pm 0,9 \%$ ($n = 36$ zusammenhängende b-AP Messungen), mit NS5806 leicht darüber ($12,6 \pm 0,6 \%$, $n = 15$ zusammenhängende b-AP Messungen, p gegenüber Kontrolle $> 0,05$) und mit 4-AP mehr als doppelt so hoch ($27,2 \pm 3 \%$, $n = 15$ zusammenhängende b-AP Messungen, p gegenüber Kontrolle $< 0,001$). Mit zunehmender Entfernung vom Soma zeigten die nachfolgenden Werte mit 4-AP bzw. NS5806 eine unterschiedlich ausgeprägte Abschwächung. Mit 4-AP war eine Ca^{2+} -Signal-Abschwächung sichtbar, jedoch waren die Werte jederzeit stark gegenüber der Kontrolle erhöht. So lagen die durchschnittlichen 4-AP Werte beim größten Abstand vom Soma (255 μm) mit $9,9 \pm 0,8 \%$ immer noch im Bereich der somanahen Fluoreszenzänderung (5 μm) der Kontrolle. Die anfänglich gegenüber der Kontrolle leicht erhöhten Werte mit NS5806 wurden entlang des Dendriten stärker abgeschwächt als in der Kontrolle, so dass sich beide Kurven bei ca. 45 μm Abstand vom Soma überkreuzten. Bei einem Abstand vom Soma zwischen 55 μm und 185 μm verliefen

die Werte mit NS5806 dann parallel unterhalb der Kontrollwerte. Um die Abschwächung der b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Transienten entlang des Dendriten besser bewerten zu können, wurden (wie bei der SE-Analyse, siehe Abschnitt 3.3.2) alle Datenpunkte der einzelnen Zellen jeweils auf den ersten Messpunkt normiert (5 μm ; Abschnitt 2.9.2.2). Die gemittelten Werte der drei Gruppen fielen ausgehend vom Maximalwert bei 5 μm Abstand vom Soma annähernd exponentiell entlang des Dendriten ab (Abb. 31B). Der Abfall der Werte war mit NS5806 gegenüber der Kontrollsituation insgesamt steiler, der Unterschied trat dabei ab einem Abstand vom Soma von etwa 50 μm besonders stark zutage. Mit 4-AP war der Abfall der Werte dagegen flacher als in der Kontrolle. Auch die Distanz, innerhalb der sich das Fluoreszenzsignal entlang der Dendritenachse halbierte, war verschoben. In der Kontrolle war eine Signalstärke von 0,5 bei ca. 95 μm Abstand vom Soma erreicht. Mit NS5806 halbierte sich die Signalstärke dagegen schon bei ca. 60 μm und mit 4-AP erst bei 130 μm Abstand vom Soma (Abb. 31B).

Um die Unterschiede in der Abschwächung der b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Transienten auf Signifikanz zu überprüfen, wurden die normierten Werte (wie bei der SE-Analyse, siehe Abschnitt 3.3.3) logarithmiert und auf diese Weise linearisiert (vgl. Abschnitt 2.9.2.2). Durch eine lineare Regression konnte jeder Zelle ein Steilheitswert für die Ca^{2+} -Signal-Abschwächung zugeordnet werden (Abb. 32A). Die jeweiligen Steilheitswerte (in log Einheiten/ μm) ließen sich statistisch vergleichen. Das arithmetische Mittel der Steigung in Kontrollzellen ($-0,00454 \pm 0,00027$, $n = 36$) unterschied sich signifikant von der Steigung unter 4-AP-Einfluss ($-0,00340 \pm 0,00028$, $n = 15$, p gegenüber Kontrolle $< 0,05$) und nach NS5806-Zugabe ($-0,00759 \pm 0,00041$, $n = 15$, p gegenüber Kontrolle $< 0,001$). In Abbildung 32B ist die weitere statistische Auswertung dieser Unterschiede als Box-Diagramm dargestellt. Trotz der enormen Unterschiede zwischen den prozentualen Werten der Kontrolle und 4-AP (vgl. Abb. 31A) zeigte die Auswertung mit Hilfe der logarithmierten Daten, dass der Unterschied in der Signal-Abschwächung zwischen Kontrolle und NS5806 stärker ausgeprägt war als zwischen Kontrolle und 4-AP (Abb. 32A,B). Die Streuung der Daten war in der Kontroll- und 4-AP-Gruppe annähernd symmetrisch verteilt (Quantile und Antennen in Abb. 32B). Mit NS5806 waren die Regressionsgeraden dagegen häufiger besonders steil und die Daten daher asymmetrisch verteilt. Die unteren Antennen der

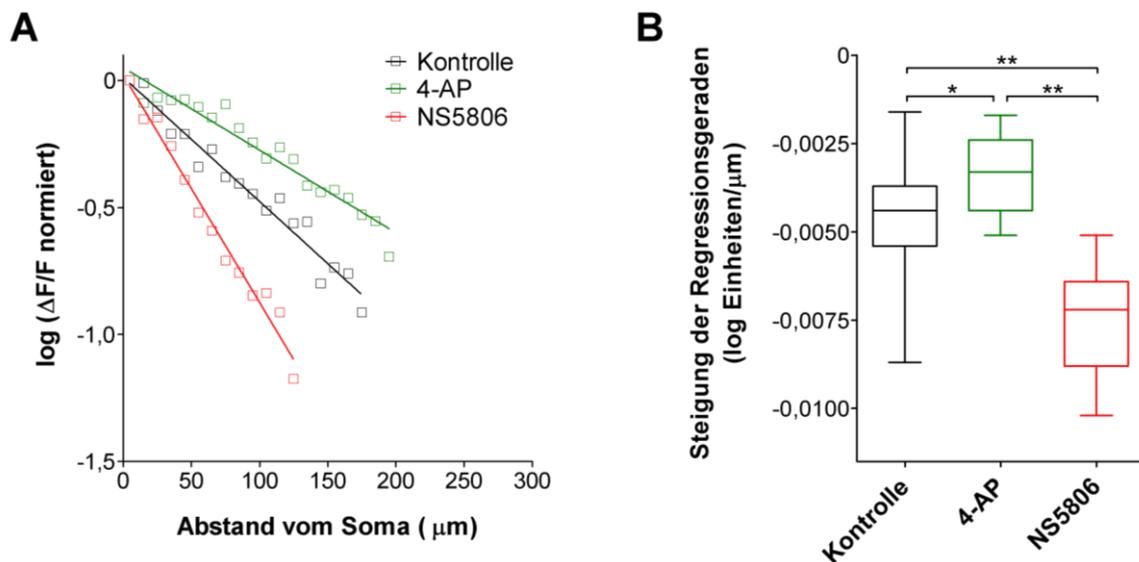


Abbildung 32: Statistische Auswertung der pharmakologisch beeinflussten b-AP-Abschwächung mit Hilfe von logarithmierten Fluoreszenzdaten.

A: Beispiele von linearisierten Daten, die durch Logarithmieren der normierten Fluoreszenzdaten einer Zelle unter Kontrollbedingungen bzw. je einer Zelle unter Einfluss von 4-AP oder NS5806 hergeleitet wurden. **B:** Box-Diagramm der statistischen Auswertung: die Rechtecke werden jeweils nach oben und unten durch die Quantile begrenzt und vom Median in zwei Teile geteilt, die Antennen stehen für die jeweiligen Extremwerte der Datensätze. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; Kontrolle: $n = 36$; 4-AP: $n = 15$; NS5806: $n = 15$

NS5806-Gruppe lagen daher deutlich außerhalb des Gesamtbereichs der Kontrollwerte. Insgesamt führte der A-Typ-Kanal-Blocker 4-AP wie erwartet offenbar zu einer weniger starken b-AP-Abschwächung im Apikaldendriten von CA1-Pyramidenzellen. Unter Einfluss von NS5806 kam es dagegen vermutlich zu einer Verstärkung dieser b-AP-Abschwächung. Dies deutet darauf hin, dass durch NS5806 die physiologische Funktion des $K_v4.2$ -vermittelten I_{SA} verstärkt wurde. In diesem Punkt besteht eine Übereinstimmung zu der verstärkten Ca^{2+} -Signal-Abschwächung, die in CA1-Pyramidenzellen nach einem KA-induzierten SE beobachtet wurde (Abschnitt 3.3). Dies könnte bedeuten, dass auch in diesem Fall eine Verstärkung der I_{SA} -Funktion in KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen stattgefunden hat und die b-AP-Abschwächung stärker ausgeprägt war.

4 Diskussion

4.1 Epilepsie-Modelle

Es gibt viele verschiedene klinische Formen von neuronaler Übererregbarkeit und chronischer Epilepsie (Berg *et al.*, 2010; Capovilla *et al.*, 2009), zu deren Erforschung jeweils geeignete Tier-Modelle verfügbar sind (Pitkänen *et al.*, 2007). Dabei werden in diesen Modellen teilweise stark unterschiedliche methodische Ansätze verfolgt, um die jeweils erforderlichen Symptome hervorzurufen (vgl. Abschnitt 1.1). Eine direkte Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus verschiedenen Modellen ist deshalb nicht immer gegeben (Pitkänen *et al.*, 2007; Dichter, 2009; McNamara *et al.*, 2006). Eine relativ gute Vergleichbarkeit besteht zwischen zwei Modellen für Temporallappenepilepsie (TLE), die auf der systemischen Applikation von Kainat (KA, *kainic acid*; vgl. Abschnitt 2.2) bzw. Pilocarpin basieren. Zum einen ist der zeitliche Ablauf, in dem die ausgelösten epileptiformen Krampfanfälle und der *Status epilepticus* (SE) bei Mäusen und Ratten auftreten, in beiden Modellen nahezu identisch (Sperk, 1994; Curia *et al.*, 2008; vgl. Abschnitt 2.2, Tab. 1). Zum anderen weist die primäre Wirkung von KA- bzw. Pilocarpin eine ähnliche Lokalisation auf. KA wirkt als spezifischer Agonist einer Unterfamilie ionotroper Glutamatrezeptoren (KA-Rezeptor) und führt dadurch zur Depolarisation verschiedener Neuronen-Klassen innerhalb der Hippocampusformation (Ben Ari & Cossart, 2000). Pilocarpin bewirkt als Agonist muskarinischer Acetylcholinrezeptoren in hippocampalen Neuronen, aber auch innerhalb des Neokortex und des Mandelkerns, eine neuronale Übererregung (Curia *et al.*, 2008). Des Weiteren ergeben sich im KA- und Pilocarpin-Modell Homologien auf molekularer Ebene: Die primäre Übererregung durch KA bzw. Pilocarpin führt zur sekundären Ausschüttung von Glutamat an den exzitatorischen Synapsen des ineinander verschachtelten Netzwerks hippocampaler und entorhinal-kortikaler Neurone in der Hippocampusformation (vgl. Abschnitt 1.2; Ben Ari & Cossart, 2000; Curia *et al.*, 2008). Durch den Glutamatüberschuss kommt es während des SE zur massiven Aktivierung von ionotropen Glutamatrezeptoren der NMDA-Unterfamilie, die daraufhin einen starken postsynaptischen Ca^{2+} -Einstrom vermitteln (Raza *et al.*, 2004; McNamara *et al.*, 2006). Das Ca^{2+} fungiert als sekundärer Botenstoff, der über nachgeschaltete Signalkaskaden die Effizienz der synaptischen Übertragung und die

intrinsische Erregbarkeit von CA1-Pyramidenzellen verändert, also zu synaptischer bzw. intrinsischer Plastizität führt (Daoudal & Debanne, 2003; Frick & Johnston, 2005; Xu *et al.*, 2005; Schulz, 2006). Intrinsische Plastizität kann nach dem SE durch eine veränderte Aktivität von Kinasen wie der ERK (*extracellular signal-related kinase*) oder Phosphatasen wie Calcineurin vermittelt werden (McNamara *et al.*, 2006; Loane *et al.*, 2006; Houser *et al.*, 2008; Kurz *et al.*, 2001), indem sie die biophysikalischen Eigenschaften von spannungsabhängigen Ionenkanälen verändern. Parallel dazu finden multiple Veränderungen der Genregulation statt (Laurén *et al.*, 2010), die teilweise schon wenige Stunden nach dem SE einsetzen, sich aber auch während der Latenzphase und bis in die chronische Phase hinein weiter ausweiten können (McNamara *et al.*, 2006). Eine veränderte Expression von spannungsabhängigen Ionenkanälen kann eine zu- bzw. abnehmende Dichte von Ionenkanälen bewirken und die intrinsische Erregbarkeit der Zelle direkt verändern (Wellmer *et al.*, 2002; Ellerkmann *et al.*, 2003; Bernard *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2007; Becker *et al.*, 2008; Beck & Yaari, 2008; Monaghan *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011). Durch den SE verändert sich aber auch die Expression von Proteinen, die Teil einer Signalkaskade sind, mit synaptischer Plastizität in Verbindung stehen oder an der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt sind (Laurén *et al.*, 2010). Diese Veränderungen können wiederum auf gegenwärtig vorhandene Ionenkanäle rückwirken und indirekt zu intrinsischer Plastizität führen (Hong *et al.*, 2003; Raza *et al.*, 2004; DeLorenzo *et al.*, 2005; McNamara *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2010).

Die pathophysiologisch veränderte intrinsische Erregbarkeit einzelner CA1-Pyramidenzellen wurde bisher vor allem in der chronischen Phase (siehe Abschnitt 1.1) des KA- und des Pilocarpin-Modells beschrieben. CA1-Pyramidenzellen von KA-behandelten Ratten zeigen nach synaptischer Stimulation gegenüber der Kontrolle vergrößerte exzitatorische postsynaptische Potenziale (EPSPs); ein Anzeichen für eine erhöhte dendritische Erregbarkeit (Ashwood *et al.*, 1986; Wu & Leung, 2003). In Übereinstimmung damit werden in KA-behandelten Zellen durch sehr starke synaptische Stimulationen häufiger dendritische Aktionspotenziale (APs) ausgelöst als in Kontrollzellen, die sich zudem stärker als gewöhnlich im distalen Apikaldendriten ausbreiten (Wu & Leung, 2003). In der Folge der KA-Behandlung kommt es auch häufiger zu einer explosionsartigen Entladung hochfrequenter somatischer APs als in Kontrollzellen (Ashwood *et al.*, 1986; Meier &

Dudek, 1996). Dies deutet auf eine erhöhte axosomatische Erregbarkeit hin. Im chronischen Pilocarpin-Modell treten sehr ähnliche Veränderungen auf. Die axosomatische Erregbarkeit ist dort aufgrund einer verstärkten Expression von spannungsabhängigen $\text{Na}_v1.6$ - und $\text{Ca}_v3.2$ -Kanälen (siehe Abschnitt 1.3) stark erhöht (Chen *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2008). Im *Current-Clamp*-Experiment (CC; vgl. Abschnitt 2.4) zeigen die CA1-Pyramidenzellen daraufhin ebenfalls ein explosionsartiges Entladungsverhalten (Sanabria *et al.*, 2001; Remy *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). Eine Erhöhung der dendritischen Erregbarkeit ist einerseits durch die verminderte Expression von spannungsabhängigen $\text{K}_v4.2$ -Kanälen (siehe Abschnitt 1.3 u. 1.4, Abb. 3) bedingt, die mit einer verminderten dendritischen Lokalisation der verbliebenen $\text{K}_v4.2$ -Kanäle einhergeht (Monaghan *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2008). Dies hat eine verminderte Abschwächung retrograd wandernder APs (b-AP, *backpropagating action potential*) im distalen Apikaldendriten zur Folge (Bernard *et al.*, 2004). Andererseits bewirkt die verringerte Expression von HCN-Kanälen (siehe Abschnitt 1.3) einen vergrößerten dendritischen Eingangswiderstand (R_{in}), der die Entstehung dendritischer APs erleichtert (Jung *et al.*, 2007). Eine ähnliche molekulare Umstrukturierung (*Remodeling*) des HCN-vermittelten I_h findet auch im chronischen KA-Modell statt (Shin *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 2008). Insgesamt gehört eine erhöhte axosomatische und dendritische Erregbarkeit von CA1-Pyramidenzellen daher wahrscheinlich zu den Ursachen für spontan auftretende Anfälle in der chronischen Phase des KA- bzw. des Pilocarpin-Modells (Ben Ari & Cossart, 2000; Beck & Yaari, 2008; Curia *et al.*, 2008; Vincent & Mulle, 2009; Remy *et al.*, 2010).

Intrinsische Plastizität, die akut nach dem SE oder in der Latenzphase (siehe Abschnitt 1.1) auftritt, ist weit weniger untersucht worden als in der chronischen Phase des KA- und Pilocarpin-Modells. Einige Befunde weisen auf Modulationen der biophysikalischen Eigenschaften von Ionenkanälen oder deren Expression hin, die bereits kurz nach der initialen Übererregung durch den SE beginnen (Lugo *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2008; Shruti *et al.*, 2008; Mohapatra *et al.*, 2009; Mulholland & Chandler, 2010). Es ist im Einzelnen schwer zu beurteilen, ob diese Veränderungen Teil einer homöostatischen Schutzreaktion nach dem SE sind oder, im Gegenteil, zur Epileptogenese beitragen. Zudem kann sich die intrinsische Erregbarkeit von Neuronen im Verlauf der Epileptogenese auch wieder ändern, da unterschiedliche Mechanismen miteinander interagieren oder ineinander übergehen (Dichter, 2009; Williams *et al.*, 2009; Dudek & Staley, 2011). Für einen Vergleich von experimentellen Ergebnissen aus akuten und subakuten Phasen von Epilepsie-Modellen ist der zeitliche Kontext daher besonders wichtig.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein SE bei juvenilen Wildtyp-Mäusen (C57BL/6, P21-23; vgl. Abschnitt 2.1) durch intraperitoneale Injektion von KA induziert (Abschnitt 2.2). Daraufhin wurden Messungen an CA1-Pyramidenzellen durchgeführt, die gerade die pathophysiologischen Bedingungen eines SE überlebt hatten (KA-Zellen). Um die Erregbarkeit der KA-Zellen gegenüber CA1-Pyramidenzellen aus Kontrolltieren (Sham-Zellen) zu vergleichen wurden die Entstehung von APs, der AP-Verlauf und die Abschwächung von b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Transienten untersucht. Diese Teilaspekte sollen im Folgenden gesondert diskutiert werden.

4.2 Somatodendritische Erregbarkeit nach SE-Induktion

4.2.1 Entstehung von somatischen APs nach SE-Induktion

Für die Erregbarkeit einer CA1-Pyramidenzelle und die AP-Entstehung sind die passiven und aktiven Eigenschaften der Zellmembran entscheidend (Abschnitt 1.3; Hille, 2001; Baranauskas, 2007; Bean, 2007). Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die weitgehend passive Membraneigenschaften repräsentieren, sind der Eingangswiderstand (R_{in}) und die Membranzeitkonstante τ . Beide Werte zeigten in Sham- und KA-Zellen keinen signifikanten Unterschied (Abschnitt 3.2.1 Abb. 18C-E). Durch die ähnliche Morphologie von CA1-Pyramidenzellen aus Sham- und KA-Tieren (Abschnitt 3.3.1, Abb. 24) war ihre jeweilige Membrankapazität (C_m) vermutlich ebenfalls sehr ähnlich. Daher hat der SE insgesamt wahrscheinlich keinen Einfluss auf die passiven Membraneigenschaften und die elektrotonische Umladung der Membran während der Trajektorie zum AP ($\tau = R_{in} \times C_m$; Hille, 2001). Allerdings zeigten KA-Zellen im Vergleich zu Sham-Zellen moderate, aber signifikante Unterschiede im Betrag des Ruhemembranpotenzials (RMP; Abb. 33; vgl. Abschnitt 3.2.1, Abb. 18A, B; Tab. 9) und der AP-Schwelle (Abb. 33; vgl. Abschnitt 3.2.4, Abb. 22A, C; Tab. 9), die offenkundig die AP-Entstehung beeinflussen können (Hille, 2001; Baranauskas, 2007; Bean, 2007). Für diese Verschiebung des RMP und der AP-Schwelle könnte prinzipiell ein *Remodeling* von Ionenkanälen verantwortlich sein.

