

**Aus dem Oscar Langendorff Institut für Physiologie  
der Universität Rostock**

**Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Köhling**

**Elektrophysiologische Untersuchungen zur Funktionalität des NMDA-  
Rezeptors an Körnerzellen des Gyrus dentatus bei Anti-NMDA-Rezeptor-  
Enzephalitis im Tiermodell der Ratte**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock**

**vorgelegt von**

**Till Janusz Würdemann, geb. am 22.03.1984 in Köln**

**aus Niederkassel**

**Rostock, 19. Juli 2013**

**Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. univ. E. C. Reisinger**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. med. univ. E. C. Reisinger

**1. Gutachter:** Priv.-Doz. Dr. med. T. Kirschstein,  
Oscar Langendorff Institut für Physiologie, Universität Rostock

**2. Gutachter:** Prof. Dr. med. C. G. Bien,  
Chefarzt der Epilepsiekliniken Mara, Epilepsie-Zentrum Bethel

**3. Gutachter:** Univ.-Prof. Dr. med. A. Draguhn,  
Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Heidelberg

**Datum der Einreichung:** 19. Juli 2013

**Datum der Verteidigung:** 09. Dezember 2014

*Für alle, die mich förderten und forderten!*

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG – DIE LIMBISCHE ENZEPHALITIS</b> .....	<b>1</b>
1.1 DIE ANTI-NMDA-REZEPTOR-ENZEPHALITIS .....	3
1.1.1 <i>Die Symptomatik des Krankheitsbildes</i> .....	4
1.2 GRUNDLAGEN VON LERNPROZESSEN UND GEDÄCHTNIS .....	5
1.2.1 <i>Der Hippocampus</i> .....	5
1.2.2 <i>Der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor</i> .....	7
1.2.3 <i>Lernen und Gedächtnis – Rolle von Hippocampus und NMDA-Rezeptor</i> .....	8
1.3 STAND DER FORSCHUNG .....	10
1.4 ZIEL DER ARBEIT .....	12
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>13</b>
2.1 MATERIALIEN.....	13
2.1.1 <i>Chemikalien und Pharmaka</i> .....	13
2.1.2 <i>Intracerebral injizierte Substanzen</i> .....	13
2.1.3 <i>Mehr- und Einwegmaterial</i> .....	14
2.1.4 <i>Geräte</i> .....	15
2.1.5 <i>Lösungen</i> .....	16
2.2 METHODEN .....	17
2.2.1 <i>Operative stereotaktische hippocampale Injektion</i> .....	17
2.2.2 <i>Präparation des Hippocampus</i> .....	21
2.2.3 <i>Aufbau des elektrophysiologischen Messplatzes</i> .....	22
2.2.4 <i>Prinzipien der elektrophysiologischen Methoden</i> .....	23
2.2.4.1 <i>Herstellung von Glasmikropipetten</i> .....	23
2.2.4.2 <i>Herstellung von bipolaren Stimulationselektroden</i> .....	24
2.2.4.3 <i>Pharmakologie</i> .....	24
2.2.4.4 <i>Intrazelluläre Messungen</i> .....	25
2.2.5 <i>Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse</i> .....	30
2.2.5.1 <i>Definition der Versuchsreihen</i> .....	30
2.2.5.2 <i>Vorgehensweise bei der Auswertung der Membraneigenschaften</i> .....	30
2.2.5.3 <i>Vorgehensweise bei der Auswertung der Input-Output-Kurven</i> .....	32

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
3.1	VERWENDETE TIERE .....	34
3.2	MEMBRANEIGENSCHAFTEN.....	38
3.2.1	<i>Passive Membraneigenschaften.....</i>	38
3.2.2	<i>Entladungsverhalten .....</i>	44
3.3	INPUT-OUTPUT-KURVEN.....	48
3.3.1	<i>Auffälligkeiten bei der Evozierung von Aktionspotenzialen .....</i>	56
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>60</b>
4.1	TIERMODELL DER ANTI-NMDAR-ENZEPHALITIS .....	60
4.2	EINFLUSS DER ANTIKÖRPER AUF DEN NMDA-REZEPTOR .....	63
4.2.1	<i>Einfluss des kommerziellen Anti-NR1-Antikörpers .....</i>	63
4.2.2	<i>Einfluss des bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis nachweisbaren Autoantikörpers .....</i>	65
4.3	NMDAR-FUNKTION UND SYMPTOME DER ANTI-NMDAR-ENZEPHALITIS.....	68
4.3.1	<i>Parallelen zu anderen Erkrankungen.....</i>	69
4.3.2	<i>NMDAR-Funktion und Gedächtnisstörungen .....</i>	70
4.4	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK .....	71
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>THESEN .....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>75</b>
7.1	EINSTELLUNG DES PIPETTENZIEHGERÄTES (P-97) .....	75
7.2	PROTOKOLLE ZUR BESTIMMUNG DER MEMBRANEIGENSCHAFTEN.....	75
7.3	PROTOKOLL FÜR DIE DURCHFÜHRUNG VON INPUT-OUTPUT-KURVEN.....	76
7.4	LITERATURVERZEICHNIS.....	76
	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>89</b>
	<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>90</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Übersicht über einige Formen der limbischen Enzephalitis, nach Grisold <i>et al.</i> 2011 und Pedrosa <i>et al.</i> 2012 .....	1
Abbildung 1-2: Auswirkungen einer pharmakologischen NMDAR-Blockade bzw. einer genetischen Reduktion, modifiziert nach Florance-Ryan & Dalmau 2010 .....	4
Abbildung 1-3: Hippocampus der Ratte.....	6
Abbildung 1-4: Vereinfachte Darstellung des NMDA-Rezeptors, modifiziert nach Cull-Candy & Leszkiewicz 2004.....	7
Abbildung 1-5: Immunhistochemischer Nachweis von Antikörpern gegen NR1-NR2B-Heteromere des NMDA-Rezeptors (Dalmau et al. 2008) .....	11
Abbildung 2-1: Schemazeichnung eines Rattenschädels, nicht maßstabsgetreu .....	18
Abbildung 2-2: Schemazeichnung der Tieroperation .....	19
Abbildung 2-3: Sagittalschnitt eines Rattenhirns zur Darstellung des Einstichkanals .....	20
Abbildung 2-4: Schemazeichnung des Messplatzes, modifiziert nach Rohde 2009.....	22
Abbildung 2-5: Schemazeichnung des Hippocampus mit Platzierung der Elektroden.....	25
Abbildung 2-6: Zellsuche im Zeitraffer .....	26
Abbildung 2-7: Messung von Membraneigenschaften .....	28
Abbildung 2-8: Beispiel für EPSP .....	29
Abbildung 2-9: Beispiel einer Strom-Spannungs-Kennlinie .....	31
Abbildung 2-10: Beispiel der Unterschiede beim Doppelpulsverhältnis.....	32
Abbildung 2-11: Beispiel der EPSP-Auswertung .....	33
Abbildung 3-1: Daten zu den verwendeten Tieren der Versuchsreihe I .....	35
Abbildung 3-2: Zeitraum zwischen Tieroperation und Versuchstag der Versuchsreihe II.....	36
Abbildung 3-3: Gewichtsverteilung der verwendeten Tieren der Versuchsreihe II .....	37
Abbildung 3-4: Repräsentative Messspuren der Versuchsreihe I .....	38
Abbildung 3-5: Synopsis der passiven Membraneigenschaften der Versuchsreihe I.....	39
Abbildung 3-6: Repräsentative Messspuren der Versuchsreihe II.....	41
Abbildung 3-7: Strom-Spannungs-Kennlinien der Versuchsreihe II.....	42
Abbildung 3-8: RMP und Membranzeitkonstante der Versuchsreihe II.....	43
Abbildung 3-9: Repräsentative Messspuren der Versuchsreihe I .....	44

Abbildung 3-10: Entladungsverhalten der Versuchsreihe I .....	45
Abbildung 3-11: Repräsentative Messspuren der Versuchsreihe II.....	46
Abbildung 3-12: Entladungsverhalten der Versuchsreihe II.....	47
Abbildung 3-13: Doppelpulsverhältnis der Versuchsreihe I.....	49
Abbildung 3-14: Repräsentative Messspuren der Versuchsreihe I .....	50
Abbildung 3-15: Input-Output-Kurven der Versuchsreihe I.....	51
Abbildung 3-16: Repräsentative Messspuren der Versuchsreihe II.....	53
Abbildung 3-17: Input-Output-Kurven der Versuchsreihe II .....	54
Abbildung 3-18: Repräsentative Messspuren zur Darstellung der Überschwelligkeit (Versuchsreihe I).....	56
Abbildung 3-19: Repräsentative Messspuren zur Darstellung der Überschwelligkeit (Versuchsreihe II).....	57
Abbildung 3-20: Vergleich der Überschwelligkeit der Versuchsreihe II.....	58

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Lieferquellen Chemikalien und Pharmaka.....	13
Tab. 2: Lieferquellen kommerzieller injizierter Substanzen.....	13
Tab. 3: Lieferquellen Liquores.....	14
Tab. 4: Lieferquellen Mehr- und Einwegmaterial.....	14
Tab. 5: Lieferquellen Geräte.....	15
Tab. 6: Passive elektrotonische und aktive Membraneigenschaften.....	27
Tab. 7: Definition der Versuchsreihen.....	30
Tab. 8: Übersicht der Gründe für den Ausschluss von Zellen.....	34
Tab. 9: Protokolle des Pipettenziehgerätes (P-97).....	75
Tab. 10: Protokolle zur Bestimmung der Membraneigenschaften.....	75
Tab. 11: Protokoll der Input-Output-Kurven.....	76



## Abkürzungsverzeichnis

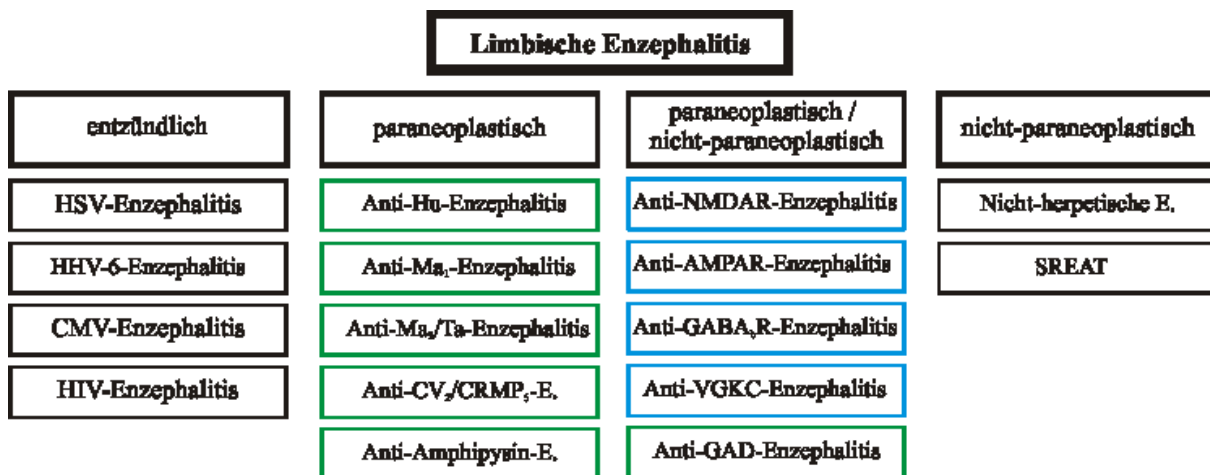
ABD	Agonisten-Bindungsstelle
ACSF	artificial cerebrospinal fluid
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AMPAR	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid – Rezeptor
CA	Cornu ammonis (Ammonshorn)
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CH <sub>3</sub> COOK	Kaliumacetat
CMV	Zytomegalievirus
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRMP	collapsin response mediator protein
DG	Gyrus dentatus
EEG	Elektroenzephalographie
engl.	Englisch
EPSC	excitatory postsynaptic current
EPSP	excitatory postsynaptic potential
GABA	gamma-Aminobutyric acid
GABA <sub>b</sub> R	gamma-Aminobutyric acid – Rezeptor
GAD	Glutamatdecarboxylase
Gr.	Größe
HCl	Chlorwasserstoff, in Wasser Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HHV	humanes Herpes – Virus 6
HIV	humanes Immundefizienz – Virus
HSV	Herpes-simplex – Virus
i.p.	intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KS-Test	Kolmogorow-Smirnow-Test
LTD	long-term depression
LTP	long-term potentiation

mf	Moosfasern
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NMDA	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -Aspartat
NMDAR	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -Aspartat – Rezeptor
NMDAR-ab	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -Aspartat-Rezeptor-antibody
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
Pat.	Patient
pp	Tractus perforans
PPR	paired-puls ratio
R <sub>in</sub>	Membranwiderstand
RMP	Ruhemembranpotenzial
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes
sc	Schaffer-Kollateralen
SD	Standardabweichung
SERAT	steroid-responsive Enzephalopathie mit assoziierter Autoimmunthyreoiditis
StSpSp	Strom-Spannungs-Sprünge
Tab.	Tabelle
TBS	Theta-burst Stimulation
TTX	Tetrodotoxin
VGKC	voltage gated potassium channel

# 1 Einleitung – Die limbische Enzephalitis

Der Begriff „limbische Enzephalitis“ wurde zum ersten Mal 1968 von der Arbeitsgruppe Corsellis *et al.* im Zusammenhang mit einem akuten oder subakuten Beginn von Gedächtnisstörungen, psychiatrischen Symptomen und Krampfanfällen geprägt (Corsellis, Goldberg & Norton 1968). Die Gruppe untersuchte seinerzeit drei eigene Fälle sowie acht weitere, bereits bekannte Fälle. Wiederholt zeigte sich eine Assoziation der Symptome mit einer karzinomatösen Erkrankung. Im Rahmen der Autopsie fanden sich dann sowohl entzündliche als auch degenerative Veränderungen im Bereich der „limbischen grauen Substanz“. Daraufhin knüpften Corsellis und Kollegen erstmals eine Verbindung zwischen einer karzinomatösen Systemerkrankung und der limbischen Enzephalitis (Tüzün & Dalmau 2007). Die Erstbeschreibung einer Involvierung der „limbischen Lappen“ (Uncus, Amygdala, Hippocampus, Inselrinde, Gyrus cinguli) bei einer Enzephalitis und somit der limbischen Enzephalitis ist jedoch Brierley *et al.* acht Jahre vorher zuzuschreiben (Brierley *et al.* 1960).

Obwohl die Erkrankung lange Zeit als sehr selten und nur in Kombination mit Karzinomen auftretend angesehen wurde (Bakheit, Kennedy & Behan 1990), ist mittlerweile mit Blick in die Literatur offensichtlich, dass es sowohl viele verschiedene Ursachen (Graus & Saiz 2008; Graus, Saiz & Dalmau 2010), u. a. auch nicht-paraneoplastische Formen (Bien *et al.* 2000; Vincent *et al.* 2004), wie auch höhere Fallzahlen (Gultekin *et al.* 2000) gibt. Abbildung 1-1 stellt diese Vielfalt zusammenfassend dar.



**Abbildung 1-1: Übersicht über einige Formen der limbischen Enzephalitis, nach Grisold *et al.* 2011 und Pedrosa *et al.* 2012**

Bei den blau hervorgehobenen Formen richten sich die Antikörper gegen Oberflächenproteine der Zellen, bei den grün hervorgehobenen gegen intrazelluläre Strukturen. **Abkürzungen:** HSV – Herpes-simplex-Virus; HHV-6 – humanes Herpes-Virus 6; CMV – Zytomegalie-Virus; HIV – humanes Immundefizienz-Virus; CRMP – collapsin response mediator protein; NMDAR – N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor; AMPAR -  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid – Rezeptor;

GABA<sub>b</sub>R -  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Rezeptor; VGKC – voltage gated potassium channel; GAD – Glutamatdecarboxylase; SREAT – steroid-responsive Enzephalopathie mit assoziierter Autoimmun-Thyreoiditis

In der Literatur häufen sich seit dem Ende der 1990er Jahre Berichte über das Auftreten einer reversiblen paraneoplastischen Form der limbischen Enzephalitis bei jungen Frauen, die mit dem Vorhandensein von ovariellen Teratomen assoziiert zu sein scheint (u. a. Nokura *et al.* 1997; Aydiner, Gürvit & Baral 1998; Taylor *et al.* 1999). Im Jahr 2005 berichten Vitaliani *et al.* über vier Patientinnen, die an eben dieser Form der reversiblen limbischen Enzephalitis in Kombination mit ovariellen Teratomen erkrankt sind (Vitaliani *et al.* 2005). Die Arbeitsgruppe postuliert, dass es sich bei der Erkrankung um eine immunogen-vermittelte Störung handelt, deren Antikörper mit den üblichen Testmethoden nicht nachgewiesen werden können. Gestützt wird diese Vermutung durch den Umstand, dass sich eine Form der limbischen Enzephalitis, die unter Therapie einen günstigen Verlauf zeigt, durch Antikörper gegen das Neuropil des Hippocampus bzw. Kleinhirns identifizieren lässt (Ances *et al.* 2005) und nicht, wie bisher bei paraneoplastischen Syndromen bekannt, durch Antikörper gegen den Nucleus bzw. gegen das Zytosol (u. a. Honnorat *et al.* 1996; Alamowitch *et al.* 1997; Dalmau *et al.* 2004; Darnell & Posner 2005). Es sei allerdings angemerkt, dass zu diesem Zeitpunkt im Rahmen der limbischen Enzephalitis bereits Antikörper gegen einige Zellmembranproteine bekannt waren (siehe Abbildung 1-1), wie z. B. Antikörper gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle (Anti-VGKC-Antikörper). Diese stehen aber seltener im Zusammenhang mit Neoplasien und sprechen – im Gegensatz zu oben erwähnten paraneoplastischen Syndromen – gut auf eine immunsuppressive Therapie an (u. a. Hart *et al.* 1997; Pozo-Rosich *et al.* 2003; Vincent *et al.* 2004).

Schlussendlich identifizierten Dalmau *et al.* im Jahr 2007 das bis dahin noch unbekanntes Antigen für den o. g. Antikörper als den *N*-Methyl-*D*-Aspartat-Rezeptor (NMDAR) und berichten erstmals über eine paraneoplastische Anti-*N*-Methyl-*D*-Aspartat-Rezeptor-Enzephalitis (Anti-NMDAR-Enzephalitis), die eine Assoziation mit ovariellen Teratomen zeigt (Dalmau *et al.* 2007). Daher liegt die Motivation für die vorliegende Arbeit in der gezielten elektrophysiologischen Untersuchung der pathophysiologischen Relevanz des humanen Anti-NMDAR-Antikörpers.

## 1.1 Die Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis

Die Inzidenz der Erkrankung lässt sich zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht beziffern. Im Jahr 2011 waren der Arbeitsgruppe (Dalmau *et al.* 2011) 400 Fälle aus den letzten drei Jahren bekannt. Eine multizentrische, prospektive Studie zur Ursache einer Enzephalitis in England zeigte, dass die Häufigkeit einer Anti-NMDAR-Enzephalitis bei 4% lag, zweithäufigste Ursache von immun-vermittelten Enzephalitiden nach einer akuten disseminierten Enzephalomyelitis (Granerod *et al.* 2010) – siehe auch Gable *et al.* 2012 für die Daten des kalifornischen Enzephalitisprojektes hinsichtlich der Häufigkeit. Eine Prädisposition scheint bei jungen Menschen bis ca. 35 Jahre zu bestehen (Dalmau *et al.* 2011). Zusätzlich konnte mit ca. 80% ein deutliches Überwiegen des weiblichen Geschlechtes dokumentiert werden.

Eine Tumorassoziation ist wahrscheinlicher je älter die Patienten sind, bei jungen Patienten überwiegt hingegen eine nicht-paraneoplastische Form (Dalmau *et al.* 2011). Die Verknüpfung mit einem ovariellen Teratom ist häufig, nur 2% der Patienten wiesen einen anderen Tumor auf. Dabei zeigte die Untersuchung der ovariellen Teratome von 25 Patienten in allen Fällen die Expression von NMDA-Rezeptoren in der Tumormasse (Tüzün *et al.* 2009).

Im Liquor cerebrospinalis finden sich initial bei 80% der Patienten Veränderungen (z. B. Lymphozytose, erhöhte Proteinkonzentration); im Verlauf zeigen fast alle Patienten diese Abweichungen (Dalmau *et al.* 2008). 60% der Patienten entwickeln oligoklonale Banden (Dalmau *et al.* 2008). Eine intrathekale Synthese der Anti-NMDAR-Antikörper und damit hohe Konzentrationen sind häufig. (Dalmau *et al.* 2008, 2011; Irani *et al.* 2010).

Die Therapie der Anti-NMDAR-Enzephalitis besteht neben der Entfernung des Tumors in einer Immunsuppression, die je nach Schwere mit einer Plasmapherese und/oder der Gabe von Immunglobulinen kombiniert wird (Florance-Ryan & Dalmau 2010).

Die Prognose der Erkrankung ist gut. Drei Viertel der Patienten erfahren eine *Restitutio ad integrum* oder behalten milde Folgeerscheinungen (Dalmau *et al.* 2008). Beim restlichen Viertel verbleiben entweder schwere neurologische Residualzustände oder es kommt zum Tod. Rezidive kommen bei 20 bis 25% der Patienten vor und können noch nach Monaten oder Jahren auftreten (Dalmau *et al.* 2008, 2011; Florance-Ryan & Dalmau 2010; Irani *et al.* 2010).

### 1.1.1 Die Symptomatik des Krankheitsbildes

Die Krankheit verläuft in mehreren Phasen, beginnend bei etwa 70% der Patienten mit prodromalen Symptomen, wie z. B. Kopfschmerzen, Fieber, Übelkeit, Erbrechen bzw. unspezifischen Virus-ähnlichen Symptomen (Dalmau *et al.* 2011). Innerhalb weniger Tage – meist weniger als 2 Wochen – entwickeln sich erste psychiatrische Symptome, wie z. B. Angst, Schlaflosigkeit, Wahnvorstellungen, Manie und Paranoia (siehe auch Abbildung 1-2), weshalb die Patienten meist zunächst einem Psychiater vorgestellt werden. 77 von 100 Patienten wurden beim ersten fachärztlichen Kontakt einem Psychiater und nur 23 einem Neurologen vorgestellt (Dalmau *et al.* 2008).



Abbildung 1-2: Auswirkungen einer pharmakologischen NMDAR-Blockade bzw. einer genetischen Reduktion, modifiziert nach Florance-Ryan & Dalmau 2010

Dieses Schema beruht auf Daten aus experimentellen Modellen, bei denen die Zahl der NMDA-Rezeptoren entweder pharmakologisch oder genetisch reduziert wurde. Der blaue Pfad zeigt die potenziellen Auswirkung auf das dopaminerge, noradrenerge und cholinerge System. Den vermuteten

Zusammenhang mit den Beschwerden im respiratorischen System stellt der grüne Weg dar. Der orangene Weg beleuchtet die Bewegungsstörungen und die psychischen Symptome. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt im roten Weg und den Auswirkungen der möglichen Blockierung auf den Hippocampus. Das Resultat wären u. a. Störungen des Gedächtnisses.

Ein weiteres häufiges Symptom ist eine Störung des Kurzzeitgedächtnisses (Dalmau *et al.* 2007). Die Häufigkeit scheint jedoch unterschätzt zu werden, da dieses Symptom durch die psychiatrischen Symptome bzw. durch auftretende Sprachprobleme bis hin zum Mutismus öfters überdeckt wird (Dalmau *et al.* 2008, 2011). Im weiteren Krankheitsverlauf zeigen sich Bewegungsstörungen sowie Dystonien mit erhöhtem Muskeltonus. Begleitet werden diese Erscheinungen von einer autonomen Instabilität, die z. B. durch Hypoventilation, Tachy- und/oder Bradykardie gekennzeichnet ist (Dalmau *et al.* 2007, 2008; Iizuka *et al.* 2008; Florance *et al.* 2009).

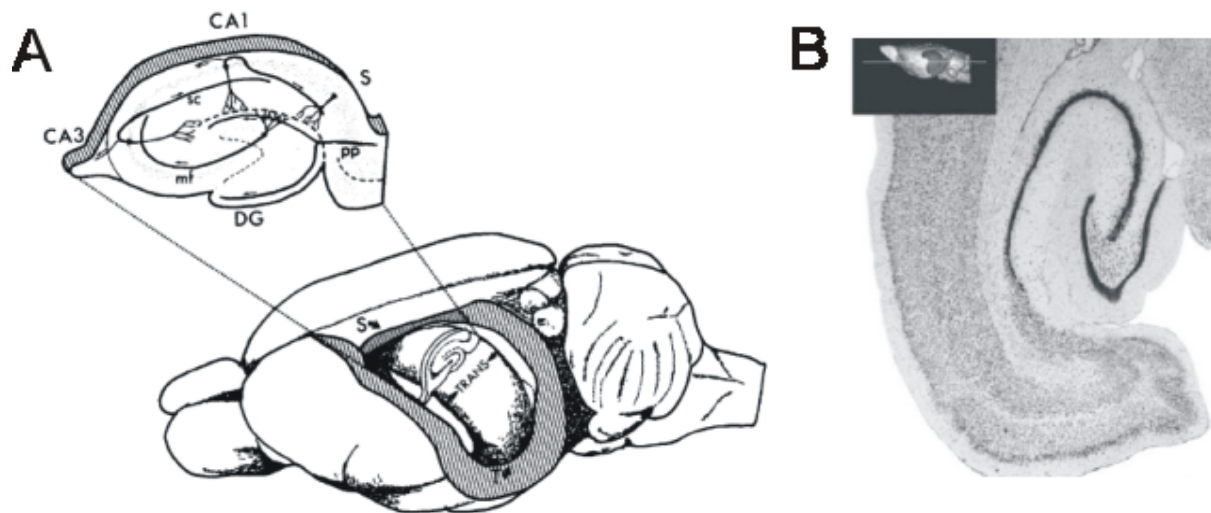
Während aller Abschnitte der Erkrankung kann es zu fokalen bzw. generalisierten Krampfanfällen kommen. Meist sind diese jedoch ein frühes Symptom. Ein Krankheitsbeginn mit einem komplex-fokalen Status epilepticus (Bayreuther *et al.* 2009), mit einem anhaltenden, nicht-convulsiven Status epilepticus (Johnson *et al.* 2010) sowie mit einer Epilepsia partialis continua (Dalmau *et al.* 2007) sind in der o. g. Literatur beschrieben.

Die unterschiedlichen Krankheitsphasen lassen sich abschließend folgendermaßen zusammenfassen: Prodromalsymptome, psychotische Phase, Phase der Teilnahmslosigkeit mit Hypoventilation, Phase der autonomen Instabilität und der Dyskinesien und mögliche Genesung oder Tod (Dalmau *et al.* 2007).

## **1.2 Grundlagen von Lernprozessen und Gedächtnis**

### **1.2.1 Der Hippocampus**

Der Hippocampus ist eine paarige Struktur am Boden des Unterhorns des Seitenventrikels, der die mediale Randzone des Temporallappens bildet. Zytoarchitektonisch lassen sich zwei C-förmige Strukturen, der Gyrus dentatus (DG), der als kleinerer Schenkel das Cornu ammonis (CA) halb umschließt, voneinander abgrenzen (siehe Abbildung 1-3 und Abbildung 2-5). Das Cornu ammonis wiederum kann aufgrund der verschiedenen Zelldifferenzierungen und -funktionen in vier Bereiche, die Sektoren CA1 bis CA4, unterteilt werden (Lopes da Silva *et al.* 1990). An den CA1-Sektor schließt sich das Subiculum an.



### Abbildung 1-3: Hippocampus der Ratte

**A** Die Schemazeichnung zeigt neben der Lage des Hippocampus im Rattenhirn auch einen Querschnitt mit den wichtigsten Strukturen. (Amaral & Witter 1989) **B** Horizontaler Schnitt mit MRT-Rekonstruktion des Rattenhirns. Die Schnittebene ist eingezeichnet. Dicke 250  $\mu\text{m}$  (Amaral, Scharfman & Lavenex 2007) **Abkürzungen:** DG – Gyrus dentatus; CA – Cornu ammonis; mf – Moosfasern; pp – Tractus perforans; sc – Schaffer-Kollateralen

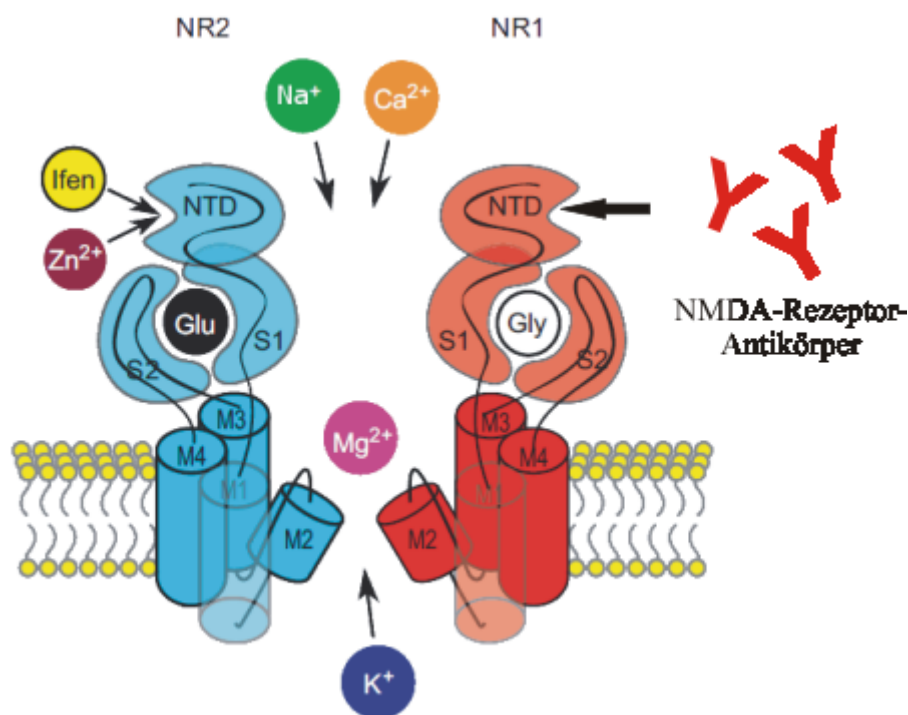
Im Gyrus dentatus findet sich histologisch eine phylogenetisch begründete Dreischichtung, wobei die Körnerzellen dicht gepackt in der mittleren Schicht, dem Stratum granulare, liegen (Amaral, Scharfman & Lavenex 2007). Die apikalen Dendriten durchziehen das in eine innere und äußere Schicht geteilte Stratum moleculare (Blackstad 1956). Die Axone ziehen als Moosfasern durch das Hilum, eine polymorphe Schicht. Der Aufbau des Cornu ammonis ähnelt dem o. g. in den Grundzügen. Hier befinden sich jedoch in einem Stratum pyramidale große Pyramidenzellen, die die überwiegenden Zellen im Hippocampus bilden.

Der Tractus perforans, der in einen medialen und einen lateralen Schenkel unterteilt werden kann und seinen Ursprung im entorhinalen Kortex nimmt, ist eine der wichtigsten afferenten Bahnen des Hippocampus und endet als erste synaptische Verbindung im trisynaptischen Schaltkreis an den Körnerzellen des DG (Amaral & Witter 1989). Zusätzlich verläuft der Fasertrakt direkt zu den Pyramidenzellen des CA3-Sektors. Auf diese Zellen projiziert auch das Moosfasersystem als zweite synaptische Verbindung des o. g. Schaltkreises. Die sog. Schaffer-Kollateralen komplettieren als Projektionsfasern des CA3- zum CA1-Sektor die trisynaptische Schleife. Die Efferenzen der Pyramidenzellen des CA1-Sektors gelangen über das Subiculum zurück zum entorhinalen Kortex. Weitere Kollateralen der Pyramidenzellen münden in den Fornix.



## 1.2.2 Der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor

Der NMDA-Rezeptor gehört zusammen mit dem AMPA- und dem Kainat-Rezeptor zur Gruppe der ionotropen, ligandengesteuerten Glutamaterezeptoren (Dingledine *et al.* 1999). Klassisch ist eine tetramere Konfiguration bestehend aus zwei NR1- und zwei NR2-Untereinheiten, wobei acht Subtypen der NR1- als Splicevarianten eines Gens und vier Subtypen (A bis D) der NR2-Untereinheit bekannt sind. Eine NR3-Untereinheit (Subtypen A und B) ist ebenfalls beschrieben. Extrazellulär sind die N-terminale Domäne sowie die Agonisten-Bindungsstelle (ABD) und zytoplasmatisch die C-terminale Domäne angeordnet (Lau & Zukin 2007), siehe Abbildung 1-4. Die Notwendigkeit der NR1-Untereinheit für die Funktionsfähigkeit des Rezeptors zeigen NR1-Knockout-Mäuse. Die Tiere sind trotz nur minimaler Änderungen in Struktur und Funktion der Neurone nicht lebensfähig (Forrest *et al.* 1994); NR2A-Knockout-Mäuse sind hingegen nicht nur lebensfähig, sondern in ihrer Entwicklung wahrscheinlich nicht beeinträchtigt (Sakimura *et al.* 1995).



**Abbildung 1-4: Vereinfachte Darstellung des NMDA-Rezeptors**, modifiziert nach Cull-Candy & Leszkiewicz 2004

An der N-terminalen extrazellulären Bindungsstelle können an der NR2-Untereinheit je nach Subtyp Zink oder Ifenprodil binden. Die Bindungsstelle für den NMDAR-Antikörper ist an der NR1-Untereinheit eingezeichnet (Idee für die graphische Umsetzung Pedrosa *et al.* 2012). Die S1- und S2-Domänen formen die Bindungsstelle für Glutamat bzw. für Glycin. Die spannungssensitive Blockade beruht auf der Bindungsstelle für Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) innerhalb der Pore. Der Ionenkanal ist durchgängig für Natrium- ( $Na^+$ ), Kalium- ( $K^+$ ) und Kalziumionen ( $Ca^{2+}$ ). Die intrazellulär gelegenen C-terminalen Domänen binden Kinasen sowie Strukturproteine (nicht dargestellt).

Die Besonderheit des Rezeptors liegt sowohl in der Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  als auch in der Art der Aktivierung. Für diese ist die gleichzeitige Bindung von Glutamat (an der NR2-Untereinheit ABD) und von Glycin bzw. D-Serin (an der NR1- oder NR3-Untereinheit ABD) notwendig (Furukawa *et al.* 2005; Yao & Mayer 2006). Zusätzlich reduziert eine in der Pore integrierte extrazelluläre spannungssensitive  $\text{Mg}^{2+}$ -Blockade die Offenwahrscheinlichkeit, falls es nicht durch andere Ionenkanäle (meist AMPA- und Kainat-Rezeptoren) zu einer Vordepolarisation der Zelle kommt. Durch diesen Mechanismus ist der Rezeptor ein molekularer Fühler, der einen Ionenfluss – und damit einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx – nur zulässt, wenn die Erregung der Prä- und der Postsynapse zusammenfällt (Cull-Candy & Leszkiewicz 2004). Der NMDA-Rezeptor kommt ubiquitär im gesamten zentralen Nervensystem vor, wobei es eine Reihe von unterschiedlichen Isoformen gibt (Cull-Candy, Brickley & Farrant 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es Erfahrungs-abhängig zu einer Änderung der Zusammensetzung der Untereinheiten kommen kann (Philpot *et al.* 2001). Nichtsdestotrotz ist die Konfiguration mit NR2A- und NR2B-Untereinheiten im Hippocampus in der Überzahl (Köhr 2006).

Besonders anzumerken ist jedoch auch das zellschädigende Potenzial des Rezeptors. Durch repetitive Aktivierung kann es durch den vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu einem Vorgang kommen, der von Olney als Exzitotoxizität beschrieben wurde (Olney 1978). Dies kann letztlich über intrazelluläre Signalkaskaden zu neuronalen Schäden bis hin zum neuronalen Zelltod führen (Lipton & Rosenberg 1994).

### **1.2.3 Lernen und Gedächtnis – Rolle von Hippocampus und NMDA-Rezeptor**

Die Funktionen Lernen und Gedächtnis sind für uns Menschen von größter Bedeutung, denn deren Einschränkung bringt einen deutlichen Verlust an Lebensqualität mit sich. Teil des System zur Aufrechterhaltung dieser komplexen Funktionen ist der Hippocampus. Dieser und weitere subkortikale und kortikale Hirnstrukturen sind wiederum Teil des limbischen Systems, ein Begriff der erstmals von MacLean für ein System, das neben Lern- und Gedächtnisfunktionen u. a. auch für Aufmerksamkeit, Arterhaltung und emotionales Verhalten wesentlich ist, verwendet wurde (Roxo *et al.* 2011).

