

Intracerebroventrikuläre Injektionen von Zink Ionen und Histidin als Carrier modulieren die Anfallsaktivität nach experimentell induzierter Epileptogenese unterschiedlich in $Ca_v2.3$ -defizienten Mäusen und Kontrolltieren

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

An der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln



vorgelegt von

Serdar Alpdogan

aus Hilden

Köln, 2020

Intracerebroventrikuläre Injektionen von Zink Ionen und Histidin als Carrier modulieren die Anfallsaktivität nach experimentell induzierter Epileptogenese unterschiedlich in $Ca_v2.3$ defizienten Mäusen und Kontrolltieren

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Serdar Alpdogan

aus Hilden

Köln, 2020

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Wolfgang Walkowiak

Gutachter/in: 2. Priv.-Dozentin Dr. Heike Endepols

Datum der Einreichung: 20.03.2020

Datum der Promotion: 26.05.2020

Für meine Eltern, Geschwister,

meine Frau

und

meine Kinder.

Teile dieser Dissertation stammen aus folgenden Publikationen und wurden mit der Erlaubnis des Copyright Besitzers wiederverwendet.

1. Publikation: Mit Erlaubnis von © Springer Nature 2019. Original Artikel ist verfügbar unter (<https://doi.org/10.1007/s00221-019-05605-z>)
2. Publikation: © 2020 Serdar Alpdogan et. al. Original Artikel ist verfügbar unter (<https://doi.org/10.33594/000000213>)

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Professor Dr. Toni Schneider und Frau Renate Clemens von mir selbst ausgeführt worden.

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	V
Abstract	VII
1 Einleitung	1
1.1 Spannungsgesteuerter Ca _v 2.3 (R-Typ) Calcium-Kanal.....	3
1.2 Epilepsie	4
1.3 Spurenmetallkationen (Trace metals).....	5
1.4 Zink und Epilepsie.....	6
1.5 Zielsetzung	7
2 Material und Methoden	9
2.1 Material.....	9
2.2 Hilfsmittel.....	12
2.3 Mauslinie	14
2.4 Methoden	15
2.4.1 Genotypisierung	15
2.4.2 Anästhesie.....	15
2.4.3 Implantation von Führungskanülen und Transmitter	15
2.4.4 Telemetrie System	21
2.4.5 Analyse der Hirnaktivität	22
2.4.6 Verhaltensstudie	23
2.4.7 Versuchsgruppen und Injektionen	24
2.4.8 Histologische Untersuchung von Spurenmetall Kationen.....	28
3 Ergebnisse	30
3.1 Postoperative Genesung und Gewichtsentwicklung	30
3.2 Subkutane Pouch-Implantation der Radio-Transmitter	31
3.3 Elektrocorticogramme vor den Injektionen	32
3.4 Elektrocorticogramme nach den Injektionen.....	32
3.4.1 Elektrocorticogramme nach intraperitonealer NaCl-Injektion	32
3.4.3 Elektrocorticogramme nach intraperitonealer Kainat-Injektion.....	34
3.5 Verhaltensstudie	36

3.5.1 Seizure Scoring.....	36
3.5.3 Latenzzeitanalyse	42
3.6 Telemetrische Datenanalyse mit NeuroScore	44
3.6.1 Analyse unterschiedlicher Anfallsparameter.....	44
3.6.2 Leistungsspektraldichte Analyse (Power spectrum density)	50
3.7 Histologische Untersuchung.....	56
3.7.1 Qualitative Analyse nach Timm´s Färbemethode	56
4 Diskussion.....	63
4.1 Implantation von Transmittern und Führungskanülen	63
4.2 Sterberaten	64
4.3 Analyse von Hirnoberflächenableitungen	64
4.4 Leistungsspektraldichte	65
4.5 Timm´s Färbemethode zum Nachweis von Zink Ionen	66
4.6 Ca _v 2.3 Calcium-Kanal, Histidin und Zink	67
4.7 Abschluss.....	70
Literaturverzeichnis.....	IX
Anhang	XVI
Danksagung.....	XIX
Erklärung.....	XX

Abkürzungsverzeichnis

AMG Methode	Autometallographische Methode
Ca ²⁺	Calcium
cc	Kubikzentimeter
Cu ²⁺	Kupfer
DHP	Dihydropiridin
Fe ⁺	Eisen
h	Stunde
His	L-Histidin
K ⁺	Kalium
KA	Kainat
kg	Kilogramm
KO	Knock out, Ca _v 2.3(-/-)-defizient oder Ca _v 2.3(-/-)
Hz	Herz
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunde

n	Anzahl
NaCl ₂	Natrium Chlorid
Na ₂ S	Natriumsulfid
Ni ²⁺	Nickel
PFA	Paraformaldehyde
rpm	Rounds per minute Umdrehung pro Minute
RT PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction = Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SE	Status Epilepticus
SEM	Standardfehler
WHO	World Health Organization = Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp, Ca _v 2.3(+ +) kompetent, Ca _v 2.3(+ +)
Zn ²⁺	Zink
ZEN	Zinc enriched neurons = mit Zink angereicherte Neurone
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Hintergrund: Epilepsie ist eine neurologische Erkrankung, an der weltweit über 50 Millionen Menschen aus allen Altersgruppen erkrankt sind. Die Erkrankung hat viele Formen und unterschiedliche Symptome. Die genauen Mechanismen für die Entstehung von epileptischen Anfällen sind sehr vielfältig. Zum einen ist der $Ca_v2.3$ Calcium-Kanal an der Generierung von epileptischen Anfällen beteiligt. Zusätzlich verdichteten sich in den letzten Jahren vermehrt Hinweise, dass die Homöostase von bestimmten Spurenmetall-Ionen, insbesondere von Zink, eine Rolle in der Epileptogenese einnehmen.

Ziele: In dieser Arbeit soll die Funktion von Zink und seine Bedeutung in der Kainat induzierten Epileptogenese über den $Ca_v2.3$ Calcium-Kanal untersucht werden.

Methoden: In dieser Arbeit wird daher die Zinkhomöostase manipuliert, um den Einfluss von Zink bei der Kainat induzierten Epilepsie in Mäusen mit und ohne $Ca_v2.3$ Calcium-Kanal zu untersuchen. Mäusen wird entweder 1 mM Histidin (His) allein oder in Kombination mit 10 μ M Zinkchlorid ($ZnCl_2$) zusätzlich zur intraperitonealen Injektion von 15 mg / kg Kainat (KA) zur Anfallsinduktion injiziert. Es wurde eine Methode zur intracerebroventrikulären (i.c.v.) Injektion von Histidin allein oder in Kombination mit Zink bei Mäusen entwickelt, um eine direkte Anreicherung von Zink Ionen im Gehirn zu erreichen. Wildtyp-Mäuse und Mäuse mit deletiertem $Ca_v2.3$ Ca^{2+} -Kanal wurden in je 3 Hauptgruppen eingeteilt: A. Mäuse ohne i.c.v. Injektion (ohne Kanüle), B. mit i.c.v. Histidin Injektion (mit Kanüle) und C. mit i.c.v. Injektion von Zink mit Histidin (mit Kanüle). Jede Hauptgruppe enthielt eine Kontrollgruppe und einer Gruppe von Mäusen bei denen konvulsive Anfälle durch ein intraperitoneal (i.p.) injiziertes chemisches Läsionswerkzeug, dem Kainat (KA) ausgelöst wurden. Nach den Injektionen wurden telemetrische Messungen an der Hirnoberfläche von sich frei bewegenden Mäusen zur Erfassung von epileptischen Anfällen durchgeführt. Zusätzlich wurde für eine Gesamtbeobachtungszeit von 2 h nach Injektion der Schweregrad von Anfällen registriert und quantifiziert. Darüber hinaus wurde eine immunhistochemische Methode zum Nachweis von Schwermetall-Kationen im Gehirn angewendet, um die Ausbreitung von injiziertem Zink zu verfolgen oder den Verbleib von endogenem Zink darzustellen.

Ergebnisse: Nach Kainat Injektion wurde in $Ca_v2.3$ -kompetenten Mäusen schwerere Anfälle und eine höhere Sterblichkeitsrate festgestellt verglichen mit $Ca_v2.3$ KO-Mäusen. Nach zusätzlicher intracerebroventrikulärer Gabe von Histidin reduzierten sich die Sterberaten

drastisch in beiden Genotypen. Jedoch zeigte sich nur in Wildtyp-Mäusen eine signifikante Verbesserung in der Anfallsintensität. Zusätzlich wurde dabei eine Abnahme der Färbintensität nach der Methode von Timm registriert. Die zusätzliche Applikation von Zink in Verbindung mit Histidin sorgte hingegen erneut für einen Anstieg der Sterblichkeitsrate jedoch nur in $Ca_v2.3(+|+)$ Wildtyp-Mäusen und zu einer intensiveren Färbung im Gehirn. Schlussfolgernd liegt es nahe, dass Zink durch die modulierenden Effekte am $Ca_v2.3$ Ca^{2+} -Kanal Einfluss auf die Epileptogenese hat.

Schlagwörter:

Epilepsie, spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle, $Ca_v2.3$, Zink, Kainat

Abstract

Background: Worldwide more than 50 million people of all ages are diagnosed with epilepsy, which comes up in many forms and different symptoms. The exact mechanisms for the development of epileptic seizures are very diverse. One, the $Ca_v2.3$ calcium-channel is involved in the generation of epileptic seizures. Additionally, there has been increasing evidence in recent years that the homeostasis of certain trace metal ions, especially zinc, plays also a role in epileptogenesis.

Objectives: The function of zinc and its importance in kainate-induced epileptogenesis via the $Ca_v2.3$ calcium-channel are to be investigated in this work.

Methods: In this work, zinc homeostasis is manipulated in order to investigate the influence of zinc in kainate-induced epilepsy in mice with and without $Ca_v2.3$ calcium-channel. Mice are injected with either 1 mM histidine (His) alone or in combination with 10 μ M zinc chloride ($ZnCl^{2+}$) in addition to intraperitoneal injection of 15 mg / kg kainic acid (KA) for seizure induction. A new murine system was developed for intracerebroventricular injections of either histidine alone or in combination with zinc to ensure an instant enrichment in the brain. Wildtype-mice and mice with deleted $Ca_v2.3$ Ca^{2+} -channel were divided into 3 main groups: A. Mice without i.c.v. Injection (without cannula), B. with i.c.v. Histidine injection (with cannula) and C. with i.c.v. zinc injection with histidine (with cannula). Each main group consisted of a control group and a group of mice in which convulsive seizures were caused by an intraperitoneally (i.p.) injected chemical lesion tool called kainate (KA). After the injections, telemetric measurements were taken from the brain of freely moving mice to detect epileptic seizures. In addition, the severity of seizures was recorded and quantified for a total observation period of 2 hours after the injections. Furthermore, an immunohistochemical method for the detection of metal cations in the brain was used to monitor the spreading of injected zinc or to localize endogenous pools of zinc.

Results: Kainate injection caused more severe seizures in $Ca_v2.3$ -competent mice resulting in high seizure Scores and a higher mortality rate compared to $Ca_v2.3$ KO-mice. After additional intracerebroventricular administration of histidine, death rates were drastically reduced in both genotypes. However, there was a significant reduction in seizure intensity only in wildtype-mice. In addition, a decrease in Timm's stain was observed for this group. The additional application of zinc in combination with histidine, however, again caused an

increase in the mortality rate, but only in $Ca_v2.3(+|+)$ -mice. Also staining pattern in Timm's stain was different in both genotypes. Given the above mentioned results it is obvious that zinc has an influence on epileptogenesis due to the modulating effects on the $Ca_v2.3$ Ca^{2+} -channel.

Keywords:

Epilepsy, voltage-gated calcium channels, $Ca_v2.3$, Zinc, Kainic acid

1 Einleitung

Spannungsgesteuerte Calcium (Ca^{2+})-Kanäle beeinflussen den Calcium-Strom in jeder Zelle eines Organismus und sind daher Schlüsselemente der neuronalen Erregung. Sie wandeln elektrische Signale an der Zellmembran um, und führen zum Anstieg des intrazellulären Calciums. Durch die daher bedingte Änderung der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle über verschiedene Ca^{2+} -Kanäle werden viele physiologische Prozesse und Reaktionen aktiviert und reguliert. Neben der elektrischen Erregbarkeit von Zellen wird z.B. auch die elektromechanische Kopplung bei der Muskelkontraktion, die Synthese und Sekretion von Neurotransmittern und Peptid Hormonen, Insulinsekretion (Jing 2005; Catterall et al. 2005), Regulation und Expression von Genen oder Apoptose (Suzuki et al. 2004), Langzeitpotenzierung bei der Gedächtnisbildung (Myoga und Regehr 2011), Schmerzentwicklung und Schmerzweiterleitung (Saegusa et al. 2002) geregelt. Bisher wurden 10 verschiedene Typen von spannungsgesteuerten Calcium-Kanälen entdeckt (Übersicht siehe Tabelle 1), die alle durch unterschiedliche pharmakologische oder physiologische Eigenschaften weiter unterteilt werden können (Catterall 2000). Die hochspannungsaktivierenden Ca^{2+} -Kanäle aktivieren bei Depolarisation auf -50mV - -30mV und bestehen aus den Mitgliedern der L- ($\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$ und $\text{Ca}_v1.4$), P/Q- ($\text{Ca}_v2.1$), N- ($\text{Ca}_v2.2$) und R-Typ Kanälen ($\text{Ca}_v2.3$). Die T-Typ Kanäle ($\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$, und $\text{Ca}_v3.3$) bilden die Gruppe der niederspannungsaktivierenden Ca^{2+} -Kanäle (Zamponi et al. 2015; Catterall et al. 2017; Nanou und Catterall 2018), da sie bereits bei einer geringeren Depolarisationsspannung aktiviert werden.

Veränderungen in diesen Calcium-Kanälen oder deren Interaktionspartnern können viele Calciumkanalkrankheiten auslösen (Weiergräber et al. 2008; Striessnig et al. 2010), wie z. B. JME (juvenile myoclonic epilepsy) (Suzuki et al. 2004), Morbus Parkinson (Benkert et al. 2019) und werden auch mit epileptischen Enzephalopathien sowie weiteren neurologischen Entwicklungsstörungen (Helbig et al. 2018) in Verbindung gebracht. Dabei gab es bereits 1999 erste Hinweise auf veränderte Transkripte zweier Calcium-Kanäle ($\text{Ca}_v2.3$ und $\text{Ca}_v3.1$) im Hirn von genetisch veränderten Ratten mit Absence Epilepsie (GEARS) aus Strasbourg (Borman et al. 1999). Der hier untersuchte $\text{Ca}_v2.3$ Ca^{2+} -Kanal ist im zentralen Nervensystem (ZNS) weit verbreitet und ist vor allem im Hippocampus und Neocortex (Gasparini et al. 2001; Sochivko et al. 2002) exprimiert. Diese Bereiche werden auch mit der Generierung von schnellen und langsamen Spitzen (spike-wave-discharges) in der Epileptogenese in Verbindung gebracht.

Tabelle 1: Calcium Kanäle aufgelistet mit ihren jeweilig vermittelten Strömen und deren Lokalisation (modifiziert nach (Catterall et al. 2005)).

Calcium Kanal	vermittelter Strom	Lokalisation
Ca _v 1.1	L-Typ	Skelett Muskeln, transversale Tubuli
Ca _v 1.2	L-Typ	Myozyten, glatte Muskelzellen, cochleare, Endokrine Zellen, neuronale Zellkörper, Dendriten
Ca _v 1.3	L-Typ	Endokrine Zellen, neuronale Zellkörper und Dendriten, atriale Myozyten und Schrittmacherzellen, cochleare Haarzellen
Ca _v 1.4	L-Typ	retinale Stäbchen und Bipolare Zellen, Nebenniere, Rückenmark, Mastzellen
Ca _v 2.1E	N-Typ	Nervenenden und Dendriten, neuroendokrine Zellen, kardiale Zellen, retinale Zellen
Ca _v 2.2	P/Q-Typ	Nervenenden und Dendriten, neuroendokrine Zellen
Ca _v 2.3	R-Typ	neuronale Zellkörper und Dendriten
Ca _v 3.1	T-Typ	neuronale Zellkörper und Dendriten Herzmuskelzellen und glatte Muskelzellen
Ca _v 3.2	T-Typ	neuronale Zellkörper und Dendriten, Herzmuskelzellen und glatte Muskelzellen
Ca _v 3.3	T-Typ	neuronale Zellkörper und Dendriten

1.1 Spannungsgesteuerter Ca_v2.3 (R-Typ) Calcium-Kanal

Der spannungsgesteuerte Ca_v2.3 Calcium-Kanal hat aufgrund seiner pharmakologischen und physiologischen Eigenschaften eine gesonderte Stellung. Dieser Kanal wird auch als R-Typ Kanal bezeichnet, da dieser Kanal aktiv bleibt bzw. resistent ist, wenn alle anderen Kanäle geblockt werden. Dieser Kanal ist gegenüber den bekannten Calcium-Kanal Antagonisten wie Dihydropyridinen (DHPs), ω -Conotoxin GVIA, ω -Conotoxin MVIIC und ω -Agatoxin IVA resistent (Pringos et al. 2011). Lange Zeit galt SNX-482, ein Gift von *Hysteroocrates gigas* (Herkulespinne), einer Tarantel, welche in Kamerun beheimatet ist, als spezifische Ca_v2.3 Calcium-Kanalblocker (IC₅₀ 20-60 nM) (Newcomb et al. 1998; Ricoy und Frerking 2014), bis sich herausstellte, dass 2 Kalium-Kanäle (K_v4.2-Kanal, K_v4.3-Kanal) mit einer höheren Affinität blockiert werden (IC₅₀ < 3 nM für K_v4.3-Kanal) (Kimm und Bean 2014). Wie bei vielen spannungsgesteuerten Kanälen haben Metallionen wie Nickel (Ni²⁺), Kupfer (Cu²⁺), Zink (Zn²⁺) eine inhibierende Wirkung auf den Ca_v2.3 Calcium-Kanal, welche darauf beruht, einen geschlossenen Kanal über zwei Histidin Bindungsstellen (His¹⁷⁹ und His¹⁸³) im geschlossenen Zustand zu stabilisieren (Shcheglovitov et al. 2012; Neumaier et al. 2015). Auch wenn der Ca_v2.3 Calcium-Kanal in anderen Geweben lokalisiert ist, wie zum Beispiel im Herzen, in der Retina, in den Geschlechtszellen und weiteren, findet sich die höchste Population an Ca_v2.3 Ca²⁺-Kanälen im Hippocampus und weiteren limbischen Strukturen im Gehirn, sowie in der Retina und kortikalen Neuronen (Soong et al. 1993; Sochivko et al. 2002; Weiergräber et al. 2006). Daher können Veränderungen und Fehlfunktionen des Ca_v2.3 Ca²⁺-Kanals zu schweren neurologischen Entwicklungsstörungen sowie weiteren krankhaften Veränderungen im Gehirn führen, einschließlich zu einer epileptischen Enzephalopathie, wie in der Arbeit von Helbig et al. 2018, (Helbig et al. 2018) gezeigt wurde. Bei früheren Experimenten mit Mäusen zeigte eine Abschaltung des Gens CaCNA1E, dass die generierten Ca_v2.3-defizienten Mäuse (Ca_v2.3(-/-)) in Untersuchungen mit Kainat induzierten epileptischen Anfällen eine erhöhte Anfallsresistenz zeigten und weniger hippocampale Zellen zugrunde gingen (Weiergräber et al. 2007; Dibué-Adjei et al. 2017). Die hier untersuchten Mäuse entstammen aus der hauseigenen Zucht und werden in Abschnitt 2.3 näher beschrieben.

1.2 Epilepsie

Epilepsie zählt zu den am häufigsten verbreiteten Hirnerkrankungen der Welt. Weltweit wird die Zahl der Menschen mit Epilepsie von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) auf ungefähr 50 Millionen geschätzt (Juni 2019) und betrifft Menschen aus jeder Altersgruppe. In Deutschland sind 500000 Menschen betroffen, die wegen einer Epilepsie behandelt werden, wobei jährlich etwa 38000 Neuerkrankungen hinzukommen. Gekennzeichnet ist die Epilepsie durch immer wiederkehrende Anfälle, die sich in Form von kurzen Episoden unwillkürlicher Bewegungen manifestieren. Diese epileptischen Anfälle werden ausgelöst durch pathologisch exzessiven neuronalen Entladungen bzw. durch eine abnormal gesteigerte hypersynchrone Hirnaktivität (Fisher et al. 2005).

Epileptische Anfälle können partial, wenn nur eine Körperregion betroffen ist, oder generalisiert bzw. am gesamten Körper auftreten. Die generalisierten Anfälle werden häufig begleitet von Bewusstseinsverlust und Inkontinenz. Es wird geschätzt, dass etwa 10 % der Weltbevölkerung (WHO, 2019) mindestens einmal im Leben einen epileptischen Anfall erleiden, wobei dieser bereits auch im Kindesalter aufgetreten sein kann. Eine Reihe von Ursachen kann die Entstehung von Epilepsie begünstigen. Im Kindes- und Jugendalter werden unter anderem genetische Defekte (Helbig et al. 2019) und Schäden am zentralen Nervensystem mit der Entstehung von Epilepsie in Verbindung gebracht, während im Erwachsenenalter ein Schlaganfall, eine schwere Kopfverletzung, eine Infektion (Meningitis, Enzephalitis und weitere) oder Tumore das Risiko an Epilepsie zu erkranken erhöhen (WHO, 2019).

Ein epileptischer Anfall kann unterschiedlich aussehen. Je nachdem welcher Hirnbereich durch spontane übermäßige elektrische Entladung von Nervenzellgruppen betroffen ist, können unterschiedliche Funktionen gestört sein. Das bedeutet, dass zum Beispiel die Motorik, Sprache oder das Bewusstsein betroffen und gestört sein können. Ein Anfall im motorischen Kortex kann sich durch leichte Zuckungen bis hin zu unkontrollierten Bewegungen bemerkbar machen, je nach Schwere des epileptischen Anfalls. Eine Absence Epilepsie betrifft eher das Bewusstsein und ist nach außen hin schwerer zu erkennen, da die Betroffenen sich unauffällig verhalten, aber Bewusstseinspausen haben, in denen sie nicht ansprechbar sind. Bei einem „Grand mal“ verkrampft der anfallserleidende Mensch zunächst am ganzen Körper (tonische Phase) und im Anschluss in der klonischen Phase zuckt der gesamte Körper unkontrolliert. Bei diesem tonisch-klonischen Anfall, kann es zu mehr oder minder schweren Verletzungen kommen (Zunge durchbeißen, Kopfverletzungen durch Stürze, Unfälle im Straßenverkehr und Weiteres).

Epileptische Anfälle dauern in der Regel einige Minuten. Anschließend arbeitet das Gehirn in gewohnter Weise weiter. Heutzutage gibt es viele Antiepileptika wie z.B. Lamotrigin oder Clonazepam und weitere (Stephen und Brodie 2020), die helfen können, anfallsfrei zu bleiben. Meist wählt man einen monotherapeutischen Ansatz, bei dem der Patient nur einen Wirkstoff erhält. Eine Therapie kann auch mithilfe von mehreren Medikamenten erfolgen. Nachteil dieser Kombinationstherapie ist jedoch, dass mehr Nebenwirkungen auftreten können. Ein Absetzen der medikamentösen Therapie kann nach zwei anfallsfreien Jahren in Frage kommen. Bei Patienten, bei denen eine medikamentöse Epilepsiebehandlung nicht oder nach einer gewissen Zeit nicht mehr zum gewünschten Erfolg der Anfallsfreiheit führt, könnte die Neurostimulation oder ein epilepsiechirurgischer Eingriff als eine weitere Möglichkeit in Betracht gezogen werden. Die Neurostimulation ist eine Option für Patienten, die für einen chirurgischen Eingriff nicht in Frage kommen. Bei der Neurostimulation handelt es sich um ein Verfahren, bei dem nur eine Minderung der Anfallsfrequenz oder Anfallsschwere erreicht werden kann, jedoch nie eine vollständige Anfallsfreiheit erreicht wird. Es werden bei diesem Verfahren, ähnlich wie bei einem Herzschrittmacher, Strukturen, die zum Gehirn führen, wie z.B. der Vagusnerv (Vagus-Nerv-Stimulation) mit niedrigen Stromstärken stimuliert, um die Übererregbarkeit im Gehirn herabzusetzen.

Eine weitere Option ist eine Operation am Gehirn. Ziel ist es dabei geschädigte Hirnareale zu entfernen, um so eine Anfallsfreiheit zu erreichen. In einer Studie wurde gezeigt, dass 58% der untersuchten Epilepsiepatienten 1 Jahr nach einer Temporal Lappen Operation anfallsfrei blieben (Wiebe Samuel et al. 2001).

1.3 Spurenmetallkationen (Trace metals)

Spurenmetallkationen von Eisen (Fe^+), Kupfer (Cu^{2+}), Magnesium (Mg^{2+}) und Zink (Zn^{2+}) kommen in geringen Mengen im menschlichen Organismus vor und sind für eine normale Entwicklung unverzichtbar. Sie übernehmen wichtige Funktionen und sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt. Unter anderem dienen sie als Co-Faktoren für viele Enzyme, dienen der Aufrechterhaltung von Strukturen (Osredkar und Sustar 2011) oder haben regulierende Aufgaben, wie zum Beispiel bei der neuronalen Erregbarkeit (Mathie et al. 2006; Barnham und Bush 2008). Im Körper sind ca. 90 % der Spurenmetallionen an sogenannte Metalloproteine (z. B. Albumin, Hämoglobin und weiteren) oder an Aminosäuren wie z.B. L-Histidin oder L-Glutamat gebunden und werden dadurch reguliert (Mathie et al. 2006; Shcheglovitov et al. 2012; Neumaier et al. 2018b). Nur eine geringe Menge der Metallionen

kommt dabei in freier oder locker gebundener Form vor, wie zum Beispiel Zink als Botenstoff in präsynaptischen Vesikeln (Takeda et al. 2003). Freie oder locker gebundene Metallionen werden oft auch als histochemisch reaktiv bezeichnet. Die Verteilung und die Konzentrationen der unterschiedlichen Metallionen variieren in verschiedenen Bereichen des Gehirns. Dabei gibt es viele regulierende Mechanismen (Transporter) oder Barrieren (Blut-Hirn-Schranke) zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes, da Metallionen aufgrund ihres geladenen Charakters nicht ohne spezifische Transporter oder Kanäle durch Membrane hindurchtransportiert werden können.

Bei vielen pathologischen Veränderungen und Erkrankungen wie Epilepsie, Schlaganfall, alzheimerischen Erkrankung, Morbus Parkinson und Creutzfeldt-Jakob Syndrom wurden signifikante Änderungen im Spurenmetall Haushalt nachgewiesen (Frederickson et al. 2005; Barnham und Bush 2008).

Viele Kanäle haben eine Bindungsstelle für Spurenmetallkationen. Die Bindungsstelle des hier untersuchten $\text{Ca}_v2.3 \text{ Ca}^{2+}$ -Kanals reagiert sensitiv auf Zn^{2+} und Cu^{2+} und bindet diese beiden Kationen mit einer hohen Affinität. Die Bindung von Zink und Kupfer stabilisiert dabei einen Zustand des Kanals und verändert damit die Sensitivität gegenüber der Spannung und die Kanalaktivierung (Shcheglovitov et al. 2012; Neumaier et al. 2018b). Daher wird in dieser Arbeit im $\text{Ca}_v2.3$ KO-Mausmodell der native Zinkhaushalt manipuliert (Chelierung durch Histidin, Anreicherung durch Zink), um dessen Auswirkung bei der Kainat induzierten Epilepsie zu erforschen.

