

Aus dem Institut für Tierpathologie
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Prof. Dr. Wolfgang Schmahl

Angefertigt in der Klinik für Neurochirurgie
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn
Abteilung: Experimentelle Neurobiologie
Prof. Dr. Christian Steinhäuser

**Koexistenz funktionell verschiedener Typen von
Astrozyten im Hippokampus: Bedeutung für die
Entstehung von Krampfaktivität bei Epilepsie-Patienten.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Kerstin Hüttmann
aus Menden

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E.P. Märtlbauer
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Ammer

Tag der Promotion: 10 Februar 2006

Inhaltsverzeichnis

1. Verzeichnis der Abkürzungen	3
2. Einleitung und Fragestellung	6
2.1 Gliazellen	6
2.2 Funktionen von Gliazellen	7
2.3 Ionenkanäle auf Gliazellen	7
2.4 Anatomie und Funktion des Hippocampus	9
2.5 Glutamat als Neurotransmitter	11
2.6 Heterogenität astroglialer Zellen im Hippocampus	12
2.7 Kopplung	15
2.8 Epilepsie	16
2.9 Fragestellung	18
3. Materialien und Methoden	19
3.1 Patientendaten	19
3.2 Präparation des humanen Gewebes	20
3.3 Präparation von Hirngewebe der Maus	20
3.4 Visualisierung des Biozytins	20
3.5 Messaufbau	21
3.6 Datenanalyse	21
3.7 Schnelle Applikation von Glutamat	22
3.8 Einzelzell RT-PCR und semiquantitative PCR	23
3.9 Kainat Injektionen	28
3.10 BrdU-Markierung und Immunhistochemie	29
3.11 Lösungen und Chemikalien	29
4. Resultate	31
4.1 Humaner Hippocampus	31
4.1.1 Identifizierung von Astrozyten	31
4.1.2 Membraneigenschaften humaner Astrozyten	31
4.1.3 Glutamatsensitivität humaner Astrozyten	34
4.1.4 Molekulare Analyse der AMPA-Rezeptor Untereinheiten	36
4.1.5 Kopplung	40

4.1.6 Verlust passiver GluT-Zellen bei AHS	42
4.2 Charakterisierung von Astrozyten in der SGZ des Gyrus dentatus von Tg(hGFAP/EGFP)-Mäusen	43
5. Diskussion	50
5.1 GluR- und GluT-Zellen im humanen Hippocampus	50
5.2 Veränderungen der K_{ir} -Stromdichte bei AHS	50
5.3 Mögliche Ursachen für das Verschwinden der GluT-Zellen bei AHS	51
5.4 Folgen des Verschwindens der GluT-Zellen bei AHS	52
5.5 Molekulare Analyse der Glutamat-Rezeptoren humaner Astrozyten	53
5.6 Funktionelle Eigenschaften EGFP-positiver Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus der Maus	55
6. Zusammenfassung	57
6.1 Summary	58
7. Literatur	59
7.1 Internetquellen	70

1. Verzeichnis der Abkürzungen

ACSF	artefizielle Zerebrospinalflüssigkeit
AHS	Ammonshornsklerose
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-propionat
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
Bp	Basenpaare
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CA	Cornu Ammonis
CD	Stromdichte
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cm	Membrankapazität
CTZ	Cyclothiazid
Cx	Connexin
Cy	Cyanin
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNT	Dysembryoplastischer neuro-epithelialer Tumor
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
EAAC-1	exzitatorischer Aminosäuren <i>carrier-1</i>
EAAT	exzitatorischer Aminosäuren-Transporter
EGFP	verstärktes grün fluoreszentes Protein
FAM	6-Carboxyfluorescein
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFAP	saures Gliafaserprotein
GLAST	Glutamat/Aspartat-Transporter
GLT-1	Glutamat-Transporter-1
GluR	Glutamat-Rezeptor
GluT	Glutamat-Transporter

GYKI ₅₃₆₅₅	1-(4-Aminophenyl)-3-Methylcarbamyl-4-Methyl-3,4-Dihydroxy-7,8-Methylenedioxy-5-H-2,3-Benzodiazepin
hGFAP	humanes saures Gliafaserprotein
I	Stromstärke
IP ₃	Inositoltriphosphat
KA	Kainat-Rezeptor
K _A -Kanäle	transiente K ⁺ -Kanäle
K _{dr} -Kanäle	verzögert-gleichrichtende K ⁺ -Kanäle
kHz	Kiloherz
K _{ir} -Kanäle	einwärts-gleichrichtende K ⁺ -Kanäle
K _v -Kanäle	spannungsabhängige K ⁺ -Kanäle
LTP	Langzeitpotenzierung
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
MΩ	Megaohm
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NBQX	2,3-Dihydroxy-6-Nitro-7-Sulfamoyl-Benzo(f)quinoxalin-2,3-Dion
NGS	normales Ziegen Serum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR	NMDA-Rezeptor
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Thrombozyten Wachstumsfaktor
PFA	Paraformaldehyd
PNS	Peripheres Nervensystem
RI	Rektifizierungsindex
RNasin	RNase Inhibitor
R _s	Serienwiderstand
RT	Reverse Transkription

SGZ	Subgranularzellschicht
SVZ	Subventrikularzellschicht
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TB	Tris-Puffer
Tg	transgen
TLE	Temporallappenepilepsie
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Einheit
UNG	Uracil-DNA-Glycosylase
Vr	Ruhemembranpotential
ZNS	Zentrales Nervensystem

2. Einleitung

Das Gehirn ist das komplexeste Organ des Körpers und fasziniert Forscher und Wissenschaftler seit jeher. Trotz dieses großen Interesses an den Vorgängen im Gehirn sind viele Abläufe nach wie vor unverstanden oder nur in Teilen bekannt. Mit ein Grund dafür könnte sein, dass sich die Forschung sehr lange auf die als „wichtigste“ Zellpopulation des Gehirns angenommenen Zellen, die Neuronen konzentriert hat. Gliazellen, als zahlenmäßig größte Zellpopulation des Gehirns, wurden meistens außer Betracht gelassen. Die Erkenntnis, dass auch die nicht erregbaren Zellen des Gehirns Einfluss auf die Informationsverarbeitung und Weiterleitung im Gehirn nehmen, besteht erst seit relativ kurzer Zeit. Zwar sind die Neuronen nach wie vor die einzigen Zellen des Gehirns, die in der Lage sind vollständige Aktionspotentiale zu generieren, doch hat es sich gezeigt, dass die Gliazellen direkt an der Verarbeitung der Information beteiligt sind und eine direkte Kommunikation zwischen Neuronen und Gliazellen besteht. Hierzu verfügen sie über nahezu den selben Besatz mit Ionenkanälen und Transmitter-Rezeptoren (Verkhratsky & Steinhäuser, 2000; Seifert & Steinhäuser, 2001) wie die Neuronen selber und greifen aktiv in die Kommunikation der Neuronen untereinander ein (Kang et al., 1998; Volterra & Steinhäuser, 2004). So ist es nicht auszuschließen, dass auch Störungen der Gliazellfunktionen mit die Ursachen für Krankheiten sein können, deren Ursprung man bisher rein neuronal bedingt vermutete.

2.1 Gliazellen

Die Gliazellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) werden unterteilt in Makroglia, (Oligodendrozyten und Astrozyten) und Mikroglia. Während die Mikroglia mesodermalen Ursprungs sind, stammen die Makroglia vom Ektoderm ab. Die Aufgaben der unterschiedlichen Gliaarten sind sehr vielfältig. Während die Mikroglia die Phagozyten des ZNS darstellen und durch Infektionen und Verletzungen aktiviert werden, bilden die Oligodendrozyten des ZNS und Schwannzellen des Peripheren Nervensystems (PNS) die Myelinscheiden um die Axone der Nervenzellen und gewährleisten so eine hohe Leitungsgeschwindigkeit der elektrischen Signale. Astrozyten werden morphologisch unterteilt in protoplasmatische Astrozyten, die man in der

grauen Substanz des ZNS findet und die Endfüße auf Synapsen und Blutgefäßen haben, und fibröse Astrozyten, die in der weißen Substanz vorkommen und mit ihren Endfüßen die Ranvier'schen Schnürringe und ebenfalls Blutgefäße kontaktieren.

2.2 Funktionen von Gliazellen

Das Wort Glia kommt aus dem Griechischen und bedeutet Leim oder Kitt. Dies umschreibt sehr gut den Aufgabenbereich den man den Gliazellen, besonders den Astrozyten, über lange Zeit zugeordnet hat. Dabei zeigen neue Forschungsergebnisse, dass die Funktionen der Gliazellen weit über eine passive Stützfunktion hinausgehen.

So fungieren radiale Gliazellen als neuronale Progenitoren denen die meisten corticalen Pyramidenneurone entstammen (Weissman et al., 2004) und leiten während der Entwicklung Neuronen bei ihrer Wanderung durch den Neocortex (Rakic et al., 1971; Nadarajah et al., 2003). Die Fortsätze von Astrozyten umschließen neuronale Synapsen und nehmen bei neuronaler Aktivität freiwerdendes Glutamat über ihre Glutamat-Transporter auf (Bergles et al., 1999; Olié et al., 2004). Dadurch sind sie in der Lage die synaptische Aktivität zu modulieren (Kang et al., 1998; Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004; Parri et al., 2001). Auch für die Ionenhomöostase des Extrazellulärraums ist die Funktion der Gliazellen von essentieller Bedeutung. Astrozyten nehmen bei neuronaler Erregung freiwerdendes K^+ auf und verteilen es über ein Netzwerk miteinander gekoppelter Zellen an Stellen mit niedriger Kaliumkonzentration (*spatial buffering* Konzept, Orkand et al. 1966; Newman et al., 1986). Im Hippocampus konnten sogar direkte Synapsen auf Gliazellen, die das Chondroitinsulfat Proteoglykan NG2 exprimieren, nachgewiesen werden (Lin & Bergles, 2004). Astrozyten des Hippocampus können zudem nicht nur Glutamat über ihre Glutamat-Transporter aufnehmen, sondern neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass sie auch in der Lage sind, ähnlich wie Neuronen, Glutamat aus intrazellulären Vesikeln freizusetzen (Bezzi et al., 2004).

2.3 Ionenkanäle in Gliazellen

Mit Hilfe der *Patch-Clamp* Technik konnte gezeigt werden, dass Gliazellen nahezu dieselben funktionellen Ionenkanäle und Transmitter-Rezeptoren exprimieren wie Neuronen (Verkhratsky & Steinhäuser, 2000), die einer starken Regulation sowohl während der Entwicklung, als auch unter pathophysiologischen Bedingungen unterworfen sind. So kommt es während der postnatalen Entwicklung zu einer Herunterregulation der spannungsabhängigen, auswärtsgerichteten Na^+ - und K^+ -Ströme, wohingegen die passiven und einwärtsgerichteten K^+ -Leitfähigkeiten zunehmen (Kressin et al., 1995).

Das Strommuster von Gliazellen im adulten Gehirn wird von K^+ -Leitfähigkeiten dominiert, die durch die Aktivierung mehrerer Kanal-Typen zustande kommen:

1. einwärtsgerichtete K^+ -Kanäle (K_{ir}), die Kalium besser in Einwärts-als in Auswärts-Richtung leiten und bei der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials eine entscheidende Rolle spielen. Die Leitfähigkeit dieser Kanäle nimmt unter pathophysiologischen Bedingungen bzw. während der Proliferation ab, was zu einer Verringerung der Kalium-Aufnahmekapazität der Zellen führt (Schröder et al., 2000; Hinterkeuser et al., 2000; Bordey et al., 2001; MacFarlane & Sontheimer, 1997).

2. verzögert gleichrichtende (K_{dr})- und transiente- (K_A) spannungsgesteuerte K^+ -Kanäle, die zur Familie der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle (K_v -Kanäle) gehören (Christie, 1995). Diese Kanäle sind bei Neuronen an der Repolarisation während des Aktionspotentials beteiligt. Bei Gliazellen ist die Leitfähigkeit der K_v -Kanäle während der Zellproliferation erhöht (Bordey et al., 2001; MacFarlane & Sontheimer, 1997; MacFarlane & Sontheimer, 2000), und ein direkter Einfluß verschiedener K_v1 Untereinheiten auf die Proliferation von Gliazellen konnte kürzlich nachgewiesen werden (Vautier et al., 2004).

3. Die Identität von K^+ -Kanälen, durch die die großen passiven Leitfähigkeiten zustande kommen, die bei den passiven Astrozyten und Oligodendrozyten das Strommuster dominieren und alle anderen Ströme überdecken, ist noch nicht bekannt. Vermutet wird, dass die sogenannten „Two-Pore-Domain“ Kanäle zumindest einen Teil dieser Leitfähigkeit ausmachen.

Von den bekannten spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen findet man L- und T-Typ Kanäle auf Astrozyten (Akopian et al., 1996) und Oligodendrozyten in Kultur (Verkhratsky et al., 1990). Zudem exprimieren Gliazellen verschiedene Typen von Cl^- -Kanälen (Walz, 2002).

2.4 Anatomie und Funktion des Hippocampus

Der Hippocampus [von griechisch hippos = Pferd, kampe = gekrümmt] ist eines der zentralen Bestandteile des limbischen Systems und gehört zum Archicortex oder Allocortex, der im Gegensatz zum phylogenetisch jüngeren Isocortex typischerweise nicht sechsschichtig ist. Der Hippocampus liegt bogenförmig ausgezogen entlang des Unterhorns des Seitenventrikels im mesialen Temporallappen. Er bildet die mediale Begrenzung des Seitenventrikels und ist nach lateral durch den Sulcus hippocampi vom Gyrus parahippocampalis getrennt.

Die Hippocampusformation besteht im wesentlichen aus: dem Gyrus dentatus, dem Cornu Ammonis (Ammonshorn, CA) und dem Subiculum. Der Gyrus dentatus besteht aus drei Schichten: der Lamina molecularis, der Lamina granularis, in der die Somata der Körnerzellen liegen, und dem Hilus, der teilweise auch als CA4 Region bezeichnet wird.

Das Ammonshorn wird weiter aufgeteilt in die Felder CA1 bis CA3, wobei jedes der Felder aus 4 Schichten besteht. Diese sind das Stratum oriens, Stratum pyramidale, in dem die Somata der Pyramidenneurone liegen, das Stratum radiatum und das Stratum lacunosum-moleculare.

Das Subiculum ist das zytoarchitektonisch abgrenzbare Areal zwischen CA1 und der Area entorhinalis (siehe Abb. 1).

Informationen erreichen den Hippocampus aus dem entorhinalen Kortex über den Tractus perforans (perforant path), der hauptsächlich an den Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus terminiert. Die Axone der Körnerzellen projizieren als sogenannte Moosfasern zu den großen Pyramidenzellen der CA3 Region. Diese wiederum senden die Schaffer'schen Kollateralen zu den apikalen Dendriten der Pyramidenneuronen in CA1.

Bei den Funktionen des Hippocampus stehen Gedächtnis und Lernen im Vordergrund. Eindrucksvoller Beleg hierfür ist die in den 1950er Jahren am Patienten H.M. durchgeführte bilaterale Hippocampektomie, die zu einer vollständigen anterograden Amnesie und partieller retrograder Amnesie (für das Jahr vor der Operation) führte. Der Neurochirurg William B. Scoville hatte sich für diese Art der Operation entschieden, nachdem sich kein epileptischer Fokus eingrenzen ließ (Internetquelle 1, Freed et al., 1987; Scoville & Milner, 2000). 1973 fanden Bliss und Lomo das Phänomen der Langzeitpotenzierung (LTP) der synaptischen Transmission, das als zelluläres Modell für Lern- und Gedächtnisvorgänge im Hippocampus gilt.

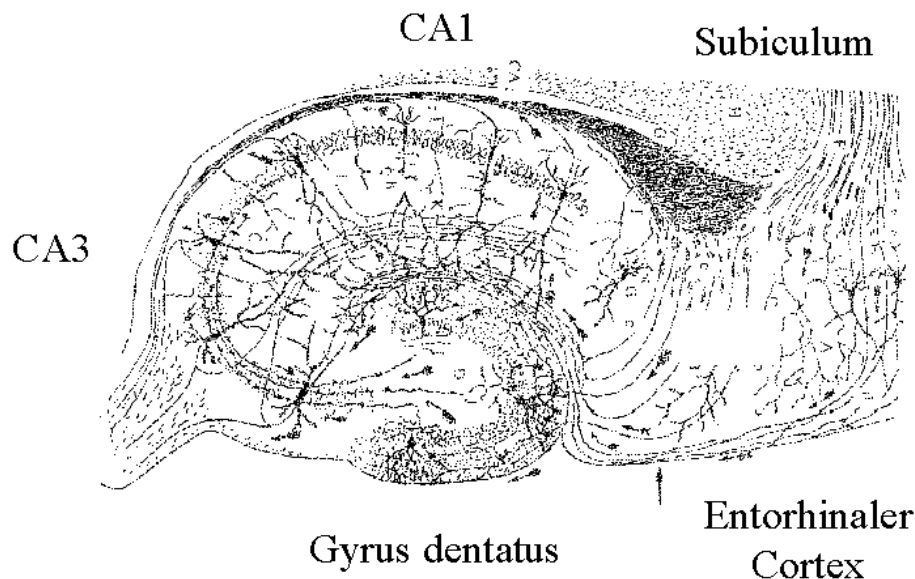


Abb.1: Linker Hippocampus der Ratte, sagittaler Schnitt (Internetquelle 2).

Der Hippocampus ist neben der Subventrikularzellschicht (SVZ) (Alvarez-Buylla et al., 2000) die einzige Hirnregion, in der nach der Geburt bis ins Erwachsenenalter Neurogenese stattfindet. Vorläuferzellen, die in der Subgranularzellschicht (SGZ) des Gyrus dentatus liegen, produzieren neue Körnerzellen, die in die Körnerzellschicht migrieren, ihre Dendriten in die Molekularzellschicht und die Axone in den Hilus und die CA3 Region (Hastings & Gould, 1999; Markakis & Gage, 1999) senden und sich so in das hippocampale Netzwerk integrieren (Scharfman et al., 2000; van Praag et al., 2002). Dies konnte bei Nagetieren (Altman & Das, 1965), Primaten (Seress, 1992; Gould et al., 1999) und dem Menschen (Eriksson et al., 1998) gezeigt werden, wobei angenommen wird, dass die postnatale Neurogenese eine wichtige Rolle bei der Bildung des episodischen Gedächtnisses spielt (Shors et al., 2001). Hirnverletzungen, wie sie bei epileptischen Anfällen (Benzon et al., 1997; Parent et al., 1997; Gray & Sundstrom, 1998), Ischämie (Liu et al., 1998) und Schädelverletzungen (Dash et al., 2001) vorkommen, bewirken eine vorübergehende Verstärkung der Neurogenese. Nachdem bisher angenommen wurde, dass sowohl die proliferierenden als auch die neugebildeten Zellen praktisch ausschließlich Neuronen sind (Parent et al., 1997; Gray & Sundstrom, 1998; Liu et al., 1998), haben andere Arbeiten jedoch astrogliale Zellen als Vorläuferzellen identifiziert. In Ratten-Embryonen bilden radiale Gliazellen der SVZ eine Subpopulation von Neuronen des cerebralen Cortex (Noctor et al., 2001; Heins et al., 2002; Malatesta et al., 2003). Auch im adulten Gyrus

dentatus sind es Astrozyten mit radialen Fortsätzen, die neue Neuronen und neue Gliazellen bilden (Seri et al., 2001; Hüttmann et al., 2003).

2.5 Glutamat als Neurotransmitter

Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im ZNS von Wirbeltieren. Nach synaptischer Freisetzung aktiviert Glutamat sowohl post-als auch präsynaptisch verschiedene metabotrope und ionotrope Glutamat-Rezeptoren. Die ionotropen Glutamat-Rezeptoren sind ligandengesteuerte nicht selektive Kationenkanäle, die sich in drei Familien unterteilen lassen: die α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat (AMPA)-Rezeptoren (Glutamat-Rezeptor (GluR) 1-4), die Kainat-Rezeptoren (GluR5-7, KA-1 und KA-2) und die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (NR1, NR2A-D, NR3A) (Dingledine et al., 1999). Während man davon ausgeht, dass NMDA- und Kainat-Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich auf Neuronen vorkommen, findet man AMPA-Rezeptoren auch in der Zellmembran von Astrozyten und Oligodendrozyten (Seifert & Steinhäuser, 1995; Seifert et al., 1997; Zhou & Kimelberg, 2001).

Neben den ligandengesteuerten ionotropen Glutamat-Rezeptoren gibt es die G-Protein gekoppelten metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluRs). Die metabotropen Glutamat-Rezeptoren werden in drei Gruppen unterteilt: Die erste Gruppe (mGluR1 und mGluR5) bewirkt eine Kalzium Ausschüttung aus intrazellulären Speichern (durch die Aktivierung der Phospholipase C und des Inositoltriphosphat (IP₃)/ Diacylglycerol-Systems), die zweite Gruppe (mGluR2 und mGluR3) und die dritte Gruppe (mGluR4,6,7 und 8) modulieren die synaptische Übertragung in Neuronen durch Hemmung der Adenylatzyklase (Knopfel & Grandes, 2002).

In Astrozyten findet man metabotrope Glutamat-Rezeptoren der Gruppen I und II, deren Expression bei der Aktivierung von Astrozyten, wie sie bei unterschiedlichen Formen von Hirnschädigungen vorkommt, hochreguliert wird (Aronica et al., 2000; Ferraguti et al., 2001).