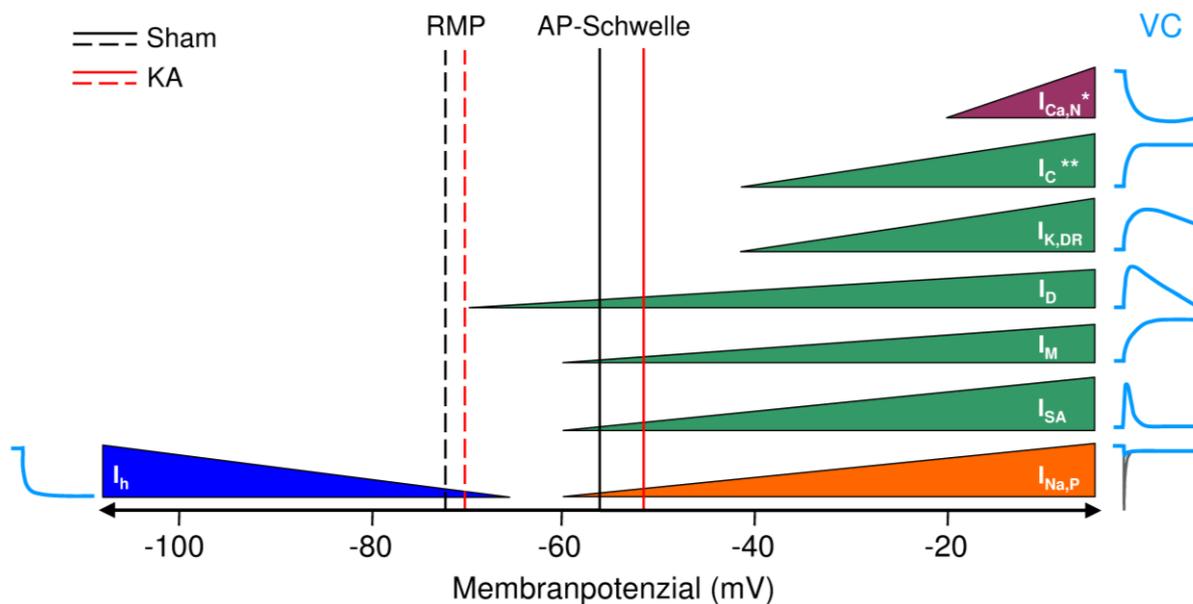


Abbildung 33: Schema der Aktivierungsschwelle einiger spannungsabhängiger Ströme in CA1-Pyramidenzellen.

Die beginnende Aktivierung einiger Ionenströme von CA1-Pyramidenzellen wird durch ansteigende Dreiecke symbolisiert. Diese Literaturwerte sind den durchschnittlichen Werten für RMP und AP-Schwelle der KA- und Sham-Zellen aus dieser Arbeit gegenübergestellt (siehe Abschnitt 3.2 bzw. Tab. 9). Der I_h wird bei Hyperpolarisation der Zelle zunehmend aktiviert, ist bei Potenzialen unterhalb von -65 mV tonisch aktiv und kann daher das RMP beeinflussen (Surges *et al.*, 2004). Der persistierende $I_{Na,P}$ ist bereits unterhalb der Aktivierungsschwelle des transienten I_{Na} aktiv (Yue *et al.*, 2005). Auch I_{SA} , I_M und I_D aktivieren bei Depolarisationen bereits unterhalb der AP Schwelle und können die Geschwindigkeit beeinflussen, mit der ein AP entstehen kann (Storm, 1988; Kim *et al.*, 2005; Brown & Passmore, 2009). Der $I_{K,DR}$ aktiviert, nachdem ein AP ausgelöst wurde und ist an der AP-Repolarisation beteiligt (Murakoshi & Trimmer, 1999). Die Aktivierung des I_C ist stark von einem vorherigen Ca^{2+} -Einstrom abhängig (** = Aktivierung bei $10 \mu M Ca^{2+}$; Meera *et al.*, 1997). Die Aktivierung des $I_{Ca,N}$ und anderer Ca^{2+} -Ströme mit hoher Aktivierungsschwelle durch ein AP führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom (* = Ca^{2+} -Ströme mit niedrigerer Aktivierungsschwelle sind in der Abbildung nicht berücksichtigt; Magee & Johnston, 1995). Die hellblauen Kurven deuten die kinetischen Eigenschaften der jeweiligen Ströme unter *Voltage-Clamp*-Bedingungen an (VC; Im Falle des $I_{Na,P}$ steht die graue Kurve für den gesamten Na^+ -Strom I_{Na}). Farbe der Dreiecke = Ionen-Selektivität: Lila: Ca^{2+} , Grün: K^+ , Orange: Na^+ , Dunkelblau: Na^+ und K^+ ; Höhe der Dreiecke: I_D und I_M sind in CA1-Pyramidenzellen somatodendritisch deutlich weniger vertreten als I_{SA} und $I_{K,DR}$ (Chen & Johnston, 2004).

Das RMP von CA1-Pyramidenzellen wird primär von der nicht spannungsabhängigen K^+ -Hintergrundleitfähigkeit bestimmt, die über tonisch geöffnete K_{2P} - (*two-pore-domain*) und K_{ir} - (*inward rectifier*) K^+ -Kanäle vermittelt wird (Neusch *et al.*, 2003; Enyedi & Czirják, 2010). Bei Potenzialen unter -65 mV wird das RMP zudem stark durch einen stetigen Na^+ -Einstrom beeinflusst, der über spannungsabhängige HCN-Kanäle (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated*) stattfindet (Surges *et al.*, 2004; Biel *et al.*, 2009; Abb. 33: " I_h "). Während über ein SE-induziertes *Remodeling* der K^+ -Hintergrundleitfähigkeit bisher nichts bekannt ist, konnte in verschiedenen Epilepsie-Modellen gezeigt werden, dass der

HCN-Kanal vermittelte I_h (*hyperpolarization activated current*) zu verschiedenen Zeitpunkten nach einem SE einer Vielzahl von Veränderungen unterliegt (Brewster *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009; Marcelin *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2010). In CA1-Pyramidenzellen von Ratten kann man 24-48 Stunden nach einer KA-Injektion eine Potenzierung des somatischen I_h beobachten, die mit einem weniger negativen RMP einhergeht (Shin *et al.*, 2008). Dieses I_h -Remodeling hat in CC-Experimenten nach negativen Strominjektionen, die zu einer Hyperpolarisation der Zelle führen (vgl. Abschnitt 2.7.3, Abb. 8), jedoch gleichzeitig eine größere Potenzial-Senke (*sag*) zur Folge und setzt den R_{in} der Zelle deutlich herab (Shin *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu zeigt sich in der vorliegenden Arbeit sowohl der *sag* (Abschnitt 3.2.1; Abb. 18F) als auch die Steilheit der R_{in} -Kennlinie (Abschnitt 3.2.1, Abb. 18 D und E) durch den SE unbeeinflusst. Da jede Änderung der K^+ -Hintergrundleitfähigkeit ebenso zwangsläufig den R_{in} der CA1-Pyramidenzelle verändern würde, kann das latent depolarisierte RMP von KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen nicht durch ein Remodeling von K_{2P} -, K_{ir} - oder HCN-Kanäle erklärt werden. Für die Ursache der latenten Depolarisation von KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen ergeben sich aufgrund der vorhandenen Daten in dieser Arbeit daher keine Hinweise.

Die AP-Schwelle hängt von der Aktivierung des transienten Na^+ -Stroms (I_{Na}) ab, der von spannungsabhängigen Natriumkanälen (Na_v ; vgl. Abschnitt 1.3) vermittelt wird. Die Ursache für die unterschiedliche AP-Schwelle von Sham- und KA-Zellen könnte demnach im einfachsten Fall eine verminderte Anzahl von Na_v -Kanälen sein. Zumindest in Körnerzellen des *Gyrus dentatus* von Pilocarpin-behandelten Ratten kann man einen Tag nach dem SE eine verminderte Expression von $Na_v1.6$ -Kanaluntereinheiten beobachten (Ellerkmann *et al.*, 2003). Es ist aber auch möglich, dass die vorhandenen Na_v -Kanäle in Sham- und KA-Zellen unterschiedliche biophysikalische Eigenschaften aufweisen. Unter physiologischen Bedingungen zeigt der I_{Na} schon bei stark negativen stationären Membranpotenzialen (*Steady-State*) eine partielle Inaktivierung, so dass ein Teil des Stroms bei Depolarisationen ab dem RMP nicht aktivierbar ist (Magee & Johnston, 1995). Eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit dieser *Steady-State*-Inaktivierung in Richtung stärker hyperpolarisierter Potenziale könnte daher zu einer verringerten Aktivierung des I_{Na} geführt haben. Im Gegensatz zu dieser Annahme tritt 24 Stunden nach einem SE in der Regel eine Verschiebung der *Steady-State*-Inaktivierung in Richtung stärker depolarisierter Potenziale ein, die eine erhöhte I_{Na} -Aktivierbarkeit zur Folge hat (Vreugdenhil *et al.*, 1998; Ellerkmann *et al.*, 2003). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass wenige Stunden nach dem

SE eine verringerte Aktivierbarkeit des I_{Na} vorliegt. Möglicherweise handelt es sich um einen Effekt, der nur von kurzer Dauer ist und sich im Verlauf der Epileptogenese in das Gegenteil umkehrt. In der chronischen Phase verschiedener Epilepsie-Modelle ist eine erhöhte I_{Na} -Aktivierbarkeit in jedem Fall eine wichtige Ursache für die pathophysiologisch erhöhte Erregbarkeit von hippocampalen Neuronen (Sanabria *et al.*, 2001; Aronica *et al.*, 2001; Wellmer *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011).

Eine weitergehende Aussage darüber, ob sich die Voraussetzungen zur Entstehung von somatischen APs in CA1-Pyramidenzellen durch den SE verändert haben, könnte durch Unterschiede in der Latenzzeit bis zum AP und durch die Reizstärke-Reizdauer-Beziehung der KA- und Sham-Zellen getroffen werden. Allerdings erscheinen die entsprechenden Ergebnisse dieser Arbeit zunächst gegensätzlich:

- Die AP-Latenzzeit war in KA-Zellen stellenweise signifikant länger als in Sham-Zellen (Abschnitt 3.2.4, Abb. 22D und Abschnitt 3.2.2, Abb. 19A, B bei +50 pA). In einem Teil der KA-Zellen konnte jedoch das genaue Gegenteil beobachtet werden (Abschnitt 3.2.2, Abb. 19A, B bei +100 pA).
- Die KA-Zellen zeigten gegenüber Sham-Zellen jeweils einen Trend zu geringeren Rheobase-Werten bei gleichzeitig längeren Chronaxie-Werten (Abschnitt 3.2.3, Abb. 21).

Der Unterschied zwischen der mittleren AP-Schwelle von Sham- und KA-Zellen ist deutlich größer als der Unterschied beim RMP (Tab. 9). Es ist daher möglich, dass in KA-Zellen zur AP-Entstehung eine größere absolute Potenzialänderung nötig war als in Sham-Zellen (Abb. 33). Dieser Effekt hätte aber in allen CC-Experimenten bestehen müssen. Die uneinheitlichen Ergebnisse bei der AP-Latenzzeit und der Reizstärke-Reizdauer-Beziehung könnten daher ein Hinweis auf weitere akute Effekte des KA-induzierten SE sein, die parallel zu einem möglichen *Remodeling* des I_{Na} auftreten.

Die verschiedenen Ionenströme einer CA1-Pyramidenzelle unterscheiden sich durch ihre Kinetik und ihre spezifische Aktivierungsschwelle (Abb. 33). Im CC-Experiment hängt die anteilige Aktivierung der jeweiligen Ionenströme daher vom Ausmaß und von der Länge einer Depolarisation ab, die durch die Dauer und Stärke der verwendeten Strominjektion bestimmt wird. Es besteht demzufolge die Möglichkeit, dass sich das SE-induzierte

Remodeling eines Ionenstroms in Abhängigkeit vom verwendeten CC-Protokoll (Abschnitt 2.7.3, Abb. 8, 9 u. 10) nur in einem Teil der Ergebnisse widerspiegelt. Durch einen Vergleich der AP-Latenzzeiten mit der Reizstärke-Reizdauer-Beziehung von KA- und Sham-Zellen kann diese Hypothese untermauert werden:

- Die Kurven der Reizstärke-Reizdauer-Beziehung von Sham- und KA-Zellen überschneiden sich bei einer Reizdauer von 10 ms (Abschnitt 3.2.3, Abb. 21A). KA-Zellen sind demnach bei kurzfristigen Depolarisationen (< 10 ms) weniger erregbar als Sham-Zellen. In Übereinstimmung damit zeigten einzelne somatische APs in KA-Zellen, bei einer Depolarisation über 4 ms, eine signifikant längere Latenzzeit als in Sham-Zellen (Abschnitt 3.2.4, Abb. 22D). Zudem war in KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen eine etwas höhere Strominjektion nötig, um ein einzelnes AP zu induzieren (Abschnitt 3.2.4, Abb. 22B). Insgesamt entsteht der einheitliche Eindruck, dass der SE zu einer eingeschränkten AP-Entstehung nach kurzen Depolarisationen führt.
- Bei anhaltenden Depolarisationen, die durch 900 ms lange Strominjektionen mit einer fest eingestellten Stärke von +50 oder +100 pA hervorgerufen wurden, waren die Veränderungen in der AP-Latenzzeit von KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen hingegen gegensätzlich ausgeprägt. Ein Vergleich mit der Reizstärke-Reizdauer-Beziehung zeigt, dass die Rheobase-Werte von Sham- bzw. KA-Zellen insgesamt genau im Bereich zwischen 50 und 100 pA lagen (Abschnitt 3.2.3, Abb. 21B). Die Rheobase-Werte stimmen daher mit der Beobachtung überein, dass nur jeweils etwa zwei Drittel der Sham- bzw. KA-Zellen bei +50 pA repetitive APs zeigten (Abschnitt 3.2.2, Abb. 19). Zur AP-Induktion wurde im jeweils verbliebenen Drittel der Sham- und KA-Zellen eine relativ große Steigerung der Strominjektion auf +100 pA vorgenommen, die wahrscheinlich ungeeignet war um geringe Unterschiede in der Erregbarkeit von Sham- und KA-Zellen aufzulösen. Die Depolarisationen bei der Bestimmung der Rheobase-Werte waren durch eine Steigerung der Strominjektion um jeweils 10 pA (Abschnitt 2.7.3, Abb. 10) sehr viel feiner abgestuft und führten zu einem nicht signifikanten Trend von KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen hin zu kleineren Werten (Abschnitt 3.2.3, Abb. 21B). Dieser Trend könnte jedoch allenfalls erklären, warum KA-Zellen bei +100 pA eine kürzere AP-Latenzzeit zeigten als Sham-Zellen. Die verlängerte AP-Latenzzeit von KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen bei +50 pA steht weiterhin im Widerspruch dazu. Es kann daher nicht eindeutig geklärt werden, ob die Erregbarkeit

von CA1-Pyramidenzellen bei lang anhaltenden Depolarisationen nach dem SE erhöht oder verringert wurde.

In CA1-Pyramidenzellen kommen einige Ionenströme vor, deren jeweilige Aktivierungsschwelle unterhalb der AP-Schwelle liegt (Abb. 33, vgl. Abschnitt 1.3). Die Aktivierung dieser Ströme kann daher die Geschwindigkeit des Potenzialanstiegs während der Trajektorie zum AP und folglich die AP-Latenzzeit beeinflussen (Spruston & McBain, 2007; Baranauskas, 2007; Bean, 2007; vgl. Abschnitt 1.3). Der persistierende Na^+ -Strom ($I_{\text{Na,P}}$) beschleunigt die Trajektorie und wird zu einem großen Teil von $\text{Na}_v1.6$ -Kanälen vermittelt (Burbidge *et al.*, 2002; Royeck *et al.*, 2008). Da $\text{Na}_v1.6$ -Kanäle auch zum transienten I_{Na} beitragen (Goldin, 1999), könnte eine Reduktion nach dem SE gleichzeitig die AP-Schwelle erhöht und die Trajektorie von KA-Zellen verlangsamt haben. Dies könnte im Vergleich zu Sham-Zellen in zweifacher Hinsicht zu einer geringeren Erregbarkeit geführt haben. Auch durch ein *Remodeling* unterschwellig aktiver K^+ -Ströme könnte sich die AP-Entstehung in KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen verändert haben. In diesem Zusammenhang müssen allerdings die großen Unterschiede in der Aktivierungs- bzw. Inaktivierungskinetik von I_{SA} (somatodendritischer A-Typ K^+ -Strom), I_{D} (Dendotoxinsensitiver K^+ -Strom) und I_{M} (durch M1-muskarinische Acetylcholinrezeptoren inhibierbarer K^+ -Strom; "M-Strom") beachtet werden (Abb. 33, *Voltage-Clamp*-Kurven, VC). In den CC-Messungen dieser Arbeit wurden Strominjektionen unterschiedlicher Dauer und Stärke verwendet (siehe oben; vgl. Abschnitt 2.7.3, Abb. 8-10), die folglich zu einer unterschiedlichen anteiligen Aktivierung von I_{SA} , I_{D} und I_{M} geführt haben müssen. Der I_{M} benötigt zur Aktivierung eine Depolarisation, die über mindestens 50 ms anhält (Brown & Passmore, 2009). In dieser Arbeit hatte der I_{M} daher allenfalls einen Einfluss auf die AP-Latenzzeit, die nach lang anhaltenden Strominjektionen (900 ms) gemessen wurde. Die Aktivierung von I_{SA} und I_{D} ist hingegen schnell genug, um innerhalb einer kurzen Zeitspanne die AP-Latenzzeit zu verzögern (I_{SA} : < 3 ms; I_{D} : 2-4 ms; Storm, 1988; Kim *et al.*, 2005; Morin *et al.*, 2010). Demnach könnte für die gegenüber Sham-Zellen eingeschränkte AP-Entstehung von KA-Zellen nach kurzen Depolarisationen eine Verstärkung von I_{SA} oder I_{D} verantwortlich sein. Durch die relativ schnelle Inaktivierung von I_{SA} und I_{D} (vgl. Abb. 33, VC-Kurven) könnte dieser Effekt bei lang anhaltenden Depolarisationen nicht mehr wirksam gewesen sein. Grundsätzlich könnte ein verschiedenartiges oder paralleles *Remodeling* von

I_{SA} , I_D und/oder I_M nach einem KA-induzierten SE für die heterogenen Ergebnisse bei der AP-Latenzzeit und der Reizstärke-Reizdauer-Beziehung von Sham- und KA-Zellen einen Erklärungsansatz bieten.

Insgesamt verändert der SE offenbar die somatische AP-Entstehung in CA1-Pyramidenzellen. Insbesondere die geringere Erregbarkeit von KA-Zellen nach kurzen Depolarisationen (< 10 ms), die im Vergleich zu Sham-Zellen mit dem Trend zu längeren Chronaxie-Werten übereinstimmt, könnte physiologisch relevant sein. In der klassischen Elektrophysiologie stellt die Chronaxie die optimale Reizdauer dar, mit der in einer Nervenfasern durch äußere Stimulation ein einzelnes AP ausgelöst werden kann (Irnich, 2010). Prinzipiell ist dieser Zusammenhang auch auf intrazelluläre CC-Ableitungen übertragbar (vgl. Abschnitt 2.9.1.3), in denen APs durch definierte Strominjektionen hervorgerufen werden. Im Gegensatz dazu entstehen APs *in vivo* als Reaktion auf EPSPs, die durch synaptische Aktivität an glutamatergen Synapsen des Dendriten auftreten. Einzelne EPSPs haben eine Dauer von wenigen Millisekunden (Magee & Cook, 2000) und reichen normalerweise nicht aus, um die CA1-Pyramidenzelle bis über die AP-Schwelle zu depolarisieren (Spruston & McBain, 2007). Nur durch ein exakt aufeinander abgestimmtes auftreten mehrerer EPSPs, die sich zeitlich bzw. räumlich zu einer ausreichenden Depolarisation aufsummieren, kann ein AP ausgelöst werden (Magee, 2000). Die verringerte Empfindlichkeit der KA-Zellen gegenüber kurzfristigen Depolarisationen, die in den CC-Experimenten dieser Arbeit im Vergleich zu Sham-Zellen aufgetreten ist, könnte daher für die Signalintegration *in vivo* von besonderer Bedeutung sein. Möglicherweise hat sich die Erregbarkeit von CA1-Pyramidenzellen auf diese Weise an die erhöhte synaptische Aktivität, die während des SE aufgetreten ist (vgl. Abschnitt 4.1), angepasst und dient der Zelle als Schutz gegenüber erneuter Übererregung.