1.4 Zink und Epilepsie

Zink ist nach Eisen das zweithäufigste Metallion im Körper und ist überwiegend in den Moos Fasern des Hippocampus hoch konzentriert (Danscher et al. 1997). Es ist daher nicht verwunderlich, dass Zink essenziell für eine gesunde Entwicklung und für die Aufrechterhaltung von Funktionen ist. Veränderungen im Zinkhaushalt stehen in Zusammenhang mit vielen psychiatrischen und neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel Depressionen, Schizophrenie, Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörung (ADHS) Multiple Sklerose, Down Syndrom, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Morbus Wilson und der Pick-Krankheit (Grabrucker et al. 2011).

Im gesunden Gehirn ist Zink verpackt in Vesikeln, die sich an den synaptischen Enden von Zink-angereicherten Neuronen (ZEN) befinden und kann bei Bedarf freigesetzt werden (Frederickson et al. 2005). Die physiologische Konzentration von freiem Zink liegt

intrazellulär im Pico Molaren Bereich. Es hat neben seinen Aufgaben als strukturfestigende Komponente (z.B. in Zinkfinger Proteinen) oder als Co-Faktor vieler Enzyme (z.B. Carboxypeptidase) auch neuromodulatorische Funktionen (Inhibition-Exzitation) und dient als Neurotransmitter (Takeda et al. 2005; Mathie et al. 2006; Osredkar und Sustar 2011). Dabei kann die Freisetzung spontan oder aktivitätsabhängig, zum Beispiel mit Glutamat nach neuronaler Erregung (calciumabhängig) erfolgen. Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits erwähnt wurde, ist Zink ein effektiver Blocker von unterschiedlichen spannungsgesteuerten Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Kanälen, daher kann keine eindeutige Aussage über einen Nettoeffekt von Zink getroffen werden (Mathie et al. 2006). Zusätzlich sei erwähnt, dass sich die neuromodulatorischen Fähigkeiten von Zink nach dem Rezeptortypen richten, da es inhibierend auf exzitatorische und inhibitorische Rezeptoren wirkt. Daher wird seine Rolle in der Pathogenese von epileptischen Anfällen und Epilepsie kontrovers diskutiert und es wurde bereits in vielen Studien die Verbindung eines veränderten Zinkhaushaltes im epileptischen Gehirn gezeigt.

Das Fehlen von Zink oder dessen Chelierung im normalen Gehirn führt einerseits dazu, dass die Anfallsaktivität gesteigert wird (protektive Wirkung von Zink im Umkehrschluss) (Domnguez et al. 2003) und andererseits die Zuführung von Zinksalzen in das Gehirn oder die vermehrte Ansammlung von freiem Zink in nanomolaren Konzentrationen in bestimmten Bereichen zelltoxisch und vor allem prokonvulsiv wirkt (Takeda et al. 2003; Mathie et al. 2006; Neumaier et al. 2015).

In dieser Arbeit möchte ich einen weiteren Einblick zur Rolle von Zink in Verbindung mit dem $\text{Ca}_v2.3$ Calcium-Kanal bei der durch Kainat induzierten Epilepsie geben und versuchen dabei die potenzielle Beteiligung zu verstehen. Im Zuge dessen soll die Auswirkung von einem veränderten Zinkhaushalt im Experiment der Kainat induzierten Epilepsie in Abhängigkeit vom $\text{Ca}_v2.3$ Ca^{2+} -Kanals untersucht werden. Dazu werden Verhaltensstudien, telemetrische Messungen und histologische Untersuchungen vorgenommen.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung von niedrigen Zink Ionen-Konzentrationen (nominell $10 \mu\text{M}$) und dessen funktionelle Relevanz für den spannungsgesteuerten $\text{Ca}_v2.3$ Calcium-Kanal unter normalen Bedingungen und im epileptischen Gehirn besser zu verstehen. Dazu wurden in vivo telemetrische EEG-Messungen und Verhaltensstudien nach Kainat-Induzierter Epilepsie bei $\text{Ca}_v2.3$ KO-Mäusen und bei Kontrolltieren durchgeführt. Dabei wurde ein

Verfahren zur direkten Verteilung von Metallionen im Gehirn über das Ventrikel System etabliert. Zusätzlich wurde eine immunhistochemische Untersuchungsmethode (Autometallographie) zum Nachweis von Zink Ionen und deren Verteilung im Gehirn in beiden Genotypen post mortem durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methoden sollen die Fragen geklärt werden:

1. Welchen Effekt hat freies Zink auf die neuronale Erregbarkeit unter normalen Bedingungen und nach Kainat Injektion?
2. Welche Bedeutung hat bei diesen Zink Ionen Änderungen der $Ca_v2.3$ Calcium-Kanal?
3. Welche Auswirkung hat die Chelierung von intracerebroventrikulären Zink Ionen nach Kainat-induzierter Epilepsie?

2 Material und Methoden

Im Folgenden werden die Materialien und Hilfsmittel, die für diese Arbeit verwendet worden sind, aufgelistet.

2.1 Material

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Firma	Bestell Nr.	Lot Nr.
Betaisadona Lösung (Povidon- Iod)	Mundipharma GmbH		
Citronensäure	Roth	X863.1	424220518
Cresylechtviolett	Bayer Leverkusen		513459
Eindeckmittel EU KITT UV	ORSAtes GmbH		Probetuben
Ethanol, $\geq 99,8$ % vergällt	Roth		479290785
Glutaraldehyd – Lösung 25 %	Appllichem Pancreac	163857.1611	0000543175
Gum Arabic from acacia tree	Sigma Life Science	G9752-500G	BCBW8956
HCl, 15 %	Sigma Aldrich		
Hydrochinon	Sigma-Aldrich		WXBC7739V
Indian Ink (Tusche)	Royal Talens	44717000	

Iono Express Cement	Kent Dental, Nordenta	957321	
Isofluran-Piramal (Isofluran), 250 ml	Piramal Healthcare	PZN-9714675	B90L15B
Isotonische Kochsalzlösung, 0,9 % NaCl	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	PZN-0809115	
Kainic acid monohydrate	Milestone PharmTech	6M-0100, 50 mg	
Ketamin, 10 %	Pharmanovo GmbH		25558
L-Histidin (BioUltra, ≥ 99,5 %)	Sigma	53319-25G	BCBL8528V
Medizym Neodisher®	Dr. Weigert		
NaOH, 30 %			
Natriumsulfid	Aldrich	4074010-10G	1313-82-2
Paraformaldehyde			35H1058
Rimadyl (Carprofen)	Pfizer		
Silber Lactat	Sigma	85210-10G	BCBN9501V
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Merck		A570148448
Wasserstoffperoxid	Sigma		

H ₂ O ₂ 3%			
Xylarium (Xylazin)	ReboPharm Arzneimittel- Vertriebsgesellschaft mbH		400260/1
Xylol (Isomere) > 98 % rein, für Histologie	Roth		34274525
Zinc chloride (99,999 %) trace metal basis	Aldrich	229997-10G	

2.2 Hilfsmittel

Tabelle 3: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

	Firma	Spezifikation	Seriennummer
Adhäsions- Objektträger, Histobond+	Paul Marienfeld GmbH	76 x 26 x 1 mm	23318
Bohrer	KaVo EWL 20000		
Butterfly-21 Kanüle	Venisystems, Abbott Ireland	19.5mm, 0,8mm, 0,6 mm	72485VM
Deckgläser 24 x 50 mm	Paul Marienfeld GmbH		
Diamantschleifer	Komet Dental Gebr. Brasseler GmbH	835314008 (Zylinderform)	743756
Einmalspritzen TBC	Dispomed	1 ml	
Ethicon (Vicryl Plus 3-0 SH plus)	Johnson & Johnson Intl	70 cm	MMBDKTQ0 LL8DSPP0 TK8GKZMO
Heizfeld für Stereotaxie	Eigenbau Mechanik Werkstatt Neurophysiologie	8 x 0,9 x 12,5 cm	
Heizplatte	MEDAX	24,5 x 6,5 x 29,5 cm	
-Injektionskanülen	Plastic One, über die Firma Bilaney	-C315IS/PK/SPC	

-Führungskanüle -Dummykanüle	Consultants GmbH	-C315G/PK/SPC 2.0 mm with 5 mm pedestal -C315DCNS- 5/PK/SP	
Injektor	Braun		
Isofluran Vaporisierer	Rothacher-Medical GmbH		700065
Laborhebebühne	Rudolf Grauter AG	Swiss Boy 100	
Lichtquelle Highlight 3000	Olympus Europe		
Mikroskop: Axio Imager.A1	Carl Zeiss AG		
Stereotaxie Apparat	Eigenbau Mechanik Werkstatt Neurophysiologie		
Telemetrie System	DataScience International		
Transmitter ETA-F10	DataScience International	Transmitter Nr. 50769, 45526, 47744, 48707	
Transmitter ETA-F20	DataScience International	Transmitter Nr. 25669, 6665, 42568, 26954,	

		7403, 36895, 47585, 26015	
--	--	------------------------------	--

2.3 Mauslinie

Die männlichen Mäuse entstammen aus der hauseigenen Zucht. Sie besitzen einen gemischt genetischen Hintergrund aus C57Bl/6 und 129SvJ. Sie werden bis in die 4. Generation in den reinen C57Bl/6 Hintergrund gezüchtet. Die Versuchstiere entstammen aus der Verpaarung mit C57Bl/6, bei denen ein bestimmtes Gen (CACNA1E), welches den Hochspannungsaktivierenden $Ca_v2.3$ Ca^{2+} -Kanal kodiert, deletiert ist. Die Verpaarung ergibt Nachkommen mit intaktem $Ca_v2.3$ Ca^{2+} -Kanal (WT, $Ca_v2.3(+|+)$) und Nachkommen, die keinen $Ca_v2.3$ Ca^{2+} -Kanal bilden können (KO, $Ca_v2.3(-|-)$) (Pereverzev et al. 2002; Pereverzev et al. 2005). Daten für diese Arbeit stammen von 53 männlichen WT-Mäusen im Alter von 17.6 ± 0.2 Wochen und 56 männlichen KO-Mäusen im Alter von 17.5 ± 0.2 Wochen ($p = 0,69$). Es ist anzumerken, dass die untersuchten WT-Mäuse im Durchschnitt schwerer waren als die KO-Mäuse (WT $31,3 \text{ gr.} \pm 0.4 \text{ SEM}$ vs. $28,6 \text{ gr.} \pm 0.4 \text{ SEM}$; $p = \leq 0,001$). Alle Versuchstiere wurden unter gleichen, standardisierten Bedingungen gehalten. Eine Zeitschaltuhr regelte den Tag / Nacht Rhythmus (12 h / 12 h), eine Klimaanlage stellte die Raumtemperatur auf $20 \text{ }^\circ\text{C} - 22 \text{ }^\circ\text{C}$ ein. Die Luftfeuchtigkeit lag zwischen 40 % - 48 %. Futter und Wasser waren ad libitum verfügbar. Alle Tierversuche stehen im Einklang mit der Richtlinie 2010 / 63 / EU des Rates der Europäischen Gemeinschaften zur Haltung und Verwendung von Labortieren und wie im UFAW-Handbuch zur Haltung und Bewirtschaftung von Labortieren beschrieben.

2.4 Methoden

2.4.1 Genotypisierung

Die genotypische Identifizierung der verwendeten Mäuse wurde mit der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (rtPCR) von unserer Mitarbeiterin Renate Clemens und nach Anleitung von ihr ebenfalls von mir durchgeführt.

2.4.2 Anästhesie

Für die Implantation der Radio-Transmitter und der Führungskanüle wurden alle Mäuse mit einer Mischung aus Ketamin (100 mg / kg) (Ketamin 10 %, Pharmanovo, Hannover, Germany) und Xylazin (10 mg / kg) (Xylarium, Rebopharm Arzneimittelvertriebsgesellschaft mbH, Bocholt, Germany) narkotisiert.

Für die kurzzeitige Narkose für die Dauer der intracerebroventrikulären und intraperitonealen Injektion wurden die Mäuse per Inhalationsnarkose (1,5 % - 2 % Isofluran, Piramal Healthcare, UK) über eine Ventilationsmaske (Eigenbau) mit einer Durchflussrate von 600 ml O₂ pro min mit einem Anteil von 1,5 - 2 % Isofluran ruhig gestellt und nach Injektionsgabe zurück in ihre Käfige gelegt. Anschließend wird der Käfig für die Aufzeichnung des Elektroencephalogramms direkt auf der Messeinheit positioniert.

2.4.3 Implantation von Führungskanülen und Transmitter

In dieser *in vivo* Untersuchungsreihe wurde mit Hilfe von implantierten Kanülen, Spurenmessungen in einen der Seitenventrikel injiziert und summierte elektrische Aktivitäten im Gehirn in Form eines Elektroencephalogramms, welches über implantierte Radiotransmitter (DSI) übertragen wurden, aufgezeichnet.

Da die zerebrale Flüssigkeit in direktem Kontakt mit Nervenzellen steht und der Versorgung von Nervenzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie ebenso dem Abtransport von Abfallprodukten dient (Bedussi et al. 2015), wurde diese Injektionsroute für das Einbringen und die Verteilung von Zink Ionen zur Manipulation des Zinkhaushaltes in Erwägung gezogen. Für die Injektionen wurden spezielle metallfreie Führungs- und Injektionskanülen (Bilaney Consultants GmbH, Düsseldorf / Germany) bestehend aus Polyetheretherketon (PEEK) verwendet (Abbildung 1 A - E), um eine ungewollte Metallverunreinigung mit weiteren Metallen zu vermeiden (Neumaier et al. 2018a). PEEK ist ein in der Medizin häufig

verwendeter, biokompatibler Kunststoff zur Herstellung von Implantaten oder chirurgischen Instrumenten.

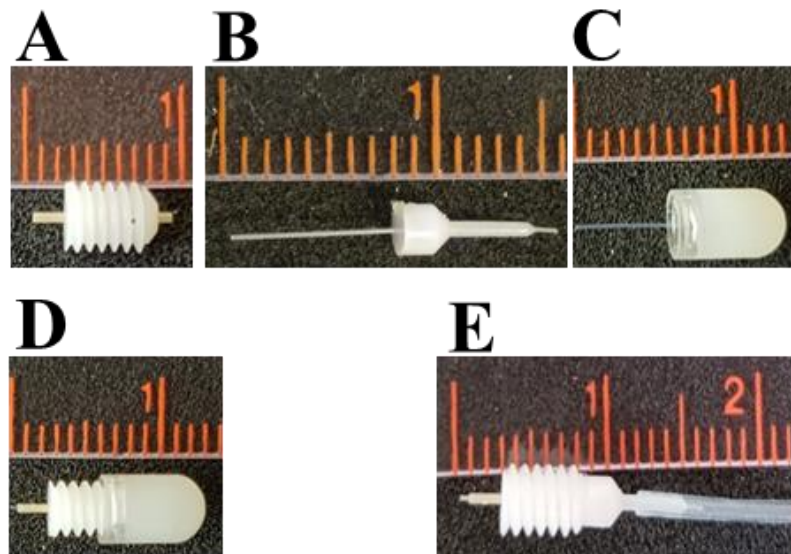


Abbildung 1: Implantierbare metallfreie Kanülen aus Polyetheretherketon (PEEK). A. Führungskanüle, B. Injektionskanüle, C. Dummy Kanüle zum Verschluss wie in D., E. zeigt die Führungskanüle mit eingesetzter Injektionskanüle für intracerebroventrikuläre Injektionen.

Ein für Mäuse eingerichteter Operationsplatz verfügte über eine wärme regulierte Heizplatte (295 mm x 245 mm x 70 mm, MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster, Deutschland). Diese diente während der Implantation der Transmitter und der Kanülen als Operationstisch und gewährleistet die Aufrechterhaltung der Körperkerntemperatur von 37 - 38°C während dem operativen Eingriff, um eine Hypothermie der Maus zu verhindern (Abb.: 2 A).



Abbildung 2: Operationsplatz mit einer Heizplatte als Operationsfläche zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur.

Der Eingriff erfolgte nach der Gabe einer Mischinjektion als Narkose. Darin enthalten war das Narkosemittel Ketamin und das Muskelrelaxans Xylazin im Mischverhältnis von 100 mg / kg Ketamine Hydrochlorid (KETASET, Zoetis, USA) und 10 mg / kg Xylazin Hydrochlorid (Rompun® 2 % Bayer Vital, Germany). Die Injektion wurde im rechten unteren Quadranten in die Bauchhöhle (intraperitoneal = i.p.) durchgeführt. Nach negativem Reflextest (Zwischenzehenreflex) wurde präemptiv sub cutan (s.c.) 5 mg / kg Carprofen (Rimadyl®, Pfizer, USA) als Analgetikum verabreicht. Anschließend konnte der Eingriff beginnen. Zunächst wurden die Haare über der Schädeldecke bis zum Nacken entfernt und die Hautoberfläche mit Betaisadona 3mal gereinigt und desinfiziert. Augen wurden mit Dexpanthenol (Bepanthen® Salbe, Hoffmann-La Roche AG, Schweiz) vor Austrocknung geschützt. Die Schädeldecke wurde durch einen ca. 1 - 1,5 cm Schnitt in der Kopfhaut freigelegt und mit 3 % H₂O₂ Lösung vorsichtig von Geweberesten gesäubert. Durch den Einsatz von H₂O₂ wurden nicht nur Gewebereste entfernt, sondern gleichzeitig wurden Bregma, Lambda und Sutura sagittales zur besseren Orientierung auf der Schädeldecke deutlich sichtbar (Abb.: 3). Anschließend wird mit Hilfe einer Sonde und einer stumpfen Schere von der Inzision am Kopf vorsichtig eine Tasche an der rechten Flanke präpariert und der Transmitterkörper vorsichtig über den eröffneten Bereich über dem Schädel eingeführt und bis zur rechten Flanke eingeschoben.



Abbildung 3: Aufsicht auf die freigelegte Schädeldecke der narkotisierten Maus mit den markierten Orientierungspunkten Bregma (schwarzer Stern), Lambda (schwarzes Dreieck) mit der Sutura sagittalis als Linie zwischen Bregma und Lambda und den drei angedeuteten Positionen für die Kanüle und die Elektroden des Transmitters (schwarze Kreise).

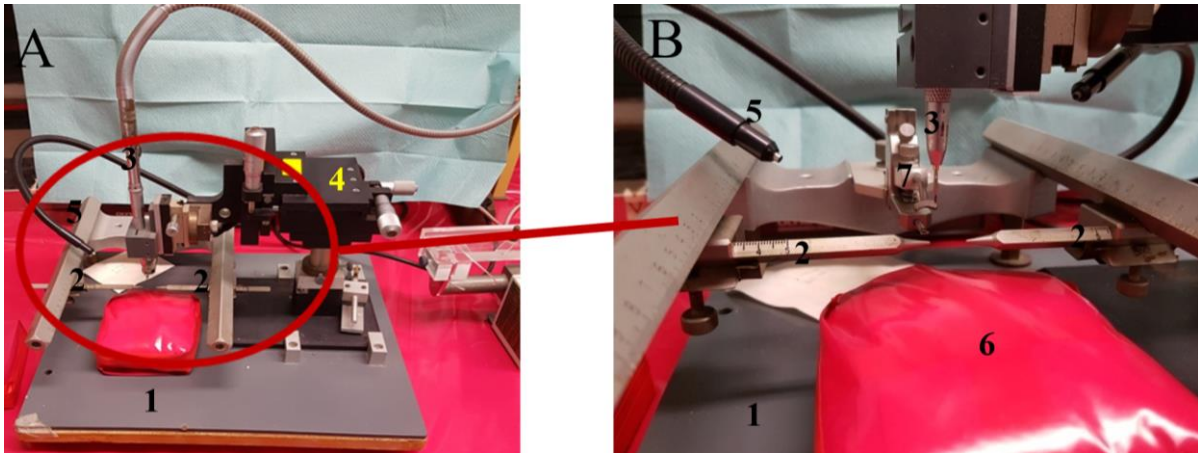


Abbildung 4 A. Stereotaktische Apparatur in der Aufsicht und B. in der vergrößerten Ansicht. Zu sehen sind 1. Montageplatte der Apparatur; 2. Ohrhalter, 3. Zahnarztbohrer, 4. 3-Wege-Mikromanipulator, 5. Lichtquelle, 6. höhenverstellbare, beheizte Auflage (Laborhebebühne), 7. Zahnhalter.

Zur genauen Positionierung der Transmitterelektroden und der Führungskanüle für die spätere Injektion wurde die Maus in eine stereotaktische Apparatur überführt (Abb.: 4 A und B). Diese verfügt über eine in der Höhe verstellbare und erwärmbare Laborhebebühne für die Maus (Eigenbau Werkstatt, Institut für Neurophysiologie, Universität zu Köln), Zahnhalter, Nasenklammer und Ohrhalter, in der die Maus eine festgelegte Orientierung und Haltung einnehmen kann. Mit Hilfe eines über der Maus an der Apparatur befestigten, umgebauten Zahnarztbohrer (20000 rpm, KaVo EWL, Germany), welcher über einen 3-Achsen-Mikromanipulator in 3 Ebenen verstellt werden kann, wurden die Koordinaten für

1. Differente Elektrode: vom Bregma caudal -1 mm, lateral 3 mm,
2. Indifferente Elektrode: vom Bregma caudal -6,3 mm, lateral 1 mm und
3. Führungskanüle: vom Bregma caudal -0,34 mm, lateral -1 mm)

zur punktförmigen Eröffnung der Schädeldecke eingestellt (Abb.: 3 zeigt die Positionen der Bohrlöcher). Diese Stellen wurden vorsichtig punktförmig mit einem zylinderförmigen Diamantschleifer der Größe 008 1/10 mm Durchmesser (Produktname 835.314.008, Komet Dental, Lemgo, Deutschland) durchbohrt. Elektroden des Transmitters wurden um 90° gebogen und so eingesetzt, dass sie Kontakt zur Dura mater haben (epidural) (Abb. 5). Die Führungskanüle wurde so eingesetzt, dass sie mit ihrer Spitze in einen der Seitenventrikel projiziert, damit die Test-Substanzen in den Liquor Raum injiziert werden können und sich darüber verteilen. Die Führungskanüle wurde bis zur Injektion durch einen Verschluss (Dummy cannula) geschützt. Elektroden und Kanüle wurden mit Zahnzement (Kent Dental Nordenta, Hamburg, Germany) fixiert (siehe Abbildungen 6 A und B). Anschließend wurde

die Haut an der Schädeloberseite mittels Einzelknopfnähten mit nichtresorbierbarem Nahtmaterial (Ethicon (Vicryl Plus 3-0 SH plus, Johnson & Johnson) zusammengenäht und mit Betaisadona erneut desinfiziert. Um Mäuse vor der Auskühlung zu schützen, wurden sie bis zur vollständigen Genesung in Einzelkäfigen auf einer Wärmeplatte gehalten (Medax). Um nach der Operation die Nahrungsaufnahme zu erleichtern, wurde zusätzlich eine Schale mit angefeuchteten Nahrungspellets in den Käfig platziert. Zur Behandlung von Schmerzen wurde präemptiv vor Beginn der Operation 5 mg / kg Carprofen verabreicht und anschließend bei Bedarf alle 12 h 5 mg / kg. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Genesungsverlauf sowie das Gewicht der Mäuse täglich kontrolliert.



Abbildung 5: Aufsicht auf die Schädeldecke einer Maus. Man sieht die bereits eingesetzten und einzementierten Elektroden des Transmitters (1 und 2) und die punktförmige Eröffnung der Schädeldecke für die Aufnahme der Führungskanüle (3).

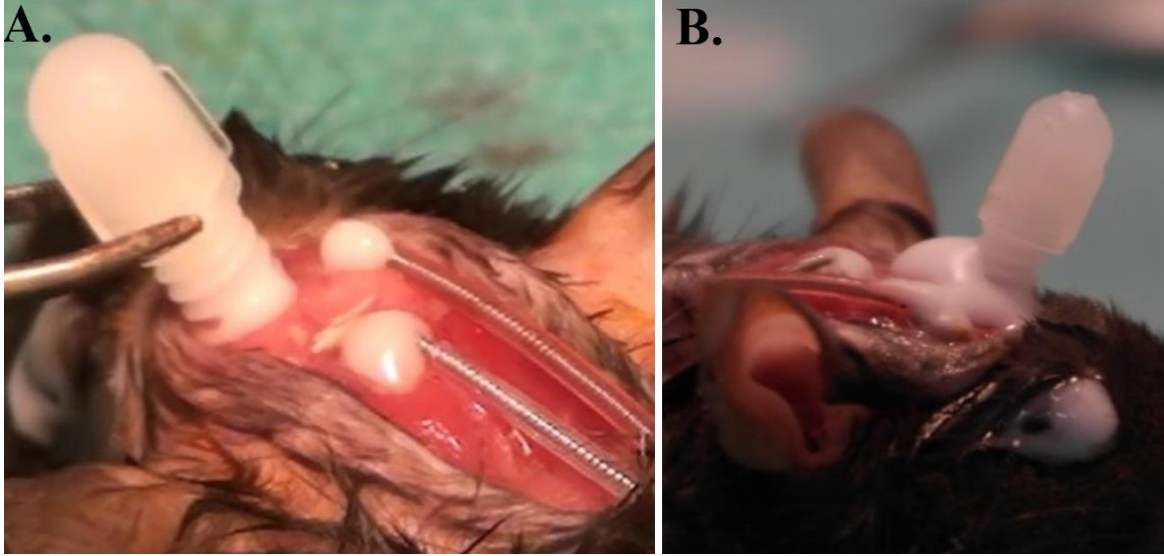


Abbildung 6: A. Ansicht auf eingesetzte und einzementierte Elektroden und eingesetzte Führungskanüle mit der Dummy Kanüle auf der freien Schädeldecke einer narkotisierten Maus. B. zeigt die seitliche Ansicht der einzementierten Elektroden und Kanüle vor der Naht.

2.4.4 Telemetrie System

Für die Messung von Potentialschwankungen auf der Hirnoberfläche wurden PhysioTel® Transmitter mit der Bezeichnung TA10ETA - F20 (siehe Abb. 7 A technische Spezifikationen: 3.9 gr., 1.9 cc Bandbreite 1-200 Hz; Data Science International, DSI, Lexington, USA) der Firma DSI verwendet. Aufgrund der Produktionseinstellung der TA10ETA - F20 Transmitter und von neueren Produktentwicklungen wurde der adäquate Ersatztransmitter mit der Bezeichnung ETA - F10 (bisher in 8 WT- und 8 KO-Mäusen implantiert) (Abb. 7 B) mit der gleichen Bandbreite von 1 - 200 Hz verwendet. Der aktuellere Transmitter wiegt 1,6 gr. und hat ein Volumen von 1,1 cc. Daten der sich frei bewegenden Tiere wurden kabellos an die Empfänger (= Receiver) -Platte (RPC-1, DSI) übertragen, auf der der Käfig mit der Maus platziert war. Eine kabellose Übertragung der Daten ermöglicht es, dass die Tiere ihr volles natürliches Bewegungs- und Verhaltensspektrum beibehalten. Die Daten werden von der Empfänger-Platte über eine Datenaustauschmatrix / Multiplexer (Data Exchange Matrix, DSI) zu einem PC weitergeleitet und mit der Software Dataquest A.R.T. Gold Analysis (Version 4.36. der Firma Data Science International Inc.) auf einem PC mit Windows XP Betriebssystem (siehe Abb. 7 C) aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgt mit der Software NeuroScore 2.1.0 der Firma DSI an einem PC mit Windows 7 Betriebssystem.