Glutamat-Transporter (GluT) stellen den wirksamsten Mechanismus dar, durch den Glutamat aus dem Extrazellulärraum aufgenommen werden kann, um so eine niedrige, nicht-toxische Glutamatkonzentration aufrecht zu erhalten (Bergles & Jahr, 1998). Damit haben die Glutamat-Transporter direkten Einfluss auf die neuronale Transmission und stellen das aufgenommene Glutamat zusätzlich im Zellinneren zur Synthese von z.B. γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glutathion zur Verfügung. Sowohl in der Zellmembran von Neuronen als auch in der Membran

von Gliazellen kommen Glutamat-Transporter vor. Man unterscheidet die exzitatorischen Aminosäuren-Transporter (*EAAT*)1-5, von denen EAAT2 (Glutamat-Transporter-1 (GLT-1)) der am häufigsten vorkommende Glutamat-Transporter im Vorderhirn (Prosencephalon) ist, während EAAT1 (Glutamat/Aspartat-Transporter (GLAST)) im restlichen Gehirn am häufigsten vorkommt. Im erwachsenen Hirngewebe kommt GLT-1 Protein nur im Soma und in den Fortsätzen von Astrozyten vor. Im Gegensatz dazu findet man in der Retina GLT-1 Protein jedoch nur in Neuronen und nicht in Gliazellen (Rauen & Kanner, 1994; Euler & Wassle, 1995; Rauen, 2000). Während der pränatalen Entwicklung (Furuta et al., 1997) und unter pathologischen Bedingungen kommt GLT-1 Protein auch in anderen Neuronen vor (Northington et al., 1999). GLAST Protein findet man nur in astroglialen Zellen und nicht in Neuronen, weder während der Entwicklung, noch bei Krankheiten. EAAT3 (exzitatorische Aminosäuren *Carrier-1* (EAAC-1)) kommt im Soma und den Dendriten, jedoch anscheinend nicht in den Nervenendigungen, von Neuronen vor (Rothstein et al., 1994) und scheint im Gegensatz zu GLT-1 und GLAST hauptsächlich zytoplasmatisch und nicht in der Zellmembran lokalisiert zu sein. Zudem sind die Konzentrationen verglichen mit denen von GLT-1 und GLAST sehr gering (Haugeto et al., 1996). EAAT4 kommt nahezu ausschliesslich in den Purkinjezellen des Kleinhirns vor. Über die genaue Lokalisation von EAAT5 ist wenig bekannt, es scheint in den Müllerzellen der Retina vorzukommen (Danbolt, 2001).

2.6 Heterogenität astroglialer Zellen im Hippocampus

Mit Hilfe einer transgenen (Tg) Maus, die das „verstärkte grün fluoreszente Protein“ (EGFP) unter Kontrolle des „Humanen Sauren Gliafaserprotein (hGFAP)-Promotors“ exprimiert (Nolte et al., 2001), konnten wir zeigen, dass die Astrozyten des Hippocampus sich anhand der Expression von Glutamat-Rezeptoren und Glutamat-Transportern in ihrer Zellmembran in zwei Gruppen aufteilen lassen (Matthias et al., 2003).

Man findet zum einen Zellen mit einem runden Zellsoma mit wenigen dünnen Fortsätzen, die nur blassgrün bzw. schwach EGFP positiv sind und ein komplexes Strommuster haben (siehe Abb. 2A-B links). Durch die Applikation von Glutamat oder AMPA konnten bei diesen Zellen schnell aktivierende und fast vollständig desensitisierende Antworten ausgelöst werden. Diese Antworten wurden durch den AMPA-Rezeptor Modulator Cyclothiazid (CTZ) (Partin et al., 1993) potenziert

und ließen sich sowohl mit 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxalin-2,3-dion (NBQX) als auch mit 1-(4-aminophenyl)-3-methylcarbonyl-4-methyl-3,4-dihydroxy-7,8-methylenedioxy-5-H-2,3-benzodiazepin (GYKI₅₃₆₅₅) vollständig blockieren. Im Gegensatz dazu konnte mit D-Aspartat, einem Substrat von Glutamat-Transportern, an diesen Zellen niemals eine Antwort ausgelöst werden. Um eine Strom-Spannungskurve der Antworten zu erhalten, wurden *Outside-out patches* von der Zellmembran gezogen und Glutamat bei verschiedenen Spannungen appliziert. Hieraus ergab sich die typische Stromspannungskurve eines Glutamat-Rezeptors mit einem Umkehrpotential nahe null mV (Seifert & Steinhäuser, 1995) (siehe Abb. 2B-C links). Die Zellen wurden aufgrund der Expression von Glutamat-Rezeptoren als Glutamat-Rezeptor (GluR)-Zellen bezeichnet (Matthias et al., 2003).

Eine zweite Gruppe von Astrozyten hat unregelmäßig geformte Zellkörper mit vielen prominenten, weit verzweigten Fortsätzen, ist leuchtend grün bzw. stark EGFP positiv und hat ein passives Strommuster (siehe Abb. 2A-B rechts). Durch die Applikation von Glutamat oder D-Aspartat konnte in diesen Zellen eine kleinere Stromantwort mit einer größeren stationären Komponente als in den GluR-Zellen ausgelöst werden, die sich jedoch weder mit NBQX noch mit GYKI₅₃₆₅₅ blockieren ließ. Im Gegensatz dazu konnte mit AMPA und Kainat, auch nach einer Vorinkubation in CTZ, kein Strom ausgelöst werden. Bei der Glutamat Applikation an *Outside-out patches* zeigte sich, dass der Strom bei positiven Membranspannungen nicht in Auswärtsrichtung umkehrte, was typisch für Glutamat-Transporter ist (siehe Abb 2B-C rechts). Deswegen wurden diese Zellen als Glutamat-Transporter (GluT)-Zellen bezeichnet (Matthias et al., 2003).

Um die EGFP positiven Zellen weiter zu identifizieren, wurden Antikörperfärbungen gegen die astroglialen Marker GFAP und S100 β durchgeführt. Am postnatalen Tag 14 waren 77 ± 8 % der EGFP positiven Zellen im Stratum Radiatum der CA1 Region des Hippocampus S100 β positiv (Anzahl (n) = 349) und 75 ± 7 % waren GFAP positiv (n = 397). Erstaunlicherweise ko-exprimierten 38 % der Zellen (n = 109) neben S100 β auch AN2, das Maus Homolog von NG2, das früher als Marker Oligodendroglialer Vorläuferzellen angesehen wurde (Matthias et al., 2003).

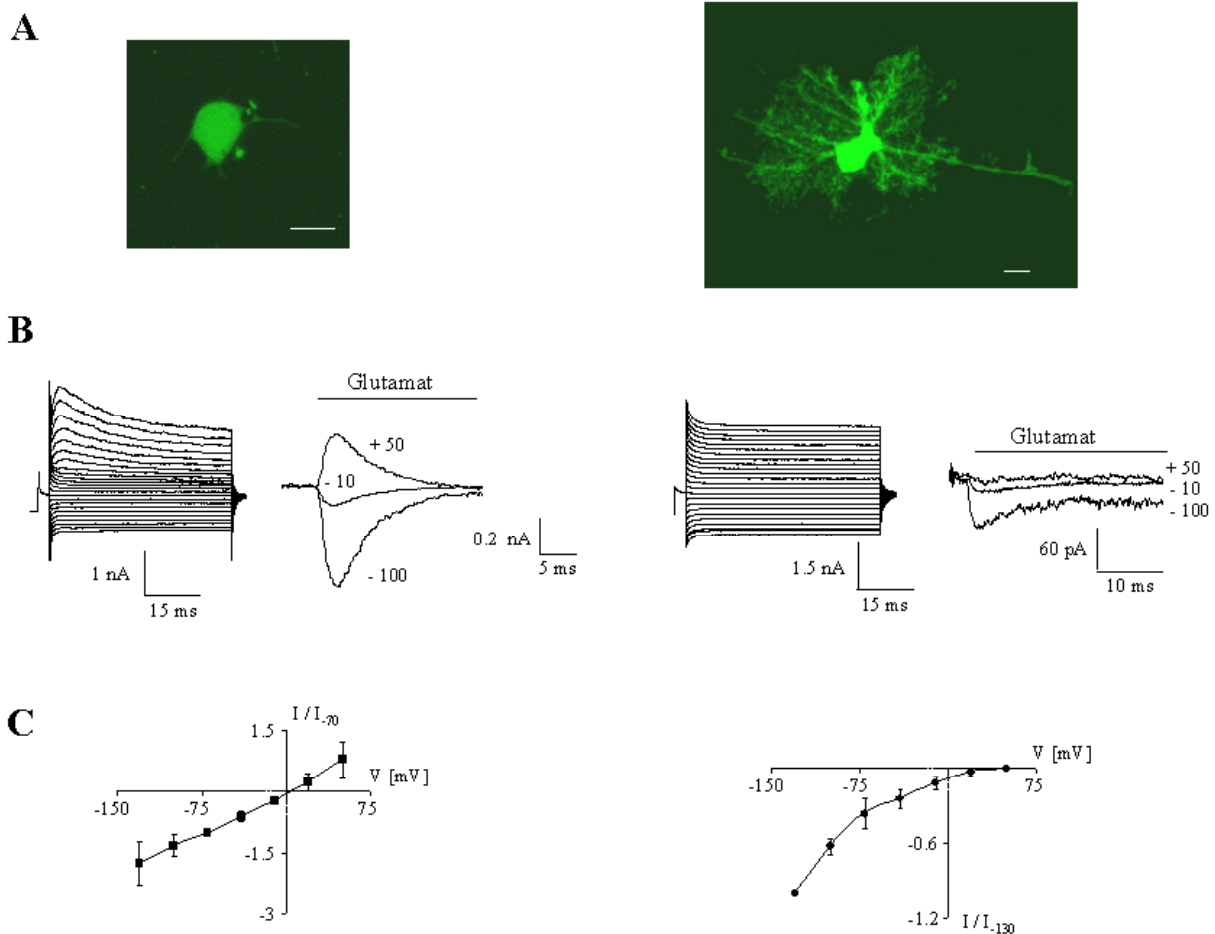


Abb. 2: [A]: Typisches Beispiel der Morphologie einer GluR Zelle (links) und einer GluT Zelle (rechts) aus der CA1 Region des Hippocampus einer Tg(hGFAP/EGFP) Maus. Man erkennt deutlich, dass die GluR-Zelle nur blass grün ist und scheinbar wenige Fortsätze hat, wohingegen die GluT-Zelle leuchtend grün ist und einen weit verzweigten Fortsatzbaum besitzt (Skalierung = 10 μ m). [B]: Ableitung von einer GluR-Zelle (links) und einer GluT-Zelle (rechts) in der Whole-cell Konfiguration (Vorhyperpolarisation auf -110 mV, dann von -70 mV aus jeweils vierzehn 10 mV Spannungssprünge in depolarisierende Richtung und neun 10 mV Sprünge in hyperpolarisierende Richtung). Anschließend wurde jeweils ein Outside-out Patch von der Zellmembran gezogen und Glutamat appliziert. Hierbei wurde die Zellmembran auf -100 mV hyperpolarisiert bzw. auf -10 und $+50$ mV depolarisiert. Bei allen Spannungen konnte bei der GluR-Zelle ein Rezeptorstrom ausgelöst werden, der bei der positiven Spannung in Auswärtsrichtung umkehrte. Bei der GluT-Zelle (rechts) konnte dagegen mit Glutamat kein Auswärtsstrom bei positiver Spannung aktiviert werden. [C]: Stromspannungskurven von 21 Rezeptorzellen und 14 Transporterzellen, gemittelt und normiert auf den Wert bei -70 mV (Rezeptorzellen) und -130 mV (Transporterzellen). (Matthias et al., 2003)

Bei der zusätzlich durchgeführten Einzelzell Polymerasekettenreaktion (PCR) fanden wir in allen untersuchten GluT-Zellen die *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) für GLT-1 und GLAST, jedoch nie die für GluR1-4. In den GluR-Zellen fanden wir jedoch überraschenderweise neben der mRNA für GluR1-4 auch bei 83 % mRNA für GLT-1 oder GLAST und bei 73 % sogar beide. Darüberhinaus wurde in 44 % der GluR-Zellen Transkripte für den neuronalen Glutamat-Transporter EAAC-1 gefunden. Die GluR-Zellen besitzen also neben astroglialen auch oligodendrogliale und neuronale Eigenschaften (Matthias et al., 2003).

2.7 Kopplung

Eine wichtige Eigenschaft von Gliazellen ist, dass sie miteinander über bestimmte spezialisierte Kanäle, die sogenannten *gap junctions*, zu einem großen Synzytium verbunden sind. Die *gap junctions* werden von bestimmten Proteinen, den Connexinen (Cx) gebildet. Während man bei Oligodendrozyten Cx29, Cx32 und Cx47 findet, exprimieren Astrozyten Cx43, Cx30 und Cx26 (Nagy und Rash, 2000, 2003; Nagy et al. 2003).

Gap Junctions sind durchgängig für Ionen und kleine Moleküle und ermöglichen so z.B. die Verteilung von Energiesubstraten im Gehirn (Giaume et al., 1997) oder die Verteilung von bei neuronaler Aktivität aufgenommenen Ionen und Neurotransmittern (Hansson et al., 2000).

Neueste Untersuchungen zeigen jedoch, dass den GluR-Typ Astrozyten diese wichtige Eigenschaft fehlt. Während jede GluT-Zelle, wie für Astrozyten erwartet, mit mehr als hundert anderen GluT-Zellen gekoppelt ist (siehe Abb. 3B), sind die GluR-Zellen vollkommen ungekoppelt (siehe Abb. 3D) (Wallraff et al., 2004). Hieraus folgt, dass im Gehirn anscheinend allein die GluT-Zellen für die räumliche Umverteilung von aufgenommenen Substanzen über weitere Entfernungen zuständig sind.

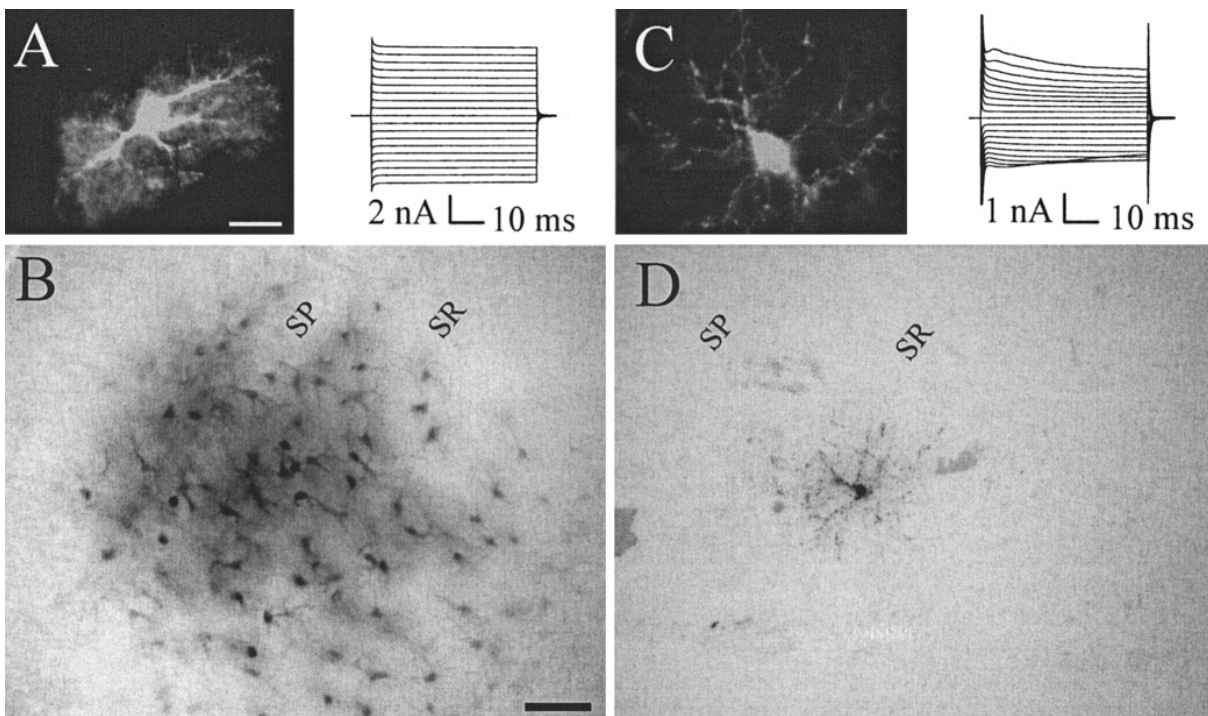


Abb.3: Kopplungsverhalten von GluR- und GluT-Zellen im Hippocampus von Tg(hGFAP/EGFP) Mäusen. [A]: Morphologie einer typischen GluT-Zelle (links) und elektrophysiologische Ganzzell Ableitung einer vergleichbaren Zelle (rechts; 20 Spannungssprünge, davon 9 depolarisierende und 9 hyperpolarisierende um jeweils 10 mV von -70 mV aus). [B]: Eine GluT-Zelle wurde während der Ableitung (20 min) mit Biozytin gefüllt, wodurch ihre Kopplung mit ca. 160 anderen Zellen sichtbar wird. [C]: Morphologie (links) und typisches Strommuster (Protokoll siehe A) einer GluR-Zelle. [D]: Durch die Biozytinfüllung während der elektrophysiologischen Ableitung (20 min) wird sichtbar, dass die Zelle nicht gekoppelt ist. (Skalierung = $10 \mu\text{m}$ (A, C) und $50 \mu\text{m}$ (B, D); SP = Stratum Pyramidale; SR = Stratum Radiatum) (Wallraff et al., 2004).

2.8 Epilepsie

Die Epilepsie (griechisch: „von etwas befallen oder erfasst“) gehört zu den häufigsten chronischen Krankheiten des Zentralen Nervensystems. In Deutschland sind etwa 400000 bis 800000 Menschen betroffen, von denen die Hälfte unter 10 Jahren alt ist. Epilepsien können jedoch Menschen jeglichen Alters betreffen.

Epilepsien werden unterteilt in idiopathische Epilepsien (aus dem griechischen: idios = von Natur aus, angeboren; pathos = Krankheit), symptomatische Epilepsien (griechisch Symptoma = Begleiterscheinung) und kryptogene Epilepsien (griechisch kryptein = verbergen).

Bei den idiopathischen Epilepsien, die meist altersgebunden sind, fehlt eine bekannte Ursache, man nimmt jedoch an, dass eine genetische Disposition besteht, eine Epilepsie zu entwickeln. Hierzu zählen zum Beispiel die gutartige Epilepsie des Kindesalters mit „zentro-temporalen Spikes“ und die Absence-Epilepsie des Kindesalters.

Symptomatische Epilepsien sind mit nachweisbaren Hirnschädigungen assoziiert. Hierzu gehören zum Beispiel die Temporallappenepilepsien und die Frontallappenepilepsien.

Bei den kryptogenen Epilepsien wird zwar eine Ursache vermutet, sie kann jedoch nicht nachgewiesen werden. Hierzu zählen das Lennox-Gastaut-Syndrom und das West-Syndrom.

An Anfallsformen unterscheidet man fokale und generalisierte Anfällen. Bei den fokalen Anfällen ist nur eine Hirnregion in einer Hirnhälfte betroffen, wobei je nach Bewusstseinzustand weiter in einfach-fokal, mit ungestörtem Bewusstsein, und komplex-fokal, mit getrübttem Bewusstsein unterschieden wird. Bei den generalisierten Anfällen dagegen sind beide Hirnhälften betroffen, mit den unterschiedlichsten möglichen Begleiterscheinungen wie erhöhter Speichelfluss, Herzrasen oder Atemstillstand. Die generalisierten Anfälle können von Beginn an generalisiert sein, oder aber aus einem komplex-fokalen Anfall hervorgehen, der sich weiter ausbreitet. Die häufigste Form des generalisierten epileptischen Anfalls ist der generalisierte tonisch-klonische oder „Grand-Mal“-Anfall.

Temporallappenepilepsien stellen etwa 40 Prozent aller Epilepsien dar. Sie entwickeln sich meistens in der ersten oder zweiten Lebensdekade und sind sehr oft therapierefraktär. Fast alle Betroffenen haben komplex-fokale Anfälle, denen einfach-fokale Anfälle vorausgehen können. Teilweise gehen die komplex-fokalen Anfälle auch in generalisierte Anfälle über. Der Hippocampus ist eine der krampfbereitesten Strukturen des Gehirns und Ausgangspunkt zahlreicher Epilepsien, insbesondere der Temporallappenepilepsie. Als Ursache findet man sehr häufig eine Sklerose des Hippocampus. Häufig berichten diese Patienten von ersten Anfällen als Fieberkrämpfe im Kleinkindalter, aus denen sich nach einer anfallsfreien Periode von unterschiedlicher Dauer, meist im Jugendalter, eine Epilepsie entwickelt. Weitere Ursachen können sein: Tumoren, Entzündungen des Gehirns, Gefäß- oder andere Missbildungen und Traumen, z.B. während der Geburt.

Da diese Epilepsien sehr oft mit Medikamenten nicht zufriedenstellend behandelbar sind, bleibt als letzter Ausweg häufig nur die operative Entfernung des Anfallsursprungs, vorausgesetzt, dass der Fokus auf eine Hirnhälfte beschränkt und lokal umschrieben ist.