4.2.2 Verlauf von somatischen APs nach SE-Induktion

Beim Überschreiten der AP-Schwelle kommt es in CA1-Pyramidenzellen zur massiven Aktivierung des transienten I_{Na} und einem AP mit "Alles-oder-Nichts" Charakter (Hille, 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten einzelne somatische APs von Sham- und KA-Zellen im Mittel identische Amplituden (Abschnitt 3.2.4, Abb. 23A und C). Gegenüber Sham-Zellen unterschied sich der AP-Verlauf in KA-Zellen jedoch jeweils signifikant durch eine geringere Steilheit des Aufstrichs (Abschnitt 3.2.4, Abb. 23B), eine größere Breite bei

50 % der Gesamtamplitude (APD₅₀, Abb. 23D) und einem größeren Integral der Nachdepolarisation (Integral AP-N, Abb. 23F). Diese Unterschiede deuten auf intrinsische Plastizität hin, die in den KA-Zellen durch den SE ausgelöst worden ist. Sehr auffällig war zudem, dass APs der Sham-Zellen am Ende der schnellen Repolarisation ausnahmslos eine deutliche Kerbe (*notch*) zeigten. Dies entspricht der typischen AP-Charakteristik von CA1-Pyramidenzellen aus *ex vivo* Schnitt-Präparationen (Storm, 1987; Storm *et al.*, 1990). Die APs von KA-Zellen hatten hingegen häufig keinen *notch* (Abb. 23E). Die separate Betrachtung von KA[n]- und KA[x]-Zellen zeigte, dass die Unterschiede gegenüber dem AP-Verlauf in Sham-Zellen stark an die An- oder Abwesenheit des *notch* gekoppelt waren. Dementsprechend waren signifikante Unterschiede zwischen KA[x]- und KA[n]-Zellen beim AP-Aufstrich, der APD₅₀ und dem Integral der AP-N zu beobachten. Gleichzeitig gab es bei diesen Parametern keine signifikanten Unterschiede zwischen Sham- und KA[n]-Zellen (Abb. 23B, D und F). Für diese Kopplung gibt es zwei mögliche Erklärungen:

1. Die Veränderungen im AP-Verlauf haben mehrere Ursachen, deren Auswirkungen in allen KA-Zellen mehr oder weniger ausgeprägt auftreten, aber nur in KA[x]-Zellen zur Abwesenheit des *notch* geführt haben. Diese Möglichkeit scheint plausibel, da während der aufeinander folgenden AP-Phasen (Aufstrich, Repolarisation und AP-N) unterschiedliche Ionenströme in kooperativer Weise aktiv sind (Bean, 2007; Baranauskas, 2007; siehe Abschnitt 1.3) und ein *Remodeling* mehrerer Ionenströme durch einen SE über verschiedenartige Signalkaskaden parallel ausgelöst werden kann (Ben Ari & Cossart, 2000; McNamara *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2009). Es ist denkbar, dass KA[x]-Zellen von einzelnen *Remodeling*-Prozessen unter diesen parallelen Veränderungen nach dem SE stärker betroffen waren als KA[n]-Zellen.
2. Die Abwesenheit des *notch* und die Veränderungen im AP-Verlauf gegenüber Sham-Zellen haben die gleiche Ursache, so dass die entsprechenden Auswirkungen ausschließlich in KA[x]-Zellen auftreten. Diese Möglichkeit sollte nicht komplett ausgeschlossen werden, da schon ein *Remodeling* eines einzelnen Ionenstroms ausreichen könnte, um die kooperative Aktivität anderer Ionenströme während der aufeinander folgenden AP-Phasen zu stören. In diesem Fall würden die beschriebenen

Veränderungen des AP-Aufstrichs, der APD_{50} und des Integrals der AP-N zumindest teilweise voneinander abhängen.

Die AP-Breite hängt prinzipiell von der jeweiligen Steilheit der Aufstrichphase und der Repolarisation ab. Daher könnte der gegenüber Sham-Zellen flachere AP-Aufstrich in KA-Zellen zur Vergrößerung der APD_{50} beigetragen haben. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung zeigten die APs in KA[x]-Zellen einen besonders flachen AP-Aufstrich und eine besonders lange APD_{50} (Abb. 23B und D). Die Ursache der gegenüber Sham-Zellen flacheren AP-Aufstrichphase von KA-Zellen könnte ein *Remodeling* des I_{Na} sein, das möglicherweise auch für die erhöhte AP-Schwelle verantwortlich ist (vgl. Abschnitt 4.2.1). Die starke Kopplung der APD_{50} an die An- oder Abwesenheit eines *notch*, der gegen Ende der schnellen AP-Repolarisation auftritt, spricht hingegen für eine direkte Beeinflussung der AP-Repolarisation von KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen. In CA1-Pyramidenzellen wird die AP-Repolarisation primär durch die Aktivierung von $I_{K,DR}$ und I_C gewährleistet (Storm, 1987; Storm *et al.*, 1990; Goldin, 1999; Abschnitt 1.3, Abb. 33), die parallel zur Inaktivierung des I_{Na} einsetzt. Prinzipiell können auch K^+ -Ströme, die wie der I_{SA} und der I_D bereits unterhalb der AP-Schwelle aktivieren, an der AP-Repolarisation beteiligt sein (Abschnitt 1.3). Der I_{SA} inaktiviert jedoch sehr schnell, so dass er für die Repolarisation von somatischen APs in CA1-Pyramidenzellen eine untergeordnete Rolle spielt (Bean, 2007). Der K_v1 -vermittelte I_D ist aufgrund einer starken Akkumulation im AIS und im Axon nur für die Repolarisation von axonalen APs relevant (Kole *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2009). Daher könnte vor allem ein SE-induziertes *Remodeling* des $I_{K,DR}$ oder des I_C zur verlängerten APD_{50} von KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen geführt haben.

Für $K_v2.1$ -Kanäle, die im Soma und proximalen Dendriten von CA1-Pyramidenzellen mehrheitlich den $I_{K,DR}$ vermitteln (Murakoshi & Trimmer, 1999; Abschnitt 1.3, Abb. 2), wurde ein aktivitätsabhängiges *Remodeling* beschrieben, das durch die Stimulation von NMDA-Glutamatrezeptoren hervorgerufen werden kann (Mulholland *et al.*, 2008). Vermittelt durch die Phosphatase Calcineurin kommt es zur Dephosphorylierung von $K_v2.1$ -Kanälen, einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in Richtung negativerer Potenziale und dadurch effektiv zur Potenzierung des $I_{K,DR}$ (Park *et al.*, 2006; Mohapatra *et al.*, 2009). Da der Ca^{2+} -Einstrom über NMDA-Rezeptoren ein essentieller Teil der SE-vermittelten Signalkaskade ist und wahrscheinlich zur Aktivierung von Calcineurin

führt (McNamara *et al.*, 2006; vgl. Abschnitt 4.1), wäre auch in der vorliegenden Arbeit in KA-Zellen ein gegenüber Sham-Zellen verstärkter $I_{K,DR}$ zu erwarten. Die Ergebnisse zeigen jedoch eine Verlängerung der APD_{50} , so dass diese Form intrinsischer Plastizität im verwendeten Epilepsie-Modell entweder nicht ausgelöst oder von anderen Veränderungen überlagert wurde. In Übereinstimmung mit dieser Annahme war die Frequenz von repetitiven APs, die in CA1-Pyramidenzellen empfindlich durch den $I_{K,DR}$ reguliert wird (Du *et al.*, 2000; Baranauskas, 2007; Mulholland *et al.*, 2008), in Sham- und KA-Zellen nicht signifikant verschieden (Abb. 19C).

Die Depolarisation während eines APs führt zu einem Ca_v -vermittelten Ca^{2+} -Einstrom, der während des AP-Gipfels beginnt und bis über die AP-Abstrichphase hinaus anhält (Bean, 2007). Dieser starke Ca^{2+} -Einstrom führt unmittelbar zur Aktivierung von Ca^{2+} -sensitiven BK-Kanälen (*big conductance K^+ channel*), die den I_C vermitteln (Lee & Cui, 2010). Durch diese schnelle Rückkopplung von Ca^{2+} - und K^+ -Leitfähigkeit leistet der I_C einen substanziellen Beitrag zur AP-Repolarisation, der während der späteren AP-Abstrichphase maximal ist (Storm *et al.*, 1990; Shao *et al.*, 1999) und dadurch den *notch* verursacht (Johnston *et al.*, 2000; Sah & Louise Faber, 2002). Die in dieser Arbeit festgestellte enge Kopplung der APD_{50} an die An- bzw. Abwesenheit des *notch* (Abb. 23D) könnte daher ein Hinweis auf ein *Remodeling* von BK-Kanälen sein, das vor allem in KA[x]-Zellen stattgefunden hat. Der AP-Verlauf in KA[x]-Zellen weist zumindest eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zu einzelnen somatischen APs von CA1-Pyramidenzellen auf, wie sie in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (Verhinderung des AP-assoziierten Ca^{2+} -Einstroms; Storm, 1987) oder nach der pharmakologischen Blockade von BK-Kanälen mit Iberiotoxin auftreten (Gu *et al.*, 2007). In beiden Fällen kommt es zu deutlich breiteren APs, die anstelle des *notch* einen gleichmäßigen Potenzial-Rückgang zeigen. Es ist auffällig, dass dieser Verlauf weitgehend dem von b-APs in weiter distal gelegenen Abschnitten des Apikaldendriten von CA1-Pyramidenzellen entspricht (vgl. Abb. 23A, AP ohne *notch* und Abb. 2B, b-AP bei 200 μ m). Es ist bekannt, dass in CA1-Pyramidenzellen das somatodendritische Verteilungsmuster der BK-Kanäle mit hoher Dichte im Soma bzw. im proximalen Dendriten und Abwesenheit im distalen Dendriten für den Unterschied zwischen somatischen APs (mit *notch*) und dendritischen b-APs (ohne *notch*) verantwortlich ist (Poolos & Johnston, 1999). Die in der vorliegenden Arbeit auftretende größere APD_{50} von KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen und die Abwesenheit des *notch* im AP von KA[x]-Zellen

könnten demnach durch eine akute Beeinträchtigung des I_C nach dem KA-induzierten SE plausibel erklärt werden.

Ein Bezug des BK-Kanal-vermittelten I_C zu Epilepsie besteht über beschriebene Mutationen, die eine Dysfunktion von BK-Kanälen zur Folge haben und dadurch zu einer erhöhten neuronalen Erregbarkeit beitragen (Lee & Cui, 2010). Im Pilocarpin-Modell ist zudem die hippocampale Expression von BK-Kanälen während der Epileptogenese verringert (Ermolinsky *et al.*, 2008) und unterliegt in der anschließenden chronischen Phase lang anhaltenden Veränderungen (Pacheco Otalora *et al.*, 2008; Ermolinsky *et al.*, 2011). Eine Erhöhung des I_C , die zu weniger breiten somatischen APs führt, ist hingegen 24 Stunden nach einem SE aufgetreten (Shruti *et al.*, 2008). Dabei wurde allerdings im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit ein anderes SE-Modell (PicROTOXIN) verwendet und ein anderer Zelltyp (neokortikale Pyramidenzellen) untersucht, so dass eine direkte Vergleichbarkeit nicht unbedingt gegeben ist. Es ist jedoch auffällig, dass der somanahe Ca^{2+} -Einstrom, von dem die Aktivierung des I_C entscheidend abhängt (Cui *et al.*, 2009), in der vorliegenden Arbeit in KA[n]-Zellen nicht kleiner bzw. in KA[x]-Zellen sogar größer war als in Sham-Zellen (Abschnitt 3.3.2, Abb. 25C und D). Man würde demnach im Gegenteil zu den beobachteten Unterschieden im AP-Verlauf von Sham- und KA[x]-Zellen eine verstärkte Aktivierung des I_C und gegebenenfalls eine Abnahme der APD_{50} erwarten. Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch könnte ein *Remodeling* der biophysikalischen Eigenschaften von BK-Kanälen durch den KA-induzierten SE sein, das trotz der unverminderten bzw. erhöhten AP-assoziierten Ca^{2+} -Einströme eine verminderte Aktivierung des I_C zur Folge hat. Beispielsweise kann die Offenwahrscheinlichkeit von BK-Kanälen durch eine Proteinkinase A (PKA)-vermittelte Phosphorylierung zunehmen (Chung *et al.*, 1991) oder durch eine Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung verringert werden (Loane *et al.*, 2006). Daher könnte eine zunehmende Aktivität von Calcineurin, wie sie nach einem SE auftritt (Misonou & Trimmer, 2004; McNamara *et al.*, 2006), in dieser Arbeit eine Reduktion des I_C bewirkt haben und für die verlängerte APD_{50} von KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen verantwortlich sein.

Im chronischen KA- und Pilocarpin-Modell äußert sich die erhöhte Erregbarkeit von CA1-Pyramidenzellen unter anderem in einer Häufung von explosionsartigen Entladungen hochfrequenter AP-Salven (Ashwood *et al.*, 1986; Meier & Dudek, 1996; Sanabria *et al.*,

2001). Im Pilocarpin-Modell wird dieses pathophysiologische Entladungsverhalten durch eine verstärkte AP-N verursacht, durch die das Membranpotenzial nach einem AP schneller die Schwelle für ein weiteres AP erreichen kann (Beck & Yaari, 2008; Remy *et al.*, 2010). Dieser Effekt beruht auf einer verstärkten Präsenz des $I_{Na,P}$ (Chen *et al.*, 2011) und einer pathophysiologischen Rekrutierung des $Ca_v3.2$ -vermittelten $I_{Ca,T}$ (Becker *et al.*, 2008; Yaari *et al.*, 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen kurz nach dem SE ein höchstsignifikant größeres Integral der AP-N in KA[x]-Zellen gegenüber Sham-Zellen, aber nahezu identische Werte in Sham- und KA[n]-Zellen (Abb. 23F). Diese Kontravalenz deutet darauf hin, dass sich das Integral AP-N von KA[n]- und KA[x]-Zellen ausschließlich um den Betrag des *notch* unterscheidet. Daher zeigte sich für die abfallende Flanke der AP-N in Sham- und KA-Zellen keine signifikant unterschiedliche Zeitkonstante τ AP-N und die Werte von KA[n]- und KA[x]-Zellen waren diesmal identisch (Abb. 23G; Tab. 9). Diese vollständige Abhängigkeit der AP-N Integralwerte von der An- bzw. Abwesenheit des *notch* könnte darauf hindeuten, dass es sich um eine indirekte Auswirkung des I_C -Remodelings handelt. In diesem Fall wären $I_{Na,P}$ und $I_{Ca,R}$ (*resistant*), die unter physiologischen Bedingungen für die Bildung der AP-N verantwortlich sind (Yue *et al.*, 2005; Metz *et al.*, 2005), durch den KA-induzierten SE wahrscheinlich nicht beeinflusst. Übereinstimmend damit zeigten KA[x]- und KA[n]-Zellen in dieser Arbeit nach kurzen Depolarisationen (durch 4 ms Strominjektionen) ausschließlich einzelne Aktionspotenziale (Abschnitt 3.2.4, Abb. 23) und nach längeren Depolarisationen (durch 900 ms Strominjektionen) regelmäßige repetitive APs (Abschnitt 3.2.2, Abb. 19) anstatt AP-Salven bzw. explosionsartigen AP-Entladungen, wie im chronischen Pilocarpin-Modell (Sanabria *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011).

Zusammenfassend scheint sich der AP-Verlauf in KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen durch eine Kombination der oben genannten zwei Möglichkeiten zu verändern. Die Verlängerung der APD_{50} könnte in KA[x]-Zellen durch ein *Remodeling* des I_C besonders ausgeprägt gewesen sein und zusätzlich von einem allgemeinen, für den flacheren AP-Aufstrich in KA[n]- und KA[x]-Zellen verantwortlichen *Remodeling* des I_{Na} gesteigert worden sein. Hingegen wurde das Integral der AP-N in KA[x]-Zellen gegenüber Sham-Zellen offenbar lediglich durch Veränderungen in der vorausgehenden AP-Repolarisation und die Abwesenheit des *notch* beeinflusst.

4.2.3 Abschwächung von b-APs nach SE-Induktion

Die Ausbreitung von b-APs entlang des Apikaldendriten wird durch die Aktivierung des spannungsabhängigen I_{Na} ermöglicht und in Folge der Aktivierung dendritischer Ca_v -Kanäle von einem sekundären Ca^{2+} -Einstrom begleitet (Hausser *et al.*, 2000; Johnston & Narayanan, 2008; vgl. Abb. 33 bzw. Abschnitt 1.3, Abb. 2A: $I_{Ca,N}$, $I_{Ca,L}$ oder $I_{Ca,T}$). Da sich in CA1-Pyramidenzellen der dendritische Ca^{2+} -Einstrom äquivalent zur b-AP-Amplitude verhält, sind Ca^{2+} -*Imaging*-Messungen dazu geeignet, den Verlauf eines b-AP indirekt nachzuvollziehen (Frick *et al.*, 2004; Waters *et al.*, 2005; vgl. Abschnitt 2.5, 2.7.4, 2.9.2). Das Ausmaß der b-AP-Abschwächung entlang des Apikaldendriten von CA1-Pyramidenzellen wird im Wesentlichen durch den $K_v4.2$ -vermittelten I_{SA} reguliert (Abschnitt 1.3, Abb. 2A; Hoffman *et al.*, 1997; Hoffman & Johnston, 1998; Migliore *et al.*, 1999; Frick *et al.*, 2003). Modulationen des I_{SA} wirken sich in dendritischen Ca^{2+} -*Imaging*-Experimenten daher direkt auf die Amplitude der b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Transienten aus (Kim *et al.*, 2005; Frick *et al.*, 2003; Abschnitt 3.4 u. 4.4). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen in KA-Zellen eine stärkere Abschwächung der dendritischen Ca^{2+} -Transienten als in Sham-Zellen (Abschnitt 3.3, Abb. 24, 25A und B, 26) und könnten demzufolge auf ein SE-vermitteltes *Remodeling* des I_{SA} hinweisen. Eine Voraussetzung für diese Interpretation ist allerdings, dass der SE weder Na^+ - noch Ca^{2+} -Ströme beeinträchtigt. Da in dieser Arbeit keine dendritischen *Patch-Clamp*-Ableitungen durchgeführt wurden, kann ein direktes *Remodeling* des dendritischen I_{Na} bzw. des $I_{Ca,N}$, $I_{Ca,L}$ oder $I_{Ca,T}$ nicht völlig ausgeschlossen werden. Bei einem Vergleich mit den vorliegenden Daten aus dem somatischen Teil der CA1-Pyramidenzellen scheint diese Möglichkeit allerdings wenig wahrscheinlich. Ein mögliches *Remodeling* des I_{Na} hat, unabhängig von der höheren AP-Schwelle und dem abgeflachten AP-Aufstrich von KA-Zellen gegenüber Sham-Zellen (Abschnitt 4.2.1 u. 4.2.2), offenbar keinen Einfluss auf die somatische AP-Amplitude (Abschnitt 3.2.4, Abb. 23A und C). Die Amplitude der b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Transiente zeigte nach dem SE in der Nähe des Somas (5-25 μm Abstand vom Soma) ebenfalls keinerlei Einschränkungen, sondern war in der Gesamtheit aller KA-Zellen sogar größer als in Sham-Zellen (Abschnitt 3.3.2, Abb. 25A). Durch die separate Betrachtung der Ca^{2+} -*Imaging*-Daten von KA[n]- und KA[x]-Zellen wurde eine auffällige Kopplung der somanahen Ca^{2+} -Transiente an die An- bzw. Abwesenheit des *notch* im AP sichtbar (Abschnitt 3.3.2, Abb. 25C und D). Da diese Kopplung genauso extrem ausgeprägt ist wie bei dem Integral der AP-N (Abschnitt 4.2.2), deutet diese absolute Abhängigkeit des somanahen Ca^{2+} -Einstroms von dem *notch* im AP

auf eine indirekte Beeinflussung der Ca_v -vermittelten Ca^{2+} -Ströme hin und lässt ein SE-induziertes Ca_v -*Remodeling* unwahrscheinlich erscheinen. Da der AP-assoziierte Ca^{2+} -Einstrom sehr empfindlich auf Veränderungen des AP-Verlaufs reagiert (Bean, 2007), könnte die ausgeprägte somanahe Ca^{2+} -Transiente von KA[x]-Zellen durch die besonders breiten APs, mit der gegenüber KA[n]- und Sham-Zellen signifikant größeren APD_{50} (Abschnitt 3.2.4, Abb. 23D), hervorgerufen worden sein.