Zur erneuten Verwendung der Transmitter nach abgeschlossenem Experiment, wurden diese aus dem Tier explantiert und gründlich von Geweberesten wie Bindegewebe und Blut enzymatisch mit Medizym Neodisher®, einer Verdaulösung, über Nacht befreit. Zur Resterilisation wurden die Transmitter ebenfalls über Nacht in 3 % Glutaraldehyd-Lösung gelagert. Vor der Wiederverwendung wurden die Transmitter mit steriler Kochsalzlösung abgespült.

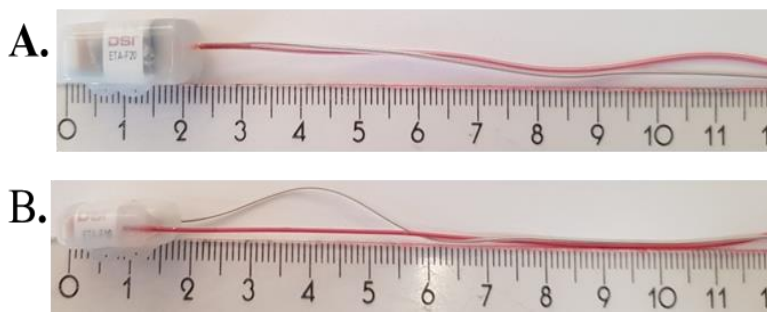


Abbildung 7: *Im Experiment verwendete Transmitter. A. Transmitter TA10ETA-F20, B zeigt denn neueren, leichteren und kleineren Transmitter ETA-F10, C zeigt die Telemetrie Messstation mit PC, Multiplexer und sechs Receivern für sechs parallele Messungen. Um einen cross-talk zwischen einzelnen Receivern zu verhindern sind die einzelnen Messstationen durch dünne Edelstahlplatten, wie in einem Faraday-Käfig, elektromagnetisch voneinander abgeschirmt, Hier werden 4 Mäuse in ihren Käfigen auf den Messstationen gleichzeitig gemessen.*

2.4.5 Analyse der Hirnaktivität

Die Software NeuroScore 2.1.0. der Firma DSI wurde für die Auswertung der gesammelten Daten verwendet. Die registrierte Hirnableitung wurde visuell gesichtet. Zusätzlich wurde ein Detektionsprotokoll eingerichtet und verwendet, welches Anfälle während iktaler Hirnaktivität erkennen kann. Mit Hilfe der einstellbaren Parameter wurden Hirnwellen bis zu einer Dauer von 200 ms und mit einer um 2.5- bis 25-fach höheren Amplitude, verglichen zur Baseline Amplitude, als Spikes erkannt. Ein Spiketrain wurde ebenfalls definiert als eine Folge von 4 Spikes innerhalb von 30 - 1000 ms mit einer Dauer von mindestens 300 ms. Bei der Frequenzanalyse wurden die Hirnwellen von dem Programm NeuroScore mit Hilfe der Fast-Furier-Transformation in Frequenzen umgewandelt. Die einzelnen Frequenzbänder wurden wie folgt definiert (Dibué-Adjei et al. 2017):

- Delta (0.5 - 4 Hz),
- Theta (4 - 8 Hz),
- Alpha (8 - 12 Hz),
- Sigma (12 - 16 Hz),
- Beta (16 - 24Hz),
- Gamma (30 - 80 Hz) und
- Ripples (80 - 200 Hz).

Zusätzlich wurde der Frequenzbereich von 200 - 250 Hz den Fast Ripples zugeordnet, jedoch wegen der Limitation des Transmitters (1 - 200 Hz) von der weiteren Auswertung ausgenommen. Absolute und relative Werte wurden ermittelt.

2.4.6 Verhaltensstudie

Kainat wurde intraperitoneal mit einer Dosis von 15 mg / kg an Mäusen im Alter zwischen 12 und 22 Wochen verabreicht. Anschließend wurden sie für maximal 2 h nach Injektion beobachtet und ihr Verhalten per Video aufgezeichnet, um den Schweregrad und Intensität der Anfälle mit Hilfe eines „Score Sheets“ zu erfassen, zu bewerten und hinterher zu vergleichen. Die Einteilung des Schweregrades der Anfälle oder auch „Seizure Scores“ genannt, orientiert sich an der Einteilung von Morrison et al. aus dem Jahr 1996 (Morrison et al. 1996) und wurde in unserem Labor bereits in vorangegangenen Experimenten angewendet (Dibué-Adjei et al. 2017) und zur besseren Vergleichbarkeit daher wie folgt modifiziert:

Score 0: Normales Verhalten: Normales Verhalten bei Mäusen bedeutet, dass die Mäuse Nahrung aufnehmen, sich ausruhen, explorieren, Nest bauen, sich kratzen und ihr Fell pflegen, graben und schnüffeln.

Score 1: Immobile Phase: In dieser Stufe erstarren die Mäuse in einer Position, wobei ihr Schwanz oftmals gerade und versteift wirkt. Die immobile Phase kann man klar abgrenzen zur Ruhelage oder Schlafphase, da die Maus in dieser Phase auf allen Beinen steht und sich nicht wie beim Schlafen einwindet. Der Schwanz ist gestreckt und die Maus schaut strikt geradeaus. Die immobile Phase dauert zwischen wenigen Sekunden bis zu mehreren Minuten und kann durch die Stufe 0 oder durch plötzlich auftretende Automatismen und Konvulsionen unterbrochen werden.

Score 2: Unwillkürliche Muskelkontraktionen im Gesicht und Automatismen: Unwillkürliche Muskelkontraktionen kann man oft an den Augenlidern oder der Nase (Vibrissen zucken) erkennen. Das Kopfnicken, Kopfschütteln, im Kreis drehen, Kratzen können Anzeichen von Automatismen sein und können klar abgegrenzt werden zu einem normalen Verhalten, wenn diese exzessiv oder in kurzen Abständen wiederholt auftreten und ohne erkennbaren Grund ablaufen. Oftmals erstarren die Tiere für einige Zeit nach einer solchen spontan ablaufenden Reaktion bevor sie sich dann wieder normal verhalten.

Score 3: Zittern und Zuckungen am Rumpf und den Gliedmaßen: In Stufe 3 treten einzelne Zuckungen der Gliedmaßen oder dem Rumpf auf, wobei die Maus auch springen kann. Diese Symptome zeigen Ähnlichkeiten zu einem schreckhaften Verhalten, ausgelöst durch laute Geräusche oder plötzlich bewegende Objekte oder Personen.

Score 4: Auf die Hinterbeine stellen, nach oben schauen (stargazing): In dieser Stufe richten sich die Mäuse auf ihren Hinterbeinen auf während sie mit dem Gesicht nach oben starren oder mit ihren Vorderbeinen „rudern“ wie ein sich aufbäumendes Pferd. Das unterscheidet

sich sehr vom Verhalten, wenn sich die Maus auf die Hinterbeine stellt, um etwas zu erschnüffeln oder zu erkunden was sich über ihr befindet.

Score 5: Fallen: Die Maus verliert öfter das Gleichgewicht und kann nicht mehr auf ihren Pfoten stehen und fällt zur Seite oder nach hinten.

Score 6: Tonisch klonische Anfälle: Generalisierter epileptischer Anfall mit tonisch-klonischen Konvulsionen.

Score 7: Tonisch klonischer Anfall mit Springanfällen: In dieser Phase kommt es vor, dass die Maus während eines generalisierten Anfalles durch tonisch klonische Konvulsionen unkontrolliert und unwillkürlich im Käfig herumspringt.

Score 8: tonisch klonischer Anfall mit Todesfolge: Zu einem Atemstillstand kann es nach einem lang anhaltenden Anfall, der sich im weiteren Verlauf zu einem schweren generalisierten tonisch klonischen Anfall entwickeln kann, kommen, wobei dies oft den Tod der Maus verursacht.

Die Bewertung des Seizure Scorings wurde wie folgt durchgeführt: Für die Beobachtungszeit von 2 h wurden die jeweiligen Scores im Intervall von 5 min notiert. Der höchste Score aus jedem 5 min Intervall wurden am Ende miteinander addiert. Die daraus resultierenden absoluten Werte der verschiedenen Gruppen wurden miteinander verglichen und zur Berechnung der „maximal“ Seizure Scores herangezogen.

2.4.7 Versuchsgruppen und Injektionen

Nach einer Genesungszeit von mindestens sieben Tagen wurden die Testsubstanzen verabreicht. Dabei wurde 15 mg / kg Kainat intraperitoneal verabreicht und 1 mM Histidin allein oder in Verbindung mit dem Spurenmetallkation Zink mit einer Konzentration von 10 μ M über die implantierte Kanüle in einen Seitenventrikel appliziert, um eine möglichst schnelle Verbreitung über das Liquor System zu erzielen. Die Injektionsrate für die i.c.v. Injektionen betrug 0,15 μ l pro Minute, um die Druckbelastung zu minimieren. Es wurden 3 Gruppen nach folgendem Schema erstellt (Übersicht siehe Tabelle 4).

Gruppe A Wild Typ ohne i.c.v Injektion, mit i.p. Injektion NaCl oder Kainat.

KO ohne i.c.v Injektion, mit i.p. Injektion mit NaCl oder Kainat.

Gruppe B Wild Typ mit i.c.v Injektion Histidin, mit i.p. Injektion NaCl oder Kainat.

KO mit i.c.v Injektion Histidin, mit i.p. Injektion NaCl oder Kainat.

Gruppe C Wild Typ mit i.c.v Injektion Zink mit Histidin, mit i.p. Injektion NaCl oder Kainat.
 KO mit i.c.v Injektion Zink mit Histidin, mit i.p. Injektion NaCl oder Kainat.

Tabelle 4: Injektionsbedingungen und Anzahl von $Ca_v2.3$ -kompetenten- und $Ca_v2.3$ -defizienten Mäusen in jeder Gruppe: Kainat (KA, 15 mg / kg) wurde intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Histidin (His, 1 mM) wurde intracerebroventrikulär (i.c.v) verabreicht ohne oder in Kombination mit Zinkchlorid ($ZnCl_2$, 10 μ M) (Tabelle entnommen aus (Alpdogan et al. 2020)).

Genotyp, Untergruppe und injizierte Lösung	Gruppe A		Gruppe B		Gruppe C	
	1. Kontrolle	2. Kainat (KA)	3. Histidin (His)	4. His + KA	5. Zinkchlorid ($ZnCl_2$) + His	6. $ZnCl_2$ + His + KA
Kanülen Implantat	-	-	+	+	+	+
Histidin, 1 mM	-	-	+	+	+	+
$ZnCl_2$, 10 μ M	-	-	-	-	+	+
Kainat, 15 mg/kg	-	+	-	+	-	+
isotonisches NaCl, i.p.	+	-	+	-	+	-
$Ca_v2.3(+ +)$	6	7	9	11	9	11
$Ca_v2.3(- -)$	6	9	9	10	11	11

In Vorversuchen wurde zur Kontrolle Tusche über die Injektionskanüle injiziert (Abb. 8). Die Tusche breitete sich erfolgreich im gesamten Liquor System aus und konnte nach der Entnahme des Gehirns nachgewiesen werden. Der Eintrittskanal der Kanüle ist auf der Hirnoberfläche auf der linken Hemisphäre deutlich, durch die Tusche Färbung, erkennbar (Abbildung 8). Nachdem das Gehirn etwas seitlich zur Mitte zwischen beiden Hemisphären geteilt wurde, konnte man sehen, dass sich die Tusche über den Injektionskanal am linken Ventrikel über das Ventrikel System komplett verteilt hat und anliegende Bereiche dadurch ebenfalls angefärbt wurden (Abb. 9 A).



Abbildung 8: Extrahiertes Gehirn einer Maus aus dem Experiment. Zur Kontrolle und Verifikation der Kanülen Position und der Koordinaten für die Implantation wurde Tusche über die Kanüle in den Seitenventrikel injiziert. Nach Extraktion des Gehirns wird der Injektionskanal sichtbar (roter Pfeil). Im Anschluss wurde das Gehirn ungefähr mittig geteilt.

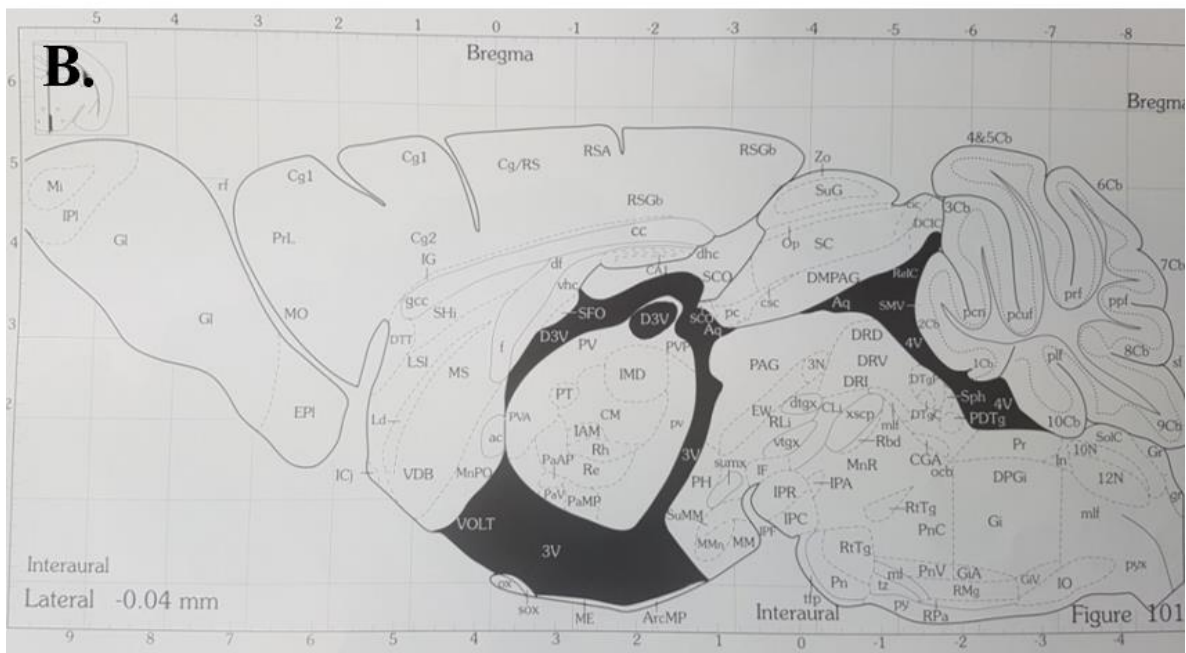
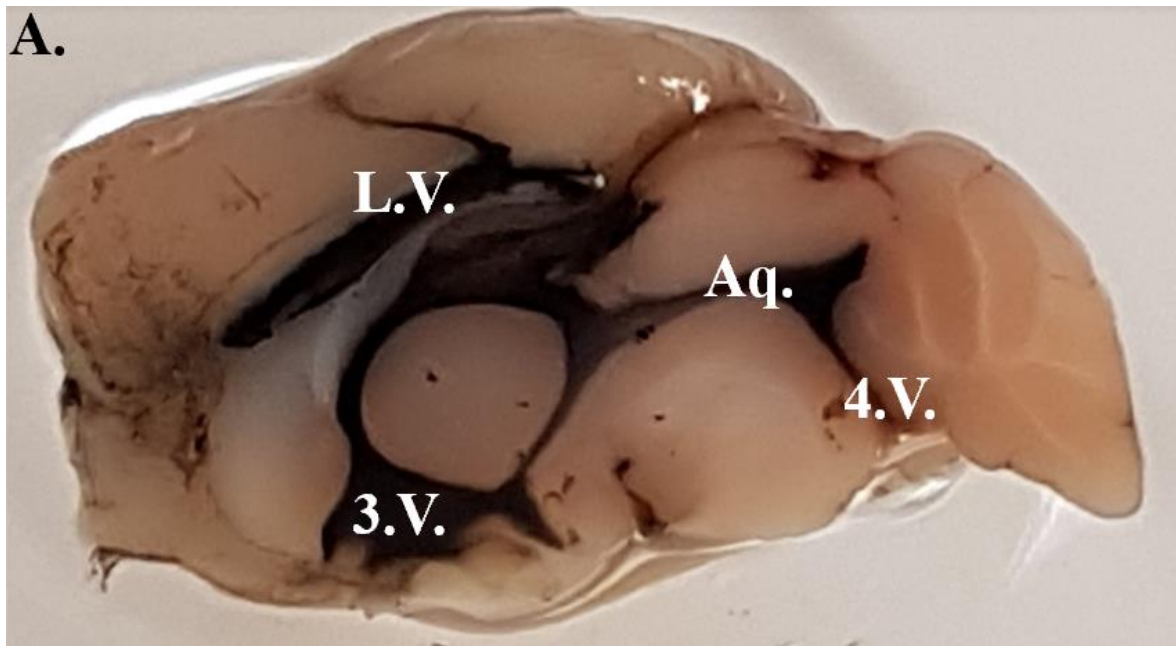


Abbildung 9: Ein extrahiertes und etwas seitlich von der Mitte geteiltes Maushirn nach einer i.c.v. Tuscheinjektion über die Injektionskanüle in den Seitenventrikel. A. zeigt die von der Tusche dunkel gefärbten Liquor Räume nach i.c.v. Injektion. Die Tusche verteilt sich über den Seitenventrikel (L.V.) und gelangt in den 3. Ventrikel (3.V.) und über dem Aquädukt (Aq.) zum 4. Ventrikel. B. zeigt den ungefähren Bereich aus dem Paxinos Mausatlas. Schwarze Bereiche stellen den Liquor Raum dar (Paxinos und Franklin 2004) (Abbildungen entnommen aus (Alpdogan et al. 2019)).

2.4.8 Histologische Untersuchung von Spurenmetall Kationen

Für die Detektion von Spurenmetallkationen wurde die autometallographische Nachweismethode (AMG Methode) angewendet. Die Methode zum Nachweis und zur Visualisierung von verschiedenen Metallionen wurde 1958 von F. Timm (F. Timm 1958) beschrieben und stetig weiterentwickelt (Robert S. Sloviter 1982; G Danscher and B Møller-Madsen 1985; Holm und Geneser 1989, Danscher und Stoltenberg 2006). Bei dieser Methode werden metallische Salze aus Metallionen und Sulfid erzeugt und können sichtbar gemacht werden. Hydrochinon dient dabei als reduzierende Substanz. Post Mortem wurden Mäuse mit einer Natriumsulfid-haltigen Lösung (0,37 % Na_2S) perfundiert, um die Penetration von Schwefel auch in tieferen Regionen zu gewährleisten. Anschließend wurde auf demselben Weg das Gewebe ausgewaschen (0,9 % NaCl) und mit 4 % Paraformaldehyd (PFA)-Lösung vorfixiert. Das Gehirn wurde im darauffolgenden Schritt entnommen und in der 4 % PFA-Lösung fixiert und bis zur Verwendung aufbewahrt.

Bei der Reaktion verbinden sich Silberionen mit den Metallsalzen und werden reduziert. Es werden weitere Silberionen angelagert, wobei die Reaktion so lange weiter fortschreitet, bis die Reaktion z.B. durch Auswaschen in Milli-Q Wasser gestoppt wird. Diese Methode erfordert das sorgfältige Arbeiten nach einem festgelegten Schema, da die Reaktion nicht gleichmäßig und linear abläuft. Die gebildeten Kristalle werden durch Anlagerung weiterer Silberionen größer. Dadurch werden mehr Silberionen pro Zeiteinheit gelagert, sodass die Reaktion mit zunehmender Kristallgröße zunimmt.

Das Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, da bereits nur wenige Zinkatome ausreichen, um eine Färbung zu erzeugen. Andererseits ist die Wahrscheinlichkeit gegeben, durch Autokatalyse von Silberionen unspezifische Bereiche zu verfärben. Die Verwendung von frischen Reagenzien und sauberen Utensilien ist ebenso wie die strikte Einhaltung eines Protokolls (Zeit und Temperaturen) für ein erfolgreiches Umsetzen wichtig und wird im folgenden Abschnitt 2.4.9 beschrieben.

2.4.9 Gewebeaufbereitung & Timm's Färbemethode (Timm's Staining)

Nach der Entnahme der Gehirne wurden sie für mindestens 24 h in 4 % PFA fixiert und anschließend mit einem Standardprotokoll in Paraffin eingebettet.

Es wurden 200 ml der Silber-Lactat Entwicklerlösung nach der Rezeptur von Danscher (Danscher 1981b) mit folgenden Bestandteilen angefertigt:

1. 180 ml Gum arabicum Lösung (mindestens für 4 h, besser über das Wochenende 100 gr. Gummi Arabicum Pulver in 200 ml Milli-Q Wasser rühren).
2. 20 ml Citrat-Lösung hergestellt aus 7,05 gr. Natriumcitrat und 7,65 gr. Zitronensäure Monohydrat in 30 Milli-Q Wasser.
3. 30 ml Hydrochinon Lösung (2,55 gr. Hydrochinon in 45 ml Milli-Q Wasser ansetzen).
4. 30 ml Silber-Lactat Lösung (0,33 g $\text{AgC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ in 45 ml Milli-Q Wasser).

Lösungen 1, 2 und 3 werden zusammengemischt und auf 37 °C im Dunkeln erwärmt. Die Schnitte wurden standardmäßig mit Xylol (lipophil) entparaffiniert. Das Xylol wurde dann mit 100 %-igem Ethanol ausgewaschen und die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (96 %, 80 %, 70 %, 40 %, Milli-Q Wasser.) für den Entwicklungsschritt vorbereitet. Kurz vor der Entwicklung der Schnitte wurde Lösung 4 in das Gemisch aus 1, 2 und 3 hinzugefügt und die Schnitte darin für 1 - 1:30 h im Dunkeln bei 37 °C inkubiert (hier 80 min). Die Inkubation in der Entwicklerlösung wurde durch kurzes Auswaschen in Milli-Q Wasser gestoppt und anschließend 5 min in Cresylechtviolett gegengefärbt. Nach erneutem Auswaschen in Milli-Q Wasser wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (96 %, 96 %, 100 %) und Xylol zum Eindeckeln mit Eu Kitt UV vorbereitet. Die Aushärtung erfolgte bei UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 365$ nm. Schnitte wurden unter einem Axio Imager A1 Mikroskop (Zeiss) betrachtet und Fotos digital mit dem Programm „Diskus“ (Version 5.0.6353 #7599) aufgenommen.

2.4.10 Statistik und Auswertung

Alle erhobenen Datensätze wurden zunächst mithilfe des Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung überprüft. Seizure Score Daten und NeuroScore Daten waren überwiegend nicht normal verteilt, sodass zur weiteren Auswertung der nicht-Parametrische Mann-Whitney-U Test angewendet wurde. Die Daten der Leistungsspektren waren überwiegend normalverteilt und daher wurde der Student's T-Test angewendet, um auf Signifikanz zu prüfen. Datensätze, die hierbei nicht normal verteilt waren, wurden hier ebenfalls mit dem Mann-Whitney-U Test berechnet. Alle Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ermittelt aus der Anzahl n der unabhängigen Experimente. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf einen p-Wert von 0.05 und niedriger gesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Postoperative Genesung und Gewichtsentwicklung

Der Genesungsverlauf der Versuchstiere wurde nach der Implantation von Kanüle und Transmitter beobachtet. Insgesamt wurden 53 Ca_v2.3-kompetente Mäuse im Alter von 17,6 Wochen \pm 0,2 SEM und 56 Ca_v2.3 „knock-out“-Mäuse im Alter von 17,5 Wochen \pm 0,2 SEM (p-Wert: 0,7) untersucht. Mit einem durchschnittlichen Initialgewicht von 31,3 gr. \pm 0,4 SEM waren die Wildtyp-Mäuse ein wenig schwerer als die KO-Mäuse, bei denen das Initialgewicht 28,6 gr. \pm 0,4 SEM betrug (p-Wert \leq 0,001) (Abbildung 10 A).

Die Mäuse wurden nach der Transmitterimplantation täglich gewogen, um den Genesungsverlauf zu dokumentieren, wobei das Gewicht der verwendeten Transmitter jeweils subtrahiert wurde. Zusätzlich wurden die Mäuse visuell auf ihr Aussehen (Fell, Augen, Nasen) sowie ihr Verhalten (Mobilität, Exploration, Fellpflege, Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme) begutachtet und beobachtet. Den größten Gewichtsverlust verzeichneten die Tiere 1 Tag nach der Operation (bei WT 98,4 % \pm 0,6 %, bei KO 98,8 % \pm 0,9 %). Jedoch bereits nach dem 3. Tag haben die Mäuse ihr Anfangsgewicht bzw. Normalgewicht erreicht (siehe Abbildung 10 B).

Die Wundheilung an der Naht am Kopf der Tiere wurde ebenfalls täglich kontrolliert. Dabei wurden keine Infektionen oder Entzündungen an den Wundrändern und den genähten Bereichen festgestellt. Es wurde beobachtet, dass einige Tiere 3 h nach der OP bereits feste Pellets zu sich genommen haben. Dennoch wurde zusätzlich zur leichteren Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme angefeuchtete, weiche Pellets angeboten.