(Internetquellen 3, 4 und 5)

2.9 Fragestellung

Mit dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob auch im menschlichen Hippocampus unterschiedliche Typen von Astrozyten vorkommen und ob diese in ihren Eigenschaften den Astrozyten im Hippocampus der Maus gleichen. Hierzu sollten Zellen aus dem Hippocampus von Patienten mit Ammonshornsklerose (AHS) und mit Läsions-assoziiierter Epilepsie vergleichend elektrophysiologisch, pharmakologisch und molekularbiologisch untersucht werden. Die Charakterisierung der Zellen sollte anhand des Membranstrommusters, des Kopplungsverhaltens und der Glutamatsensitivität erfolgen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob es in der Gruppe der Patienten mit Ammonshornsklerose epilepsiebedingt zu Veränderungen der Zelleigenschaften kommt. Dabei dienen die Astrozyten der Läsionspatienten, bei denen es keine oder nur sehr geringe morphologischen Veränderungen im Hippocampus gibt, als Vergleichsgruppe.

Neben den Untersuchungen an menschlichem Gewebe sollten vergleichende funktionelle Experimente in einem Epilepsie-Tiermodell durchgeführt werden. Hierbei wurden die Eigenschaften von Astrozyten zweier hippocampaler Subregionen, des Stratum Radiatum der CA1 Region und der SGZ des Gyrus dentatus, miteinander verglichen. Die SGZ ist von besonderem Interesse, da sie eines der wenigen Areale des Gehirns repräsentiert, in denen lebenslang Neurogenese stattfindet.

3 Materialien und Methoden

3.1 Patientendaten

Es wurden Hippocampuspräparate von 61 Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie untersucht. Insgesamt wurden 285 Astrozyten von 37 weiblichen und 24 männlichen Patienten analysiert, deren durchschnittliches Alter bei Beginn der Anfälle 10,8 Jahre war, zwei Patienten hatten keine Epilepsie. Die meisten Patienten zeigten komplex-partielle Anfälle, teilweise mit zusätzlichen einfach partiellen Anfällen. 35 Patienten hatten Grand-mal Anfälle von unterschiedlicher Häufigkeit.

Bei der anschließenden histopathologischen Untersuchung wurde in 39 Fällen eine Ammonshornsklerose diagnostiziert, die durch starken Neuronenverlust in der CA1, CA3 und CA4 Region gekennzeichnet war. Bei weiteren 22 Patienten wurden keine oder nur geringe morphologische Veränderungen im Hippocampus festgestellt. Von diesen Patienten litten 5 Patienten an einem Gangliogliom, 4 Patienten an einer corticalen Dysplasie, einer an einem Cavernom, einer an einem Sturge-Weber Syndrom, einer an einer Hemimegalenzephalie, einer an einem anaplastischen Astrozytom, einer an einem Arteria cerebri media-Infarkt und einer an einem dysembryoplastischen neuro-epithelialen Tumor (DNT). Die übrigen Patienten zeigten keine oder nur geringe Veränderungen des histopathologisch untersuchten Gewebes.

Das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation war 31,1 Jahre. Bei allen AHS Patienten wurde durch nicht invasive und invasive prächirurgische Untersuchungen der Hippocampus als Anfallsursprung identifiziert (Engel, Jr., 1993; Kral et al., 2002), und die Entfernung des Hippocampus war klinisch indiziert, um eine Kontrolle der Anfallsaktivität zu erlangen. Bei den Patienten mit extrahippocampaler Läsion wurde eine Entfernung des Hippocampus im Rahmen der Entfernung der epileptogenen Läsion durchgeführt. Alle Patienten haben einer weiteren elektrophysiologischen Untersuchung des Gewebes zugestimmt, und alle Untersuchungen waren genehmigt worden durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn und entsprachen den Standards der Deklaration von Helsinki (1989).

3.2 Präparation des humanen Gewebes

Dank einer speziell entwickelten Resektions-Technik wurden *en bloc*-Präparate des Hippocampus entnommen, deren Volumen sowohl eine anschließende histopathologische wie auch eine elektrophysiologische Untersuchung ermöglichten (Dietrich et al., 1999). Sofort nach der Resektion wurde das Gewebe in 4-6°C kalter Präparationslösung (siehe Tabelle 1) mit einer Rasierklinge transversal geblockt und die 3-4 mm dicken Blöcke mit einem Vibratom (VT 1000 S, Leica, Bensheim, Deutschland) auf 200 µm heruntergeschnitten. Die Schnitte wurden in artefizieller Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF, siehe Tabelle 1), die mit Carbogen (5 % CO₂/ 95 % O₂) begast wurde, bei Raumtemperatur (22°C) aufbewahrt. Zum Messen wurde jeweils ein Schnitt in die Perfusionskammer, die auf dem Tisch eines Zeiss Mikroskops (Axioskop FS, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) befestigt war, überführt und mit einem Grid aus Nylonfäden fixiert. Die Kammer wurde ununterbrochen mit begaster Lösung durchspült. Die abgeleiteten Zellen lagen in der CA1 Region des Hippocampus und wurden ausgesucht mit Hilfe einer Infrarot Kamera (C5204, HAMAMATSU, Japan).

3.3 Präparation von Hirngewebe der Maus

Tg(hGFAP/EGFP) Mäuse wurden mit einer Mischung aus 50 % CO₂ und 50 % O₂ anästhesiert und dekapitiert. Es wurden 80 µm oder 100 µm dicke Schnitte für die *in situ* Ableitungen angefertigt (Steinhäuser et al., 1992). Der Messaufbau entsprach dem für die Ableitungen aus dem humanen Gewebe. Die Zellen wurden anhand ihrer grünen Fluoreszenz ausgewählt und während der Ableitung mit 0,5 % Texas Red Dextran (Molecular Probes, Eugene, USA) gefüllt, das der 130 Kaliumchlorid (KCl)-Innenlösung (siehe Tabelle 3) beigesetzt wurde.

3.4 Visualisierung des Biozytins

Die Schnitte mit den intrazellulär markierten Zellen wurden sofort nach der Ableitung in 4 % Paraformaldehyd (PFA) (siehe Tabelle 4) bei 4 °C über Nacht fixiert. Anschließend wurden sie 3 mal für jeweils 10 min mit 0,1 M Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) (siehe Tabelle 4)

gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen wurde für 1 h mit 5 % Rinderserumalbumin (BSA) in 0,1 M PBS mit 2 % Triton X-100 geblockt. Danach wurde die endogene Peroxidase mit 0,03 % H₂O₂ in 0,1 M PBS mit 0,1 % Triton X-100 inaktiviert. Nach nochmaligem Blocken in 5 % normalem Ziegen Serum (NGS) in 0,1 M PBS mit 0,1 % Triton X-100 für 15 min wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit dem Elite ABC Kit (Axxora Deutschland GmbH, Grünberg, Deutschland), 1: 500, in 0,1 M PBS mit 0,6 % Triton X-100 und 0,5 % BSA inkubiert. Anschließend wurden sie zunächst zweimal für jeweils 10 min in 0,1 M PBS gewaschen und danach einmal für 10 min in 0,05 M Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan - Puffer (TB) (siehe Tabelle 4). Nach einer Präinkubation von 30 min in 0,05 M TB mit 0,05% Diaminobenzidin (DAB) und 0,01 % NiNH₄SO₄, wurde durch Zugabe von 0,003 % H₂O₂ das DAB oxidiert. Die Reaktion wurde nach ca. 10 min gestoppt und die Schnitte zunächst einmal in 0,05 M TB, anschließend zweimal in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) (siehe Tabelle 4) gewaschen. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

3.5 Messaufbau

Die Membranströme der Zellen wurden mit der *Patch-Clamp* Technik in der *Whole-cell* Konfiguration untersucht. Experimente, in denen Substanzen schnell appliziert wurden, wurden an *Outside-out Patches* durchgeführt. Die Ströme wurden verstärkt (EPC 9 Verstärker; HEKA, Lambrecht, Deutschland), gefiltert bei 3 oder 10 Kiloherz (kHz) und abgetastet bei 10 oder 30 kHz. Als Messprogramm wurde Tida für Windows verwendet. Der Widerstand der *Patch-Pipetten* war bei 4-6 Megaohm (MΩ). Kapazität und Serien-Widerstand (R_s) sowie das *Liquid Junction Potential* wurden kompensiert. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (22°C) durchgeführt.

3.6 Datenanalyse

Die Membrankapazität (C_m) wurde aus einem 10 mV Testpuls, der die Zellmembran vom Haltepotential bei -70 mV auf -60 mV depolarisiert, berechnet. Der A-Strom wurde separiert, indem die Stromdifferenz zweier Spannungsprotokolle, eins mit einem Vorpuls auf -110 mV, um

denn A-Strom zu aktivieren und eins mit einem Vorpuls auf -40 mV, um den A-Strom zu inaktivieren, bestimmt wurde. Die Stromdichten (CD) wurden aus der Stromstärke (I) bei $+70$ mV bzw. -130 mV und Cm mit folgenden Formeln berechnet:

$$CD = I_{+70} / Cm$$

für die A-Stromdichte und

$$CD = I_{-130} / Cm$$

für die K_{ir} -Stromdichte.

Unterschiedliche Werte wurden mit dem „*Students-t-Test*“ auf Signifikanz untersucht.

Der Rektifizierungsindex (RI) wurde aus dem Verhältnis der Leitfähigkeiten bei $+20$ mV und -130 mV mit der Formel:

$$RI = [I_{+20} / (+20 - E_{rev})] / [I_{-130} / (-130 - E_{rev})]$$

bestimmt, wobei E_{rev} das Umkehrpotential der Membranströme (in mV) ist. Die Werte wurden 40 ms nach Aktivierung der jeweiligen Stromkomponente abgelesen.

3.7 Schnelle Applikation von Glutamat

In Anlehnung an die Methode von Franke et al. (1987) wurde Glutamat schnell an *Outside-out Patches* appliziert. Die Applikationspipette wurde aus Theta-Glass (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) mit einem äußeren Durchmesser von 2,0 mm, einem inneren Durchmesser von 1,4 mm und einer Septum Dicke von 0,11 mm hergestellt. Die Spitze wurde so ausgezogen, dass sie einen Durchmesser von ungefähr 200 μ m hatte. Die Applikationspipette wurde an einem Piezotranslator (P-245.50, Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland) befestigt und durch einen Piezomotor (P270.01, Physik Instrumente) bewegt. Sowohl Kontroll-Lösung als auch Agonisten-Lösung flossen gleichzeitig und kontinuierlich unter leichtem Druck durch eine Spritzenpumpe (sp220i, WPI, Berlin, Deutschland) durch die beiden Hälften des Theta-Glases. Die Lösungen wurden in 50 ml Spritzen mit einem Filteraufsatz (Minisart, Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit 0,2 μ m Porengröße aufbewahrt, um Luftblasen zu vermeiden und eine optimale Fließgeschwindigkeit zu gewährleisten. Die Spitze der *Patch*-Pipette mit dem *Outside-out Patch* wurde im rechten Winkel zur Applikationspipette im Zentrum des Kontrollstrahls positioniert. Durch die Aktivierung des Piezotranslators wurde die Applikationspipette um 80 μ m zur Seite bewegt, so dass der *Patch* für einen definierten Zeitraum im Agonistenstrahl war. Die

Anstiegszeit für den Lösungsaustausch (20 % -80 %) betrug 300 μ s, ein vollständiger Lösungsaustausch ca. 1 ms. Um eine schnelle Entfernung des Agonisten aus der Badkammer zu gewährleisten, wurde eine hohe Durchflussrate von 2-8 ml/min eingestellt.

3.8 Einzelzell RT-PCR und semiquantitative PCR

Um Aufschluss darüber zu bekommen welche Glutamat-Rezeptor Untereinheiten in den Astrozyten exprimiert sind, wurde ein Teil der Zellen im Anschluß an die elektrophysiologische Ableitung mittels Einzelzell Reverse Transkription-PCR (RT-PCR) untersucht. Hierzu wurde das Zytoplasma der jeweiligen Zelle nach der elektrophysiologischen Ableitung vorsichtig in die *Patch*-Pipette eingesaugt und der Inhalt der Pipette in ein Gefäß mit 3 μ l Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser überführt. Anschließend wurde das Gefäß mit dem Zytoplasma der Zelle sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Um die RT Reaktion durchzuführen wurden 3,5 μ l eines Reaktions Gemisches aus RT Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland), Desoxyribonukleotid-Triphosphat (dNTP) (finale Konzentration 4 x 250 μ M; Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland), Hexanukleotid Primer (50 μ M; Roche, Mannheim, Deutschland), 20 U RNase Inhibitor (RNasin) (Promega, Madison, WI, USA) und 0,5 μ l Sensiscript Reverse Transkriptase (Qiagen) beigegeben, so dass man ein Gesamtvolumen von 10 μ l erhielt. Die Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) des jeweils komplementären Einzelstrangs wurde bei 37 °C 1 h durchgeführt. Eine *nested* PCR wurde durchgeführt, indem das Produkt der ersten PCR Runde (3 μ l) als Vorlage für die zweite Runde genommen wurde. Für die erste PCR wurden dem RT Produkt PCR Puffer, MgCl₂ (2,5 mM) und die entsprechenden Primer (jeweils 200 nM) beigegeben, so dass man ein Endvolumen von 50 μ l erhielt. Nach der Denaturierung (94 °C, 4 min) wurden 3.5 U Taq Polymerase (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) bei 85 °C zugegeben.

Die Primer Paare, die für die erste PCR Runde verwendet wurden, amplifizierten alle AMPA-Rezeptor Untereinheiten (hGluR1-4). Der sense- Primer war 5'-TGTGCATTGTYTTTGCCTACATTGG, der mit hGluR3 und hGluR4 jeweils ein *mismatch* hat. Der *antisense*-Primer war 5'-CTCAGRGCRCTBGTCTTKTCCTT, der mit hGluR2 und hGluR4 jeweils ein *mismatch* hat. Die Positionen des *sense*-Primers waren 1622 bei hGluR1 (GenBank Akzessionsnummer M64752), 1643 (hGluR2, L20814), 1670 (hGluR3, U10301) und 1646

(hGluR4, U16129). Die entsprechenden Positionen der *antisense*-Primer waren 2383, 2404, 2437 und 2407. Die *sense*-Primer für die *nested* PCR waren 5'-GGACGGGACCAGACAACCAG für hGluR1 (Position 1717), 5'-TGAAGATGGAAGAGAAACACAAAG für hGluR2 (Position 1731), 5'-ACCCAC AAAGTCCTCCTG für hGluR3 (Position 1775) und 5'-GAAGGACCCAGCGACCAGCC für hGluR4 (Position 1747). Der *antisense*-Primer für die *nested* PCR, 5'-TCGTACCACCATTTGTTTTTCA, war gleich für alle Untereinheiten und hatte jeweils ein *mismatch* mit jeder Untereinheit (Position 2327, 2348, 2381 und 2351 für hGluR1-4). Die Anbindungstemperatur betrug 51 °C für hGluR1, 2, 4 und 54°C für hGluR3. Die Produkte wurden einer Agarosegel-Elektrophorese identifiziert (1,5 %, gefärbt mit Ethidiumbromid) unter zu Hilfenahme eines Molekulargewicht-Markers (Φ X174 *HincII* digest; Eurogentec, Seraing, Belgien). Die zu erwartenden Fragmentlängen waren 632, 639, 630 und 629 Basenpaare (Bp) für hGluR1-4.

Für den Nachweis von S100 β mRNA wurde als *sense*-Primer 5'-GGAAGGGAGGGAGACAAGCACAAG; Genbank Akzessionsnummer M59487, Primer Position 75 und als *antisense*-Primer 5'-TGAGGAACGCATTTAAAGAACAGC, Genbank Nummer M59488, Primer Position 572, verwendet. Für die *nested* PCR war der *sense*-Primer 5'-TCAAGGAGCTCATCAACAATG (Position 115, M59487) und der *antisense*-Primer 5'-CACGGTGCACGCTTTATCAC (Position 424, M59488). Beide *sense*-Primer detektierten eine Sequenz auf Exon 2, die zwei *antisense*-Primer eine Sequenz auf Exon 3 des humanen S100 β Gens.

Für die Restriktionsanalyse wurde die zweite PCR Runde mit einer reduzierten Zyklenzahl (25 Zyklen) wiederholt. Das Produkt wurde gereinigt und in 25 μ l Wasser gelöst. Mit den Spleißvarianten-spezifischen Endonucleasen *AluI* (schneidet hGluR1 Flip in ein 609 Bp und ein 23 Bp Fragment), *HpaI* (hGluR2 Flop, 571 Bp und 68 Bp), *HpaI* (hGluR3 Flop, 562 Bp und 68 Bp) und *BsaHI* (hGluR4 Flip, 590 Bp und 36 Bp) wurde der Spleißstatus der hGluR cDNAs identifiziert. Die Endonucleasen wurden von New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Sieben μ l des jeweiligen gereinigten PCR-Produkts wurden mit 10 U des Restriktionsenzym inkubiert (Endvolumen 15 μ l; 6 h bei 37 °C). Die cDNA Fragmente wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese mit einer Auflösung bis zu 10 Bp aufgetrennt (2 % *Separide gel matrix*, 50 Bp Längenmarker, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Die Fragmente wurden mit Ethidiumbromid markiert und mit einem System zur digitalen Darstellung (*AlphaImager*, San Leandro, CA, USA) ausgewertet. Die Belichtungszeiten wurden den jeweiligen

Färbungsintensitäten angepasst, und die optische Dichte der Fragmente wurde nach einer Hintergrundkorrektur bestimmt. Die Anteile von flip versus flop (flip/flop-Ratio) wurden für jede Untereinheit ermittelt, indem die optische Dichte der geschnittenen Banden mit der ungeschnittenen Banden verglichen wurde (auf 100 % normalisiert). Die zweite PCR und die Restriktionsanalyse wurden jeweils zweimal durchgeführt, um sicher zu sein, dass die Ergebnisse reproduzierbar waren.

Als Positiv-Kontrolle wurde mit Trizol (Invitrogen) gesamt-RNA aus humanen Hippocampuspräparaten isoliert und mit 2 ng der gesamt-RNA und den für die Einzelzell-PCR verwendeten Primern eine zwei Runden RT-PCR durchgeführt. Es wurden keine unspezifischen Produkte erhalten. PCR Produkte aus der gesamt-RNA und aus klonierten hGluRs wurden mit den beschriebenen Restriktionsenzymen verdaut. Die erhaltenen Fragmente entsprachen den erwarteten Längen, wobei im Fall der klonierten hGluRs der Verdau komplett war. Das Weglassen der reversen Transkriptase bzw. die Aspiration von Badlösung dienten als Negativkontrolle.

Bestimmung der Flip/Flop Ratios mittels *real-time* PCR: Für die cDNA Quantifizierung wurde ein ABI PRISM 7700 *Sequenz Detection System* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet. Dieses System kann die Akkumulation des PCR Produkts während jedes Zyklus' mit dem *fluorogenic 5'-nuclease assay* (Holland et al., 1991) nachweisen. Die hGluR Flip und Flop Transkripte wurden mit dem *TaqMan PCR Core Reagent Kit* (PE Applied Biosystems) untersucht; die Primer und TaqMan Proben (siehe Tabelle 1) wurden von Eurogentec bezogen.

Tabelle 1: Primer und TaqMan Proben, die für die real-time PCR verwendet wurden.

Primer und Nukleotidsequenzen Proben	Position	Produkt- Länge
hGluR Flip 5'-TCAGTGAGSMAGGCGTCTTAGA se	2300, 2321, 2354, 2324	
hGluR Flip 5'-GTCTTGTCCTTACTTCCRGAGTC as	2371, 2392, 2425, 2395	
hGluR Flip FAM-5'-AAGCTGAAAARCAAATGGTG Probe se GTAC GATAAAGG-TAMRA	2323, 2344, 2377, 2347	94 Bp
hGluR Flop 5'-TTAACCTSGCAGTATTA AAAACTGA se	2279, 2300, 2333, 2303	
hGluR Flop 5'-TGGARTCACCTCCCCCGCTG as	2364, 2375, 2418, 2388	
hGluR Flop FAM-5'-TGGACAAATTGAAAAACAAA Probe se TGG TGGTACGA-TAMRA	2318, 2339, 2372, 2342	105 Bp

Position 1 ist das erste Nukleotid des Initiation Codons. „Se“ und „as“ markieren sense- und antisense-Primer und Proben. Die TaqManTM Proben wurden an 5' mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) und an 3' mit 6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert. Alle Primer und Proben waren auf konservierten Nucleotiden für die entsprechende Spleiß Form lokalisiert. Der antisense hGluR Flip Primer hat ein Mismatch mit hGluR2 und eins mit hGluR4. Der „sense hGluR“-Flop Primer hat jeweils ein Mismatch mit hGluR2 und hGluR4 und zwei mit hGluR1 (Seifert et al., 2004).