Der Beitrag des Hippocampus zur Konsolidierung von Gedächtnisinhalten wurde bereits von Bechterew 1900 durch die Knüpfung einer Verbindung zwischen einer Schädigung des medialen Temporallappens und einer Störung des Gedächtnisses postuliert (Bechterew 1900). Ein wichtiges Beispiel für eben diese Verknüpfung ist der Patient H. M., der sich im Rahmen einer Epilepsieerkrankung einer beidseitigen Entfernung eines 8 cm großen Teils seiner

medialen Temporallappen (große Teile der Hippocampusformation) unterzog (Scoville 1954). In der Folge präsentierte er eine dauerhafte anterograde Amnesie (Scoville & Milner 1957). Zusätzlich zeigte sich eine Störung seines Orientierungsvermögens und eine milde retrograde Amnesie. Die Funktion seines Kurzzeitgedächtnisses sowie seine Auffassungsgabe und sein logisches Denkvermögen waren jedoch intakt.

Der Verdacht der ursächlichen Beteiligung des Hippocampus konnte schließlich durch neurophysiologische und neuropathologische Untersuchungen an dem Patienten R. B. bestätigt werden (Zola-Morgan, Squire & Amaral 1986). Bei ihm kam es durch eine vorübergehende Ischämie zu einer umschriebenen, bilateralen Schädigung des gesamten CA1-Sektors. Er litt seither unter den gleichen Symptomen wie H. M. und zeigte auch keine weiteren kognitiven Einschränkungen. Der Defekt wurde *post mortem* histologisch gesichert.

Eine Erklärung für die Störung des Orientierungsvermögens des Patienten H. M. lieferten bereits 1982 Morris *et al.* durch Verhaltensexperimenten an Ratten, die die Beteiligung des Hippocampus für das räumliche Lernen offenbarten (Morris *et al.* 1982, siehe auch 1984).

Der NMDA-Rezeptor spielt im Rahmen der synaptischen Plastizität ebenfalls eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen. Der Begriff synaptische Plastizität beschreibt hierbei die aktivitätsabhängige Änderung neuronaler Netzwerke und ihrer synaptischen Verbindungen, wie sie erstmals 1949 von Hebb postuliert wurde (Hebb 1949). Die Veränderungen können u. a. sowohl kurzfristig (= Kurzzeitplastizität) als auch langfristig (=Langzeitplastizität) sein.

Am Beispiel der Langzeitplastizität soll verdeutlicht werden, dass es sowohl eine Verstärkung wie auch eine Minderung der synaptischen Transmission geben kann. Bei der sog. Langzeitpotenzierung (LTP, engl. long-term potentiation) handelt es sich um eine andauernde Verstärkung von synaptischer Aktivität nach zufälliger gleichzeitiger Aktivierung einer prä- und postsynaptischen Zelle in häufiger Folge. Dieser Prozess konnte erstmals 1973 durch Hochfrequenzstimulation im Gyrus dentatus gezeigt werden (Bliss & Lomo 1973). Eine NMDA-Rezeptor abhängige LTP, bei der der Influx von  $Ca^{2+}$  (Lynch *et al.* 1983) und u. a. die nachfolgende Kalzium-gesteuerte Aktivierung von Signalkaskaden wichtig ist (Lisman 1989), wurde 1983 an der Schaffer-Kollateralen-CA1-Synapse beschrieben (Collingridge, Kehl & McLennan 1983). Die Langzeitpotenzierung gilt inzwischen als biologisches Lern- und Gedächtnismodell (Bliss & Collingridge 1993).

Grundlage für die LTP ist u. a. eine phosphorylierungs-abhängige Modifikation der Leitfähigkeit (Lee *et al.* 2003) sowie eine Erhöhung der Zahl der AMPA-Rezeptoren in der Synapsenmembran (Bredt & Nicoll 2003). Mittlerweile ist auch bekannt, dass der NMDAR-

abhängige exzitatorische postsynaptische Strom (EPSC, engl. excitatory postsynaptic current) im Rahmen einer LTP-Expression ebenfalls unter bestimmten Bedingungen zunehmen kann (O'Connor, Rowan & Anwyl 1994, 1995).

Ein entgegengesetzter Prozess ist die Langzeitdepression (LTD, engl. long-term depression), die zu einer Abnahme der synaptischen Aktivität bei längerer niederfrequenter Reizung führen kann (Dunwiddie & Lynch 1978) und somit einen hemmenden Effekt vermitteln soll. Diese konnte ebenfalls isoliert für NMDAR-EPSCs gezeigt werden (Selig *et al.* 1995).

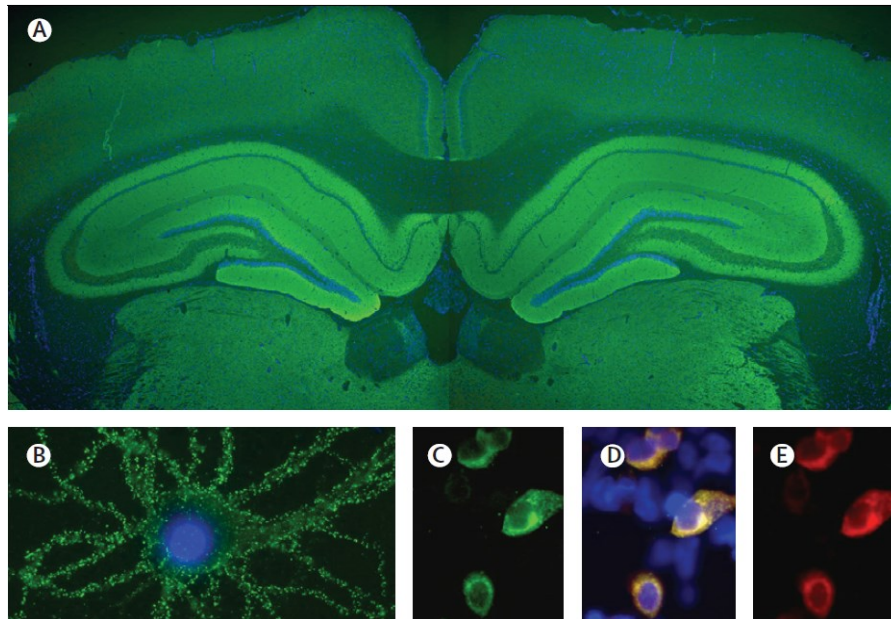
Inzwischen ist klar, dass nicht nur die Art der Stimulation – sei es hoch- oder niederfrequent – für die Differenzierung zwischen der Ausbildung einer LTP bzw. einer LTD entscheidend ist, sondern auch die intrazelluläre Konzentration an Kalziumionen (Harney, Rowan & Anwyl 2006).

Erwähnenswert in diesem Kontext ist neben der Möglichkeit der Erfahrungs-abhängigen Modifikation der Untereinheiten (siehe Kap. 1.2.2) auch die Diskussion über die Beteiligung des Rezeptors an neurodegenerativen (z. B. Morbus Alzheimer) bzw. psychiatrischen Krankheitsbildern (z. B. Schizophrenie), siehe hierzu zur weiteren Vertiefung Lau & Zukin 2007.

### **1.3 Stand der Forschung**

Abschließend folgt eine kurze Darstellung der für diese Arbeit relevanten Forschungsentwicklungen.

Der Antikörper gegen den NMDA-Rezeptor, der sich im Liquor der Patienten nachweisen lässt, ist ein Immunglobulin G (IgG) der Subklasse G1, sehr selten auch der Subklassen IgG2 und IgG3 (Tüzün *et al.* 2009). Die höchsten Konzentrationen konnten im Hippocampus und im basalen Vorderhirn ermittelt werden. Die Bindungsstelle ist die N-terminale extrazelluläre Schleife der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors (Dalmau *et al.* 2008), siehe hierzu Abbildung 1-4. Abbildung 1-5 zeigt den immunhistochemischen Nachweis von Antikörpern gegen NR1-NR2-Heteromere des NMDA-Rezeptors (Dalmau *et al.* 2008). Auch in dieser Darstellung ist die hohe Anreicherung des Patienten-Liquors im Bereich des Hippocampus zu erkennen (Teilabbildung A). In Teilabbildung D ist die Kollokalisierung des Patienten-Liquors mit einem kommerziellen monoklonalen Antikörper gegen die NR1-Untereinheit sichtbar.



**Abbildung 1-5: Immunhistochemischer Nachweis von Antikörpern gegen NR1-NR2B-Heteromere des NMDA-Rezeptors** (Dalmau et al. 2008)

**A** Frontalschnitt eines Rattenhirns immungefärbt mit dem Liquor eines Anti-NMDAR-Enzephalitis-Patienten (25-fache Vergrößerung) **B** Die Kultur lebender Hippocampusneurone, inkubiert mit demselben Liquor, zeigt eine deutliche Immunmarkierung (800-fach Vergrößerung mit Öl-Linse) **C-E** doppelte Immunfärbung von HEK293-Zellen mit transfizierten NR1- und NR2B-Untereinheiten mit demselben Liquor (**C**, grüne Markierung), mit einem Antikörper gegen die NR1-Untereinheit (**E**, rote Markierung) und in Kombination (**D**, hohe Kolokalisation der Reaktivität, daher die gelbe Färbung) (400-fache Vergrößerung)

Neuere Untersuchungen deuten daraufhin, dass die Patientenantikörper Titer-abhängig die Zahl der oberflächlichen NMDA-Rezeptoren reversibel *in vitro* und *in vivo* reduzieren, die Zahl der Synapsen und die synaptischen Komponenten aber unbeeinflusst bleiben (Hughes *et al.* 2010). Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass Zellen, die aus Kulturen hippocampaler Neurone stammen, nach einer kurzzeitigen Behandlung mit Patienten-Liquor einen signifikanten Abfall des NMDAR-vermittelten EPSCs aufweisen. Mechanistisch scheint die Bindung des Fab-Fragmentes des Patientenantikörpers an den NMDA-Rezeptor, eine anschließende Vernetzung und schließlich die Internalisierung des Rezeptors durch Endozytose für die o. g. Prozesse verantwortlich zu sein.

Aktuell konnte außerdem gezeigt werden, dass die LTP gemessen an hippocampalen Schnitten der Maus, die mit Liquor von Patienten mit Anti-NMDAR-Enzephalitis umspült wurden, signifikant gemindert ist (Zhang *et al.* 2012). Dieser Befund deutet an, dass Patientenantikörper gegen den NMDA-Rezeptor einen akuten inhibierenden Effekt auf den NMDA-Rezeptor auslösen können. Allerdings ist bisher noch nicht bekannt, ob Anti-NMDAR-Antikörper auch *in vivo* pathophysiologisch relevant sind.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Durch den aktuellen Stand der Forschung besteht die Vermutung, dass der bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis vorkommende Autoantikörper einen Einfluss auf die Funktion des NMDA-Rezeptors hat. Alle bisher gewonnenen Erkenntnisse stammen jedoch aus *in vitro*-Versuchen, sodass ein direkter Einfluss *in vivo* aktuell noch nicht nachgewiesen werden konnte. Daher sind folgende Fragen derzeit unbeantwortet:

- Hat der Autoantikörper einen pathophysiologisch relevanten Einfluss auf die Funktionalität des NMDA-Rezeptors *in vivo*?
- Wenn ja, welcher Mechanismus liegt diesem Einfluss zugrunde?

In der vorliegenden Arbeit soll die erste Fragestellung anhand der Analyse von ausgewählten elektrophysiologischen Eigenschaften des NMDA-Rezeptors der Körnerzelle des Gyrus dentatus des Hippocampus der Ratte untersucht werden. Im Anschluss kann möglicherweise für die zweite Fragestellung anhand der Ergebnisse sowie im Kontext bereits bekannter wissenschaftlicher Erkenntnisse zumindest eine Hypothese aufgestellt werden.

Im Einzelnen erfolgt die Bearbeitung anhand von folgenden Schritten:

1. Mitentwicklung eines leistungsfähigen Tiermodells der Anti-NMDAR-Enzephalitis (in Zusammenarbeit mit unter anderem T. Kirschstein, T. Tokay und M. Kersten, Oscar Langendorff Institut für Physiologie).
2. Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften des NMDA-Rezeptors bei stereotaktischer *in vivo* Injektion eines kommerziellen NR1-Antikörpers.
3. Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften des NMDA-Rezeptors bei stereotaktischer *in vivo* Injektion von Liquor eines Patienten mit nachgewiesener Anti-NMDAR-Enzephalitis.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Pharmaka

**Tab. 1: Lieferquellen Chemikalien und Pharmaka**

Produkt	Hersteller
CaCl <sub>2</sub> , C5080	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Carbogen	Linde, Wiesbaden, Deutschland
CNQX disodium salt, 50mg	Tocris, Bristol, England
D-(+)-Glucose, G7528	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Diethylether, 8254	Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
Feuerzeuggas	A.I.&E., Eindhoven, Niederlande
HCl, rauchend 37%, 100317	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl, P9333	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ketanest <sup>®</sup> S 25mg/ml, Injektionslösung	Pfizer, Berlin, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> , M8266	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
NaCl, S7653	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> S8282	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub> , 71627	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
NaOH, 1 M, 1091371000	Merck, Darmstadt, Deutschland
Novaminsulfon-ratiopharm <sup>®</sup> , 500mg/ml Tropfen	ratiopharm, Ulm, Deutschland
Rompun <sup>®</sup> 2%	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Saccharose, S7903	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Sauerstoff	Linde, Wiesbaden, Deutschland
SR 95531 hydrobromide (Gabazine), 10mg	Tocris, Bristol, England

#### 2.1.2 Intracerebral injizierte Substanzen

**Tab. 2: Lieferquellen kommerzieller injizierter Substanzen**

Produkt	Hersteller
Anti-NMDAR1, AB9864, Lot-Nr. LV1778013	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Isotone NaCl-Lösung 0,9%, 10ml	Braun, Melsungen, Deutschland

**Tab. 3: Lieferquellen Liquores**

Liquor-Nr.	Erkrankung des Pat.	NMDAR-ab-Titer	zur Verfügung gestellt von
1	Epilepsie bei Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis, weiblich, 22 Jahre	1:64	Prof. Dr. Christian G. Bien, Epilepsie-Zentrum Bethel, Deutschland
2	Epilepsie bei Gangliogliom, weiblich, 16 Jahre	negativ	s.o.
3	posttraumatische Epilepsie, männlich, 41 Jahre	negativ	s.o.

### 2.1.3 Mehr- und Einwegmaterial

**Tab. 4: Lieferquellen Mehr- und Einwegmaterial**

Produkt	Hersteller
Borosilikatröhrchen, GB120F-10	Science Products, Hofheim, Deutschland
Borosilikatröhrchen, GB150F-8	Science Products, Hofheim, Deutschland
Einmal-Feindosierspritze, Omnifix <sup>®</sup> -F 1ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Einmal-Spritze, 50ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Federschere nach <i>Vannas</i> , fein, 8cm	Geuder, Heidelberg, Deutschland
Glasflaschen, 1000ml	Schott, Mainz, Deutschland
Glasflaschen, 2000ml	Schott, Mainz, Deutschland
Infusionssysteme, Intrafix <sup>®</sup> Safeset	Braun, Melsungen, Deutschland
Injektionsspritze, 5µl, P/N: 203189	Hamilton AG, Bonaduz, Schweiz
Linsenreinigungspapier	Kodak, New York, USA
Messkolben, 500ml	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Messkolben, 1000ml	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Messkolben, 2000ml	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Mikropipettennadel, MicroFil MF28G	WPI, Sarasota, USA
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Platindraht, 0,05mm	WPI, Sarasota, USA
Polyester-S-Faden, geflochten, beschichtet, nicht resorbierbar, Durchmesser: 0,100 – 0,149mm	Catgut, Markneukirchen, Deutschland
Präzisionspipette, No. 5	Dumont & Fils, Montignez, Schweiz
Reagiergefäß, 0,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland



Reagiergefäß, 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß, 2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rundbodengläser	Schott, Mainz, Deutschland
Rundfilter, 55mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sekundenkleber	UHU, Brühl, Deutschland
Silberdraht, 0,005 Zoll	Science Products, Hofheim, Deutschland
Silikonschläuche	VWR international, West Chester, USA
Skalpells, präzisa fix, Figurenangabe 21	P. J. Dahlhausen, Köln, Deutschland
Stahlklingen	Campden Instruments, Campden, England
Sterican <sup>®</sup> Luer-Lock, Einmalkanülen, Gr. 1	Braun, Melsungen, Deutschland
Sterican <sup>®</sup> Luer-Lock, Einmalkanülen, Gr. 12	Braun, Melsungen, Deutschland

## 2.1.4 Geräte

**Tab. 5: Lieferquellen Geräte**

Produkt	Hersteller
Absaugpumpe, ALA-VWK	ALA Scientific Instruments, Framingdale, USA
Analog-Digital-Konverter, Power 1401	CED, Cambridge, England
Aufbewahrungskammer, Eigenbau	IPHYS, Rostock, Deutschland
Bad	Thermo, Karlsruhe, Deutschland
Badthermostat	Thermo, Karlsruhe, Deutschland
Betriebssystem, Windows 2000	Microsoft, Redmond, USA
Faradaykäfig, Eigenbau	IPHYS, Rostock, Deutschland
Frequenzgenerator, Master 8	A.M.P.I., Jerusalem, Israel
Guillotine, small animal decapitator	Stoelting, Wood Dale, USA
Hauptverstärker, SEC-10L	npi electronic, Tamm, Deutschland
Interfacekammer, BSC-HAT	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Kaltlichtquelle, KL 1500 LCD	Schott, Mainz, Deutschland
Kühl- und Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Magnetrührer, RH basic 2	IKA, Staufen, Deutschland
Mikromanipulator, LBM7	Scientifica, Harpenden, England
Narkosekammer, Eigenbau	IPHYS, Rostock, Deutschland
Osmometer, Knauer Osmometer automatic	Knauer GmbH, Berlin, Deutschland
Oszilloskop, TDS 1001	Tektronix, Beaverton, USA
Personalcomputer	Intel Pentium 4
pH-Meter, CG840	Schott, Mainz, Deutschland

Pipette, 10µl bis 100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette, 100µl bis 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenziehgerät, P-97	Sutter Instrument, Novato, USA
Pipettenziehgerät, PIP5	HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland
Pulsstimulator, A365	WPI, Saratota, USA
Rollerpumpe, Minipuls <sup>®</sup> 3	Gilson, Middleton, USA
Software, Signal 2.16	CED, Cambridge, England
Stereomikroskop	Wild Heerbrugg, Gais, Schweiz
Stereotaxieapparatur	Narishige, Tokio, Japan
Temperaturregler, TC-10	npi electronic, Tamm, Deutschland
Tisch, schwingungsgedämpft	TMC, Peabody, USA
Vibrator, Integraslice 7550 MM	Campden Instruments, Campden, England
Waage, 53-534	TMC, Peabody, USA
Waage, MC 1	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

### 2.1.5 Lösungen

Alle Angaben verstehen sich in mmol/l soweit keine anderslautende Einheit genannt wird.

Die ACSF-Stammlösung (engl. artificial cerebrospinal fluid), die sowohl zur Aufbewahrung der Rattenhirnschnitte zwischen Präparation und Experiment als auch – in leicht abgewandelter Form – zur Versorgung während der Experimente benötigt wurde, setzte sich aus 124,5 NaCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 Glucose, 3 KCl, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 1,3 MgCl<sub>2</sub> und 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> zusammen. Die Osmolalität lag zwischen 303 und 336 mosmol/kg H<sub>2</sub>O, wobei der Durchschnittswert 308,5 mosmol/kg H<sub>2</sub>O betrug.

Während der Präparation des Hippocampus wurde eine Saccharose-Lösung verwendet, diese bestand aus 87 NaCl, 75 Saccharose, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 10 Glucose, 7 MgCl<sub>2</sub>, 2,5 KCl, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0,5 CaCl<sub>2</sub>. Die Osmolalität lag zwischen 318 und 353 mosmol/kg H<sub>2</sub>O, wobei der Durchschnittswert 329,8 mosmol/kg H<sub>2</sub>O betrug.

Der pH-Wert aller Lösungen wurde mittels HCl bzw. NaOH auf 7,40 eingestellt.

Zur Durchführung der intrazellulären Messungen wurde eine spezielle Intrazellulärlösung verwendet. Diese enthielt 3 mol/l CH<sub>3</sub>COOK und 0,3 mol/l KCl.

Zur Durchführung der Experimente wurde die ACSF-Stammlösung mit 10 µmol/l CNQX und 3 µmol/l Gabazine versetzt. Zur Herstellung dieser beiden Stammlösungen wurden entsprechende Mengen CNQX und Gabazine in Reinstwasser gelöst (siehe hierzu auch Kap. 2.2.4.3). Bis zur Verwendung lagerten die vorbereiteten Stammlösungen bei -25 °C.

## 2.2 Methoden

Für alle Versuche wurden weibliche Wistar-Ratten (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland) genutzt. Bei der operativen stereotaktischen hippocampalen Injektion waren alle Ratten zwischen 170 und 290g schwer. Vor der Operation erfolgte die Haltung zu maximal zwei Tieren pro Käfig, nach der Operation einzeln. Der Tierstall war zwölf Stunden täglich beleuchtet und verfügte über stabile klimatische Bedingungen. Den Tieren standen Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung.

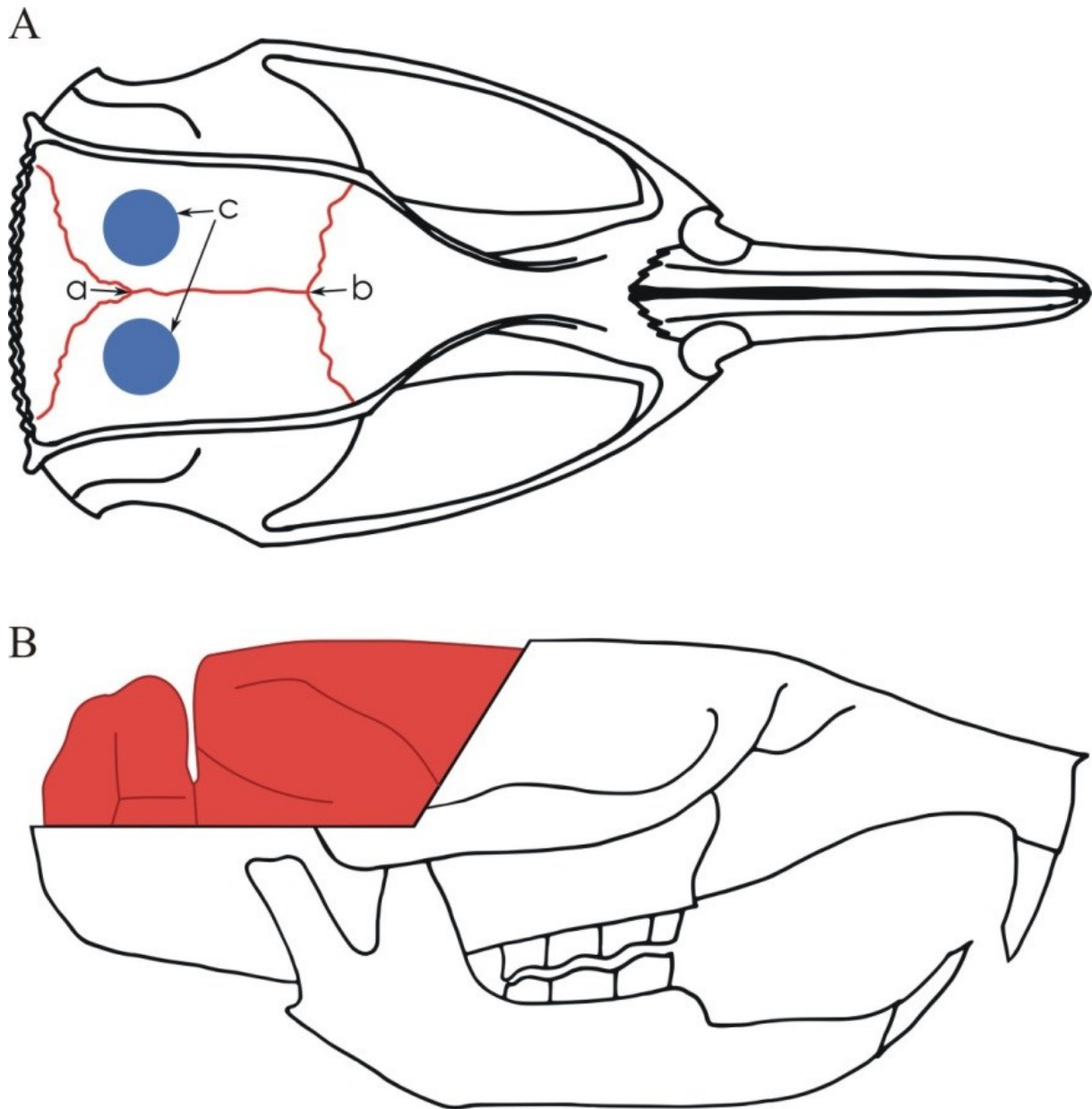
Alle angewandten experimentellen Verfahren entsprachen nationalen und internationalen Richtlinien bzgl. der ethischen Verwendung von Tieren (European Council Directive 86/609/EEC).

### 2.2.1 Operative stereotaktische hippocampale Injektion

Um die Ratten auf die bevorstehenden elektrophysiologischen Messungen vorzubereiten, musste zunächst eine der in Tab. 2 bzw. Tab. 3 aufgeführten Substanzen in den Hippocampus im Bereich des Gyrus dentatus injiziert werden. Das Vorgehen war hierzu immer identisch.

Zunächst wurde das Tier unter Zuhilfenahme von Ketanest<sup>®</sup> S (S-Ketamin) und Rompun<sup>®</sup> (Xylazinum) narkotisiert, analgesiert und relaxiert. Die Dosierung erfolgte hierbei gewichtsadaptiert (S-Ketamin 100mg/kg i.p. und Xylazinum 15mg/kg i.p.). Nach mindestens zwanzig Minuten wurde per Schmerzreiz am Fuß geprüft, ob die gewünschte Narkosetiefe erreicht wurde. Falls nicht, wurde erneut Ketanest<sup>®</sup> S (S-Ketamin) in einer individuellen, situationsangepassten Dosierung verabreicht. Wenn die notwendige Narkosetiefe nach einer entsprechenden Wartezeit noch immer nicht erzielt werden konnte, wurde die Operation abgebrochen und das Tier wachte unter Insufflation von Sauerstoff auf.

Bei Erreichen der gewünschten Narkosetiefe erfolgte eine partielle Rasur des Kopfes mittels eines Elektrorasierers. Anschließend wurde das Tier zur Durchführung der stereotaktischen hippocampalen Injektion auf die Stereotaxievorrichtung gelegt und der Kopf an der Nase sowie an beiden Ohren fixiert, mit dem Ziel Veränderungen der Positionierung des Kopfes durch manuelle Manipulationen zu vermeiden (siehe Abbildung 2-2). Die Augen des Tieres wurden durch Aufträufeln von isotoner NaCl-Lösung vor dem Austrocknen geschützt.

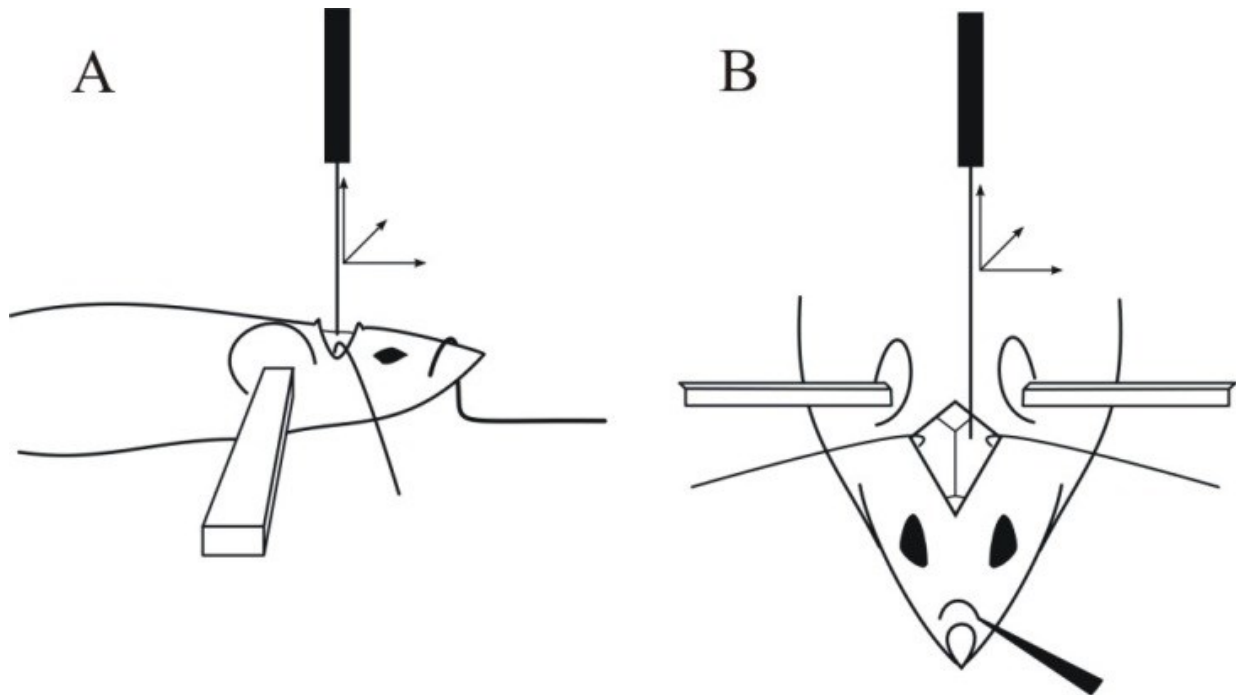


**Abbildung 2-1: Schemazeichnung eines Rattenschädels**, nicht maßstabsgetreu

**A** Ansicht eines Rattenschädels von oben. (a) Lambda, (b) Bregma und (c) Trepanationsstellen. **B** Ansicht eines Rattenschädels von rechts, Schädel ist teilweise gefenstert, sodass ein Teil des Gehirns sichtbar ist.

Im nächsten Schritt erfolgte eine mediane, ca. 1,5 bis 2cm lange Inzision entlang der Hirnlängsfurche (Fissura longitudinalis) mit Beginn kurz kaudal der Augen mittels Skalpell. Nach Entfernung der Knochenhaut (Periost) und Blutstillung wurde der Punkt aufgesucht, an dem die Kranznaht (Sutura coronalis) und die Pfeilnaht (Sutura sagittalis) zusammentreffen. Abbildung 2-1 zeigt diesen als Bregma bezeichneten Punkt. Ausgehend von Bregma wurden unter Einsatz des Koordinatensystems des Stereotaxietisches die beiden Stellen aufgesucht, an denen die Eröffnung des knöchernen Schädels (Kraniotomie) erfolgen sollte (Abbildung 2-1, Teilabbildung A, Punkt c). Beide Stellen wurden dann mittels eines Filzstiftes markiert.

Dieses Vorgehen war möglich, da während einer bestimmten Altersperiode – in diesem Fall über das Gewicht bestimmt – die Zielstruktur bezogen auf alle drei Raumebenen immer gleichweit von Bregma entfernt ist. Im konkreten Fall wurden folgende Koordinaten genutzt: 5,2mm posterior,  $\pm$  4,3mm lateral und 4,8mm Tiefe (im Bezug auf Bregma).

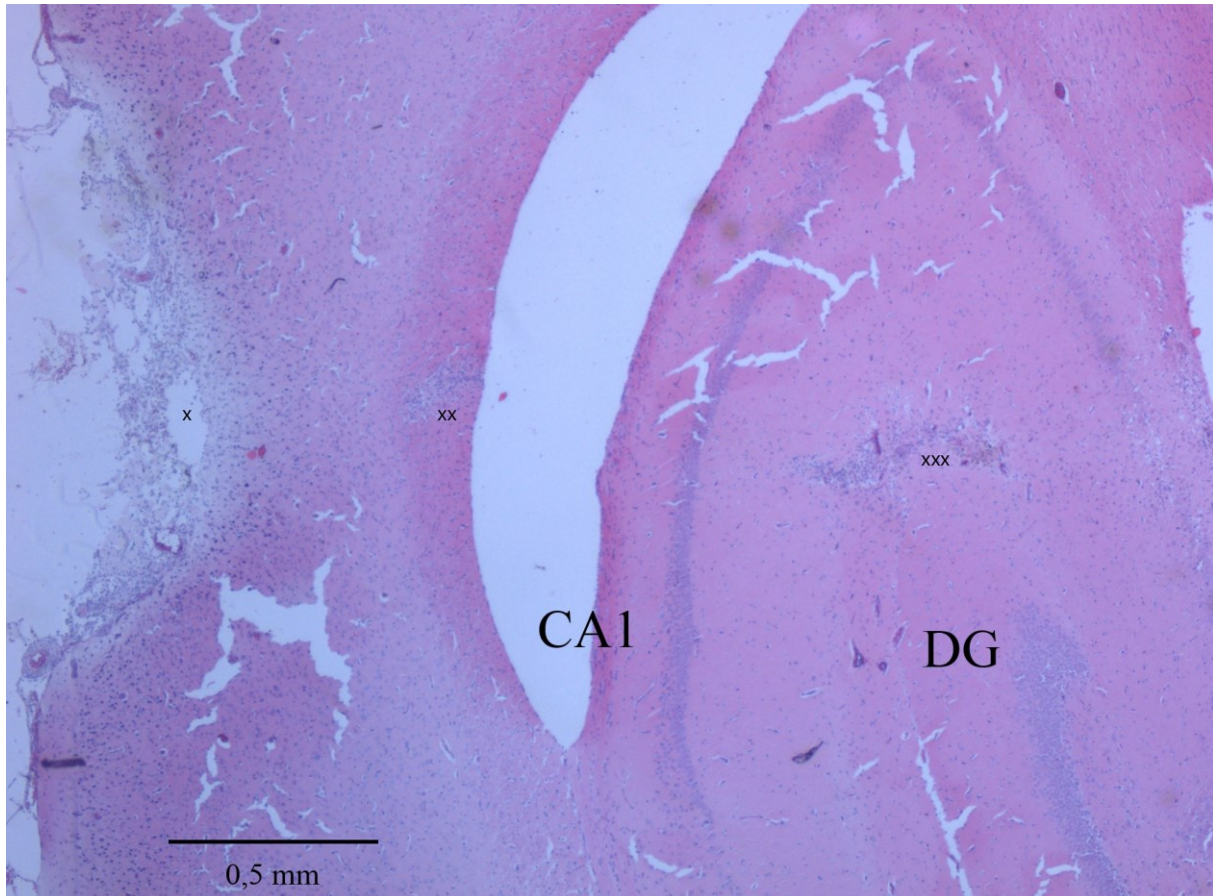


### Abbildung 2-2: Schemazeichnung der Tieroperation

**A** Seitenansicht und **B** Ansicht von vorne oben auf die Hautinzision, die Trepanationsstelle und die Injektionskanüle. Das Koordinatensystem macht deutlich, dass eine Verschiebung der Injektionskanüle in allen drei Raumebenen möglich ist. Außerdem ist die Fixierung des Kopfes an Nase und Ohren dargestellt.

Nach abgeschlossener Bohrung und eventueller Blutstillung bzw. Reinigung des Schädelknochens von Knochensplittern wurde die Spitze einer 5 $\mu$ l Hamilton-Injektionspritze, die mit einer der unverdünnten Substanzen aus Tab. 2 bzw. Tab. 3 gefüllt war, mittels der Stereotaxieapparatur in Position und schließlich langsam und kontrolliert in das Gehirn eingebracht (siehe hierzu Abbildung 2-2). Die Füllung der Injektionspritze erfolgte durch eine Hilfsperson, so dass eine Verblindung sichergestellt werden konnte. Nach exakter Positionierung der Spitze erfolgte eine Pause von mindestens 2 Minuten, damit sich das Gehirngewebe an den Stichkanal adaptieren konnte. Anschließend wurden insgesamt 5 $\mu$ l einer der genannten Substanzen in 0,5 $\mu$ l Schritten mit einer Pause von jeweils 2 Minuten zwischen den Spritzintervallen appliziert. Nach der letzten Injektion wurde die Spritze 2 Minuten *in situ* belassen. Die Injektionspausen waren notwendig, damit das Gehirngewebe die injizierte Substanz möglichst komplett aufnehmen konnte und die Substanz nicht durch den

entstehenden Injektionsdruck aus dem Stichkanal bzw. dem Bohrloch gedrückt wurde. Abschließend wurde die Injektionsspritze langsam entfernt, gereinigt, erneut mit der gleichen Substanz gefüllt und schließlich der Injektionsprozess an der gegenüberliegenden, noch unbehandelten Seite wiederholt. Abbildung 2-3 zeigt zur besseren Verdeutlichung den Einstichkanal an einem HE-gefärbten Sagittalschnitt eines behandelten Rattenhirns.



**Abbildung 2-3: Sagittalschnitt eines Rattenhirns zur Darstellung des Einstichkanals**

Die Abbildung zeigt einen sagittalen Schnitt eines operierten Rattenhirns in HE-Färbung. XXX demonstriert die Position der Läsion, die durch die Kanüle entstanden ist.