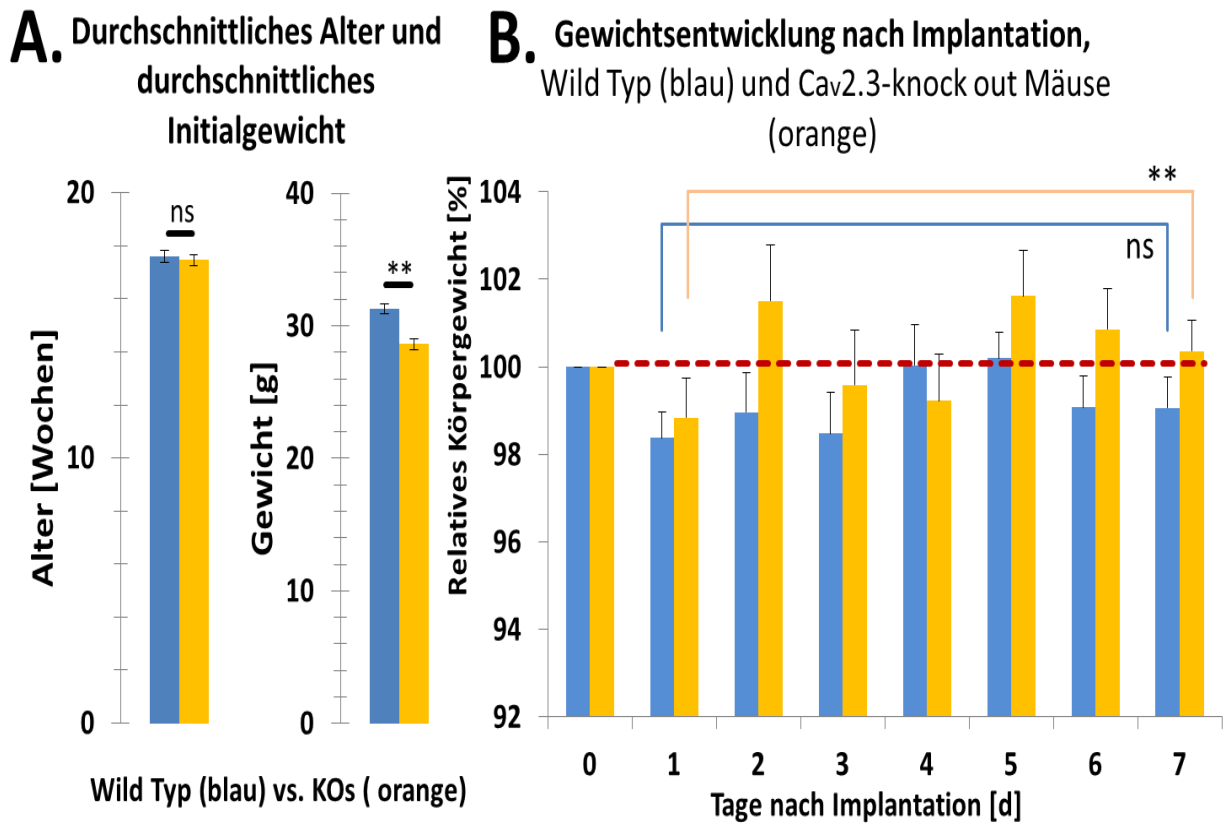


Abbildung 10: A Übersicht des durchschnittlichen Alters der Versuchstiere und deren durchschnittliches Initialgewicht vor dem Eingriff unterteilt in Wildtyp (Blau), $n = 53$ und KO (Gelb) $n = 56$. B. Hier wird die durchschnittliche Gewichtsentwicklung nach der Transmitterimplantation für beide Genotypen bis zum 7. Tag nach der Operation gezeigt (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

3.2 Subkutane Pouch-Implantation der Radio-Transmitter

Für eine schnellere Genesung der Mäuse wurden die Transmitter anstelle der Bauchhöhle, subkutan eingesetzt. Der Vorteil hierbei liegt darin, dass der Operationsbereich so klein wie möglich gehalten wurde (Inzisionslänge 1 - 1,5 cm), indem nur ein Schnitt über dem Schädel am Kopf ausgeführt wurde und der Transmitter darüber unter der Haut zur rechten Flanke der Maus geschoben werden konnte. Das Infektionsrisiko ist somit auf einen kleinen Bereich am Kopf beschränkt. Es wurde in keinem Tier eine Mobilisation des Transmitters beobachtet. Alle Tiere waren in ihrer Mobilität und Agilität nicht beeinträchtigt und es konnte beobachtet werden, dass manche Tiere bereits einen Tag nach der Operation kopfüber am Deckel ihrer Käfige geklettert sind. Das Initialgewicht wurde überwiegend bereits nach dem dritten Tag erreicht (Abb. 10 B). Es muss beachtet werden, dass bei der subkutanen Implantation keine

Körperkerntemperatur verlässlich gemessen werden kann. Daher wurden die Tiere während ihrer Erholungsphase nach der Operation auf eine Wärmeplatte gesetzt.

3.3 Elektrocorticogramme vor den Injektionen

Hirnaktivitäten wurden 24 h vor Injektionen bei jedem Versuchstier aufgezeichnet. Während dieser Zeit wurden keine spontan auftretenden epileptischen Anfälle oder Depolarisationen im Wellenmuster beobachtet.

3.4 Elektrocorticogramme nach den Injektionen

3.4.1 Elektrocorticogramme nach intraperitonealer NaCl-Injektion

In der Gruppe A haben Kontrolltiere jeweils eine intraperitoneale Injektion einer isotonischen Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) erhalten. Anschließend wurden zwei Stunden lang elektrocorticografische Messungen aufgezeichnet und das Verhalten der Mäuse bewertet. In Abbildung 11 werden repräsentative Aufnahmen von Kontrolltieren beider Genotypen (Wildtyp und KO) aus Gruppe A gezeigt. Während der gesamten Beobachtungszeit zeigte sich ein unauffälliges Hirnwellenmuster. Darüber hinaus zeigten alle Kontrolltiere beider Genotypen nach NaCl Injektion ein für Mäuse typisches Verhaltensmuster.

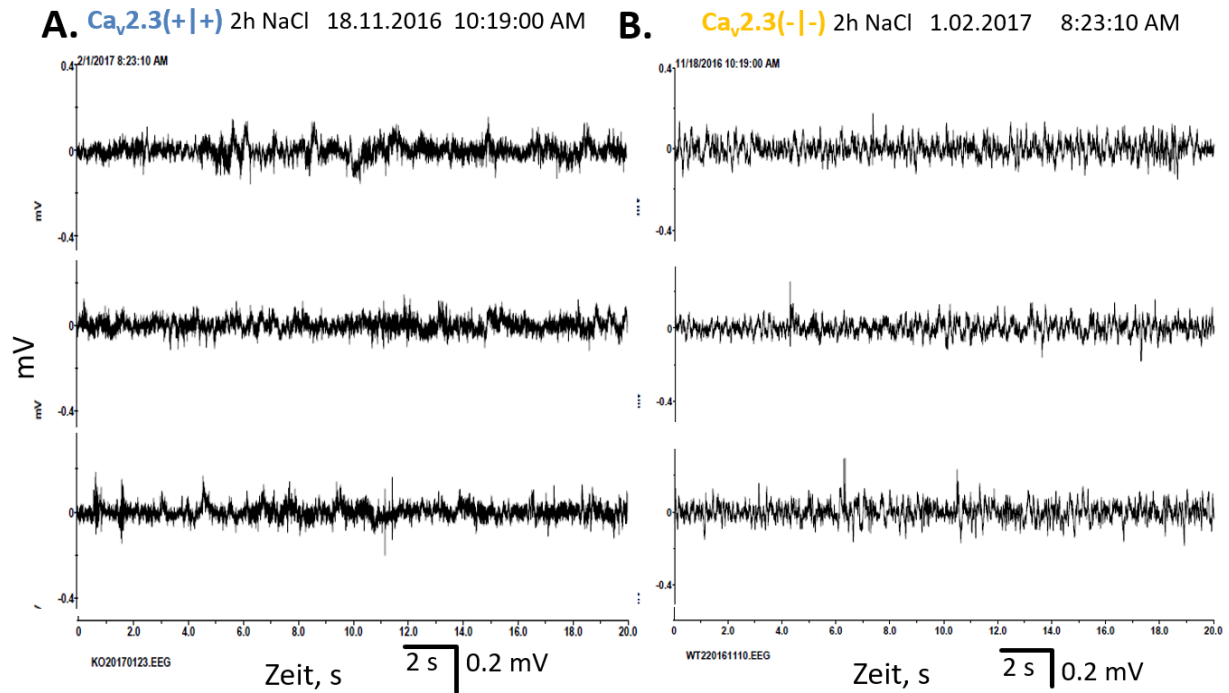


Abbildung 11: Repräsentative Original Ableitungen der Hirnoberfläche nach einer i.p. Injektion von NaCl (Gruppe A). Zu sehen ist ein Aufnahmezeitraum von einer Minute, der in drei aufeinanderfolgenden 20-Sekunden-Abschnitten für A. eine $Ca_v2.3(+|+)$ Maus und B. eine $Ca_v2.3(-|-)$ Maus. Während der Beobachtungsperiode von 2 h nach Injektion wurden keine auffälligen Wellenmuster oder Depolarisationen beobachtet.

3.4.2 Elektrocorticogramme nach intraperitonealer und intracerebroventrikulärer Injektion

Kontrolltiere der Gruppen B und C haben zusätzlich zur intraperitonealen NaCl Injektion, jeweils intracerebroventrikuläre Injektionen erhalten entweder nur mit Histidin (Gruppe B) oder mit Histidin und Zink (Gruppe C). Anschließend wurden die Mäuse in ihre Käfige zurückgelegt und auf den Receivern für die Erfassung der Oberflächenhirnaktivität platziert. Während der Messdauer von 2 h wurden die Mäuse zusätzlich auf Verhaltensänderungen beobachtet. Im Elektrocorticogramm von Versuchsmäusen, zeigte sich nach einer intracerebroventrikulären Injektion von Histidin und Histidin in Kombination mit Zink zusätzlich zu einer intraperitonealen Injektion von NaCl keine auffällige Veränderung im Wellenmuster (siehe Abbildung 12 A - D). Des Weiteren wurde ebenfalls kein abnormales Verhalten der Mäuse in der Versuchsperiode festgestellt.

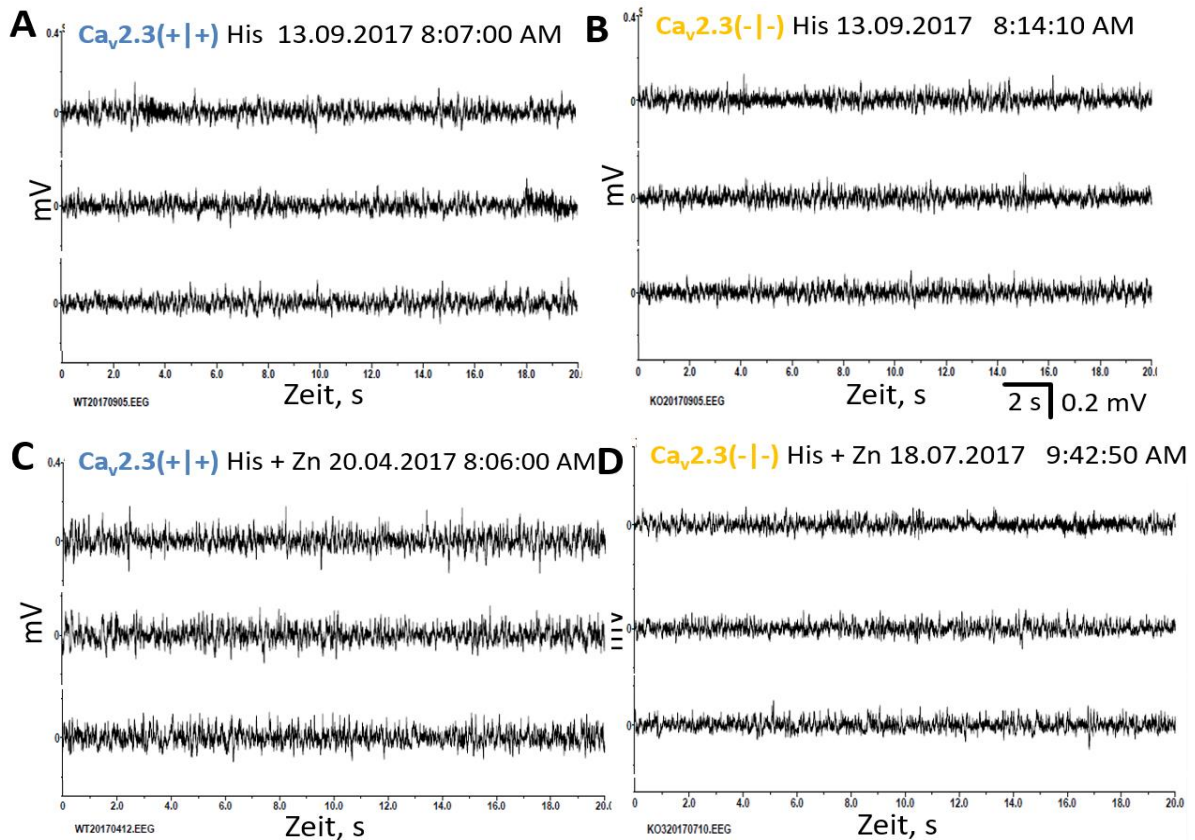


Abbildung 12: Repräsentative Original Ableitungen der Hirnoberfläche nach einer *i.p.* Injektion von NaCl und zusätzlicher *i.c.v.* Injektion von Histidin (Gruppe B, Bild A, B) und Histidin mit Zink (Gruppe C, Bild C, D). Zu sehen ist ein Aufnahmefenster von einer Minute aufgeteilt in drei aufeinanderfolgenden 20 Sekunden Abschnitte für je eine $Ca_v2.3(+|+)$ Maus (A und C) und je eine $Ca_v2.3(-|-)$ Maus (B und D). Während der Beobachtungsperiode von 2 h nach Injektion wurden keine auffälligen Wellenmuster oder Depolarisationen beobachtet (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

3.4.3 Elektrocorticogramme nach intraperitonealer Kainat-Injektion

Das Elektrocorticogramm von Mäusen aus den Gruppen A, B und C beider Genotypen zeigte nach Injektion von Kainat Veränderungen der Hirnwellen (Abb. 13 - 14). Es wird sichtbar, dass durch die intraperitoneale Kainat Injektion, das normale Wellenmuster phasenweise Veränderungen aufweist. Hier zeigen sich spontane Depolarisationen in Form von Spikes und Spikes-and-waves hervorgerufen durch epileptische Anfälle. Diese auffälligen Ereignisse korrelieren meist mit typischen Verhaltensmustern. Die veränderten epileptogenen Hirnaktivitäten unter Kainat konnten bei $Ca_v2.3(+|+)$ Mäusen (Abbildung 13 A - D) und auch bei $Ca_v2.3(-|-)$ -Mäusen (Abbildung 14 A - D) gemessen werden.

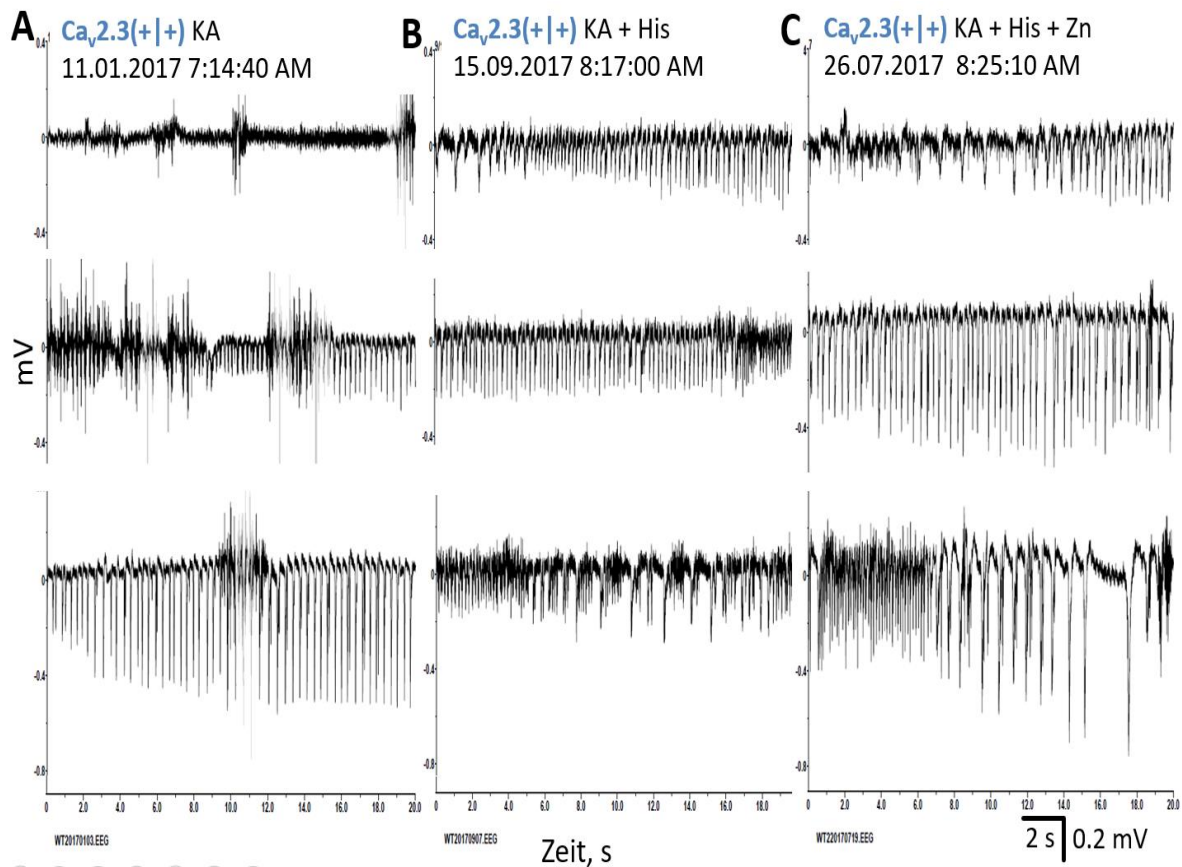


Abbildung 13: Repräsentative Original Ableitungen der Hirnoberfläche von $Ca_v2.3(+/+)$ -Mäusen nach einer i.p. Injektion von Kainat (Gruppe A, Bild A) und zusätzlicher i.c.v. Injektion von Histidin (Gruppe B, Bild B) und Histidin mit Zink (Gruppe C, Bild C). Zu sehen ist ein Aufnahmefenster von einer Minute aufgeteilt in drei aufeinanderfolgenden 20 Sekunden Abschnitte während eines Anfalls (iktale Phase) innerhalb der Beobachtungsperiode von 2 h. In allen 3 Injektionsbedingungen entwickelt sich aus anfänglich einfachen Spikes mehrere aufeinander folgende, hochfrequente Spikes, die in ihren Amplituden zunehmen. (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

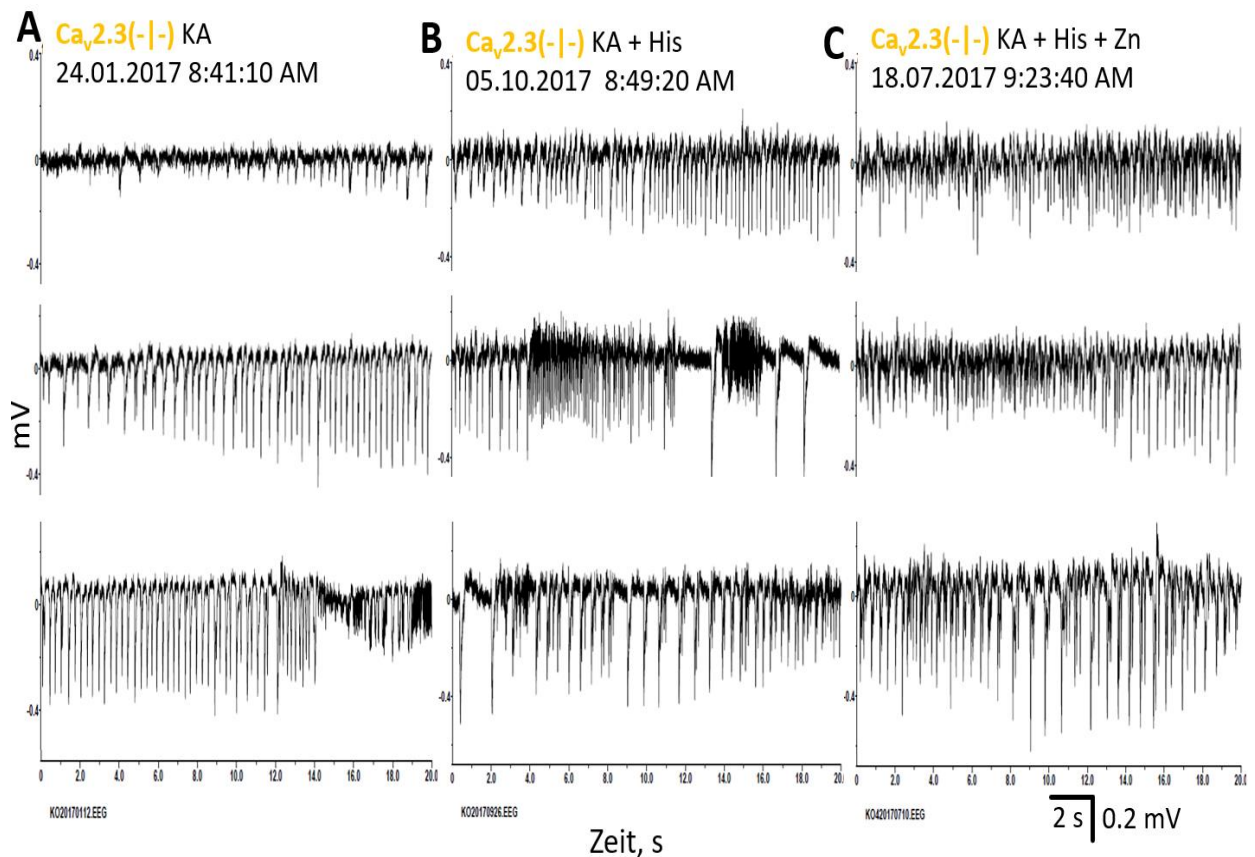


Abbildung 14: Repräsentative Original Ableitungen der Hirnoberfläche von $Ca_v2.3(-/-)$ -Mäusen nach einer i.p. Injektion von Kainat (Gruppe A, Bild A) und zusätzlicher i.c.v. Injektion von Histidin (Gruppe B, Bild B) und Histidin mit Zink (Gruppe C, Bild C). Zu sehen ist ein Aufnahmezeitraum von einer Minute aufgeteilt in drei aufeinanderfolgenden 20 Sekunden Abschnitte während eines Anfalls (iktale Phase) innerhalb der Beobachtungsperiode von 2 h. In allen 3 Injektionsbedingungen entwickelt sich aus anfänglich einfachen Spikes mehrere aufeinander folgende, hochfrequente Spikes, die in ihren Amplituden zunehmen. (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

3.5 Verhaltensstudie

3.5.1 Seizure Scoring

Über die Messdauer von 2 Stunden wurde die Wirkung von Kainat ohne und mit intracerebroventrikulären Injektionen von Histidin allein und Histidin in Kombination mit Zink auf das Verhalten der Versuchstiere beider Genotypen untersucht. Die Verhaltensänderung wurden mit Hilfe des Seizure Scores quantifiziert. Die Beurteilung erfolgt, wie oben beschrieben, nach dem modifizierten Schema von Morrison (Morrison

1996), da in unserem Labor bereits frühere Experimente auf diesem Schema beruhen und uns dadurch die Möglichkeit der besseren Vergleichbarkeit gegeben ist. Der maximal erreichte Score zu jedem Tier wurde ermittelt. In der Abbildung 15 wird ersichtlich, dass kein Tier aus den Kontrollgruppen (ohne Kanülen Implantat und nur NaCl Injektion) beider Genotypen einen hohen Score Wert erreicht hat. Zudem wurde gezeigt, dass es keine Anzeichen von epileptischen Aktivitäten gibt (Abb. 11). Auch bei den anderen Kontrollgruppen B und C mit implantierter Kanüle gab es keinerlei Anzeichen auf epileptogenes Verhalten oder epileptogene Muster im EEG (Abb. 12). Zusätzlich erreichte auch hier keine Maus höhere Score Werte (höher als 1). Jedoch zeigt sich deutlich wie auch in vorangegangenen Experimenten, dass Kainat in $Ca_v2.3$ -kompetenten Mäusen die Anfallswahrscheinlichkeit steigert (Weiergräber et al. 2007; Dibué-Adjei et al. 2017; Alpdogan et al. 2019), welches an einer erhöhten Anzahl von Tieren gemessen werden kann, die einen Score von mindestens 6 und höher erreicht haben (Abbildung 15). Kainat führt zu einer gesteigerten Anfallsaktivität im Gehirn, welche sich im Laufe des Anfalls von einzelnen Spikes (spitzenartige Entladungen) zu einer Reihe von Spikes (Spike trains) bilden (Abbildungen 13 und 14). Zum Vergleich sehen wir, dass weniger KO-Mäuse Score Werte von über 6 erreichen. In Abbildung 16 sehen wir auch, dass die Anfallswahrscheinlichkeit nicht nur davon abhängig ist, ob ein funktionierender $Ca_v2.3$ Ca^{2+} -Kanal vorhanden ist, sondern, dass auch die Injektionsbedingungen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit haben, einen Anfall zu erleiden. Bei intaktem $Ca_v2.3$ Ca^{2+} -Kanal im Organismus erreichen 87,5 % der Mäuse aus Gruppe A mit Kainat Injektion einen höheren Seizure Score als sechs im Gegensatz zu 55,6% bei Mäusen, in denen der $Ca_v2.3$ Ca^{2+} -Kanal deletiert worden ist.

In Gruppe B mit Histidin Injektion und Kainat erreichen weniger Mäuse einen Score höher als sechs (gleich bei ca. 40 % bei beiden Genotypen) nach Kainat Injektion. In der letzten Gruppe wird ein Seizure Score von 6 – 7 wieder von mehr Wildtyp Mäusen (63,6 %) erreicht als von KO-Mäusen (27,3 %). Durch die individuell erreichten maximalen Score Werte wurde des Weiteren erkennbar, dass durch Kainat Injektionen die gemittelten Score Werte (Abbildung 16 A und 16 B) der jeweiligen Gruppen bei beiden Genotypen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen erhöht ist. Schaut man sich beide Genotypen getrennt voneinander an, so haben Wildtyp Mäuse aus Gruppe A nach Kainat die höchsten Score Werte. Bei diesem Genotyp fällt besonders auf, dass Histidin die Score Werte nach Kainat Injektion von 7,7 auf 4,8 signifikant reduziert. Eine Co-Injektion mit Zink und Histidin zeigte hingegen keine signifikante Steigerung (Wert 6,3). Zwischen den unterschiedlichen Injektionsbedingungen

mit Kainat gab es hingegen bei den $Ca_v2.3$ -defizienten Mäusen keine signifikanten Unterschiede.