Das Reaktionsvolumen betrug 12,5 µl, die cDNA der ersten Runde der Einzelzell-PCR wurde als Vorlage für die nachfolgenden Reaktionen verwendet (Aliquots von 0,5 µl). In jeder PCR Runde

wurden hGluR Flip und Flop der einzelnen Zellen, parallel mit einem Gemisch aus klonierter hGluR Flip/Flop cDNA zur Kalibration, erfasst. Das optimierte Reaktionsgemisch enthielt TaqMan Puffer, 3 x 200 μ M dNTPs (dATP, dCTP, dGTP), 400 μ M dUTP, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,3 U AmpliTaq Gold TaqDNA Polymerase, 0,125 U Uracil-DNA-Glycosylase (UNG), 100 nM fluorogene TaqMan Probe und 300 nM jedes PCR Primers. Die für die einzelnen hGluR Spleißformen verwendeten spezifischen Oligonucleotide sind in Tabelle 1 aufgeführt. Nach der Inkubation (50 °C, 2 min) wurde die UNG bei 95 °C (10 min) denaturiert, gefolgt von 60 PCR Zyklen (Denaturierung bei 95 °C für 15 sec; Primer Anbindung und Elongation bei 59 °C für 60 s). Die Fluoreszenz-Intensität wurde während jeder Anbindungs- und Elongations-Phase des jeweiligen PCR Schritts abgelesen und die Fluoreszenz Emission bei der für den Farbstoff spezifischen Wellenlänge fortlaufend überwacht. Nach Normalisierung der Emission auf einen internen Referenzwert, ΔR_n , wurde der Zyklus (C_T) ermittelt, der in der exponentiellen Phase der PCR der Schwellenwert ist.

Um die Spezifität und die Effektivität der Reaktionsbedingungen zu optimieren wurde klonierte humane AMPA-Rezeptor cDNA verwendet. Alle Primer und TaqMan-Proben waren so gestaltet, dass sie nur eine Spleißvariante, entweder Flip oder Flop, amplifizierten. Dies konnte durch Verwendung von klonierter humaner GluR cDNA der jeweils anderen Spleißform als PCR Target bestätigt werden, da hierbei keine PCR Produkte erhalten wurden. Um die PCR Bedingungen so zu optimieren, dass beide Spleißformen von hGluR1-4 mit gleicher Effizienz amplifiziert wurden, wurden Lösungsreihen (von 4×10^{-17} bis 3.125×10^{-19} mol) von hGluR cDNA verwendet. Bei steigender Konzentration der jeweiligen klonierten cDNA sank der dazugehörige C_T Wert (siehe Abb. 4A). Die so erhaltenen Geraden für hGluR1 Flip und Flop waren annähernd identisch, d.h. dass beide Spleißformen mit der selben Effizienz amplifiziert wurden. Mit den verwendeten Primern und PCR Proben wurden Eichgeraden bei definierten Flip/Flop Verhältnissen erstellt, wobei die cDNA Konzentration konstant 2×10^{-17} mol betrug. So konnte aus dem Unterschied der Zyklenzahl, die benötigt wurde, um hGluR1 Flip bzw. hGluR1 Flop in den Astrozyten der Epilepsiepatienten nachzuweisen, der ΔC_T Wert errechnet werden (siehe Abb. 4B).

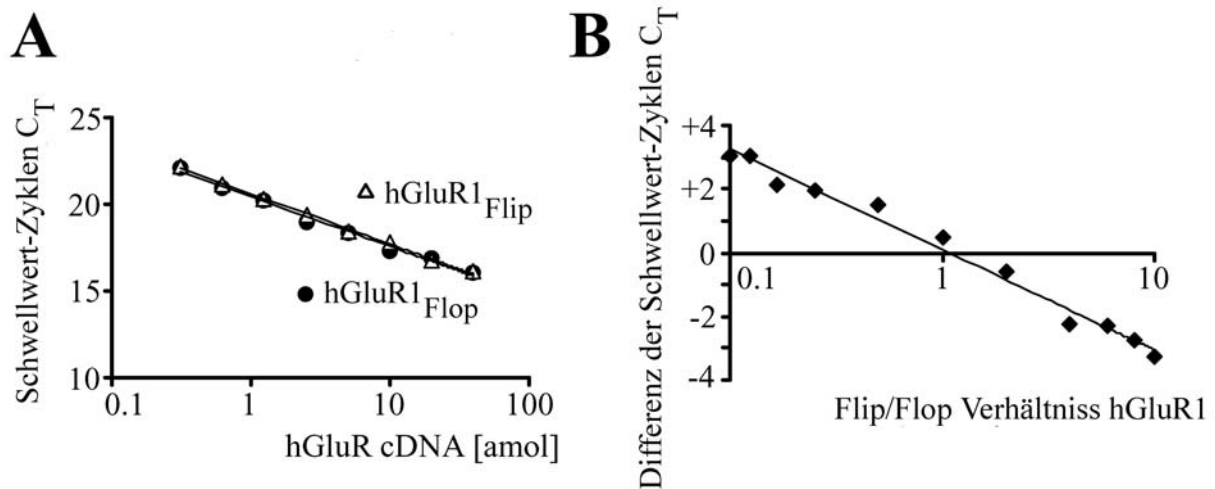


Abb. 4: Kalibrierung der real-time PCR mit klonierter humaner GluR cDNA, bei Verwendung beider Spleißformen. In [A] ist die Kalibrierung der real-time PCR mit hGluR1 Flip und Flop cDNA als Beispiel dargestellt. Es wurden die Schwellwert-Zyklen bei unterschiedlichen cDNA Konzentrationen aufgetragen, wobei die Werte von hGluR1 Flip und Flop nahezu identische Geraden ergaben. [B] Für definierte hGluR1 Flip/Flop Verhältnisse wurde eine Eichgrade ΔC_T erstellt, wobei die cDNA Konzentration konstant 2×10^{-17} mol war. Die ΔC_T Werte wurden ermittelt, indem $C_{T\text{GluR1Flop}}$ von $C_{T\text{GluR1Flip}}$ beim entsprechenden Flip/Flop Verhältnis abgezogen wurde.

3.9 Kainat-Injektionen

Zwölf 50 Tage alten (25 g) Tg(hGFAP/EGFP) Mäusen wurden 20 mg/kg Kainat, gelöst in sterilem PBS, intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden für eine Stunde beobachtet, und die Anfallsstärke wurde anhand der *Racine Skala* (Racine, 1972) bewertet und dokumentiert. Die Anfälle setzten nach 10 min ein und erreichten ihr Maximum nach ca. 30 min. Es wurden nur Tiere, die einen Wert von vier oder mehr erreichten, in die Experimente mit einbezogen. Fünf Kontrollmäusen wurde nur PBS injiziert. Zwei der Kainat-injizierten Tiere starben und eins erreichte nicht den vorgegebenen Wert auf der Racine Skala (Tierversuchsgenehmigung: Aktenzeichen 23.203.2-Bn28, 20/00). Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit der Direktive des Rats der Europäischen Gemeinschaft vom 24 November 1986 (86/609/EEC) durchgeführt.

3.10 BrdU Markierung und Immunhistochemie

Allen Tieren, die entweder Kainat in PBS oder nur PBS bekommen haben, wurde 72 h später das Thymidinanalog Bromodesoxyuridin (BrdU) (50 mg/kg, gelöst in PBS), das sich in die DNA teilender Zellen einbaut, intraperitoneal injiziert. Zwei Tage nach der BrdU-Injektion wurden die Tiere getötet und die Zellen elektrophysiologisch untersucht.

Nach der Ableitung wurden die Schnitte in 4 % PFA über Nacht fixiert. Anschließend wurden sie in TB gewaschen und die DNA in 2 N HCL bei 37 °C für 30 min denaturiert. Danach wurde zunächst 10 min in 0,1 M Borsäure (pH 8,5) gewaschen und dann mit 0,1 % Triton-X-100 und 0,05 % BSA in TB geblockt. Die Schnitte wurden über Nacht mit dem 1. Antikörper (Ratte, monoklonal, anti BrdU, 1:1000, Harlan Sera-Laboratories, UK) in 0,1 % Triton-X-100 und 0,05 % BSA in TB inkubiert. Anschließend wurden sie mehrmals in TB gewaschen und dann für 1 h mit dem 2. Antikörper (Esel-gegen-Ratte, Cyanin (Cy)3 konjugiert, 1:200; Jackson Labs, USA) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in TB wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und eingedeckelt.

3.11 Lösungen und Chemikalien

Die Tabellen 2 und 3 geben eine Übersicht über die verwendeten Bad- und Pipettenlösungen. Tabelle 4 enthält die Lösungen, die für die Färbungen verwendet wurden. Die Badlösungen wurden vor Beginn der Experimente auf einen pH-Wert von 7,38-7,40, die Innenlösungen auf 7,25-7,28 eingestellt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von *Sigma* (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2: Badlösungen¹

Nr.	Bezeichnung	Glukose	CaCl ₂	Hepes	KCl	MgSO ₄	NaCl	NaH ₂ PO ₄	NaHCO ₃	Na-Pyruvat
1.	HEPES	10	2	10	5	2	150			
2.	ACSF	10	2		3	2	126	1.25	26	
3.	Präparationslösung	10		10	5	2	150			1

¹ Alle Angaben in [mM]**Tabelle 3: Innenlösungen¹**

Nr.	Bezeichnung	BAPTA	Hepes	CaCl ₂	KCl	MgCl ₂	KSCN	ATP	K-Gluconat	EGTA	Biozytin
1.	130 KCl	5	10	0.5	130	2		3			
2.	KSCN	5	10	0.5		2	130	3			
3.	K-Gluconat mit Biozytin		20			1		3	130	10	2.68

¹ Alle Angaben in [mM]**Tabelle 4: Färbungen**

Nr.	Bezeichnung	NaCl	Na ₂ HPO	NaH ₂ PO ₄	Trizma-Base	Paraformaldehyd
1.	PBS	150	8.3	1.7		
2.	TB pH 7.6				50	
3.	PB		81	17		
4.	PFA	150	8.3	1.7		4 %

¹ Alle Angaben in [mM], sofern nicht anders angegeben; pH 7.4

4 Resultate

4.1 Humaner Hippocampus

4.1.1 Identifizierung von Astrozyten

Astrozyten wurden anhand ihrer Morphologie (rundliches bis unregelmäßig geformtes Zellsoma von ca. 8-10 μm Durchmesser, wenige dünne bis kräftigere Fortsätze, die sich zum Teil stark verzweigen) im IR-Bild ausgewählt. Zellen mit prominenten Na^+ -Strömen wurden für 30 s im Current Clamp Modus auf Spontanaktivität untersucht. Zusätzlich wurden Strominjektionen bis 300 pA durchgeführt, um die Generierung von Aktionspotentialen zu provozieren und so Neuronen sicher ausschließen zu können. Keine der hier untersuchten Zellen zeigte Spontanaktivität oder Aktionspotentiale nach Strominjektion. Die humanen Astrozyten wurden zusätzlich anhand ihrer Immunreaktivität für S100 β bzw. GFAP identifiziert. Während mit einem Antikörper gegen S100 β sowohl das Zellsoma, als auch die Soma nahen Fortsätze angefärbt wurden, markierte der GFAP-Antikörper hauptsächlich die astrozytären Fortsätze. Neurone waren niemals GFAP oder S100 β positiv (Hinterkeuser et al., 2000). Zusätzlich wurden an einem Teil der Zellen Transkriptanalysen für S100 β durchgeführt.

4.1.2 Membraneigenschaften humaner Astrozyten

Es wurden 285 Astrozyten in der CA1 Region des Hippocampus von 61 Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie untersucht. Dabei wurden zwei Arten von Zellen mit deutlich unterschiedlichen Eigenschaften elektrophysiologisch abgeleitet. Zum einen findet man passive Astrozyten, mit hauptsächlich zeit- und spannungsunabhängigen Strömen, die den GluT Zellen im Hippocampus der Maus gleichen. Der zweite Zelltyp besitzt ein komplexes Strommuster, das hauptsächlich durch das Öffnen und Schließen spannungs- und zeitabhängiger Kanäle zustande kommt und dem Strommuster der GluR Zellen der Maus ähnelt (siehe Abb. 5) (Matthias et al., 2003).

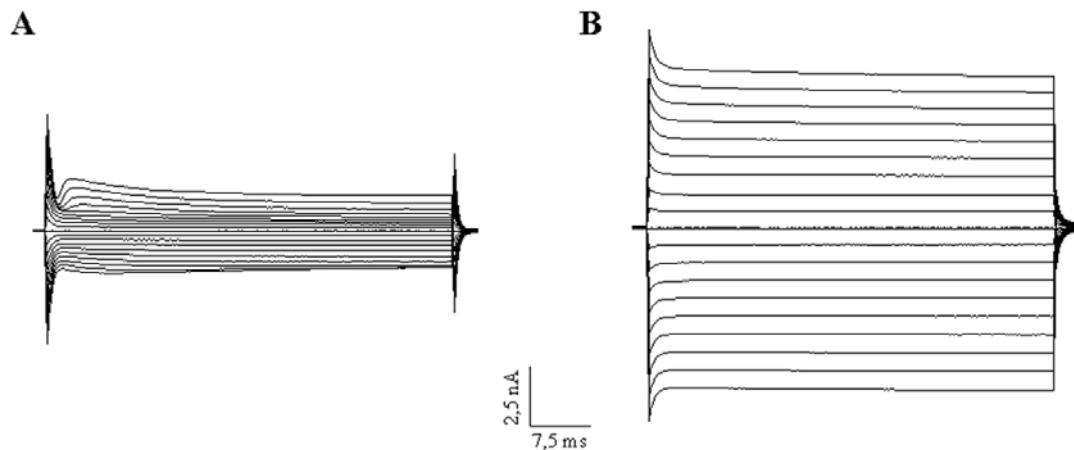


Abb. 5: Typische Strommuster von Astrozyten im Hippocampus von Patienten mit mesialer Temporallappenepilepsie. [A] Komplexe, GluR-ähnliche Zelle und [B] passive Zelle. Die passive Zelle ähnelt aufgrund ihrer großen zeit- und spannungsunabhängigen Strömen einer GluT-Zelle. (Haltepotential = -70 mV, 9 Spannungssprünge um jeweils 10 mV in depolarisierende Richtung und 9 Spannungssprünge um jeweils 10 mV in hyperpolarisierende Richtung)

Die Präparate wurden aufgrund des neuropathologischen Befundes des untersuchten Hippocampusgewebes in zwei Gruppen unterteilt: Gewebe von Patienten mit Ammonshornsklerose und Gewebe von Patienten ohne sichtbare morphologische Veränderungen des Hippocampus (Läsions-Gruppe). Die Membraneigenschaften der humanen putativen GluR und GluT Zellen der zwei Patientengruppen wurden verglichen, um herauszufinden, ob es aufgrund der sklerotischen Veränderungen im Hippocampus der Patienten mit Ammonshornsklerose zu einer Veränderung der Membraneigenschaften kommt. Es wurden das Ruhemembranpotential (V_r), die Kapazität der Zellmembran (C_m), der Eingangswiderstand (R_i) und die Stromdichten (CD) des A-Stroms (K_A) (Verkhatsky & Steinhäuser, 2000; Jan & Jan, 1997) der GluR-Zellen miteinander verglichen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Vergleich der Membraneigenschaften der GluR-Typ Astrozyten von Patienten mit Ammonshornsklerose und mit Läsions-assoziiertes Epilepsie.

	V_r [mV]	C_m [pF]	R_i [mΩ]	CD K_A [pA/pF] bei +70 mV	CD K_{ir} [pA/pF] bei -130 mV
AHS	-70 ± 11 n = 166	26 ± 18 n = 158	196 ± 150 n = 155	88 ± 74 n = 151	-28 ± 11* n = 158
Läsion	-73 ± 8 n = 69	29 ± 16 n = 65	181 ± 134 n = 68	68 ± 47 n = 49	-24 ± 20* n = 60

* = signifikant unterschiedlich, $P < 0.05$

Hierbei zeigte sich, dass die K_{ir}-Stromdichte in den putativen GluR-Zellen der Patienten mit Ammonshornsklerose signifikant größer war als in den GluR-Zellen der Patienten mit Läsions-assoziiertes Epilepsie. Die anderen untersuchten Parameter unterschieden sich nicht zwischen den zwei Patientengruppen.

Auch die Eigenschaften der passiven GluT-Typ Astrozyten der zwei Patientengruppen wurden verglichen. Auffällig war hierbei, dass GluT-Zellen bei den Patienten mit Ammonshornsklerose weitgehend fehlten. Von den 39 Patienten mit einer AHS konnten überhaupt nur bei zwei Patienten passive Astrozyten abgeleitet werden. Bei den Läsionspatienten wurden dagegen regelmäßig sowohl komplexe wie auch passive Astrozyten gefunden, die im IR-Bild eine ähnliche Morphologie aufwiesen, wie die Astrozyten im Hippocampus der Maus (Schröder et al., 2000; Hinterkeuser et al., 2000, Matthias et al., 2003). Die passiven Astrozyten hatten, wie die passiven GluT-Zellen im Hippocampus der Tg(hGFAP-EGFP) Maus, ein unregelmäßig geformtes Zellsoma, von dem mehrere kräftige, sich weit verzweigende Fortsätze abgingen. Die komplexen Astrozyten waren dagegen eher rundlich und hatten entweder keine sichtbaren oder nur wenige dünne Fortsätze und entsprachen damit morphologisch den GluR-Zellen in der transgenen-Maus.

Bei den GluT ähnlichen, passiven Astrozyten wurden nur das Ruhemembranpotential und der Eingangswiderstand verglichen, da durch die große passive Leitfähigkeit eine Bestimmung der anderen Parameter nicht möglich war (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Vergleich des Ruhemembranpotentials und des Eingangswiderstands der GluT-Zellen von AHS und Läsionspatienten.

	Vr [mV]	Ri [mΩ]
AHS	-70 ± 3 n = 7	22 ± 4 n = 6
Läsion	-71 ± 4 n = 32	20 ± 5 n = 31

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Membraneigenschaften zwischen den zwei Patientengruppen festgestellt werden.

4.1.3 Glutamatsensitivität humaner Astrozyten

Im Hippocampus von Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Verteilung von Glutamat-Transportern und Glutamat-Rezeptoren in der Zellmembran von Astrozyten streng an den Zelltyp gebunden ist (Matthias et al., 2003). Um herauszufinden, ob bei den humanen Astrozyten dieselben Verhältnisse vorliegen, wurden *Outside-out Patches* von der Zellmembran passiver und komplexer Astrozyten gezogen und über ein schnelles Applikationssystem 1 mM L-Glutamat für jeweils 35 ms appliziert, wobei die Membrantestspannung jeweils -130, -70 und +50 mV betrug. Die Glutamat-Antworten der komplexen Astrozyten kehrten bei positiven Spannungen in Auswärtsrichtung um (siehe Abb. 6A), ergaben lineare Strom-Spannungskurven mit einem Umkehrpotential von +9 mV ± 2.4 mV (n = 5) (siehe Abb. 7) und ließen sich mit 10 μM NBQX

vollständig blockieren (vorläufige Ergebnisse). Dies sind typische Eigenschaften glialer Glutamat-Rezeptoren (Seifert & Steinhäuser, 1995). Bei den passiven Zellen konnte im Gegensatz dazu bei positiven Spannungen kein Ausstrom ausgelöst werden (siehe Abb. 6B), was charakteristisch für Glutamat-Transporter ist.

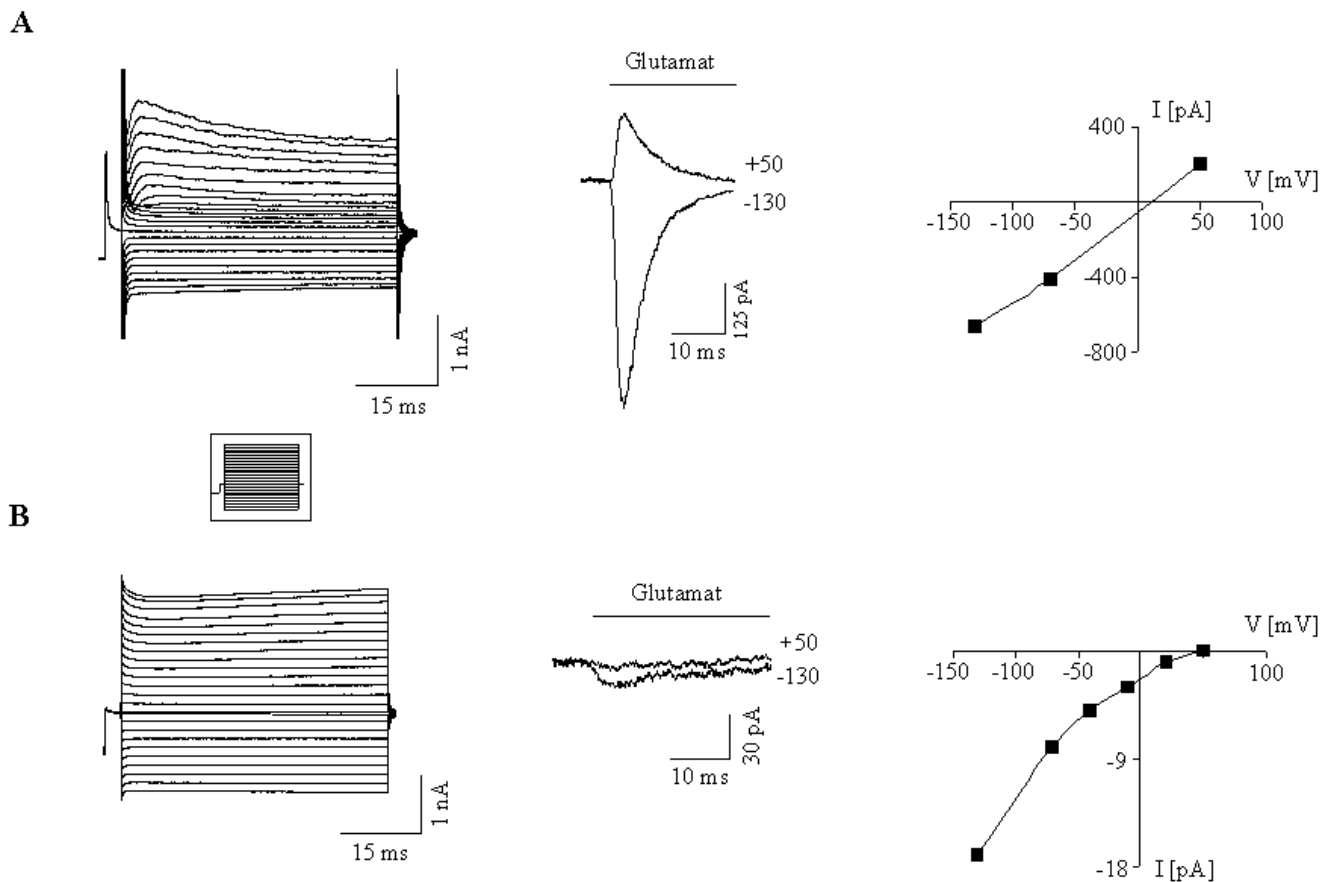


Abb. 6: [A] Ableitung von einer putativen GluR Zelle in der Whole-cell Konfiguration (links). Anschließend wurde ein Outside-out Patch von der Zellmembran gezogen und 1mM L-Glutamat für 35 ms appliziert, während die Zellmembran auf Potentiale zwischen -130 mV und $+50$ mV geklemmt wurde. Die so erhaltene lineare Strom-Spannungskurve (rechts) hat ein Umkehrpotential von 8.4 mV und ist typisch für Glutamat-Rezeptoren. [B] Bei einer putativen GluT Zelle mit passivem Strommuster (links) konnte dagegen mit 1 mM L-Glutamat kein Ausstrom bei positiven Spannungen aktiviert werden (Mitte). Daraus ergibt sich die typische asymptotische Strom-Spannungskurve eines Glutamat-Transporters (rechts).