Durch die separate Betrachtung der dendritischen Ca^{2+} -Transienten von KA[n]- und KA[x]-Zellen wird ein weiterer wichtiger Aspekt sichtbar. Die gegenüber Sham-Zellen verstärkte Abschwächung des b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Signals war sowohl in KA[n]-Zellen als auch in KA[x]-Zellen vorhanden (Abschnitt 3.2.4, Abb. 25E). Die normierten Fluoreszenzdaten (Abb. 25F) und die statistische Auswertung der logarithmierten Daten (Tab. 8) zeigten darüber hinaus, dass der Beitrag von KA[n]- und KA[x]-Zellen zur verstärkten Signalabschwächung gleichermaßen ausgeprägt war. Der akute Effekt des KA-induzierten SE auf die dendritische Erregbarkeit ist demzufolge von der veränderten Erregbarkeit in der Nähe des Somas (vgl. Abschnitt 4.2.1, 4.2.2) unabhängig und könnte durch ein *Remodeling* des I_{SA} , dessen Bedeutung für die Regulation der dendritischen Erregbarkeit mit dem Abstand vom Soma zunimmt (vgl. Abschnitt 1.3, Abb. 2A), plausibel erklärt werden. Eine reduzierte dendritische Erregbarkeit aufgrund eines akuten I_{SA} -*Remodelings* wäre gegebenenfalls durch eine erhöhte Aktivierbarkeit der dendritischen $\text{K}_{\text{v}4.2}$ -Kanäle zu erklären. Dieses Ergebnis entspräche dem genauen Gegenteil der beschriebenen I_{SA} -Reduktion im chronischen Pilocarpin-Modell (vgl. Abschnitt 1.3 u. 4.1; Bernard *et al.*, 2004; Monaghan *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2008). Zudem besteht ein deutlicher Unterschied in der Lokalisation von akuten Effekten auf die dendritische Erregbarkeit in dieser Arbeit und den chronischen Auswirkungen einer Pilocarpin-induzierten TLE. Im chronischen Modell ist die geringere b-AP-Abschwächung eine funktionelle Konsequenz der verminderten Oberflächenexpression von $\text{K}_{\text{v}4.2}$ -Kanälen im distalen Abschnitt des Apikaldendriten von CA1-Pyramidenzellen und daher auf das *Stratum lacunosum-moleculare* des Hippocampus begrenzt (Abstand vom Soma $> 200 \mu\text{m}$; Bernard *et al.*, 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen hingegen eine erhöhte dendritische I_{SA} -Aktivierbarkeit nahe, die sich bereits in geringeren Abstand vom Soma ($25\text{-}195 \mu\text{m}$) im *Stratum radiatum* auf die b-AP-Abschwächung auswirkt (Abschnitt 3.3.2, Abb. 25). Es stellt sich daher die Frage, ob die zellulären Mechanismen, durch die der I_{SA} im chronischen Modell und möglicherweise

kurz nach dem SE moduliert wird, grundsätzlich divergent sind oder ob auch Parallelen existieren:

Es ist bekannt, dass im chronischen Modell eine verringerte Proteinsynthese sowie ein eingeschränkter Transport (*trafficking*) von $K_v4.2$ -Kanälen zur dendritischen Membran insgesamt zu einer verringerten Oberflächenexpression der Kanäle führt (Bernard *et al.*, 2004; Monaghan *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2008). Zur akuten Regulation der $K_v4.2$ -Expression nach einem SE wurden widersprüchliche Ergebnisse publiziert: CA1-Pyramidenzellen zeigen 24 Stunden nach der Injektion von Pilocarpin eine vermehrte Expression von $K_v4.2$ und KChIP1 (Su *et al.*, 2008). Innerhalb von 3-6 Stunden nach einem KA-induzierten SE kommt es hingegen zu einer leichten Reduktion von $K_v4.2$ -mRNA (Francis *et al.*, 1997). Abgesehen von diesen Unstimmigkeiten werden $K_v4.2$ -Kanäle nach der Proteinsynthese im Soma über relativ langwierige *trafficking*-Prozesse in den Apikaldendriten transportiert (Rivera *et al.*, 2003; Lai & Jan, 2006; Chu *et al.*, 2006). Im Gegensatz zum chronischen Modell scheint eine Veränderung der $K_v4.2$ -Expression als Mechanismus für eine akute I_{SA} -Regulation nach einem SE daher wenig wahrscheinlich.

Eine Parallele zwischen der möglichen akuten I_{SA} -Regulation in dieser Arbeit und den beschriebenen langfristigen Änderungen der I_{SA} -Funktion im chronischen Pilocarpin-Modell (Bernard *et al.*, 2004) könnte darin bestehen, dass die jeweiligen zellulären Mechanismen von der synaptischen Aktivität abhängig sind. Die unterschiedliche dendritische Lokalisation von Effekten einer akuten Übererregung (in dieser Arbeit; $< 200 \mu\text{m}$, *Stratum radiatum*) bzw. einer chronischen Epilepsie (Bernard *et al.*, 2004; $> 200 \mu\text{m}$, *Stratum lacunosum-moleculare*) könnte dabei durch eine Verlagerung der synaptischen Aktivität entlang des Apikaldendriten von CA1-Pyramidenzellen erklärt werden. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese tritt die Übererregung während eines KA-induzierten SE aufgrund einer sehr hohen Sensibilität von CA3-Pyramidenzellen gegenüber KA zuerst in der CA3-Region des Hippocampus auf (Vincent & Mulle, 2009). Diese Übererregung wird daraufhin über die Schaffer-Kollaterale im *Stratum radiatum* auf die CA1-Pyramidenzellen übertragen (Ben Ari & Cossart, 2000; Chen *et al.*, 2007) und könnte daher für die SE-induzierten Effekte auf die dendritische Erregbarkeit verantwortlich sein, die in dieser Arbeit innerhalb von $200 \mu\text{m}$ Abstand vom Soma auftraten. In der chronischen Phase des Pilocarpin- und KA-Modells ist dagegen ein Teil der CA3-Pyramidenzellen abgestorben (Covolani & Mello, 2000) und es kommt zu einer Reorganisation des Signalflusses innerhalb der Hippocampusformation.

Einerseits erhalten die Apikaldendriten der CA1-Pyramidenzellen im *Stratum radiatum* weniger synaptische Eingänge über die Schaffer-Kollateralen und der trisynaptische Schaltkreis (entorhinaler Kortex → GD → CA3 → CA1; vgl. Abschnitt 1.2, Abb.1) verliert an Bedeutung (Ben Ari & Cossart, 2000; Avoli *et al.*, 2002; Wu & Leung, 2003). Andererseits nimmt der synaptische Eingang der CA1-Pyramidenzellen im *Stratum lacunosum-moleculare* durch eine atypisch ausgeprägte monosynaptische Erregungsweiterleitung aus der Schicht III des entorhinalen Kortex zu (vgl. Abschnitt 1.2, Abb. 1; Shah *et al.*, 2004; Ang *et al.*, 2006). Dieser Zusammenhang könnte demnach für die beschriebenen Effekte einer Epilepsie auf die dendritische Erregbarkeit verantwortlich sein, die sich erst ab einem Abstand von 200 µm vom Soma auswirken (Bernard *et al.*, 2004).

Da vermutlich sowohl für die akute als auch für die langfristige Regulation des $K_{v4.2}$ -vermittelten I_{SA} eine Abhängigkeit von der synaptischen Aktivität vorliegt, könnten dabei jeweils sehr ähnliche Signalkaskaden beteiligt sein. So werden Veränderungen der präsynaptischen Glutamatausschüttung auf postsynaptischer Seite von metabotropen Glutamatrezeptoren und ionotropen NMDA-Glutamatrezeptoren detektiert und über nachgeschaltete Signalkaskaden in den Dendriten übermittelt (Waxman & Lynch, 2005; Niswender & Conn, 2010). An diesen postsynaptischen Signalkaskaden sind unter anderem die Kinasen PKA, PKC, ERK und CaMKII unmittelbar beteiligt (Sweatt, 2001). Über die entsprechenden Phosphorylierungsstellen am $K_{v4.2}$ -Kanalproteinkomplex (vgl. Abschnitt 1.4, Abb. 3; Jerng *et al.*, 2004b; Birnbaum *et al.*, 2004) könnte kurz nach dem SE und im chronischen Modell eine direkte Wechselwirkung mit dem I_{SA} stattgefunden haben. In Übereinstimmung damit ist sowohl im chronischen Pilocarpin-Modell (Bernard *et al.*, 2004) als auch akut nach einem KA-induzierten SE (Lugo *et al.*, 2008) in CA1-Pyramidenzellen ein erhöhter Anteil ERK-phosphorylierter $K_{v4.2}$ -Proteine nachweisbar. Aus *in vitro*-Experimenten ist bekannt, dass eine direkte Phosphorylierung von $K_{v4.2}$ -Kanälen durch die ERK zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung führt und die Amplitude des I_{SA} daraufhin effektiv reduziert wird (vgl. Abschnitt 1.4; Johnston *et al.*, 2000; Isbrandt *et al.*, 2000; Jerng *et al.*, 2004b; Schrader *et al.*, 2006). Im chronischen Pilocarpin-Modell wird die verringerte b-AP-Abschwächung demnach einerseits durch die partielle Reduktion der dendritischen $K_{v4.2}$ -Oberflächenexpression (siehe oben) hervorgerufen und andererseits durch eine erhöhte ERK-vermittelte Phosphorylierung der verbliebenen $K_{v4.2}$ -Kanäle verstärkt (Bernard *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu sind die verfügbaren Informationen über eine Regulation des $K_{v4.2}$ -vermittelten I_{SA} kurze Zeit nach

einem SE weniger einheitlich. Lugo und Mitarbeiter fanden innerhalb von 3 Stunden nach einem KA-induzierten SE in einem Gesamthomogenat aus CA1-Pyramidenzellen gegenüber Kontrollzellen einen gleichbleibenden Anteil an $K_v4.2$ -Proteinen (Lugo *et al.*, 2008). Gleichzeitig zeigte eine Synaptosomen-Präparation, dass es nach dem SE zu einer verringerten Oberflächenexpression von $K_v4.2$ -Kanälen in der postsynaptischen Membran der dendritischen Dornen (*spines*) gekommen war (Lugo *et al.*, 2008). Diese Befunde bestätigen einerseits die Annahme, dass wenige Stunden nach dem SE effektiv keine Regulation der $K_v4.2$ -Proteinexpression stattfindet (siehe oben) und stehen andererseits im Einklang mit einer aktivitätsabhängigen Regulation des I_{SA} . Unter der Annahme, dass diese Regulation auch in CA1-Pyramidenzellen der KA-behandelten Mäuse in dieser Arbeit aufgetreten ist, müsste man aufgrund der ERK-vermittelten Phosphorylierung und verringerten Dichte von $K_v4.2$ -Kanälen in der postsynaptischen Membran der *spines* von einer verringerten dendritischen I_{SA} -Verfügbarkeit ausgehen. Die dendritischen Ca^{2+} -*Imaging*-Daten deuten allerdings auf eine verstärkte b-AP-Abschwächung entlang des Apikaldendriten hin (Abschnitt 3.3, Abb. 24, 25A, B u. 26). Dieser offenbare Widerspruch könnte durch einen Vergleich mit publizierten *in vitro*-Ergebnissen entkräftet werden, in denen aktivitätsabhängige Mechanismen der $K_v4.2$ -Regulation sehr detailliert beschrieben wurden.

Unter experimentellen Bedingungen, die in direkter oder indirekter Weise zu einem erhöhten postsynaptischen Ca^{2+} -Einstrom durch NMDA-Glutamatrezeptoren führen, kommt es zu einer Internalisierung von $K_v4.2$ -Kanaluntereinheiten aus den dendritischen *spines* (Kim *et al.*, 2007; Lei *et al.*, 2008; Lei *et al.*, 2009). Für diesen Prozess spielen Ca^{2+} als sekundärer Botenstoff und die Phosphorylierung des $K_v4.2$ -Kanals eine zentrale Rolle (Kim *et al.*, 2007; Hammond *et al.*, 2008; Mulholland & Chandler, 2010; Nestor & Hoffman, 2011). Da während eines KA-induzierten SE ein starker Anstieg des NMDA-Rezeptor-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms stattfindet, der mit einer gesteigerten Aktivität verschiedener Kinasen verbunden ist (vgl. Abschnitt 4.1; Raza *et al.*, 2004; McNamara *et al.*, 2006), könnte dieser Mechanismus auch *in vivo* wirken. Dabei ist auffällig, dass die Reduktion von $K_v4.2$ -Kanalproteinkomplexen durch das aktivitätsabhängige *Remodeling*, *in vitro* und *in vivo* auf die postsynaptische Membran der *spines* beschränkt zu sein scheint (Kim *et al.*, 2007; Lugo *et al.*, 2008). *Spines* und Schaft des Dendriten stellen innerhalb des Neurons räumlich getrennte Kompartimente dar, die sich funktionell stark unterscheiden (Yuste & Denk, 1995; Araya *et al.*, 2006; Grunditz *et al.*, 2008). Aufgrund der Lokalisation von $K_v4.2$ -Kanälen in

der synaptischen Membran dendritischer *spines* und der extrasynaptischen Membran des Dendritenschafts (Kim *et al.*, 2005) kann der I_{SA} im Dendriten zwei verschiedene Aufgaben erfüllen: Der I_{SA} trägt im *spine* zur Abdämpfung von EPSPs bei und ist im Dendritenschaft für die aktive Unterdrückung der b-AP-Ausbreitung verantwortlich (vgl. Abschnitt 1.3; Yuste & Denk, 1995). Die aktivitätsabhängige Internalisierung von $K_{v4.2}$ führt daher einerseits zu einer verstärkten Effizienz der basalen synaptischen Übertragung und erleichtert andererseits deren langfristige Potenzierung (*long-term potentiation*, LTP; Kim *et al.*, 2007). Dies steht im Einklang mit einem *Remodeling* des I_{SA} , das spezifisch in den dendritischen *spines* abläuft (Kim *et al.*, 2007; Lugo *et al.*, 2008). Eine Untersuchung von funktionellen Effekten einer akuten aktivitätsabhängigen $K_{v4.2}$ -Internalisierung auf die Abschwächung der dendritischen b-APs liegt bislang nicht vor. Aufgrund der funktionellen Trennung von *spine* und Dendritenschaft wäre allerdings nicht zwangsläufig mit einer Beeinflussung der b-AP-Abschwächung zu rechnen. Eine aktuelle Studie weist darüber hinaus auf eine andersartige Regulation von $K_{v4.2}$ -Kanälen im Dendritenschaft hin, die parallel zur $K_{v4.2}$ -Internalisierung innerhalb der *spines* abläuft (Mulholland & Chandler, 2010). Erstaunlicherweise scheint das $K_{v4.2}$ -*Remodeling* außerhalb der dendritischen *spines* ebenfalls an die Aktivität von NMDA-Rezeptoren und der ERK gekoppelt zu sein (Mulholland & Chandler, 2010). Es ist bekannt, dass funktionelle NMDA-Rezeptoren in extrasynaptischen Bereichen der dendritischen Membran vorkommen (Petralia *et al.*, 2010). Aufgrund einer unterschiedlichen molekularen Zusammensetzung von synaptischen und extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren wird eine Aktivierung der ERK ausschließlich durch synaptische NMDA-Rezeptoren vermittelt (Krapivinsky *et al.*, 2003). Die Stimulation von extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren setzt hingegen eine Signalkaskade in Gang, die indirekt zu einer Inaktivierung der ERK führt (Ivanov *et al.*, 2006). Diese inverse Regulation der ERK spiegelt sich im Anteil von phosphorylierten $K_{v4.2}$ -Kanälen wider. Übereinstimmend mit den Ergebnissen früherer Studien (Hammond *et al.*, 2008; Lugo *et al.*, 2008) beschreiben Mulholland und Chandler nach erhöhter synaptischer Aktivität eine vermehrte Phosphorylierung von $K_{v4.2}$ -Kanälen durch die ERK. Nach einer spezifischen Aktivierung von extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren liegen die $K_{v4.2}$ -Kanäle dagegen vermehrt in dephosphorylierter Form vor (Mulholland & Chandler, 2010).

Die präsynaptische Glutamatausschüttung ist unter physiologischen Bedingungen strikt auf den synaptischen Spalt begrenzt. In der Hippocampusformation wird extrazelluläres Glutamat in sehr kurzer Zeit (< 1 ms) durch hochaffine Glutamatttransporter in

Astrogliazellen aufgenommen und so aus dem synaptischen Spalt entfernt (Diamond, 2005). Unter den pathophysiologischen Bedingungen während eines epileptischen Anfalls kommt es etwa zeitgleich zu einer erhöhten präsynaptischen Glutamatfreisetzung und zu einer verminderten Effizienz der Glutamataufnahme in Astrogliazellen (Misonou, 2010). In der Folge entsteht ein Glutamatüberschuss, der sich bis in extrasynaptische Bereiche ausbreiten kann (Misonou, 2010). Dieser Effekt wird als "Glutamat-spill-over" bezeichnet. Nach einer pharmakologischen Blockade der glialen Glutamattransporter, die zu einem vergleichbaren *spill-over*-Effekt führt, ist ein erhöhter Anteil dephosphorylierter $K_v4.2$ -Kanäle nachweisbar (Mulholland & Chandler, 2010). Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass der Glutamat-spill-over während des SE über extrasynaptische NMDA-Rezeptoren eine geringere ERK-Aktivität im Dendritenschaft hervorruft und daraufhin zur Dephosphorylierung von $K_v4.2$ -Kanälen führt. Dieser Mechanismus weist starke Parallelen zu einer Ca^{2+} -abhängigen Dephosphorylierung von $K_v2.1-\alpha$ -Untereinheiten auf, die ebenfalls durch die Aktivierung von extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren ausgelöst wird (Mulholland *et al.*, 2008). Die Dephosphorylierung des $K_v2.1$ -Kanals führt zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in Richtung hyperpolarisierter Potenziale und daher effektiv zu einer Potenzierung des $I_{K,DR}$ (Park *et al.*, 2006; Mulholland *et al.*, 2008). Es ist möglich, dass die Serin-Threonin Phosphatase Calcineurin kurz nach einem SE aktiv zur Dephosphorylierung von $K_v2.1$ beiträgt und so einen zellulären Schutzmechanismus gegenüber Übererregung darstellt (Mohapatra *et al.*, 2009; Misonou, 2010). Eine vergleichbare Erhöhung der I_{SA} -Amplitude aufgrund einer aktiven $K_v4.2$ -Dephosphorylierung ist bisher nicht beschrieben worden. Allerdings bewirkt die gezielte Inhibition der ERK in CA1-Pyramidenzellen eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der I_{SA} -Aktivierung in Richtung hyperpolarisierter Potenziale, durch die es zur verstärkten b-AP-Abschwächung im Apikaldendriten kommt (Watanabe *et al.*, 2002). Es wurde daher angenommen, dass der $K_v4.2$ -Kanal normalerweise durch eine tonische ERK-vermittelte Phosphorylierung reguliert wird und die Aufhebung dieser Phosphorylierung ausreicht um den I_{SA} zu verstärken (Jerng *et al.*, 2004b; Yuan *et al.*, 2002).

Unter der Annahme, dass sich die *in vitro* beschriebenen Mechanismen der aktivitätsabhängigen $K_v4.2$ -Regulation auf die *in vivo* Situation während eines SE übertragen lassen, kann man folgende Hypothese aufstellen: In der vorliegenden Arbeit aktivierte die

Glutamatausschüttung während des KA-induzierten SE gleichzeitig synaptische und extrasynaptische NMDA-Rezeptor-vermittelte Signalkaskaden, die zur gegensätzlichen Regulation der ERK-Aktivität in *spine* und Dendritenschaft geführt haben. In der Folge kam es im *spine* zu einer Phosphorylierung und/oder Internalisierung von $K_v4.2$ -Kanälen und einem verminderten I_{SA} . Davon unabhängig fand durch eine geringere Phosphorylierung von $K_v4.2$ -Kanälen im dendritischen Schaft eine Verstärkung des I_{SA} statt, die zu der verstärkten Abschwächung des b-APs bzw. des b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Einstroms entlang des Apikaldendriten geführt hat.