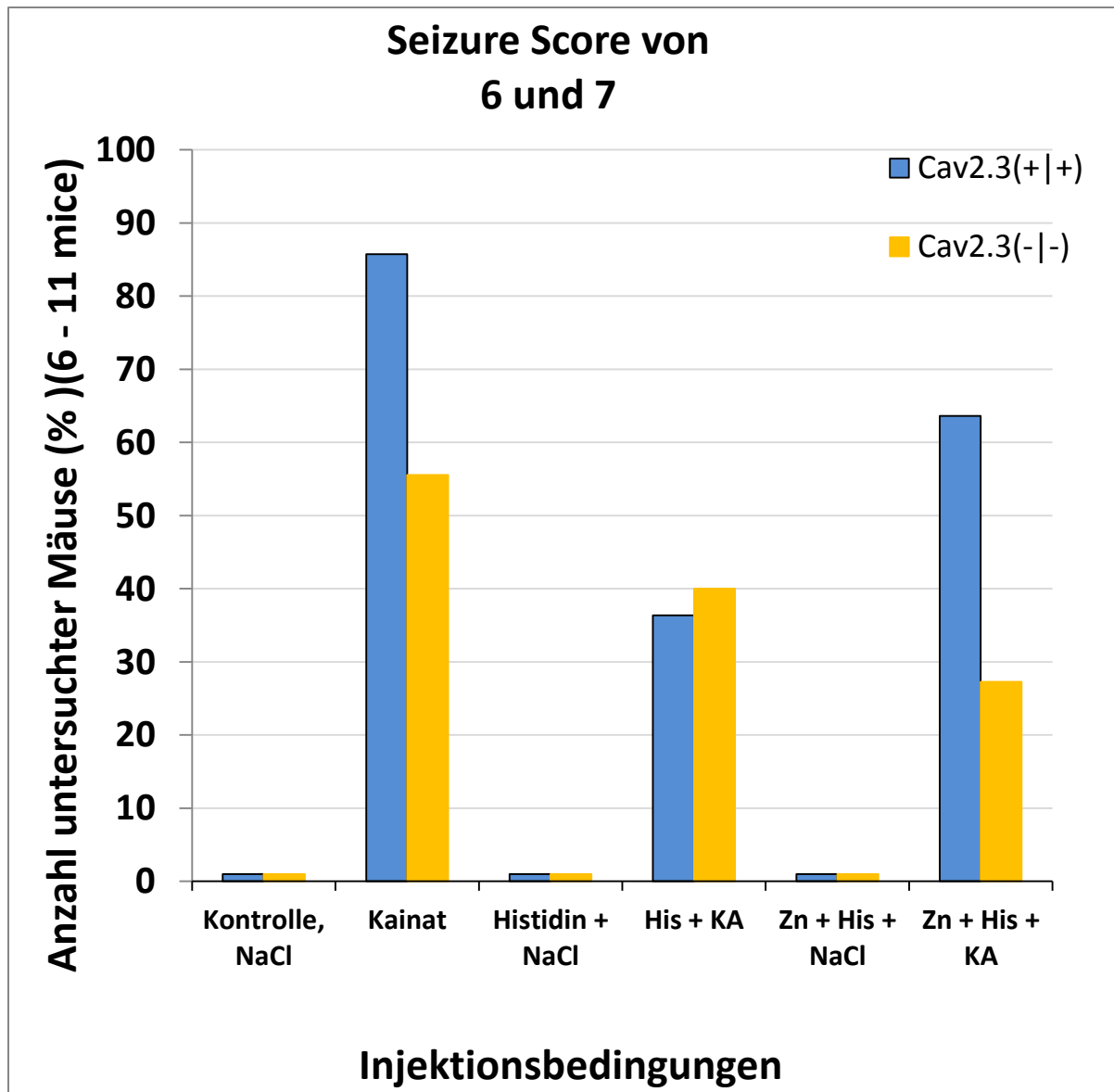


Abbildung 15: Einfluss von 15 mg / kg Kainat auf den Seizure Score. Dargestellt ist die Anzahl der Mäuse (n = 6 - 11) jeder Gruppe, die einen Score Wert von mindestens 6 erreicht haben. Mäuse aus den Kontrollgruppen ohne Kainat verhalten sich unauffällig und haben keinen Anstieg in ihren Score Werten. Die Kainat Injektion führte bei beiden Genotypen in allen Gruppen zu einem Anstieg des Score Wertes in Abhängigkeit von der Co-Injektion in unterschiedlichem Ausmaß. Blaue Balken zeigen hierbei $Ca_v2.3$ -kompetente Mäuse und gelbe Balken stellen $Ca_v2.3$ KO-Mäuse dar (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020))

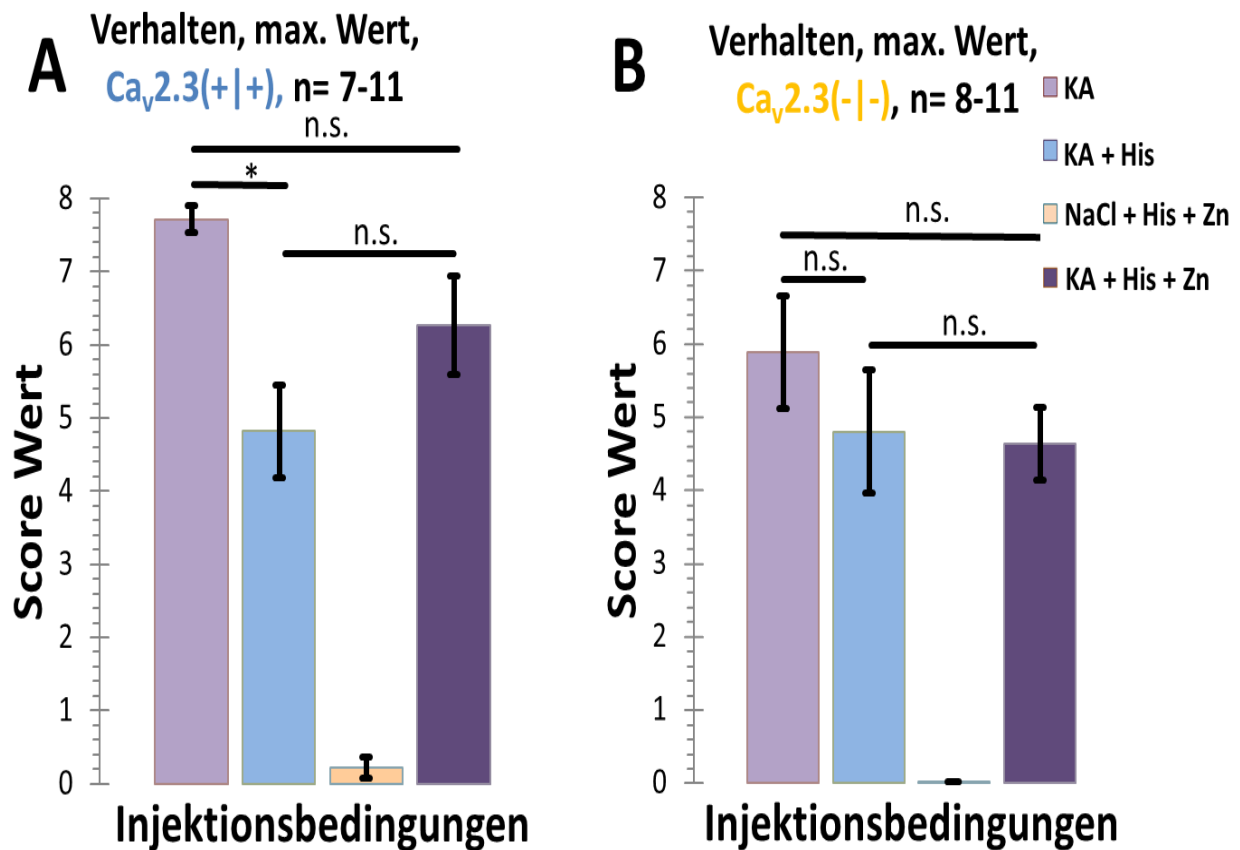


Abbildung 16: Verhaltensanalyse. Effekte von 15 mg / kg Kainat auf das Verhalten. In den ersten 2 Stunden nach Injektion von Kainat oder Kochsalz wurde das Verhalten mit Hilfe des Seizure Score Einteilung bewertet. Es zeigte sich, dass das normale explorative Verhaltensmuster der Maus 10 Minuten nach Kainat Injektion erlischt und höhere Score Werte als 2 erzielt werden. Nach Histidin ohne Kainat oder Histidin mit Zink ohne Kainat zeigten alle Mäuse ein maustypisches, normales Verhalten (Stufe 0), wobei 6 von 50 Mäusen aus beiden Genotypen Stufe 1 erreicht haben. Zum Vergleich sind ebenfalls die maximal erreichten Scores aus der Gruppe mit Histidin mit Zink und NaCl Injektion aufgeführt. Höhere Score von mindestens 6 wurde vermehrt in Gruppe A bei $Ca_v2.3(+|+)$ -Mäusen beobachtet im Vergleich zu KO-Mäusen in Gruppe A. Abbildung B zeigt das gleiche für $Ca_v2.3(-|-)$ -Mäuse (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

3.5.2 Sterblichkeitsrate

Nicht alle Versuchsmäuse haben die Messdauer von 2 h nach der Injektion überlebt, da sie im Verlauf des Experiments frühzeitig verstorben sind. Die Sterberaten werden für alle Gruppen in Abbildung 17 dargestellt. In Gruppe A verstarben 71,4 % der Wildtyp-Mäuse im Vergleich zu 44,4 % der KO-Mäuse nach Kainat Injektion. In Gruppe B hingegen reduzierte sich durch die Co-Injektion von Histidin mit Kainat die Zahl der verstorbenen Tiere. Es starben lediglich 10 % (je n = 1) der Tiere in beiden Genotypen. Frühzeitig verstarb eine von elf Wildtyp-Mäusen und eine von zehn KO-Mäusen. In Gruppe C hingegen war zu sehen, dass die Co-Injektion von Zink mit Histidin und Kainat, die Sterberate nur bei den Wildtyp-Mäusen auf 54,5 % (6 von 11 Mäusen) erneut angehoben hat, während keine einzige KO Maus in dieser Gruppe frühzeitig verstorben ist. Hier könnten antagonistische Effekte von Zink auf den $\text{Ca}_v2.3 \text{ Ca}^{2+}$ -Kanal gewirkt haben und den frühzeitigen Tod während eines Epileptischen Anfalls begünstigt haben.

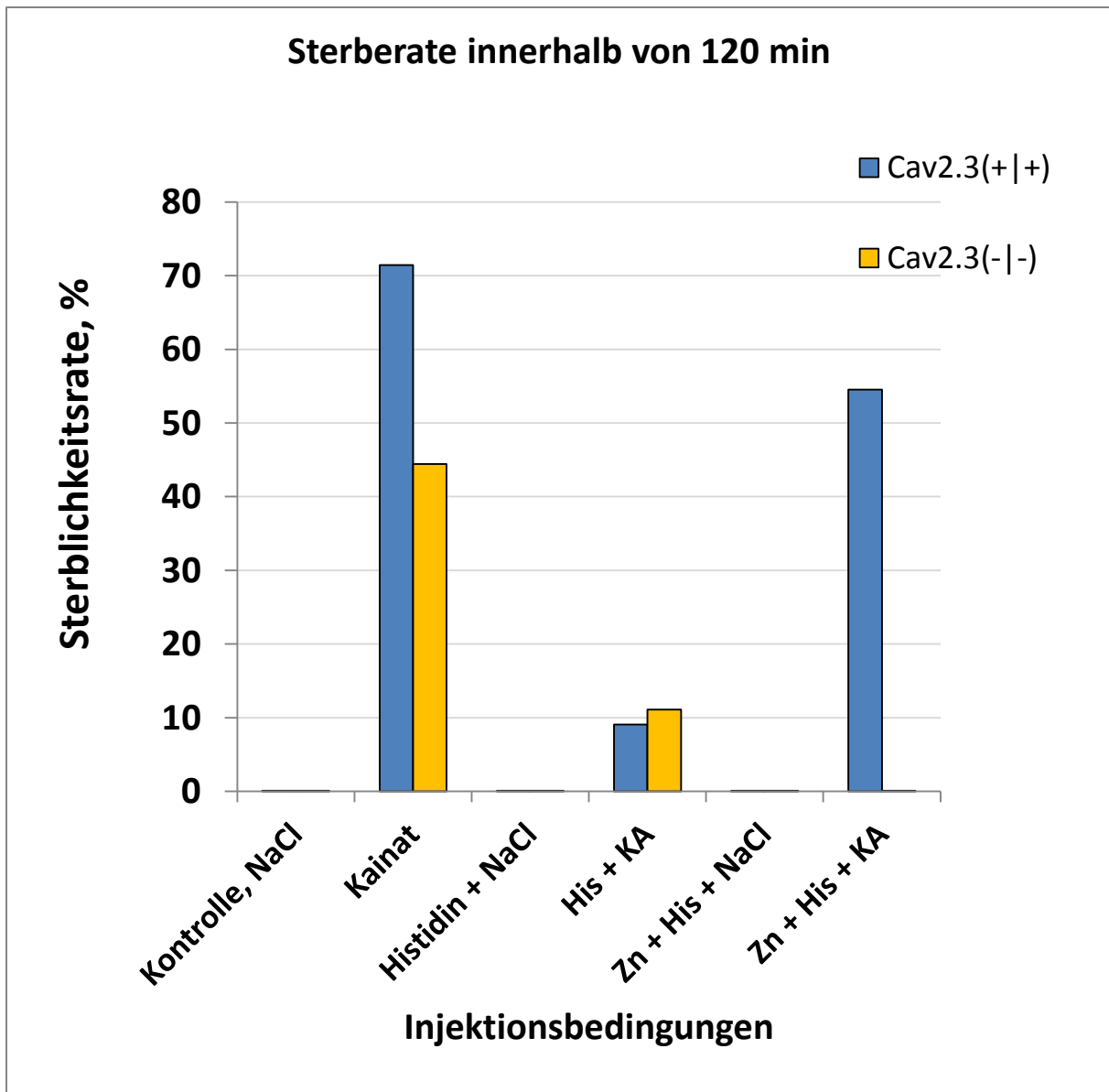


Abbildung 17: Effekt von Kainat (15 mg / kg) auf die Sterberate innerhalb der Messdauer von 120 min bei $Ca_v2.3$ -kompetenten Mäusen (blaue Balken) ($n = 6 - 11$) und $Ca_v2.3$ KO-Mäuse (gelbe Balken) ($n = 6 - 11$) in Verbindung mit Co-Injektionen. In allen Kontrollgruppen beider Genotypen gab es keine Todesfälle. Erst nach Kainat Injektion starben Mäuse, nachdem sie einen Score von 8 erreicht haben (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

3.5.3 Latenzzeitanalyse

Um zu ergründen, ob Kainat durch Co-Applikation von Histidin oder Histidin in Verbindung mit Zink die Konvulsionen zeitlich verzögert, wurden die Zeiten bis zum Erreichen der Stufe

6 bzw., die Zeit von der Injektion bis zum Eintreten des ersten tonisch-klonischen Anfalls ermittelt. Interessanterweise gab es keine signifikanten Veränderungen in den Latenzzeiten, welche durch die Co-Injektionen von Histidin und Zink verursacht werden konnten

In den Kainat Gruppen beider Genotypen wurde im Durchschnitt der Score 6 und 7 nach 30 min erreicht (Abbildung 18). Somit kann man annehmen, dass die akuten Effekte von Kainat zeitlich unabhängig von Histidin oder Zink mit Histidin ablaufen.

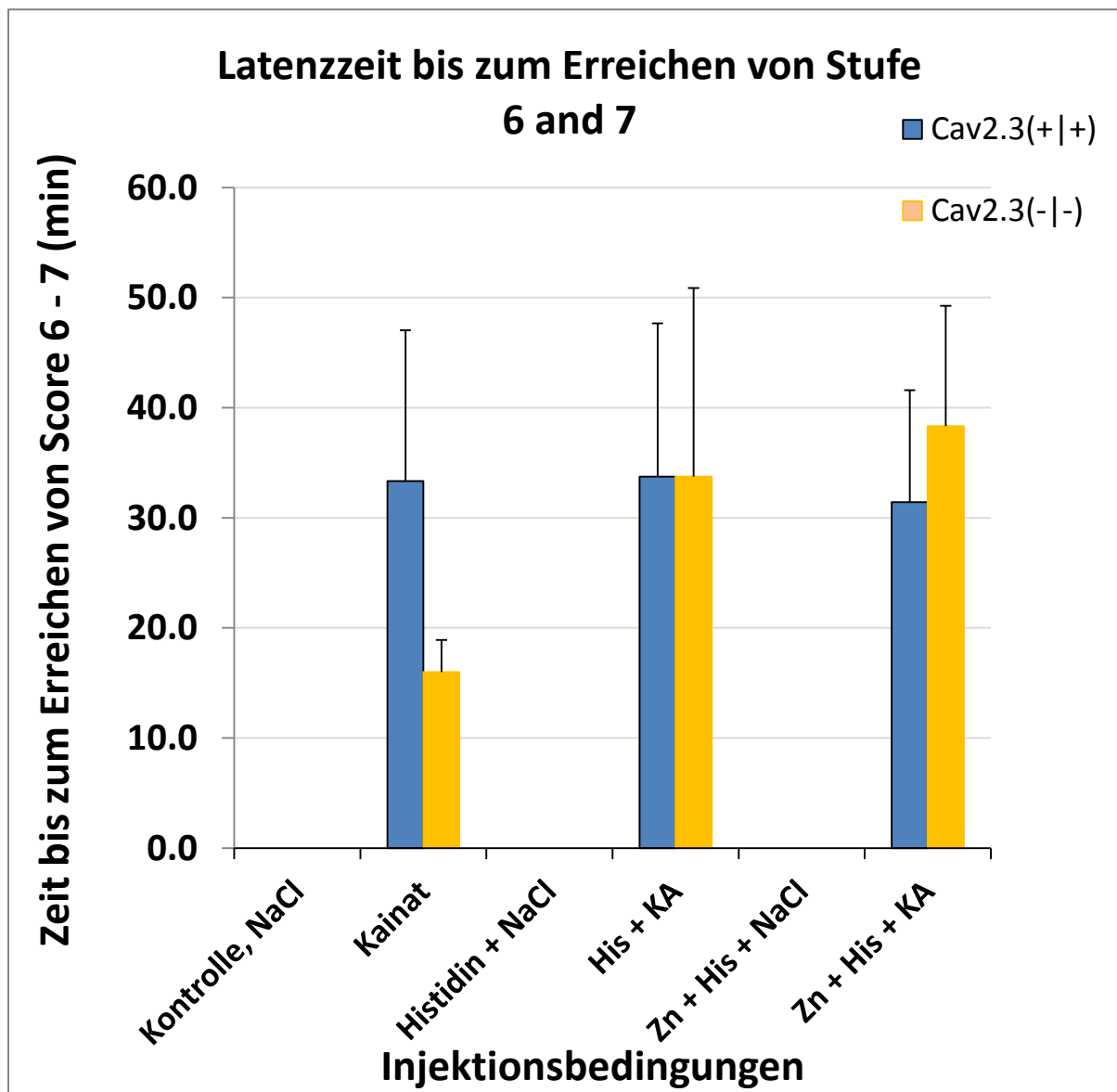


Abbildung 18: Die Latenzzeit bis zum Erreichen von Stufe 6 und 7 wird in Abhängigkeit mit Kainat in Verbindung mit den verschiedenen Co-Injektionen gezeigt. Blaue Balken zeigen hierbei $Ca_v2.3$ -kompetente Mäuse und gelbe Balken stellen $Ca_v2.3$ KO-Mäuse dar (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

3.6 Telemetrische Datenanalyse mit NeuroScore

3.6.1 Analyse unterschiedlicher Anfallsparameter

Mit Hilfe von NeuroScore (Version 2.1.0, DSI) konnten verschiedene Parameter zur genauen Charakterisierung von ictalen Phasen aus einem Elektroencephalogramm analysiert werden, um so eventuell Veränderungen, die durch die Injektionsbedingungen hervorgerufen wurden, darzustellen oder um festzustellen, ob Veränderungen aufgrund vom Fehlen eines Calcium-Kanals hervorgerufen wurden. So wurden die absolute Anzahl der Spike Episoden (Abbildung 19 A), die absolute und durchschnittliche Dauer einer Spike Episode (Abb. 19 B und C), die längste und kürzeste Dauer einer Spike Episode (Abb. 19 D und E) und die durchschnittlichen Spikes pro Episode (Abb. 19 F) ermittelt, um genotypische Unterschiede festzustellen oder Veränderungen in Abhängigkeit von den Injektionsbedingungen zu identifizieren. In den folgenden Grafiken sind Signifikanzbalken für Unterschiede bei $Ca_v2.3(+|+)$ Mäusen mit Sternchen und Balken in Blau dargestellt, Unterschiede bei $Ca_v2.3(-|-)$ -Mäusen mit schwarzen Balken und Raute und bei Unterschieden beider Genotypen miteinander mit rotem Balken und Dollar Zeichen. Nach Kainat Injektion hatten $Ca_v2.3(+|+)$ Mäuse eine signifikant höhere Anzahl von Spike Episoden in Gruppe A (1 ± 1 zu 184 ± 53 , $p = 0.001$). Unter Kainat dauerte eine Episode durchschnittlich $15 \text{ sec} \pm 4 \text{ sec}$ im Vergleich zu den Kontrollen ($= 0 \text{ sec}$), da hier keine Episoden aufgetreten sind. Dabei dauerte die längste Episode $106 \text{ sec} \pm 34 \text{ sec}$ und die kürzeste Episode 1.4 sec und waren signifikant verlängert. Auch die Anzahl der Spikes hat unter Kainat zugenommen 53 ± 19 im Gegensatz zu 1 ± 1 Spike pro Episode in Kontrollmäusen. Man sieht in Abbildung 19 C, D, F dass die Effekte des Kainats auf die 3 Parameter stärker bei Wildtyp Mäusen beeinflusst wurden als bei KO-Mäusen und daher die Effekte des Kainats in Abhängigkeit von einem $Ca_v2.3 \text{ Ca}^{2+}$ -Kanal unterschiedlich stark ausfallen. Die meisten Parameter waren in Gruppe C verändert. Beide Genotypen hatten häufiger Episoden nach Kainat und Co-Injektion von Zink und Histidin im Vergleich zu deren Kontrollen (WT: 13 ± 9 zu 147 ± 42 , $p = 0.001$, KO: 4 ± 2 auf 37 ± 15 , $p = 0.01$). Auch hier wird deutlich, dass die Effekte bei Wildtyp-Mäusen stärker ausgeprägt sind als bei KO-Mäusen. Ähnlich verhielt es sich bei der absolute Episodendauer und der längsten Episode (Abb. 19 B und D). Darüber hinaus gab es signifikante Veränderungen in Abhängigkeit einer Kainat Injektion, wobei die durchschnittliche Episodenlänge verlängert wurde und auch die Episodenlängen (Abb. 19 D und E) in beiden Genotypen verändert waren. Die wenigsten Veränderungen in den Parametern konnte in Gruppe B beobachtet werden. Hier verursachte die Injektion von Histidin in Verbindung mit Kainat überwiegend Veränderungen bei KO-

Mäusen. Nach Kainat verlängerte sich die absolute und durchschnittliche Episodendauer (Abb. 19 B, C, D, F) im Vergleich zu den Kontrollen in Gruppe B. Die Episodenlänge hat unter Kainat ebenso wie die Anzahl der einzelnen Spikes pro Episode zugenommen. Bei Cav_v2.3(+|+) Mäusen der Gruppe B zeigten sich keine signifikanten Veränderungen nach Kainat Applikation.

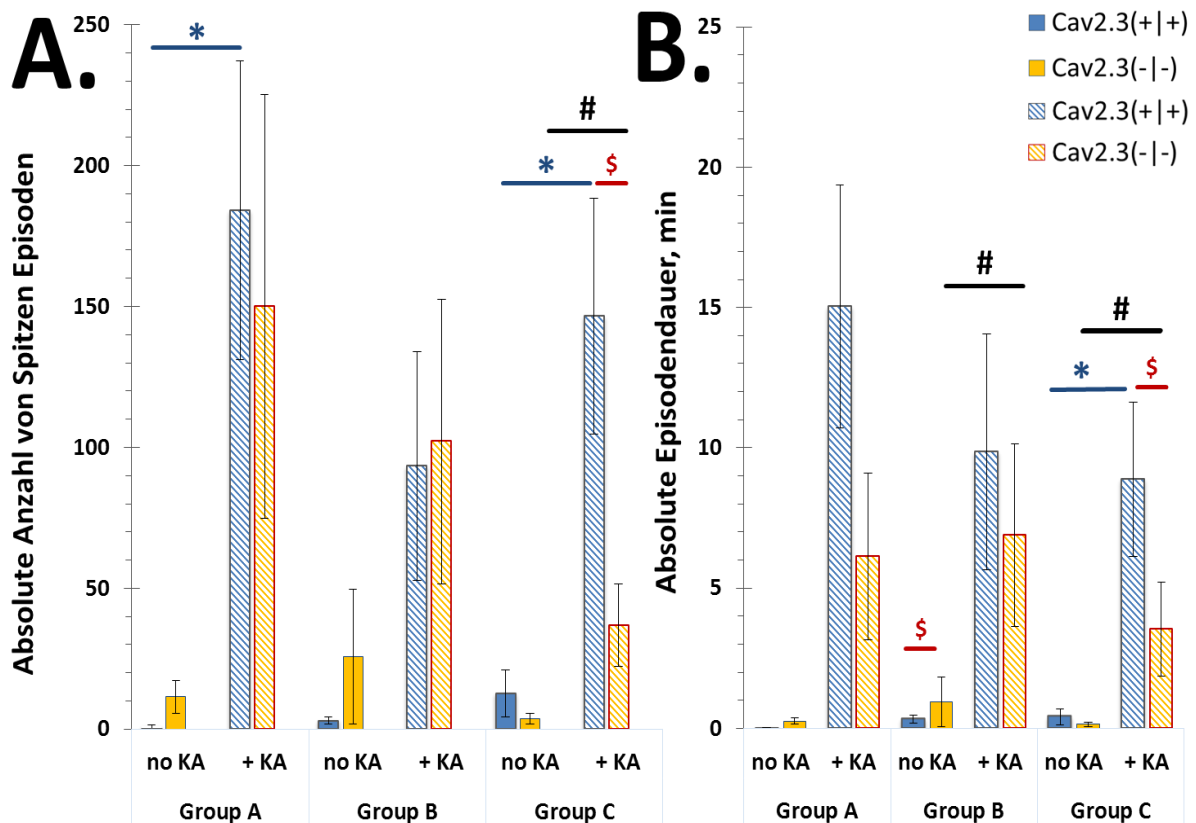


Abbildung 19 A und B: Mittelwerte der verschiedenen Spike Parameter gemessen durch NeuroScore. A und B zeigen absolute Anzahl von Spitzen Episoden (Spike Trains) und absolute Episodendauer (Spike Train Duration). Die Auswertung der aufgenommenen EEG-Ableitungen erfolgte durch ein automatisiertes Protokoll, welches Anfälle detektieren kann. Ein Spike wurde definiert als eine iktale Aktivität mit einer Länge bis 200 ms und einer Mindestamplitude von 125 μ V, welche die Baseline Amplitude um das 2,5 -25- fache übersteigt. Eine Spike Train beinhaltet mindestens 4 Spikes, die innerhalb eines Intervalls von 30 - 1000 ms auftreten und dabei mindestens 300 ms andauern. Fehlerbalken repräsentieren die SEM Werte (Mann-Whitney-U Test: $p \leq 0.05$ Amplitude, welche die Baseline Amplitude um 2,5- bis 25-fach übersteigt und eine Mindestamplitude von 125 μ V hat. Balken in Blau und Blau gestreift sind Wildtyp Mäuse. Balken in Gelb und Gelb gestreift sind KO-Mäuse (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