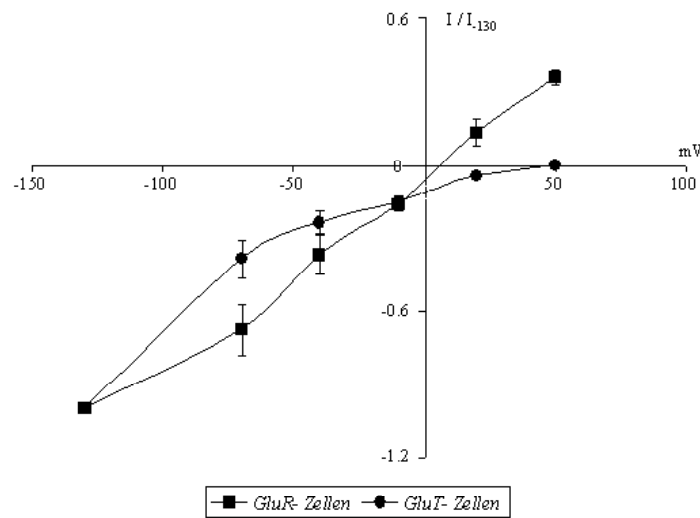


Abb. 7: Die Stromantworten von 5 komplexen Rezeptorzellen (Vierecke) und 5 passiven Transporterzellen (Kreise) auf 1 mM Glutamat wurden auf die Maximal-Amplitude bei -130 mV normiert und gemittelt. Während die Antworten der Rezeptorzellen bei positiven Spannungen in Auswärtsrichtung umkehrten, konnte in keiner der Transporterzellen bei positiven Spannungen ein Ausstrom ausgelöst werden.

Die exklusive Expression von ionotropen Glutamat-Rezeptoren auf komplexen Astrozyten und Glutamat-Transportern auf passiven Astrozyten im humanen Hippocampus von Patienten mit mesialer Temporallappenepilepsie entspricht also den Verhältnissen, wie sie im Hippocampus der Tg(hGFAP/EGFP)-Maus gefunden wurden (Matthias et al., 2003). Somit können auch die komplexen Astrozyten des humanen Hippocampus als GluR- und die passiven Astrozyten als GluT-Zellen bezeichnet werden.

4.1.4 Molekulare Analyse der AMPA-Rezeptor Untereinheiten

Um herauszufinden, welche AMPA-Rezeptor Untereinheiten für die Rezeptorströme in den humanen GluR-Zellen verantwortlich sind, wurden Transkript-Analysen durchgeführt. Nach der elektrophysiologischen Ableitung wurde das Zytoplasma der abgeleiteten Zelle gesammelt und einer zwei Runden Einzelzell RT-PCR unterzogen. Hierbei wurden die Untereinheiten GluR1-4 in unterschiedlicher Häufigkeit gefunden, nämlich 59 % (GluR1), 97 % (GluR2), 41 % (GluR3)

und 72 % (GluR4) (siehe Abb. 8A). Die GluR2 Untereinheit, die die Ca^{2+} -Permeabilität der AMPA-Rezeptoren kontrolliert, wurde in fast allen untersuchten Zellen (28 von 29) gefunden und war in 69 % (20 Zellen) mit GluR4 ko-exprimiert. Die häufigste Untereinheitenkombination war GluR1, 2 und 4 (siehe Abb. 8B), die sowohl bei den AHS Patienten ($n = 16$; 13 Patienten) als auch bei den Läsions Patienten ($n = 13$; 10 Patienten) dominierte (siehe Abb. 8C).

Um Informationen über den Spleißstatus der Untereinheiten zu erhalten und um Untereinheiten zu identifizieren, die krankheitsbedingt verändert sein könnten, wurde die zweite PCR mit einer reduzierten Zyklenzahl wiederholt. Die auf diese Weise erhaltenen PCR Produkte wurden einer anschließenden Restriktionsanalyse unterzogen. Alle Untereinheiten lagen hauptsächlich in der Flip Form vor. Auffallend war jedoch, dass bei den AHS Patienten GluR1 Flip signifikant erhöht war, verglichen mit den Läsions-Patienten. Bei den übrigen Untereinheiten (GluR2-4) wurden keine Unterschiede zwischen den zwei Patientengruppen gefunden (siehe Abb. 8D; Tabelle 7).

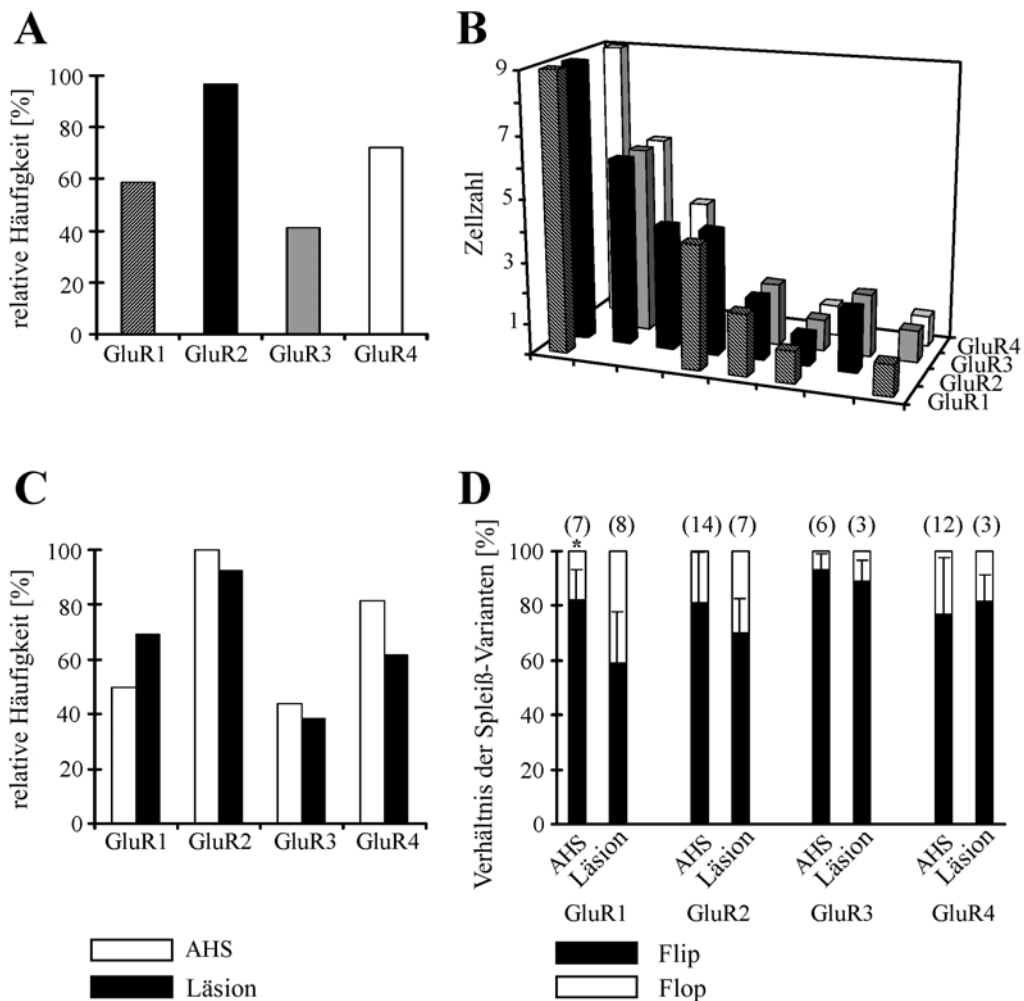


Abb. 8: Expression der AMPA-Rezeptor Untereinheiten und Spleißstatus in humanen GluR-Zellen. [A] Nach der funktionellen Charakterisierung wurde das Zytoplasma der Zellen gesammelt und mit Hilfe der Einzelzell RT-PCR untersucht. Das Diagramm zeigt die Verteilung der GluR-Untereinheiten in humanen Astrozyten ($n = 29$). In [B] sind die Kombinationen der einzelnen Untereinheiten miteinander dargestellt, wie sie in den einzelnen Zellen gefunden wurden. [C] Die Verteilung der Untereinheiten war in beiden Patientengruppen gleich. [D] Die Restriktionsanalyse zeigte eine vorherrschende Expression der Flip Version, wobei GluR1 Flip bei den AHS Patienten signifikant erhöht war (Seifert et al., 2004).

Tabelle 7: Verteilung von AMPA-Rezeptor Untereinheiten in humanen GluR-Zellen.

		GluR1	GluR2	GluR3	GluR4
AHS	Relative Häufigkeit (%)	50 (8/16)	100 (16/16)	44 (7/16)	81 (13/16)
	Flip, relativer Anteil (%)	82 ± 11 (7)*	81 ± 18 (14)	93 ± 6 (6)	77 ± 21 (12)
	Flop, relativer Anteil (%)	18 ± 11 (7)*	19 ± 18 (14)	7 ± 6 (6)	23 ± 21 (12)
Läsion	Relative Häufigkeit (%)	69 (9/13)	92 (12/13)	38 (5/13)	62 (8/13)
	Flip, relativer Anteil (%)	59 ± 19 (8)*	70 ± 13 (7)	89 ± 8 (3)	82 ± 10 (3)
	Flop, relativer Anteil (%)	41 ± 19 (8)*	30 ± 13 (7)	11 ± 8 (3)	18 ± 10 (3)

Daten als Mittelwert ± Standardabweichung, Zellzahl in Klammern

* signifikant unterschiedlich

Um das Flip/Flop Spleiß-Verhältnis einzelner Zellen der beiden Patientengruppen zu quantifizieren, wurde die Methode der Einzelzell *real-time* PCR genutzt. Das optimierte PCR Protokoll (siehe Materialien und Methoden) wurde an cDNA einzelner, funktionell charakterisierter hippocampaler Astrozyten angewendet. Die fortlaufende Zunahme der Fluoreszenzintensität (normiert auf einen passiven Fluoreszenz-Referenzwert, ΔR_n) wurde gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen. In Abbildung 9 sind die Amplifikationskurven für GluR

Flip und Flop von zwei einzelnen Astrozyten, einer von einem AHS- und einer von einem Läsions- Patienten, verglichen. Der Detektionsschwellenwert lag bei $\Delta R_n = 0.17$ (gestrichelte Linie). Für GluR Flip waren die C_T Werte der AHS- und der Läsions-Zelle nahezu identisch. Für den Nachweis der GluR Flop cDNA waren bei der AHS-Zelle jedoch mehr Zyklen notwendig als bei der Läsions-Zelle, um den Detektionsschwellenwert zu erreichen (siehe Abb. 9). Beim Vergleich der ΔC_T -Werte, die sich aus der Formel $\Delta C_T = C_{T\text{GluRFlip}} - C_{T\text{GluRFlop}}$ errechnen, zeigte sich, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den AHS-Zellen ($\Delta C_T = -3.3 \pm 2.2$; $n = 11$; 11 Patienten) und den Läsions-Zellen ($\Delta C_T = -0.1 \pm 2.6$; $n = 6$; vier Patienten) besteht. Durch den Vergleich der ΔC_T -Werte mit der Kalibrationskurve (siehe Abb. 4B) konnte die vermehrte Expression von GluR Flip bei den AHS-Zellen gegenüber den Läsions-Zellen quantifiziert werden. 80 % der Glutamat-Rezeptoren lagen bei den AHS Patienten in der Flip-Form vor, wohingegen das Verhältnis zwischen Flip- und Flop-Form bei den Rezeptoren der Läsions-Patienten mit 53 % in der Flip-Form wesentlich ausgeglichener war.

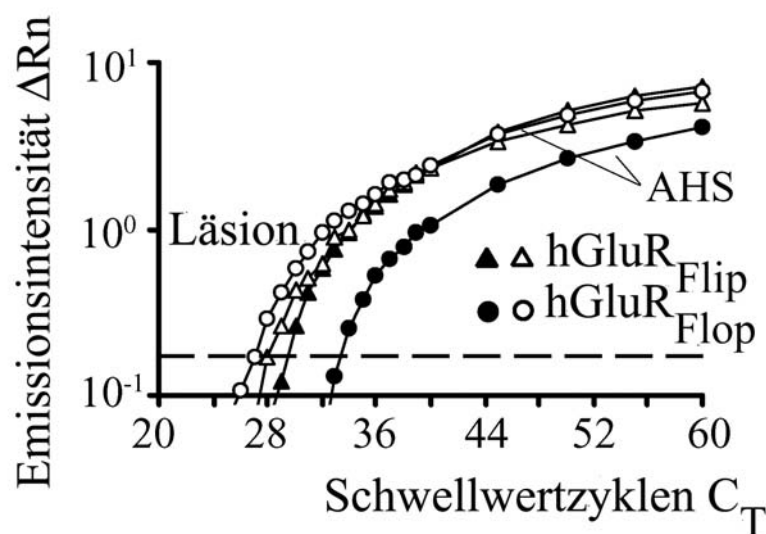


Abb. 9: Bestimmung der Flip/Flop Ratios humaner Astrozyten mit semi-quantitativer real-time PCR. Vergleich einer GluR-Zelle eines AHS Patienten (gefüllte Symbole) mit einer GluR-Zelle eines Läsions Patienten (offene Symbole). Man beachte die höhere Zyklenzahl, die notwendig ist, um in der AHS Zelle Flop Transkripte (Kreise) zu amplifizieren. Der Grenzwert der Detektion lag bei $\Delta R_n = 0.17$ (gestrichelte Linie) (Seifert et al., 2004).

4.1.5 Kopplung

Um die Kopplungseigenschaften der humanen Astrozyten zu untersuchen, wurden einzelne GluR- und GluT-Zellen während der Ableitung mit 0.5 % Biozytin gefüllt. Biozytin ist aufgrund seiner geringen Größe (373 Dalton) in der Lage, durch die Kopplungskanäle (*gap junctions*) zu diffundieren und sich so im miteinander gekoppelten Zellsynzytium zu verteilen. Die Zellen wurden während der elektrophysiologischen Ableitung gefüllt und die *Patch*-Pipette danach durch vorsichtiges Zurückziehen von der Zelle abgelöst. Anschließend wurden die Schnitte sofort in 4 % PFA fixiert. Auf diese Weise konnten 18 GluR-Zellen und 13 GluT-Zellen mit Biozytin gefüllt werden. Die gefüllten Zellen wurden mit dem Elite ABC Kit und der DAB Methode (Theis et al., 2003) entwickelt und quantitativ ausgewertet.

Ähnlich wie im Hippocampus von Mäusen (Wallraff et al., 2004), sind auch im humanen Hippocampus die GluT-Zellen miteinander gekoppelt (siehe Abb. 10A), wohingegen die GluR-Zellen nicht gekoppelt sind (siehe Abb. 10B). Die Dauer der Ableitung wurde sowohl bei den GluR-als auch bei den GluT-Zellen von 3 Minuten bis zu 20 Minuten variiert. Auch nach einer kurzen Ableitezeit von nur 3 Minuten ist bei den GluT-Zellen eine deutliche Kopplung zu erkennen (13 gekoppelte Zellen, $n = 1$), die Anzahl der gefüllten Zellen nimmt jedoch mit der Ableitezeit deutlich zu. So sind nach 20 minütiger Ableitung durchschnittlich 129 ± 97 gekoppelte Zellen zu erkennen ($n = 8$, die große Standardabweichung erklärt sich daraus, dass in den 200 μm dicken Schnitten aufgrund der Dichte der Fortsätze im Zentrum der Kopplungswolke keine Zählung der einzelnen Zellen möglich war und nur eindeutig zu identifizierende Zellen gezählt wurden). Im Gegensatz dazu war auch nach 20 minütiger Füllung mit Biozytin keine der abgeleiteten GluR-Zellen ($n = 11$) gekoppelt.

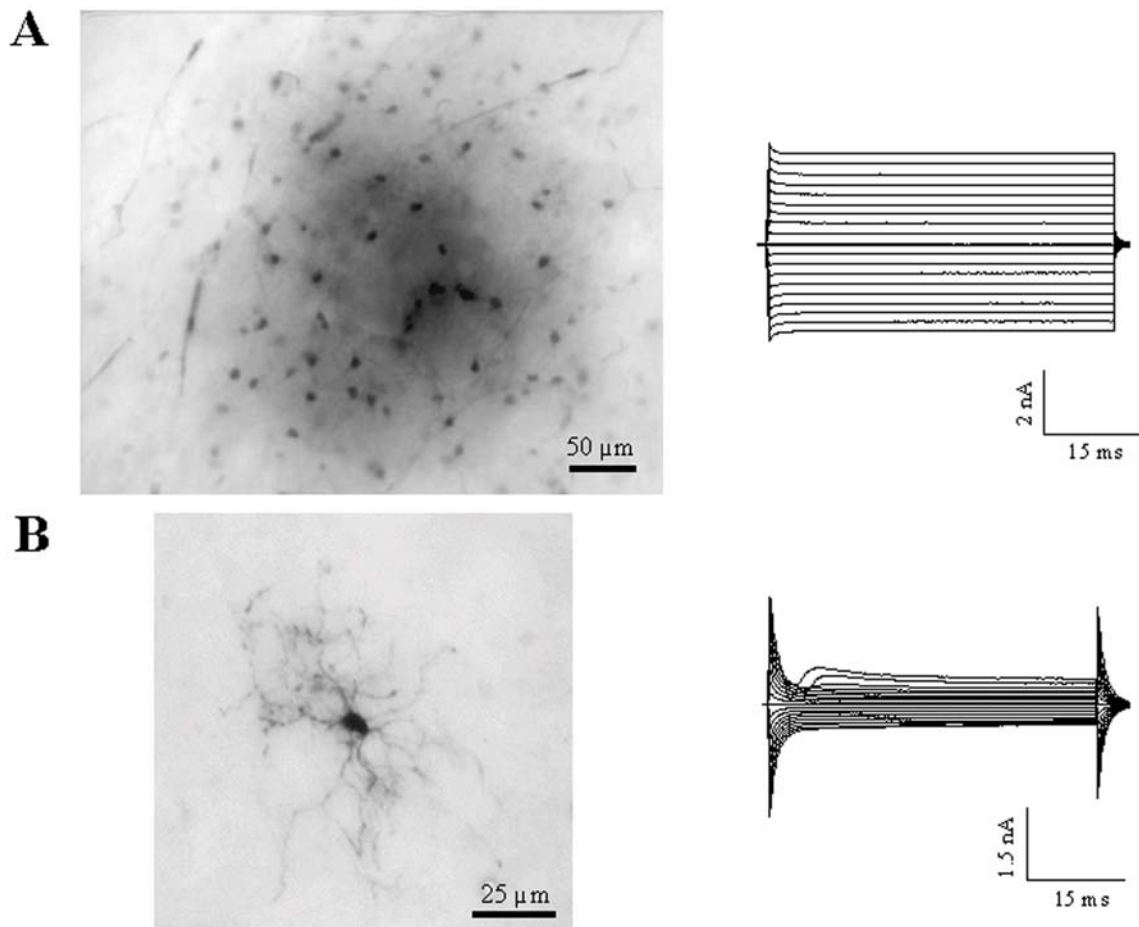


Abb. 10: Kopplungsverhalten von GluR und GluT Astrozyten im humanen Hippocampus. [A]: Eine GluT Zelle mit passivem Strommuster (rechts, 18 Spannungssprünge um jeweils $10\ \text{mV}$, 9 de- und 9 hyperpolarisierend, Haltepotential $-70\ \text{mV}$) wurde während der Ableitung (20 min.) mit Biozytin gefüllt, wodurch ihre Kopplung mit ca. 80 anderen Zellen sichtbar wird (links). [B]: Typisches Strommuster einer komplexen GluR Zelle (rechts, Protokoll siehe A), die jedoch nach 20 minütiger Biozytin-Füllung mit keiner einzigen anderen Zelle gekoppelt ist (links).