4.3 Wirkung von NS5806 auf die AP-Dynamik von CA1-Pyramidenzellen

Durch NS5806 (N-[3,5-bis(Trifluoromethyl)Phenyl]-N'-[2,4-Dibromo-6-(1H-Tetrazol-5-yl)Phenyl]-Harnstoff, 20 mM, vgl. Abschnitt 2.8) kam es entlang des Apikaldendriten von CA1-Pyramidenzellen zu einer verstärkten Abschwächung der b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Transienten (Abschnitt 3.4.2, Abb. 30, 31 und 32). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer erwarteten Potenzierung des $K_v4.2$ -vermittelten I_{SA} durch den " K_v4 -Aktivator" NS5806 (vgl. Abschnitt 1.4; Calloe *et al.*, 2009), die offenbar zu einer verstärkten dendritischen b-AP-Abschwächung geführt hat. Diese Vermutung kann allerdings nicht mit absoluter Sicherheit bestätigt werden, da in dieser Arbeit keine unmittelbare Messung des b-APs oder des I_{SA} durch dendritische *Patch-Clamp*-Ableitungen durchgeführt wurde. Im Gegensatz zu NS5806 wurde die Wirkung des A-Typ-Kanal-Blockers 4-AP (4-Aminopyridin) auf den I_{SA} bereits vielfach dokumentiert. Es ist bekannt, dass die in dieser Arbeit verwendete 4-AP-Konzentration (5 mM, vgl. Abschnitt 2.8) in CA1-Pyramidenzellen eine massive Reduktion des somatodendritischen I_{SA} hervorruft und es daraufhin zu einer stark verringerten b-AP-Abschwächung kommt (Hoffman *et al.*, 1997; Bernard & Johnston, 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen unter dem Einfluss von 4-AP eine stark eingeschränkte Abschwächung der b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Transienten (Abschnitt 3.4.2, Abb. 29, 31 und 32) und stimmen daher mit der bekannten Wirkung von 4-AP überein (Hoffman *et al.*, 1997; Bernard & Johnston, 2003). Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen (Abschnitt 2.1, 2.3-2.8 u. 2.9.2) durch 4-AP, aber auch durch NS5806 eine direkte Beeinflussung des I_{SA} hervorgerufen wurde und sich die dendritische

Funktion des I_{SA} in der Abschwächung der b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Transienten widerspiegelte.

Die Zugabe von NS5806 führte vor allem in weiter distal gelegenen Dendritenabschnitten zu einer verstärkten Abschwächung b-AP-assoziiertes Ca^{2+} -Signale (Abschnitt 3.4.2, Abb.30 u. 31B). Im Wesentlichen entspricht die verstärkte Signal-Abschwächung mit NS5806 aber den beobachteten Auswirkungen des KA-induzierten SE (vgl. Abschnitt 3.3; 4.2.3). Diese Übereinstimmung könnte darauf hindeuten, dass in beiden Fällen eine Verstärkung des I_{SA} im Apikaldendriten von CA1-Pyramidenzellen stattgefunden hat. Im Gegensatz dazu lässt sich die Wirkung von NS5806 auf somatische APs (Abschnitt 3.4.1) nicht direkt mit den entsprechenden Auswirkungen eines SE vergleichen (Abschnitt 3.2.4). Zum einen veränderte sich durch die Anwesenheit von NS5806 weder die AP-Schwelle noch die AP-Latenzzeit (Abschnitt 3.4.1, Abb. 27A). Im Gegensatz zu den SE-induzierten Effekten (vgl. Abschnitt 4.2.1), kommt es durch NS5806 daher offenbar zu keiner Beeinträchtigung der AP-Entstehung. Zum anderen bildete NS5806 die SE-induzierten Veränderungen des somatischen AP-Verlaufs nur teilweise nach: Einerseits verliefen mit NS5806, ähnlich wie nach dem SE (vgl. Abschnitt 3.2.4, Abb.23A, B u. D; Abschnitt 4.2.2), AP-Aufstrich und AP-Repolarisation weniger steil, was zu einer vergrößerten APD_{50} führte (Abschnitt 3.4.1.1, Abb. 27A, C u. E). Andererseits kam es mit NS5806, anders als nach dem SE (vgl. Abschnitt 3.2.4, Abb. 23C, F u. G; Abschnitt 4.2.2), zu einer geringeren AP-Amplitude und zu einem nahezu vollständigen Verlust der AP-N (Abschnitt 3.4.1.2, Abb. 27A u. D, 28A-C). Insgesamt werden durch den Vergleich von SE-induzierten und NS5806-verursachten Effekten auf den somatischen AP-Verlauf zwei Aspekte deutlich:

1. NS5806 und der SE haben in CA1-Pyramidenzellen vermutlich nicht nur zu einem veränderten I_{SA} geführt, sondern hatten auch Auswirkungen auf andere Ionenströme. Im Falle des SE ist dies angesichts der vielen potenziellen Signalwege und Mechanismen, die zu aktivitätsabhängiger intrinsischer Plastizität führen können, weniger überraschend (vgl. Abschnitt 4.1 u. 4.2). Für NS5806 hätte man eine spezifische Wirkung erwarten können.
2. Mögliche unspezifische Wechselwirkungen von NS5806 mit Ionenströmen, die nicht von $K_v4.2$ -Kanälen vermittelt werden, erschweren die Interpretation der unterschiedlich starken Abschwächung b-AP-assoziiertes Ca^{2+} -Signale in An- bzw. Abwesenheit von NS5806.

Die Wirkung von NS5806 wurde bislang hauptsächlich anhand von nativen K^+ -, Na^+ - und Ca^{2+} -Strömen in Myozyten des Hundes beschrieben (Calloe *et al.*, 2009, 2010, 2011). In einer weiteren Publikation wurden Effekte von NS5806 auf die Ströme verschiedener heterolog exprimierter K_v -Kanäle analysiert (Lundby *et al.*, 2010). Die Auswahl der exprimierten Ionenkanal-Familien bzw. Isoformen beschränkte sich dabei auf die bekannten molekularen Korrelate von K^+ -Strömen in Myozyten (Lundby *et al.*, 2010). Eine Untersuchung von potenziellen NS5806-Effekten auf heterolog exprimierte Na^+ - oder Ca^{2+} -Ströme liegt bislang nicht vor. Da einige Na_v -, Ca_v - und K_v -Kanal-Isoformen in CA1-Pyramidenzellen vorkommen, die in Myozyten nicht vertreten sind (vgl. Abschnitt 1.3, Abb. 2; Gutman *et al.*, 2005; Catterall *et al.*, 2005a; Catterall *et al.*, 2005b), kann ein direkter Effekt von NS5806 auf viele neuronale K^+ -, Na^+ - und Ca^{2+} -Stöme nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Erste Hinweise auf diese möglichen direkten Effekte von NS5806 in CA1-Pyramidenzellen können von den beobachteten Veränderungen des somatischen AP-Verlaufs abgeleitet werden (Abschnitt 3.4.1). Der AP-Verlauf wird durch die kooperative Aktivität verschiedener Ionenströmen während der aufeinander folgenden AP-Phasen bestimmt (Aufstrich, Repolarisation und AP-N; Bean, 2007; Baranauskas, 2007; siehe Abschnitt 1.3). Daher ergibt sich prinzipiell die Möglichkeit, dass NS5806 die Veränderungen im somatischen AP-Verlauf durch eine parallele Beeinflussung mehrerer Ionenströme hervorruft oder dass die Beeinflussung einiger weniger Ionenströme ausreicht um die Abfolge der AP-Phasen zu stören. Im letzteren Fall würden die beschriebenen Veränderungen des AP-Aufstrichs, der AP-Amplitude, der APD_{50} und des Integral AP-N zumindest teilweise voneinander abhängen (vgl. Abschnitt 4.2.2).

Die Verlangsamung des AP-Aufstrichs und die Reduktion der AP-Amplitude, die nach 10 Minuten mit NS5806 eintraten (Abschnitt 3.4.1, Abb. 27C u. D), könnten auf eine Beeinträchtigung des transienten I_{Na} hindeuten. Es ist jedoch bemerkenswert, dass die AP-Schwelle durch NS5806 offensichtlich nicht verändert wurde (Abschnitt 3.4.1, Abb. 27A). Dies könnte bedeuten, dass NS5806 eine Reduktion des I_{Na} verursacht, diese aber nicht durch eine Änderung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung hervorgerufen wird. Da die Verfügbarkeit des I_{Na} sehr empfindlich vom stationären Membranpotenzial abhängt (vgl. Abschnitt 4.2.1; Magee & Johnston, 1995), könnte eine NS5806-verursachte Reduktion des I_{Na} alternativ dazu mit einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der *Steady-State*-Inaktivierung erklärt werden. In diesem Fall wäre die Wirkung von NS5806 auf den neuronalen I_{Na} von CA1-Pyramidenzellen direkt mit einer teilweisen Reduktion des

kardialen I_{Na} vergleichbar, wie sie in linksventrikulären Hundemyozyten beobachtet wurde (Calloe *et al.*, 2009, 2011). In Myozyten wird die NS5806-verursachte Reduktion des I_{Na} durch eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der *Steady-State*-Inaktivierung hervorgerufen und ist daher bei weniger negativen stationären Membranpotenzialen besonders stark ausgeprägt (Calloe *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurden die CA1-Pyramidenzellen vor den CC- und Ca^{2+} -*Imaging*-Experimenten durch ausgleichende Strominjektionen auf ein sehr negatives Membranpotenzial voreingestellt (-70 mV; Abschnitt 2.7.3, Abb. 9 u. 11). Man könnte daher vermuten, dass eine mögliche Reduktion des neuronalen I_{Na} durch NS5806, infolge einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der *Steady-State*-Inaktivierung, eher moderat ausgeprägt war.

Die Gegenüberstellung des AP-Verlaufs vor bzw. nach der 10-minütigen Einwirkung von NS5806 (Abschnitt 3.4.1.1, Abb. 27A) zeigt deutlich, dass die Verlängerung der APD_{50} größtenteils von der verlangsamten AP-Repolarisation verursacht wird. In der Phase der AP-Repolarisation fällt die Inaktivierung des I_{Na} mit der Aktivierung repolarisierender K^+ -Ströme zusammen. Es ist daher denkbar, dass NS5806 die Geschwindigkeit der I_{Na} -Inaktivierung verzögert und daraufhin zu einer verlangsamten AP-Repolarisation führt. Diese Spekulation ist verlockend, da auf diese Weise sowohl die Veränderungen des AP-Aufstrichs und der AP-Amplitude als auch die Veränderungen der AP-Repolarisation allein durch eine Wechselwirkung von NS5806 mit Na_v -Kanälen erklärbar wären. Es ist aber ebenso möglich, dass NS5806 durch eine Reduktion von repolarisierenden K^+ -Strömen zu der vergrößerten APD_{50} führt. Die Repolarisation von somatischen APs hängt in CA1-Pyramidenzellen maßgeblich vom $I_{K,DR}$ und I_C ab (Bean, 2007; Abschnitt 1.3 u. 4.2.2). Ob NS5806 einen Einfluss auf den $K_v2.1$ - bzw. K_v3 -vermittelten $I_{K,DR}$ oder den BK-vermittelten I_C hat, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Da der $K_v4.2$ -vermittelte I_{SA} in CA1-Pyramidenzellen für die Repolarisation von somatischen APs eine untergeordnete Rolle spielt (vgl. Abschnitt 4.2.2; Bean, 2007), stellt die verlangsamte AP-Repolarisation jedenfalls nicht zwangsläufig einen Widerspruch zur möglichen NS5806-verursachten Potenzierung des I_{SA} im Dendriten dar.

Die Bezeichnung "K_v4-Aktivator" basiert auf der potenzierenden Wirkung von NS5806 auf die K_v4 -vermittelte Komponente des transienten Auswärts- K^+ -Strom I_{TO} (*transient outward K^+ current*; Niwa & Nerbonne, 2010) in linksventrikulären Hunde-Myozyten (Calloe *et al.*,

2009). In VC-Ableitungen an Myozyten erhöht NS5806 die Amplitude des I_{TO} und führt gleichzeitig zu einer stark verzögerten Inaktivierung des gemessenen Stroms. Insgesamt wird die maximale Ladungsmenge des I_{TO} dadurch knapp verdreifacht (Calloe *et al.*, 2009). Die Ströme von heterolog exprimierten $K_v4.3/KChIP2$ - und $K_v4.3/KChIP2/DPP6$ -Komplexen (K_v -Kanal-Interagierende Proteine, KChIPs und Dipeptidylaminopeptidase-verwandte Proteine, DPPs; vgl. Abschnitt 1.4) als mögliche molekulare Korrelate des nativen I_{TO} von Hundemyozyten zeigen mit NS5806 ebenfalls eine erhöhte Amplitude und eine stark verzögerte Inaktivierung (Calloe *et al.*, 2010; Lundby *et al.*, 2010). Die molekulare Zusammensetzung der jeweiligen K_v4 -Kanalproteinkomplexe, die den kardialen I_{TO} bzw. den neuronalen I_{SA} vermitteln, ist sehr ähnlich, aber nicht vollkommen identisch (Isbrandt *et al.*, 2000; Birnbaum *et al.*, 2004). Im Gegensatz zum I_{TO} , dem speziesabhängig Kanalproteinkomplexe aus $K_v4.2$ und/oder $K_v4.3$ zugrunde liegen (Nerbonne, 2000), wird der I_{SA} in CA1-Pyramidenzellen ausschließlich durch $K_v4.2$ -Homomere vermittelt (Serôdio & Rudy, 1998; Rhodes *et al.*, 2004). Zudem unterscheiden sich die jeweiligen Kanalproteinkomplexe teilweise durch die beteiligten akzessorischen β -Untereinheiten (KChIPs und DPPs; vgl. Abschnitt 1.4). NS5806 könnte in CA1-Pyramidenzellen aufgrund der spezifischen Kanalzusammensetzung ($K_v4.2$ mit KChIP2, KChIP4 und DPP6; Rhodes *et al.*, 2004; vgl. Abschnitt 1.4) andere Effekte erzielen als im Myokard von Hunden ($K_v4.3$ mit KChIP2, DPP6, möglicherweise $minK$ und $K_v\beta$; Niwa *et al.*, 2010). So deuten einige veröffentlichte Ergebnisse auf eine unterschiedliche Wirkung von NS5806 auf $K_v4.2$ - bzw. $K_v4.3$ -vermittelte Ströme hin. Im Gegensatz zu den Strömen von heterolog exprimierten $K_v4.3/KChIP2$ -Komplexen verursacht NS5806 bei Strömen von $K_v4.2/KChIP2$ -Komplexen eine weitaus geringere Potenzierung der Amplitude (Lundby *et al.*, 2010). Die Amplitude des weitgehend $K_v4.2$ -vermittelten I_{TO} der Maus wird durch NS5806 tendenziell sogar verringert (Szlachta, 2010). In beiden Fällen führt NS5806 jedoch zu einer starken Verzögerung der Strom-Inaktivierung und einer deutlich erhöhten transportierten Ladungsmenge (Lundby *et al.*, 2010; Szlachta, 2010). Unter der Annahme, dass die Wirkung von NS5806 von der gegenwärtigen K_v4 -Isoform abhängt, könnte eine Potenzierung des $K_v4.2$ -vermittelten I_{SA} auch in der vorliegenden Arbeit vor allem durch eine verzögerte Inaktivierung und weniger durch eine erhöhte Amplitude hervorgerufen worden sein. Von dieser Hypothese lassen sich mögliche Veränderungen der I_{SA} -Funktion ableiten, die mit den beobachteten Auswirkungen von NS5806 im Einklang stehen:

1. Der I_{SA} kann einem kurzfristigen Anstieg des Membranpotenzials durch eine sehr schnelle Aktivierung bereits unterhalb der AP-Schwelle effektiv entgegenwirken und so die Entstehung von somatischen APs aufhalten (Strom *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2005; Abschnitt 1.3 u. 4.2.1) bzw. die Ausbreitung von dendritischen b-APs abschwächen (Hoffman *et al.*, 1997; Johnston *et al.*, 1999; Abschnitt 1.3 u. 4.2.3). Diese Funktionen des I_{SA} hängen offenkundig vom Ausmaß der Aktivierung ab und würden nach einer alleinigen Verzögerung der Inaktivierung durch NS5806 nicht zwangsläufig verstärkt. In Übereinstimmung damit wurde die AP-Latenzzeit der somatischen APs durch NS5806 nicht beeinflusst (Abschnitt 3.4.1.1, Abb. 27A) und die Abschwächung des b-AP assoziierten Ca^{2+} -Signals unterschied sich mit NS5806 im proximalen Dendriten ($< 50 \mu\text{m}$ Abstand vom Soma) zunächst nicht wesentlich von der Abschwächung in den Kontrollzellen (Abschnitt 3.4.2, Abb. 30, 31B).
2. Der Aktivitätszeitraum des I_{SA} wird durch eine schnelle Inaktivierung begrenzt, so dass der I_{SA} beispielsweise im Anschluss an ein somatisches AP kurzzeitig nicht verfügbar ist (Jerng *et al.*, 2004) und die AP-N in CA1-Pyramidenzellen in der Regel nicht beeinflusst (Bean, 2007). Diese zeitliche Begrenzung der I_{SA} -Aktivität wäre nach einer Verzögerung der Inaktivierung durch NS5806 vermutlich geringer und der I_{SA} folglich im Zuge eines somatischen APs bzw. eines dendritischen b-APs länger aktiv. Im Soma könnte dies einerseits zum Verlust der AP-N geführt haben (Abschnitt 3.4.1.2, Abb. 28). Vor allem in weiter distal gelegenen Dendritenabschnitten ($> 50 \mu\text{m}$ Abstand vom Soma), in denen der Verlauf von b-APs mit zunehmendem Abstand vom Soma normalerweise breiter und flacher wird (Golding *et al.*, 2001; vgl. Abschnitt 1.3, Abb. 2B), könnte eine längere I_{SA} -Aktivität andererseits die Effektivität der b-AP-Abschwächung erhöht haben.

Demnach könnte eine Verzögerung der I_{SA} -Inaktivierung durch NS5806 ausreichend sein, um die vergleichsweise selektive Verstärkung b-AP-assoziierter Ca^{2+} -Signale im distalen Dendritenabschnitt und den Verlust der AP-N im somatischen AP plausibel zu erklären. Allerdings gibt es weitere denkbare Alternativen: Das Ausmaß der AP-N wird in der Regel durch den K_v7 -vermittelten I_M und den K_v1 -vermittelten I_D begrenzt (Yue & Yaari, 2006; Metz *et al.*, 2007; vgl. Abschnitt 4.2.2). Eine Verstärkung dieser Ströme durch NS5806 könnte daher prinzipiell für den Verlust der AP-N verantwortlich sein. Bisher wurde

nachgewiesen, dass NS5806 keinerlei potenzierende Wirkung auf die Ströme von heterolog exprimierten $K_v7.1$ -Kanälen hat und die Ströme von $K_v1.4$ -Kanälen durch NS5806 reduziert werden (Lundby *et al.*, 2010). Da der I_M in CA1-Pyramidenzellen jedoch ausschließlich durch $K_v7.2/K_v7.3$ -Heteromere vermittelt wird (Brown & Passmore, 2009) und dem I_D vermutlich nicht $K_v1.4$ -Kanäle, sondern andere Isoformen der K_v1 -Familie zugrunde liegen (Vacher *et al.*, 2008), kann eine direkte potenzierende Wirkung von NS5806 auf den I_M oder den I_D nicht völlig ausgeschlossen werden. Des Weiteren besteht grundsätzlich die Möglichkeit, dass NS5806 Ströme reduziert hat, die normalerweise für die Ausbildung der AP-N verantwortlich sind. In CA1-Pyramidenzellen sind das der persistierende $I_{Na,P}$ in Verbindung mit einer Ca^{2+} -getragenen Komponente, die durch den $I_{Ca,R}$ vermittelt wird (Yue *et al.*, 2005; Metz *et al.*, 2005; vgl. Abschnitt 1.3 u. 4.2.2). Aufgrund der beschriebenen Reduktion des transienten kardialen I_{Na} durch NS5806 (Calloe *et al.*, 2009, 2011), die sich möglicherweise auf den neuronalen I_{Na} in dieser Arbeit übertragen lässt (siehe oben), scheint eine direkte Wirkung von NS5806 auf den $I_{Na,P}$ nicht unwahrscheinlich. Allerdings ist eine unmittelbare Vergleichbarkeit nicht zwangsläufig gegeben, da der $I_{Na,P}$ in CA1-Pyramidenzellen im Wesentlichen durch $Na_v1.6$ vermittelt wird (Burbidge *et al.*, 2002) und diese Na_v -Isoform in Hundemyozyten nicht vorkommt (Valdivia *et al.*, 2005). Für eine Reduktion von Ca^{2+} -Strömen durch NS5806 gibt es in dieser Arbeit keinerlei Anzeichen. Zumindest in der Nähe des Somas und im proximalen Dendritenabschnitt ($< 50 \mu m$) lag mit NS5806 gegenüber der Kontrolle keine Beeinträchtigung des b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Signals vor (Abschnitt 3.4.2, Abb. 30 u. 31B; Tab. 10). Im Mittel lag das prozentuale Signal mit NS5806 in diesem Bereich sogar etwas über den Werten der Kontrolle (Abschnitt 3.4.2, Abb. 31A). Es ist möglich, dass dieser Effekt von NS5806 ähnlich wie nach einem KA-induzierten SE (vgl. Abschnitt 4.2.2) mit den gegenüber der Kontrolle vergrößerten APD_{50} -Werten zusammenhängt (Abschnitt 3.4.1.1, Abb. 27A u. E). Eine direkte Beeinträchtigung des $I_{Ca,R}$, der vor allem im Soma von CA1-Pyramidenzellen lokalisiert ist (Yokoyama *et al.*, 1995; Abschnitt 1.3, Abb. 2A) kann als Ursache für den NS5806-verursachten Verlust der AP-N jedenfalls nahezu ausgeschlossen werden. Wechselwirkungen von NS5806 mit weiteren Ca^{2+} -Strömen von CA1-Pyramidenzellen ($I_{Ca,L}$, $I_{Ca,N}$ und $I_{Ca,T}$; Abschnitt 1.3, Abb.2) sind ebenfalls eher unwahrscheinlich. In Anbetracht dessen kann man bei der Interpretation der dendritischen Ca^{2+} -*Imaging*-Daten von einer tatsächlichen Beeinflussung der b-AP-Amplitude durch NS5806 ausgehen. Zum jetzigen Zeitpunkt kann allerdings nicht

einwandfrei geklärt werden, welchem Anteil eine Potenzierung des I_{SA} bzw. eine Reduktion des I_{Na} an der verstärkten Abschwächung des b-AP-assoziierten Ca^{2+} -Signals hatte.