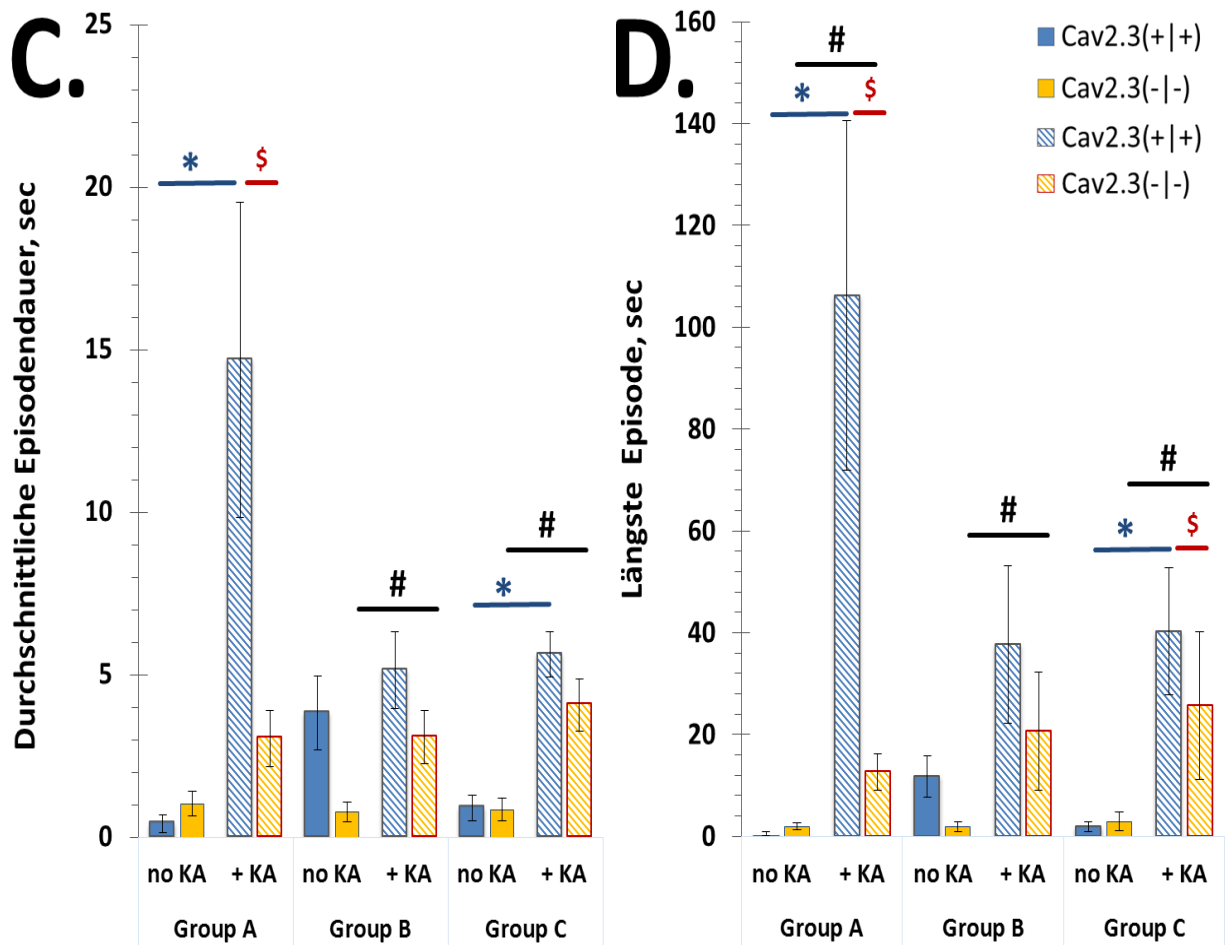


Abbildung 19 C und D: Mittelwerte der verschiedenen Spike Parameter gemessen durch NeuroScore. In C ist die durchschnittliche Episodendauer in Sekunden dargestellt. D zeigt jeweils die durchschnittliche Länge der längsten Episode in Sekunden für alle Gruppen. Balken in Blau und Blau gestreift sind Wildtyp Mäuse. Balken in Gelb und Gelb gestreift sind KO-Mäuse (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

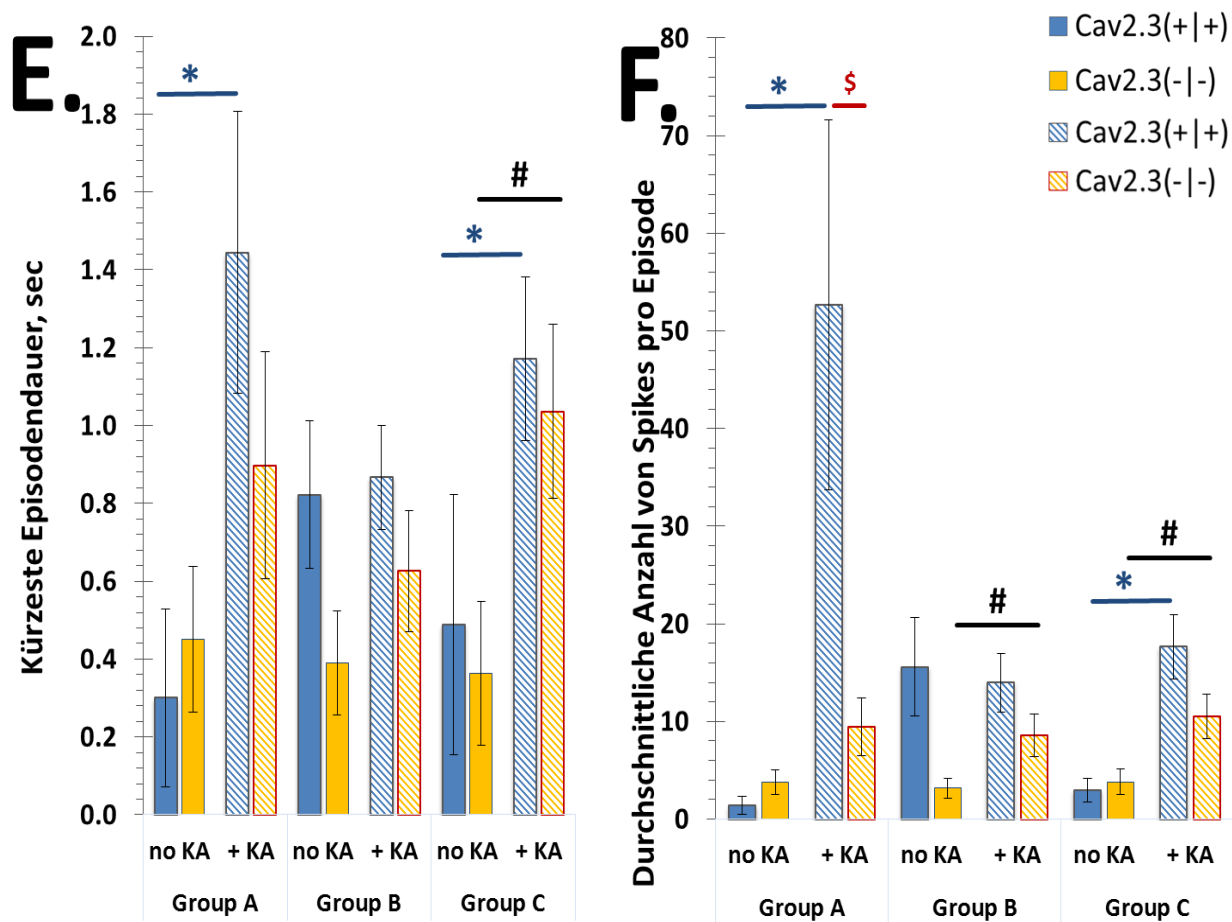


Abbildung 19 E und F: In E wird die durchschnittlich kürzeste Episodendauer gezeigt. Die durchschnittliche Anzahl von Spikes pro Episode wird in F gezeigt. Balken in Blau und Blau gestreift sind Wildtyp-Mäuse. Balken in Gelb und Gelb gestreift sind KO-Mäuse (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

Tabelle 5: NeuroScore Analyse von Oberflächenableitungen. (Analyse von 2 h). NeuroScore der Firma DSI wurde angewendet, um Anfallsereignisse zu quantifizieren. Zur Anfallsdetektion werden die Ableitungen nach wiederkehrenden Spike-Aktivitäten untersucht und Amplituden verglichen (Details in (Dibué-Adjei et al. 2017; Alpdogan et al. 2019; Alpdogan et al. 2020)). Die Werte für absolute Anzahl von Spike Episoden und 5 weitere Parameter wurden über einen Zeitraum von 2 h ermittelt und zusammengefasst. Enthalten sind die Daten aus 3 unterschiedlichen Gruppen, von beiden Genotypen mit jeweils n = 6 - 11 Mäusen. Die Mäuse in der Versuchsgruppe A. hatten keine Kanülen Implantate und erhielten keine i.c.v Injektionen. Mäuse in den beiden anderen Gruppen erhielten über ihre implantierten Kanülen B. 1 mM His und C. 1 mM His und 10 μ M Zn²⁺. Für die Statistische Auswertung wurde Mann-Whitney U-Test angewendet (Tabelle entnommen aus (Alpdogan et al. 2020)).

		Injektion von Kainat ohne / mit	Absolute Anzahl von Spitzen	Absolute Episodendauer min	Durchschn. Episodendauer sek	Längste Episode sek	Kürzeste Episode sek	Durchschn. Anzahl Spitzen/Episode	
A.	Gruppe A	ohne KA	mean	0,8	0,02	0,4	0,5	0,3	1,4
			SEM	0,7	0,0	0,3	0,3	0,2	0,9
			n =	6	6	6	6	6	6
	No His - No ZnCl ₂	+ KA	mean	184,1	15,0	14,7	106,2	1,4	52,7
			SEM	53,0	4,3	4,8	34,4	0,4	19,0
			n =	7	7	7	7	7	7
	Ca _v 2.3(+ +)	MW-U Test	p =	0,001	kein Wert	0,001	0,001	0,014	0,001
	Ca _v 2.3(- -)		mean	11,5	0,3	1,1	1,9	0,5	3,8
			SEM	5,8	0,1	0,4	0,7	0,2	1,3
n =			6	6	6	6	6	6	
MW-U Test		mean	150,0	6,1	3,1	12,7	0,9	9,4	
		SEM	75,1	3,0	0,9	3,6	0,3	3,0	
		n =	9	9	9	9	9	9	
	p =	0,09	0,07	0,09	0,05	0,53	0,22		
+ + vs. - -	no	p =	0,18	kein Wert	0,39	0,13	0,70	0,18	
	yes	p =	0,35	0,05	0,01	0,00	0,25	0,01	

Tabelle 5 B: NeuroScore Analyse von Oberflächenableitungen der Gruppe B.

		Injektion von Kainat ohne / mit	Absolute Anzahl von Spitzen	Absolute Episoden	Durchschn. Episodendauer sek	Längste Episode sek	Kürzeste Episode sek	Durchschn. Anzahl Spitzen/Episode	
B.	Gruppe B	ohne KA	mean	3,1	0,3	3,8	11,8	0,8	15,6
			SEM	1,2	0,1	1,1	4,1	0,2	5,0
	Plus His		n =	9	9	9	9	9	9
	Ca_v2.3(+ +)	+ KA	mean	93,5	9,9	5,2	37,7	0,9	14,0
			SEM	40,6	4,2	1,2	15,5	0,1	3,0
			n =	11	11	11	11	11	11
		MW-U Test	p =	0,05	0,11	0,79	0,32	0,85	0,94
	Ca_v2.3(- -)		mean	25,8	0,9	0,8	1,9	0,4	3,2
			SEM	23,9	0,9	0,3	0,9	0,1	1,0
			n =	9	9	9	9	9	9
			mean	102,1	6,9	3,1	20,7	0,6	8,6
			SEM	50,5	3,2	0,8	11,6	0,2	2,2
			n =	10	10	10	10	10	10
		MW-U Test	p =	0,08	0,04	0,02	0,04	0,50	0,04
	+ + vs. - -	no	p =	0,60	0,04	0,05	0,08	0,55	0,09
		yes	p =	0,97	0,67	0,20	0,31	0,78	0,24

Tabelle 5 C: NeuroScore Analyse von Oberflächenableitungen der Gruppe C.

		Injektion von Kainat ohne / mit	Absolute Anzahl von Spitzen	Absolute Episoden	Durchschn. Episodendauer sek	Längste Episode sek	Kürzeste Episode sek	Durchschn. Anzahl Spitzen/Episode	
C.	Gruppe C	ohne KA	mean	12,7	0,4	0,9	1,9	0,5	3,0
			SEM	8,5	0,3	0,4	0,9	0,3	1,2
	Plus His- ZnCl ₂		n =	9	9	9	9	9	9
	Ca_v2.3(+ +)	+ KA	mean	146,6	8,9	5,6	40,3	1,2	17,7
			SEM	41,9	2,7	0,7	12,5	0,2	3,3
			n =	11	11	11	11	11	11
		MW-U Test	p =	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
	Ca_v2.3(- -)		mean	3,7	0,1	0,9	2,9	0,4	3,8
			SEM	1,8	0,1	0,3	1,8	0,2	1,3
			n =	11	11	11	11	11	11
			mean	36,9	3,5	4,1	25,7	1,0	10,5
			SEM	14,6	1,7	0,8	14,5	0,2	2,3
			n =	11	11	11	11	11	11
		MW-U Test	p =	0,01	0,02	0,00	0,01	0,02	0,03
	+ + vs. - -	no	p =	0,94	0,18	0,88	1,00	0,41	0,85
		yes	p =	0,02	0,05	0,15	0,05	0,79	0,07

Tabelle 6: Für den statistischen Vergleich aller Gruppen miteinander wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet (Tabelle entnommen aus (Alpdogan et al. 2020)).

	Injektion von Kainat ohne / mit	Absolute Anzahl von Spitzen Episoden	Absolute Episodendauer min	Durchschn. Episodendauer sek	Längste Episode sek	Kürzeste Episode sek	Durchschn. Anzahl Spitzen/Episode	
Cav2.3+ + Plus His vs. No ZnCl ₂	ohne	p = 0,181	kein Wert	0,050	0,026	0,145	0,026	B vs. A
	mit	p = 0,070	0,160	0,046	0,057	0,365	0,024	B vs. A
Cav2.3- - Plus His vs. No ZnCl ₂	ohne	p = 0,456	0,607	0,689	0,607	0,864	0,864	B vs. A
	mit	p = 0,661	0,968	1,000	0,720	0,842	0,905	B vs. A
Cav2.3+ + Plus His-ZnCl ₂ vs. His	ohne	p = 0,730	0,340	0,094	0,094	0,077	0,094	C vs. B
	mit	p = 0,168	0,555	0,844	0,555	0,393	0,511	C vs. B
Cav2.3- - Plus His-ZnCl ₂ vs. His	ohne	p = 0,848	0,935	0,939	0,939	0,410	0,908	C vs. B
	mit	p = 0,751	0,671	0,377	0,622	0,333	0,778	C vs. B
Cav2.3+ + Plus His-ZnCl ₂ vs. no ZnCl ₂	ohne	p = 0,529	kein Wert	0,607	0,529	0,776	0,456	C vs. A
	mit	p = 0,651	0,239	0,057	0,103	0,587	0,057	C vs. A
Cav2.3- - Plus His-ZnCl ₂ vs. no ZnCl ₂	ohne	p = 0,264	0,427	0,647	0,477	0,378	0,960	C vs. A
	mit	p = 0,403	0,594	0,323	0,761	0,403	0,648	C vs. A

3.6.2 Leistungsspektraldichte Analyse (Power spectrum density)

Um weitere Informationen zur Entstehung von Kainat-induzierten, konvulsiven Anfällen zu erhalten und Unterschiede zwischen beiden Genotypen zu identifizieren, wurde eine Analyse der Leistungsspektren über das Programm NeuroScore durchgeführt. Dafür wurden die Signale des EEGs über eine Fouriertransformation in ihre einzelne Frequenzbanden aufgeteilt. Die relativen Werten der einzelnen Frequenzbanden wurde in allen Gruppen verglichen. Signifikante Unterschiede wurden in den folgenden Grafiken erneut für Ca_v2.3(+|+) Mäuse mit blauen Sternchen und Balken, mit schwarzen Balken und Raute für Ca_v2.3(-|-) Mäuse und mit rotem Balken und Dollar Zeichen für Unterschiede zwischen beiden Genotypen dargestellt. In Gruppe A zeigte sich Veränderungen bei beiden Genotypen. Bei den KO-Mäusen stieg die Leistung (power) der Delta-Wellen signifikant an während die Leistung der Alpha-Wellen abnahm. Bei den Wildtyp-Mäusen hat die Leistung von Sigma und Alpha Wellen bei einer gleichzeitigen Zunahme der Leistung von Gamma-Wellen abgenommen (Grafik 20 A).

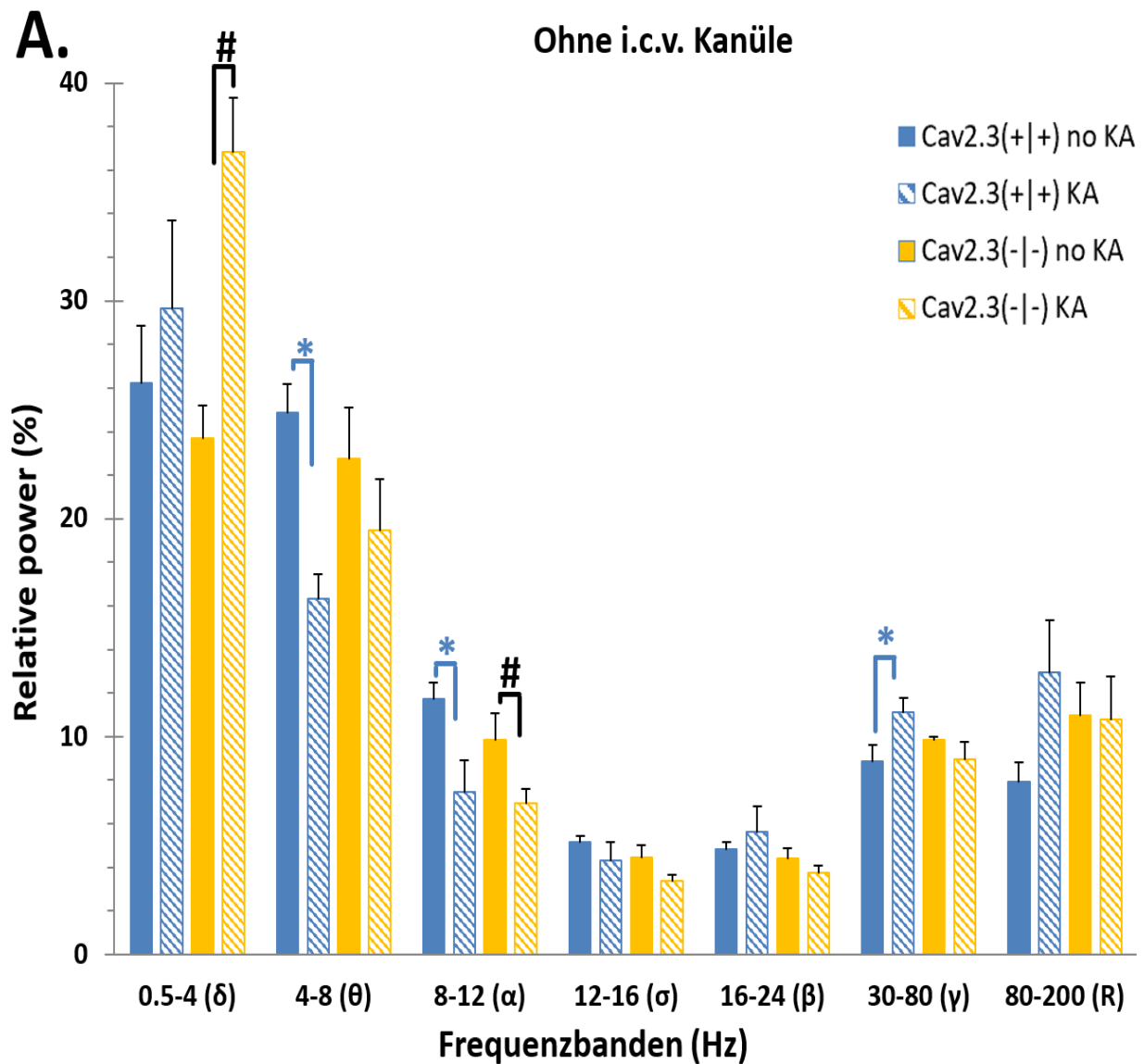


Abbildung 20 A: Analyse der Leistungsspektraldichte (PSD) für Gruppe A ohne Kanüle. Die Abbildung zeigt die relative Power der einzelnen Frequenzbereiche während der Messperiode von maximal 2 Stunden für beide Genotypen. Dabei sind $Ca_v2.3$ Wildtyp-Mäuse ohne Kainat Injektion (Blau) und mit 15 mg / kg Kainat (Blau gestreift) sowie $Ca_v2.3$ KO-Mäuse ohne KA Injektion (Gelb) und mit KA (Gelb gestreift) dargestellt. Linien und Sternchen in Blau (WT) sowie Linien und Raute in Schwarz (KO) zeigen statistisch signifikante Unterschiede bei Mäusen ohne vs. mit Kainat (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

Tabelle 7 A: Werte für Abbildung 20 A von Wildtyp und KO-Mäusen der Gruppe A. Tabelle entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

A.	Injektion von Kainat no / yes	Frequenzbanden	(δ)	(θ)	(α)	(σ)	(β)	(γ)	(R)	(FR)
		Hz	0.5 - 4	4 - 8	8 - 12	12 - 16	16 - 24	30 - 80	80 - 200	200 - 250
Ca_v2.3(+ +)	no	mean	26,5	22,9	10,5	4,4	4,3	9,6	9,5	10,2
		SEM	3,2	1,1	0,4	0,2	0,3	0,9	1,0	0,9
		n =	6	6	6	6	6	6	6	6
	yes	mean	28,7	16,3	7,3	3,9	5,2	12,4	13,5	9,5
	SEM	3,5	1,9	1,4	0,6	0,8	0,8	2,2	1,6	
	n =	8	8	8	8	8	8	8	8	
	t-test:	p =	0,67	0,02	0,07	0,48	0,38	0,04	0,17	0,76
Ca_v2.3(- -)	no	mean	24,6	22,5	8,9	4,1	4,0	10,0	11,4	12,6
		SEM	1,5	3,1	1,3	0,5	0,4	0,4	1,8	2,5
		n =	6	6	6	6	6	6	6	6
	yes	mean	34,8	18,5	6,3	3,0	3,9	11,0	11,6	8,5
	SEM	2,7	2,3	0,6	0,2	0,3	1,1	1,9	1,9	
	n =	8	8	8	8	8	8	8	8	
	t-test:	p =	0,01	0,30	0,06	0,07	0,76	0,43	0,94	0,21
+ + vs. - -	no	p =	0,59	0,91	0,27	0,57	0,52	0,75	0,38	0,38
	yes	p =	0,19	0,48	0,49	0,21	0,14	0,34	0,53	0,69

Während sich bei der vorherigen Analyse der einzelnen Anfallsparametern in Gruppe B die wenigsten Parameter unterschieden haben (Grafik 19 A - F), sieht man bei der genauen Untersuchung der einzelnen Leistungsspektren, dass in der Gruppe der Versuchstiere nach Histidin ohne und mit Kainat-Injektionen Veränderungen und Unterschiede in allen 7 Frequenzbanden vorzufinden sind (Grafik 20 B). In den Ca_v2.3(-|-) Mäusen hatte die Kainat-Injektion nur einen signifikant reduzierenden Effekt auf die Leistung im Alpha-Wellen Bereich. Dagegen wurden in Ca_v2.3(+|+) Mäusen nach Kainat-Injektion gleich 5 Frequenzbanden beeinflusst. Unter Kainat reduzierte sich die Leistung in den Bereichen von Theta-, Alpha- und Sigma-Wellen. Im Gegensatz dazu verstärkte sich die Leistung im Gamma-Wellen Bereich ebenso wie die als Ripples definierten Frequenzbereiche. In vier Frequenzbanden konnten auch genotypisch bedingte Veränderungen identifiziert werden. So reduzierte Histidin die Leistung der Thetawellen nur bei KO-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren. Die zusätzliche Injektion von Kainat in dieser Gruppe führte zu einer Zunahme der Delta-power bei einer gleichzeitigen Abnahme von Beta- und Gamma-power bei KO-Tieren verglichen mit den WT-Tieren.

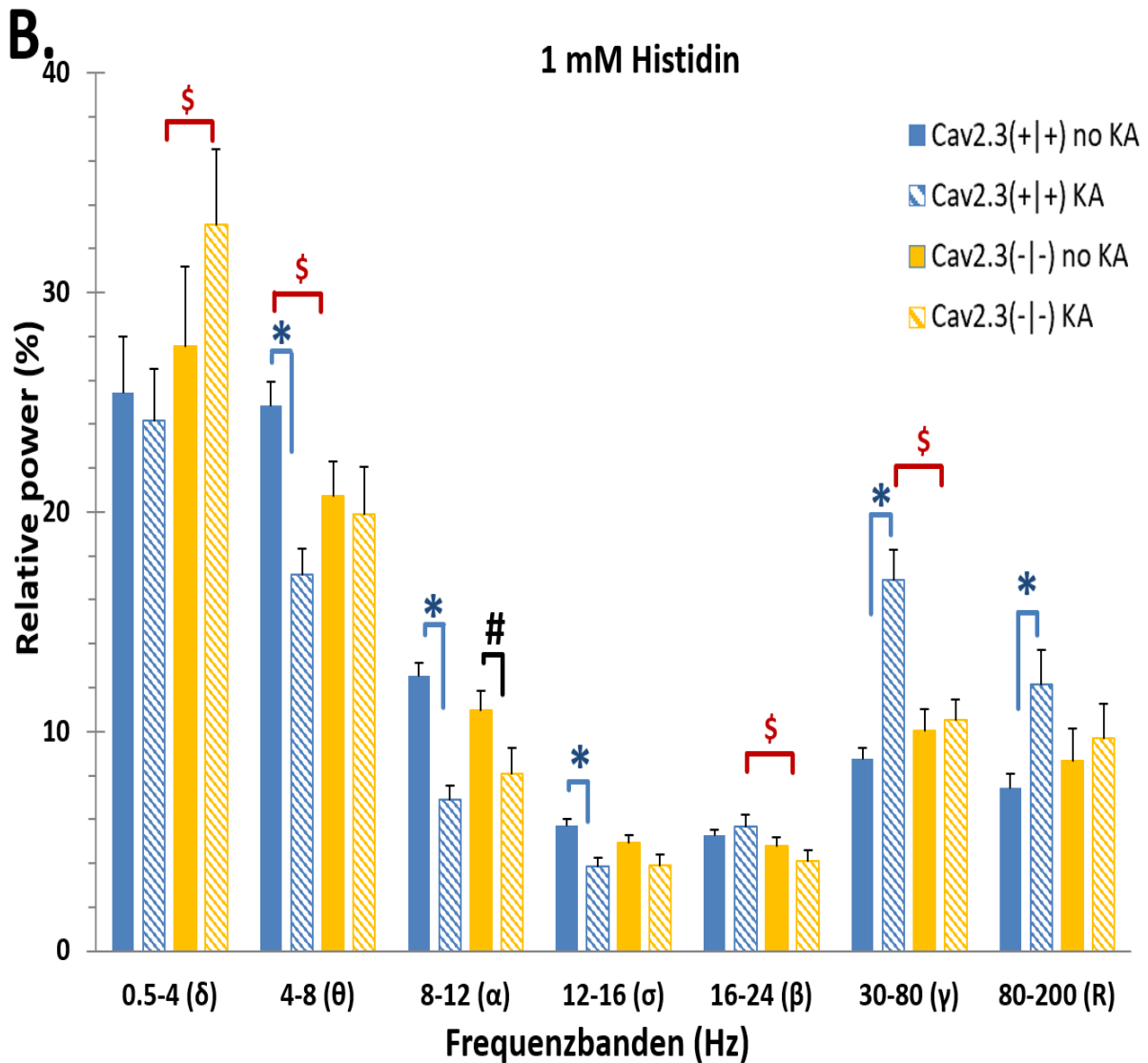


Abbildung 20 B: Analyse der Leistungsspektraldichte (PSD) für Gruppe B mit Kanülen Implantat und Histidin Injektion. Die Abbildung zeigt die relative Power der einzelnen Frequenzbereiche während der Messperiode von maximal 2 Stunden für beide Genotypen. Dabei sind $Ca_v2.3$ Wildtyp-Mäuse ohne Kainat Injektion (Blau) und mit 15 mg / kg Kainat (Blau gestreift) sowie $Ca_v2.3$ KO-Mäuse ohne KA Injektion (Gelb) und mit KA (Gelb gestreift) dargestellt. Linien und Sternchen in Blau (WT) sowie Linien und Raute in Schwarz (KO) zeigen statistisch signifikante Unterschiede bei Mäusen ohne vs. mit Kainat. Zusätzlich zeigen Linien in Dollar Zeichen in Rot. Unterschiede zwischen beiden Genotypen (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

Tabelle 7 B: Werte für Abbildung 20 B von Wildtyp und KO-Mäusen der Gruppe B. (Tabelle entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

B.	Injektion von Kainat no / yes	Frequenzbanden	(δ)	(θ)	(α)	(σ)	(β)	(γ)	(R)	(FR)
		Hz	0.5 - 4	4 - 8	8 - 12	12 - 16	16 - 24	30 - 80	80 - 200	200 - 250
Ca_v2.3(+ +)	no	mean	25,6	24,5	11,4	5,2	5,0	9,5	8,4	8,2
		SEM	3,1	1,2	0,7	0,3	0,3	0,6	0,6	1,0
		n =	8	8	8	8	8	8	8	8
	yes	mean	23,1	15,0	6,1	3,3	5,6	17,4	14,7	11,4
		SEM	3,1	1,5	0,9	0,6	0,9	1,2	2,3	1,6
		n =	8	8	8	8	8	8	8	8
t-test:	p =	0,56	0,00	0,00	0,01	0,55	0,00	0,02	0,11	
Ca_v2.3(- -)	no	mean	33,8	16,4	7,5	3,4	3,6	9,6	10,7	13,2
		SEM	5,3	1,2	0,5	0,3	0,3	1,1	1,9	2,2
		n =	8	8	8	8	8	8	8	8
	yes	mean	29,2	17,8	7,4	3,7	4,3	12,8	12,4	9,8
		SEM	3,7	2,5	1,5	0,6	0,6	1,7	1,9	1,2
		n =	8	8	8	8	8	8	8	8
t-test:	p =	0,49	0,61	0,96	0,66	0,31	0,13	0,53	0,19	
+ + vs. - -	no	p =	0,21	0,00	0,00	0,00	0,01	0,93	0,26	0,06
	yes	p =	0,22	0,34	0,50	0,60	0,28	0,04	0,45	0,43

In Abbildung 20 C wird der Einfluss von Zink und Histidin in Verbindung ohne und mit Kainat auf die einzelnen Frequenzbanden bei beiden Genotypen dargestellt. Kainat-spezifische Effekte gab es bei beiden Genotypen. So fand man in allen Versuchstieren einen reduzierenden Effekt von Kainat auf die Frequenzbanden im Alpha- und Sigma Wellen Bereich. Zusätzlich dazu gab es unter Kainat bei den KO-Mäusen auch Veränderungen im Delta- und Theta-Wellen Bereich.