4.1.6 Verlust passiver GluT-Zellen bei AHS

Auffälligster Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen ist das nahezu vollständige Verschwinden der GluT-Typ Astrozyten bei Patienten mit Ammonshornsklerose.

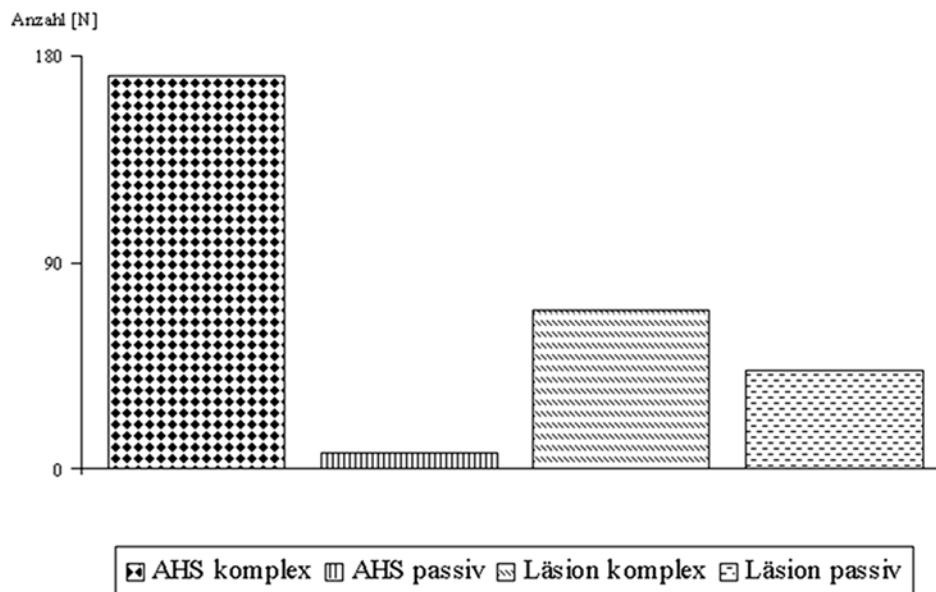


Abb. 11: Vergleich der Anzahl passiver GluT- und komplexer GluR-Astrozyten der Patienten mit Ammonshornsklerose bzw. extrahippocampaler Läsion. Während im sklerotischen Hippocampus der AHS Patienten von insgesamt 178 Astrozyten nur 7 GluT-Zellen gefunden werden konnten, existieren in den Präparaten von Läsionspatienten sowohl GluR- als auch GluT-Zellen.

Bei den Läsions-Patienten findet man regelmäßig sowohl GluR- als auch GluT-Astrozyten (siehe Abb. 11). Im Gegensatz dazu findet man im Hippocampus von Patienten mit AHS, bis auf die oben genannten Ausnahmen, ausschließlich komplexe GluR-Zellen (siehe Abb. 11). Auffällig hierbei ist, dass Zellen, die morphologisch wie GluT-Zellen aussehen, d.h. große unregelmäßige Somata und viele verzweigte Fortsätze aufweisen, fast immer ein komplexes Strommuster haben, Glutamat-Rezeptoren exprimieren und nicht gekoppelt sind.

4.2 Charakterisierung von Astrozyten in der SGZ des Gyrus dentatus von Tg(hGFAP/EGFP)-Mäusen

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um (i) Krampf-induzierte Veränderungen im Proliferations-Status von Astrozyten zu analysieren und (ii) funktionelle Eigenschaften von Astrozyten in einer benachbarten Region, der SGZ des Gyrus dentatus, zu untersuchen. Die SGZ ist neben der SVZ die einzige bekannte Hirnregion, in der postnatal in nennenswertem Ausmaß Neurogenese stattfindet (Altman & Das, 1965; Seress, 1992; Gould et al., 1999; Eriksson et al., 1998). Durch die Verwendung eines Epilepsie Tier-Modells, bei dem Tg(hGFAP/EGFP) Mäusen Kainat intraperitoneal injiziert wurde, konnten die Eigenschaften der Astrozyten unter normalen mit denen unter epileptischen Bedingungen verglichen werden. Alle Kainat injizierten Tiere erhielten 72 h nach der Kainat-Injektion eine einzelne BrdU-Injektion, um sich teilende Zellen zu markieren. Zwei Stunden nach der BrdU-Injektion wurden die Zellen elektrophysiologisch und immunzytochemisch untersucht.

Die Zellen wurden anhand ihrer EGFP-Fluoreszenz als Astrozyten identifiziert, wobei die Fluoreszenzintensitäten sehr variabel waren. Die „radialen Gliazellen“, die durch einen langen, in die Körnerzellschicht reichenden Fortsatz charakterisiert sind, waren immer leuchtend grün (siehe Abb. 12A1) und hatten, bis auf eine Ausnahme, ein passives Strommuster (siehe Abb. 12A2 und Abb. 13A). Die Morphologie der übrigen EGFP-positiven Zellen war variabel, wobei viele blassgrüne Zellen mit wenigen dünnen Fortsätzen (siehe Abb. 12B1) und komplexem Strommuster (siehe Abb. 12B2) gefunden wurden.

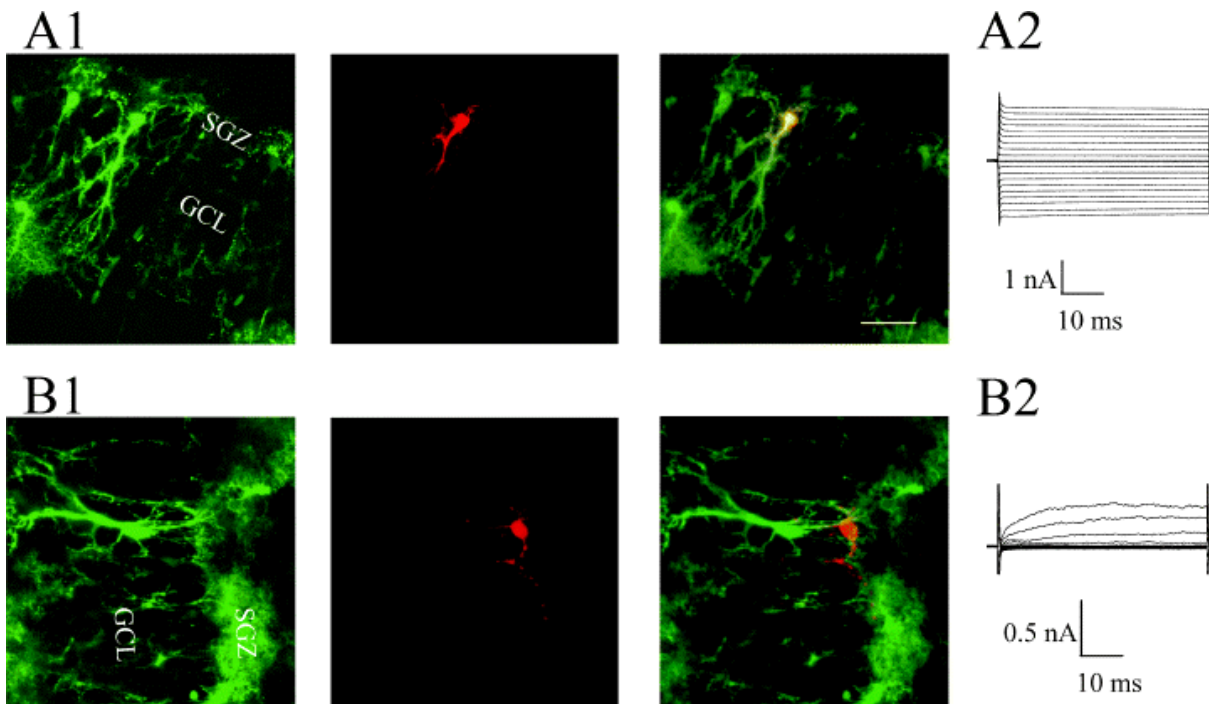


Abb. 12: Morphologische und elektrophysiologische Eigenschaften EGFP-positiver Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus adulter Kontrollmäuse. [A] Es wurde eine stark EGFP-fluoreszente Zelle ausgewählt, deren radialer Fortsatz in die Körnerzellschicht (GCL) hereinreicht (A1 links). Die Zelle wurde während der elektrophysiologischen Ableitung mit Texas-Red Dextran gefüllt (A1 Mitte). Übereinanderlegung der zwei Fluoreszenzen (A1 rechts). Das Strommuster der gefüllten Zelle wird von passiven Leitfähigkeiten dominiert (A2, De- und Hyperpolarisation zwischen +20 und -160 mV, 10 mV Sprünge für 50 ms, Haltepotential -70). [B] Durch die Füllung einer schwach EGFP-positiven Zelle (B1 links) mit Texas-Red Dextran, werden ihre feinen, unregelmäßigen Fortsätze sichtbar (B1 Mitte). Übereinanderlegung der zwei Fluoreszenzen (B1 rechts). Bei der elektrophysiologischen Ableitung konnten lediglich verzögert gleichrichtende Ströme in Auswärtsrichtung aktiviert werden (B2, Protokoll siehe A2). Skalierung = 20 μm (Hüttmann et al., 2003).

Um neben dem Ruhemembranpotential ein weiteres Charakteristikum der Zellen zu erhalten, wurde der Rektifizierungsindex (RI) bestimmt und verglichen (siehe Tabelle 7). In beiden untersuchten Gruppen (Kontroll- und Kainat-injizierte Mäuse) lag das Ruhemembranpotential der „radialen Gliazellen“ bei -72 mV ($n = 22$) und damit in der Nähe des theoretischen K^+ -Gleichgewichtspotenzials (~ -82 mV). Auch der RI-Wert der „radialen Gliazellen“ aus beiden

Gruppen war nahezu identisch (siehe Tabelle 8). Applikation von 1 mM Glutamat an *Outside-out Patches* dieser Zellen aktivierte Transporter-Ströme (vorläufige Daten).

Die übrigen EGFP-positiven Zellen ($n = 55$) hatten unterschiedliche Stromkomponenten, die zugehörigen Strom-Spannungskurven reichten von starker Auswärtsgleichrichtung bis zur Linearität, mit RI-Werten von 38 bis 0.6. 39 dieser Zellen entsprachen morphologisch (schwach fluoreszente Zellen mit rundem Soma und kurzen, dünnen Fortsätzen) den GluR-Zellen im Stratum Radiatum der CA1 Region des Hippocampus. Von diesen 39 Zellen hatten jedoch nur 16 Zellen ein für die hippocampalen GluR-Zellen typisches Strommuster, das durch die Expression von verzögert gleichrichtenden- und inaktivierenden spannungsgesteuerten K^+ -Kanälen, sowie einwärtsgleichrichtenden K^+ -Kanälen zustande kommt (siehe Abb. 13B). Das Umkehrpotential der Auswärtsströme wurde mit *Tail-current* Analyse bestimmt und lag bei -67.7 ± 3.8 mV ($n = 3$, Test Puls +20 mV). Für den Einstrom betrug das Umkehrpotential -75 ± 3.2 mV ($n = 8$, Test Puls -130 mV), d.h. sowohl Ein- als auch Ausströme wurden hauptsächlich von Kaliumionen getragen.

Der Grossteil der Zellen (23 von 39) zeigte keine Einwärtsströme bei negativen Spannungen bis zu -160 mV und bei Depolarisation der Zellmembran keine oder zu vernachlässigende schnell inaktivierende Auswärtsströme. Die Strom-Spannungskurven dieser Zellen verlief im positiven Spannungsbereich sigmoidal (siehe Abb. 13C), und das Ruhemembranpotential war depolarisiert verglichen mit den Zellen mit K_{ir} -Strömen (siehe Tabelle 8). Diese Zellen wurden sowohl in den Kontrolltieren, als auch in den Tieren mit Kainat-Läsion gefunden. Erste Ergebnisse an *Outside-out Patches* weisen darauf hin, dass die Zellen nur NBQX sensitive AMPA/Kainat-Rezeptoren, aber keine funktionellen Glutamat-Transporter exprimieren.

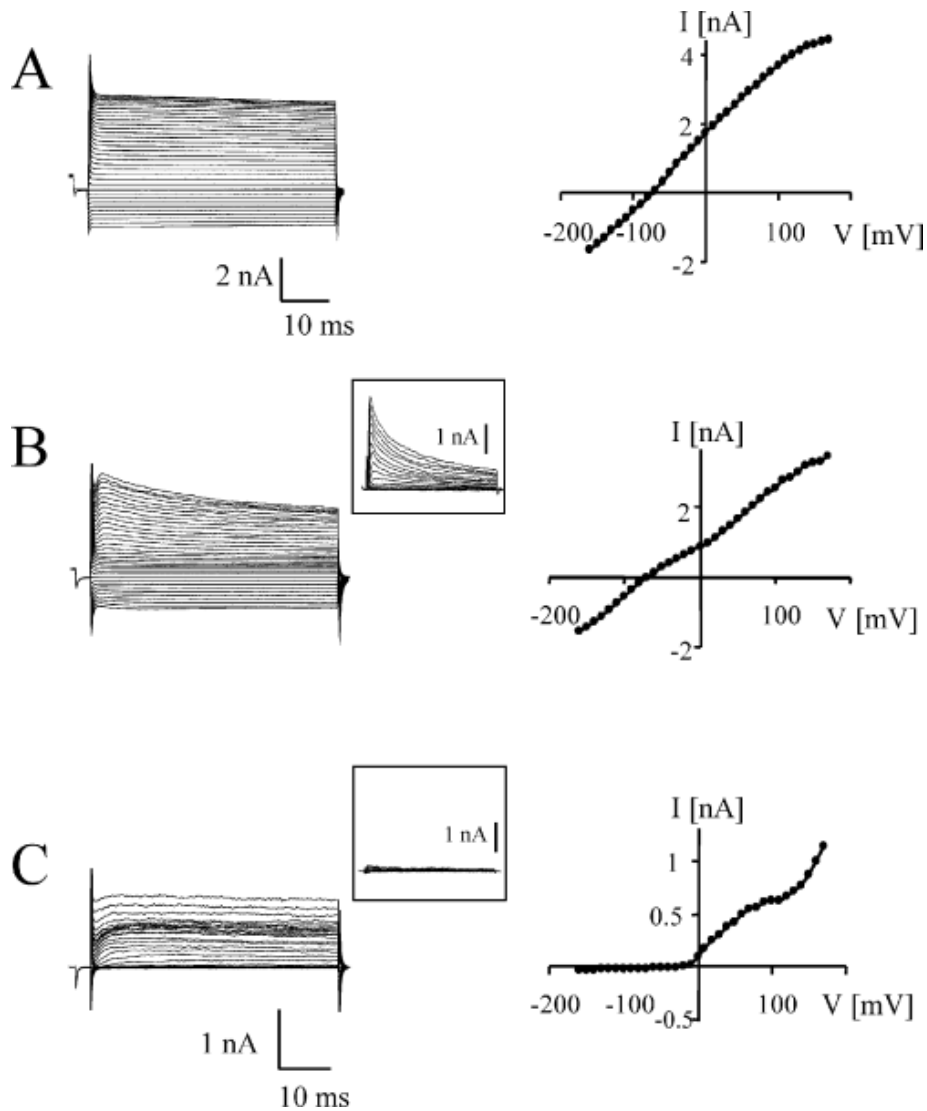


Abb. 13: Die drei typischen Strommuster EGFP-positiver Astrozyten in der SGZ des Gyrus dentatus adulter Kontrollmäuse. [A] Strommuster eines stark fluoreszenten Astrozyten mit radialem Fortsatz, der in die Körnerzellschicht reicht ($V_r = -74$ mV). Nach einem depolarisierenden Vorpuls auf -40 mV wurde die Zellmembran kurz (3 ms) zurück auf das Haltepotential von -70 mV geklemmt und anschließend in 10 mV Sprüngen (50 ms) bis auf $+170$ mV de- und bis auf -160 mV hyperpolarisiert. Die so erhaltene Strom-Spannungskurve ist fast vollständig linear. [B] Eine schwach fluoreszente Zelle wurde mit dem selben Protokoll wie in A untersucht. Die Zelle besitzt neben inaktivierenden und verzögert gleichrichtenden spannungsgesteuerten K^+ -Strömen auch einwärtsgleichrichtende K^+ -Ströme. Dies entspricht dem typischen Strommuster von GluR-Zellen im Hippocampus. Um die inaktivierenden K^+ -Ströme zu isolieren (inset), wurden die Ströme zweier Spannungsprotokolle (um die spannungsaktivierten

Auswärtsströme zu aktivieren: Vorpuls auf -110 mV, um die spannungsaktivierten Auswärtsströme zu inaktivieren: Vorpuls auf -40 mV) miteinander verrechnet. ($V_r = -71$ mV, Skalierung siehe A). [C] Eine weitere schwach EGFP-fluoreszente Zelle wurde mit den gleichen Spannungsprotokollen analysiert wie in B. Die so erhaltene Strom-Spannungskurve zeigt einen sigmoiden Verlauf ($V_r = -20$ mV). Im Gegensatz zu der Zelle in B fehlen der Zelle sowohl inaktivierende Auswärtsströme (inset), als auch einwärtsgerichtete K^+ -Ströme (Hüttmann et al., 2003).

Tabelle 8: Elektrophysiologische Eigenschaften der morphologisch unterschiedlichen Gruppen von EGFP-positiven Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus.

	Kontrollmäuse			Kainat-injizierte Mäuse		
	Stark fluoreszent mit radialem Fortsatz	Schwach fluoreszent, wenige dünne Fortsätze Keine oder zu vernachlässigende K_{ir} -Ströme	Prominente K_{ir} -Ströme	Stark fluoreszent mit radialem Fortsatz	Schwach fluoreszent, wenige dünne Fortsätze Keine oder zu vernachlässigende K_{ir} -Ströme	Prominente K_{ir} -Ströme
V_r / mV	$-71,9 \pm 2,1$	$-23,5 \pm 6,7^*$	$-75,3 \pm 3,6$	$-71,7 \pm 1,8$	$-32,7 \pm 10^*$	$-65,8 \pm 14,1$
RI	$0,86 \pm 0,11$	$16,4 \pm 9^*$	$0,88 \pm 0,15$	$0,89 \pm 0,09$	$11,2 \pm 7,8^*$	$1,17 \pm 0,47$
n	15	16	12	6	7	4

Die BrdU-positive Zelle mit radialem Fortsatz wurde nicht mit einbezogen. * $P < 0.05$ gegenüber den stark fluoreszenten Zellen mit radialem Fortsatz und gegenüber den schwach fluoreszenten Zellen mit prominenten K_{ir} -Strömen.

Um das Strommuster der abgeleiteten Zellen mit dem Proliferationsstatus korrelieren zu können, wurden die Zellen der Kainat-injizierten Tiere während der Ableitung mit Texas-Red (Dextran

konjugiert, 0.1 %; n = 34) gefüllt und im Anschluss eine BrdU-Färbung durchgeführt. Von sieben gefüllten Gliazellen mit radialem Fortsatz wurden vier Zellen bei der nachfolgenden konfokalen Analyse wiedergefunden, von denen aber nur eine Zelle BrdU-positiv war (siehe Abb. 14A). Interessanterweise war diese BrdU-positive Zelle die einzige der „radialen“ Gliazellen mit einem nichtlinearen Strom-Profil (siehe Abb. 14B).

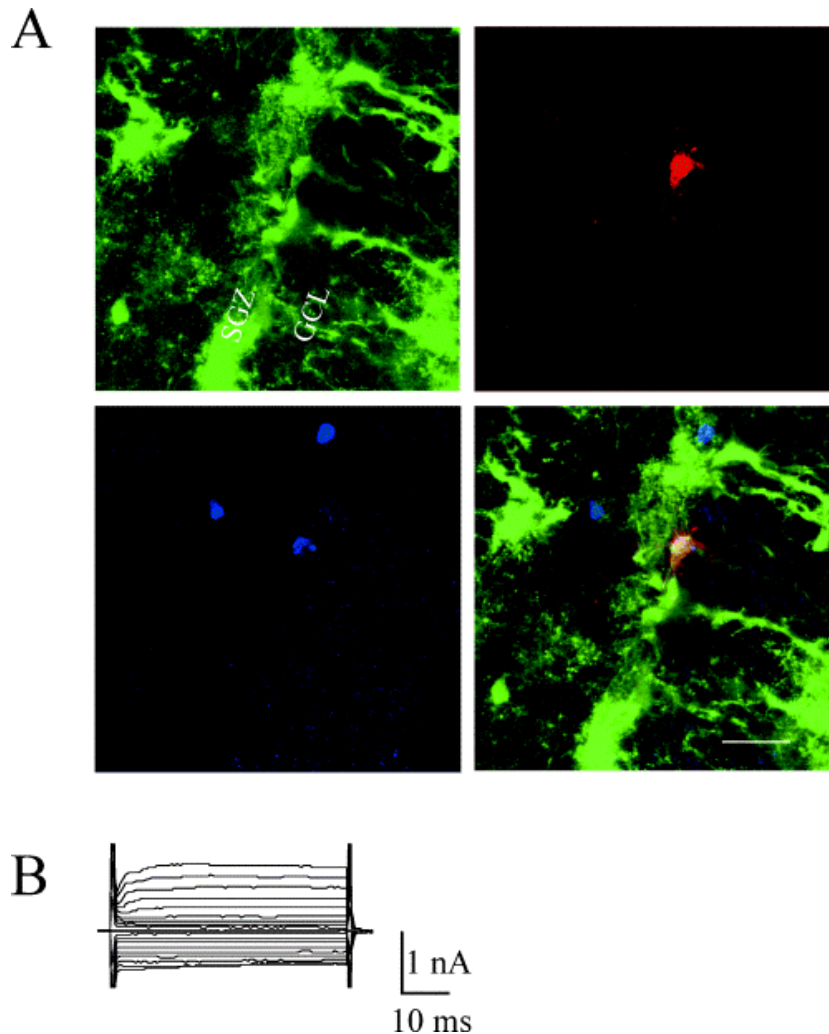


Abb. 14: Strommuster einer EGFP-positiven Zelle, die BrdU inkorporiert hat. [A] In der SGZ einer Kainat-injizierten Tg(hEGFP/GFAP-Maus), die vor der Präparation BrdU intraperitoneal gespritzt bekommen hat, wurde eine EGFP-positive Zelle ausgewählt (oben links). Die Zelle wurde während der Ableitung mit Texas Red Dextran gefüllt (oben rechts) und der Schnitt anschließend mit einem Antikörper gegen BrdU angefärbt (unten links). Nach der

Übereinanderlegung der drei Fluoreszenzen (unten rechts) ist deutlich zu erkennen, dass die Texas Red gefüllte, EGFP-positive Zelle BrdU positiv ist. [B] Durch de- und hyperpolarisierende Spannungssprünge (Protokoll siehe Abb. 12) wurden verzögert auswärtsgerichtete und einwärtsgerichtete Ströme aktiviert (Hüttmann et al., 2003).