Insgesamt könnten die Effekte von NS5806 auf den somatischen AP-Verlauf und die Abschwächung b-AP-assoziiertes Ca^{2+} -Signale, die in dieser Arbeit aufgetreten sind, allein durch eine Beeinflussung von K_v4 - und Na_v -vermittelten Strömen (I_{SA} und I_{Na}) erklärt werden, die weitgehend mit der beschriebenen Wirkung von NS5806 in linksventrikulären Myozyten vergleichbar sind (Potenzierung des K_v4 -vermittelten I_{TO} , Reduktion des kardialen I_{Na} ; Calloe *et al.*, 2009, 2010, 2011). Für die durch NS5806 verlangsamte AP-Repolarisation und den Verlust der AP-N gibt es allerdings verschiedene alternative Erklärungen. Um diese Alternativen eindeutig auszuschließen zu können, ist eine unmittelbare und umfangreiche Charakterisierung von möglichen NS5806-Effekten auf einzelne neuronale Ionenströme erforderlich.

4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert deutliche Hinweise auf Mechanismen der intrinsischen Plastizität, die in CA1-Pyramidenzellen bereits kurz nach einem KA-induzierten SE auftreten. Diese akuten Veränderungen führen vermutlich zu einer verstärkten b-AP-Abschwächung entlang des Apikaldendriten und zu einer überwiegend beeinträchtigten axosomatischen AP-Entstehung nach kurzen Depolarisationen. Da diese Eigenschaften dem genauen Gegenteil von leicht erregbarer Nervenzellen in der chronischen Phase vergleichbarer Epilepsie-Modelle entsprechen (Bernard *et al.*, 2004; Remy *et al.*, 2010), könnte es sich bei den Befunden in dieser Arbeit um homöostatische Schutzanpassungen der Zelle nach einem SE handeln. Die Reduktion der dendritischen und axosomatischen Erregbarkeit direkt nach dem SE deutet auf ein *Remodeling* des somatodendritischen I_{SA} und des transienten I_{Na} hin. Die An- bzw. Abwesenheit eines *notch* im AP von KA[n]- bzw. KA[x]-Zellen ist am wahrscheinlichsten durch ein *Remodeling* des I_C zu erklären. In zukünftigen Experimenten sollten diese ersten Hinweise auf ein akutes *Remodeling* von I_{SA} , I_{Na} und I_C durch direkte elektrophysiologische Messungen dieser Ströme unter möglichst ähnlichen Bedingungen und am selben Modell verifiziert werden. Insbesondere sollte überprüft werden, ob eine I_{SA} -Potenzierung im Apikaldendriten stattfindet und ob diese von der Aktivierung extrasynaptischer Signalkaskaden abhängig ist. Durch die Anwendung molekularer Techniken könnte die Beschreibung von akuten Veränderungen der entsprechenden Ionenkanäle, wie etwa der Anteil phosphorylierter Kanalproteine, weiter ausgebaut werden. In einem weiteren Schritt könnten Variablen, wie z.B. das Alter der Tiere und der Zeitpunkt der Messungen nach dem SE variiert werden. Zudem könnten weitere Modell-Systeme zum Vergleich genutzt werden. Nur auf diese Weise können allgemeine Prinzipien der Epileptogenese erkannt werden. Durch adäquate, möglichst lückenlose Vergleichsmöglichkeiten könnte eine Unterscheidung getroffen werden zwischen Ergebnisse dieser Arbeit, die mit dem Auftreten von spontanen Anfällen in der chronischen Phase des KA-Modells in Zusammenhang stehen und Ergebnissen, die von der Epileptogenese unabhängige Mechanismen einer initialen Schutzanpassungen darstellen. Ein tieferes Verständnis solcher zellulären Schutzmechanismen könnte in Zukunft dazu beitragen eine Epileptogenese bei Menschen mit erhöhtem Risiko für neuronale Übererregbarkeit zu vermeiden.

5 Literatur

- Amaral D & Lavenex P (2007). Hippocampal Neuroanatomy. In *The Hippocampus Book*, eds. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, & O'Keefe J, pp. 37-114. Oxford University Press, New York.
- Amarillo Y, De Santiago-Castillo JA, Dougherty K, Maffie J, Kwon E, Covarrubias M, & Rudy B (2008). Ternary Kv4.2 channels recapitulate voltage-dependent inactivation kinetics of A-type K⁺ channels in cerebellar granule neurons. *J Physiol* **586**, 2093-2106.
- An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, & Rhodes KJ (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* **403**, 553-556.
- Andersen P, Bliss T, & Skrede K (1971). Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp Brain Res* **13**, 222-238.
- Ang CW, Carlson GC, & Coulter DA (2006). Massive and specific dysregulation of direct cortical input to the hippocampus in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **26**, 11850-11856.
- Araya R, Jiang J, Eisenthal KB, & Yuste R (2006). The spine neck filters membrane potentials. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 17961-17966.
- Aronica E, Boer K, Doorn KJ, Zurolo E, Spliet WGM, van Rijen PC, Baayen JC, Gorter JA, & Jeromin A (2009). Expression and localization of voltage dependent potassium channel Kv4.2 in epilepsy associated focal lesions. *Neurobiol Dis* **36**, 81-95.
- Aronica E, Yankaya B, Troost D, Van Vliet EA, Da Silva FHL, & Gorter JA (2001). Induction of neonatal sodium channel II and III α -isoform mRNAs in neurons and microglia after status epilepticus in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **13**, 1261-1266.
- Ashwood TJ, Lancaster B, & Wheal HV (1986). Intracellular electrophysiology of CA1 pyramidal neurones in slices of the kainic acid lesioned hippocampus of the rat. *Exp Brain Res* **62**, 189-198.
- Avoli M, D'Antuono M, Louvel J, Köhling R, Biagini G, Pumain R, D'Arcangelo G, & Tancredi V (2002). Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog Neurobiol* **68**, 167-207.
- Bähring R, Dannenberg J, Peters HC, Leicher T, Pongs O, & Isbrandt D (2001). Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J Biol Chem* **276**, 23888-23894.

- Barghaan J, Tozakidou M, Ehmke H, & Bähring R (2008). Role of N-terminal domain and accessory subunits in controlling deactivation-inactivation coupling of Kv4.2 channels. *Biophys J* **94**, 1276-1294
- Bannister NJ & Larkman AU (1995). Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: I. Branching patterns. *J Comp Neurol* **360**, 150-160.
- Baranauskas G (2007). Ionic channel function in action potential generation: Current perspective. *Mol Neurobiol* **35**, 129-150.
- Barmashenko G, Schmidt M, & Hoffmann KP (2005). Differences between cation-chloride co-transporter functions in the visual cortex of pigmented and albino rats. *Eur J Neurosci* **21**, 1189-1195.
- Barnwell LFS, Lugo JN, Lee WL, Willis SE, Gertz SJ, Hrachovy RA, & Anderson AE (2009). Kv4.2 knockout mice demonstrate increased susceptibility to convulsant stimulation. *Epilepsia* **50**, 1741-1751.
- Bean BP (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* **8**, 451-465.
- Beck H & Yaari Y (2008). Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nat Rev Neurosci* **9**, 357-369.
- Becker AJ, Pitsch J, Sochivko D, Opitz T, Staniek M, Chen CC, Campbell KP, Schoch S, Yaari Y, & Beck H (2008). Transcriptional upregulation of Cav3.2 mediates epileptogenesis in the pilocarpine model of epilepsy. *J Neurosci* **28**, 13341-13353.
- Ben Ari Y & Dudek FE (2010). Primary and secondary mechanisms of epileptogenesis in the temporal lobe: there is a before and an after. *Epilepsy Curr* **10**, 118-125.
- Ben Ari Y & Cossart R (2000). Kainate, a double agent that generates seizures: Two decades of progress. *Trends Neurosci* **23**, 580-587.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, & Scheffer IE (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* **51**, 676-685.
- Bernard C, Anderson A, Becker A, Poolos NP, Beck H, & Johnston D (2004). Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science* **305**, 532-535.
- Bernard C & Johnston D (2003). Distance-dependent modifiable threshold for action potential back-propagation in hippocampal dendrites. *J Neurophysiol* **90**, 1807-1816.
- Bezanilla F (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* **80**, 555-592.

- Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, & Zong X (2009). Hyperpolarization-activated cation channels: From genes to function. *Physiol Rev* **89**, 847-885.
- Birnbaum SG, Varga AW, Yuan LL, Anderson AE, Sweatt JD, & Schrader LA (2004). Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiol Rev* **84**, 803-833.
- Bischofberger J, Engel D, Li L, Geiger JR, & Jonas P (2006). Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nat Protocols* **1**, 2075-2081.
- Brewster AL, Bernard JA, Gall CM, & Baram TZ (2006). Formation of heteromeric hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the hippocampus is regulated by developmental seizures. *Neurobiol Dis* **19**, 200-207.
- Brown DA & Passmore GM (2009). Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br J Pharmacol* **156**, 1185-1195.
- Burbidge SA, Dale TJ, Powell AJ, Whitaker WRJ, Xie XM, Romanos MA, & Clare JJ (2002). Molecular cloning, distribution and functional analysis of the NAV1.6. Voltage-gated sodium channel from human brain. *Brain Res Mol Brain Res* **103**, 80-90.
- Calloe K, Nof E, Jespersen T, Di Diego J, Chlus N, Olesen SP, Antzelevitch C, & Cordeiro JM (2011). Comparison of the effects of a transient outward potassium channel activator on currents recorded from atrial and ventricular cardiomyocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol* **22**, 1057-1066
- Calloe K, Cordeiro JM, Di Diego JM, Hansen RS, Grunnet M, Olesen SP, & Antzelevitch C (2009). A transient outward potassium current activator recapitulates the electrocardiographic manifestations of Brugada syndrome. *Cardiovasc Res* **81**, 686-694.
- Calloe K, Soltysinska E, Jespersen T, Lundby A, Antzelevitch C, Olesen SrP, & Cordeiro JM (2010). Differential effects of the transient outward K⁺ current activator NS5806 in the canine left ventricle. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 191-200.
- Camerino DC, Tricarico D, & Desaphy JF (2007). Ion channel pharmacology. *Neurotherapeutics* **4**, 184-198.
- Capovilla G, Berg AT, Cross JH, Moshe SL, Vigevano F, Wolf P, & Avanzini G (2009). Workshop Report: Conceptual dichotomies in classifying epilepsies: Partial versus generalized and idiopathic versus symptomatic. *Epilepsia* **50**, 1645-1649.
- Catterall WA, Goldin AL, & Waxman SG (2005a). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 397-409.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, & Striessnig J (2005b). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 411-425.

- Chen JWY, Naylor DE, & Wasterlain CG (2007). Advances in the pathophysiology of status epilepticus. *Acta Neurol Scand* **115**, 7-15.
- Chen S, Su H, Yue C, Remy S, Royeck M, Sochivko D, Opitz T, Beck H, & Yaari Y (2011). An increase in persistent sodium current contributes to intrinsic neuronal bursting after status epilepticus. *J Neurophysiol* **105**, 117-129.
- Chen XX & Johnston D (2004). Properties of single voltage-dependent K⁺ channels in dendrites of CA1 pyramidal neurones of rat hippocampus. *J Physiol* **559**, 187-203.
- Chen XX, Yuan LL, Zhao CP, Birnbaum SG, Frick A, Jung WE, Schwarz TL, Sweatt JD, & Johnston D (2006). Deletion of Kv4.2 gene eliminates dendritic A-type K⁺ current and enhances induction of long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **26**, 12143-12151.
- Chen Z, Chen S, Chen L, Zhou J, Dai Q, Yang L, Li X, & Zhou L (2009). Long-term increasing co-localization of SCN8A and ankyrin-G in rat hippocampal cornu ammonis 1 after pilocarpine induced status epilepticus. *Brain Res* **1270**, 112-120.
- Christie BR, Eliot LS, Ito K, Miyakawa H, & Johnston D (1995). Different Ca²⁺ channels in soma and dendrites of hippocampal pyramidal neurons mediate spike-induced Ca²⁺ influx. *J Neurophysiol* **73**, 2553-2557.
- Chu PJ, Rivera JF, & Arnold DB (2006). A role for Kif17 in transport of Kv4.2. *J Biol Chem* **281**, 365-373.
- Chung SK, Reinhart PH, Martin BL, Brautigan D, & Levitan IB (1991). Protein-kinase activity closely associated with a reconstituted calcium-activated potassium channel. *Science* **253**, 560-562.
- Clark BD, Goldberg EM, & Rudy B (2009). Electrogenic tuning of the axon initial segment. *Neuroscientist* **15**, 651-668.
- Covarrubias M, Bhattacharji A, De Santiago-Castillo JA, Dougherty K, Kaulin Y, Naphuket T, & Wang G (2008). The neuronal Kv4 channel complex. *Neurochem Res* **33**, 1558-1567.
- Covolán L & Mello LEAM (2000). Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res* **39**, 133-152.
- Cui J, Yang H, & Lee U (2009). Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cell Mol Life Sci* **66**, 852-875.
- Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RSG, & Avoli M (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* **172**, 143-157.
- Daoudal G & Debanne D (2003). Long-term plasticity of intrinsic excitability: Learning rules and mechanisms. *Learn Mem* **10**, 456-465.

- DeLorenzo RJ, Sun DA, & Deshpande LS (2005). Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: The calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther* **105**, 229-266.
- Diamond JS (2005). Deriving the glutamate clearance time course from transporter currents in CA1 hippocampal astrocytes: Transmitter uptake gets faster during development. *J Neurosci* **25**, 2906-2916.
- Dichter MA (2009). Emerging concepts in the pathogenesis of epilepsy and epileptogenesis. *Arch Neurol* **66**, 443-447.
- Dolphin AC (2009). Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr Opin Neurobiol* **19**, 237-244.
- Du J, Haak LL, Phillips-Tansey E, Russell JT, & McBain CJ (2000). Frequency-dependent regulation of rat hippocampal somato-dendritic excitability by the K⁺ channel subunit Kv2.1. *J Physiol* **522**, 19-31.
- Dudek FE & Staley KJ (2011). The time course of acquired epilepsy: Implications for therapeutic intervention to suppress epileptogenesis. *Neurosci Lett* **497**, 240-246.
- Ellerkmann RK, Remy S, Chen J, Sochivko D, Elger CE, Urban BW, Becker A, & Beck H (2003). Molecular and functional changes in voltage-dependent Na⁺ channels following pilocarpine-induced status epilepticus in rat dentate granule cells. *Neuroscience* **119**, 323-333.
- Enyedi P & Czirják G (2010). Molecular background of leak K⁺ currents: Two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* **90**, 559-605.
- Ermolinsky B, Arshadmansab MF, Pacheco Ojalora LF, Zarei MM, & Garrido-Sanabria ER (2008). Deficit of Kcnma1 mRNA expression in the dentate gyrus of epileptic rats. *Neuroreport* **19**, 1291-1294.
- Ermolinsky BS, Skinner F, Garcia I, Arshadmansab MF, Ojalora LFP, Zarei MM, & Garrido-Sanabria ER (2011). Upregulation of STREX splice variant of the large conductance Ca²⁺-activated potassium (BK) channel in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurosci Res* **69**, 73-80.
- Francis J, Jugloff DGM, Mingo NS, Wallace MC, Jones OT, McIntyre Burnham W, & Eubanks JH (1997). Kainic acid-induced generalized seizures alter the regional hippocampal expression of the rat Kv4.2 potassium channel gene. *Neurosci Lett* **232**, 91-94.
- Frick A & Johnston D (2005). Plasticity of dendritic excitability. *J Neurobiol* **64**, 100-115.
- Frick A, Magee J, & Johnston D (2004). LTP is accompanied by an enhanced local excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nat Neurosci* **7**, 126-135.

- Frick A, Magee J, Koester HJ, Migliore M, & Johnston D (2003). Normalization of Ca^{2+} signals by small oblique dendrites of CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **23**, 3243-3250.
- Gasparini S, Migliore M, & Magee JC (2004). On the initiation and propagation of dendritic spikes in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **24**, 11046-11056.
- Geiger JRP, Bischofberger J, Vida I, Frobe U, Pfitzinger S, Weber HJ, Haverkamp K, & Jonas P (2002). Patch-clamp recording in brain slices with improved slicer technology. *Pflugers Arch* **443**, 491-501.
- George MS, Abbott LF, & Siegelbaum SA (2009). HCN hyperpolarization-activated cation channels inhibit EPSPs by interactions with M-type K^+ channels. *Nat Neurosci* **12**, 577-584.
- Goldin AL (1999). Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels. *Ann NY Acad Sci* **868**, 38-50.
- Golding NL, Jung Hy, Mickus T, & Spruston N (1999). Dendritic calcium spike initiation and repolarization are controlled by distinct potassium channel subtypes in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **19**, 8789-8798.
- Golding NL, Kath WL, & Spruston N (2001). Dichotomy of action-potential backpropagation in CA1 pyramidal neuron dendrites. *J Neurophysiol* **86**, 2998-3010.
- Grunditz A, Holbro N, Tian L, Zuo Y, & Oertner TG (2008). Spine neck plasticity controls postsynaptic calcium signals through electrical compartmentalization. *J Neurosci* **28**, 13457-13466.
- Grynkiewicz G, Poenie M, & Tsien RY (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450.
- Gu N, Vervaeke K, & Storm JF (2007). BK potassium channels facilitate high-frequency firing and cause early spike frequency adaptation in rat CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* **580**, 859-882.
- Gu XQ & Haddad GG (2001). Decreased neuronal excitability in hippocampal neurons of mice exposed to cyclic hypoxia. *J Appl Physiol* **91**, 1245-1250.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, Mckinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, & Wang X (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 473-508.
- Hammond RS, Lin L, Sidorov MS, Wikenheiser AM, & Hoffman DA (2008). Protein kinase A mediates activity-dependent Kv4.2 channel trafficking. *J Neurosci* **28**, 7513-7519.
- Hausser M, Spruston N, & Stuart GJ (2000). Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science* **290**, 739-744.

- Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahljianian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP, & Catterall WA (1993). Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol* **123**, 949-962.
- Helmchen F, Imoto K, & Sakmann B (1996). Ca^{2+} buffering and action potential-evoked Ca^{2+} signaling in dendrites of pyramidal neurons. *Biophys J* **70**, 1069-1081.
- Herman ST (2002). Epilepsy after brain insult. *Neurology* **59**, S21-S26.
- Hille B (2001). Ion channels of excitable membranes. *Sinauer Associates, Inc.*, 3 ed. Sunderland, MA.
- Hoffman DA & Johnston D (1998). Downregulation of transient K^+ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC. *J Neurosci* **18**, 3521-3528.
- Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, & Johnston D (1997). K^+ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* **387**, 869-875.
- Hong YM, Jo DG, Lee MC, Kim SY, & Jung YK (2003). Reduced expression of calsenilin/DREAM/KChIP3 in the brains of kainic acid-induced seizure and epilepsy patients. *Neurosci Lett* **340**, 33-36.
- Houser CR, Huang CS, & Peng Z (2008). Dynamic seizure-related changes in extracellular signal-regulated kinase activation in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **156**, 222-237.
- Huang Z, Walker MC, & Shah MM (2009). Loss of dendritic HCN1 subunits enhances cortical excitability and epileptogenesis. *J Neurosci* **29**, 10979-10988.
- Invitrogen (2011). Fura and Indo ratiometric calcium indicators. Product information MP01200 (Stand Feb. 2011)
- Irnich W (2010). The terms "Chronaxie" and "Rheobas" are 100 years old. *Pacing Clin Electrophysiol* **33**, 491-496.
- Isbrandt D, Leicher T, Waldschütz R, Zhu X, Luhmann U, Michel U, Sauter K, & Pongs O (2000). Gene structures and expression profiles of three human KCND (Kv4) potassium channels mediating A-type currents I_{TO} and I_{SA} . *Genomics* **64**, 144-154.
- Ivanov A, Pellegrino C, Rama S, Dumalska I, Salyha Y, Ben Ari Y, & Medina I (2006). Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* **572**, 789-798.
- Jerng HH, Kunjilwar K, & Pfaffinger PJ (2005). Multiprotein assembly of Kv4.2, KChIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with I_{SA} -like properties. *J Physiol* **568**, 767-788.

- Jerng HH & Pfaffinger PJ (2008). Multiple Kv Channel-interacting proteins contain an N-terminal transmembrane domain that regulates Kv4 channel trafficking and gating. *J Biol Chem* **283**, 36046-36059.
- Jerng HH, Qian Y, & Pfaffinger PJ (2004a). Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys J* **87**, 2380-2396.
- Jerng HH, Pfaffinger PJ, & Covarrubias M (2004b). Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol Cell Neurosci* **27**, 343-369.
- Johnston D, Hoffman DA, Colbert CM, & Magee JC (1999). Regulation of back-propagating action potentials in hippocampal neurons. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 288-292.
- Johnston D, Hoffman DA, Magee JC, Poolos NP, Watanabe S, Colbert CM, & Migliore M (2000). Dendritic potassium channels in hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol* **525**, 75-81.
- Johnston D, Magee JC, Colbert CM, & Christie BR (1996). Active properties of neuronal dendrites. *Annu Rev Neurosci* **19**, 165-186.
- Johnston D & Narayanan R (2008). Active dendrites: colorful wings of the mysterious butterflies. *Trends Neurosci* **31**, 309-316.
- Jung S, Bullis JB, Lau IH, Jones TD, Warner LN, & Poolos NP (2010). Downregulation of dendritic HCN channel gating in epilepsy is mediated by altered phosphorylation signaling. *J Neurosci* **30**, 6678-6688.
- Jung S, Jones TD, Lugo JN, Jr., Sheerin AH, Miller JW, D'Ambrosio R, Anderson AE, & Poolos NP (2007). Progressive dendritic HCN channelopathy during epileptogenesis in the rat pilocarpine model of epilepsy. *J Neurosci* **27**, 13012-13021.
- Jung SC & Hoffman DA (2009). Biphasic somatic A-type K⁺ channel downregulation mediates intrinsic plasticity in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *PLoS ONE* **4**, e6549.
- Kim J, Wei DS, & Hoffman DA (2005). Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* **569**, 41-57.
- Kim J, Jung SC, Clemens AM, Petralia RS, & Hoffman DA (2007). Regulation of dendritic excitability by activity-dependent trafficking of the A-type K⁺ channel subunit Kv4.2 in hippocampal neurons. *Neuron* **54**, 933-947.
- Kim J, Nadal MS, Clemens AM, Baron M, Jung SC, Misumi Y, Rudy B, & Hoffman DA (2008). Kv4 accessory protein DPPX (DPP6) is a critical regulator of membrane excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* **100**, 1835-1847.

- Kole MHP, Ilschner SU, Kampa BM, Williams SR, Ruben PC, & Stuart GJ (2008). Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat Neurosci* **11**, 178-186.
- Kole MHP, Letzkus JJ, & Stuart GJ (2007). Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron* **55**, 633-647.
- Konnerth A, Obaid AL, & Salzberg BM (1987). Optical recording of electrical activity from parallel fibres and other cell types in skate cerebellar slices in vitro. *J Physiol* **393**, 681-702.
- Krapivinsky G, Krapivinsky L, Manasian Y, Ivanov A, Tyzio R, Pellegrino C, Ben Ari Y, Clapham DE, & Medina I (2003). The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron* **40**, 775-784.
- Kurz JE, Sheets D, Parsons JT, Rana A, DeLorenzo RJ, & Churn SB (2001). A significant increase in both basal and maximal calcineurin activity in the rat pilocarpine model of status epilepticus. *J Neurochem* **78**, 304-315.
- Lai HC & Jan LY (2006). The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nat Rev Neurosci* **7**, 548-562.
- Laurén HB, Lopez-Picon FR, Brandt AM, Rios-Rojas CJ, & Holopainen IE (2010). Transcriptome analysis of the hippocampal CA1 pyramidal cell region after kainic acid-induced status epilepticus in juvenile rats. *PLoS ONE* **5**, e10733.
- Lee US & Cui J (2010). BK channel activation: Structural and functional insights. *Trends Neurosci* **33**, 415-423.
- Lei Z, Deng P, Li Y, & Xu ZC (2009). Downregulation of Kv4.2 channels mediated by NR2B-containing NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* **165**, 350-362.
- Lei ZG, Deng P, & Xu ZC (2008). Regulation of Kv4.2 channels by glutamate in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* **106**, 182-192.
- Loane DJ, Hicks GA, Perrino BA, & Marrion NV (2006). Inhibition of BKCa channel activity by association with calcineurin in rat brain. *Eur J Neurosci* **24**, 433-441.
- Lorincz A & Nusser Z (2010). Molecular identity of dendritic voltage-gated sodium channels. *Science* **328**, 906-909.
- Lugo JN, Barnwell LF, Ren Y, Lee WL, Johnston LD, Kim R, Hrachovy RA, Sweatt JD, & Anderson AE (2008). Altered phosphorylation and localization of the A-type channel, Kv4.2 in status epilepticus. *J Neurochem* **106**, 1929-1940.
- Lundby A, Jespersen T, Schmitt N, Grunnet M, Olesen SP, Cordeiro JM, & Calloe K (2010). Effect of the I(to) activator NS5806 on cloned K(v)4 channels depends on the accessory protein KChIP2. *Br J Pharmacol* **160**, 2028-2044.

- Maffie JK & Rudy B (2008). Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K⁺ currents in neurons. *J Physiol* **586**, 5609-5623.
- Magee JC (2000). Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat Rev Neurosci* **1**, 181-190.
- Magee JC & Cook EP (2000). Somatic EPSP amplitude is independent of synapse location in hippocampal pyramidal neurons. *Nat Neurosci* **3**, 895-903.
- Magee JC & Johnston D (1995). Characterization of single voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels in apical dendrites of rat CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* **487**, 67-90.
- Magee JC (1998). Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **18**, 7613-7624.
- Marcelin B, Chauvière L, Becker A, Migliore M, Esclapez M, & Bernard C (2009). H channel-dependent deficit of theta oscillation resonance and phase shift in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* **33**, 436-447.
- McKhann GM, Wenzel HJ, Robbins CA, Sosunov AA, & Schwartzkroin PA (2003). Mouse strain differences in kainic acid sensitivity, seizure behavior, mortality, and hippocampal pathology. *Neuroscience* **122**, 551-561.
- McNamara JO, Huang YZ, & Leonard AS (2006). Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Sci STKE* **2006**, re12.
- Meera P, Wallner M, Song M, & Toro L (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 14066-14071.
- Meier CL & Dudek FE (1996). Spontaneous and stimulation-induced synchronized burst afterdischarges in the isolated CA1 of kainate-treated rats. *J Neurophysiol* **76**, 2231-2239.
- Metz AE, Jarsky T, Martina M, & Spruston N (2005). R-type calcium channels contribute to afterdepolarization and bursting in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **25**, 5763-5773.
- Metz AE, Spruston N, & Martina M (2007). Dendritic D-type potassium currents inhibit the spike afterdepolarization in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* **581**, 175-187.
- Migliore M, Hoffman DA, Magee JC, & Johnston D (1999). Role of an A-type K⁺ conductance in the back-propagation of action potentials in the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *J Comput Neurosci* **7**, 5-15.
- Migliore M & Shepherd GM (2002). Emerging rules for the distributions of active dendritic conductances. *Nat Rev Neurosci* **3**, 362-370.

- Mills LR, Niesen CE, So AP, Carlen PL, Spigelman I, & Jones OT (1994). N-type Ca^{2+} channels are located on somata, dendrites, and a subpopulation of dendritic spines on live hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* **14**, 6815-6824.
- Misonou H & Trimmer JS (2004). Determinants of voltage-gated potassium channel surface expression and localization in mammalian neurons. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **39**, 125-145.
- Misonou H (2010). Homeostatic regulation of neuronal excitability by K^+ channels in normal and diseased brains. *Neuroscientist* **16**, 51-64.
- Mohapatra DP, Misonou H, Held JE, Surmeier DJ, & Trimmer JS (2009). Regulation of intrinsic excitability in hippocampal neurons by activity-dependent modulation of the Kv2.1 potassium channel. *Channels* **3**, 46-56.
- Monaghan MM, Menegola M, Vacher H, Rhodes KJ, & Trimmer JS (2008). Altered expression and localization of hippocampal A-type potassium channel subunits in the pilocarpine-induced model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **156**, 550-562.
- Morin F, Haufler D, Skinner FK, & Lacaille JC (2010). Characterization of voltage-gated K^+ currents contributing to subthreshold membrane potential oscillations in hippocampal CA1 interneurons. *J Neurophysiol* **103**, 3472-3489.
- Morrison RS, Wenzel HJ, Kinoshita Y, Robbins CA, Donehower LA, & Schwartzkroin PA (1996). Loss of the p53 tumor suppressor gene protects neurons from kainate-induced cell death. *J Neurosci* **16**, 1337-1345.
- Mulholland PJ & Chandler LJ (2010). Inhibition of glutamate transporters couples to Kv4.2 dephosphorylation through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuroscience* **165**, 130-137.
- Mulholland PJ, Carpenter-Hyland EP, Hearing MC, Becker HC, Woodward JJ, & Chandler LJ (2008). Glutamate transporters regulate extrasynaptic NMDA receptor modulation of Kv2.1 potassium channels. *J Neurosci* **28**, 8801-8809.
- Murakoshi H & Trimmer JS (1999). Identification of the Kv2.1 K^+ channel as a major component of the delayed rectifier K^+ current in rat hippocampal neurons. *J Neurosci* **19**, 1728-1735.
- Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, de Miera EVS, Ma YL, Mo WJ, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA, & Rudy B (2003). The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K^+ channels. *Neuron* **37**, 449-461.
- Neher E & Sakmann B (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.
- Nerbonne JM (2000). Molecular basis of functional voltage-gated K^+ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* **525**, 285-298.

- Nestor MW & Hoffman DA (2011). Differential cycling rates of Kv4.2 channels in proximal and distal dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* **22**, 969-980.
- Neusch C, Weishaupt JH, & Bähr M (2003). Kir channels in the CNS: emerging new roles and implications for neurological diseases. *Cell and Tissue Research* **311**, 131-138.
- Neves G, Cooke SF, & Bliss TVP (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* **9**, 65-75.
- Niswender CM & Conn PJ (2010). Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **50**, 295-322.
- Niwa N & Nerbonne JM (2010). Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (Ito) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 12-25.
- Numberger M & Draguhn A (1996). Patch-Clamp Technik, 1 ed. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, Heidelberg.
- Odgen D (1994). Microelectrode techniques, 2 ed., pp. 1-437. *The Company of Biologists*, Cambridge.
- Pacheco Otalora LF, Hernandez EF, Arshadmansab MF, Francisco S, Willis M, Ermolinsky B, Zarei M, Knaus HG, & Garrido-Sanabria ER (2008). Down-regulation of BK channel expression in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain Res* **1200**, 116-131.
- Park KS, Mohapatra DP, Misonou H, & Trimmer JS (2006). Graded regulation of the Kv2.1 potassium channel by variable phosphorylation. *Science* **313**, 976-979.
- Perreault P & Avoli M (1991). Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* **65**, 771-785.
- Petralia RS, Wang YX, Hua F, Yi Z, Zhou A, Ge L, Stephenson FA, & Wenthold RJ (2010). Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations. *Neuroscience* **167**, 68-87.
- Pitkänen A, Kharatishvili I, Karhunen H, Lukasiuk K, Immonen R, Nairismägi J, Gröhn O, & Nissinen J (2007). Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia* **48**, 13-20.
- Poolos NP & Johnston D (1999). Calcium-activated potassium conductances contribute to action potential repolarization at the soma but not the dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **19**, 5205-5212.
- Powell KL, Ng C, O'Brien TJ, Xu SH, Williams DA, Foote SJ, & Reid CA (2008). Decreases in HCN mRNA expression in the hippocampus after kindling and status epilepticus in adult rats. *Epilepsia* **49**, 1686-1695.
- Pusch M & Neher E (1988). Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflugers Arch* **411**, 204-211.

- Ramakers GMJ & Storm JF (2002). A postsynaptic transient K⁺ current modulated by arachidonic acid regulates synaptic integration and threshold for LTP induction in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 10144-10149.
- Raza M, Blair RE, Sombati S, Carter DS, Deshpande LS, & DeLorenzo RJ (2004). Evidence that injury-induced changes in hippocampal neuronal calcium dynamics during epileptogenesis cause acquired epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 17522-17527.
- Remondes M & Schuman EM (2002). Direct cortical input modulates plasticity and spiking in CA1 pyramidal neurons. *Nature* **416**, 736-740.
- Remy S, Beck H, & Yaari Y (2010). Plasticity of voltage-gated ion channels in pyramidal cell dendrites. *Curr Opin Neurobiol* **20**, 503-509.
- Rhodes KJ, Carroll KI, Sung MA, Doliveira LC, Monaghan MM, Burke SL, Strassle BW, Buchwalder L, Menegola M, Cao J, An WF, & Trimmer JS (2004). KChIPs and Kv4 alpha subunits as integral components of A-type potassium channels in mammalian brain. *J Neurosci* **24**, 7903-7915.
- Rivera JF, Ahmad S, Quick MW, Liman ER, & Arnold DB (2003). An evolutionarily conserved dileucine motif in Shal K⁺ channels mediates dendritic targeting. *Nat Neurosci* **6**, 899.
- Royeck M, Horstmann MT, Remy S, Reitze M, Yaari Y, & Beck H (2008). Role of Axonal NaV1.6 Sodium Channels in Action Potential Initiation of CA1 Pyramidal Neurons. *J Neurophysiol* **100**, 2361-2380.
- Sah P & Louise Faber ES (2002). Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. *Prog Neurobiol* **66**, 345-353.
- Sanabria E, Su H, & Yaari Y (2001). Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol* **532**, 205-216.
- Schrader LA, Anderson AE, Varga AW, Levy M, & Sweatt JD (2002). The other half of Hebb - K⁺ channels and the regulation of neuronal excitability in the hippocampus. *Mol Neurobiol* **25**, 51-66.
- Schrader LA, Birnbaum SG, Nadin BM, Ren YJ, Bui D, Anderson AE, & Sweatt JD (2006). ERK/MAPK regulates the Kv4.2 potassium channel by direct phosphorylation of the pore-forming subunit. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C852-C861.
- Schrader LA, Ren Y, Cheng F, Bui D, Sweatt JD, & Anderson AE (2008). Kv4.2 is a locus for PKC and ERK/MAPK cross-talk. *Biochem J* **417**, 705-715.
- Schulz DJ (2006). Plasticity and stability in neuronal output via changes in intrinsic excitability: It's what's inside that counts. *J Exp Biol* **209**, 4821-4827.
- Seikel E & Trimmer JS (2009). Convergent modulation of Kv4.2 channel α subunits by structurally distinct DPPX and KChIP auxiliary subunits. *Biochemistry* **48**, 5721-5730.

- Serôdio P & Rudy B (1998). Differential expression of Kv4 K⁺ channel subunits mediating subthreshold transient K⁺ (A-type) currents in rat brain. *J Neurophysiol* **79**, 1081-1091.
- Shah MM, Anderson AE, Leung V, Lin X, & Johnston D (2004). Seizure-induced plasticity of h channels in entorhinal cortical layer III pyramidal neurons. *Neuron* **44**, 495-508.
- Shah MM, Hammond RS, & Hoffman DA (2010). Dendritic ion channel trafficking and plasticity. *Trends Neurosci* **33**, 307-316.
- Shao LR, Halvorsrud R, Borg-Graham L, & Storm JF (1999). The role of BK-type Ca²⁺-dependent K⁺ channels in spike broadening during repetitive firing in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* **521**, 135-146.
- Sheng M, Tsaur ML, Jan YN, & Jan LY (1992). Subcellular segregation of 2 A-type K⁺ channel proteins in rat central neurons. *Neuron* **9**, 271-284.
- Shibata R, Misonou H, Campomanes CR, Anderson AE, Schrader LA, Doliveira LC, Carroll KI, Sweatt JD, Rhodes KJ, & Trimmer JS (2003). A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J Biol Chem* **278**, 36445-36454.
- Shin M, Brager D, Jaramillo TC, Johnston D, & Chetkovich DM (2008). Mislocalization of h channel subunits underlies h channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* **32**, 26-36.
- Shruti S, Clem RL, & Barth AL (2008). A seizure-induced gain-of-function in BK channels is associated with elevated firing activity in neocortical pyramidal neurons. *Neurobiol Dis* **30**, 323-330.
- Singh B, Ogiwara I, Kaneda M, Tokonami N, Mazaki E, Baba K, Matsuda K, Inoue Y, & Yamakawa K (2006). A K(v)4.2 truncation mutation in a patient with temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* **24**, 245-253.
- Spencer SS & Spencer DD (1994). Entorhinal-hippocampal interactions in medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **35**, 721-727.
- Sperk G (1994). Kainic acid seizures in the rat. *Prog Neurobiol* **42**, 1-32.
- Spruston N & McBain CJ (2007). Structural and functional properties of hippocampal neurons. In *The Hippocampus Book*, eds. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, & O'Keefe J, pp. 133-201. Oxford University Press, New York.
- Spruston N, Schiller Y, Stuart G, & Sakmann B (1995). Activity-dependent action-potential invasion and calcium influx into hippocampal CA1 dendrites. *Science* **268**, 297-300.
- Storm JF (1987). Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* **385**, 733-759.
- Storm JF, Zimmer J, & Ottersen OP (1990). Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog Brain Res* **83**, 161-187.