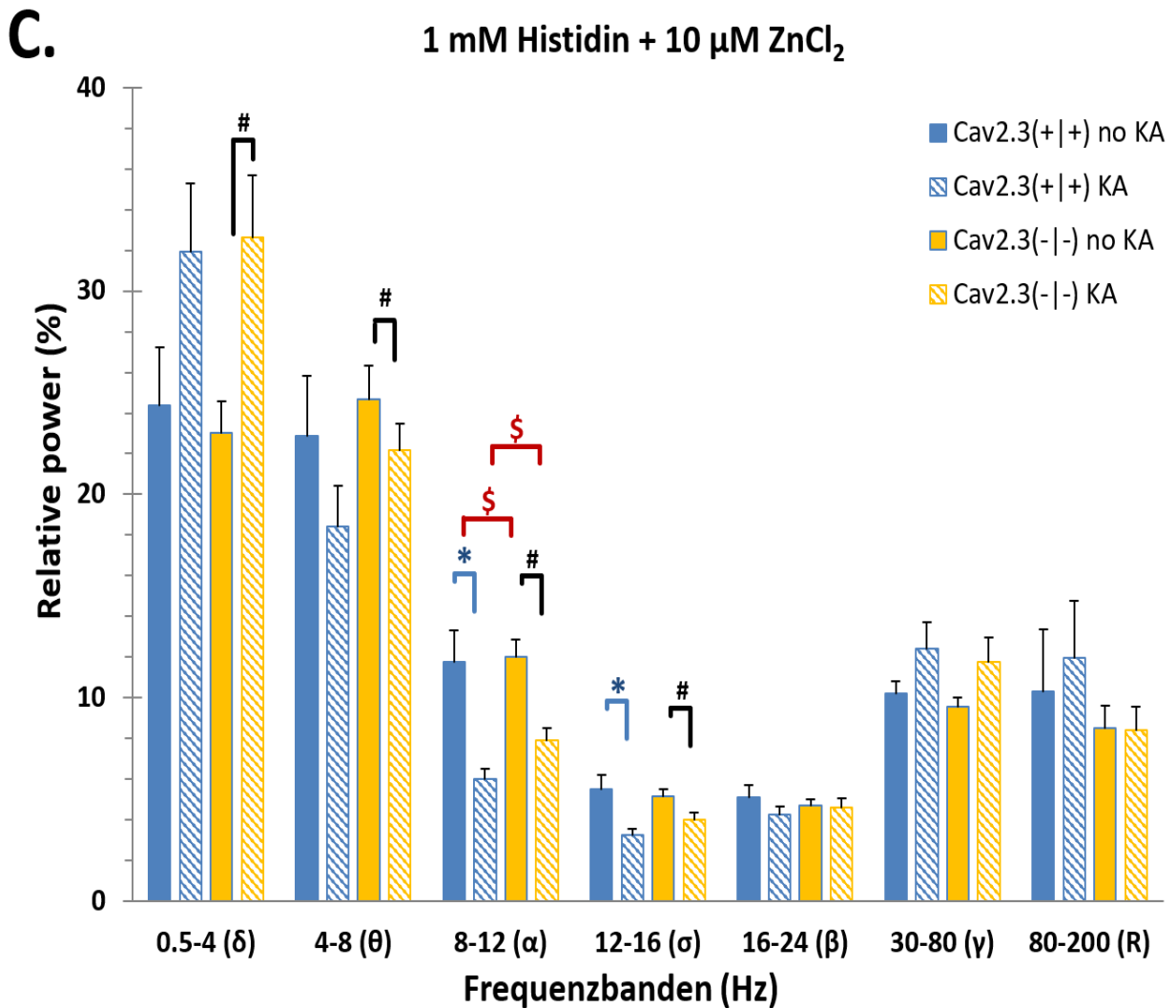


Abbildung 20 C: Analyse der Leistungsspektraldichte (PSD) für Gruppe C mit Kanülen Implantat und Histidin mit Zink Injektion. Die Abbildung zeigt die relative Power der einzelnen Frequenzbereiche während der Messperiode von maximal 2 Stunden für beide Genotypen. Dabei sind Ca_v2.3 Wildtyp-Mäuse ohne Kainat Injektion (blau) und mit 15 mg / kg Kainat (blau-gestreift) sowie Ca_v2.3 KO-Mäuse ohne KA Injektion (gelb) und mit KA (gelb-gestreift) dargestellt. Linien und Sternchen in blau (WT) sowie Linien und Raute in schwarz (KO) zeigen statistisch signifikante Unterschiede bei Mäusen ohne vs. mit Kainat. Zusätzlich zeigen Linien in Dollar Zeichen in Rot Unterschiede zwischen beiden Genotypen (Abbildung entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020)).

Table 7 C: Werte für Abbildung 20 C von Wildtyp und KO-Mäusen der Gruppe C. Tabelle entnommen und modifiziert aus (Alpdogan et al. 2020).

C.	Injektion von Kainat	Frequenzbanden Hz	(δ)	(θ)	(α)	(σ)	(β)	(γ)	(R)	(FR)
			0.5 - 4	4 - 8	8 - 12	12 - 16	16 - 24	30 - 80	80 - 200	200 - 250
Genotyp										
Ca_v2.3(+ +)	no	mean	26,2	20,2	9,4	4,2	4,2	10,2	12,5	11,0
		SEM	3,5	3,7	1,7	0,7	0,7	0,7	3,6	3,0
		n =	8	8	8	8	8	8	8	8
	yes	mean	28,0	18,2	5,7	3,2	4,5	13,5	14,7	9,3
		SEM	3,2	2,5	0,6	0,4	0,5	0,6	3,9	1,5
t-test:	p =	0,32	0,85	0,07	0,36	0,55	0,01	0,79	0,49	
Ca_v2.3(- -)	no	mean	26,1	21,2	9,6	4,2	3,9	9,7	10,4	13,0
		SEM	2,2	2,0	1,0	0,4	0,3	0,5	1,4	2,9
		n =	8	8	8	8	8	8	8	8
	yes	mean	24,8	16,9	6,8	3,6	4,6	16,3	15,1	8,8
		SEM	3,4	1,3	0,6	0,3	0,5	1,2	3,4	1,1
t-test:	p =	0,38	0,19	0,02	0,30	0,12	0,00	0,58	0,34	
+ +	no	p =	0,98	0,82	0,92	0,96	0,68	0,53	0,61	0,64
vs. - -	yes	p =	0,76	0,68	0,20	0,63	0,95	0,10	0,95	0,56

3.7 Histologische Untersuchung

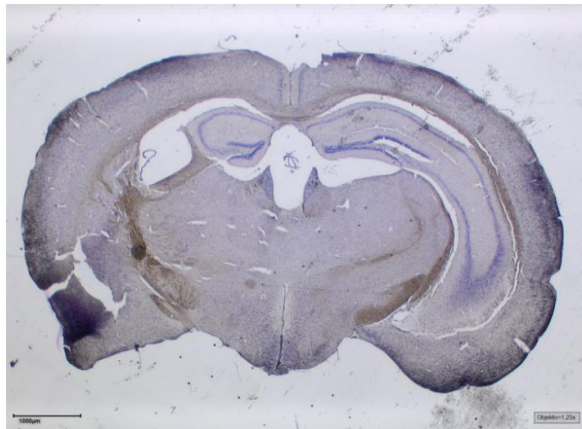
3.7.1 Qualitative Analyse nach Timm's Färbemethode

In diesem Teil der Arbeit werden Hirnschnitte aus den Bereichen -3,8mm bis -2,8 mm vom Bregma nach der histologischen Färbemethode von Timm, zum Nachweis von Zink Ionen zur vorläufigen qualitativen Analyse gezeigt. Zum Mikroskopieren wurde ein Axio Imager A1 von Zeiss in Verbindung mit einer Kamera der Marke Hitachi (Model: HV-F202) und der Software Diskus (Versionsnummer 5.0.6353 #7599) verwendet. Alle Hirnschnitte aus den 6 unterschiedlichen Gruppen wurden identisch behandelt, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu erreichen. Dabei soll vor allem der Hippocampus näher betrachtet werden, zum Einen, weil in vergangenen Experimenten bereits gezeigt wurde, dass unter Kainat in Ca_v2.3(+|+)-Mäusen mehr Neuronen in der CA1 und CA3 Region degenerieren als in unserem Ca_v2.3-KO-Mausmodell (Dibué-Adjei et al. 2017), und zum anderen, weil sich der Hippocampus durch seine laminar aufgebaute Struktur gut eingrenzen lässt. Das meiste Zink befindet sich in synaptischen Vesikeln vor allem an den Enden der Moos Fasern, die bei einer

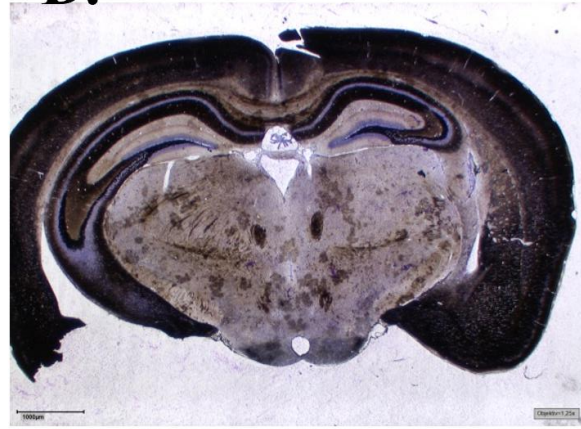
Stimulation in den synaptischen Spalt zusammen mit Glutamat freigesetzt werden (Andersen 2007). In den Abbildungen 21 - 24 ist jeweils A ein Kontrolltier, B ein Tier mit Histidin Injektion, C ein Tier mit Zink und Histidin Injektion zu sehen. Abbildungen 21 - 24 D - E zeigen jeweils ein Paraffinschnitt eines Gehirns aus der Gruppe mit Kainat Injektion (D), Histidin mit Kainat Injektion (E) und Zink Histidin mit Kainat Injektion (F). In den Kontrolltieren beider Genotypen konnte man im Hippocampus Bereich keine intensive Färbung durch Timms Methode erkennen. Im Gegensatz dazu erhalten wir intensive dunkle Färbung nach Kainat Injektion in den Hippocampi beider Genotypen. Insbesondere erstreckt sich ein schwarzes Band von der polymorphen Zellschicht des Gyrus Dentatus bis hin zum Stratum lucidum der CA3 und (CA2) Region, wo viele Moos Fasern projizieren. Zusätzlich sind Stratum radiatum, Stratum oriens an der CA1 Region ebenfalls positiv gefärbt (Abbildungen 21 - 24 A, 21 - 24 D). Nach Injektion von Histidin oder Histidin und Kainat sehen wir bei den Hirnschnitten von $Ca_v2.3$ -kompetenten Mäusen keine Silber Sulfid Färbung am Hippocampus. Die Hirnschnitte bei $Ca_v2.3$ -defiziente Mäuse zeigten ebenfalls keine Verfärbung nach Histidin Injektion (Abbildungen 22 B, 24 B) jedoch nach Co-Injektion mit Kainat (Abbildungen 22 E, 24 E) gab es in den gleichen Bereichen ein Signal wie nach Kainat Injektion. Das Färbemuster in beiden Genotypen unterschied sich jedoch in Gruppe C deutlich in Bezug zu den eigenen Kontrollen und in Bezug auf den anderen Genotyp. Im Hippocampus von $Ca_v2.3$ KO-Mäuse wurde nach Injektion von Zink mit Histidin nur das Stratum lucidum stark angefärbt, während andere Bereiche gar nicht angefärbt waren. Nach zusätzlicher Kainat Injektion zeigte sich erneut ein identisches Bild wie bei Bild D nur ein wenig schwächer in den Bereichen des Stratum oriens und des stratum moleculare. Bei den Wildtyp-Hirn Proben aus der Gruppe C zeigte sich jedoch ein anderes Bild. Nach der Injektion von Zink zeigte sich ein ähnliches Farbmuster im Hippocampus wie nach Kainat Injektion (Abbildungen 21 C und 23 C). Nach der Co-Injektion von Kainat wurden Teile des Hippocampus nicht mehr angefärbt. Besonders das Stratum lucidum war in Höhe der Polymorphen Zellschicht des Gyrus Dentatus nicht mehr angefärbt. Ein Verlust der Färbeintensität ist auch in den Bereichen des Stratum radiatum und Stratum oriens zu erkennen. Einzig ein kleiner Teil des Stratum lucidum am Ende der CA3 Region gibt ein starkes Signal wieder (Abbildungen 21 F, 23 F).

Ca_v2.3 +/+

A. Kontrolle

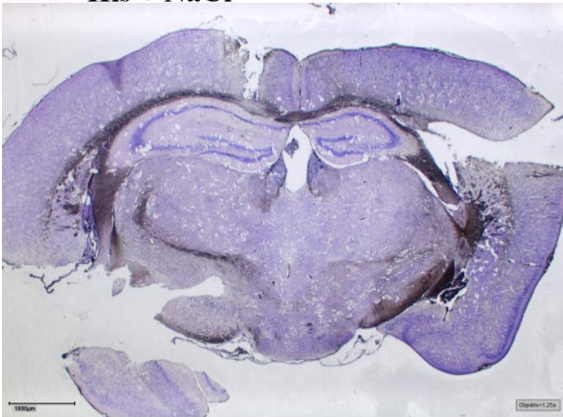


D. Kainat

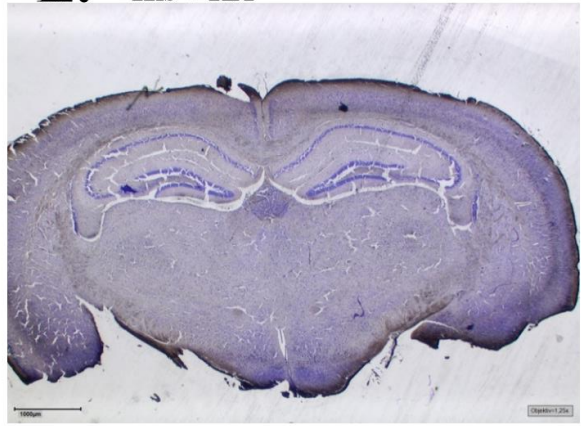


1000µm Objektiv 1,25 x

B. His + NaCl



E. His + KA



C. Zn²⁺ + His + NaCl



F. Zn²⁺ + His + KA

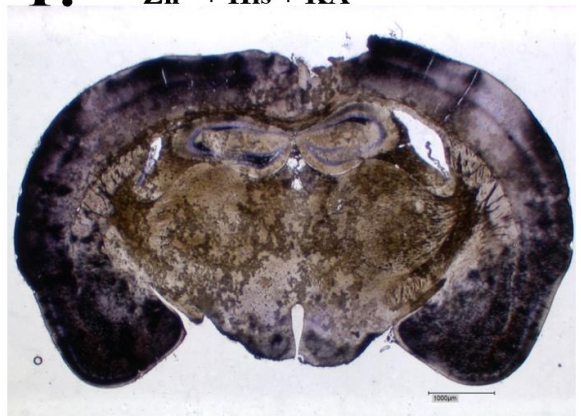
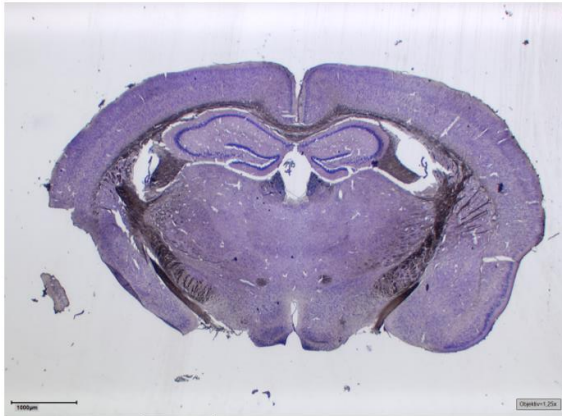


Abbildung 21: Timm's Silbersulfid Färbung von Metallionen im Hirn mit Cresylviolett Gegenfärbung zur Visualisierung der Zellkerne. Paraffin Schnitte von Ca_v2.3(+/-)-Maushirnen. Übersicht über das Verteilungsmuster von Metallionen Zink. Kontrolle A, Histidin mit NaCl, B, Zink mit Histidin und NaCl C, Kainat D, Histidin mit Kainat E, Zink Histidin mit Kainat F

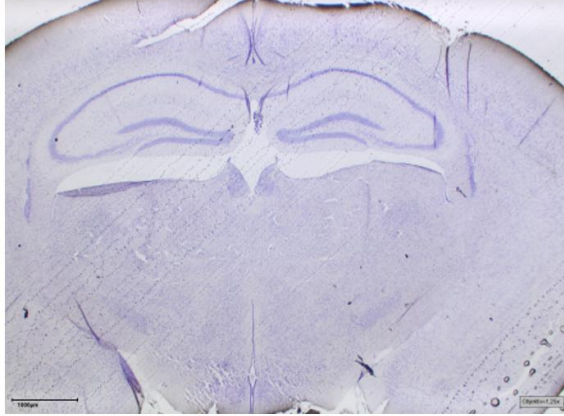
Ca_v2.3 -/-

A. Kontrolle



1000µm Objektiv 1,25 x

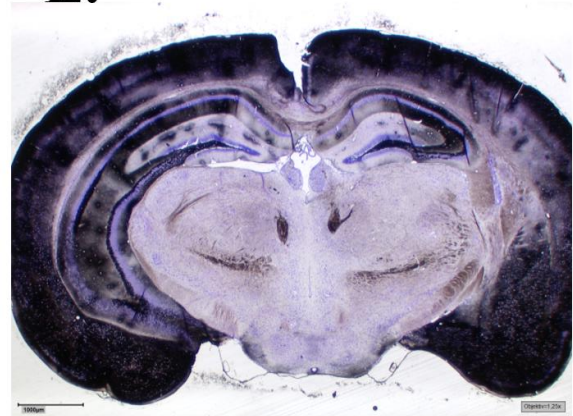
B. His + NaCl



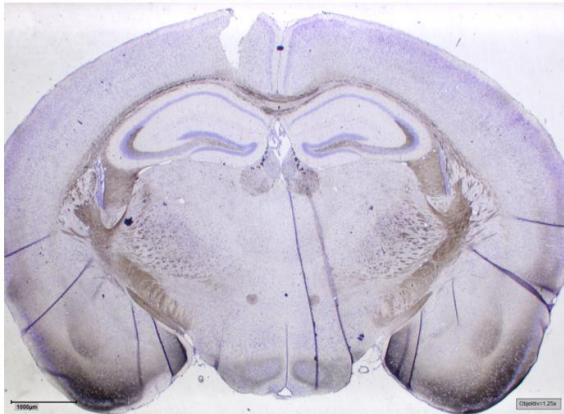
D. Kainat



E. His + KA



C. Zn²⁺ + His + NaCl



F. Zn²⁺ + His + KA



Abbildung 22: Timm's Silbersulfid Färbung von Metallionen im Hirn mit Cresylviolett Gegenfärbung zur Visualisierung der Zellkerne. Paraffin Schnitte von Ca_v2.3(-/-)-Maushirnen. Übersicht über das Verteilungsmuster von Metallionen Zink. Kontrolle A, Histidin mit NaCl B, Zink mit Histidin und NaCl C, Kainat D, Histidin mit Kainat E, Zink Histidin mit Kainat F.

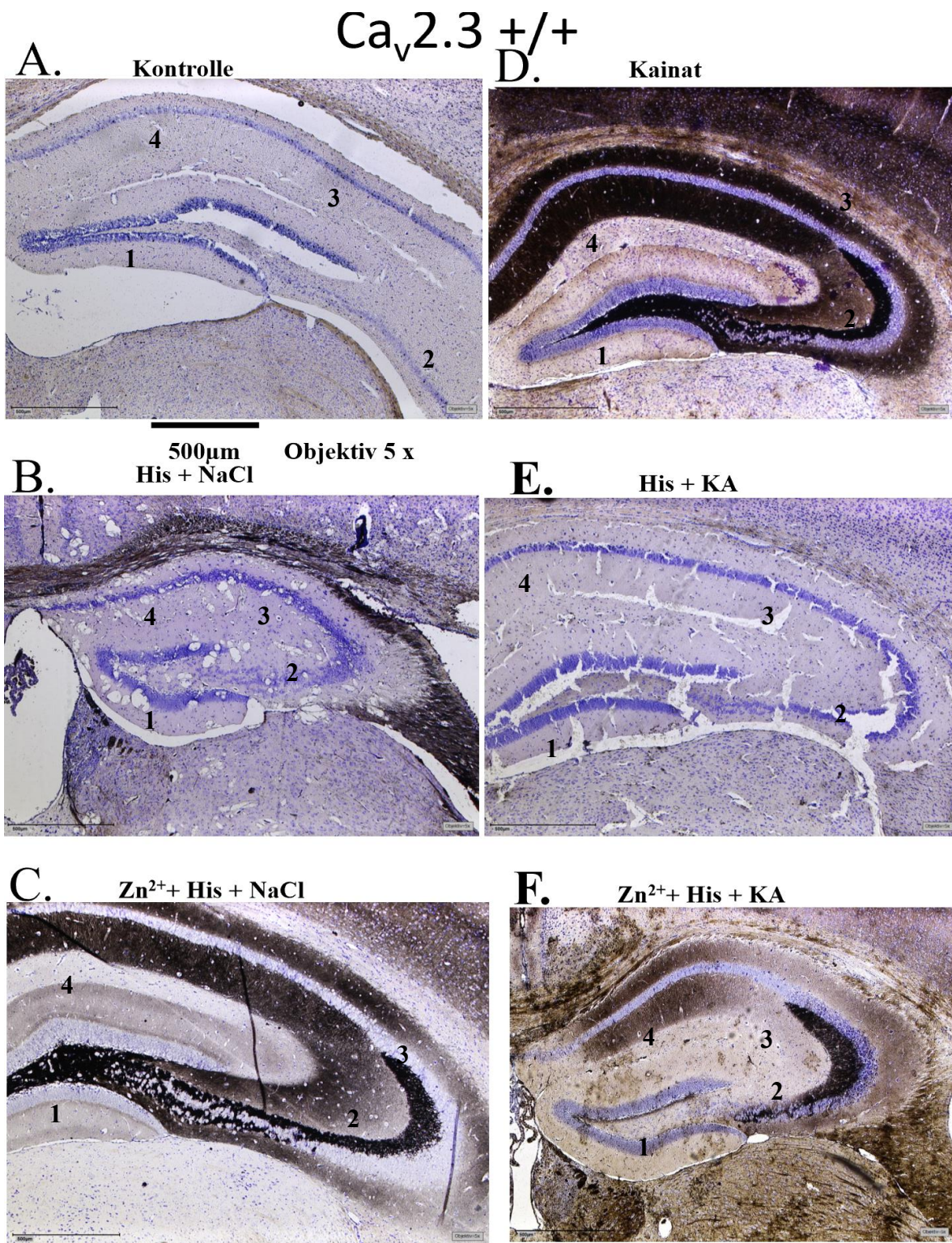
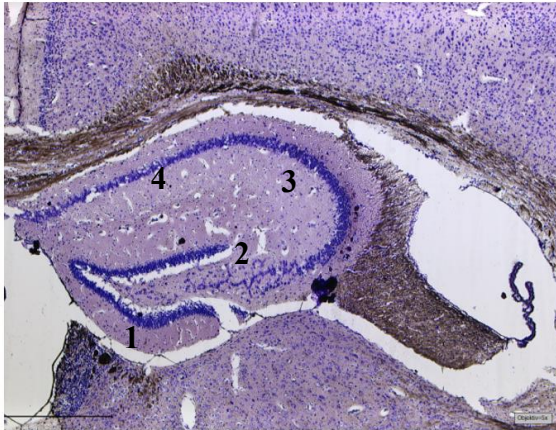


Abbildung 23: Timm's Silbersulfid Färbung von Metallionen im Hippocampus mit Cresylviolett Gegenfärbung zur Visualisierung der Zellkerne. Paraffin Schnitte von Ca_v2.3(+/-)-Maushirnen. Übersicht über das Verteilungsmuster von Zink Ionen im Hippocampus. Kontrolle A, Histidin mit NaCl B, Zink mit Histidin und NaCl C, Kainat D, Histidin mit Kainat E, Zink Histidin mit Kainat F. 1. Gyrus dentatus CA4 Region, 2. CA3 Region, 3. CA2-Region, 4 CA1 Region.