5. Diskussion

5.1 GluR- und GluT-Zellen im humanen Hippocampus

Mit den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Astrozyten im humanen Hippocampus von Patienten mit mesialer Temporallappenepilepsie ähnliche Eigenschaften aufweisen, wie die Astrozyten im Hippocampus der Maus. Man findet ebenfalls zwei Typen von Astrozyten, von denen die GluR-Zellen ein komplexes Strommuster haben, ionotrope Glutamat-Rezeptoren aber keine Glutamat-Transporter exprimieren und nicht gekoppelt sind. Im Gegensatz dazu haben die GluT-Zellen ein passives Strommuster, Glutamat-Transporter aber keine Glutamat-Rezeptoren und sind miteinander gekoppelt.

Diese Zelleigenschaften sind bei den GluR-Astrozyten beider Patientengruppen sehr ähnlich. Unterschiedlich ist dagegen die K_{ir} -Stromdichte, die in den GluR-Zellen der AHS Patienten erhöht ist.

5.2 Veränderungen der K_{ir} -Stromdichte bei AHS

Eines der typischen Charakteristika einer Ammonshornsklerose ist neben dem Zelltod bestimmter Neuronenpopulationen eine reaktive Gliose (Blümcke et al., 2002), d.h. eine Vermehrung der Gliazellen, insbesondere der Astrozyten. Das Strommuster proliferierender, reaktiver Astrozyten ist durch eine signifikante Reduktion der K_{ir} -Ströme charakterisiert (Bordey et al., 2001; MacFarlane & Sontheimer, 1997). Im Gegensatz dazu ist bei reaktiven, nicht proliferierenden Astrozyten eine Erhöhung der K_{ir} -Stromdichte beschrieben worden (Bordey et al., 2000; MacFarlane & Sontheimer, 1997), wie sie auch während der postnatalen Entwicklung beobachtet wird (Kressin et al., 1995).

Die Patienten, deren Hippocampusgewebe untersucht wurde, litten durchschnittlich ca. 24 Jahre an epileptischen Anfällen, bevor die Operation durchgeführt und der Hippocampus entfernt wurde. Aufgrund des langen Bestehens der Krankheit vor der Operation und der starken Ausprägung der Sklerose bei allen Patienten kann man davon ausgehen, dass die Gewebeveränderungen einen chronischen Zustand erreicht hatten und keinen akuten Prozeß

anzeigten. Dies erklärt die Zunahme der K_{ir} -Stromdichte in den GluR-Zellen der AHS Patienten, verglichen mit der Kontrollgruppe, da wahrscheinlich hauptsächlich reaktive aber nicht proliferierende Astrozyten abgeleitet wurden. In der Literatur beschrieben ist bisher eine Abnahme der K_{ir} -Stromdichte bei Patienten mit AHS verglichen mit der Läsionsgruppe (Hinterkeuser et al., 2000). In dieser Arbeit wurde jedoch eine Leckstrom-Kompensation durchgeführt, was nach neueren Erkenntnissen nicht sinnvoll ist, da dadurch die K_{ir} -Stromkomponente vermutlich unterschätzt wird.

5.3 Mögliche Ursachen für das Verschwinden der GluT-Zellen bei AHS

Warum es in den sklerotischen Hippocampi der AHS Patienten zu einem selektiven Verlust an GluT-Zellen kommt, ist unklar. Eine mögliche Ursache ist, dass die GluT-Zellen aufgrund ihrer spezifischen Zelleigenschaften vulnerabler sind als die GluR-Zellen und im Verlauf des Entstehens der Ammonshornsklerose sterben.

Andererseits ist es auch möglich, dass die GluT-Zellen nicht sterben, sondern ihre spezifischen Zelleigenschaften so verändern, dass sie GluR-Zellen ähneln. Entsprechend dieser Hypothese verlieren die Zellen ihre Zellkopplung und die Glutamat-Transporter und exprimieren statt dessen Glutamat-Rezeptoren. Dies könnte im Rahmen einer Dedifferenzierung und Gliazellproliferation während der Ausbildung der Ammonshornsklerose passieren.

Klären wird man die Frage mit Patienten-Material jedoch nicht können, da das humane Hippocampusgewebe immer nur im weit fortgeschrittenen Zustand der Sklerose nach langjährigem Bestehen der Erkrankung für unsere Untersuchungen zur Verfügung steht. Eine Möglichkeit, um den Verlauf der Erkrankung nachzuvollziehen, wäre ein Tier-Epilepsiemodell, das idealerweise die gleichen Veränderungen im Hippocampus entwickelt, wie man sie im humanen Hippocampus der AHS-Patienten vorfindet. Dies würde die Möglichkeit eröffnen, die unterschiedlichen Stadien der Veränderungen zu untersuchen, und so die offenen Fragen zu beantworten. Entsprechende Untersuchungen am Pilocarpin-Epilepsie-Modell werden derzeit durchgeführt.

5.4 Folgen des Verschwindens der GluT-Zellen bei AHS

Zu den Aufgaben von Astrozyten zählt es, bei neuronaler Aktivität freiwerdendes K^+ aufzunehmen und so die Kaliumionen Konzentration im Extrazellulärraum konstant zu halten (*spatial buffering*-Konzept, Orkand et al. 1966; Newman et al., 1984). Außerdem wird auch ein großer Teil der bei neuronaler Aktivität freigesetzten Neurotransmitter, z.B. Glutamat, von Astrozyten aufgenommen (Bergles et al., 1999; Huang & Bergles, 2004) und so eine niedrige, nicht-toxische Konzentration der Botenstoffe im Extrazellulärraum gewährleistet. Glutamat, der häufigste erregende Transmitter im Gehirn, wird in Astrozyten in Glutamin umgewandelt und wieder in den Extrazellulärraum abgegeben. Das freigewordene Glutamin wird von Neuronen aus dem Extrazellulärraum aufgenommen und entweder wieder in Glutamat umgewandelt oder dient dem neuronalen Energiestoffwechsel (Danbolt, 2001).

Die Astrozyten vom GluT-Typ umschließen mit ihren Fortsätzen die neuronalen Synapsen und verhindern durch ihre Glutamat-Transporter, dass der freigewordene Transmitter zu hohe Konzentrationen erreicht, weiter weg diffundieren und extrasynaptisch gelegene Glutamat-Rezeptoren oder benachbarte Synapsen erregen kann (Bergles et al., 1999; Huang & Bergles, 2004). Da die GluR-Zellen aufgrund des Fehlens von Glutamat-Transportern kein Glutamat aufnehmen können, sind auf astrozytärer Seite für diese homöostatische Funktion allein die GluT-Zellen zuständig. Auch am „spatial buffering“ sind die GluR-Zellen nur bedingt beteiligt, da sie aufgrund der fehlenden Kopplung die aufgenommenen Kaliumionen nicht über ein Zellsynzytium an Stellen mit niedriger extrazellulärer Kaliumkonzentration räumlich umverteilen können. Im Gegensatz dazu sind die GluT-Zellen in der Lage, weitaus größere Mengen von Kaliumionen aufzunehmen, da sie über Kopplungskanäle in andere GluT-Zellen verteilt und an Stellen mit niedriger Kaliumionen Konzentration wieder freigesetzt werden.

Durch den Verlust der GluT-Zellen im sklerotischen Hippocampus kommt es folglich zu einer Anhäufung von Kaliumionen und Glutamat im Extrazellulärraum, was zu einer Verstärkung und Verlängerung der Depolarisation der umliegenden Zellen bei neuronalen Aktivität führt. Dieser Effekt wird noch verstärkt, da es anfallsbedingt zu einer Schrumpfung des Extrazellulärraums kommt (Lux et al., 1986; Heinemann, 1986), wodurch die Glutamat- und Kaliumionen Konzentrationen im verbleibenden Extrazellulärraum zusätzlich erhöht werden.

Dieser Effekt der reduzierten Kaliumionen-Pufferung im sklerotischen Hippocampus konnte sowohl am Tiermodell (Gabriel et al., 1998a) als auch am humanen Hippocampus bereits gezeigt

werden (Gabriel et al., 1998b; Kivi et al., 2000). Es wurde bisher jedoch davon ausgegangen, dass die reduzierte Kaliumionen Aufnahme im Hippocampus von Patienten mit AHS allein durch eine reduzierte Expression von K_{ir} -Kanälen in den verbliebenen GluR-Zellen zustande kommt (Hinterkeuser et al., 2000; Schröder et al., 2000).

Es ist bekannt, dass es bei epileptischer Aktivität zu einer Erhöhung der extrazellulären Kaliumionen Konzentration in der betroffenen Hirnregion kommt (Moody et al., 1974; Fisher et al., 1976; Lothman & Somjen, 1976). Darüberhinaus kann durch eine erhöhte Kaliumionen Konzentration im Extrazellulärraum epileptische Aktivität ausgelöst oder aufrechterhalten werden (Traynelis & Dingledine, 1988; McNamara, 1994).

Auch die reduzierte Aufnahme des neuronal freigesetzten Glutamats hat weitreichende Folgen, denn durch eine reduzierte Glutamin-Produktion durch Astrozyten bei AHS steht den Neuronen weniger Glutamin zur Produktion von Glutamat oder der Energieversorgung zur Verfügung. Hierdurch wird die Funktion der Neurone in der betroffenen Region zusätzlich beeinträchtigt.

Durch den Verlust an GluT-Zellen bei Patienten mit Ammonshornsklerose wird die Funktion des Hippocampus demnach massiv beeinträchtigt und die Reizanfälligkeit erhöht, denn man muß vermuten, dass durch das Verschwinden der GluT-Zellen das Schutzschild, das die mit Glutamat-Transportern besetzten Fortsätze der Astrozyten um die neuronalen Synapsen bilden, verloren geht. Dadurch kommt es zu einer massiven Akkumulation von Glutamat im Extrazellulärraum, was zu einer Erregung synaptischer und extrasynaptischer Glutamat-Rezeptoren führt. Sowohl Gliazellen, als auch Neuronen werden depolarisiert und die Reizschwelle der Neuronen erniedrigt.

Ungeklärt bleibt jedoch, welche Zellpopulation zuerst verschwindet. Kommt es durch das Verschwinden der GluT-Zellen zum Absterben bestimmter Neuronenpopulationen, oder verschwinden die GluT-Zellen als Folge des Neuronensterbens? Diese Frage wird man nur durch weitergehende Untersuchungen am Tiermodell beantworten können.

5.5 Molekulare Analyse der Glutamat-Rezeptoren humaner Astrozyten

Es gibt Hinweise dafür, dass Fehlfunktionen ionotroper Glutamat-Rezeptoren, wie man sie bei den GluR-Typ Astrozyten im Hippocampus findet, bei Krankheiten des Gehirns beteiligt sein können (Seifert & Steinhäuser, 2001). Die funktionellen Eigenschaften von Transmitter-

Rezeptoren auf humanen Astrozyten sind weitgehend unbekannt. In einer ersten Studie wurde kürzlich beschrieben, dass Astrozyten im Hippocampus von Patienten mit pharmakoresistenter TLE Glutamat-Rezeptoren vom AMPA-Typ mit einer mittleren Kalziumpermeabilität exprimieren, und es gab Hinweise auf Unterschiede im Flip/Flop Spleißen bei den verschiedenen TLE Formen (Seifert et al., 2002).

An diese Arbeit anschließend wurden in der vorliegenden Studie durch Einzelzell RT-PCR die von den humanen GluR-Zellen exprimierten Glutamat-Rezeptor Untereinheiten, GluR 1,-2 und-4, identifiziert. Dies entspricht den Verhältnissen wie sie im Hippocampus von Mäusen vorgefunden werden (Seifert et al., 1997). Die Verteilung der Untereinheiten war bei AHS- und Läsions Patienten gleich. Durch eine anschließende Restriktionanalyse konnte gezeigt werden, dass die humanen GluR Gene hauptsächlich in der Flip Spleißform exprimiert sind, wobei eine quantitative Analyse des Flip/Flop Verhältnisses zeigte, dass in den Astrozyten von AHS Patienten vermehrt GluR1 Flip vorkommt. Eine vermehrte Expression von Glutamat-Rezeptoren in der Flip Form in den Astrozyten von AHS Patienten, verglichen mit den Astrozyten von Läsions Patienten, konnte mittels *real-time* PCR bestätigt werden. Beim direkten Vergleich der Ergebnisse einzelner Zellen, die mit den zwei Methoden erhalten wurden, gab es in den meisten Fällen eine Korrelation zwischen dem Flip/Flop Verhältnis und ΔC_T . Wenn man davon ausgeht, dass die Stromdichte der Rezeptoren bei AHS- und Läsions Patienten gleich ist (Seifert et al., 2002), erscheint eine Hochregulation von GluR1 unwahrscheinlich. Vielmehr kommt es zu einer relativen Erhöhung von GluR1 Flip auf Kosten von GluR1 Flop (Seifert et al., 2004).

Ähnliche Veränderungen im Flip/Flop Verhältnis der GluR1 Untereinheit sind für die Körnerzellen des Gyrus dentatus im epileptischen Hippocampus des *Kindling*-Modells beschrieben. Hier fand man zunächst eine Erhöhung von GluR1-3 in der Flip Form, 24 h nach dem letzten Anfall (Kamphuis et al., 1992). Vier Wochen später war jedoch nur noch die mRNA für GluR1 Flip erhöht (Kamphuis et al., 1994). Im Kainat-Epilepsie-Modell kommt es aufgrund der Anfallsaktivität zu einer vermehrten Expression von GluR2-Flip in der CA1 Region des Hippocampus. Bei humaner TLE ist die Expression von GluR1 in den CA3 Neuronen und in Mooszellen im Hilus des Gyrus dentatus erhöht, was auf eine Beteiligung dieser Glutamat-Rezeptor Untereinheit an der Entstehung und Aufrechterhaltung der epileptischen Aktivität hinweist (De Lanerolle et al., 1998; Eid et al., 2002).

Ob die Veränderungen im Spleißstatus der glialen Glutamat-Rezeptoren eine Ursache für, oder eine Folge der Hyperaktivität sind, muß, genau wie der zugrundeliegende Mechanismus, weiter

untersucht werden. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass bestimmte Wachstumsfaktoren (basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), Thrombozyten Wachstumsfaktor (PDGF)), die Expression von GluR1 in kultivierten Gliazellen beeinflussen, da durch Anfallsaktivität die Wachstumsfaktor-Expression sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen induziert wird (Gall, 1993; Gall et al., 1994), was zur Schädigung von Neuronen führt (Mathern et al., 1997).

5.6 Funktionelle Eigenschaften EGFP-positiver Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus der Maus

Um zusätzlich zu den Experimenten am humanen Gewebe, das nur in limitiertem Umfang zur Verfügung steht, Aufschluß über die funktionellen Eigenschaften von Astrozyten unter epileptischen Bedingungen zu erhalten, wurde ein Maus Epilepsie-Modell gewählt. Es wurden die Zellen in der SGZ des Gyrus dentatus untersucht, da sie eine der wenigen Hirnregionen darstellt, in denen auch im adulten Gehirn Neurogenese stattfindet und vorangegangene Arbeiten sich hauptsächlich mit den Eigenschaften der Astrozyten des Hilus bzw. der Molekularschicht des Gyrus dentatus beschäftigt haben (Backus & Berger, 1995; Schröder et al., 1999).

Von den hier funktionell untersuchten EGFP-positiven Zellen waren bis auf eine Ausnahme alle Zellen BrdU-negativ. Eine Erklärung hierfür ist die niedrige BrdU-Dosis, die verwendet wurde, bzw. die kurze Expositionszeit.

Die BrdU-negativen-EGFP-positiven Zellen wurden in zwei Gruppen eingeteilt: leuchtend grüne Zellen mit radialem Fortsatz der in die Körnerzellschicht hineinreicht, und blassgrüne Zellen mit wenigen, dünnen Fortsätzen. Die BrdU-negativen Astrozyten mit radialem Fortsatz hatten alle ein passives Strommuster, das dem der GluT-Zellen (Matthias et al., 2003) im Stratum Radiatum des Hippocampus bzw. den Zellen in der Molekularzellschicht des Gyrus dentatus (Schröder et al., 1999) entsprach. Neue Daten zeigen, dass diese Zellen Nestin exprimieren, was die Annahme bestärkt, dass es sich um Stammzellen handelt (Filippov et al., 2003).

Die schwach EGFP-positiven Zellen wurden weiter in zwei funktionell unterschiedliche Gruppen unterteilt. Die Zellen der einen Gruppe entsprachen in ihrem Strommuster den GluR-Zellen im Stratum Radiatum des Hippocampus (Matthias et al., 2003) bzw. den Zellen in der Molekularzellschicht des Gyrus dentatus (Schröder et al., 1999). Dem Strommuster der Zellen

der zweiten Gruppe, die sich morphologisch nicht von denen der ersten Gruppe unterscheiden ließen, fehlten sowohl transiente Auswärts-, wie auch einwärtsgerichtete K^+ -Ströme. Ein Fehlen von K_{ir} -Strömen ist ein Indiz für die Proliferation von Astrozyten (Bordey et al., 2001), wobei jedoch keine der Zellen BrdU-positiv war. Dies lässt sich möglicherweise mit der zu geringen BrdU-Dosis erklären, die nicht alle sich teilenden Zellen markiert hat (Cameron & McKay, 2001).

Interessanterweise scheinen in der SGZ, außer den Zellen mit radialem Fortsatz, nur wenige hGFAP-EGFP-positive Zellen auch Nestin-EGFP (Filippov et al., 2003) positiv zu sein. Zudem hatte keine der in der vorliegenden Arbeit funktionell charakterisierten hGFAP-EGFP-positiven Zellen neuronale Eigenschaften (Hüttmann et al., 2003). Vermutlich handelt es sich bei den hier untersuchten Zellen mit hGFAP-Promotor Aktivität um ein früheres transientes Stadium auf dem Weg zur neuronalen Differenzierung (Seri et al., 2001), als die Nestin-EGFP-positiven Zellen, so dass die untersuchten Zellen noch viele Eigenschaften ihres astroglialen Ursprungs aufweisen.

6. Zusammenfassung

In der CA1 Region des Hippocampus von Mäusen existieren zwei funktionell und morphologisch unterschiedliche Arten von Astrozyten, die aufgrund des Besatzes mit Glutamat-Rezeptoren bzw. Glutamat-Transportern als GluR- und GluT-Zellen bezeichnet werden (Matthias et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Astrozyten der CA1-Region des humanen Hippocampus von Patienten mit TLE und die Astrozyten der SGZ des Gyrus dentatus in einem Maus Epilepsie-Modell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass auch im humanen Hippocampus zwei Gruppen von Astrozyten existieren, die offensichtlich ähnliche funktionelle und morphologische Eigenschaften besitzen wie die GluR- und GluT-Zellen im Hippocampus von Mäusen. Bei einer der zwei untersuchten Patientengruppen, den Patienten mit AHS, kommt es jedoch krankheitsbedingt zum nahezu vollständigen Verlust der GluT-Zellen und damit verbunden zu massiven Veränderungen in der Kalium- und Glutamatpufferkapazität.

Darüberhinaus konnte durch Transkript-Analysen gezeigt werden, dass es bei den verbliebenen GluR-Zellen dieser Patienten zu Veränderungen im Flip/Flop-Spleiß-Verhältnis der GluR1-Untereinheit kommt. Hierbei ist der relative Anteil von GluR1 in der Flip Version erhöht. Diese Veränderungen tragen zur Genese und/oder Ausbreitung von Anfallsaktivität bei.