- Storm JF (1988). Temporal integration by a slowly inactivating K^+ current in hippocampal neurons. *Nature* **336**, 379-381.
- Stuart GJ, Dodt HU, & Sakmann B (1993). Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain-slices using infrared video microscopy. *Pflugers Arch* **423**, 511-518.
- Su T, Cong WD, Long YS, Luo AH, Sun WW, Deng WY, & Liao WP (2008). Altered expression of voltage-gated potassium channel 4.2 and voltage-gated potassium channel 4-interacting protein, and changes in intracellular calcium levels following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience* **157**, 566-576.
- Sun W, Maffie J, Lin L, Petralia R, Rudy B, & Hoffman D (2011). DPP6 establishes the A-type K^+ current gradient critical for the regulation of dendritic excitability in CA1 hippocampal neurons. *Neuron* **71**, 1102-1115.
- Surges R, Freiman TM, & Feuerstein TJ (2004). Input resistance is voltage dependent due to activation of I-h channels in rat CA1 pyramidal cells. *J Neurosci Res* **76**, 475-480.
- Sweatt JD (2001). The neuronal MAP kinase cascade: A biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* **76**, 1-10.
- Szlachta K. (2010). Molekulare Korrelate repolarisierender K^+ -Ströme in Mäusemyozyten und ihre pathophysiologische Umstrukturierung. *Dissertation*, Universität Hamburg.
- Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud A, Perez-Reyes E, & Bayliss DA (1999). Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* **19**, 1895-1911.
- Thomas T, Hitti E, Kotlyarov A, Potschka H, & Gaestel M. (2008). MAP-kinase-activated protein kinase 2 expression and activity is induced after neuronal depolarization. *Eur J Neurosci* **28**, 642-654.
- Tsay D, Dudman JT, & Siegelbaum SA (2007). HCN1 channels constrain synaptically evoked Ca^{2+} spikes in distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Neuron* **56**, 1076-1089.
- Vacher H, Mohapatra DP, & Trimmer JS (2008). Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol Rev* **88**, 1407-1447.
- Valdivia CR, Chu WW, Pu J, Foell JD, Haworth RA, Wolff MR, Kamp TJ, & Makielski JC (2005). Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* **38**, 475-483.
- Varga AW, Yuan LL, Anderson AE, Schrader LA, Wu GY, Gatchel JR, Johnston D, & Sweatt JD (2004). Calcium-calmodulin-dependent kinase II modulates Kv4.2 channel expression and upregulates neuronal A-type potassium currents. *J Neurosci* **24**, 3643-3654.

- Vervaeke K, Hu H, Graham LJ, & Storm JF (2006). Contrasting effects of the persistent Na⁺ current on neuronal excitability and spike timing. *Neuron* **49**, 257-270.
- Vetter P, Roth A, & Hausser M (2001). Propagation of action potentials in dendrites depends on dendritic morphology. *J Neurophysiol* **85**, 926-937.
- Vincent P & Mulle C (2009). Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* **158**, 309-323.
- Vreugdenhil M, Faas GC, & Wadman WJ (1998). Sodium currents in isolated rat CA1 neurons after kindling epileptogenesis. *Neuroscience* **86**, 99-107.
- Walker MC, White HS, & Sander JWAS (2002). Disease modification in partial epilepsy. *Brain* **125**, 1937-1950.
- Walker MC (2009). Basic physiology of limbic status epilepticus. *Epilepsia* **50**, 5-6.
- Watanabe S, Hoffman DA, Migliore M, & Johnston D (2002). Dendritic K⁺ channels contribute to spike-timing dependent long-term potentiation in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 8366-8371.
- Waters J, Schaefer A, & Sakmann B (2005). Backpropagating action potentials in neurones: Measurement, mechanisms and potential functions. *Prog Biophys Mol Biol* **87**, 145-170.
- Waxman EA & Lynch DR (2005). N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: Multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist* **11**, 37-49.
- Weiergräber M, Henry M, Radhakrishnan K, Hescheler J, & Schneider T (2007). Hippocampal seizure resistance and reduced neuronal excitotoxicity in mice lacking the Cav2.3 E/R-type voltage-gated calcium channel. *J Neurophysiol* **97**, 3660-3669.
- Wellmer J, Su H, Beck H, & Yaari Y (2002). Long-lasting modification of intrinsic discharge properties in subicular neurons following status epilepticus. *Eur J Neurosci* **16**, 259-266.
- White HS (2002). Animal models of epileptogenesis. *Neurology* **59**, S7-S14.
- Williams PA, White AM, Clark S, Ferraro DJ, Swiercz W, Staley KJ, & Dudek FE (2009). Development of spontaneous recurrent seizures after kainate-induced status epilepticus. *J Neurosci* **29**, 2103-2112.
- Wu K & Leung LS (2003). Increased dendritic excitability in hippocampal CA1 in vivo in the kainic acid model of temporal lobe epilepsy: A study using current source density analysis. *Neuroscience* **116**, 599-616.
- Xu J, Kang N, Jiang L, Nedergaard M, & Kang J (2005). Activity-dependent long-term potentiation of intrinsic excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **25**, 1750-1760.

- Yaari Y, Yue C, & Su H (2007). Recruitment of apical dendritic T-type Ca^{2+} channels by backpropagating spikes underlies de novo intrinsic bursting in hippocampal epileptogenesis. *J Physiol* **580**, 435-450.
- Yokoyama CT, Westenbroek RE, Hell JW, Soong TW, Snutch TP, & Catterall WA (1995). Biochemical properties and subcellular distribution of the neuronal class E calcium channel alpha 1 subunit. *J Neurosci* **15**, 6419-6432.
- Yuan LL, Adams JP, Swank M, Sweatt JD, & Johnston D (2002). Protein kinase modulation of dendritic K^{+} channels in hippocampus involves a mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* **22**, 4860-4868.
- Yue C, Remy S, Su H, Beck H, & Yaari Y (2005). Proximal persistent Na^{+} channels drive spike afterdepolarizations and associated bursting in adult CA1 pyramidal cells. *J Neurosci* **25**, 9704-9720.
- Yue C & Yaari Y (2006). Axo-somatic and apical dendritic Kv7/M channels differentially regulate the intrinsic excitability of adult rat CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol* **95**, 3480-3495.
- Yuste R (1997). Potassium channels - Dendritic shock absorbers. *Nature* **387**, 851-&.
- Yuste R & Denk W (1995). Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* **375**, 682-684.

6 Anhang

6.1 Zusammenfassende Ergebnis-Tabellen

Tabelle 9: Gesammelte Mittelwerte der *Status epilepticus*-Experimente.

	Sham	KA	KA[n]	KA[x]
R_{in} (<i>Peak</i>) (M Ω)	224 \pm 6 (n = 65)	215 \pm 5 (n = 81, p = 0,245)	-	-
R_{in} (<i>Steady-State</i>) (M Ω)	168 \pm 6 (n = 65)	160 \pm 5 (n = 81, p = 0,283)	-	-
RMP (mV) 900 ms Pulse	-72,6 \pm 0,5 (n = 65)	-70,4 \pm 0,4 * (n = 81, p = 0,001)	-	-
Membranzeit- konstante τ (ms)	33,5 \pm 1,2 (n = 65)	32,2 \pm 1,1 (n = 80, p = 0,780)	-	-
AP-Latenzzeit bei +50 pA (ms)	92,9 \pm 16,3 (n = 43)	168 \pm 30 * (n = 48, p = 0,035)	-	-
AP-Latenzzeit bei +100 pA (ms)	66,2 \pm 11,0 (n = 21)	37,9 \pm 4,2 * (n = 29, p = 0,010)	-	-
AP-Frequenz bei +50 pA (Hz)	8,0 \pm 0,7 (n = 40)	6,7 \pm 0,8 (n = 45, p = 0,232)	-	-
AP-Frequenz bei +100 pA (Hz)	9,1 \pm 0,9 (n = 23)	11,6 \pm 0,9 (n = 30, p = 0,070)	-	-
Rheobase-Wert (pA)	98,8 \pm 26,1 (n = 5)	66,5 \pm 10,5 (n = 5, p = 0,284)	-	-
Chronaxie-Wert (ms)	7,3 \pm 2,5 (n = 5)	13,8 \pm 2,5 (n = 5, p = 0,108)	-	-
Artefakt (mV)	10,7 \pm 1,1 (n = 37)	10,7 \pm 0,8 (n = 61, p > 0,05)	10,1 \pm 1,1 (n = 34, p > 0,05)	11,4 \pm 1,2 (n = 27, p > 0,05)
Strominjektion (pA)	244 \pm 14 (n = 37)	271 \pm 13 (n = 61, p > 0,05)	261 \pm 17 (n = 34, p > 0,05)	283 \pm 20 (n = 27, p > 0,05)
AP-Schwelle (mV)	-56,4 \pm 0,9 (n = 37)	-51,7 \pm 0,8 * (n = 61, p < 0,01)	-52,3 \pm 1,1 * (n = 34, p < 0,05)	-51,1 \pm 1,1 * (n = 27, p < 0,01)

* p < 0,05 bzw. ** p < 0,001 gegenüber Sham; † signifikanter Unterschied zwischen KA[n] und KA[x].

Weiterführung Tabelle 9: Gesammelte Mittelwerte der *Status epilepticus*-Experimente.

	Sham	KA	KA[n]	KA[x]
Schwelennahe AP-Latenzzeit 4 ms Puls (ms)	3,81 ± 0,08 (n = 37)	4,12 ± 0,05 * (n = 61, p < 0,01)	4,06 ± 0,07 (n = 34, p > 0,05)	4,19 ± 0,06 ** (n = 27, p < 0,01)
AP-Aufstrich (mV/ms)	462 ± 15 (n = 37)	391 ± 12 * (n = 61, p < 0,01)	420 ± 16 † (n = 34, p > 0,05)	355 ± 15 **† (n = 27, p < 0,001)
AP-Amplitude (mV)	124 ± 1 (n = 37)	122 ± 1 (n = 61, p > 0,05)	122 ± 1 (n = 34, p > 0,05)	122 ± 1 (n = 27, p > 0,05)
APD ₅₀ (ms)	1,43 ± 0,06 (n = 37)	1,59 ± 0,04 * (n = 61, p < 0,05)	1,50 ± 0,04 † (n = 34, p > 0,05)	1,71 ± 0,05 **† (n = 27, p < 0,001)
Integral AP-N (ms*mV)	326 ± 24 (n = 28)	392 ± 21 (n = 34, p > 0,05)	334 ± 25 † (n = 20, p > 0,05)	476 ± 23 **† (n = 14, p < 0,001)
τ AP-N (ms)	32,7 ± 1,8 (n = 28)	37,1 ± 1,8 (n = 34, p > 0,05)	36,9 ± 2,7 (n = 20, p > 0,05)	37,4 ± 2,0 (n = 14, p > 0,05)
ΔF/F bei 5 μm vom Soma (%)	9,5 ± 0,5 (n = 41)	-	8,9 ± 1,1 † (n = 17, p > 0,05)	13,3 ± 1,7 *† (n = 12, p < 0,05)
τ der Ca ²⁺ -Transiente bei 5 μm vom Soma (ms)	180 ± 9 (n = 41)	-	169 ± 11 (n = 17, p > 0,05)	184 ± 16 (n = 12, p > 0,05)
Regressionsgerade der Ca ²⁺ -Signal-Abschwächung (log Einheiten/μm)	-0,00711 ± 0,00045 (n = 41)	-0,00934 ± 0,00058 * (n = 39, p < 0,05)	-0,00981 ± 0,00094 * (n = 17, p < 0,05)	-0,00970 ± 0,00117 * (n = 12, p < 0,05)

* p < 0,05 bzw. ** p < 0,001 gegenüber Sham; † signifikanter Unterschied zwischen KA[n] und KA[x].

Tabelle 10: Gesammelte Mittelwerte der pharmakologischen Experimente.

	Kontrolle	NS5806 10 min	4-AP
Strominjektion (pA)	290 ± 82 (n = 4)	235 ± 75 (n = 4, p = 0,212 [†])	-
AP-Aufstrich (mV*ms)	485 ± 30 (n = 4)	319 ± 28 (n = 4, p = 0,049 [†])	-
AP-Amplitude (mV)	118 ± 2 (n = 4)	111 ± 1 * (n = 4, p = 0,004 [†])	-
APD ₅₀ (ms)	1,74 ± 0,04 (n = 4)	2,38 ± 0,15 * (n = 4, p = 0,015 [†])	-
Integral AP-N (ms*mV)	119 ± 11 (n = 4)	58,7 ± 13,2 * (n = 4, p = 0,002 [†])	-
τ AP-N (ms)	23,0 ± 1,4 (n = 4)	13,1 ± 2,9 (n = 4, p = 0,075 [†])	-
ΔF/F bei 5 μm vom Soma (%)	11,8 ± 0,9 (n = 36)	12,6 ± 0,6 (n = 15, p > 0,05)	27,2 ± 3,0 ** (n = 15, p < 0,001)
Regressionsgerade der Ca ²⁺ -Signal- Abschwächung (log Einheiten/μm)	-0,00454 ± 0,00027 (n = 36)	-0,00759 ± 0,00041 ** (n = 15, p < 0,001)	-0,00340 ± 0,00028 * (n = 15, p < 0,05)

* p < 0,05 bzw. ** p < 0,001 gegenüber Kontrolle; [†]gepaarter t-Test.

6.2 Häufig verwendete Abkürzungen

4-AP	4-Aminopyridin (A-Typ Kanal-Blocker)
ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (während der Messungen verwendet)
AIS	<i>axon initial segment</i> (Ort der AP Entstehung)
AP	Aktionspotenzial
AP5	DL-2-Amino-5-phosphopentan-Säure (blockiert NMDA-Glutamatrezeptoren)
APD ₅₀	Aktionspotenzialdauer bei 50 % der AP-Amplitude
AP-N	AP-Nachdepolarisation
b-AP	<i>backpropagating action potential</i> (retrograde AP-Ausbreitung)
BK	Ca ²⁺ -sensitive K ⁺ -Kanäle mit großer Leitfähigkeit
CA1	Region 1 innerhalb des Hippocampus (<i>Cornu Ammonis</i>)
CA3	Region 3 innerhalb des Hippocampus (<i>Cornu Ammonis</i>)
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin abhängige Kinase II
Ca _v -Kanal	spannungsabhängiger Ca ²⁺ -Kanal
CC	<i>Current-Clamp</i> (Stromklemm-Anordnung des <i>Patch-Clamp</i> -Verstärkers)
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion (blockiert AMPA-Glutamatrezeptoren)
CS	<i>cutting solution</i> (während der Präparation verwendet)
DPP	Dipeptidylaminopeptidase-verwandtes Protein
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial (entsteht an glutamaterger Synapse)
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
GD	<i>Gyrus dentatus</i> (Region innerhalb der Hippocampusformation)
HCN	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channel</i>
IC	intrazelluläre Lösung (Lösung in der <i>Patch</i> -Pipette)
I _C	Ca ²⁺ -sensitiver K ⁺ -Strom mit großer Leitfähigkeit (von BK-Kanälen vermittelt)
I _{Ca,L}	Ca ²⁺ -Strom (<i>long-lasting</i> ; von Ca _v 1-Kanälen vermittelt)
I _{Ca,N}	Ca ²⁺ -Strom (<i>neuron</i> ; von Ca _v 2.2-Kanälen vermittelt)
I _{Ca,R}	Ca ²⁺ -Strom (<i>resistant</i> ; von Ca _v 2.3-Kanälen vermittelt)
I _{Ca,T}	Ca ²⁺ -Strom (<i>transient</i> ; von Ca _v 3-Kanälen vermittelt)

I _D	Dendrotoxin-sensitiver K ⁺ -Strom (von K _v 1-Kanälen vermittelt)
I _h	durch Hyperpolarisation aktivierter Strom aus monovalenter Kationen (Na ⁺ /K ⁺ ; von HCN-Kanälen vermittelt)
I _{K,DR}	spät rektifizierender K ⁺ -Strom (von K _v 3- und K _v 2.1-Kanälen vermittelt)
I _M	durch M1-muskarinische Acetylcholinrezeptoren inhibierbarer K ⁺ -Strom; "M-Strom" (von K _v 7.2/K _v 7.3-Heteromeren vermittelt)
I _{Na}	transienter Anteil des Na ⁺ -Stroms (von Na _v -Kanälen vermittelt)
I _{Na,P}	persistierender Anteil des Na ⁺ -Stroms (von Na _v -Kanälen vermittelt)
I _{SA}	somatodendritischer A-Typ K ⁺ -Strom (von K _v 4.2-Kanälen vermittelt)
KA	Kainat (<i>kainic acid</i>); Gesamtheit aller KA-behandelter CA1-Pyramidenzellen
KA[n]	Anteil KA-behandelter Zellen deren somatisches AP einen <i>notch</i> zeigte
KA[x]	Anteil KA-behandelter Zellen deren somatisches AP keinen <i>notch</i> zeigte
KChIP	K _v -Kanal-Interagierendes Protein
K _v -Kanal	spannungsabhängiger K ⁺ -Kanal
Na _v -Kanal	spannungsabhängiger Na ⁺ -Kanal
NS5806	N-[3,5-bis(Trifluoromethyl)Phenyl]-N'-[2,4-Dibromo-6-(1H-Tetrazol-5-yl)-Phenyl]- Harnstoff (K _v 4-Aktivator)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RMP	Ruhemembranpotenzial
ROI	<i>region of interest</i> (Bereich der Fluoreszenz-Messung)
SE	<i>Status epilepticus</i> (lang anhaltender, generalisierter epileptischer Anfall)
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler)
TLE	Temporallappen Epilepsie (partielle, limbische Form der Epilepsie)
VC	<i>Voltage-Clamp</i> (Spannungsklemme mittels <i>Patch-Clamp</i> -Verstärker)

6.3 Wissenschaftlicher Werdegang

- 2007 – 2011 Promotion bei PD Dr. Robert Bähring am Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie des Uniklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE)
Thema: "Dynamik somatodendritischer Aktionspotenziale in hippocampalen CA1-Pyramidenzellen der Maus (*Mus musculus* Lin.) nach Kainat-induziertem *Status epilepticus* und unter Einfluss von NS5806"
- 2005 – 2006 Diplomarbeit an der TU Braunschweig, Zoologisches Institut, Abteilung Tierphysiologie
Thema: "Einfluss von Raver1 auf Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression in excitatorischen hippocampalen Bahnen der Maus"
- 1999 – 2005 Studium der Biologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

6.4 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Windhorst S, Minge D, Bähring R, Hüser S, Schob C, Blechner C, Lin HY, Mayr GW, Kindler S (2012). Inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinase A regulates dendritic morphology and shapes synaptic Ca^{2+} transients. *Cell Signal* **24**, 750-757.

Minge D & Bähring R (2011). Acute Alterations of Somatodendritic Action Potential Dynamics in Hippocampal CA1 Pyramidal Cells after Kainate-Induced Status Epilepticus in Mice. *PLoS ONE* **6**, e26664.

Minge D & Bähring R (2011). Acute alterations of action potential dynamics in hippocampal CA1 pyramidal cells after kainate-mediated status epilepticus. *Posterbeitrag auf dem 90. Jahrestreffen der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Regensburg.*

Minge D, Witzel, K and Bähring R (2011). Modulation of somatodendritic A-type channels and spread of dendritic excitation by the Kv4 channel gating modifier NS5806. *Posterbeitrag auf dem 90. Jahrestreffen der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Regensburg.*

Minge D & Bähring R (2009). Rolle des $K_v4.2$ -vermittelten somatodendritischen A-Typ-Stroms bei der b-AP- und EPSP-Modulation in hippocampalen Neuronen. *Vortrag auf dem XIV. Treffen der Ostseephysiologen in Greifswald.*

Minge D, Hofmann H, und Bähring R (2009). Contribution of A-type potassium current I_{SA} in b-AP and EPSP attenuation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Posterbeitrag auf dem 8. Treffen der Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft in Göttingen.*

Lahmann I, Fabienke M, Henneberg B, Pabst O, Vauti F, Minge D, Illenberger S, Jockusch BM, Korte M, Arnold HH (2008). The hnRNP and cytoskeletal protein raver1 contributes to synaptic plasticity. *Exp Cell Res* **314**, 1048-60.

Minge D & Bähring R (2008). Somatodendritische Erregungskontrolle in hippocampalen CA1-Pyramidenzellen. *Vortrag auf dem XIII. Treffen der Ostseephysiologen in Rostock.*

6.5 Danksagung

Ich möchte mich zu allererst bei PD Dr. Robert Bähring bedanken, der mir die Möglichkeit zu dieser Doktorarbeit gegeben hat. Mit viel Wissen, Erfahrung und praktischer Unterstützung hat er mich in allen Lebenslagen des Doktoranden-Daseins exzellent betreut und mir doch viel Freiraum für eigene Ideen gegeben.

Professor Dr. Christian Lohr möchte ich dafür danken, dass er sich freundlicherweise Zeit für die Begutachtung dieser Dissertation genommen hat.

Herrn Professor Dr. Heimo Ehmke möchte ich für die zur Verfügung gestellte Infrastruktur und die angenehme Art der Institutsleitung danken.

Frau Professor Dr. Christiane Bauer und Herrn Professor Dr. Matthias Kneussel möchte ich dafür danken, dass sie sich bereit erklärt haben die Disputationsgutachten zu erstellen.

Und natürlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Zelluläre und Integrative Physiologie und den naturwissenschaftlichen und medizinischen Doktoranden für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gemeinsamen Mittagspausen und die schönen Betriebsausflüge bedanken. Danke auch an alle externen Kooperations- und Diskussionspartner, die meine Arbeit bereichert haben.