**Abkürzungen:** DG – Gyrus dentatus; CA – Cornu ammonis

*Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Christian G. Bien, Epilepsie-Zentrum Bethel.*

Nach Abschluss der Injektion wurde der Kopf der Ratte aus der Fixation gelöst. Der Verschluss der Wundränder erfolgte mittels eines nicht-resorbierbaren Fadens (Stärke: 0,100 – 0,149mm) mit ca. vier bis sechs Einzelknopfnähten. Während der Aufwachphase bekam das Tier eine mindestens zweistündige Sauerstoffinsufflation. Zusätzlich wurden dem Trinkwasser bis 48h nach der Operation etwa 5 bis 10g Glucose sowie 10 bis 15 Tropfen Novaminsulfon-ratiopharm® (Metamizol) pro 200ml zugesetzt. Durch dieses Regime erholten sich die Tiere sehr schnell und wurden innerhalb von 10 Tagen für die weiteren Versuche verwendet.

### 2.2.2 Präparation des Hippocampus

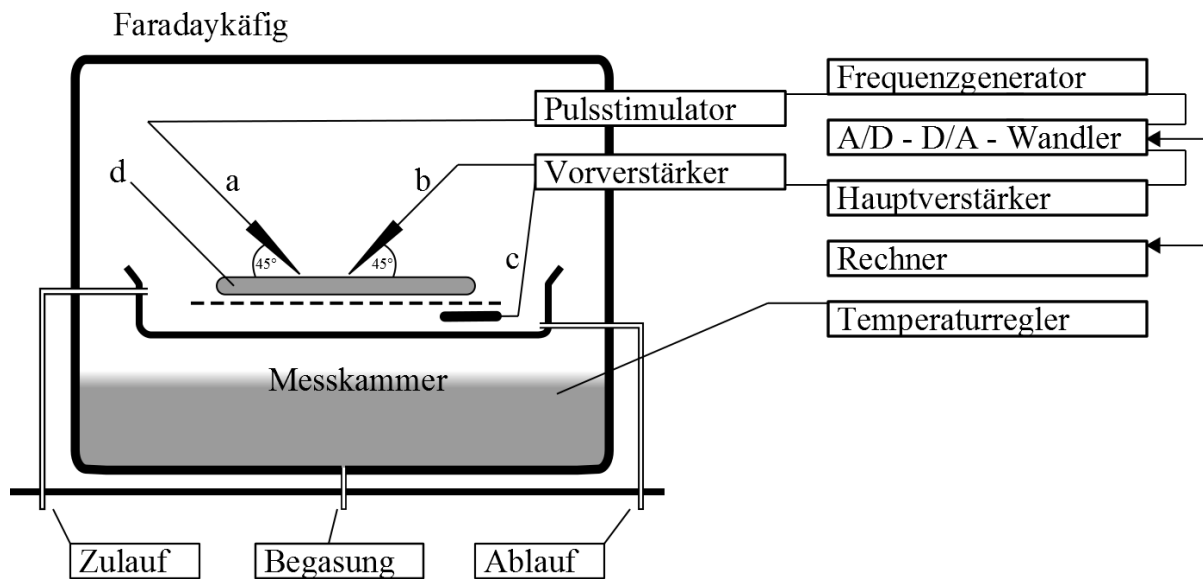
Für die Präparation des Hippocampus wurde das Tier unter dem Abzug je nach Gewicht mit 10 bis 20ml Diethylether narkotisiert. Es folgte die Dekapitation mit einer Guillotine. Zum Ausschluss von Hypoxieschäden mussten die folgenden Schritte der Präparation, die nicht in der o. g. Saccharose-Nährlösung erfolgten, innerhalb von maximal einer Minute abgeschlossen sein.

Zunächst wurde eine mediane Inzision der Kopfhaut von kranial nach kaudal unter Zuhilfenahme eines Skalpells durchgeführt und der Schädelknochen freigelegt. Nach Durchtrennung der Hinterhauptsbeine (Os occipitale) wurde mit der gleichen Schere von kaudal nach kranial ein medianer Schnitt entlang der Fissura longitudinalis vollzogen und hierdurch sowohl der Schädelknochen wie auch die harte Hirnhaut (Dura mater) eröffnet. Nun konnten die beiden Knochendeckel mit einer Pinzette vorsichtig abgehoben werden. Von dem nun sichtbaren Gehirn wurde das Kleinhirn (Cerebellum) mit einem Skalpell abgetrennt. Das verbliebene Gehirn wurde mittels eines kleinen Spatels bzw. eines Löffels vorsichtig in eisgekühlte, mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begaste Saccharose-Lösung überführt. Nach einer ca. einminütigen Lagerung wurde das Gehirn unter Verwendung von Sekundenkleber auf dem Schnittblock befestigt, der daraufhin in der Schnittkammer fixiert wurde. Diese wurde anschließend sofort mit ebenfalls eisgekühlter und mit Carbogen begaster Saccharose-Lösung befüllt.

Vor Fortsetzung der Präparation bewährte es sich bei Tieren ab einem Alter von ca. 3 Monaten, die weiche Hirnhaut (Pia mater) des Tieres mittels einer Präzisionspinzette und einer Federschere im Bereich der Schnittebene zu entfernen. Nun wurden im Bereich des Hippocampus unter Anwendung eines Vibratoms 400µm dicke Schnitte des Gehirns angefertigt. Anschließend erfolgte der Transfer mittels einer Transferpipette in die mit ACSF-Stammlösung gefüllte und mit Carbogen begaste Aufbewahrungskammer.

Nach einer mindestens 60-minütigen Lagerung der Schnitte bei Raumtemperatur wurden sie mit o. g. Transferpipette in die Messkammer transloziert.

### 2.2.3 Aufbau des elektrophysiologischen Messplatzes



**Abbildung 2-4: Schemazeichnung des Messplatzes**, modifiziert nach Rohde 2009

(a) Stimulationselektrode, (b) Ableitungselektrode, (c) Referenzelektrode und (d) Gewebeschnitt des Hippocampus.

Zur Durchführung adäquater elektrophysiologischer Messungen war ein elektrisch abgeschirmter Messplatz eine der Grundvoraussetzungen (siehe Abbildung 2-4). Daher wurde die o. g. Messkammer in einem geerdeten Faradaykäfig aufgestellt, der sich auf einem vibrationsgedämpften Tisch befand. Die Gewebeschnitte des Hippocampus lagen auf einem Nylonnetz, das ständig von mit Carbogen begaster ACSF-Stammlösung mit einer konstanten Flussrate von ca. 2ml/Minute umspült wurde. Möglich wurde dies durch eine peristaltische Rollerpumpe. Die Temperatur der Lösung wurde durch einen Temperaturregler bei  $32\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  konstant gehalten. Die Messung wurde erst nach einer Wartezeit von mindestens 30 Minuten begonnen.

Neben der Messkammer war auf der einen Seite die Stimulationselektrode auf einem Mikromanipulator montiert und mit einem Pulsstimulator verbunden. Bei der Stimulationselektrode handelte es sich um einen Eigenbau; der eigentliche Reizdraht bestand aus Platin. Auf der gegenüberliegenden Seite war die intrazelluläre Ableitungselektrode zur elektrophysiologischen Ableitung in einen schrittmotorgetriebenen Mikromanipulator eingespannt und mit einem Vorverstärker verbunden. Die intrazelluläre Ableitungselektrode war ein chlorierter Silberdraht, der in die mit Intrazellulärlösung gefüllte Glasmikropipette eingeführt wurde (zur Herstellung der Glasmikroelektroden siehe Kap. 2.2.4.1). Oberhalb der Messkammer wurde ein Stereomikroskop zur Positionierung der Elektroden angebracht.



Zur Darstellung und Bearbeitung der Ableitungen mit der Akquisitionsoftware Signal 2.16 wurde das analoge Ausgangssignal des Vorverstärkers über einen Hauptverstärker und über einen A/D-Wandler an einen Computer geleitet. Umgekehrt war es möglich, über die Software unter Zuhilfenahme eines D/A-Wandlers den Hauptverstärker zu steuern, sodass die Zelle mit unterschiedlichen Stromprotokollen erregt werden konnte. Der o. g. Pulsstimulator wurde über einen Frequenzgenerator kontrolliert. Die Datenspeicherung erfolgte letztlich digital auf elektronischen Speichermedien.

Alle elektrischen Geräte wurden in einem Metallschrank montiert und sternförmig geerdet.

## **2.2.4 Prinzipien der elektrophysiologischen Methoden**

Im folgenden Abschnitt werden sowohl die elektrophysiologischen Methoden vorgestellt als auch die Herstellung der notwendigen Hilfsmittel erläutert. Zusätzlich wird auf die gewählten Protokolle eingegangen, deren Kenntnis notwendige Voraussetzung für das Verständnis der Ergebnisse ist. Für umfangreiche Hintergrundinformationen siehe auch Smith *et al.* (1985).

### **2.2.4.1 Herstellung von Glasmikropipetten**

Für jeden Versuchstag wurden zwischen 4 und 16 scharfe Glasmikropipetten benötigt. Aufgrund der kurzen Haltbarkeit mussten sie versuchstäglich neu gefertigt werden. Grundlage hierfür waren das horizontale Pipettenziehgerät (P-97) und Borosilikatröhrchen (GB120F-10). Die scharfen Glasmikropipetten verfügten über einen Spitzendurchmesser von unter 0,5µm. Bedingt durch diese hohen Anforderungen wirkten sich sowohl die Raumtemperatur als auch die Luftfeuchtigkeit sowie der Luftdruck auf die Herstellung aus. Dementsprechend musste das Protokoll – gemeint sind die Werte für die Temperatur der Glühwendel sowie Geschwindigkeit und Dauer des Zuges – regelmäßig angepasst werden (siehe hierzu Tab. 9 im Anhang). Rückschlüsse auf den Spitzendurchmesser konnten über den Pipettenwiderstand (Zielwert mindestens 60MΩ und maximal 140MΩ), der negativ mit dem Spitzendurchmesser korreliert, gezogen werden.

Abschließend wurden die Glasmikropipetten unter Zuhilfenahme einer Mikropipette mit Intrazellulärlösung gefüllt (Zusammensetzung siehe Kap. 2.1.5).

### **2.2.4.2 Herstellung von bipolaren Stimulationselektroden**

Bei der bipolaren Stimulationselektrode handelte es sich um einen Eigenbau. Allerdings wurde sie nicht versuchstaglich, sondern nur bei Bedarf erneuert. Als Grundlage dienten das vertikale Pipettenziehgerät (PIP5), Borosilikatröhrchen (GB150F-8) und Platindraht.

Zunächst wurde mit dem Pipettenziehgerät eine Glaspipette gezogen und die Spitze mit einer Schere im Bereich des ersten Drittels abgetrennt, sodass der Spitzendurchmesser ungefähr so groß war, dass der Platindraht durchgeschoben werden konnte. Im nächsten Schritt wurde ein ungefähr 15 bis 20cm langes Stück Platindraht, der mit Teflon isoliert ist, in der Mitte geteilt, die beiden Teile aufeinandergelegt und miteinander verdrillt, sodass auf der einen Seite beide Ende aneinander lagen und auf der anderen Seite zwei ca. 2 bis 3cm lange, frei bewegliche Enden entstanden. Dieser Draht wurde dann in der Art in die Pipette eingeführt, dass das verbundene Ende des Drahtes ca. 1cm aus dem vorderen Ende der Pipette herausragte. An beiden Öffnungen der Pipette wurde der Draht mit Sekundenkleber fixiert. Die Isolierung im Bereich der freien Enden wurde auf einer Länge von ca. 0,5cm mittels eines Bunsenbrenners abgebrannt. Hier erfolgte dann der Anschluss des Pulsstimulators.

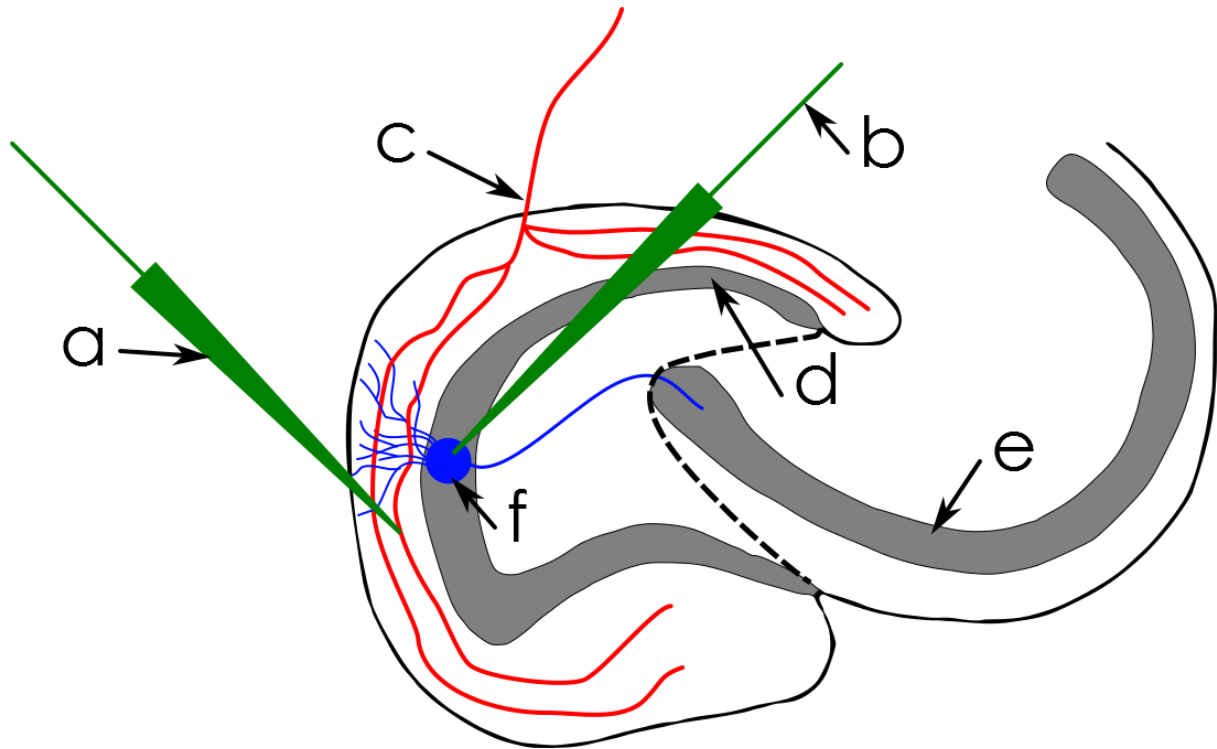
### **2.2.4.3 Pharmakologie**

Für die Umsetzung der Experimente war es nötig, die Rezeptorsysteme der Zelle durch den Einsatz von Pharmaka in der Art zu manipulieren, dass es möglich war, den NMDA-Rezeptor aus der Reihe der ionotropen Glutamaterezeptoren einzeln zu betrachten. Die Realisierung erfolgte über eine pharmakologische Isolierung durch die sogenannte Badapplikation der pharmakologischen Substanzen. Hierbei wurde das zu applizierende Pharmakon in die ACSF-Stammlösung gemischt und dann, wie in Kap. 2.2.3 beschrieben, mit der Stammlösung eingewaschen. Um eine optimale Verteilung in der Stammlösung zu gewährleisten, musste die Applikation der Pharmaka mindestens 10 Minuten vor dem Einwaschen in das Schlauchsystem und die Messkammer erfolgen.

Damit bei der Darstellung der NMDAR-EPSPs ausgeschlossen werden konnte, dass andere glutamaterge Rezeptoren beteiligt waren, wurden der AMPA- und der Kainat-Rezeptor permanent durch CNQX antagonisiert. Für die nötige Vordepolarisation der Zelle, die für die Aktivierung des NMDA-Rezeptors unter anderem benötigt wird, sorgte der selektive GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonist Gabazine. Für die genauen Konzentrationen siehe Kap. 2.1.5.

### 2.2.4.4 Intrazelluläre Messungen

Nach der oben beschriebenen Translokation des Gewebeschnittes (siehe Kap. 2.2.2) in die Messkammer erfolgte die Positionierung der Elektroden, wie in Abbildung 2-5 gezeigt, unter Zuhilfenahme des Stereomikroskops und der beiden Mikromanipulatoren (siehe Kap. 2.2.3).



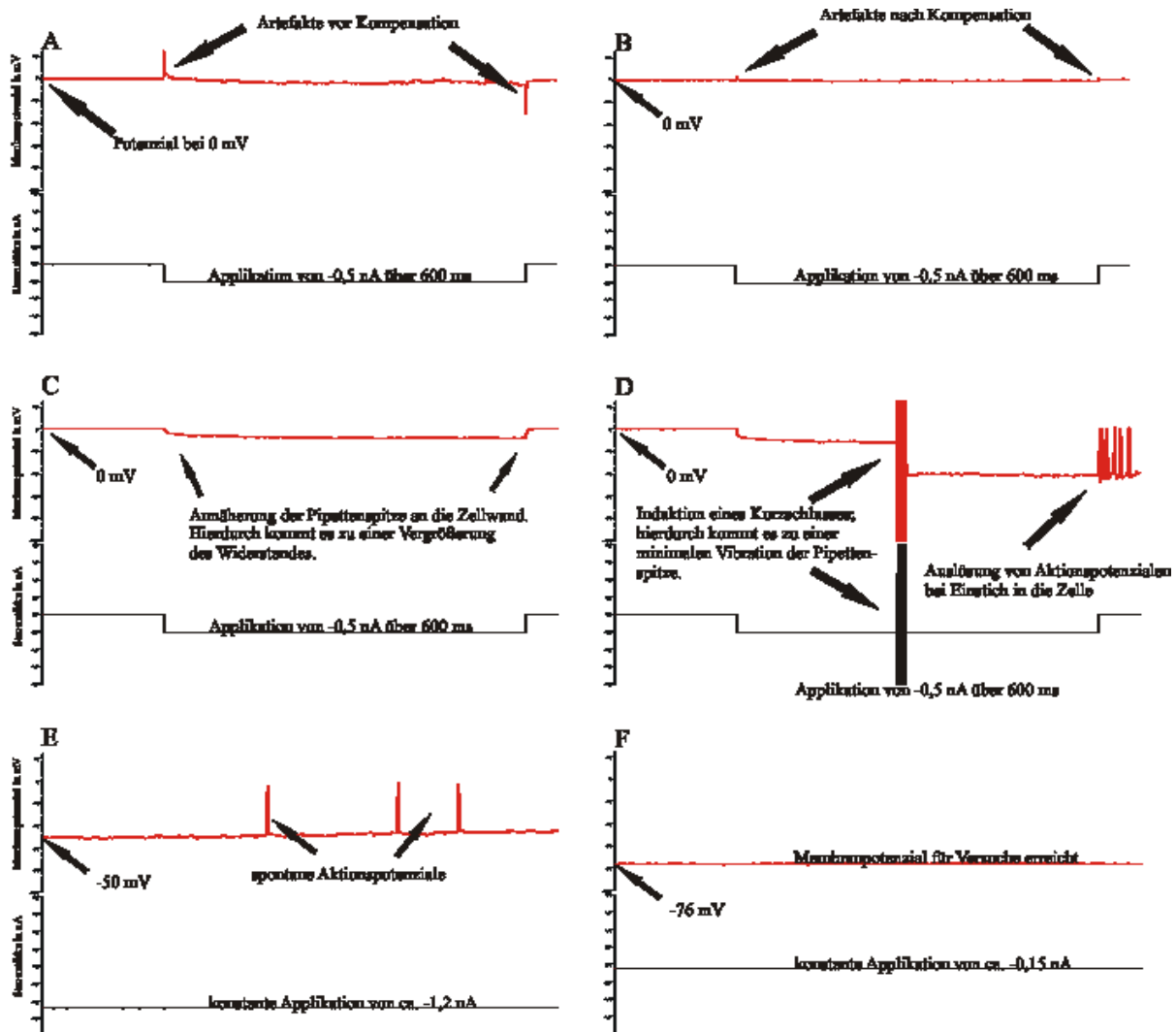
**Abbildung 2-5: Schemazeichnung des Hippocampus mit Platzierung der Elektroden**  
(a) Stimulationselektrode, (b) intrazelluläre Ableitungselektrode, (c) Tractus perforans, (d) Stratum moleculare des Gyrus dentatus, (e) Cornu ammonis und (f) Körnerzelle.

Hierbei wurde die Stimulationselektrode im Bereich des Tractus perforans und die intrazelluläre Ableitungselektrode im Stratum moleculare des Gyrus dentatus positioniert, sodass Körnerzellen abgeleitet werden konnten. Als Referenzelektrode diente ein ebenfalls chlorierter Silberdraht, der mit der Badlösung der Messkammer in Verbindung stand und am Vorverstärker angeschlossen war.

#### 2.2.4.4.1 Vorgehen bei der Zellsuche

Alle im folgenden Abschnitt beschriebenen Schritte sind in Abbildung 2-6 gezeigt. Vor Beginn der eigentlichen Zellsuche musste zunächst der Widerstand unter Einsatz einer Brückenschaltung am Hauptverstärker angepasst werden (Nullabgleich des Spannungsunterschieds). Anschließend erfolgte die Kompensation der Kapazität der Pipette, gezeigt in den Teilabbildungen A und B. Im nächsten Schritt wurde die Spitze der Glasmikropipette in einem Winkel von ca. 45° in 1µm Schritten mit einer Geschwindigkeit

von 1000 $\mu\text{m/s}$  durch das Stratum moleculare geföhrt. Als Hilfsmittel diente hierbei der o. g. schrittmotorgetriebene Mikromanipulator (siehe Kap. 2.2.3).



**Abbildung 2-6: Zellsuche im Zeitraffer**

**A** Vor Kompensation, **B** nach Kompensation, **C** Annäherung an eine Zelle, **D** Einstechen in eine Zelle, **E** Spontanaktivität der Zelle und **F** Zelle, die das erforderliche MP erreicht hat.

Als erstes Anzeichen für den Kontakt der Pipettenspitze mit einer Zelle vergrößerte sich der Pipettenwiderstand (Teilabbildung C). Direkt nach der Penetration der Zelle reagierte diese dann mit dem Auslösen von Aktionspotenzialen (Teilabbildung D). Nun folgte eine Phase, in der das Membranpotenzial durch die Injektion eines hyperpolarisierenden Haltestromes in die Zelle manipuliert und somit stabilisiert werden musste (Teilabbildung E). Üblich war hierbei zunächst eine Injektion von -1,2 nA. Im Verlauf von maximal 10 Minuten wurde die Strominjektion immer weiter reduziert, sodass sich die Zelle im Regelfall bei einem Membranpotenzial von -70 bis -80 mV stabilisierte (Teilabbildung F). Die gleichzeitige Strominjektion und Spannungsmessung wurde über o. g. Brückenschaltung ermöglicht.

#### 2.2.4.4.2 Mindestanforderungen an die Zellen

Es wurden nur Zellen zugelassen, die ein stabiles Ruhemembranpotenzial von mindestens  $-65\text{mV}$  und maximal  $-85\text{mV}$  aufwiesen. Bei allen Messungen wurde das Membranpotenzial auf annähernd  $-75\text{mV}$  gehalten. In der Mehrzahl der Fälle wurde dies über einen hyperpolarisierenden, selten über einen depolarisierenden Haltestrom verwirklicht. Die injizierte Stromstärke durfte zu keinem Zeitpunkt über  $+0,2\text{nA}$  bzw.  $-0,2\text{nA}$  liegen. Gelegentlich musste die Stromstärke während der Messung an geringfügige Veränderungen des Membranpotenzials angepasst werden. Dennoch waren geringe Abweichungen möglich.

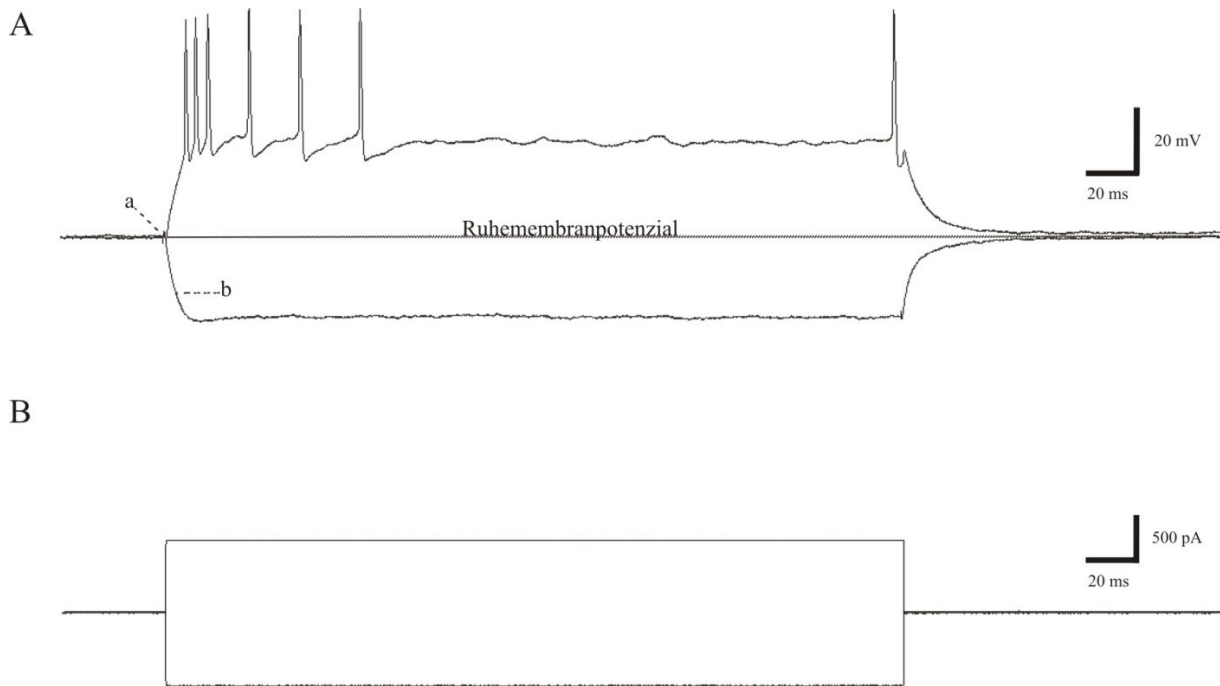
Zusätzlich musste die gemessene Temperatur der Lösung, die die Schnitte umspülte, stabil bei  $32^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  liegen.

#### 2.2.4.4.3 Bestimmung von Membraneigenschaften

Nach Auffinden und Stabilisierung einer Körnerzelle wurden zu Beginn der Ableitung grundlegende Zelleigenschaften bestimmt. Notwendig wurde die Erhebung dieser Daten, um die gemessenen Körnerzellen zu charakterisieren. Hierzu erfolgte die Bestimmung folgender passiver elektrotonischer und aktiver Membraneigenschaften:

**Tab. 6: Passive elektrotonische und aktive Membraneigenschaften**

Membraneigenschaft	Definition (siehe Abbildung 2-7)
<b>Ruhemembranpotenzial (RMP)</b>	zeitlich unverändertes Membranpotenzial
<b>Membranwiderstand (<math>R_{in}</math>)</b>	Anstieg der Strom-Spannungs-Kennlinie
<b>Membranzeitkonstante (<math>\tau</math>)</b>	zeitlicher Abstand vom Beginn der Stimulation (siehe Punkt a) bis zum Erreichen von 63,2% der maximalen Hyperpolarisation (siehe Punkt b)
<b>Salve von Aktionspotenzialen (engl. burst)</b>	Anzahl mehrerer aufeinanderfolgender Aktionspotenziale



### Abbildung 2-7: Messung von Membraneigenschaften

**A** Hyperpolarisation und überschwellige Depolarisation der Zellmembran und **B** schematische Darstellung des Stimulationsprotokolls mit positiver und negativer Stromstärke.

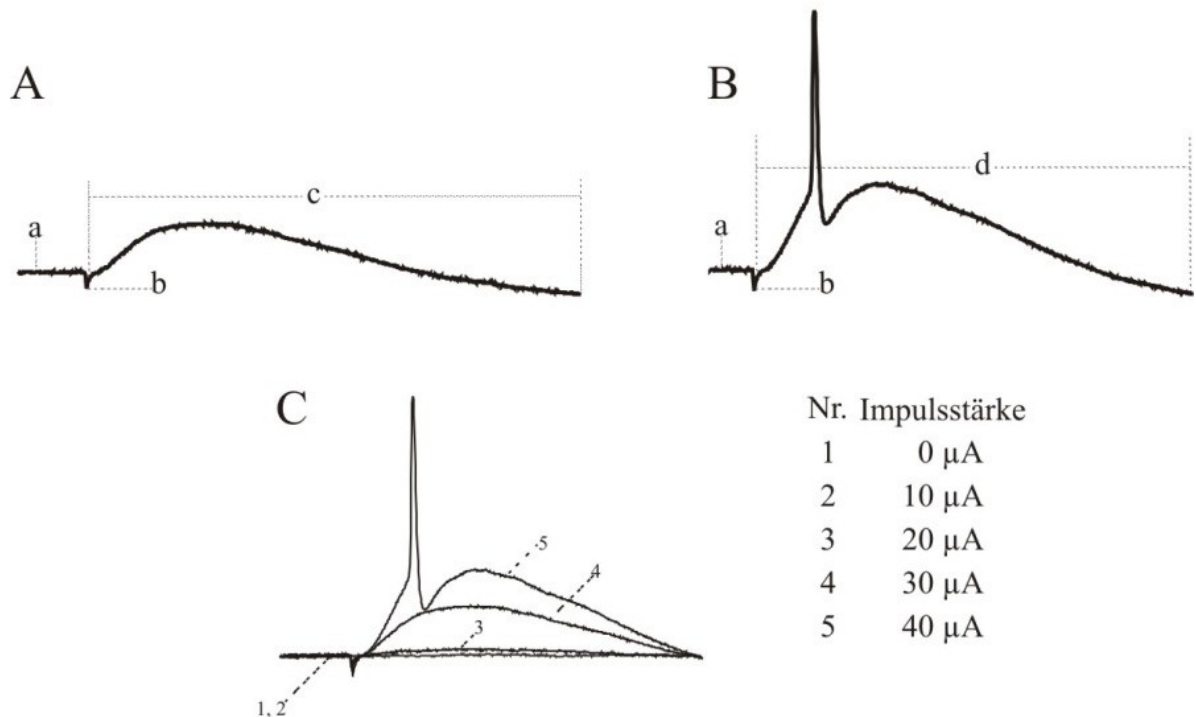
Zur Ermittlung der Parameter wurden Strom-Spannungs-Sprünge (StSpSp) durchgeführt. Hierbei erfolgte die Stimulation der Zelle durch eine Strominjektion über die Ableitungselektrode. Zwei unterschiedliche Protokolle kamen zur Anwendung (siehe auch Tab. 10).

Bei den depolarisierenden Strom-Spannungs-Sprüngen begann die Stimulation mit 0nA über eine Dauer von 350ms. Mit einem Abstand von 5s erhöhte sich die Stromstärke solange um +0,1nA, bis der Maximalwert von +1,4nA erreicht wurde.

Das Protokoll der hyperpolarisierenden Strom-Spannungs-Sprünge war identisch, jedoch wurde die Stromstärke mit umgekehrtem Vorzeichen verändert.

#### 2.2.4.4.4 Erstellung von Input-Output-Kurven

Nach Abschluss der StSpSp wurden sog. Input-Output-Kurven erstellt. Hierbei wurde die Stimulation nicht wie bei den in Kap. 2.2.4.4.3 durchgeführten Versuchen über die Ableitungselektrode, sondern über die Stimulationselektrode vermittelt. Abbildung 2-8 zeigt die durch diese Technik gemessenen exzitatorischen postsynaptischen Potenziale (EPSP).



### Abbildung 2-8: Beispiel für EPSP

**A** EPSP ohne Aktionspotential (AP), **B** EPSP mit AP und **C** Kurvenschar im Sinne einer Input-Output-Kurve. (a) Ruhemembranpotenzial (RMP), (b) Stimulationsartefakt, (c) EPSP ohne AP und (d) EPSP mit AP.

Die Stimulation erfolgte über den Tractus perforans (siehe Abbildung 2-5) in einem Intervall von 30s als Einzelimpuls. Begonnen wurde mit einer Stimulationsstärke von  $0\mu\text{A}$ . Mit jedem weiteren Stimulus wurde die Stimulationsstärke um  $10\mu\text{A}$  gesteigert, solange bis ein Maximalwert von  $150\mu\text{A}$  ( $200\mu\text{A}$ ) erreicht wurde. In einigen Fällen zeigte die Zelle bereits bei niedrigen Stimulationsstärken Aktionspotenziale (siehe Abbildung 2-8). Es wurde versucht, die Stimulation dennoch bis zum angestrebten Maximalwert fortzusetzen, was jedoch nicht immer möglich war, da Zellen, die bei niedrigen Stromstärken mit Aktionspotenzialen reagierten, bei höheren Stimulationsstärken regelmäßig instabil wurden.

In einem zweiten Schritt wurde dasselbe Protokoll erneut verwendet, jedoch erfolgte nun eine Doppelpulsstimulation mit einem Interstimulusintervall von 40ms zwischen den Impulsen. Hierdurch war es möglich, zwischen dem medialen und dem lateralen Tractus perforans zu unterscheiden (siehe Kap. 2.2.5.3 und Abbildung 2-10). In einigen Fällen war die Zelle zum Zeitpunkt des Doppelpulsstimulationsprotokolls allerdings so instabil, dass eine Anwendung nicht mehr zufriedenstellend erfolgen konnte. Für eine genaue Aufstellung der Protokolle siehe Tab. 11 im Anhang.

## 2.2.5 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Zur Auswertung und Aufbereitung der ermittelten Daten fanden Microsoft Office Excel 2010, SPSS Statistics 20 und SigmaPlot 11.0 Anwendung. Die Erstellung bzw. weitere Bearbeitung der Abbildungen wurde mit CorelDRAW 12, CorelDRAW X5 und Inkscape vorgenommen.

Zur deskriptiven Beschreibung der Daten wurden der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ), die Standardabweichung (SD) sowie der Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) nach folgenden Formeln angewandt:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} * \sum_{i=1}^n x_i \quad SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad S.E.M. = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Alle Daten sind als arithmetisches Mittel mit dem Standardfehler des Mittelwertes ( $\bar{x} \pm$  S.E.M.) angegeben. Zur Signifikanztestung wurden der Shapiro-Wilk-Test, der *t*-Test, der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (*U*-Test) und der Kolmogorov-Smirnov-Test (KS-Test) angewendet. Die statistische Auswertung der Input-Output-Kurven erfolgte dankenswerterweise in enger Zusammenarbeit mit T. Kirschstein (Oscar Langendorff Institut für Physiologie).

### 2.2.5.1 Definition der Versuchsreihen

**Tab. 7: Definition der Versuchsreihen**

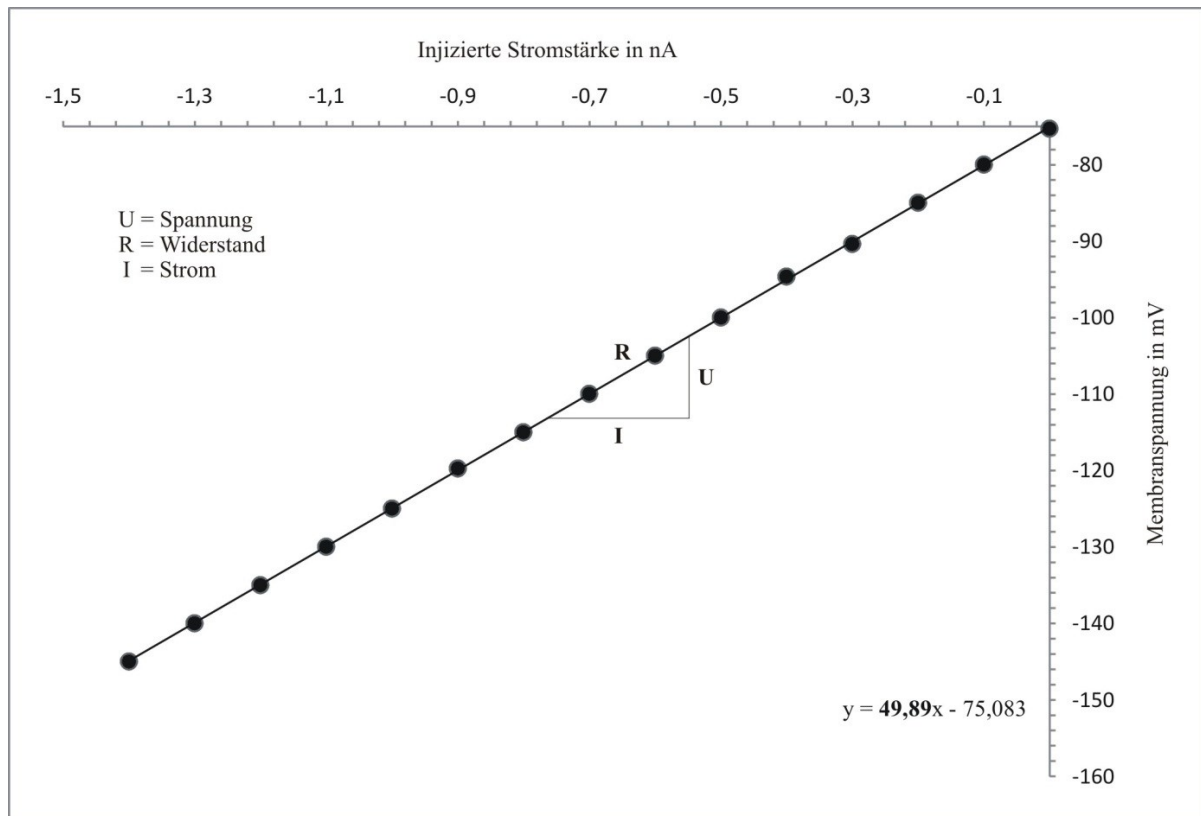
Versuchsreihe	I	II
<b>Testsubstanz</b>	Anti-NR1-Antikörper	Liquor eines Pat. mit Anti-NMDAR-Enzephalitis
<b>Kontrolle(n)</b>	NaCl	Liquor eines Pat. mit einem Gangliogliom Liquor eines Pat. mit posttraumatischer Epilepsie

### 2.2.5.2 Vorgehensweise bei der Auswertung der Membraneigenschaften

Die ermittelten Parameter wurden in Tab. 6 bereits kurz vorgestellt (siehe hierzu auch Abbildung 2-7). Für die Bestimmung des RMP wurden die Messwerte verwendet, die aus den



hyperpolarisierenden Strom-Spannungs-Kurven bei einer Stimulation von 0nA gewonnen werden konnten. Bei einigen wenigen Zellen gelang deren Durchführung nicht, daher wurden entweder die Werte der depolarisierenden Strom-Spannungs-Kurven bei einer Stimulation von 0nA genutzt oder es musste auf den entsprechenden Datenpunkt verzichtet werden. Um die in Kap. 2.2.4.4.2 bereits erwähnten geringfügigen Schwankungen auszugleichen, wurden alle vorhandenen Werte gemittelt.