In der SGZ des Gyrus dentatus von Mäusen findet man, im Gegensatz zur CA1-Region, mindestens drei unterschiedliche Typen von Astrozyten. Zum einen gibt es als „radiale“ Glia bezeichnete Zellen, die einen langen, in die Körnerzellschicht reichenden Fortsatz haben. Das Strommuster und die Glutamat-Sensitivität dieser Zellen entspricht dem der GluT-Zellen in der CA1 Region. Zusätzlich findet man Zellen mit der Morphologie von GluR-Zellen, von denen aber nur ein Teil auch das Strommuster von GluR-Zellen besitzt. Die übrigen Zellen sind durch das Fehlen einzelner Stromkomponenten gekennzeichnet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Astrozyten keine einheitliche Zellpopulation darstellen, sondern, dass regional unterschiedlich, verschiedene Gruppen von Astrozyten existieren. Dies konnte nicht nur im Hippocampus von Mäusen, sondern auch im humanen Hippocampus gezeigt werden, wo es krankheitsbedingt bei einer bestimmten Form der TLE zu Veränderungen der Zusammensetzung der Astrozytenpopulationen und zu Veränderungen an Glutamat-Rezeptoren kommt.

6.1 Summary

Coexistence of functionally different types of astrocytes in the hippocampus: Impact for seizure generation in epilepsy patients.

We have recently identified two subpopulations of astrocytes coexisting in the CA1 region of the mouse hippocampus with distinct morphological and functional properties. In detail, the cells show a non-overlapping expression of either AMPA-type glutamate receptors (GluR-cells) or glutamate transporters (GluT-cells) (Matthias et al., 2003). In the present work the astrocytes in the CA1 region of the human hippocampus from patients with TLE and the astrocytes in the SGZ of the dentate gyrus in a mouse epilepsy-model were examined. In principle, both groups of astrocytes were found in the human hippocampus, displaying similar functional and morphological properties as the GluR- and GluT-cells previously observed in mice. But in one group of patients (AHS' group) there is a nearly complete loss of GluT-cells leading to extensive changes in potassium- and glutamate-buffering.

Moreover, transcript-analyses revealed changes in the flip/flop-ratio of the GluR1-subunit of the remaining GluR-cells, where the relative portion of GluR1-flip is increased. These changes contribute to the genesis and/or spread of seizure activity.

In contrast to the hippocampal CA1 region, we found at least three different astroglial cell-types in the SGZ of the dentate gyrus. There are the so called 'radial' glia cells with a long process emanating through the granular cell layer. These cells display a current pattern and glutamate-sensitivity according to the GluT-cells in the CA1 region. Additionally there are cells with GluR-cell morphology, but only a part of them shows the typical current pattern of CA1 GluR-cells. The remaining cells are characterised by the absence of several current components.

The results of this work point out that astrocytes do not represent a uniform cell population, but that regionally varying, different groups of astrocytes exist. This was not only shown in the hippocampus of mice, but also in the human hippocampus, where changes in the composition of the astroglial populations and changes in glutamate receptors are found, that are caused by a certain form of TLE.

7. Literatur

- Akopian G., Kressin K., Derouiche A., Steinhäuser C. (1996) Identified glial cells in the early postnatal mouse hippocampus display different types of Ca²⁺ currents. *Glia* **17(3)**: 181-194
- Altman J., Das GD. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neuro.* **124(3)**: 319-335
- Alvarez-Buylla A., Herrera DG., Wichterle H. (2000) The subventricular zone: source of neuronal precursors for brain repair. *Prog. Brain Res.* **127**: 1-11
- Angulo MC., Kozlov AS., Charpak S., Audinat E. (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J. Neurosci.* **24(31)**: 6920-6927
- Aronica E., van Vliet EA., Mayboroda OA., Troost D., da Silva FH., Gorter JA. (2000) Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* **12(7)**: 2333-2344
- Backus KH., Berger T. (1995) Developmental variation of the permeability to Ca²⁺ of AMPA receptors in presumed hilar glial precursor cells. *Pflügers Arch.* **431(2)**: 244-252
- Bengzon J., Kokaia Z., Elmer E., Nanobashvili A., Kokaia M., Lindvall O. (1997) Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94(19)**: 10432-10437
- Bergles DE., Jahr CE. (1998) Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *J. Neurosci.* **18(19)**: 7709-7716
- Bergles DE., Diamond JS., Jahr CE. (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9(3)**: 293-298

-
- Bezzi P., Gundersen V., Galbete JL., Seifert G., Steinhäuser C., Pilati E., Volterra A. (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neurosci.* **7(6)**: 613-620
- Bliss TV., Lomo T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* **232(2)**: 331-356
- Blümcke I., Thom M., Wiestler OD. (2002) Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol.* **12(2)**: 199-211
- Bordey A., Hablitz JJ., Sontheimer H. (2000) Reactive astrocytes show enhanced inwardly rectifying K⁺ currents in situ. *Neuroreport* **11(14)**: 3151-3155
- Bordey A., Lyons SA., Hablitz JJ., Sontheimer H. (2001) Electrophysiological characteristics of reactive astrocytes in experimental cortical dysplasia. *J. Neurophysiol.* **85(4)**: 1719-1731
- Cameron HA., McKay RD. (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* **435(4)**: 406-417
- Christie MJ. (1995) Molecular and functional diversity of K⁺ channels. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **22(12)**: 944-951
- Danbolt NC. (2001) Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* **65(1)**: 1-105
- Dash PK., Mach SA., Moore AN. (2001) Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. *J. Neurosci. Res.* **63(4)**: 313-319
- De Lanerolle NC., Eid T., von Campe G., Kovacs I., Spencer DD., Brines M. (1998) Glutamate receptor subunits GluR1 and GluR2/3 distribution shows reorganization in the human epileptogenic hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **10(5)**: 1687-1703

- Dietrich D., Clusmann H., Kral T., Steinhäuser C., Blümcke I., Heinemann U., Schramm J. (1999) Two electrophysiologically distinct types of granule cells in epileptic human hippocampus. *Neuroscience* **90(4)**: 1197-1206
- Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis SF. (1999) The glutamate receptor ion channel. *Pharmacol. Rev.* **51(1)**: 7-61
- Eid T., Kovacs I., Spencer DD., de Lanerolle NC. (2002) Novel expression of AMPA-receptor subunit GluR1 on mossy cells and CA3 pyramidal neurons in the human epileptogenic hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **15(3)**: 517-527
- Engel J. Jr. (1993) Clinical neurophysiology, neuroimaging, and the surgical treatment of epilepsy. *Curr. Opin. Neurol.* **6(2)**: 240-249
- Eriksson PS., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., Alborn AM., Nordborg C., Peterson DA., Gage FH. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* **4(11)**: 1313-1317
- Euler T., Wassle H. (1995) Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* **361(3)**: 461-478
- Fellin T., Pascual O., Gobbo S., Pozzan T., Haydon PG., Carmignoto G. (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* **43(5)**: 729-743
- Ferraguti F., Corti C., Valerio E., Mion S., Xuereb J. (2001) Activated astrocytes in areas of kainate-induced neuronal injury upregulate the expression of the metabotropic glutamate receptors 2/3 and 5. *Exp. Brain Res.* **137(1)**: 1-11
- Filippov V., Kronenberg G., Pivneva T., Reuter K., Steiner B., Wang LP., Yamaguchi M., Kettenmann H., Kempermann G. (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.* **23(3)**: 373-382

- Fisher RS., Pedley TA., Moody WJ. Jr., Prince DA. (1976) The role of extracellular potassium in hippocampal epilepsy. *Arch. Neurol.* **33(2)**: 76-83
- Franke C., Hatt H., Dudel J. (1987) Liquid filament switch for ultra-fast exchanges of solutions at excised patches of synaptic membranes of crayfish muscle. *Neurosci. Lett.* **77(2)**: 199-204
- Freed DM., Corkin S., Cohen NJ. (1987) Forgetting in H.M.: a second look. *Neuropsychologica* **25(3)**: 461-471
- Furuta A., Rothstein JD., Martin LJ. (1997) Glutamate transporter subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* **17(21)**: 8363-8375
- Gabriel S., Eilers A., Kivi A., Kovacs R., Schulze K., Lehmann TN., Heinemann U. (1998a) Effects of barium on stimulus induced changes in extracellular potassium concentration in area CA1 of hippocampal slices from normal and pilocarpine-treated epileptic rats. *Neurosci. Lett.* **242(1)**: 9-12
- Gabriel S., Kivi A., Kovacs R., Lehmann TN., Lanksch WR., Meencke HJ., Heinemann U. (1998b) Effects of barium on stimulus induced changes in $[K^+]_o$ and field potentials in dentate gyrus and area CA1 of human epileptic hippocampus. *Neurosci. Lett.* **249(2-3)**: 91-94
- Gall CM. (1993) Seizure induced changes in neurotrophin expression: implications for epilepsy. *Exp. Neurol.* **124(1)**: 150-166
- Gall CM., Berschauer R., Isackson PJ. (1994) Seizures increase basic fibroblast growth factor mRNA in adult rat forebrain neurons and glia. *Mol. Brain Res.* **21(3-4)**: 190-205
- Giaume C., Taberero A., Medina JM. (1997) Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia* **21(1)**: 114-123

- Gould E., Reeves AJ., Fallah M., Tanapat P., Gross CG., Fuchs E. (1999) Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96(9)**: 5263-5267
- Gray WP., Sundstrom LE. (1998) Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Brain Res.* **790(1-2)**: 52-59
- Hansson E., Muydermann H., Leonova J., Allansson L., Sinclair J., Blomstrand F., Thorlin T., Nilsson M., Ronnback L. (2000) Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem. Int.* **37(2-3)**: 317-329
- Hastings NB., Gould E. (1999) Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J. Comp. Neurol.* **413(1)**: 146-154
- Haugeto O., Ullensvang K., Levy LM., Chaudhry FA., Honore T., Nielsen M., Lehre KP., Danbolt NC. (1996) Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J. Biol. Chem.* **271(44)**: 27715-27722
- Heinemann U. (1986) Excitatory amino acids and epilepsy-induced changes in extracellular space size. *Adv. Exp. Med. Biol.* **203**: 449-460
- Heins N., Malatesta P., Cecconi F., Nakafuku M., Tucker KL., Hack MA., Chapouton P., Barde YA., Götz M. (2002) Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat. Neurosci.* **5(4)**: 308-315
- Hinterkeuser S., Schröder W., Hager G., Seifert G., Blümcke I., Elger CE., Schramm J., Steinhäuser C. (2000) Astrocytes in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy display changes in potassium conductances. *Eur. J. Neurosci.* **12(6)**: 2087-2096
- Huang YH., Bergles DE. (2004) Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14(3)**: 346-352

- Hüttmann K., Sadgrove M., Wallraff A., Hinterkeuser S., Kirchhoff F., Steinhäuser C., Gray WP. (2003) Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: functional and immunocytochemical analysis. *18(10)*: 2769-2778
- Jan LY., Jan YN. (1997) Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *J. Physiol.* **505(Pt 2)**: 267-282
- Kamphuis W., Monyer H., De Rijk TC., Lopes da Silva FH. (1992) Hippocampal kindling increases the expression of glutamate receptor-A Flip and -B Flip mRNA in dentate granule cells. *Neurosci. Lett.* **148(1-2)**: 51-54
- Kamphuis W., De Rijk TC., Talamini LM., Lopes da Silva FH. (1994) Rat hippocampal kindling induces changes in the glutamate receptor mRNA expression patterns in dentate granule neurons. *Eur. J. Neurosci.* **6(7)**: 1119-1127
- Kang J., Jiang L., Goldman SA., Nedergaard M. (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* **1(8)**: 683-692
- Kivi A., Lehmann TN., Kovacs R., Eilers A., Jauch R., Meencke HJ., von Deimling A., Heinemann U., Gabriel S. (2000) Effects of barium on stimulus-induced rises of $[K^+]_o$ in human epileptic non-sclerotic and sclerotic hippocampal area CA1. *Eur. J. Neurosci.* **12(6)**: 2039-2048
- Knopfel T., Grandes P. (2002) Metabotropic glutamate receptors in the cerebellum with a focus on their function in Purkinje cells. *Cerebellum* **1(1)**: 19-26
- Kral T., Clusmann H., Urbach J., Schramm J., Elger CE., Kurthen M., Grunwald T. (2002) Preoperative evaluation for epilepsy surgery (Bonn Algorithm). *Zentralbl. Neurochir.* **63(3)**: 106-110
- Kressin K., Kuprijanova E., Jabs R., Seifert G., Steinhäuser C. (1995) Developmental regulation of Na^+ and K^+ conductances in glial cells of mouse hippocampal brain slices. *Glia* **15(2)**: 173-187

- Lin SC., Bergles DE. (2004) Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* **7(1)**: 24-32
- Liu J., Solway K., Messing RO., Sharp FR. (1998) Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J. Neurosci.* **18(19)**: 7768-7778
- Lothman EW., Somjen GG. (1976) Functions of primary afferents and responses of extracellular K⁺ during spinal epileptiform seizures. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **41(3)**: 253-267
- Lux HD., Heinemann U., Dietzel I. (1986) Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity. *Adv. Neurol.* **44**: 619-639
- MacFarlane SN., Sontheimer H. (1997) Electrophysiological changes that accompany reactive gliosis in vitro. *J. Neurosci.* **17(19)**: 7316-7329
- MacFarlane SN., Sontheimer H. (2000) Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes. *Glia* **30(1)**: 39-48
- Malatesta P., Hack MA., Hartfuss E., Kettenmann H., Klinkert W., Kirchhoff F., Götz M. (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* **37(5)**: 751-764
- Markakis EA., Gage FH. (1999) Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J. Comp. Neurol.* **406(4)**: 449-460
- Martin LJ., Brambrink AM., Lehmann C., Portera-Cailliau C., Koehler R., Rothstein J., Traystman RJ. (1997) Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. *Ann. Neurol.* **42(3)**: 335-348
- Mathern GW., Babb TL., Micevych PE., Blanco CE., Pretorius JK. (1997) Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber

sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Mol. Chem. Neuropathol.* **30(1-2)**: 53-76

Matthias K., Kirchhoff F., Seifert G., Hüttmann K., Matyash M., Kettenmann H., Steinhäuser C. (2003) Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* **23(5)**: 1750-1758

McNamara JO. (1994) Cellular and molecular basis of epilepsy. *J. Neurosci.* **14(6)**: 3413-3425

Moody WJ., Futamachi KJ., Prince DA. (1974) Extracellular potassium activity during epileptogenesis. **42(2)**: 248-263

Nadarajah B., Alifragis P., Wong RO., Parnavelas JG. (2003) Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cereb. Cortex.* **13(6)**: 607-611

Nagy JJ., Rash JE. (2000) Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res. Rev.* **32(1)**: 29-44

Nagy JJ., Ionescu AV., Lynn BD., Rash JE. (2003) Coupling of astrocyte connexins Cx26, Cx30, Cx43 to oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications from normal and connexin32 knockout mice. *Glia* **44(3)**: 205-218

Newman EA., Frambach DA., Odette LL. (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science* **225(4667)**: 1174-1175

Newman EA. (1986) High potassium conductance in astrocyte endfeet. *Science* **233**: 453-454

Noctor SC., Flint AC., Weissman TA., Dammerman RS., Kriegstein AR. (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* **409(6821)**: 714-720

- Nolte C., Matyash M., Pivneva T., Schipke CG., Ohlemeyer C., Hanisch UK., Kirchhoff F., Kettenmann H. (2001) GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* **33(1)**: 72-86
- Oliet SH., Piet R., Poulain DA., Theodosis DT. (2004) Glial modulation of synaptic transmission: Insights from the supraoptic nucleus of the hypothalamus. *Glia* **47(3)**: 258-267
- Orkand RK., Nicholls JG., Kuffler SW. (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* **29(4)**: 788-806
- Palmer TD., Willhoite AR., Gage FH. (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* **425(4)**: 479-494
- Parent JM., Yu TW., Leibowitz RT., Geschwind DH., Sloviter RS., Lowenstein DH. (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* **17(10)**: 3727-3738
- Parri HR., Gould TM., Crunelli V. (2001) Spontaneous astrocytic Ca^{2+} oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat. Neurosci.* **4(8)**: 803-812
- Partin KM., Patneau DK., Winters CA., Mayer ML., Buonanno A. (1993) Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron* **11(6)**: 1069-1082
- Racine RJ. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophys.* **32(3)**: 281-294
- Rakic P. (1971) Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res.* **33(2)**: 471-478
- Rauen T., Kanner BL. (1994) Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. *Neurosci. Lett.* **169(1-2)**: 137-140

- Rauen T. (2000) Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina. *Amino Acids* **19(1)**: 53-62
- Rothstein JD., Martin L., Levey AI., Dykes-Hoberg M., Jin L., Wu D., Nash N., Kuncl RW. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* **13(3)**: 713-725
- Scharfman HE., Goodman JH., Sollas AL. (2000) Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J. Neurosci.* **20(16)**: 6144-6158
- Schröder W., Hager G., Kouprijanova E., Weber M., Schmitt AB., Seifert G., Steinhäuser C. (1999) Lesion-induced changes of electrophysiological properties in astrocytes of the rat dentate gyrus. *Glia* **28(2)**: 166-174
- Schröder W., Hinterkeuser S., Seifert G., Schramm J., Jabs R., Wilkin GP., Steinhäuser C. (2000) Functional and molecular properties of human astrocytes in acute hippocampal slices obtained from patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **41 Suppl.6**: 181-184
- Scoville WB., Milner B. (2000) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **12(1)**: 103-113
- Seifert G., Steinhäuser C. (1995) Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca^{2+} permeability. *Eur. J. Neurosci.* **7(9)**: 1872-1881
- Seifert G., Rehn L., Weber M., Steinhäuser C. (1997) AMPA receptor subunits expressed by single astrocytes in the juvenile mouse hippocampus. *Mol. Brain Res.* **47(1-2)**: 286-294
- Seifert G., Steinhäuser C. (2001) Ionotropic glutamate receptors in astrocytes. *Prog. Brain Res.* **132**: 287-299

Seifert G., Schröder G., Hinterkeuser S., Schumacher T., Schramm J., Steinhäuser C. (2002) Changes in flip/flop splicing of astroglial AMPA receptors in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **43 Suppl 5**: 162-167

Seifert G., Hüttmann K., Schramm J., Steinhäuser C. (2004) Enhanced relative expression of glutamate receptor 1 flip AMPA receptor subunits in hippocampal astrocytes of epilepsy patients with Ammon's horn sclerosis. *J. Neurosci.* **24(8)**: 1996-2003

Seress L. (1992) Morphological variability and developmental aspects of monkey and human granule cells: differences between the rodent and primate dentate gyrus. *Epilepsy Res. Suppl.* **7**: 3-28

Seri B., Garcia-Verdugo JM., McEwens BS., Alvarez-Buylla A. (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* **21(18)**: 7153-7160

Shors TJ., Miesegae G., Beylin A., Zhao M., Rydel T., Gould E. (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* **410(6826)**: 372-376

Steinhäuser C., Berger T., Frotscher M., Kettenmann H. (1992) Heterogeneity in the membrane current pattern of identified glial cells in the hippocampal slice. *Eur. J. Neurosci.* **4(6)**: 472-484

Theis M., Jauch R., Zhuo L., Speidel D., Wallraff A., Doring B., Frisch C., Sohl G., Teubner B., Euwens C., Huston J., Steinhäuser C., Messing A., Heinemann U., Willecke K. (2003) Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J. Neurosci.* **23(3)**: 766-776

Traynelis SF., Dingledine R. (1988) Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. *J. Neurophysiol.* **59(1)**: 259-276

van Praag H., Schinder AF., Christie BR., Toni N., Palmer TD., Gage FH. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* **415(6875)**: 1030-1034

Vautier F., Belachew S., Chittajallu R., Gallo V. (2004) Shaker-type potassium channel subunits differentially control oligodendrocyte progenitor proliferation. *Glia* **48(4)**: 337-345

Verkhatsky AN., Trotter J., Kettenmann H., (1990) Cultured glial precursor cells from mouse cortex express two types of calcium currents. *Neurosci. Lett.* **112(2-3)**: 194-198

Verkhatsky A., Steinhäuser C. (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res. Rev.* **32(2-3)**: 380-412

Volterra A., Steinhäuser C. (2004) Glial modulation of synaptic transmission in the hippocampus. *Glia* **47(3)**: 249-257

Wallraff A., Odermatt B., Willecke K., Steinhäuser C. (2004) Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia* **48(1)**: 36-43

Walz W. (2002) Chloride/anion channels in glial cell membranes. *Glia* **40(1)**: 1-10

Weissman TA., Riquelme PA., Ivic L., Flint AC., Kriegstein AR. (2004) Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron* **43(5)**: 647-661

Zhou M., Kimelberg H. (2001) Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression. *J. Neurosci.* **21(20)**: 7901-7908

7.1 Internetquellen

1. www.psychologie.uni-trier.de/personen/wschlotz/veranstaltungen/ausgew_Probleme/HM_Flamme.pdf

2. medweb.bham.ac.uk/neuroscience/jefferys/images/hippocampus.html
3. www.medizininfo.de/kopfundseele/epilepsie/start.shtml;
4. www.neuro24.de/epilepsie_syndrome.htm
5. www.epilepsie-online.de/daten/was3.htm

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Steinhäuser für die Bereitstellung des interessanten Themas und die engagierte und persönliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. W. Schmahl danke ich sehr herzlich für seine hilfreichen Ratschläge zur Anfertigung dieser Arbeit und die Vertretung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die offene und hilfreiche Arbeitsatmosphäre. Insbesondere Frau I. Schroedter gilt mein Dank für die perfekte technische Assistenz und Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Seifert für seinen Rat und seine Anregungen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. Schramm, Herrn Prof. Dr. B. Meyer und Frau P. Stausberg für ihre Bemühungen zur Bereitstellung des humanen Gewebes.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht und mich immer unterstützt haben.