**Abbildung 2-9: Beispiel einer Strom-Spannungs-Kennlinie**

Der Membranwiderstand ergibt sich aus der Steigung (im Beispiel  $R = 49,89\text{M}\Omega$ ) der Strom-Spannungs-Kennlinie.

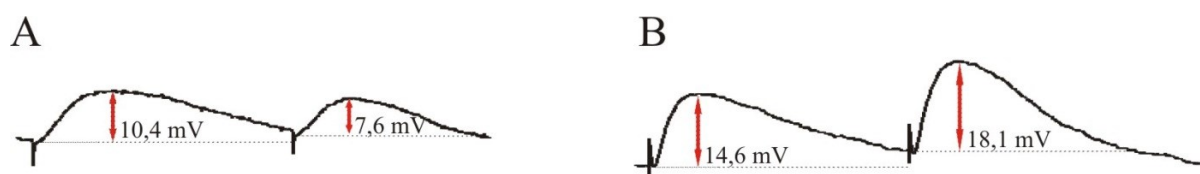
Der Membranwiderstand ergibt sich aus der Steigung der Strom-Spannungs-Kennlinie (Abbildung 2-9). Zur Erstellung dieser Kennlinie wird die injizierte Stromstärke in Nanoampere gegen das Membranpotenzial in Millivolt aufgetragen. Hierbei fanden lediglich die hyperpolarisierenden StSpSp Verwendung, da die Aktionspotenziale, die bei den depolarisierenden StSpSp evoziert wurden, eine genaue Auswertung unmöglich machten. Der Membranwiderstand ließ sich dann, wie in Abbildung 2-9 gezeigt, als die Steigung der Kennlinie bestimmen. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden alle vorliegenden Daten der einzelnen Zellen einer Versuchsgruppe gemittelt, um auch hier geringfügige individuelle Unterschiede auszugleichen.

Die Bestimmung der Membranzeitkonstanten ist in Tab. 6 kurz erläutert und in Abbildung 2-7 gezeigt. Es fanden ebenfalls die hyperpolarisierenden StSpSp Anwendung, außerdem wurden auch hier, ähnlich wie beim RMP, alle 14 Messwerte pro Zelle gemittelt, da minimale intraindividuelle Abweichungen auftraten.

Abschließend wurden die Aktionspotenziale, die bei den depolarisierenden Strom-Spannungssprüngen auftraten, für die unterschiedlichen injizierten Stromstärken ausgezählt (z. B. in Abbildung 2-7 7 Stück).

### 2.2.5.3 Vorgehensweise bei der Auswertung der Input-Output-Kurven

Für die Auswertung der Input-Output-Kurven wurde zunächst bestimmt, ob über den medialen oder den lateralen Tractus perforans stimuliert wurde. Hierzu fand das Doppelpulsverhältnis (PPR, engl. paired-puls ratio) Anwendung.

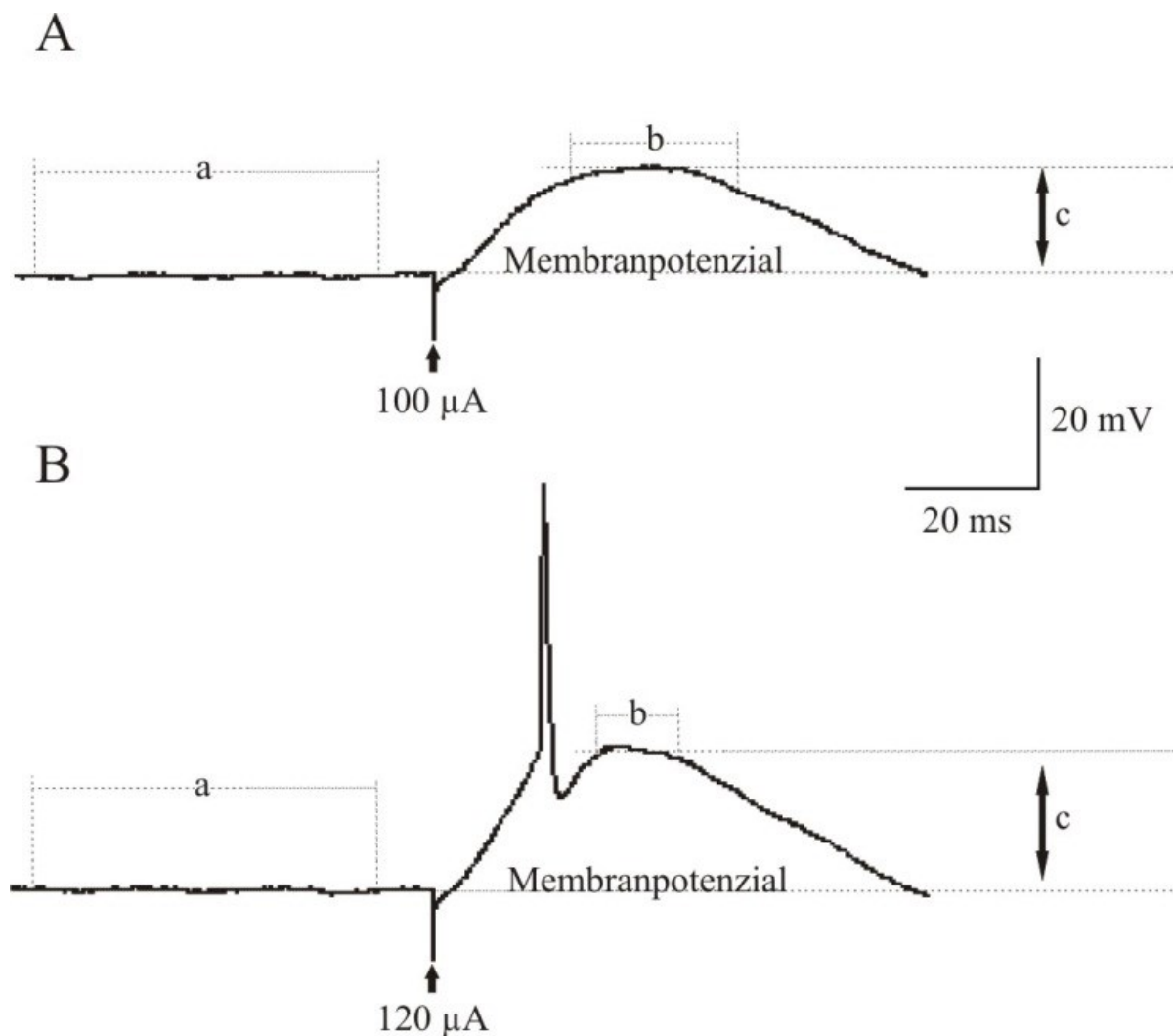


**Abbildung 2-10: Beispiel der Unterschiede beim Doppelpulsverhältnis**

Stimulation über den **A** medialen und **B** lateralen Tractus perforans. Die roten Linien zeigen die Amplituden.

Abbildung 2-10 zeigt die Unterschiede im Doppelpulsverhältnis. Bei Stimulation des medialen Tractus perforans tritt eine Depression des zweiten EPSP auf, bei Stimulation des lateralen Tractus perforans eine Potenzierung (McNaughton 1980). Die Analyse wurde folglich über einen Vergleich der EPSP-Amplituden durchgeführt. Hierbei war es wichtig, die richtige Position (vgl. Abbildung 2-11) für die Bestimmung des Membranpotenzials zu ermitteln, da das Potenzial beim Auslösen des zweiten Stimulus regelmäßig nicht auf das Niveau des Membranpotenzials zu Beginn abgefallen war (siehe hierzu auch Abbildung 2-10).

Im nächsten Schritt erfolgte dann die Bestimmung der Amplitude der EPSP sowohl bei Einzelpuls- wie auch bei Doppelpulsstimulation zur Erstellung der Input-Output-Kurven. Hierzu zeigt Abbildung 2-11 ein Auswertungsbeispiel für die Einzelpulsstimulation.



**Abbildung 2-11: Beispiel der EPSP-Auswertung**

**A** EPSP ohne AP und **B** EPSP mit AP. (a) Bereich zur Auswertung des RMP, (b) Bereich zur Auswertung des maximalen Membranpotenzials und (c) Amplitude des EPSP.

Zunächst wurde im Bereich (a) das RMP bestimmt, dabei wurde durch die Software Signal 2.16 für den gesamten markierten Bereich der Mittelwert bestimmt. Anschließend erfolgte im Bereich (b) die Bestimmung des maximalen Membranpotenzials. Durch die Subtraktion der beiden Werte ergab sich die Amplitude des EPSP. Die Teilabbildung B zeigt, welches Problem für die Auswertung entstand, wenn ein EPSP mit AP gemessen wurde. Daher wurde hier für die Bestimmung des maximalen Membranpotenzials ein Bereich vor bzw. nach dem AP gewählt, der am ehesten dem Bereich des maximalen Membranpotenzials ohne AP entsprach. In einigen wenigen Fällen war es nicht möglich diesen Bereich festzumachen, diese Messwerte sind dann für die Auswertung nicht herangezogen worden.

Um den Einfluss von geringen Schwankungen in der Amplitude des EPSP zu minimieren, wurden die Werte der Einzelpuls- und der Wert der ersten Stimulation der Doppelpulsstimulationen gemittelt, sofern Messwerte beider Protokolle vorlagen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Verwendete Tiere

In beiden Versuchsreihen (siehe Tab. 7 in Kap. 2.2.5.1) wurden insgesamt 51 Tiere verwendet und 39 verwertbare Zellversuche (66%) bei insgesamt 59 Zellversuchen (100%) durchgeführt. Die Gründe für den Ausschluss von 20 Zellversuchen (34%) sind in Tab. 8 aufgelistet.

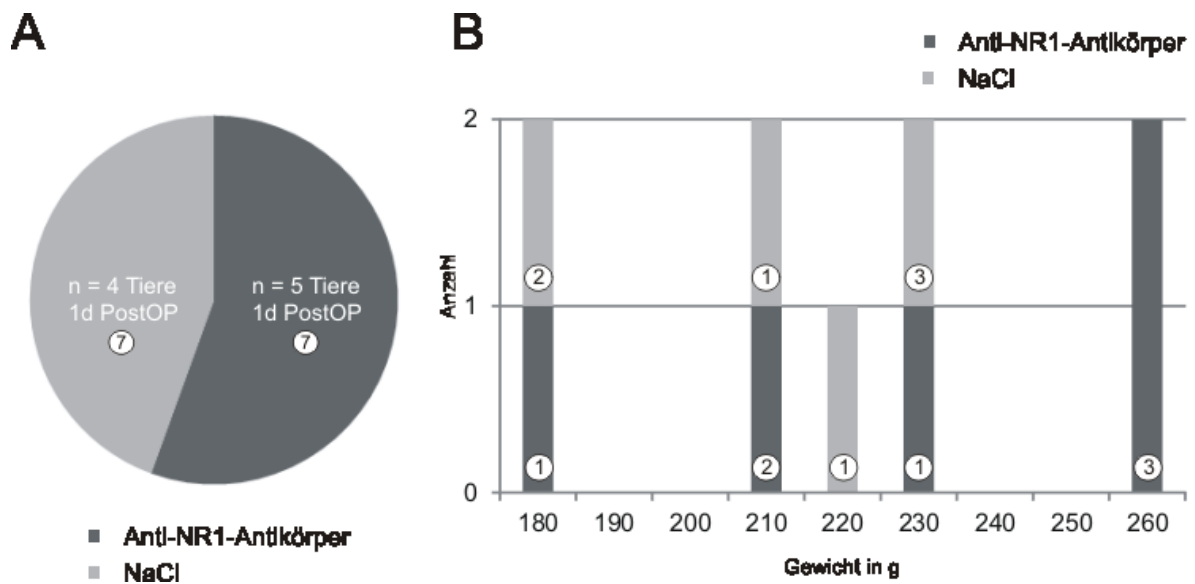
**Tab. 8: Übersicht der Gründe für den Ausschluss von Zellen**

Ursache	Versuchsreihe I	Versuchsreihe II
<b>Zellverlust</b>	2 Zellen (33%)	5 Zellen (36%)
<b>Abweichendes RMP</b>	---	2 Zellen (14%)
<b>Technische Fehler</b>	3 Zellen (50%)	6 Zellen (43%)
<b>Falsche Pharmaka</b>	1 Zelle (17%)	1 Zelle (7%)
<b>Gesamt:</b>	<b>6 Zellen (100%)</b>	<b>14 Zellen (100%)</b>

Um differenzieren zu können, inwieweit gravierende Unterschiede zwischen den Gruppen vorliegen, die Einfluss auf die Interpretation der weiteren Ergebnisse haben könnten, erfolgte die Auswertung der Tierdaten hinsichtlich den Zeiträumen zwischen den Tieroperationen und den Versuchen sowie des Gewichtes der Tiere. Die Daten finden sich in den folgenden beiden Unterkapiteln. Zusätzlich ist die genaue Anzahl der jeweiligen Zellversuche dem Post-OP-Zeitraum sowie dem Tiergewicht zugeordnet.

#### **Anti-NR1-Antikörper vs. NaCl-Kontrolle**

Die Versuche innerhalb der Versuchsreihe I wurden an insgesamt 12 Tieren durchgeführt. Hiervon konnten die Daten von fünf Tieren mit Anti-NR1-Antikörper-Injektion bzw. von vier Tieren mit NaCl-Injektion ausgewertet werden. Bei den übrigen drei Tieren kam es entweder zu Messergebnissen, die die Kriterien gemäß Kap. 2.2.4.4.2 nicht erfüllten, oder es waren keine Messungen möglich, da sich keine Zellen fanden. Insgesamt konnten sieben Zellversuche pro Versuchsgruppe verwendet werden.



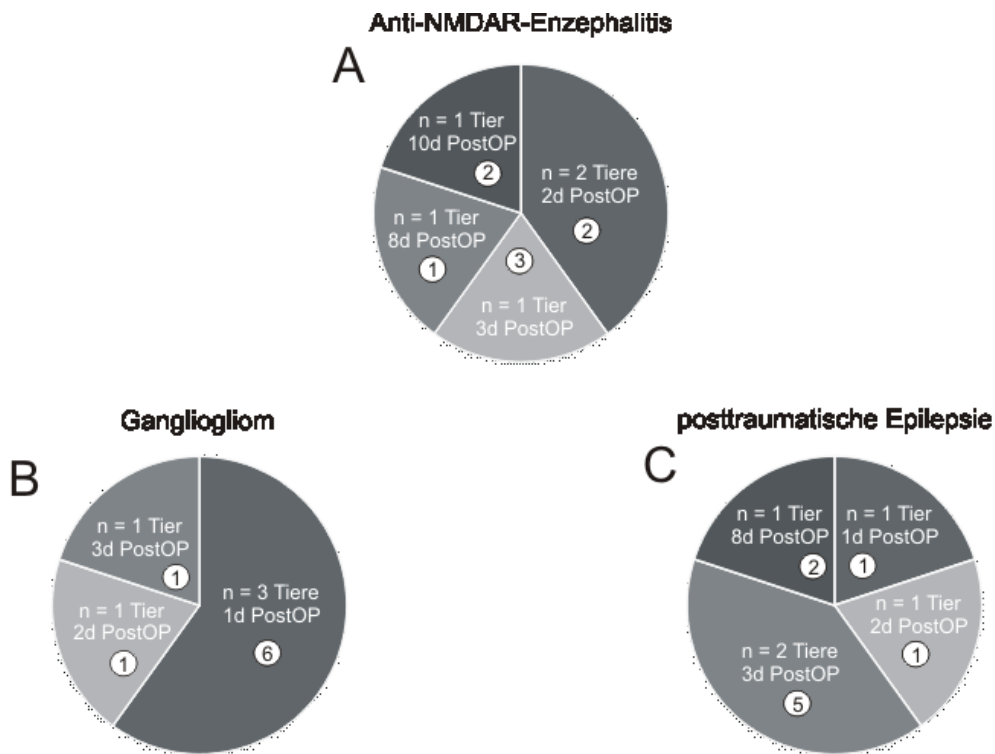
**Abbildung 3-1: Daten zu den verwendeten Tieren der Versuchsreihe I**

**A** Zeitspanne zwischen Tier-OP und Versuchen. Die Zahl in dem Kreisdiagramm ist die Zahl der in dem jeweiligen Post-OP-Zeitraum gemessenen Zellen. **B** Histogramm des Gewichtes der Tiere am Versuchstag. Die Zahl in den Säulen gibt an, wie viele Zellen von den jeweiligen Tieren stammen.

Die Zeitspanne zwischen der stereotaktischen Injektion der Testsubstanzen und den Versuchen lag bei beiden Versuchsgruppen genau bei einem postoperativen Tag. Das Gewicht der Tiere betrug  $228\text{g} \pm 13,7\text{g}$  bei der Anti-NR1-Antikörpergruppe, das der NaCl-Gruppe  $215\text{g} \pm 12,5\text{g}$ . Ein signifikanter Unterschied bestand nicht (*t*-Test). Für die genaue Aufschlüsselung siehe Abbildung 3-1. In Teilabbildung B sind zusätzlich die Tiergewichte mit Angabe der Anzahl der Zellversuche dargestellt.

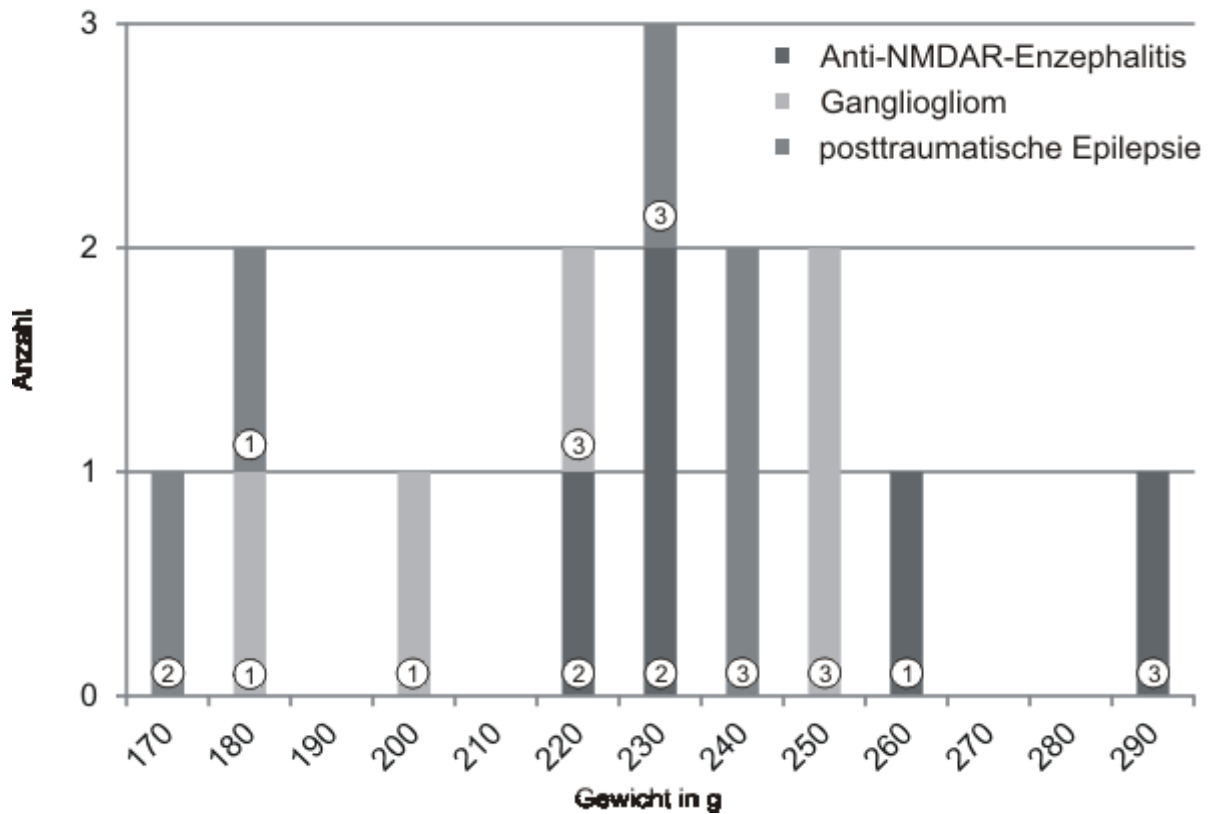
### Anti-NMDAR-Enzephalitis-Liquor vs. Kontrollliquores

Die Versuche innerhalb dieser Versuchsreihe wurden an insgesamt 39 Tieren durchgeführt. Die Daten von jeweils fünf Tieren der drei Versuchsgruppen waren auswertbar. Die darüber hinausgehenden Messdaten entsprachen nicht den Vorgaben gemäß Kap. 2.2.4.4.2. Zusätzlich waren teilweise keine Messungen möglich, da sich keine Zellen fanden. Insgesamt konnten jeweils acht Zellversuche der Anti-NMDAR-Enzephalitis- und der Gangliogliom- sowie neun der posttraumatischen-Epilepsie-Gruppe verwendet werden.



**Abbildung 3-2: Zeitraum zwischen Tieroperation und Versuchstag der Versuchsreihe II**  
 Die Zahl in dem Kreisdiagramm ist die Zahl der in dem jeweiligen Post-OP-Zeitraum gemessenen Zellen.

Die Zeitspanne zwischen der stereotaktischen Injektion der Testsubstanzen und den Versuchen bewegte sich bei der Gruppe der Tiere, die eine Injektion mit Liquor eines Anti-NMDAR-Enzephalitis-Patienten erhielten, zwischen 2 bis 10 Tagen, im Mittel bei  $5 \pm 3,3$  Tagen (Teilabbildung A), bei der Gruppe der Tiere, die eine Injektion mit Liquor eines Gangliogliom-Patienten erhielten, zwischen 1 bis 3 Tagen, im Mittel bei  $1,6 \pm 0,4$  Tagen (Teilabbildung B) und bei der Gruppe der Tiere, die eine Injektion mit Liquor eines Patienten mit posttraumatischer Epilepsie erhielten, zwischen 1 und 8 Tagen, im Mittel bei  $3,4 \pm 1,1$  Tagen (Teilabbildung C). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht nicht (*t*-Test). Die in Klammern angegebenen Teilabbildungen beziehen sich auf Abbildung 3-2, die hierzu noch eine genauere Aufschlüsselung zeigt. Es ist u. a. dargestellt, wie viele Zellversuche an welchem postoperativen Tag durchgeführt wurden.



**Abbildung 3-3: Gewichtsverteilung der verwendeten Tiere der Versuchsreihe II**

Histogramm des Gewichtes der Tiere am Versuchstag. Die Zahl in den Säulen gibt an, wie viele Zellen von den jeweiligen Tieren stammen.

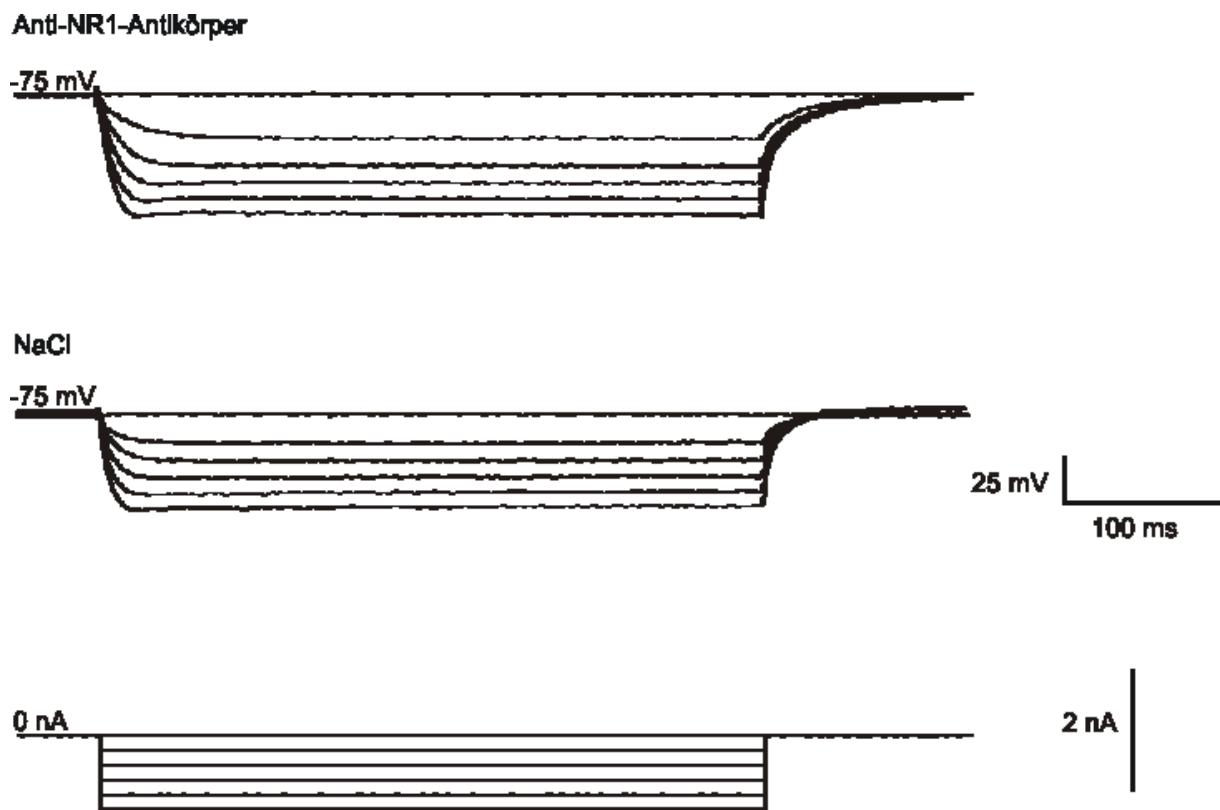
Das durchschnittliche Gewicht der Tiere bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe betrug  $246g \pm 11,5g$ , bei der Gangliogliom-Gruppe  $220g \pm 12,3g$  und bei der posttraumatischen-Epilepsie-Gruppe  $212g \pm 13,7g$ . Der Unterschied zwischen den Gruppen ist nicht signifikant ( $t$ -Test). Eine Zuordnung zu den Zellversuchen findet sich in Abbildung 3-3.

## 3.2 Membraneigenschaften

Während der Bearbeitung einer Versuchszelle erfolgte zuerst die Bestimmung der passiven Membraneigenschaften. Anschließend folgte die Untersuchung des Entladungsverhaltens. Dieses Vorgehen diente der Zellcharakterisierung und der Vitalitätsprüfung (siehe Kap. 2.2.4.4.3). Die benötigten Versuchsprotokolle finden sich im Kap. 7.2 in Tab. 10 im Anhang. In den folgenden Unterkapiteln erfolgt die Darstellung der ausgewerteten Daten.

### 3.2.1 Passive Membraneigenschaften

#### Anti-NR1-Antikörper vs. NaCl-Kontrollen

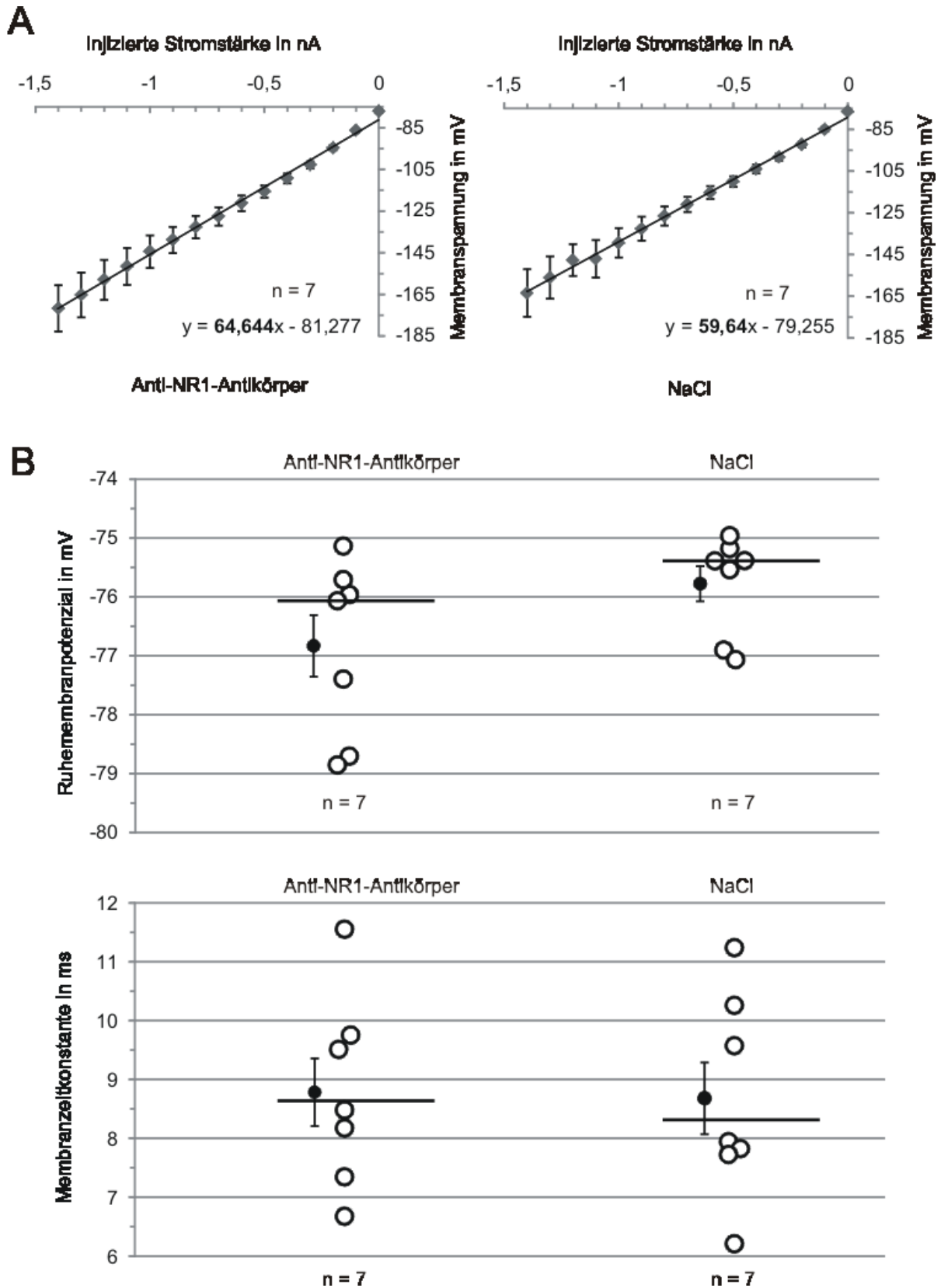


**Abbildung 3-4: Repräsentative Messspuren der Versuchsreihe I**

Zur besseren Übersicht sind nur die Stimulationsstärken 0, -200, -400, -600, -800 und -1000pA dargestellt.

Abbildung 3-4 zeigt beispielhaft jeweils eine repräsentative Messspur für die beiden Versuchsgruppen sowie die entsprechende Stimulationsspur, an der sich der in die Zelle injizierte negative Strom ablesen lässt. Es ist nur eine Auswahl an Stimulationsstärken abgebildet, um (1) die Übersichtlichkeit zu verbessern und (2) den Zusammenhang zwischen der Injektion von negativem Strom und der folgenden Hyperpolarisation der Zelle nutzbringender zu veranschaulichen.





**Abbildung 3-5: Synopsis der passiven Membraneigenschaften der Versuchsreihe I**

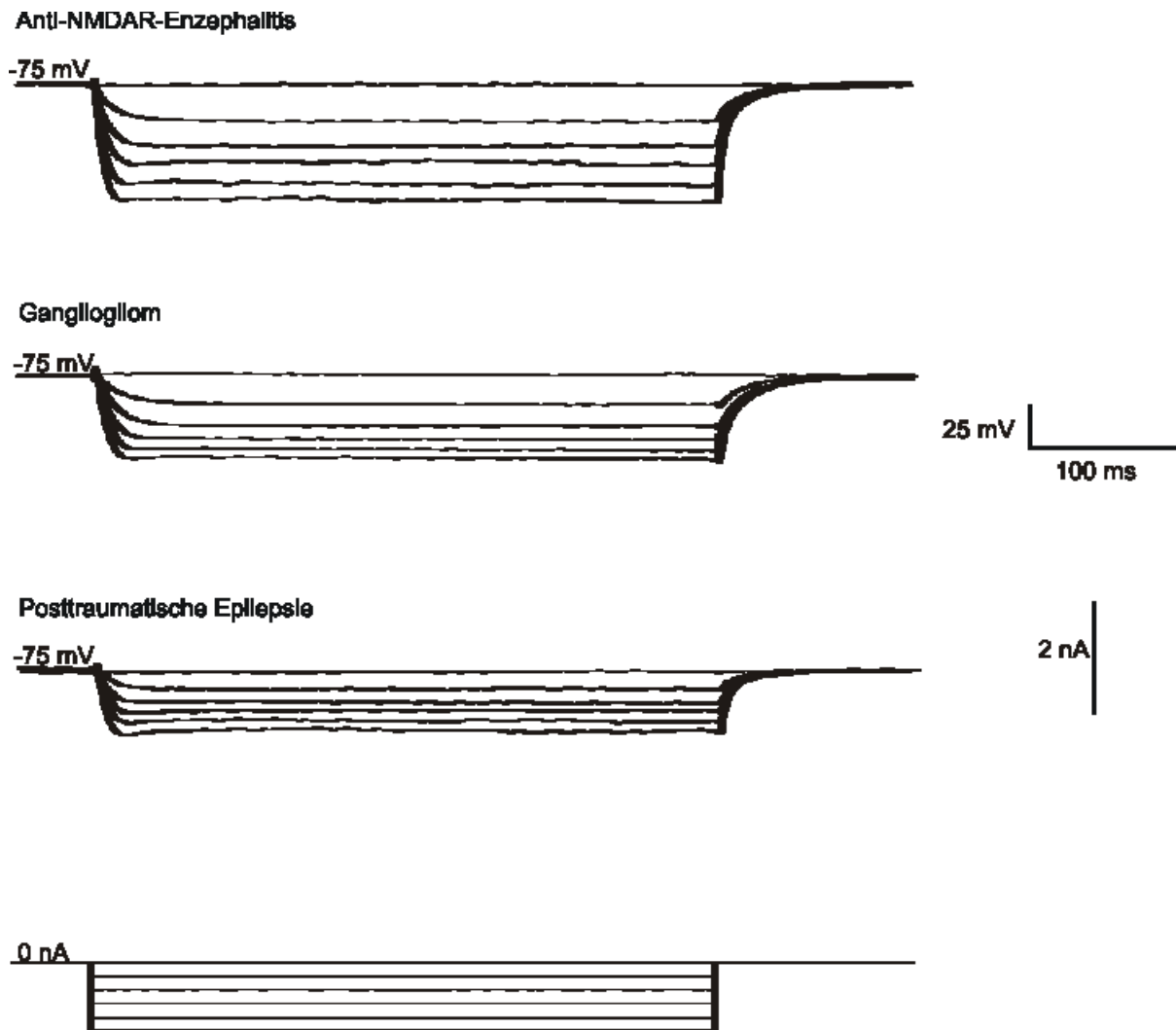
A Der Membranwiderstand ist die Steigung der Geraden und fett gedruckt.

B — Median, ●  $\bar{x} \pm S.E.M.$ , ○ Einzelwerte

Dieser oben erwähnte Zusammenhang, gemeint ist die Korrelation zwischen injizierter Stromstärke und Hyperpolarisation der Zelle, war bei allen Zellen der Versuchsgruppen sichtbar (siehe Abbildung 3-5, Teilabbildung A). Die Ergebnisse der Regressionsanalyse bei der Anti-NR1-Antikörper-Gruppe mit  $R^2 = 0,9967$  und bei der NaCl-Kontrollgruppe mit  $R^2 = 0,9972$  bestätigen diese Beobachtung.

Die Auswertung der passiven Membraneigenschaften erfolgte – wie in Kap. 2.2.5.2 erläutert – an insgesamt sieben Versuchszellen je Versuchsgruppe. Somit ist der Membranwiderstand bei der Anti-NR1-Antikörper-Gruppe mit  $64,64\text{M}\Omega \pm 8,56\text{M}\Omega$  und bei der NaCl-Kontrollgruppe mit  $59,64\text{M}\Omega \pm 8,37\text{M}\Omega$  zu beziffern. Die Einzelwerte für das Ruhemembranpotenzial und die Membranzeitkonstante sind ebenfalls in Abbildung 3-5 (Teilabbildung B) dargestellt. Das Ruhemembranpotenzial liegt im Mittel bei der Anti-NR1-Antikörper-Gruppe bei  $-76,8\text{mV} \pm 0,5\text{mV}$  und die Membranzeitkonstante bei  $8,8\text{ms} \pm 0,6\text{ms}$ . Für die NaCl-Kontrollgruppe ergaben sich  $-75,8\text{mV} \pm 0,3\text{mV}$  für das Ruhemembranpotenzial sowie  $8,7\text{ms} \pm 0,6\text{ms}$  für die Membranzeitkonstante. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen passiven Membraneigenschaften konnte nicht festgestellt werden. Da der Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung bei den Daten des Membranwiderstands ergab, erfolgte die Signifikanztestung hier mit dem *U*-Test; die Testung der Daten des RMP und der Membranzeitkonstante wurde mit dem *t*-Test durchgeführt.

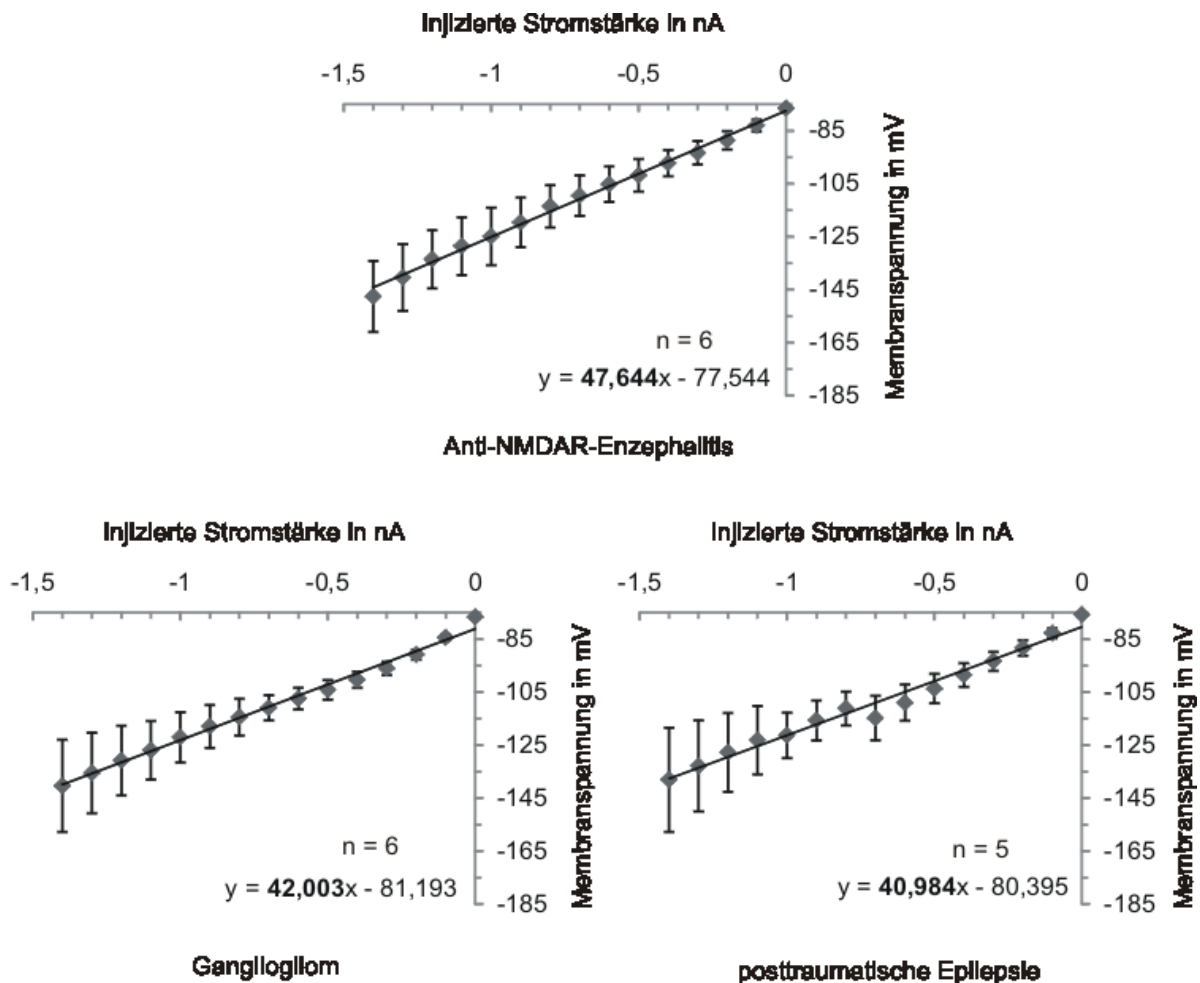
## Anti-NMDAR-Enzephalitis-Liquor vs. Kontrollliquores



### Abbildung 3-6: Repräsentative Messspuren der Versuchsreihe II

Zur besseren Übersicht sind nur die Stimulationsstärken 0, -200, -400, -600, -800 und -1000 pA dargestellt.

Abbildung 3-6 zeigt in gleicher Art und Weise wie Abbildung 3-4 repräsentative Messspuren der Versuchsreihe II der hyperpolarisierenden StSpSp. Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass die Injektion eines negativen Stromes eine Hyperpolarisierung der Zellmembranspannung zur Folge hat, die von der Höhe des injizierten Stromes abhängig ist. Geringe Unterschiede der Membranwiderstände lassen sich bereits an den Ableitungen erkennen. So ist die Hyperpolarisation z. B. bei der dargestellten Zelle der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe stärker ausgeprägt als bei den Kontrollgruppen.

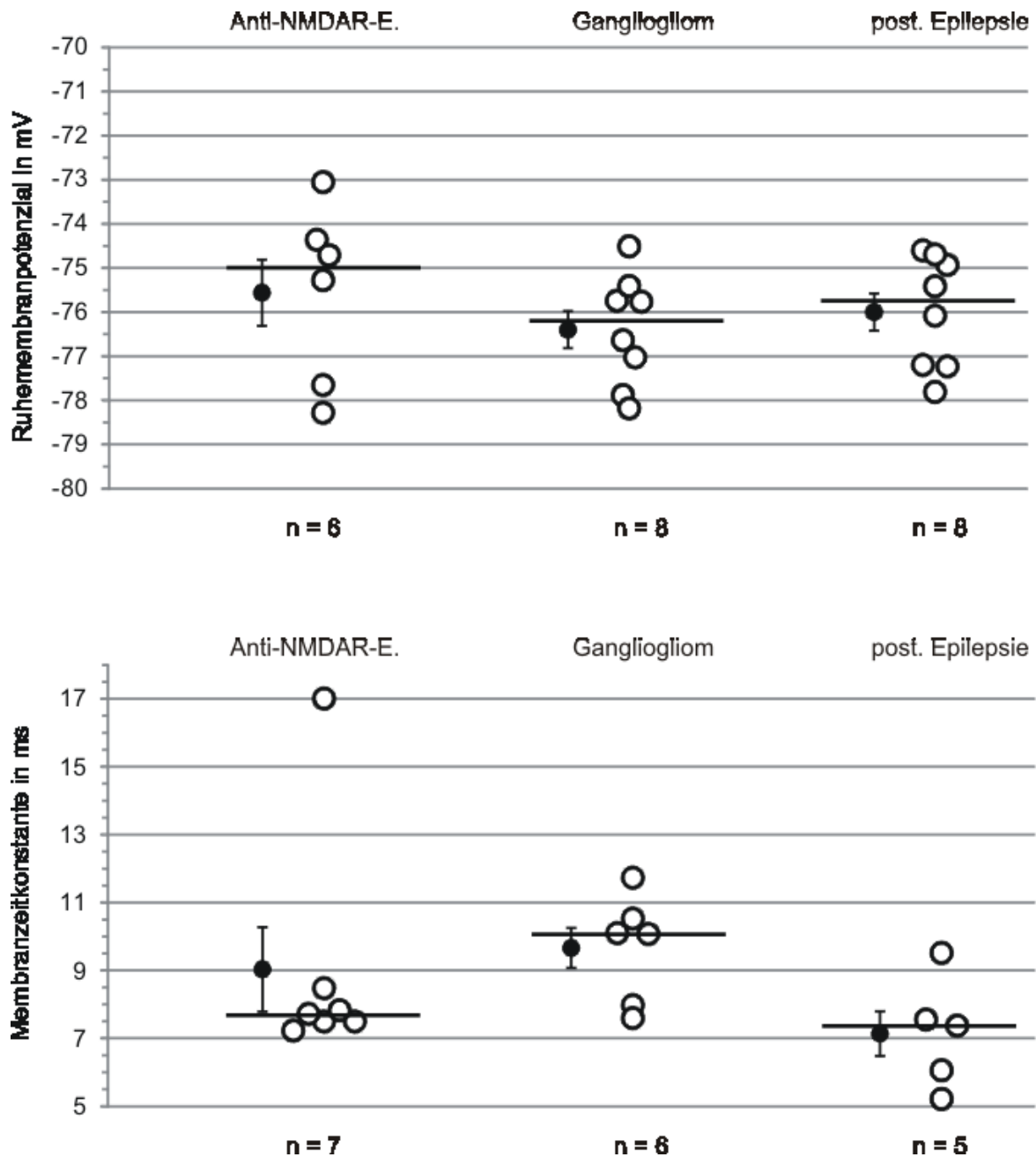


**Abbildung 3-7: Strom-Spannungs-Kennlinien der Versuchsreihe II**

Der Membranwiderstand ist die Steigung der Geraden und fett gedruckt.

Die oben beschriebene Korrelation ist auch hier – wie Abbildung 3-7 zeigt – deutlich zu erkennen. Die Regression liegt bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe bei  $R^2 = 0,9954$  bzw. bei der Gangliogliom-Kontrollgruppe bei  $R^2 = 0,9915$  und bei der posttraumatischen-Epilepsie-Kontrollgruppe bei  $R^2 = 0,9791$ .

Die weitere Auswertung der passiven Membraneigenschaften ergab folgende Resultate. Der Membranwiderstand der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe beträgt nach Auswertung von sechs Versuchszellen  $47,64M\Omega \pm 8,78M\Omega$ . Bei den Kontrollgruppen liegt er bei  $42M\Omega \pm 9,67M\Omega$  für die Gangliogliom-Gruppe mit insgesamt sechs auswertbaren Versuchszellen und bei  $40,98M\Omega \pm 14M\Omega$  für die posttraumatische-Epilepsie-Gruppe mit insgesamt fünf auswertbaren Versuchszellen. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Testgruppe und den Kontrollgruppen besteht nicht (*t*-Test).



**Abbildung 3-8: RMP und Membranzeitkonstante der Versuchsreihe II**

— Median, ●  $\bar{x} \pm S.E.M.$ , ○ Einzelwerte

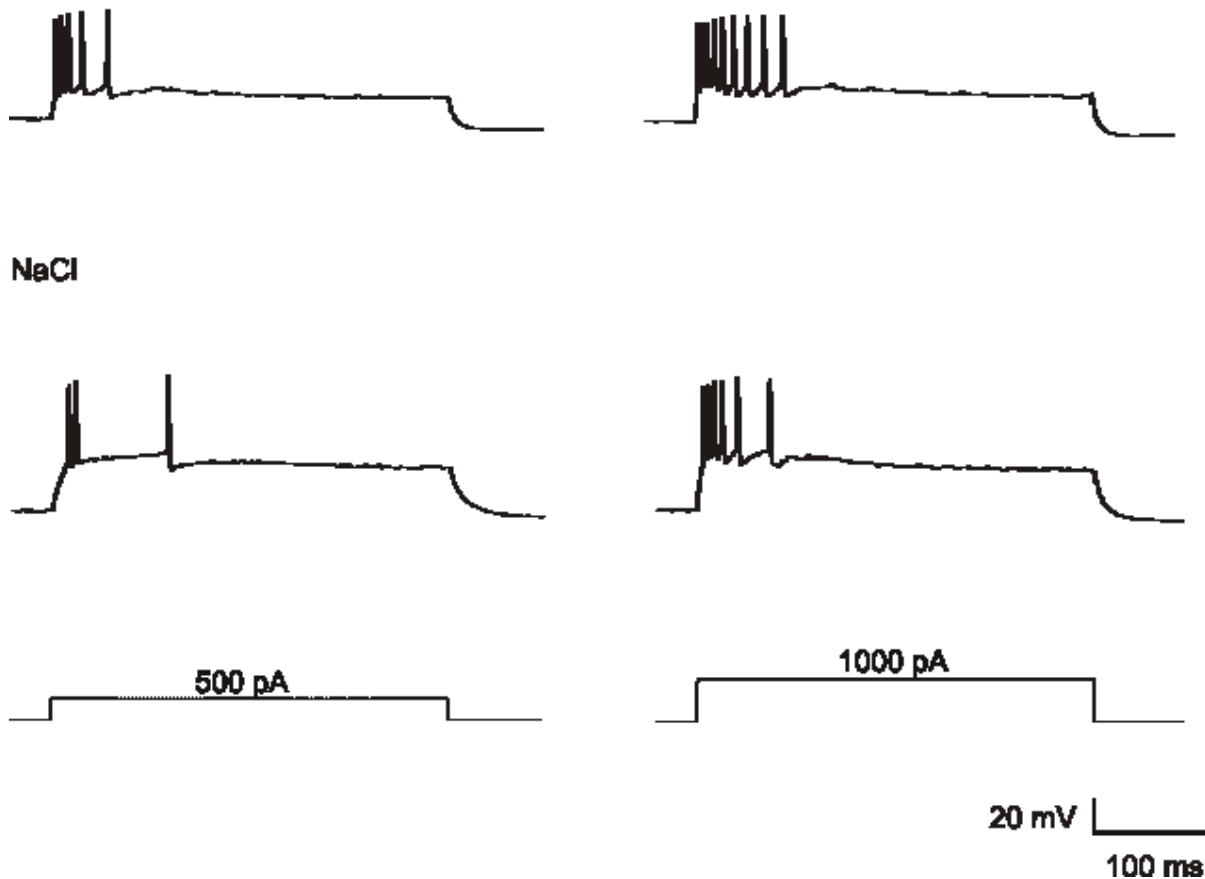
Auch hier sind die Einzelwerte für das Ruhemembranpotenzial sowie für die Membranzeitkonstante (siehe Abbildung 3-8) dargestellt. Das mittlere Ruhemembranpotenzial beträgt  $-75,6\text{mV} \pm 0,8\text{mV}$  nach der Auswertung von sechs Versuchszellen bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe,  $-76,4\text{mV} \pm 0,4\text{mV}$  bzw.  $-76,0\text{mV} \pm 0,4\text{mV}$  bei der Gangliogliom- bzw. der posttraumatischen-Epilepsie-Kontrollgruppe mit jeweils acht bzw. neun auswertbaren Versuchszellen. Die Membranzeitkonstante liegt bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe bei  $9,0\text{ms} \pm 1,2\text{ms}$ . Bei den Kontrollgruppen beläuft sich der Wert auf  $9,7\text{ms} \pm 0,6\text{ms}$  für die Gangliogliom- bzw. bei  $7,1\text{ms} \pm 0,7\text{ms}$  für die

posttraumatische-Epilepsie-Gruppe. Die angegebenen Werte der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe und der Kontrollgruppen unterscheiden sich nicht signifikant. Da der Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung bei den Daten der Membranzeitkonstante ergab, erfolgte die Signifikanztestung hier mit dem *U*-Test; die Testung der Daten des RMP wurde mit dem *t*-Test durchgeführt.

### 3.2.2 Entladungsverhalten

#### Anti-NR1-Antikörper vs. NaCl-Kontrolle

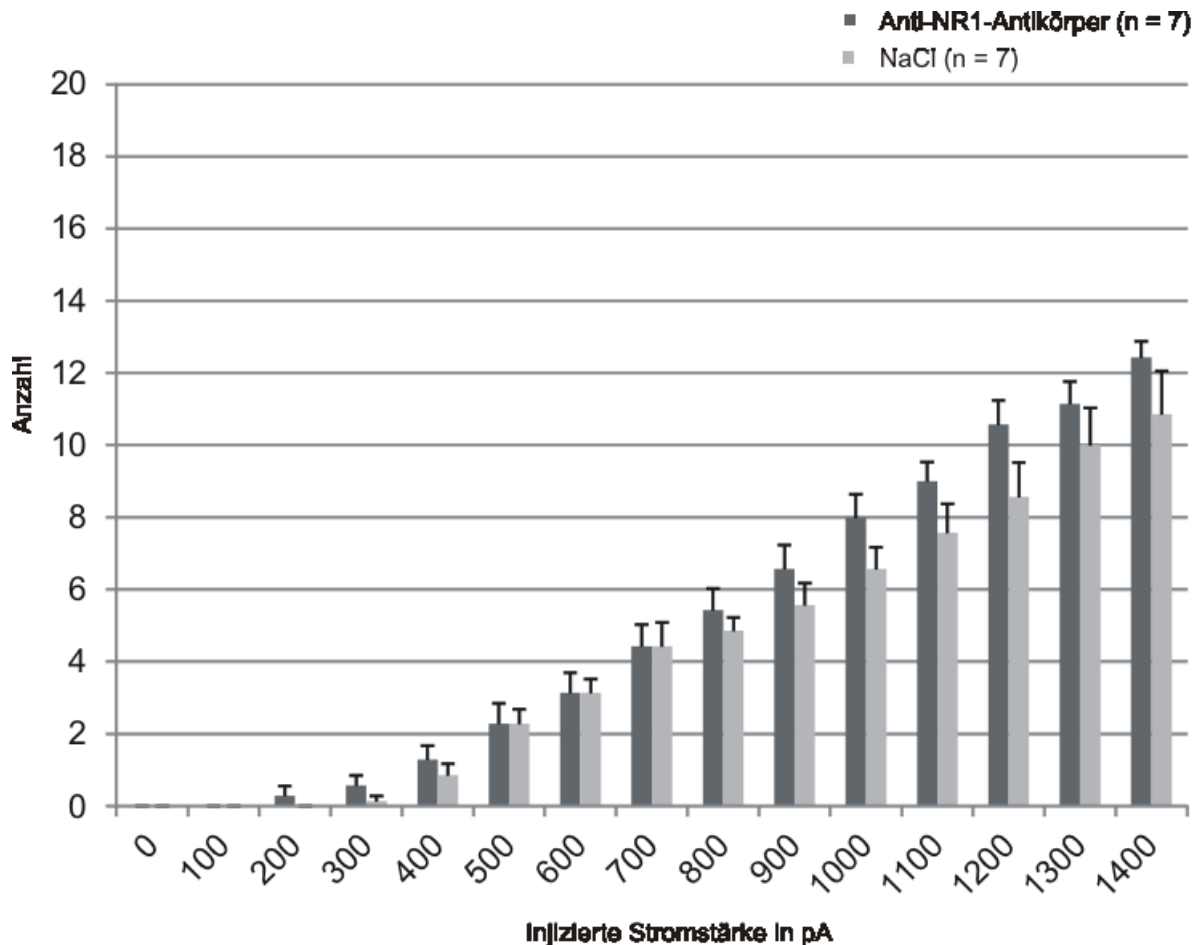
##### Anti-NR1-Antikörper



**Abbildung 3-9: Repräsentative Messspuren der Versuchsreihe I**

Abbildung 3-9 stellt den Zusammenhang zwischen der Injektion eines positiven Stromes in die Zelle und der daraus ab einem bestimmten Schwellenwert resultierenden Auslösung von Aktionspotenzialen an repräsentativen Messspuren für die jeweiligen Versuchsgruppen dieser Versuchsreihe dar. Die Messspuren sind so gewählt, dass verständlich wird, dass bei einem Anstieg des positiven Stimulationsstromes die Anzahl der evozierten Aktionspotenziale

zunimmt. Die Stimulationsspur, die ebenfalls eingezeichnet ist, zeigt die Stärke (500 bzw. 1000pA) sowie die Dauer (350ms) des jeweiligen Stimulus an.



**Abbildung 3-10: Entladungsverhalten der Versuchsreihe I**

Histogramm der Anzahl der Aktionspotenziale bei einer injizierten Stromstärke von 0 bis 1400pA.

Es konnten auch hier insgesamt sieben Zellversuche pro Versuchsgruppe ausgewertet werden. Die starke Korrelation zwischen injiziertem positivem Strom und Anzahl der evozierten Aktionspotenziale lässt sich aus Abbildung 3-10 ablesen. Die mittlere Anzahl an evozierten Aktionspotenzialen liegt bei der Anti-NR1-Antikörper-Gruppe bei 500pA bei  $2,3 \pm 0,6$ , bei 1000pA bei  $8 \pm 0,6$  und schließlich bei 1400pA bei  $12,4 \pm 0,4$ . Im Vergleich hierzu sind die Zahlen bei der NaCl-Kontrollgruppe bei 500pA bei  $2,3 \pm 0,4$ , bei 1000pA bei  $6,6 \pm 0,6$  und bei 1400pA bei  $10,9 \pm 1,2$ . Die Unterschiede sind nicht signifikant ( $t$ -Test).

**Anti-NMDAR-Enzephalitis-Liquor vs. Kontrollliquores**

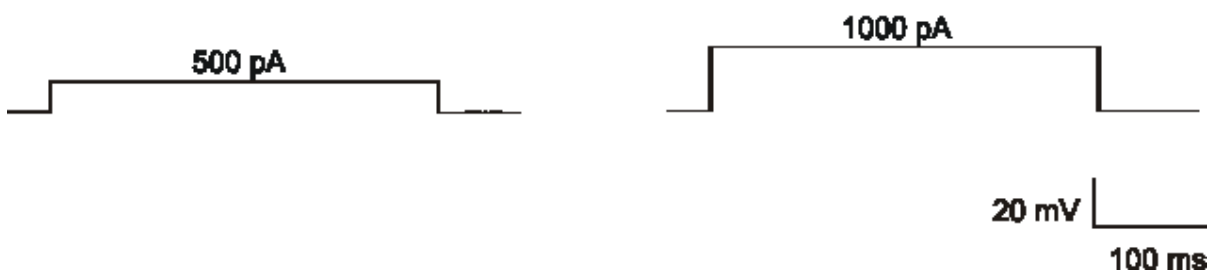
**Anti-NMDAR-Enzephalitis**



**Gangliogliom**



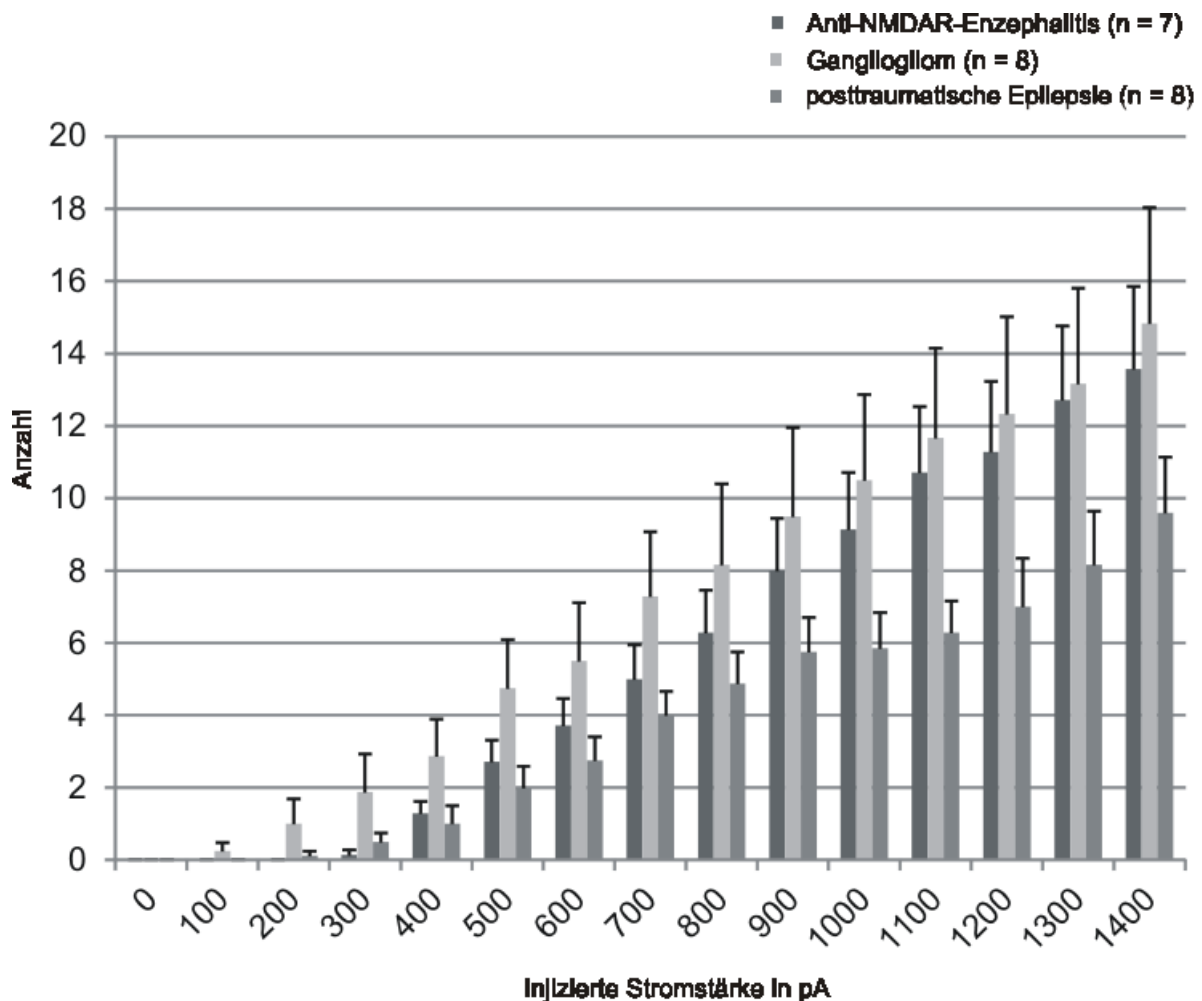
**posttraumatische Epilepsie**



**Abbildung 3-11: Repräsentative Messspuren der Versuchsreihe II**

Abbildung 3-11 zeigt an drei repräsentativen Messspuren, dass es auch bei dieser Versuchsreihe einen Zusammenhang zwischen injiziertem positivem Strom und der Anzahl der evozierten Aktionspotenziale gibt. Allerdings lässt sich hier zusätzlich erkennen, dass unterschiedliche Entladungsmuster möglich sind – z. B. eine Entladungssalve nur zu Beginn der positiven Strominjektion (siehe Beispiel der Gangliogliom-Gruppe).





**Abbildung 3-12: Entladungsverhalten der Versuchsreihe II**

Histogramm der Anzahl der Aktionspotenziale bei einer injizierten Stromstärke von 0 bis 1400pA.

Es konnten sieben Versuchszellen der Anti-NMDAR-Enzephalitis- und jeweils acht der Kontrollgruppen untersucht werden. Abbildung 3-12 verdeutlicht die o. g. Korrelation. Die Anzahl an evozierten Aktionspotenzialen ist bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe bei 500pA bei  $2,7 \pm 0,6$ , bei 1000pA bei  $9,1 \pm 1,6$  und bei 1400pA bei  $13,6 \pm 2,3$ . Bei der Gangliogliom- bzw. bei der posttraumatische-Epilepsie-Gruppen sind es bei 500pA  $4,8 \pm 1,3$  bzw.  $2,0 \pm 0,6$ , bei 1000pA  $10,5 \pm 2,4$  bzw.  $5,9 \pm 1$  und bei 1400pA  $14,8 \pm 3,2$  bzw.  $9,6 \pm 1,5$ . Die zwischen der Testgruppe und den Kontrollgruppen bestehenden geringen Unterschiede sind nicht signifikant (*t*-Test).

### 3.3 Input-Output-Kurven

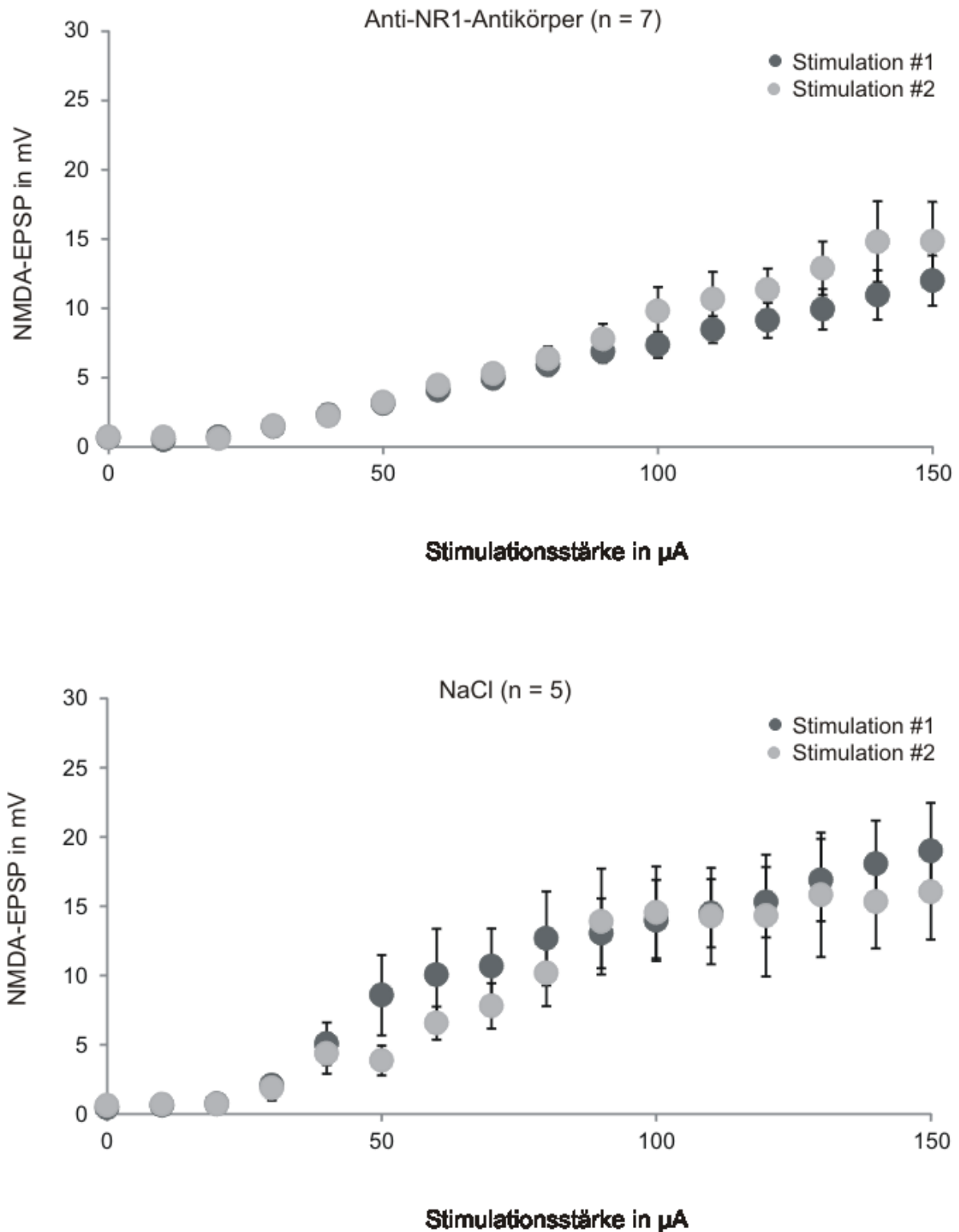
Der zweite und entscheidende Schritt in der Bearbeitung einer Versuchszelle war die Erstellung von Input-Output-Kurven. Eine Beschreibung der genauen Vorgehensweise ist dem Kap. 2.2.4.4.4 zu entnehmen. Die entsprechende genaue Darstellung des Versuchsprotokolls findet sich im Kap. 7.3 in der Tab. 11 im Anhang.

Das Ziel dieser Untersuchung ist die Beantwortung der Fragestellung, ob Unterschiede der EPSPs bei der Stimulation mit aufsteigenden Stromstärken zwischen den Testgruppen und den jeweiligen Kontrollgruppen bestehen, die einen möglichen Zusammenhang zwischen den Symptomen der Anti-NMDAR-Enzephalitis (siehe Kap. 1.1.1) und dem Nachweis des Antikörpers gegen die NR1-Untereinheit im Liquor der Patienten (siehe Kap. 1.3) pathophysiologisch erklären können.

#### **Anti-NR1-Antikörper vs. NaCl-Kontrolle**

Die Stimulationsstärke bei den Versuchen der Versuchsreihe I wurde von  $0\mu\text{A}$  bis  $150\mu\text{A}$  kontinuierlich in  $10\mu\text{A}$ -Schritten erhöht. Die Stimulation erfolgte über den Tractus perforans.

Abbildung 3-13 zeigt das Doppelpulsverhältnis der beiden Versuchsgruppen. Der geringe Unterschied, der bei beiden Gruppen zwischen der ersten und der zweiten Stimulation erkennbar ist, ist nicht signifikant (KS-Test). Es ist somit davon auszugehen, dass zwischen der Stimulation des medialen und des lateralen Tractus perforans ein ausgeglichenes Verhältnis bestand. Allerdings ist es sehr wahrscheinlich, dass ab einer bestimmten Stromstärke generell beide Anteile des Fasertraktes erfasst werden.

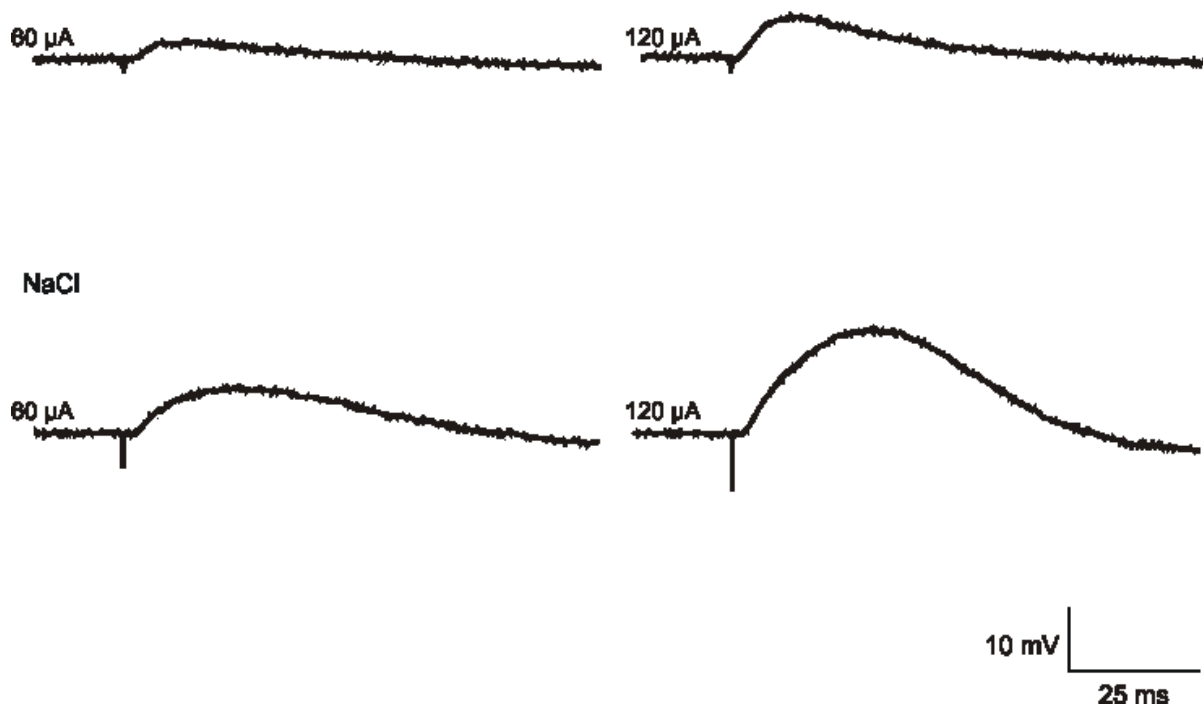


**Abbildung 3-13: Doppelpulsverhältnis der Versuchsreihe I**

Der Unterschied zwischen der ersten und der zweiten Stimulation ist bei der jeweiligen Versuchsgruppe nicht signifikant. Daher wurde weder über den medialen noch über den lateralen Tractus perforans häufiger stimuliert.

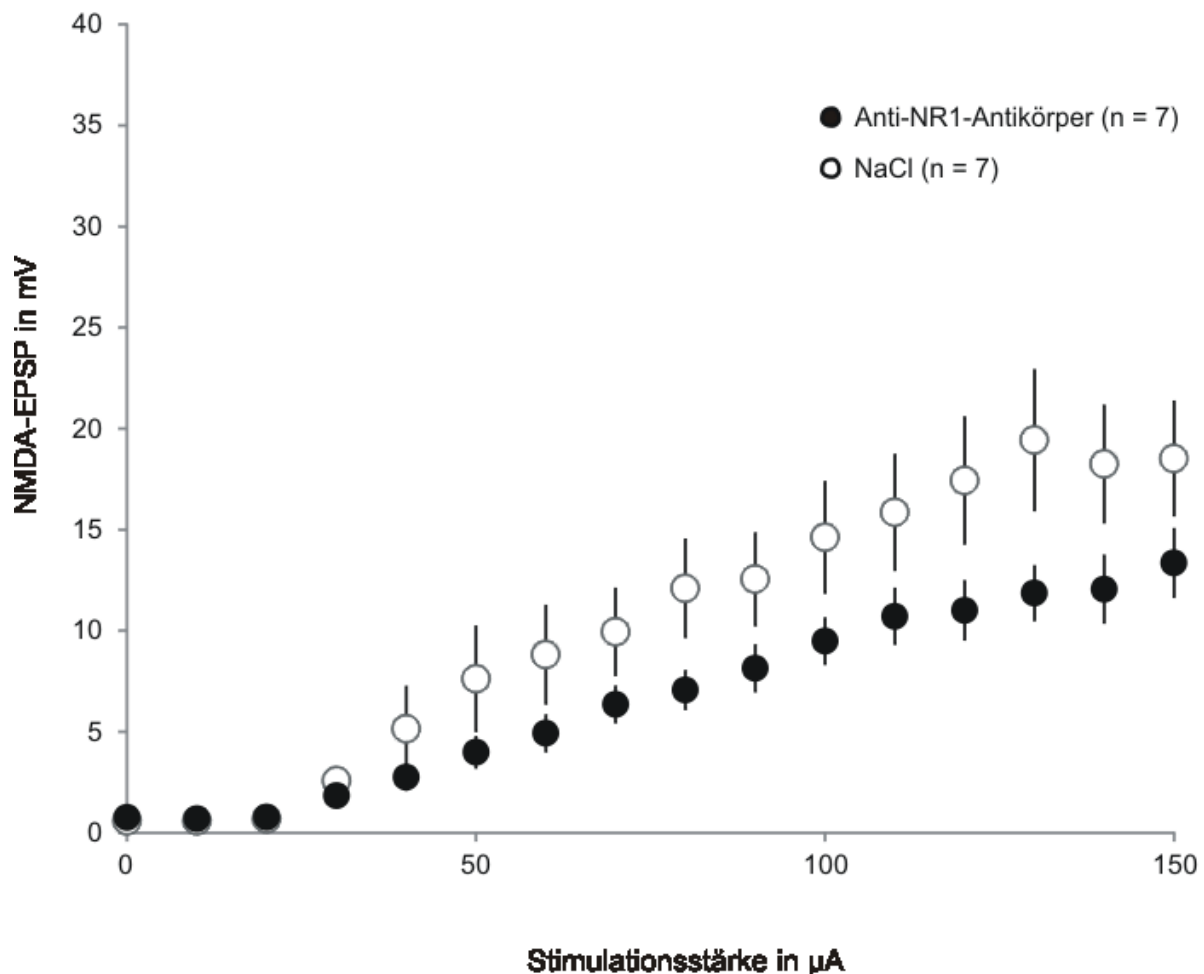
Abbildung 3-14 stellt exemplarisch die Messspuren einer Einzelpulsmessung einer Versuchszelle der Anti-NR1-Antikörper- sowie der NaCl-Gruppe bei 60 bzw. 120  $\mu\text{A}$  dar. Bei der Zelle der Anti-NR1-Gruppe liegt die Amplitude des EPSP bei 60  $\mu\text{A}$  bei 4,79mV und bei 120  $\mu\text{A}$  bei 11,13mV. Bei der NaCl-Versuchszelle hingegen ist die Amplitude bei 60  $\mu\text{A}$  bei 12,36mV und bei 120  $\mu\text{A}$  bei 28,49mV. Es lässt sich folglich ein deutlicher Unterschied von 7,57mV bei 60  $\mu\text{A}$  Stimulationsstärke bzw. von 17,36mV bei 120  $\mu\text{A}$  im Generierungspotenzial für EPSPs der beiden Zellen feststellen. Es bleibt jedoch die Frage, ob dieser deutliche Einzelbefund auch als Gesamtbefund nach Auswertung aller Zellversuche dieser Versuchsreihe Bestand hat.

#### Anti-NR1-Antikörper



**Abbildung 3-14: Repräsentative Messspuren der Versuchsreihe I**

Für die Auswertung des Gesamtbefundes standen insgesamt jeweils sieben Zellen pro Versuchsgruppe dieser Versuchsreihe zur Verfügung. Die genaue Vorgehensweise bei der Auswertung war für beide Versuchsreihen identisch und kann im Kap. 2.2.5.3 nachgelesen werden.



### Abbildung 3-15: Input-Output-Kurven der Versuchsreihe I

Darstellung der Amplitude der EPSP der Versuchszellen der beiden Versuchsgruppen der Versuchsreihe I bei einer Stimulation von  $0\mu\text{A}$  bis  $150\mu\text{A}$  mit einer Erhöhung um  $10\mu\text{A}$  je Stimulus und einem Intervall von 30s zwischen den einzelnen Stimuli. Die Stimulation erfolgte über den Tractus perforans. Der sichtbare Unterschied zwischen den beiden Input-Output-Kurven ist mit einem p-Wert  $< 0,05$  (KS-Test) signifikant.

Die oben geäußerte Frage, ob der Einzel- als Gesamtbefund für diese Versuchsreihe bestätigt werden kann, muss mit Blick auf Abbildung 3-15 eindeutig bejaht werden. Der für eine Input-Output-Kurve typische sigmoidale Verlauf lässt sich erkennen und bedeutet, dass ab einem bestimmten Schwellenwert die Amplitude der EPSPs nicht weiter bzw. nur noch minimal gesteigert werden kann. Als Ursache hierfür ist die Tatsache anzusehen, dass ab einer bestimmten Stimulationsstärke die Schwelle zur Bildung von Aktionspotenzialen erreicht ist. Dies führt dazu, dass die EPSP-Amplitude nur noch geringfügig steigt, dafür aber die Anzahl an evozierten Aktionspotenziale zunehmen kann bzw. überhaupt erst Aktionspotenziale ausgeprägt werden können (zum besseren Verständnis siehe Abbildung 2-11). Die Schwierigkeiten, die sich aus diesem elektrophysiologisch normalen Verhalten für die Auswertung ergeben, sind ebenfalls in Kap. 2.2.5.3 detailliert beschrieben.

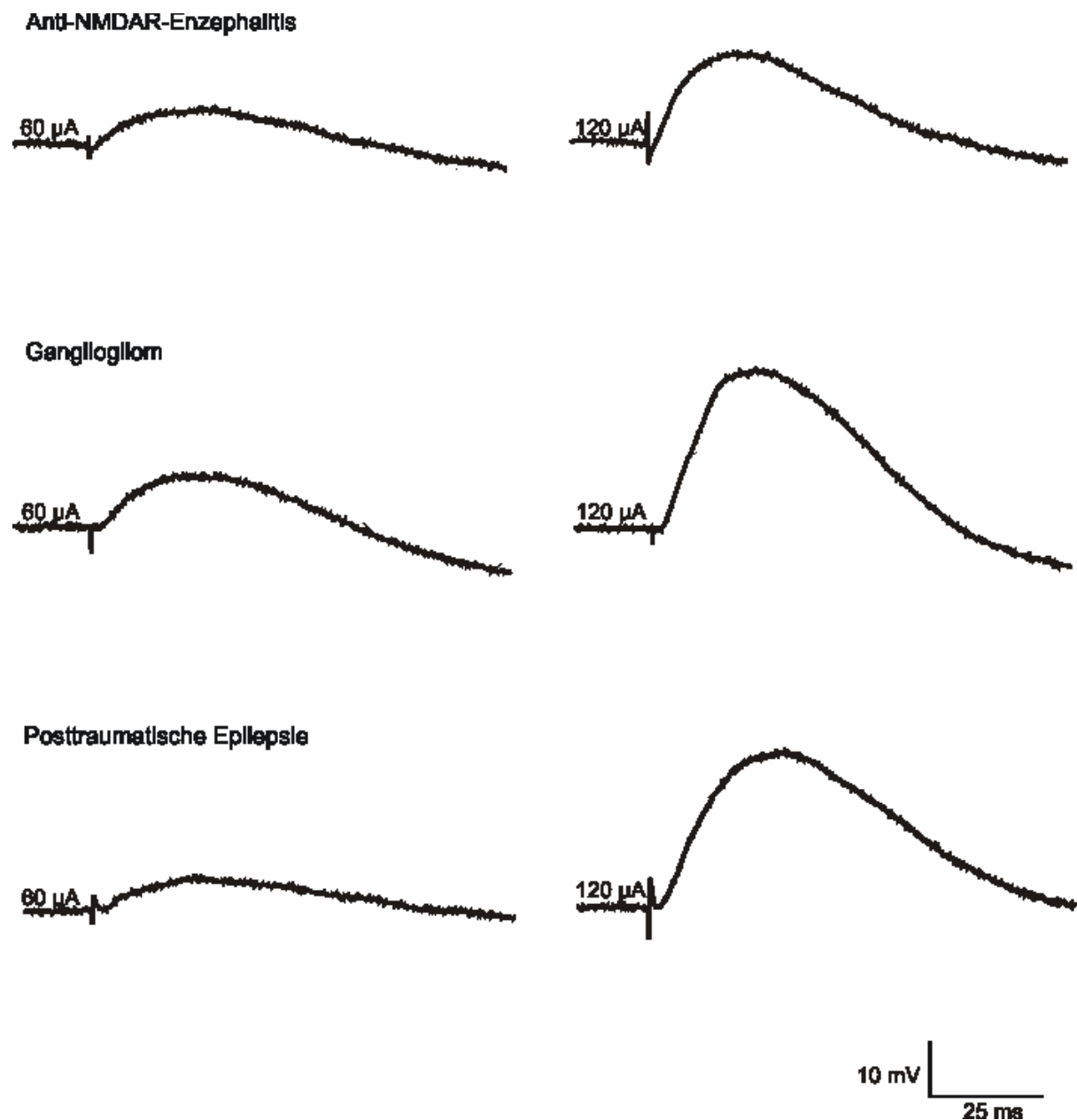
Die EPSP-Amplitude beträgt im Mittel bei der Anti-NR1-Antikörper-Gruppe bei 50 $\mu$ A 3,98mV  $\pm$  0,78mV, bei 100 $\mu$ A 9,48mV  $\pm$  1,14mV und bei 150 $\mu$ A 13,35mV  $\pm$  1,70mV. Bei der NaCl-Kontrollgruppe liegen die Werte im Mittel bei 50 $\mu$ A bei 7,61mV  $\pm$  2,61mV, bei 100 $\mu$ A bei 14,61mV  $\pm$  2,76mV und bei 150 $\mu$ A bei 18,52mV  $\pm$  2,84mV. Diese drei Stimulationsstärken wurden beispielhaft ausgewählt, die übrigen Werte sind der Abbildung 3-15 zu entnehmen.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Auswertung der Input-Output-Kurven der Versuchsreihe I einen signifikanten Unterschied (p-Wert < 0,05, KS-Test) zwischen dem Generierungspotenzial für EPSPs bei der Anti-NR1-Antikörper-Gruppe gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe ergeben hat. Es ist daher davon auszugehen, dass der kommerzielle Anti-NR1-Antikörper den NMDA-Rezeptor in seiner Funktionsfähigkeit hinsichtlich der Generierung von EPSPs deutlich einschränkt.

### **Anti-NMDAR-Enzephalitis-Liquor vs. Kontrollliquores**

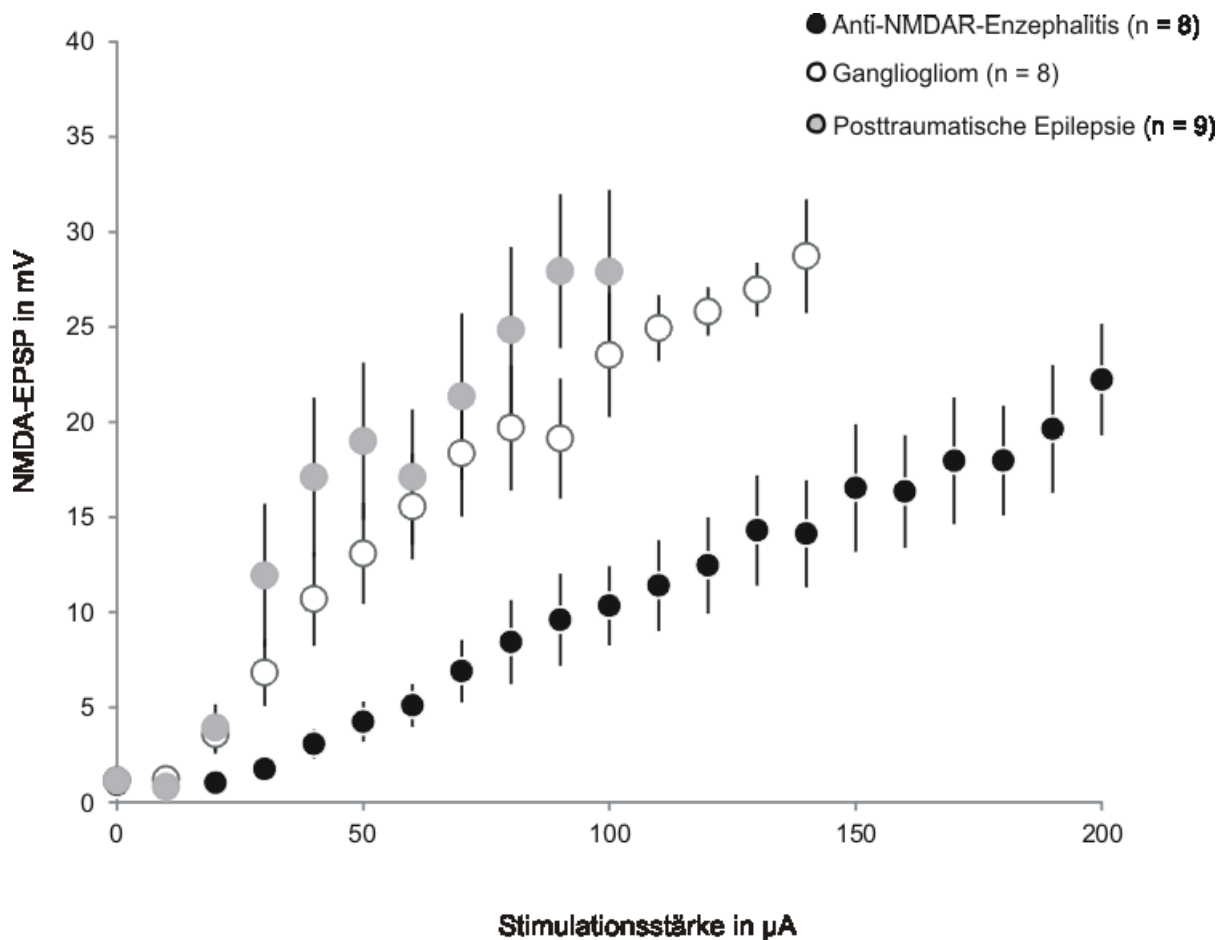
Vor diesem Hintergrund erfolgte die Planung und Durchführung der Versuchsreihe II mit demselben Versuchsprotokoll (wie bei Versuchsreihe I). Denn es erschien sinnvoll und gerechtfertigt zu untersuchen, ob eine Testung mit dem humanen Antikörper, der bei Patienten mit Anti-NMDAR-Enzephalitis im Liquor nachgewiesen werden kann, zu dem gleichen oder zumindest einem ähnlichen Ergebnis kommen würde.

Die Stimulationsstärke bei den Versuchen der Versuchsreihe II wurde gegenüber der Versuchsreihe I von 0 $\mu$ A bis 200 $\mu$ A kontinuierlich in 10 $\mu$ A-Schritten erhöht. Die Stimulation erfolgte ebenfalls über den Tractus perforans. Eine zuverlässige und belastbare Auswertung des Doppelpulsverhältnisses war leider nicht möglich. Zunächst fehlt bei einigen Versuchszellen ein kompletter Datensatz bzgl. des Doppelpulsverhältnisses, da nur Probestimulationen mit ausgewählten Stromstärken durchgeführt wurden. Außerdem gestaltete sich gerade die Auswertung des zweiten Stimulus durch viele aufgesetzte Aktionspotenziale als nicht durchführbar. Der Grund hierfür ist der in Kap. 2.2.5.3 bereits angesprochene nicht vollständige Abfall des Membranpotenzials auf Werte vor der ersten Stimulation. Hierdurch sind die Ausgangsbedingungen unterschiedlich und die Schwelle kann schneller erreicht werden.



**Abbildung 3-16: Repräsentative Messspuren der Versuchsreihe II**

Mit Abbildung 3-16 sind bei der Versuchsreihe II ebenfalls mustergültige Einzelpulsmessspuren für jede der untersuchten Versuchsgruppen dargestellt. Das EPSP beläuft sich bei der abgebildeten Versuchszelle der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe bei  $60\mu\text{A}$  auf  $7,10\text{mV}$  und bei  $120\mu\text{A}$  auf  $14,70\text{mV}$ . Bei der Gangliogliom-Kontrollgruppe sind es bei  $60\mu\text{A}$   $8,31\text{mV}$  und bei  $120\mu\text{A}$   $26,46\text{mV}$  bzw.  $6,88\text{mV}$  und  $29,69\text{mV}$  bei der posttraumatischen-Epilepsie-Kontrollgruppe. Gerade bei der Stimulation mit  $120\mu\text{A}$  zeigt sich hier eine deutliche Differenz. Es stellt sich auch hier die Frage, ob ein Übertrag von der Einzelzelle auf die Gesamtheit der ausgewertet Zellen möglich ist.



### Abbildung 3-17: Input-Output-Kurven der Versuchsreihe II

Darstellung der Amplitude der EPSP der Versuchszellen der drei Versuchsgruppen der Versuchsreihe II bei einer Stimulation von  $0\mu\text{A}$  bis  $100\mu\text{A}$ ,  $140\mu\text{A}$  bzw.  $200\mu\text{A}$  mit einer Erhöhung um  $10\mu\text{A}$  je Stimulus und einem Intervall von  $30\text{s}$  zwischen den einzelnen Stimuli. Die Stimulation erfolgte über den Tractus perforans. Der sichtbare Unterschied zwischen der Input-Output-Kurve der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe und den Kontrollgruppen ist mit einem  $p\text{-Wert} < 0,05$  (KS-Test) signifikant.

Es konnten insgesamt acht Zellen der Anti-NMDAR-Enzephalitis-, acht Zellen der Gangliogliom- sowie neun Zellen der posttraumatischen-Epilepsie-Gruppe ausgewertet werden. Die Auswertung gestaltete sich jedoch aufgrund der teilweise sehr frühen Ausbildung von Aktionspotenzialen bei den Kontrollgruppen (siehe hierzu auch Kap. 2.2.5.3) schwierig. In der Folge konnte eine zuverlässige Auswertung der Gangliogliom-Gruppe nur bis zu einer Stimulationsstärke von  $140\mu\text{A}$  und bei der posttraumatischen-Epilepsie-Gruppe nur bis  $100\mu\text{A}$  erfolgen. Hieraus ergibt sich die eingeschränkte Darstellung in Abbildung 3-17. Der oben angesprochene Aspekt der frühen Ausbildung von Aktionspotenzialen wird im Anschluss an dieses Kapitel noch ausführlicher beleuchtet.

Abbildung 3-17 zeigt einen sigmoidalen Verlauf bei den Input-Output-Kurven der Kontrollgruppe, bei der Kurve der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe ist dieser Verlauf nur



angedeutet, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das EPSP bei einer weiteren Erhöhung der Stimulationsstärke noch steigerbar gewesen wäre. Der unharmonischere Verlauf der Kurven der Kontrollgruppen gegenüber der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe spiegelt ebenfalls die Schwierigkeiten bei der Auswertung wider. Außerdem wird ein deutlicher Unterschied zwischen der Kurve der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe und den Kontrollgruppen sichtbar.

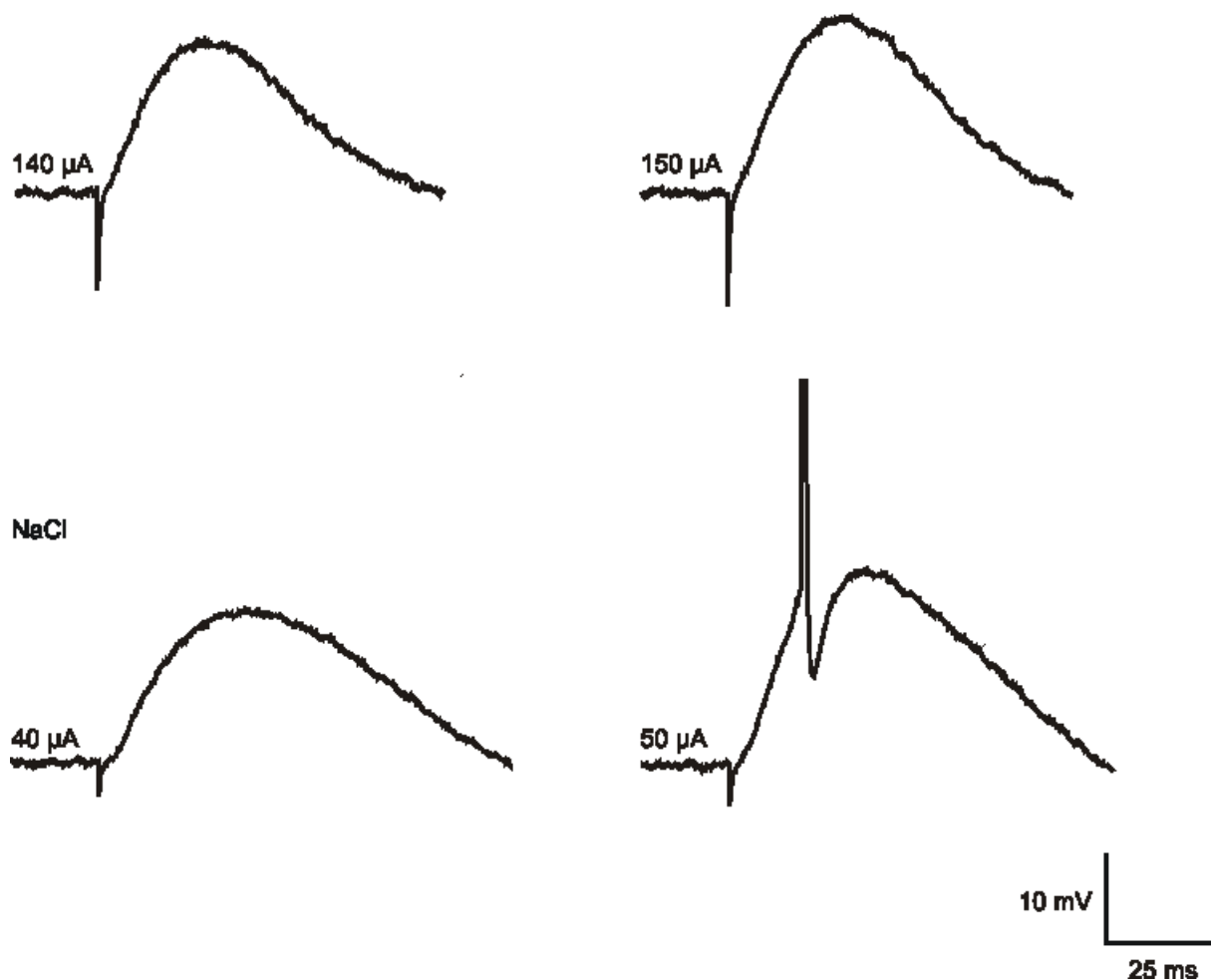
Im Mittel liegt das EPSP bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe bei 50 $\mu$ A bei 4,24mV  $\pm$  1,02mV, bei 100 $\mu$ A bei 10,34mV  $\pm$  2,05mV, bei 140  $\mu$ A bei 14,12mV  $\pm$  2,78mV und bei 200 $\mu$ A bei 22,23mV  $\pm$  2,90mV. Bei der Gangliogliom-Kontrollgruppe betragen die Werte bei 50 $\mu$ A 13,09mV  $\pm$  2,62mV, bei 100 $\mu$ A 23,52mV  $\pm$  3,23mV und bei 140 $\mu$ A 28,72mV  $\pm$  2,96mV. Die Werte der posttraumatischen-Epilepsie-Kontrollgruppe sind mit 18,99mV  $\pm$  4,09mV bei 50 $\mu$ A und 27,90mV  $\pm$  4,27mV bei 100 $\mu$ A anzugeben. Die Werte dieser Stimulationsstärken wurden exemplarisch ausgewählt, die übrigen Werte sind der Abbildung 3-17 zu entnehmen.

In der Zusammenschau wird nach Auswertung der Daten der Versuchsreihe II deutlich, dass zwischen den EPSP der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe und denen der Kontrollgruppen ein deutlicher und in diesem Fall ebenfalls signifikanter Unterschied mit einem p-Wert  $< 0,05$  (KS-Test) besteht. Somit ist die eingangs gestellte Fragen, ob eine Übertragung der Ergebnisse der Einzelzellen auf die Gesamtheit möglich ist, ebenfalls zu bejahen. Es ist daher nach Abschluss der Auswertung der Versuchsreihe II davon auszugehen, dass der im Liquor der Patienten mit Anti-NMDAR-Enzephalitis nachgewiesene Antikörper gegen die N-terminale extrazelluläre Domäne der NR1-Untereinheit die Fähigkeit zur Generierung von EPSPs, wie sie bei den Kontrollgruppe gegeben ist, in einem gewissen Maße einschränkt.

### 3.3.1 Auffälligkeiten bei der Evozierung von Aktionspotenzialen

In den vorherigen Kapiteln wurde mehrfach auf die Problematik hingewiesen, die sich bei der Auswertung von EPSPs mit aufgesetzten Aktionspotenzialen ergibt. Die logische Konsequenz aus der Beobachtung, dass dieses Phänomen bei einigen Versuchsgruppen häufiger aufzutreten schien als bei anderen, war die Auswertung des Evozierungsverhaltens von Aktionspotenzialen der einzelnen Versuchsgruppen der jeweiligen Versuchsreihen mit der Fragestellung, ob relevante Unterschiede vorliegen. Die ermittelten Ergebnisse sind in diesem Unterkapitel zusammengefasst.

#### Anti-NR1-Antikörper

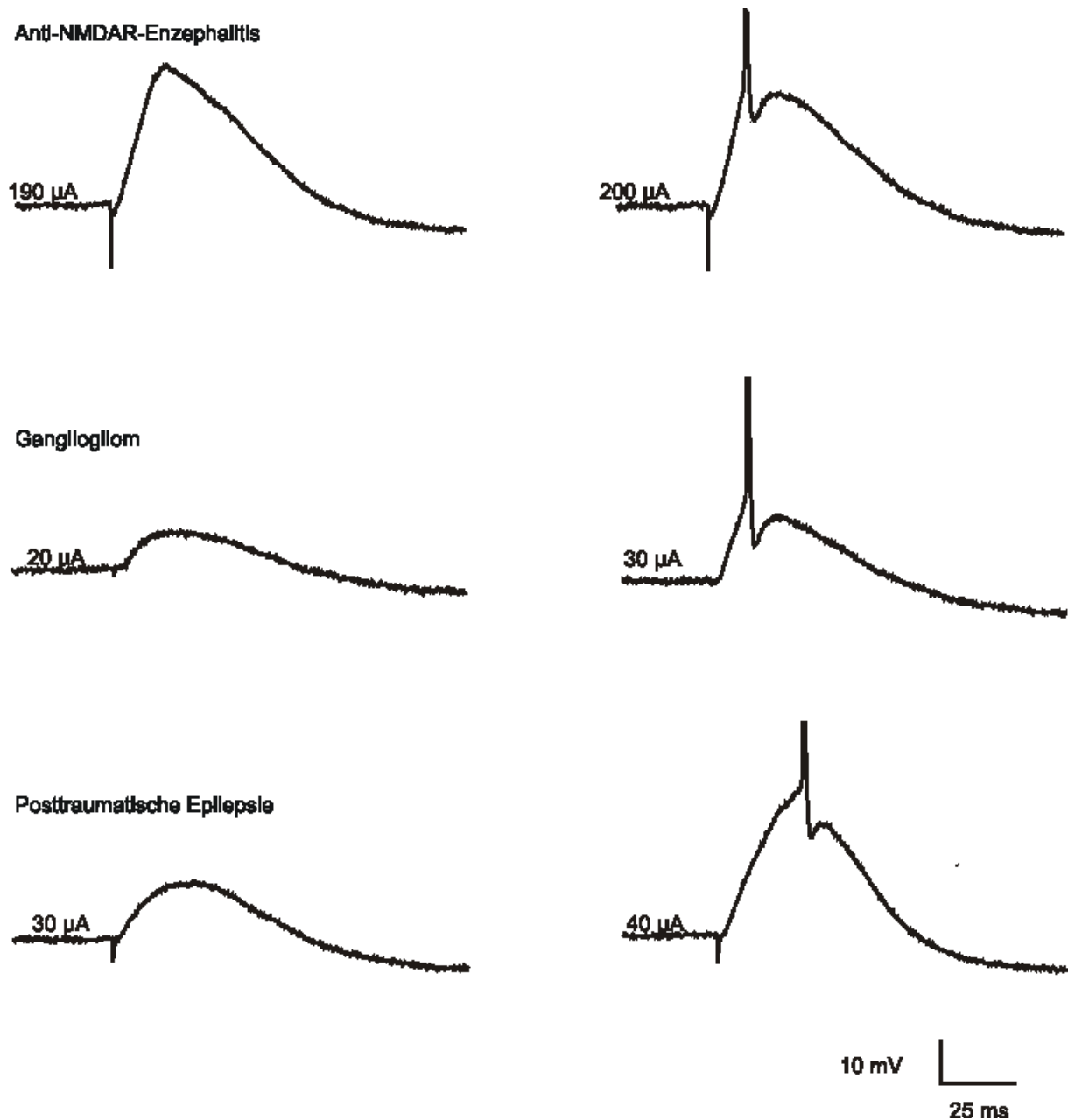


**Abbildung 3-18: Repräsentative Messspuren zur Darstellung der Überschwelligkeit (Versuchsreihe I)**

Die Aktionspotenziale wurden bei -30 mV trunkiert.

Abbildung 3-18 zeigt jeweils eine Zelle der beiden Versuchsgruppen der Versuchsreihe I. Die Versuchszelle der Anti-NR1-Antikörper-Gruppe ist die Zelle mit dem größten EPSP der Versuchsgruppe, dennoch konnte kein Aktionspotenzial bis zur maximalen Stimulationsstärke von 150  $\mu\text{A}$  evoziert werden. Im Gegensatz hierzu ist bei der exemplarisch gewählten Zelle

der NaCl-Kontrollgruppe erkennbar, dass bereits bei einer Stimulationsstärke von  $50\mu\text{A}$  die Schwelle zur Ausbildung eines Aktionspotenziales erreicht ist.



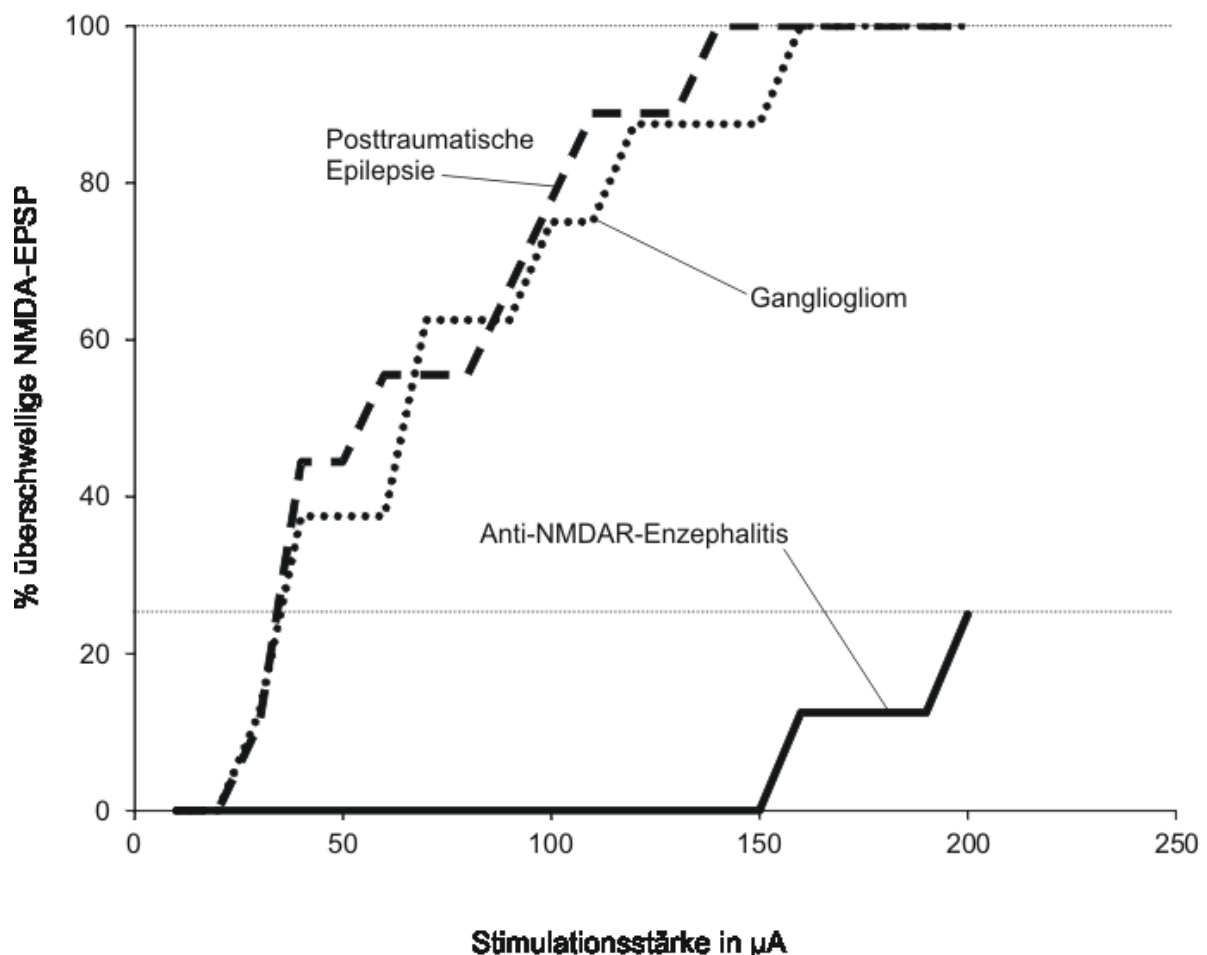
**Abbildung 3-19: Repräsentative Messspuren zur Darstellung der Überschwelligkeit (Versuchsreihe II)**

Die Aktionspotenziale wurden bei  $-30\text{ mV}$  trunkiert.

Im Vergleich stellt Abbildung 3-19 jeweils eine Zelle jeder Versuchsgruppe der Versuchsreihe II dar. Bei allen Gruppen konnte die Schwelle zur Ausbildung von Aktionspotenzialen erreicht werden. Die benötigte Stimulationsstärke ist jedoch bei den gezeigten Zellen der Kontrollgruppen mit  $30\mu\text{A}$  bzw.  $40\mu\text{A}$  deutlich niedriger als die der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe mit  $200\mu\text{A}$ .

Die Gesamtauswertung der Versuchsreihe I bestätigt die Beobachtung aus Abbildung 3-18 jedoch nicht. Aus diesem Grund wurde auf die Darstellung mittels einer Abbildung verzichtet. Es ist zwar erkennbar, dass bei keiner der sieben ausgewerteten Versuchszellen der Anti-NR1-Antikörper-Gruppe das Schwellenpotenzial erreicht werden konnte, der Unterschied zur NaCl-Kontrollgruppe ist jedoch nicht signifikant. Gleichwohl konnte bis zu einer Stimulationsstärke von 50µA eine Zelle und bis 150µA eine weitere Zelle von insgesamt sieben Versuchszellen zur Überschwelligkeit gebracht werden.

Zusammenfassend ist somit allerdings ein Trend zu erkennen, da bei der Kontrollgruppe in 29% der Fälle und bei der Anti-NR1-Antikörper-Gruppe in 0% der Fälle eine Überschwelligkeit erzielt werden konnte.



**Abbildung 3-20: Vergleich der Überschwelligkeit der Versuchsreihe II**

Darstellung der überschwelligen NMDA-EPSP der drei Versuchsgruppen der Versuchsreihe II in Prozent. Es wurden insgesamt die Daten von acht Zellen der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe und von acht bzw. neun Zellen der Gangliogliom- bzw. der posttraumatischen-Epilepsie-Gruppe ausgewertet. Der Unterschied zwischen der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe und den Kontrollgruppen ist signifikant (p-Wert < 0,05, KS-Test).

Bei der Auswertung der Versuchsreihe II in Bezug auf die o. g. Fragestellung kristallisierte sich dafür ein ungleich klareres Bild heraus. Es standen Daten von acht Versuchszellen der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe und insgesamt siebzehn Versuchszellen der Kontrollgruppen zur Verfügung – acht Zellen der Gangliogliom- und neun Zellen der posttraumatischen-Epilepsie-Gruppe.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-20 veranschaulicht. Im Detail reagierte die erste Zelle der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe bei einer Stimulationsstärke von  $160\mu\text{A}$  und die zweite Zelle bei  $200\mu\text{A}$  mit der Ausbildung von Aktionspotenzialen. Bei den übrigen sechs Zellen dieser Gruppe war eine überschwellige Erregung bis einschließlich  $200\mu\text{A}$  nicht möglich, sodass insgesamt eine Überschwelligkeit in 25% der Fälle vorlag. Die erste Zelle der Gangliogliom-Gruppe konnte bereits bei Applikation eines Stimulus mit  $30\mu\text{A}$  überschwellig gereizt werden; die letzte Zelle dieser Gruppe benötigte  $160\mu\text{A}$ . Ebenfalls bei  $30\mu\text{A}$  Stimulationsstärke wurde bei der ersten Zelle der posttraumatischen-Epilepsie-Gruppe Aktionspotenziale sichtbar; die letzte Zelle dieser Gruppe brauchte  $140\mu\text{A}$ . Letztendlich konnten somit bei 100% der Zellen der Kontrollgruppen EPSP mit aufgesetzten Aktionspotenzialen beobachtet werden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass für die Evozierung von Aktionspotenzialen bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe ein erheblich höherer Stimulus notwendig ist als bei den Kontrollgruppen. Der Unterschied ist mit einem p-Wert  $< 0,05$  (KS-Test) als signifikant einzustufen.

## 4 Diskussion

Der grundlegende Mechanismus bzw. die Mechanismen, die zur Ausprägung der Leitsymptome epileptische Anfälle, Gedächtnisstörung und psychiatrische Auffälligkeiten bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis führen (u. a. Dalmau *et al.* 2007, 2008, 2011), sind zurzeit in der wissenschaftlichen Diskussion. Um sich diesem Diskurs u. a. auch mit elektrophysiologischen Methoden nähern zu können, wurde am Oscar Langendorff Institut für Physiologie – auch im Rahmen dieser Arbeit – ein Tiermodell der Anti-NMDAR-Enzephalitis an der Ratte entwickelt. Die zentrale Frage dieser Arbeit ist, ob eine pathophysiologische Relevanz des Anti-NMDAR-Autoantikörpers, wie er bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis nachweisbar ist, auch *in vivo* besteht. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Frage nach der Verknüpfung dieses Einflusses und den bei der Erkrankung auftretenden Gedächtnisstörungen.

### 4.1 Tiermodell der Anti-NMDAR-Enzephalitis

Die Entscheidung, für diese Arbeit ein Tiermodell der Ratte zu verwenden, fiel vor dem Hintergrund der bereits vorliegenden Erfahrungen mit einem anderen Tiermodell der Ratte bei bereits abgeschlossenen Projekten im Oscar Langendorff Institut für Physiologie (u. a. Bajorat *et al.* 2011; Schulz *et al.* 2012). Zusätzlich war die notwendige Logistik schon etabliert und ein erster Vorversuch zu einem Tiermodell der Anti-NMDAR-Enzephalitis kurz zuvor angelaufen. Auch unter methodischen Aspekten erschien es sinnvoll, ein Modell zu entwickeln, in dem die Applikation der Autoantikörper gegen den NMDA-Rezeptor bzw. der sonstigen Testsubstanzen durch ein *in vivo*-Verfahren erfolgen konnte. Alle vorherigen Untersuchungen wurden schließlich entweder an Zellen einer Hippocampuszellkultur (Hughes *et al.* 2010) oder an Schnittpräparaten (Zhang *et al.* 2012) mittels eines *in vitro*-Applikationsverfahrens durchgeführt.

Daher war die hier angewendete intrazerebrale stereotaktische Injektion in den Hippocampus als Zielstruktur naheliegend. Gleichermäßen wurde bei der Wahl der Zielstruktur berücksichtigt, dass (1) der Hippocampus der Bereich des Gehirns mit der höchsten beschriebenen Anreicherung des Autoantikörpers ist (u. a. Dalmau *et al.* 2007, 2008; Hughes *et al.* 2010) und er (2) eine bedeutsame Rolle für Lernprozesse und somit für die Funktionsfähigkeit des Gedächtnisses übernimmt (u. a. Scoville & Milner 1957; Zola-Morgan, Squire & Amaral 1986; Tsien, Huerta & Tonegawa 1996). Zusätzlich war es nach

histologischer Sicherung (siehe auch Abbildung 2-3) eine gute Methode um hohe Konzentration im Bereich der Körnerzellen des Gyrus dentatus zu erreichen, wo die eigentlichen elektrophysiologischen Messungen durchgeführt werden sollten. Ebendeswegen fand aus dem Portfolio an Liquorproben von Anti-NMDAR-Enzephalitis-Patienten die Liquorprobe Anwendung, die über die höchste Titerstufe verfügte. Die Bestimmung dieser Stufe erfolgte dankenswerter Weise durch Christian G. Bien (Bielefeld/Deutschland) mit dem Verfahren der Endpunkttitration des charakteristischen NMDAR-Antikörper-Färbemusters an Schnitten eines Rattenhirns durch indirekte Immunhistochemie (Niehusmann *et al.* 2009). Eine Bestätigung erfolgte durch eine Zell-basierte Untersuchung von Angela Vincent (Oxford/Großbritannien) (Irani *et al.* 2010).

Die minimale Wartezeit von einem Tag zwischen der operativen Vorbereitung der Tiere und der Durchführung der Versuche, wie sie im Kap. 2.2 beschrieben ist, wurde weitgehend arbiträr festgelegt. Da es bisher keine anderen Arbeiten gibt, die einen ähnlichen Versuchsansatz gewählt haben, war auch keine Orientierung an diesen zum Zweck der Vergleichbarkeit der Ergebnisse möglich. Einziger Anhaltspunkt für eine sinnvolle Festlegung der Wartezeit waren (1) die bisher erfolgten *in vitro* Experimente, die zeigen konnten, dass ein Effekt durch den Antikörper innerhalb weniger Minuten (Zhang *et al.* 2012) bis hin zu einem Tag (Hughes *et al.* 2010) eintreten kann und (2) die Tatsache, dass der nicht-kompetitive NMDAR-Antagonist S-Ketamin, der zur Narkose der Ratten angewendet wurde, eine Plasmahalbwertszeit von ein bis zwei Stunden hat (Morgan & Curran 2012). Unter Berücksichtigung dieser Aspekte kann davon ausgegangen werden, dass eine mögliche Wirkung des Antikörpers einen Tag nach Applikation eingetreten ist und die Effekte nicht durch die Wirkung des S-Ketamins auf das zentrale Nervensystem maskiert werden. Wie aus Kap. 3.1 hervorgeht, wurde die Mindestwartezeit bei den Versuchen der Versuchsreihe II bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe mit  $5 \pm 3,3$  Tagen sogar regelmäßig überschritten. Trotzdem war eine Einschränkung der NMDAR-Funktion nachweisbar. Dies könnte ein erster Anhaltspunkt dafür sein, dass die Effekte durch den Autoantikörper durchaus von längerer Dauer sein könnten als bisher vermutet. Aktuelle Daten hinsichtlich der mutmaßlichen Internalisierung des NMDA-Rezeptors durch den Autoantikörper deuten nämlich daraufhin, dass zumindest dieser Prozess nach vier Tagen ohne weitere Inkubation mit dem Autoantikörper vollständig reversibel ist (Hughes *et al.* 2010). Weitere Untersuchungen in puncto Langzeiteffekte scheinen daher durchaus sinnvoll und angebracht.

Es bleibt aber die Frage, ob das oben beschriebene Konzept überhaupt geeignet ist, um in einem Tiermodell die Anti-NMDAR-Enzephalitis zuverlässig abzubilden, sodass die hieraus

gewonnenen Erkenntnisse als valide angesehen werden können. Zur Beantwortung dieser Frage erscheint eine Betrachtung der bis dato mit diesem Modell erhobenen Daten unter dem Aspekt der Übertragbarkeit auf den in der Klinik beobachteten Phänotyp der Erkrankung sinnvoll.

Neben den in dieser Arbeit erhobenen Daten, die eine klare Einschränkung der Funktion des NMDA-Rezeptors signalisieren, gibt es weitere *in vitro*- und sogar *in vivo*-Befunde, die dies bestätigen. So konnte an Hippocampusschnitten dieses Tiermodells nachgewiesen werden, dass die LTP im Vergleich zu Kontrolluntersuchungen signifikant vermindert ist (unveröffentlichte Daten von T. Tokay, Oscar Langendorff Institut für Physiologie). Darüber hinausgehend spiegelte sich in Verhaltensexperimenten, durchgeführt mit dem Morris Water Maze, eine signifikante Reduzierung des Lernerfolgs bei Aufgaben, die von der Funktion des Hippocampus abhängen, gegenüber Kontrolltieren wider (unveröffentlichte Daten von M. Kersten, Oscar Langendorff Institut für Physiologie).

Ein Defizit ist jedoch in der Tatsache zu sehen, dass es bisher nicht gelungen ist, epileptische Anfälle, z. B. durch Beobachtung oder durch eine implantierte dauerhafte EEG-Ableitung, bei den Tieren zu sichern. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der einmaligen Applikation des Autoantikörpers, wie sie in diesem Tiermodell durchgeführt wird, liegen. Die klinische Beobachtung, dass die Störungen des Gedächtnisses und die auftretenden psychiatrischen Symptome die epileptischen Anfälle häufig überdauern (u. a. Dalmau *et al.* 2007, 2008, 2011), stützt die Vermutung, dass für die epileptogene Potenz des Autoantikörpers eine mehrzeitige bzw. dauerhafte Applikation notwendig sein könnte. Eine längerdauernde EEG-Ableitung und Analyse bei den Tieren erscheint angebracht, da (1) auch nicht alle Patienten epileptische Anfälle entwickeln (u. a. Dalmau *et al.* 2008; Florance *et al.* 2009) und (2) bei vielen Patienten aber dennoch unspezifische Verlangsamungen und desorganisierte Aktivität im EEG beobachtet werden können (Dalmau *et al.* 2008). Für den Fall, dass diese Veränderungen auch bei behandelten Tieren nachgewiesen werden können, würde sich die Aussagekraft des Tiermodells weiter erhöhen.

Nach der Zusammenschau aller Daten, die bisher zu dem Tiermodell vorliegen, ist es jedoch durchaus als geeignet anzusehen, um die Prozesse, die der Autoantikörper bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis in Bezug auf das Gedächtnis bewirkt, zu untersuchen. Der große Vorteil ist in der Möglichkeit der *in vivo*-Applikation des Antikörpers zu sehen, die weit näher an der Realität liegt als die *in vitro*-Applikation.



## 4.2 Einfluss der Antikörper auf den NMDA-Rezeptor

Die Zellversuche für diese Arbeit, wie in Kap. 2.2.4.4 nachzulesen ist, fanden ausnahmslos an Körnerzellen des Gyrus dentatus statt. Um die Vergleichbarkeit mit bereits durchgeführten sowie zukünftigen Studien zu erleichtern und die Vitalität der untersuchten Zellen zu beweisen, erfolgte die Bestimmung der Membraneigenschaften; die entsprechenden Ergebnisse sind in Kap. 3.2 aufgeführt. Daher erweist es sich als zweckmäßig vor der Diskussion des Einflusses der eingesetzten Antikörper zunächst auf diesen Aspekt einzugehen.

Unglücklicherweise erscheint ein Vergleich der Membraneigenschaften mit denen aktueller Arbeiten schwierig bzw. nicht möglich, da (1) die Daten dieser Arbeiten an einer anderen Zellpopulation des Hippocampus (CA1-Sektor, Pyramidenzellen) respektive an einer anderen Spezies (Maus) und (2) nicht mit dem gleichen Verfahren (Feldpotenzialmessung, Patch-Clamp mit Spannungsklemme) erhoben wurden (Hughes *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2012). Allerdings wäre eine entsprechende Gegenüberstellung der Membraneigenschaften auch dann nicht sinnvoll, wenn die Versuche aus den o. g. Arbeiten an Körnerzellen durchgeführt worden wären, da es zwischen den Membraneigenschaften, die mit dem Verfahren, das in dieser Arbeit Anwendung fand, und dem Patch-Clamp-Verfahren ermittelt werden, durchaus Abweichungen gibt (Staley, Otis & Mody 1992). Zusätzlich ist eine Erhebung von Membraneigenschaften im Rahmen von Feldpotenzialmessung ohnehin nicht möglich.

Ungeachtet dessen ist zumindest eine Klassifikation der gemessenen Zellen anhand der Membraneigenschaften als Körnerzellen des Gyrus dentatus möglich und auch sinnvoll. So können nach einem Vergleich mit Arbeiten, die sich u. a. mit den elektrophysiologischen Membraneigenschaften der Körnerzellen des Hippocampus der Ratte beschäftigt haben, alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen den Körnerzellen des Gyrus dentatus zugeordnet werden (McNaughton, Barnes & Andersen 1981; Durand *et al.* 1983; Crunelli, Forda & Kelly 1983; Staley, Otis & Mody 1992). Eine zusätzliche Sicherheit liefert selbstverständlich auch die durchgeführte Sichtkontrolle bei der Platzierung der Messelektrode (siehe Kap. 2.2.4.4).

### 4.2.1 Einfluss des kommerziellen Anti-NR1-Antikörpers

Der in dieser Arbeit eingesetzte kommerzielle Anti-NR1-Antikörper bindet im Gegensatz zu dem Autoantikörper, der bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis nachgewiesen werden kann, an der intrazellulären C-terminalen Domäne der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors an den Aminosäuren 909 bis 938. Der gleiche Antikörper wurde bereits in einer früheren Publikation

zur Anti-NMDAR-Enzephalitis zur Detektion des humanen Anti-NMDAR-Antikörpers im Liquor bzw. zur Identifizierung der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors als Zielstruktur mitbenutzt (Dalmau *et al.* 2008). In mindestens zwei weiteren Untersuchungen fand er ebenfalls Verwendung zum Nachweis des Autoantikörpers (Irani *et al.* 2010; Hughes *et al.* 2010). Unter diesen Bedingungen erschien es sinnvoll, diesen Antikörper für erste Versuche einzusetzen.

Die Auswertung der Daten machte ein signifikant geringeres EPSP der Versuchszellen der Tiere, die mit dem Anti-NR1-Antikörper behandelt wurden, gegenüber den Kontrollzellen der Tiere, die eine Behandlung mit NaCl erfuhren, deutlich (siehe Kap. 3.3). Hieraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der kommerzielle Anti-NR1-Antikörper die NMDAR-Funktion hinsichtlich des Generierungspotenzials für EPSPs zumindest einschränkt. Zusätzlich war es möglich zu zeigen, dass die Stimulation weder über den medialen noch über den lateralen Anteil des Tractus perforans überzufällig häufiger geschah und das oben beschriebene Ergebnis somit nicht auf eine unterschiedliche Stimulation zurückzuführen ist. Darüber hinausgehend konnte in LTP-Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die LTP an Schnittpräparaten des Hippocampus, gemessen an einer medialen Tractus perforans – Körnerzell – Synapse, bei entsprechend behandelten Ratten signifikant gegenüber NaCl-Kontrolltieren vermindert ist (unveröffentlichte Daten von T. Tokay, Oscar Langendorff Institut für Physiologie).

Diese Untersuchungen stützen die Hypothese, dass Antikörper, die an intrazellulären Strukturen binden, einem in der Art und Weise zurzeit noch unbekanntem Aufnahmemechanismus in die Zellen unterliegen könnten und somit die Funktionsfähigkeit des NMDA-Rezeptors möglicherweise nachhaltig einengen. Die Klärung dieses Aufnahmemechanismus ist zumindest unter klinischen Aspekten eine interessante Fragestellung, besonders seit Autoimmunenzephalitiden bekannt sind, die eine Assoziation mit einem Antikörper gegen die Glutamatdecarboxylase (GAD-Antikörper) zeigen. Denn GAD-Antikörper sind als zytoplasmatische Enzyme de facto intrazelluläre Strukturen und es ist bisher unklar, wie diese Antikörper ihre Zielstrukturen erreichen (Bien & Scheffer 2011). Bei der weiteren Interpretation muss allerdings beachtet werden, dass die immunogene Spezifität des eingesetzten Antikörpers nicht Gegenstand dieser Arbeit war und daher nicht generell ausgeschlossen werden kann, dass durchaus eine Kreuzreaktivität des Antikörpers gegen eine extrazelluläre Zellstruktur vorliegen könnte.

## 4.2.2 Einfluss des bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis nachweisbaren Autoantikörpers

Der Einfluss des bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis nachweisbaren Autoantikörpers wurde bisher in vielen Studien untersucht (u. a. Dalmau *et al.* 2008; Prüss *et al.* 2012; Gleichman *et al.* 2012); in zwei Veröffentlichungen jedoch widmeten sich die Autoren besonders den elektrophysiologischen Veränderungen, die letztendlich Folge der Auswirkungen auf die NMDAR-Funktion sind (Hughes *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2012). Der wichtige Unterschied zwischen diesen beiden und der vorliegenden Arbeit liegt in der Wahl der *in vivo*-Applikationsart des Autoantikörpers bzw. des Tiermodells, wie bereits in Kap. 4.1 diskutiert.

Die Haupte Erkenntnis der in dieser Arbeit durchgeführten elektrophysiologischen Untersuchungen ist die signifikante Minderung der NMDAR-abhängigen Funktion der Generierung von EPSPs durch den Autoantikörper bei *in vivo*-Applikation gegenüber den Kontrollgruppen. In der Konsequenz ist für die Ausbildung von Aktionspotenzialen bei Stimulation über den Tractus perforans eine deutlich höhere Stimulationstärke von Nöten als bei den Kontrollgruppen. Ein gewisses Defizit kann jedoch in dem Faktum gesehen werden, dass eine Auswertung des stimulierten Anteils des Tractus perforans sowohl wegen der mangelnden Datenlage als auch aufgrund der häufigen Überschwelligkeit der Versuchszellen nicht belastbar durchführbar war. Die schlechte Datenlage begründet sich durch die Tatsache, dass stets mit der Stimulation im Einzelpulsverfahren begonnen wurde und lediglich zu Beginn eine Probestimulation mit 50µA im Doppelpulsverfahren erfolgte. Dieses Vorgehen lieferte einen ersten Eindruck des stimulierten Anteils des Fasertraktes, der retrospektiv allerdings nicht ausreichend ist. Die nach der Einzelstimulation erhobenen Daten der Doppelpulsstimulation waren in Anbetracht der während der Einzelstimulation teilweise erreichten Stimulationstärken häufig nicht von hoher Qualität, sodass eine Auswertung nicht sinnvoll erschien bzw. häufig nicht möglich war. Das Problem, das durch die Ausbildung von Aktionspotenzialen entstand, hätte durch die Blockade der spannungsaktivierten Natriumkanäle mit Tetrodotoxin (TTX) (Savio-Galimberti, Gollob & Darbar 2012) und die resultierende Unterbindung von Aktionspotenzialen aufgrund des fehlenden Einstroms von Natriumionen in die Zelle (Hodgkin & Huxley 1952) behoben werden können. Allerdings wäre die gemachte Beobachtung der Schwellenunterschiede dann unmöglich gewesen. Es ist bekannt, dass das zweite EPSP bei einer Doppelpulsstimulation in Abhängigkeit des stimulierten Anteils des Tractus perforans unterschiedlich ausfällt (McNaughton 1980), siehe dazu auch Kap. 2.2.5.3, Abbildung 2-10. Aber obwohl ein NMDAR-abhängiges EPSP bei Stimulation des lateralen Anteils des Tractus perforans zeitweise in Frage gestellt wurde

(Dahl, Burgard & Sarvey 1990), konnte eine NMDAR-abhängige Komponente bei beiden Anteilen des Fasertraktes nachgewiesen werden (Colino & Malenka 1993); über Unterschiede in der Amplitude dieser Komponente wurde jedoch nicht berichtet. Eine relevante Abweichung für das EPSP nach dem ersten Stimulus bei Reizung über den medialen oder den lateralen Tractus perforans ist daher als fraglich anzusehen.

Um die bereits erwähnten Schwellenunterschiede letztendlich werten zu können, ist es zusätzlich zwingend notwendig zu prüfen, ob die Ursache für die Abweichung nicht evtl. in den vorher genannten spannungsaktivierten Natriumkanälen oder eben in einer anderen zellulären Struktur zu suchen ist. Zur Klärung ist die Betrachtung des Entladungsverhaltens der einzelnen Versuchsgruppen sinnvoll. Da es hier jedoch keinen signifikanten Unterschied gibt, ist davon auszugehen, dass die Schwellenunterschiede ursächlich durch die Funktionsminderung des NMDA-Rezeptors durch den Autoantikörper zu erklären sind. Ergänzend sei noch erwähnt, dass sich bei den Versuchen mit dem Anti-NR1-Antikörper ein ähnliches Ergebnis abzeichnete. Die Unterschiede deuten hier zwar nur einen Trend an, aber es ist eine Parallelität in der Art erkennbar, dass auch die Zellen der Anti-NR1-Gruppe bis zu einer Stimulationsstärke von 150 $\mu$ A keine Überschwelligkeit zeigten.

Nach der vorangegangenen Betrachtung der Güte der Ergebnisse sei zunächst kurz wiederholend erwähnt, dass weitere Untersuchungen aus dem Oscar Langendorff Institut für Physiologie ebenfalls einen einschränkenden Einfluss auf die Funktion des NMDA-Rezeptors *in vitro* und *in vivo* belegen konnten. So ist die LTP, getestet an medialen Tractus perforans – Körnerzell – Synapsen, bei Tieren, die mit dem Liquor von Patienten mit Anti-NMDAR-Enzephalitis behandelt wurden, signifikant reduziert; ebenso ist der Lernerfolg von entsprechend behandelten Tieren bei Verhaltensexperimenten mit dem Morris Water Maze für Hippocampus-spezifisches Lernen gegenüber Kontrolltieren signifikant gemindert (unveröffentlichte Daten von M. Kersten und T. Tokay, Oscar Langendorff Institut für Physiologie).

In Anbetracht dieser Erkenntnisse stellt sich die Frage, welcher Mechanismus hinter der oben beschriebenen Wirkung des Autoantikörpers auf die Funktion des NMDA-Rezeptors stehen könnte.

Zur Klärung dieser Frage konnte bereits beschrieben werden, dass eine eintägige Behandlung mit dem Liquor von Patienten mit Anti-NMDAR-Enzephalitis in einer hippocampalen Zellkultur die Dichte der NMDA-Rezeptoren auf der Oberfläche der postsynaptischen Zellmembran Titer-abhängig zu reduzieren vermag (Hughes *et al.* 2010). In der gleichen Arbeit zeigte die Arbeitsgruppe im übrigen auch, dass bei der o. g. Behandlung der Zellen

auch der NMDA-abhängige EPSC gegenüber Kontrollen signifikant reduziert war. Der Effekt auf die Dichte der NMDA-Rezeptoren war innerhalb von vier Tagen nach Entfernung der Anti-NMDAR-Antikörper aus dem Kulturmedium interessanterweise voll reversibel. Die Schlussfolgerung der Autoren für dieses Ergebnis ist das Vorliegen eines Internalisierungsmechanismus mit einer sich möglicherweise anschließenden Degradierung des NMDA-Rezeptors, der durch die Bindung des Autoantikörpers vermittelt wird.

Im Vergleich hierzu warfen Versuche an Hippocampuschnitten der Maus, die einer fünfminütigen Kurzzeitbehandlung mit Liquor von Patienten mit Anti-NMDAR-Enzephalitis unterzogen wurden, die Vermutung nach einem kurzfristigen inhibierenden Effekt der Autoantikörper auf (Zhang *et al.* 2012). Im Detail wurde die LTP an der Schaffer-Kollateralen-CA1-Synapse untersucht, nachdem fünf Minuten vor Durchführung der (die LTP-auslösende) Theta-burst-Stimulation (TBS) mit dem Einwasch von Liquor von Patienten mit Anti-NMDAR-Enzephalitis begonnen wurde. Direkt im Anschluss an die TBS wurde der eingesetzte Liquor mit ACSF ausgewaschen. Im Ergebnis zeigte sich eine signifikante Minderung der NMDAR-abhängige LTP gegenüber Kontrollversuchen.

Im Hinblick auf den zugrunde liegenden Mechanismus ist es daher durchaus möglich, dass die o. g. *in vitro*-Effekte Folge einer Internalisierung und Degradierung des NMDA-Rezeptors sein können, da diese Prozesse innerhalb von Minuten bis hin zu Stunden ablaufen (Collingridge, Isaac & Wang 2004; Hayashi, Thomas & Huganir 2009). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass die Effekte *in vivo* möglicherweise länger anhaltend sind. Bekräftigt wird dies (1) durch die längere Wartezeit zwischen der Injektion des Liquors und der Durchführung der Versuche bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis-Gruppe ( $5 \pm 3,3$  Tage bei einer Spannweite von 2 bis 10 Tagen) und (2) durch die Erkenntnisse aus o. g. Verhaltensexperimenten bei denen die Auswirkungen nach der operativen Injektion für mindestens zehn Tage nachweisbar waren (unveröffentlichte Daten von M. Kersten, Oscar Langendorff Institut für Physiologie). Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass die Bindung des Autoantikörpers an den NMDA-Rezeptor bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis neben kurzfristigen auch längerfristige Effekte zur Folge haben könnte. Ursächlich denkbar und sicherlich weiter untersucht werden sollten beispielsweise Änderungen in der Transkription der entsprechenden Gene.

### 4.3 NMDAR-Funktion und Symptome der Anti-NMDAR-Enzephalitis

Ein wissenschaftlich interessanter Punkt ist der Zusammenhang zwischen der NMDAR-Funktion und den bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis auftretenden Symptomen, wobei hier besonders die Parallelen einer Funktionseinschränkung des NMDA-Rezeptors zu anderen Krankheitsbildern und die auftretenden Gedächtnisstörungen im Fokus stehen sollen.

In diversen tierexperimentellen Studien wurden die Auswirkungen einer pharmakologischen Blockade bzw. einer genetischen Reduktion des NMDA-Rezeptors bereits untersucht (u. a. Morris *et al.* 1986, 1989; Sakimura *et al.* 1995; Chen & Tonegawa 1997; Mohn *et al.* 1999). Hierbei entwickelten die Tiere teilweise ganz ähnliche Symptome, wie sie sich auch bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis manifestieren (siehe hierzu auch Kap. 1.1.1 Abbildung 1-2). Die Reversibilität der Symptome dieser Erkrankung beim Menschen im Zusammenhang mit dem Abfall des Autoantikörpertiters im Liquor bzw. Serum der Patienten konnte bereits beschrieben werden (u. a. Iizuka *et al.* 2008; Dalmau *et al.* 2008). Sie unterstützt die Hypothese, dass es sich ursächlich um eine reversible und Titer-abhängige Minderung der Dichte von NMDA-Rezeptoren an postsynaptischen Dendriten handeln könnte (Dalmau *et al.* 2008). Eine weitere Besonderheit ist in der Tatsache zu sehen, dass der Rückgang der Symptome bei den Patienten in der entgegengesetzten Reihenfolge wie das Auftreten erfolgt (Dalmau *et al.* 2011). Lediglich die auftretende Amnesie – teilweise für den gesamten Krankheitsprozess – überdauert den Titerabfall des Autoantikörpers und ist meist sogar irreversibel (Dalmau *et al.* 2008).

Der oben kurz beschriebene Krankheitsverlauf bei den Patienten steht zwar einerseits im Konsens mit der von Hughes und Kollegen aufgestellten Hypothese zur Funktionseinschränkung des NMDA-Rezeptors durch kurzfristige Internalisierung und sich möglicherweise anschließender Degradierung durch den Autoantikörper (Hughes *et al.* 2010); andererseits lassen sich aber auch längerfristige Mechanismen, wie sie im Kap. 4.2.2 geäußert werden, nicht ausschließen. Gleichwohl bleibt die Frage, in welchem Maß die Einschränkung der NMDAR-Funktion durch den Autoantikörper, wie sie in dieser und anderen Arbeiten (Hughes *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2012) beschrieben wird, überhaupt im Zusammenhang mit der Ausprägung der beschriebenen Symptome steht, wobei die o. g. strenge Korrelation mit dem Titer bereits erste Hinweise hierfür liefert.

### 4.3.1 Parallelen zu anderen Erkrankungen

Bei einigen häufigen neurologischen Erkrankungen ist eine NMDAR-Überexpression oder zumindest ein Überwiegen der Funktion des NMDA-Rezeptors ursächlich an der Pathogenese beteiligt (für eine Übersicht siehe Kemp & McKernan 2002). Häufig liegt die Ursache in einer durch einen vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Zellen ausgelösten Exzitotoxizität (Olney 1978; Lipton & Rosenberg 1994). Jedoch ist auch eine NMDAR-Unterfunktion als Grund für einige neuropsychiatrische Krankheitsbilder in der Diskussion, im Besonderen für die Schizophrenie (Tsai & Coyle 2002) und neuerdings auch für Formen des Autismus (Gandal *et al.* 2012).

Der Verdacht, dass eine NMDAR-Unterfunktion an der Ausbildung einer Schizophrenie beteiligt sein könnte, entstand durch Studien mit nicht-kompetitiven NMDAR-Antagonisten (Phencyclidin, Ketamin, MK801). Durch Applikation der NMDAR-Antagonisten können beim Menschen Symptome ausgelöst werden, die den Negativ- (z. B. Affektverflachung, soziale Inkompetenz aber auch kognitive Störungen wie Minderung der Gedächtnisfunktion) und Positivsymptomen (z. B. Halluzinationen, Wahn sowie Ich-Störungen) einer Schizophrenie sehr stark ähneln (u. a. Krystal *et al.* 1994, 1999, 2000; Weiner *et al.* 2000). In diesem Zusammenhang konnten auch Bewegungsstörungen beobachtet werden (Marco & Joshi 1992).

Durch diese Erkenntnisse wird deutlich, dass sich durch eine nicht-kompetitive Blockade des NMDA-Rezeptors und damit durch die pharmakologische Induktion einer Rezeptorunterfunktion ein Symptombild erzielen lässt, das dem der Anti-NMDAR-Enzephalitis sehr stark ähnelt. Unter weiterer Berücksichtigung der Tatsache, dass durch die Antagonisierung ebenfalls eine autonome Instabilität – wie sie auch bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis beschrieben wird (Dalmau *et al.* 2011) – hervorgerufen werden kann (McCarron *et al.* 1981), wird ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Funktionseinschränkung des NMDA-Rezeptors und dem Krankheitsverlauf der Anti-NMDAR-Enzephalitis noch wahrscheinlicher.

### 4.3.2 NMDAR-Funktion und Gedächtnisstörungen

In der Einleitung dieser Arbeit wurde bereits auf die substantielle Bedeutung der Hippocampusformation und des NMDA-Rezeptors für die Funktionen Lernen und Gedächtnis hingewiesen (siehe Kap. 1.2.3). Daher ist es naheliegend, abschließend die Auswirkungen der – durch die in dieser Arbeit festgestellte – Funktionsminderung des NMDA-Rezeptors im Hinblick auf die Lern- und Gedächtnisfunktionsstörung, die bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis regelhaft auftritt (u. a. Dalmau *et al.* 2008, 2011), zu erörtern.

In der Literatur konnte schon mehrfach gezeigt werden, welche Bedeutung der NMDA-Rezeptor im Hippocampus für Lern- und Gedächtnisprozesse hat. So lieferte eine tierexperimentelle Studie die Erkenntnis, dass durch den NMDAR-Antagonisten AP5 eine selektive Beeinträchtigung sowohl von Lernprozessen als auch eine Blockade der LTP möglich ist (Morris *et al.* 1986). Weitere Untersuchungen unterstrichen die Maßgabe eines funktionsfähigen NMDA-Rezeptors für die Entwicklung einer LTP zusätzlich (u. a. Artola & Singer 1987; Sakimura *et al.* 1995). Durch gezielte molekulargenetische Modifikationen wurden letztendlich NMDAR-Knock-out-Tiere gezüchtet, bei denen der NMDA-Rezeptor speziell in bestimmten Hirnregionen funktionslos gemacht bzw. eine Unterfunktion erzeugt werden konnte. So bewirkt z. B. ein Knock-out des NMDA-Rezeptors im Bereich des CA1-Sektors u. a. ein Defizit des räumlichen Arbeitsgedächtnisses (Sakimura *et al.* 1995; McHugh *et al.* 1996; Tonegawa *et al.* 1996; Tsien, Huerta & Tonegawa 1996). In weiteren Knock-Out-Studien – auch im Bereich des CA1-Sektors – konnte zusätzlich eine Verschlechterung der Merkfähigkeit (Huerta *et al.* 2000) bzw. der Konsolidierung von Informationen aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis (Shimizu *et al.* 2000) nachgewiesen werden. Darüber hinausgehend konnte die Erfordernis des NMDA-Rezeptors im CA3-Sektor des Hippocampus für den Informationsabruf im Tiermodell geklärt werden (Nakazawa *et al.* 2002).

Die Bedeutung des NMDA-Rezeptors in Körnerzellen des Gyrus dentatus ist ebenfalls Gegenstand der Forschung. Untersuchungen an einem Knock-Out-Mausmodell, dem das Gen für die NR1-Untereinheit in den Körnerzellen fehlt, zeigten die Relevanz dieses ionotropen Glutamaterezeptors für die Generierung gezielter Erinnerungen und die Differenzierung dieser von bereits zuvor erlernten ähnlichen Zusammenhängen (pattern separation) (McHugh *et al.* 2007). Auch eine Minderung der LTP und des räumlichen Arbeitsgedächtnisses – wie bereits für den CA1-Sektor beschrieben – konnte in einem ähnlichen Mausmodell für die Körnerzellen nachgewiesen werden (Niewoehner *et al.* 2007).

Bei Berücksichtigung der vorgenannten Daten ist es als sehr wahrscheinlich anzusehen, dass eine Unterfunktion des NMDA-Rezeptors, deren Vorliegen bei der Anti-NMDAR-



Enzephalitis u. a. anhand der Ergebnisse dieser Arbeit sehr plausibel ist, einen großen Anteil an der Pathophysiologie der Amnesie bzw. der über den Krankheitsprozess hinausgehenden Störungen des Gedächtnisses hat. In einer aktuellen Studie von Finke und Kollegen wurde in diesem Zusammenhang das neurophysiologische Langzeitergebnis von neun Patienten untersucht (Finke *et al.* 2012). Der darin geführte Nachweis, dass bei acht Patienten persistierende kognitive Defizite (u. a. im Bereich Aufmerksamkeit, Arbeitsgedächtnis, Exekutivfunktionen) vorlagen, obwohl die Patienten als geheilt gelten – nur bei zwei der neun Patienten waren noch Anti-NMDAR-Autoantikörper nachweisbar – und bereits teilweise ihr normales Berufsleben wieder aufgenommen haben, deutet zusätzlich (1) auf eine Beeinflussung der NMDAR-abhängigen synaptischen Plastizität und (2) auf mögliche Langzeiteffekte des Autoantikörpers hin, wie bereits in Kap. 4.2.2 gemutmaßt.

#### **4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Abschließend kann festgehalten werden, dass das Tiermodell der Anti-NMDAR-Enzephalitis, das im Rahmen dieser Arbeit mitentwickelt wurde, geeignet ist, um bei den verwendeten Tieren den Phänotyp der Gedächtnisstörungen abzubilden (unveröffentlichte Daten von M. Kersten, Oscar Langendorff Institut für Physiologie). Darüber hinausgehend konnte eine Funktionsminderung des NMDA-Rezeptors sowohl durch den kommerziellen Anti-NR1-Antikörper als auch durch den Autoantikörper gegen den NMDA-Rezeptor, wie er bei der Anti-NMDAR-Enzephalitis nachgewiesen werden kann, gegenüber Kontrollexperimenten demonstriert werden. Bei den Versuchen mit dem Autoantikörper konnte ergänzend gezeigt werden, dass die Schwelle zur Evozierung von Aktionspotenzialen gegenüber Kontrollversuchen signifikant höher liegt. Diese Daten machen eine pathophysiologische Relevanz des Autoantikörpers auf den NMDA-Rezeptor *in vivo* sehr wahrscheinlich.

Künftige Studien könnten zum Ziel haben, das Tiermodell der Anti-NMDAR-Enzephalitis in der Art weiterzuentwickeln, dass auch epileptische Anfälle nachgewiesen und weiter untersucht werden können. Hierzu erscheinen auch dauerhafte EEG-Ableitungen bei den behandelten Ratten sinnvoll. Ein weiterer Fokus könnte auf Versuchen mit unterschiedlichen Titerstufen des Autoantikörpers sowie auf Versuchen mit einer längeren Wartezeit zwischen der Operation der Tiere und der Datenerhebung liegen. Hierdurch könnten eine Titer-abhängige Funktionsminderung des NMDA-Rezeptors und überdies auch Langzeiteffekte besser beurteilt werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis ist als autoimmune Enzephalitis eine in ihrer Häufigkeit unterschätzte und mittlerweile zunehmend diagnostizierte Unterform der limbischen Enzephalitis. Kennzeichen sind epileptische Anfälle, Störungen des Gedächtnisses sowie psychiatrische Symptome wie Manie oder Paranoia. Betroffen sind oft junge Frauen bei denen in einer großen Zahl ein ovarielles Teratom nachweisbar ist. Dennoch sind zurzeit die funktionellen Konsequenzen der Autoantikörper gegen den NMDA-Rezeptor, die bei diesen Patienten im Liquor nachgewiesen werden können, noch nicht sehr gut verstanden.

Um die pathophysiologische Relevanz dieser Autoantikörper näher zu beleuchten, wurde für diese Arbeit Liquor von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis bzw. ein kommerzieller Anti-NR1-Antikörper stereotaktisch in den Gyrus dentatus von adulten weiblichen Ratten injiziert. Als Kontrollen dienten Liquores von Patienten mit einem Gangliogliom bzw. mit posttraumatischer Epilepsie ohne nachweisbaren Autoantikörpertiter oder Natriumchlorid.

Intrazelluläre Messungen der Körnerzellen des Gyrus dentatus zeigten nach Stimulation des Tractus perforans eine signifikante Reduktion der NMDA-Rezeptor-abhängigen exzitatorischen postsynaptischen Potenziale bei Ratten, die mit dem Liquor der Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis-Patienten behandelt wurden. Als logische Konsequenz war die Fähigkeit der Zellen Aktionspotenziale auszuprägen signifikant eingeschränkt und es wurden deutlich höhere Stimulationsstärken als bei den Kontrollversuchen benötigt. Die Evozierung von Aktionspotenzialen bei Strominjektion in die Zelle war gegenüber den Kontrollen jedoch unbeeinflusst.

Die Ergebnisse der Arbeit legen nahe, dass die NMDA-Rezeptor-Funktion bei *in vivo*-Applikation des Autoantikörpers, der gegen die extrazelluläre N-terminale Domäne der NR1-Untereinheit des Rezeptors gerichtet ist, deutlich eingeschränkt ist. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass der Autoantikörper zumindest an der Ausprägung der Gedächtnisstörungen ursächlich beteiligt ist, da Prozesse wie die Langzeitpotenzierung als Teil der synaptischen Plastizität eingeschränkt sein könnten.

## 6 Thesen

- 1.) Die Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis ist eine Erkrankung mit unterschätzter Häufigkeit, die durch epileptische Anfälle, Gedächtnisstörungen und psychiatrische Symptome gekennzeichnet ist.
- 2.) Der im Patientenliquor nachgewiesene IgG-Antikörper bindet an die extrazelluläre N-terminale Domäne der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors, wobei sich eine besonders hohe Anreicherung im Hippocampus zeigt.
- 3.) Im Hippocampus erfüllt der NMDA-Rezeptor eine entscheidende Aufgabe im Rahmen der synaptischen Plastizität und hat damit eine herausragende Bedeutung für Lernprozesse.
- 4.) Der Einsatz von elektrophysiologischen, intrazellulären Zellmessungen nach intrazerebraler, stereotaktischer Injektion eines kommerziellen Anti-NR1-Antikörpers und von Liquor eines Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis in den Gyrus dentatus des Hippocampus der Ratte im Vergleich mit Kontrollsubstanzen ist die Methode der Wahl, um eine pathophysiologische Relevanz nach *in vivo* Applikation des Anti-NMDAR-Antikörpers zu klären.
- 5.) Die Körnerzellen des Gyrus dentatus sowie eine Stimulation über den Tractus perforans sind geeignet, um in diesem Tiermodell exzitatorische postsynaptische Potenziale zu bestimmen.
- 6.) Es besteht ein signifikanter Unterschied ( $p$ -Wert  $< 0,05$ , KS-Test) zwischen dem NMDA-Rezeptor-abhängigen exzitatorischen postsynaptischen Potenzial unter Einsatz des kommerziellen Anti-NR1-Antikörpers gegenüber der Kontrollsubstanz Natriumchlorid.
- 7.) Bei Anwendung des Liquors eines Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis gegenüber den Kontrollliquores ohne nachweisbaren Titer des o. g. Antikörpers ist der Unterschied ebenfalls signifikant ( $p$ -Wert  $< 0,05$ , KS-Test).
- 8.) Die Schwelle zur Ausbildung von Aktionspotenzialen bei den Zellen der Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis-Gruppe wird erst bei signifikant höheren Stimulationsstärken ( $p$ -Wert  $< 0,05$ , KS-Test) als bei den Zellen der Kontrollgruppen erreicht.

- 9.) Das verwendete Tiermodell ist unter Berücksichtigung der erhobenen Daten in dieser Arbeit sowie weiterer Daten aus dem Oscar Langendorff Institut für Physiologie geeignet die Gedächtnisstörungen der Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis adäquat abzubilden.
- 10.) Die NMDA-Rezeptor-Funktion ist bei *in vivo* Applikation des Autoantikörpers deutlich eingeschränkt, sodass davon auszugehen ist, dass der Autoantikörper von pathophysiologischer Bedeutung für die Störung des Gedächtnisses der Patienten ist.
- 11.) Der Mechanismus der Autoantikörperwirkung ist weiterhin nicht vollständig geklärt, aber neben kurzzeitigen sind auch langzeitige Effekte, wie z. B. die Modifikation der Gentranskription, anzunehmen.
- 12.) Weitere Untersuchungen z. B. mit Liquores unterschiedlicher Titerstufen oder einer verlängerten Wartezeit zwischen Injektion und Versuchen sind sinnvoll, um (1) einen Dosis-Wirkungs-Effekt und (2) eine mögliche Reversibilität nachzuweisen.

## 7 Anhang

### 7.1 Einstellung des Pipettenziehgerätes (P-97)

Tab. 9: Protokolle des Pipettenziehgerätes (P-97)

RAMP-Wert	Heat	Pull Strength	Velocity	Time
502	508	150	90	250
514	505	150	100	250
519	515	160	95	250
525	531	145	90	230
529	535	150	100	245
532	538	150	90	220
550	554	145	90	220

### 7.2 Protokolle zur Bestimmung der Membraneigenschaften

Tab. 10: Protokolle zur Bestimmung der Membraneigenschaften

Protokoll	depolarisierende StSpSp	hyperpolarisierende StSpSp
Initiale Stromstärke	0nA	0nA
Dauer des Strompulses	350ms	350ms
Abstand zwischen der Erhöhung des Strompulses	5s	5s
Veränderung nach dem Strompuls	+0,1nA	-0,1nA
Maximale Stromstärke	+1,4nA	-1,4nA

### 7.3 Protokoll für die Durchführung von Input-Output-Kurven

Tab. 11: Protokoll der Input-Output-Kurven

Protokoll	Einzelimpuls	Doppelimpuls
Initiale Stromstärke	0 $\mu$ A	0 $\mu$ A
Abstand zwischen der Erhöhung des Strompulses	30s	30s
Veränderung nach dem Strompuls	+10 $\mu$ A	+10 $\mu$ A
Maximale Stromstärke	150 $\mu$ A (200 $\mu$ A)	150 $\mu$ A (200 $\mu$ A)
Anzahl der Stimuli	1	2
Interstimulationsintervall	---	40ms

### 7.4 Literaturverzeichnis

- 1.) Alamowitch, S, Graus, F, Uchuya, M, Reñé, R, Bescansa, E & Delattre, JY 1997, 'Limbic encephalitis and small cell lung cancer. Clinical and immunological features', *Brain : a journal of neurology*, 120 (Pt 6), pp. 923–928.
- 2.) Amaral, DG, Scharfman, HE & Lavenex, P 2007, 'The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies)' in *The dentate gyrus. A comprehensive guide to structure, function, and clinical implications*, ed HE Scharfman, Elsevier, Amsterdam, pp. 3–22.
- 3.) Amaral, DG & Witter, MP 1989, 'The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data', *Neuroscience*, vol. 31, no. 3, pp. 571–591.
- 4.) Ances, BM, Vitaliani, R, Taylor, RA, Liebeskind, DS, Voloschin, A, Houghton, DJ, Galetta, SL, Dichter, M, Alavi, A, Rosenfeld, MR & Dalmau, J 2005, 'Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates', *Brain : a journal of neurology*, vol. 128, Pt 8, pp. 1764–1777.
- 5.) Artola, A & Singer, W 1987, 'Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex', *Nature*, vol. 330, no. 6149, pp. 649–652.
- 6.) Aydiner, A, Gürvit, H & Baral, I 1998, 'Paraneoplastic limbic encephalitis with immature ovarian teratoma--a case report', *Journal of neuro-oncology*, vol. 37, no. 1, pp. 63–66.

- 7.) Bajorat, R, Wilde, M, Sellmann, T, Kirschstein, T & Köhling, R 2011, 'Seizure frequency in pilocarpine-treated rats is independent of circadian rhythm', *Epilepsia*, vol. 52, no. 9, pp. e118.
- 8.) Bakheit, AM, Kennedy, PG & Behan, PO 1990, 'Paraneoplastic limbic encephalitis: clinico-pathological correlations', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, vol. 53, no. 12, pp. 1084–1088.
- 9.) Bayreuther, C, Bourg, V, Dellamonica, J, Borg, M, Bernardin, G & Thomas, P 2009, 'Complex partial status epilepticus revealing anti-NMDA receptor encephalitis', *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape*, vol. 11, no. 3, pp. 261–265.
- 10.) Bechterew, W von 1900, 'Demonstration eines Gehirns mit Zerstörung der vorderen und inneren Theile der Hirnrinde beider Schläfenlappen', *Neurologisches Centralblatt, Band 19* 1900, pp. 990–991.
- 11.) Bien, CG & Scheffer, IE 2011, 'Autoantibodies and epilepsy', *Epilepsia*, 52 Suppl 3, pp. 18–22.
- 12.) Bien, CG, Schulze-Bonhage, A, Deckert, M, Urbach, H, Helmstaedter, C, Grunwald, T, Schaller, C & Elger, CE 2000, 'Limbic encephalitis not associated with neoplasm as a cause of temporal lobe epilepsy', *Neurology*, vol. 55, no. 12, pp. 1823–1828.
- 13.) Blackstad, TW 1956, 'Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination', *The Journal of comparative neurology*, vol. 105, no. 3, pp. 417–537.
- 14.) Bliss, TV & Collingridge, GL 1993, 'A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus', *Nature*, vol. 361, no. 6407, pp. 31–39.
- 15.) 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', *The Journal of physiology*, vol. 232, no. 2, pp. 331–356.
- 16.) Bredt, DS & Nicoll, RA 2003, 'AMPA receptor trafficking at excitatory synapses', *Neuron*, vol. 40, no. 2, pp. 361–379.
- 17.) Brierley, JB, Corsellis, JAN, Hierons, R & Nevin, S 1960, 'Subacute encephalitis of later adult life. Mainly affecting the limbic areas', *Brain*, vol. 83, no. 3, pp. 357–368.

- 18.) Chen, C & Tonegawa, S 1997, 'Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain', *Annual review of neuroscience*, vol. 20, pp. 157–184.
- 19.) Colino, A & Malenka, RC 1993, 'Mechanisms underlying induction of long-term potentiation in rat medial and lateral perforant paths in vitro', *Journal of neurophysiology*, vol. 69, no. 4, pp. 1150–1159.
- 20.) Collingridge, GL, Isaac, JTR & Wang, YT 2004, 'Receptor trafficking and synaptic plasticity', *Nature reviews. Neuroscience*, vol. 5, no. 12, pp. 952–962.
- 21.) Collingridge, GL, Kehl, SJ & McLennan, H 1983, 'Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus', *The Journal of physiology*, vol. 334, pp. 33–46.
- 22.) Corsellis, JA, Goldberg, GJ & Norton, AR 1968, "'Limbic encephalitis" and its association with carcinoma', *Brain : a journal of neurology*, vol. 91, no. 3, pp. 481–496.
- 23.) Crunelli, V, Forda, S & Kelly, JS 1983, 'Blockade of amino acid-induced depolarizations and inhibition of excitatory post-synaptic potentials in rat dentate gyrus', *The Journal of physiology*, vol. 341, pp. 627–640.
- 24.) Cull-Candy, S, Brickley, S & Farrant, M 2001, 'NMDA receptor subunits: diversity, development and disease', *Current Opinion in Neurobiology*, no. 11, pp. 327–335.
- 25.) Cull-Candy, SG & Leszkiewicz, DN 2004, 'Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses', *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, vol. 2004, no. 255, pp. re16.
- 26.) Dahl, D, Burgard, EC & Sarvey, JM 1990, 'NMDA receptor antagonists reduce medial, but not lateral, perforant path-evoked EPSPs in dentate gyrus of rat hippocampal slice', *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale*, vol. 83, no. 1, pp. 172–177.
- 27.) Dalmau, J, Gleichman, AJ, Hughes, EG, Rossi, JE, Peng, X, Lai, M, Dessain, SK, Rosenfeld, MR, Balice-Gordon, R & Lynch, DR 2008, 'Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies', *Lancet neurology*, vol. 7, no. 12, pp. 1091–1098.
- 28.) Dalmau, J, Graus, F, Villarejo, A, Posner, JB, Blumenthal, D, Thiessen, B, Saiz, A, Meneses, P & Rosenfeld, MR 2004, 'Clinical analysis of anti-Ma2-associated encephalitis', *Brain : a journal of neurology*, vol. 127, Pt 8, pp. 1831–1844.



- 29.) Dalmau, J, Lancaster, E, Martinez-Hernandez, E, Rosenfeld, M & Balice-Gordon, R 2011, 'Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis', *Lancet neurology*, vol. 10, no. 1, pp. 63–74.
- 30.) Dalmau, J, Tüzün, E, Wu, H, Masjuan, J, Rossi, JE, Voloschin, A, Baehring, JM, Shimazaki, H, Koide, R, King, D, Mason, W, Sansing, LH, Dichter, MA, Rosenfeld, MR & Lynch, DR 2007, 'Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma', *Annals of Neurology*, vol. 61, no. 1, pp. 25–36.
- 31.) Darnell, RB & Posner, JB 2005, 'A new cause of limbic encephalopathy', *Brain : a journal of neurology*, vol. 128, Pt 8, pp. 1745–1746.
- 32.) Dingledine, R, Borges, K, Bowie, D & Traynelis, SF 1999, 'The glutamate receptor ion channels', *Pharmacological reviews*, vol. 51, no. 1, pp. 7–61.
- 33.) Dunwiddie, T & Lynch, G 1978, 'Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: localization and frequency dependency', *The Journal of physiology*, vol. 276, pp. 353–367.
- 34.) Durand, D, Carlen, PL, Gurevich, N, Ho, A & Kunov, H 1983, 'Electrotonic parameters of rat dentate granule cells measured using short current pulses and HRP staining', *Journal of neurophysiology*, vol. 50, no. 5, pp. 1080–1097.
- 35.) Finke, C, Kopp, UA, Prüss, H, Dalmau, J, Wandinger, K & Ploner, CJ 2012, 'Cognitive deficits following anti-NMDA receptor encephalitis', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, vol. 83, no. 2, pp. 195–198.
- 36.) Florance, NR, Davis, RL, Lam, C, Szperka, C, Zhou, L, Ahmad, S, Campen, CJ, Moss, H, Peter, N, Gleichman, AJ, Glaser, CA, Lynch, DR, Rosenfeld, MR & Dalmau, J 2009, 'Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis in children and adolescents', *Annals of neurology*, vol. 66, no. 1, pp. 11–18.
- 37.) Florance-Ryan, N & Dalmau, J 2010, 'Update on anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis in children and adolescents', *Current opinion in pediatrics*, vol. 22, no. 6, pp. 739–744.
- 38.) Forrest, D, Yuzaki, M, Soares, HD, Ng, L, Luk, DC, Sheng, M, Stewart, CL, Morgan, JI, Connor, JA & Curran, T 1994, 'Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death', *Neuron*, vol. 13, no. 2, pp. 325–338.
- 39.) Furukawa, H, Singh, SK, Mancusso, R & Gouaux, E 2005, 'Subunit arrangement and function in NMDA receptors', *Nature*, vol. 438, no. 7065, pp. 185–192.

- 40.) Gable, MS, Sheriff, H, Dalmau, J, Tilley, DH & Glaser, CA 2012, 'The frequency of autoimmune N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis surpasses that of individual viral etiologies in young individuals enrolled in the California Encephalitis Project', *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 54, no. 7, pp. 899–904.
- 41.) Gandal, MJ, Anderson, RL, Billingslea, EN, Carlson, GC, Roberts, TPL & Siegel, SJ 2012, 'Mice with reduced NMDA receptor expression: more consistent with autism than schizophrenia?', *Genes, brain, and behavior*, vol. 11, no. 6, pp. 740–750.
- 42.) Gleichman, AJ, Spruce, LA, Dalmau, J, Seeholzer, SH & Lynch, DR 2012, 'Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 32, no. 32, pp. 11082–11094.
- 43.) Granerod, J, Ambrose, HE, Davies, NW, Clewley, JP, Walsh, AL, Morgan, D, Cunningham, R, Zuckerman, M, Mutton, KJ, Solomon, T, Ward, KN, Lunn, MP, Irani, SR, Vincent, A, Brown, DW & Crowcroft, NS 2010, 'Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study', *The Lancet infectious diseases*, vol. 10, no. 12, pp. 835–844.
- 44.) Graus, F & Saiz, A 2008, 'Limbic encephalitis: an expanding concept', *Neurology*, vol. 70, no. 7, pp. 500–501.
- 45.) Graus, F, Saiz, A & Dalmau, J 2010, 'Antibodies and neuronal autoimmune disorders of the CNS', *Journal of neurology*, vol. 257, no. 4, pp. 509–517.
- 46.) Grisold, W, Giometto, B, Vitaliani, R & Oberndorfer, S 2011, 'Current approaches to the treatment of paraneoplastic encephalitis', *Therapeutic advances in neurological disorders*, vol. 4, no. 4, pp. 237–248.
- 47.) Gultekin, SH, Rosenfeld, MR, Voltz, R, Eichen, J, Posner, JB & Dalmau, J 2000, 'Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients', *Brain : a journal of neurology*, 123 (Pt 7), pp. 1481–1494.
- 48.) Harney, SC, Rowan, M & Anwyl, R 2006, 'Long-term depression of NMDA receptor-mediated synaptic transmission is dependent on activation of metabotropic glutamate receptors and is altered to long-term potentiation by low intracellular

- calcium buffering', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 26, no. 4, pp. 1128–1132.
- 49.) Hart, IK, Waters, C, Vincent, A, Newland, C, Beeson, D, Pongs, O, Morris, C & Newsom-Davis, J 1997, 'Autoantibodies detected to expressed K<sup>+</sup> channels are implicated in neuromyotonia', *Annals of neurology*, vol. 41, no. 2, pp. 238–246.
- 50.) Hayashi, T, Thomas, GM & Huganir, RL 2009, 'Dual palmitoylation of NR2 subunits regulates NMDA receptor trafficking', *Neuron*, vol. 64, no. 2, pp. 213–226.
- 51.) Hebb D. O. 1949, *The Organization of Behavior: a neuropsychological approach.*, John Wiley & Sons Inc., New York.
- 52.) Hodgkin, AL & Huxley, AF 1952, 'A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve', *The Journal of physiology*, vol. 117, no. 4, pp. 500–544.
- 53.) Honnorat, J, Antoine, JC, Derrington, E, Aguera, M & Belin, MF 1996, 'Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66 kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, vol. 61, no. 3, pp. 270–278.
- 54.) Huerta, PT, Sun, LD, Wilson, MA & Tonegawa, S 2000, 'Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons', *Neuron*, vol. 25, no. 2, pp. 473–480.
- 55.) Hughes, E, Peng, X, Gleichman, A, Lai, M, Zhou, L, Tsou, R, Parsons, T, Lynch, D, Dalmau, J & Balice-Gordon, R 2010, 'Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 30, no. 17, pp. 5866–5875.
- 56.) Iizuka, T, Sakai, F, Ide, T, Monzen, T, Yoshii, S, Iigaya, M, Suzuki, K, Lynch, DR, Suzuki, N, Hata, T & Dalmau, J 2008, 'Anti-NMDA receptor encephalitis in Japan: long-term outcome without tumor removal', *Neurology*, vol. 70, no. 7, pp. 504–511.
- 57.) Irani, SR, Bera, K, Waters, P, Zuliani, L, Maxwell, S, Zandi, MS, Friese, MA, Galea, I, Kullmann, DM, Beeson, D, Lang, B, Bien, CG & Vincent, A 2010, 'N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes', *Brain : a journal of neurology*, vol. 133, Pt 6, pp. 1655–1667.

- 58.) Johnson, N, Henry, C, Fessler, AJ & Dalmau, J 2010, 'Anti-NMDA receptor encephalitis causing prolonged nonconvulsive status epilepticus', *Neurology*, vol. 75, no. 16, pp. 1480–1482.
- 59.) Kemp, JA & McKernan, RM 2002, 'NMDA receptor pathways as drug targets', *Nature neuroscience*, vol. 5, pp. 1039–1042.
- 60.) Köhr, G 2006, 'NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution', *Cell and tissue research*, vol. 326, no. 2, pp. 439–446.
- 61.) Krystal, JH, Bennett, A, Abi-Saab, D, Belger, A, Karper, LP, D'Souza, DC, Lipschitz, D, Abi-Dargham, A & Charney, D 2000, 'Dissociation of ketamine effects on rule acquisition and rule implementation: possible relevance to NMDA receptor contributions to executive cognitive functions', *Biological psychiatry*, vol. 47, no. 2, pp. 137–143.
- 62.) Krystal, JH, D'Souza, DC, Petrakis, IL, Belger, A, Berman, RM, Charney, DS, Abi-Saab, W & Madonick, S 1999, 'NMDA agonists and antagonists as probes of glutamatergic dysfunction and pharmacotherapies in neuropsychiatric disorders', *Harvard review of psychiatry*, vol. 7, no. 3, pp. 125–143.
- 63.) Krystal, JH, Karper, LP, Seibyl, JP, Freeman, GK, Delaney, R, Bremner, JD, Heninger, GR, Bowers, MB & Charney, DS 1994, 'Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses', *Archives of general psychiatry*, vol. 51, no. 3, pp. 199–214.
- 64.) Lau, CG & Zukin, RS 2007, 'NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders', *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 8, no. 6, pp. 413–426.
- 65.) Lee, H, Takamiya, K, Han, J, Man, H, Kim, C, Rumbaugh, G, Yu, S, Ding, L, He, C, Petralia, RS, Wenthold, RJ, Gallagher, M & Huganir, RL 2003, 'Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory', *Cell*, vol. 112, no. 5, pp. 631–643.
- 66.) Lipton, SA & Rosenberg, PA 1994, 'Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders', *The New England journal of medicine*, vol. 330, no. 9, pp. 613–622.
- 67.) Lisman, J 1989, 'A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, no. 23, pp. 9574–9578.

- 68.) Lopes da Silva, FH, Witter, MP, Boeijinga, PH & Lohman, AH 1990, 'Anatomic organization and physiology of the limbic cortex', *Physiological reviews*, vol. 70, no. 2, pp. 453–511.
- 69.) Lynch, G, Larson, J, Kelso, S, Barrionuevo, G & Schottler, F 1983, 'Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation', *Nature*, vol. 305, no. 5936, pp. 719–721.
- 70.) Marco, LA & Joshi, RS 1992, 'A ketamine-induced rat model of tardive dyskinesia', *Progress in neurobiology*, vol. 38, no. 6, pp. 571–600.
- 71.) McCarron, MM, Schulze, BW, Thompson, GA, Conder, MC & Goetz, WA 1981, 'Acute phencyclidine intoxication: incidence of clinical findings in 1,000 cases', *Annals of emergency medicine*, vol. 10, no. 5, pp. 237–242.
- 72.) McHugh, TJ, Blum, KI, Tsien, JZ, Tonegawa, S & Wilson, MA 1996, 'Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice', *Cell*, vol. 87, no. 7, pp. 1339–1349.
- 73.) McHugh, TJ, Jones, MW, Quinn, JJ, Balthasar, N, Coppari, R, Elmquist, JK, Lowell, BB, Fanselow, MS, Wilson, MA & Tonegawa, S 2007, 'Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network', *Science (New York, N)*, vol. 317, no. 5834, pp. 94–99.
- 74.) McNaughton, BL 1980, 'Evidence for two physiologically distinct perforant pathways to the fascia dentata', *Brain research*, vol. 199, no. 1, pp. 1–19.
- 75.) McNaughton, BL, Barnes, CA & Andersen, P 1981, 'Synaptic efficacy and EPSP summation in granule cells of rat fascia dentata studied in vitro', *Journal of neurophysiology*, vol. 46, no. 5, pp. 952–966.
- 76.) Mohn, AR, Gainetdinov, RR, Caron, MG & Koller, BH 1999, 'Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia', *Cell*, vol. 98, no. 4, pp. 427–436.
- 77.) Morgan, CJA & Curran, HV 2012, 'Ketamine use: a review', *Addiction*, vol. 107, no. 1, pp. 27–38.
- 78.) Morris, R 1984, 'Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat', *Journal of neuroscience methods*, vol. 11, no. 1, pp. 47–60.
- 79.) Morris, RG 1989, 'Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 9, no. 9, pp. 3040–3057.

- 80.) Morris, RG, Anderson, E, Lynch, GS & Baudry, M 1986, 'Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5', *Nature*, vol. 319, no. 6056, pp. 774–776.
- 81.) Morris, RG, Garrud, P, Rawlins, JN & O'Keefe, J 1982, 'Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions', *Nature*, vol. 297, no. 5868, pp. 681–683.
- 82.) Nakazawa, K, Quirk, MC, Chitwood, RA, Watanabe, M, Yeckel, MF, Sun, LD, Kato, A, Carr, CA, Johnston, D, Wilson, MA & Tonegawa, S 2002, 'Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall', *Science (New York, N.Y.)*, vol. 297, no. 5579, pp. 211–218.
- 83.) Niehusmann, P, Dalmau, J, Rudlowski, C, Vincent, A, Elger, CE, Rossi, JE & Bien, CG 2009, 'Diagnostic value of N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in women with new-onset epilepsy', *Archives of neurology*, vol. 66, no. 4, pp. 458–464.
- 84.) Niewoehner, B, Single, FN, Hvalby, Ø, Jensen, V, Zum Meyer Alten Borgloh, S, Seeburg, PH, Rawlins, JNP, Sprengel, R & Bannerman, DM 2007, 'Impaired spatial working memory but spared spatial reference memory following functional loss of NMDA receptors in the dentate gyrus', *The European journal of neuroscience*, vol. 25, no. 3, pp. 837–846.
- 85.) Nokura, K, Yamamoto, H, Okawara, Y, Koga, H, Osawa, H & Sakai, K 1997, 'Reversible limbic encephalitis caused by ovarian teratoma', *Acta neurologica Scandinavica*, vol. 95, no. 6, pp. 367–373.
- 86.) O'Connor, JJ, Rowan, MJ & Anwyl, R 1994, 'Long-lasting enhancement of NMDA receptor-mediated synaptic transmission by metabotropic glutamate receptor activation', *Nature*, vol. 367, no. 6463, pp. 557–559.
- 87.) O'Connor, JJ, Rowan, MJ & Anwyl, R 1995, 'Tetanicly induced LTP involves a similar increase in the AMPA and NMDA receptor components of the excitatory postsynaptic current: investigations of the involvement of mGlu receptors', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 15, 3 Pt 1, pp. 2013–2020.
- 88.) Olney, JW 1978, 'Neurotoxicity of excitatory amino acids.' in *Kainic acid as a tool in neurobiology*, eds EG McGeer, JW Olney & PL McGeer, Raven Press, New York, pp. 95–121.

- 89.) Pedrosa, D, Geyer, C, Klosterkötter, J, Fink, G & Burghaus, L 2012, 'Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis: Ein neurologisch-psychiatrischer Notfall', *Fortschritte der Neurologie · Psychiatrie*, vol. 80, no. 01, pp. 29–35.
- 90.) Philpot, BD, Sekhar, AK, Shouval, HZ & Bear, MF 2001, 'Visual experience and deprivation bidirectionally modify the composition and function of NMDA receptors in visual cortex', *Neuron*, vol. 29, no. 1, pp. 157–169.
- 91.) Pozo-Rosich, P, Clover, L, Saiz, A, Vincent, A & Graus, F 2003, 'Voltage-gated potassium channel antibodies in limbic encephalitis', *Annals of neurology*, vol. 54, no. 4, pp. 530–533.
- 92.) Prüss, H, Höltje, M, Maier, N, Gomez, A, Buchert, R, Harms, L, Ahnert-Hilger, G, Schmitz, D, Terborg, C, Kopp, U, Klingbeil, C, Probst, C, Kohler, S, Schwab, JM, Stoecker, W, Dalmau, J & Wandinger, KP 2012, 'IgA NMDA receptor antibodies are markers of synaptic immunity in slow cognitive impairment', *Neurology*, vol. 78, no. 22, pp. 1743–1753.
- 93.) Rohde, M 2009, *Mechanismen synaptischer Langzeitplastizität im Hippokampus nach Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren*. Diplomarbeit, Rostock.
- 94.) Roxo, MR, Franceschini, PR, Zubaran, C, Kleber, FD & Sander, JW 2011, 'The limbic system conception and its historical evolution', *TheScientificWorldJournal*, vol. 11, pp. 2428–2441.
- 95.) Sakimura, K, Kutsuwada, T, Ito, I, Manabe, T, Takayama, C, Kushiya, E, Yagi, T, Aizawa, S, Inoue, Y & Sugiyama, H 1995, 'Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit', *Nature*, vol. 373, no. 6510, pp. 151–155.
- 96.) Savio-Galimberti, E, Gollob, MH & Darbar, D 2012, 'Voltage-Gated Sodium Channels: Biophysics, Pharmacology, and Related Channelopathies', *Frontiers in Pharmacology*, vol. 3.
- 97.) Schulz, R, Kirschstein, T, Brehme, H, Porath, K, Mikkat, U & Köhling, R 2012, 'Network excitability in a model of chronic temporal lobe epilepsy critically depends on SK channel-mediated AHP currents', *Neurobiology of disease*, vol. 45, no. 1, pp. 337–347.
- 98.) Scoville, WB 1954, 'The limbic lobe in man', *Journal of neurosurgery*, vol. 11, no. 1, pp. 64–66.

- 99.) Scoville, WB & Milner, B 1957, 'Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, vol. 20, no. 1, pp. 11–21.
- 100.) Selig, DK, Hjelmstad, GO, Herron, C, Nicoll, RA & Malenka, RC 1995, 'Independent mechanisms for long-term depression of AMPA and NMDA responses', *Neuron*, vol. 15, no. 2, pp. 417–426.
- 101.) Shimizu, E, Tang, YP, Rampon, C & Tsien, JZ 2000, 'NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation', *Science (New York, N.Y.)*, vol. 290, no. 5494, pp. 1170–1174.
- 102.) Smith, TG, Lecar, H, Redman, SJ & Gage, PW (eds.) 1985, Voltage and patch clamping with microelectrodes. [Workshop on Voltage Clamping with Microelectrodes ... was part of a satellite Symposium on Synaptic Transmission ... held on Hayman Island, Australia, Sept. 4 - 10, 1983], American Physiolog. Soc, Bethesda, Md.
- 103.) Staley, KJ, Otis, TS & Mody, I 1992, 'Membran Properties of Dentate Gyrus Granule Cells: Comparison of Sharp Microelectrode and Whole-Cell Recordings', *Journal of Neurophysiology*, vol. 67, no. 5, pp. 1346–1358.
- 104.) Taylor, RB, Mason, W, Kong, K & Wennberg, R 1999, 'Reversible paraneoplastic encephalomyelitis associated with a benign ovarian teratoma', *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, vol. 26, no. 4, pp. 317–320.
- 105.) Tonegawa, S, Tsien, JZ, McHugh, TJ, Huerta, P, Blum, KI & Wilson, MA 1996, 'Hippocampal CA1-region-restricted knockout of NMDAR1 gene disrupts synaptic plasticity, place fields, and spatial learning', *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, vol. 61, pp. 225–238.
- 106.) Tsai, G & Coyle, JT 2002, 'Glutamatergic mechanisms in schizophrenia', *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 42, pp. 165–179.
- 107.) Tsien, JZ, Huerta, PT & Tonegawa, S 1996, 'The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory', *Cell*, vol. 87, no. 7, pp. 1327–1338.
- 108.) Tüzün, E & Dalmau, J 2007, 'Limbic Encephalitis and Variants: Classification, Diagnosis and Treatment', *The Neurologist*, vol. 13, no. 5, pp. 261–271.
- 109.) Tüzün, E, Zhou, L, Baehring, JM, Bannykh, S, Rosenfeld, MR & Dalmau, J 2009, 'Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis



- associated with ovarian teratoma', *Acta neuropathologica*, vol. 118, no. 6, pp. 737–743.
- 110.) Vincent, A, Buckley, C, Schott, JM, Baker, I, Dewar, B, Detert, N, Clover, L, Parkinson, A, Bien, CG, Omer, S, Lang, B, Rossor, MN & Palace, J 2004, 'Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis', *Brain : a journal of neurology*, vol. 127, Pt 3, pp. 701–712.
- 111.) Vitaliani, R, Mason, W, Ances, B, Zwerdling, T, Jiang, Z & Dalmau, J 2005, 'Paraneoplastic encephalitis, psychiatric symptoms, and hypoventilation in ovarian teratoma', *Annals of neurology*, vol. 58, no. 4, pp. 594–604.
- 112.) Weiner, AL, Vieira, L, McKay, CA & Bayer, MJ 2000, 'Ketamine abusers presenting to the emergency department: a case series', *The Journal of emergency medicine*, vol. 18, no. 4, pp. 447–451.
- 113.) Yao, Y & Mayer, ML 2006, 'Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 26, no. 17, pp. 4559–4566.
- 114.) Zhang, Q, Tanaka, K, Sun, P, Nakata, M, Yamamoto, R, Sakimura, K, Matsui, M & Kato, N 2012, 'Suppression of synaptic plasticity by cerebrospinal fluid from anti-NMDA receptor encephalitis patients', *Neurobiology of disease*, vol. 45, no. 1, pp. 610–615.
- 115.) Zola-Morgan, S, Squire, LR & Amaral, DG 1986, 'Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 6, no. 10, pp. 2950–2967.

*Ich danke allen von Herzen, die für mich da waren!*

## Veröffentlichungen

### Originalarbeiten:

1. Kernig, K., Kirschstein, T., **Würdemann, T.**, Rohde, M., Köhling, R. (2012): The afterhyperpolarizing Potential following a train of action potentials is suppressed in an acute Epilepsy Model in the rat cornu ammonis 1 area. *Neuroscience* 201, 288-296

### Kongressbeiträge:

1. Kirschstein, T., Tokay, T., Rohde, M., **Würdemann, T.**, Porath, K., Bien, C., Köhling, R. (2011): Long-term potentiation is impaired in a rat model of anti- NMDA receptor encephalitis. 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Physiological Society, Regensburg, Germany, 2011, *Acta Physiologica 2011*, Volume 201, Supplement 682: O42
2. Elektrophysiologische Untersuchungen zur Funktionalität des NMDA-Rezeptors bei Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis im Tiermodell der Ratte. Vortrag beim XVII. Physiologentreffen im Ostseeraum, 04. – 05. Mai 2012, Rostock.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und dabei keine anderen als die von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmitteln verwendet habe. Ich erkläre hiermit weiterhin, dass die vorgelegte Arbeit zuvor weder von mir noch – soweit mir bekannt ist – von einer anderen Person an dieser oder einer anderen Hochschule eingereicht wurde. Darüber hinaus ist mir bekannt, dass die Unrichtigkeit dieser Erklärung eine Benotung der Arbeit mit der Note "nicht ausreichend" zur Folge hat und dass Verletzungen des Urheberrechts strafrechtlich verfolgt werden können.

Rostock, 19. Juli 2013

*Till J. Würdemann*