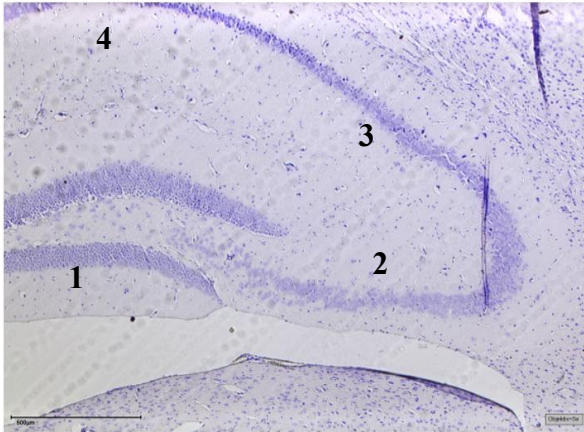
Ca_v2.3 -/-

A. Kontrolle



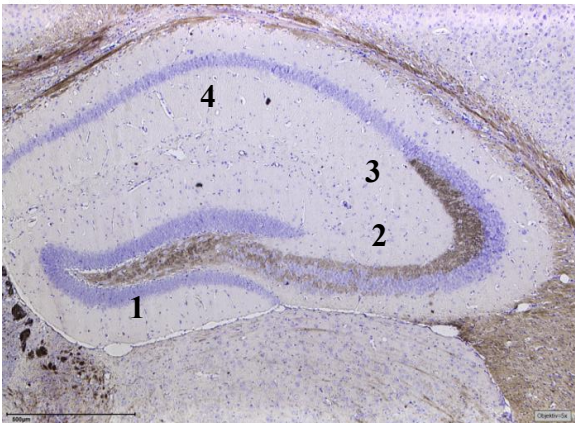
500µm Objektiv 5 x

B.



C.

Zn²⁺ + His + NaCl

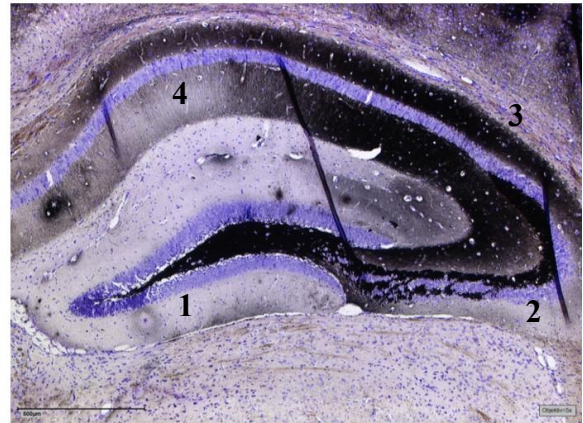


D. Kainat



E.

His + KA



F.

Zn²⁺ + His + KA

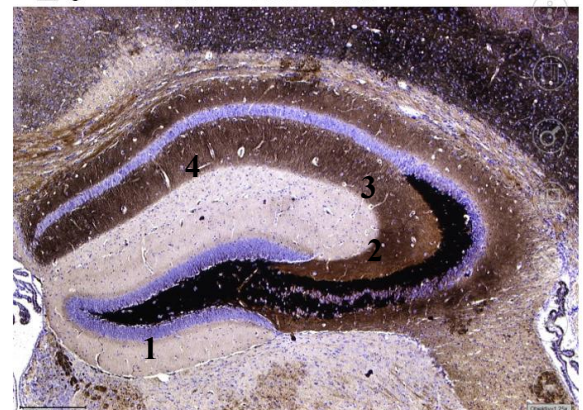


Abbildung 24: *Timm's Silbersulfid Färbung von Metallionen im Hippocampus mit Cresylviolett Gegenfärbung zur Visualisierung der Zellkerne. Paraffin Schnitte von Ca_v2.3(-/-)-Maushirnen. Übersicht über das Verteilungsmuster von Zink Ionen im Hippocampus. Kontrolle A, Histidin mit NaCl B, Zink mit Histidin und NaCl C, Kainat D, Histidin mit Kainat E, Zink Histidin mit Kainat F. 1. Gyrus dentatus CA4 Region, 2. CA3 Region, 3. CA2-Region, 4. CA1 Region.*

4 Diskussion

4.1 Implantation von Transmittern und Führungskanülen

In dieser Arbeit wurde eine Methode angewendet, bei der es möglich ist zuverlässig Metallionen ins Gehirn einzubringen. Für die direkte Zugabe von Metallionen wurden daher metallfreie Führungskanülen implantiert und als Applikationsweg in das Liquor System verwendet. Diese Methode erwies sich als zuverlässiger und reproduzierbarer als eine Injektion per Hand über die Rautengrube, welche auch eine mögliche Route darstellt, Substanzen in das Liquor System einzuführen.

Die erstellten Koordinaten sowie die einheitlichen metallfreien Führungs- und Injektionskanülen haben ebenfalls als Schlüsselfaktoren zu einer hohen Reproduzierbarkeit beigetragen. Zusätzlich konnte durch den Einsatz von metallfreien Führungskanülen, Verschlusskappen und Injektionskanülen eine mögliche Kontamination mit anderen Metallionen ausgeschlossen werden. Die im Zuge dieser Arbeit etablierte Operation, in der Transmitter und Kanülen gemeinsam in einem Operationsschritt implantiert wurden, verursachte keinerlei zusätzlichen Stress bei den Mäusen. Eine zweite Operation konnte dadurch vermieden werden und somit zusätzlicher Stress vermieden werden. Dadurch gab es auch eine immense Einsparung von Genesungszeit. Die zusätzliche Implantation der Kanülen verursachte bei den Versuchstieren keine zusätzlichen körperlichen Beeinträchtigungen, welche sich dadurch äußerte, dass alle Mäuse ihr normales Verhaltensspektrum nach der Operation zeigten. Auch eine verlängerte Genesungszeit konnte nicht beobachtet werden, da alle Tiere spätestens vier Tage nach der OP wieder vollständig genesen waren. Nach dieser Zeit hatten die meisten Mäuse ihr Initialgewicht wieder erreicht. Dadurch war es möglich bereits sieben Tage nach Einsetzen des Transmitters und der Kanüle Messungen vorzunehmen.

Es wurde in Betracht gezogen, die Metallionen Konzentration im Liquor vor und nach einem Experiment über die implantierten Kanülen zu entnehmen und fluorimetrisch die tatsächliche Konzentration zu bestimmen. Dadurch könnte man zusätzlich genauere Erkenntnisse über die Auswirkung multipler Injektionen auf die Metallionenkonzentration im Liquor gewinnen. Aus Zeitgründen war dieses Vorhaben leider nicht mehr umsetzbar und sollte in Zukunft durchgeführt werden.

Die hier verwendeten kabellosen Radio-Transmitter ermöglichen den Tieren, ihr natürliches Verhaltensspektrum ohne Einschränkungen auszuleben. Im Gegensatz zu einem Setup, indem die Tiere über Kabel an einen Messcomputer angeschlossen sind wird der Stresslevel somit

niedrig gehalten und gewährleistet zuverlässige und reelle Messergebnisse (Williams et al. 2006).

4.2 Sterberaten

Die Kainat Injektion führte bei einigen Versuchstieren während der Messperiode von 2 h des Experiments zum frühzeitigen Tod. Möglicherweise führte die intraperitoneale Injektion von Kainat zu einem bekannten Phänomen des plötzlich auftretenden Todes bei Epilepsie (sudden unexpected death in epilepsy = SUDEP) dazu, dass im Verlauf einer fortschreitenden degenerativen Kainat Wirkung im Gehirn respiratorische oder kardiale Mechanismen gestört werden und das zu einem Atemstillstand bei Mäusen führen kann (Inyushkin 2003).

4.3 Analyse von Hirnoberflächenableitungen

In dieser Arbeit wurden Ableitungen der Hirnaktivitäten von der Hirnoberfläche bei Mäusen gemessen und einzelne repräsentative Spuren (Abb. 11-14) gezeigt. Dabei ist erkennbar, dass in den Ableitungen der Kontrolltiere keine großen Potentialschwankungen oder spontane Spikes auftreten. Über die gesamte Messdauer werden Wellen mit niedriger Amplitude beobachtet. Im Gegensatz dazu haben die Ableitungen von Mäusen mit Kainat Injektion phasenweise ausgeprägte Potentialschwankungen mit mindestens der 2,5-fach höheren Amplituden. Dieses wurde in Ableitungen beider Genotypen beobachtet. Einzig auffällig in den Kainat-Gruppen war, dass Histidin sichtbar die Amplituden der Spikes im Gegensatz zu den anderen beiden Injektionsbedingungen nur im Wildtyp reduzierte (Abbildung 13 B). Das führt zu der Annahme, dass die Anfälle in dieser Gruppe milder waren und steht somit im Einklang mit dem reduzierten maximalen Seizure Score-Werten der Tiere in dieser Gruppe und kann auch die geringe Sterberate erklären. In KO-Mäusen waren Amplituden in allen 3 Kainat-Gruppen eher gleichbleibend (Abb.14 A-C). Daher liegt es nahe, dass auch der $Ca_v2.3$ Ca^{2+} -Kanal durch das applizierte Histidin direkt oder indirekt moduliert wird und somit für einen milderen Verlauf epileptischer Anfälle sorgt.

Die Auswertung erfolgte durch das Programm NeuroScore, wobei es unerlässlich ist, die jeweils aufgenommenen elektroenzephalographischen Spuren auch visuell zu begutachten, um im Vorfeld der automatischen Auswertung, die Qualität des gemessenen Elektroenzephalogramms einzusehen (Signal-Rausch-Verhältnis) und um auftretende Artefakte zu identifizieren und gegebenenfalls auszuschließen. Viele Artefakte können anhand eines

regelmäßig auftretenden Mustern (z. B. verursacht durch Herzschlag oder Atmung) klar unterschieden werden. Solche Artefakte können durch unzureichende Isolierung durch das Fixationszement, ein loses Kabel oder durch einen Riss in der Kabelummantelung entstehen. Daher ist eine sorgfältige Fixation der Elektroden, sowie auch vorsichtiger Umgang mit den Kabeln unumgänglich. Ein Vorteil bei der visuellen Einsicht von EEG-Spuren ist sicherlich die Erfahrung im Lesen und Interpretieren der Ableitungen, da bei steigender Erfahrung Artefakte klarer unterschieden werden können. Vorteilhaft für die visuelle Beurteilung ist die zeitgleiche Aufnahme eines Videos, um auftretende Ereignisse im EEG mit sichtbaren Verhaltensmustern wie z. B. exploratives Verhalten oder auftretende Automatismen in Verbindung zu bringen.

4.4 Leistungsspektraldichte

Für diese Arbeit wurde mit dem Programm NeuroScore die einzelnen Frequenzbanden aufgeschlüsselt und innerhalb der Gruppen miteinander verglichen.

In den Abbildungen 20 A - C sieht man, dass nur der Frequenzbereich von 8 - 12 Hz bei beiden Genotypen unter allen drei Injektionsbedingungen nach Kainat in gleicherweise beeinflusst wird. Die signifikante Reduktion der Alpha-Wellen deutet daher auf einen Kainat-induzierten Effekt hin, der nicht über den $Ca_v2.3 Ca^{2+}$ -Kanal mediiert wird und daher unabhängig vom $Ca_v2.3 Ca^{2+}$ -Kanal abläuft. Abbildung 20 C deutet außerdem darauf hin, dass auch Zink die Alpha-Wellen in Abhängigkeit vom R-Typ-Kanal beeinflusst. Dabei spielt es keine Rolle, ob Kainat zusätzlich injiziert wird oder nicht.

Der Delta-Wellen Bereich wird nach Kainat nur bei fehlendem R-Typ-Kanal signifikant verändert (Abb. 20 A und 20 C.). Dennoch gibt es hier einen Hinweis darauf, dass Histidin ebenfalls den Delta-Wellen Bereich im Wildtyp dahingehend verändert, dass durch die Abnahme der relativen Power nach Kainat, dieser Wellenbereich signifikant zum KO-Maus Typ verändert ist.

Die Power der Theta-Wellen reduziert sich im Wildtyp nach Kainat. Dieser Effekt verschwindet nach der Zugabe von Zink und scheint die reduzierende Wirkung von Kainat in diesem Wellenbereich über den R-Typ-Kanal abzuschwächen.

Histidin allein und mit Zink beeinflusst den Sigma-Wellen Bereich indem es die Wirkung von Kainat verstärkt. Die anfänglich geringe Reduzierung der Power in den Frequenzen 12 - 16 Hz in Abbildung 20 A nach Kainat im Wildtyp nimmt mit Histidin (Abb. 20 B) und mit Histidin in Kombination mit Zink (Abb. 20 C) immer weiter zu.

Während die Gamma-Wellen im KO-Maus Typ keine Veränderungen vorweisen, wird in $Ca_v2.3$ -kompetenten Mäusen dieser Frequenzbereich nach Kainat verstärkt. Die Zugabe von Histidin potenziert diesen Kainat-Effekt.

Der als Ripples bezeichnete Wellenbereich von 80 - 200 Hz wird im Zusammenhang mit epileptischen Ereignissen in Verbindung gebracht (Jacobs et al. 2008). Daher ist es eher verwunderlich, dass dieser Bereich nur bei der Wildtyp Gruppe B eine signifikante Veränderung unter Kainat vorweist. Die Sterberate ist in dieser Gruppe geringer als in den anderen Gruppen. Wieso gerade bei den Gruppen mit einer hohen Sterberate und intensiveren Anfällen die Ripples nicht signifikant verändert sind lässt sich daher nicht vollständig erklären. Jedoch könnte die Sterberate eine mögliche Erklärung zu diesem Widerspruch liegen: Da in den Gruppen A und C mehr Tiere vor Messende verstorben sind, fehlen hier Datenpunkte und maskieren somit die Anteile der Frequenzen aufgerechnet auf eine Gesamtmessdauer von 2 h. Es wurde in Abbildung 12 B deutlich, dass Histidin die Amplituden der Spikes im Wildtyp reduziert. Gleichzeitig erreichen weniger Mäuse in dieser Gruppe einen Score von mindestens 6 (Abbildung 15) bei einer geringen Sterberate ($n = 1$ je Genotyp). Somit stellen die Werte den realistischen Anteil des Frequenzbereichs der Ripples über die gesamte Messdauer dar.

4.5 Timm's Färbemethode zum Nachweis von Zink Ionen

Die Methode von Timm zum Nachweis und zur Lokalisation von Metallionen im Gewebe (hier Zink Ionen) wurde ausgewählt, um verlässliche Angaben über den Verbleib des applizierten Zinks oder des endogen enthaltenen, natürlich im Gewebe vorkommenden Zinks machen zu können. Die Moosfasern des Hippocampus enthalten sehr viele Zink Ionen, die mit dieser Methode nachgewiesen werden können. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unterlag aufgrund der großen Abhängigkeit von der Ausführung, Materialien, Temperatur der Lösungen großen Schwankungen. Jedoch kann mit einem ausgearbeiteten Protokoll und ausreichender Vorbereitung eine gute Reproduzierbarkeit gewährleistet werden. Das Protokoll wurde mehrmals geändert. Insbesondere Inkubationszeiten wurden variiert, um das bestmögliche Ergebnis zu erhalten. Eine große Herausforderung stellte auch die Abnahme der Färbeintensität nach dem „Eindeckeln“ dar, welche aber mit der Umstellung auf Eu Kitt behoben wurde und eine Abnahme der Färbeintensität nicht mehr beobachtet wurde.

Man muss hier bedenken, dass sich durch die Silber-Färbe-Methode nach Sulfid-Perfusion grundsätzlich alle Metalle im Gewebe nachweisen lassen. Es kann durch diese Methode aber nicht vollständig unterschieden werden, welches Metall gebunden und visualisiert wird. So

können zwar weitere Spurenmetalle wie Kupfer oder Nickel und auch giftige Metalle wie Quecksilber und Cadmium nachgewiesen werden (Danscher 1981a), dennoch geht man davon aus, dass durch diese Methode vesikuläres Zink und das sogenannte histochemisch reaktive Zink (loosely bound zinc) nachweisbar ist (Danscher und Stoltenberg 2006). Durch diese Methode erhält man einen Einblick über die Lokalisation und das Verteilungsmuster von Metallionen (Zink Ionen) im Gewebe und ihrer Funktion.

In den Abbildungen 21 – 24 werden Hirnschnitte der Versuchstiere aller Gruppen gezeigt. Man sieht, dass sich das Verteilungsmuster von Zink Ionen unter den verschiedenen Injektionsbedingungen verändert hat. Eine Kainat Injektion führte zu einer Intensivierung der Färbung, was darauf hindeutet, dass in diesen Bereichen vermehrt freies Zink vorhanden ist. Die einzige Ausnahme war im Wildtyp zu erkennen (Abbildung 21 E, 23 E). Hier konnte trotz Kainat Injektion kein freies Zink durch die AMG Methode nachgewiesen werden und hatte Ähnlichkeit mit der Färbung in Kontrolltieren. Das kann ein Indiz dafür sein, dass das applizierte Histidin, das durch Kainat freigesetztes Zink sofort gebunden hat und somit nicht mehr nachweisbar war. Möglicherweise wurde dadurch der zelltoxischen Wirkung einer hohen Zinkkonzentration entgegengewirkt.

Eine weitere Besonderheit fand sich in der Gruppe C im Wildtyp. In den Bildern 21 F und 23 F ist zu erkennen, dass im Hippocampus in der CA4 Region kein Zink nachgewiesen wurde. Zusätzlich zeigte sich nur noch eine schwächere Färbung in der CA1 Region. Wieso diese Effekte in dieser Gruppe in unterschiedlichen Teilen des Hippocampus beobachtet wurden lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht erklären und sollte näher untersucht werden.

4.6 Ca_v2.3 Calcium-Kanal, Histidin und Zink

Eine Reihe von Kanälen, unter anderem der Ca_v2.3 Ca²⁺-Kanal, die durch Zink beeinflusst werden, spielen in der Generierung von Anfällen und bei der Epilepsie eine Rolle. Dabei wurde in vielen Studien bereits gezeigt, dass eine Störung im Zinkhaushalt die Entstehung von epileptischen Anfällen begünstigen kann, da degenerierende Neuronen durch eine herabgesetzte Erregungsschwelle zusätzlich intrazelluläres Zink freisetzen (Takeda et al. 2003). Zunächst wirkt die Menge an ausgeschüttetem freiem Zink durch ihre inhibierende Wirkung auf (NMDA) Rezeptoren protektiv. Jedoch mit steigender Anzahl an geschädigten Neuronen und der immer höher steigenden Konzentration an freiem Zink, entfaltet Zink auch eine schädigende Wirkung. Das Verhältnis zu protektiver- zu schädigender Wirkung lässt sich leider durch die Multifunktionalität nicht genau erklären. Jedoch liefern die Ergebnisse dieser Arbeit einige Anhaltspunkte. In dieser Studie wurde Histidin als Vehikel verwendet, da es

dem Metallion auch als natürliches Transportprotein im Organismus dient. Die dabei beobachtete protektive Wirkung von Histidin ohne Zink nach Kainat könnte darauf zurückzuführen sein, dass der exzessiven Freisetzung von Zink nach Kainat Injektion (Takeda et al. 2003) durch zusätzlich vorhandenes Histidin entgegengewirkt wird. Dabei wird eventuell ein Überangebot an freiem Zink durch Histidin gebunden. Die freie Zinkkonzentration könnte dadurch in einer für Zellen nicht toxischen Konzentration gehalten werden. Diese Theorie erhärtet sich durch die gezeigten Experimente. Es konnte beobachtet werden, dass $Ca_v2.3$ -kompetente Mäuse aus Gruppe B nach Injektion von Histidin und Kainat im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen in Gruppe A weniger bzw. gar keine schweren Anfälle erlitten haben. Das zeigte sich zum einen daran, dass weniger Mäuse die höheren Stadien erreicht haben (Abbildung 15) und zum anderen an den reduzierten maximalen Mittelwerten in der Einstufungsskala für den Anfalls-Score (Abbildung 16). Dazu wurde die Sterberate bei WT-Mäusen drastisch reduziert (Abbildung 17). Zusätzlich wird die protektive Wirkung durch eine verkürzte Episodendauer verstärkt (Tabelle 6). An der Abnahme der absoluten Anzahl der Spike Episoden nach Histidin ist ebenfalls ein Protektiver Trend abzulesen. Ein weiteres Indiz findet sich im histologischen Nachweis. In Abbildung 21 und 23 D konnte nach Kainat Injektion kein Zink im Hippocampus nachgewiesen werden. Scheinbar ist das freigesetzte Zink komplett durch Histidin maskiert und somit nicht angefärbt. Bei der Histidin Kontrolle (Abbildungen 21 und 23 B und E) kann man vermuten, dass physiologische Konzentrationen von freiem Zink vermutlich sofort durch Histidin maskiert werden, andererseits kann man spekulieren, dass das meiste Zink nicht exzessiv freigesetzt und es dadurch zu keiner intensiven Färbereaktion kommt. Das fast identische Färbeergebnis der Timm-Färbung wie bei den Kontrollen ohne jegliche Injektion stellt offensichtlich andere endogene Zinkvorkommen dar (Abbildungen 21 und 23 A).

An den Ergebnissen in Gruppe C ist zu sehen, dass durch zusätzlich eingebrachtes Zink in Verbindung mit Histidin grundsätzlich ein intensives Färbesignal nach Timm's Methode erreicht wird. Dieses Zink scheint keine toxische Wirkung zu entfalten, da es nicht sofort freigegeben wird. Erst nach Zugabe von Kainat scheint das endogen freigesetzte Zink und das zusätzlich eingebrachte Zink eine Konzentration zu erreichen, die der in Gruppe A ähnlich ist. Die zelltoxische Wirkung der hohen physiologisch nicht mehr pufferbaren Zinkkonzentration hat dafür gesorgt, dass in dieser Gruppe die Sterberate wieder auf über 50 % angestiegen ist. Die Absolute Anzahl von Spike Episoden in dieser Gruppe erreichen ebenfalls fast die Werte der Gruppe A was ein weiterer Hinweis darauf sein könnte. Bei der Betrachtung des Gesamthirnschnittes fällt hier besonders die intensiveren ubiquitär verteilten, dunkler

gefärbten Bereiche auf, die eventuell eine global stärkere Freisetzung oder Anhäufung von freiem Zink bedeuten könnte verglichen mit Gruppe A nach KA. Auffällig ist hier jedoch, dass gerade im Hippocampus im Hilus des Gyrus Dentatus bzw. in der CA4 und im Unteren Teil des CA3 die Färbung verschwunden ist. Ob hier Zellen verstärkt zugrunde gegangen sind, Zink in diesem Bereich vermehrt durch Histidin gebunden oder umverteilt wurde lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht eindeutig klären und bedarf weiteren Untersuchungen.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der $Ca_v2.3$ -defizienten Mäuse kann man folgendes feststellen:

Die Injektion von 15 mg / kg führt auch in KO-Mäusen zum Status Epilepticus. Jedoch bestätigen sich in dieser Arbeit ebenfalls die Ergebnisse vergangener Experimente, dass $Ca_v2.3$ KO-Mäuse resistenter gegenüber den Konvulsionen auslösenden, schädigenden Wirkung von Kainat sind. Weniger KO-Mäuse erreichen höhere Anfallsstadien und weniger KO-Mäuse verstarben frühzeitig während des Experiments im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Während sich die Gesamtanzahl an Spike Episoden nicht wirklich unterscheidet, gibt es dennoch Unterschiede, die eventuell Einfluss auf die Sterberate haben könnte.

Zum einen war eine Episode signifikant kürzer als bei den Wildtyp-Mäusen in Gruppe A, wodurch die durchschnittliche Dauer einer Episode enorm verkürzt wurde. Die kürzeren Episoden enthielten dadurch signifikant weniger Spitzen, sodass man zu dem Ergebnis kommen kann, dass ein Anfall / Episode als weniger schlimm empfunden wurde oder die Anfälle nach außen hin weniger auffällig waren als bei einer lang anhalten Episode mit vielen Spikes (Spitzen). Die intracerebrale Injektion von Histidin hatte ebenfalls in den KO-Mäusen einen protektiven Effekt. Auch hier verstarben weniger Mäuse nach Kainat. Allerdings konnte man hier beobachten, dass die Zeit zum Erreichen von Anfallsstufe 6 oder 7 tendenziell viel größer war als in Gruppe A. In den NeuroScore Parametern liest sich ab, dass auch hier Kainat-bedingt die Gesamtdauer der Episoden sowie die Episodendauer erhöht ist, wobei auch die Anzahl der Spikes pro Episode zunimmt. Genotypische Unterschiede gab es in Gruppe B aber hinsichtlich der Färbung nach Timm. Hier zeigte sich, anders als bei Wildtyp nach Kainat, eine intensive dunkle Färbung als Nachweis massiver Freisetzung von Zink. Hier muss die Freisetzung über Kainat - Rezeptoren erfolgt sein. Jedoch scheint dieses Zink entweder viel länger im synaptischen Spalt zu verweilen, da durch das Fehlen von $Ca_v2.3$ Ca^{2+} -Kanälen eine eventuelle Signalweiterleitung verlangsamt wird, bzw. weniger Zink durch Kanäle in die nachfolgende postsynaptische Zelle gelangt. Es könnte so viel Zink freigesetzt worden sein, dass das injizierte Histidin nicht mehr in der Lage war alles abzupuffern (auch in

anderen Bereichen intensiver gefärbt) und dadurch in vielen Bereichen eine intensivere Färbung aufweist (Abbildungen 22 und 24 E).

In der letzten Gruppe konnte man beobachten, dass die Kombination aus Histidin und Zink in Abwesenheit des $\text{Ca}_v2.3 \text{ Ca}^{2+}$ -Kanals protektiv wirkt. Keine einzige Maus verstarb nach der Injektion von Kainat während der Messperiode. Die Anzahl der Mäuse, die einen Score von 6 oder 7 erreicht haben, hat sich in Bezug auf Gruppe A um die Hälfte reduziert (55 % vs. 27 %) bei gleichzeitiger Verdoppelung der Latenzzeit (16 min vs. 38 min). Die absolute Anzahl der Episoden war signifikant geringer als bei den Wildtyp-Mäusen der Gruppe und hatten signifikant kürzere Episodengesamtdauer. Auch die Anzahl der Spikes in den Episoden hatte sich verringert im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Erstaunlicherweise waren jedoch alle NeuroScore Parameter Kainat-bedingt verändert, vergleicht man sie mit ihren Zink-Histidin Kontrollen. Auch in den Frequenzbanden gab es hier die meisten signifikanten Kainat-bedingten Veränderungen bei den KO-Mäusen. Scheinbar müssen andere kompensatorische Mechanismen in Gang gesetzt worden sein, welche den globalen Anstieg / Anreicherung von Zink herbeigerufen haben könnte. Durch das Fehlen des $\text{Ca}_v2.3 \text{ Ca}^{2+}$ -Kanals fällt eine wichtige Route in die postsynaptischen Zellen weg. Somit entstand ein Überangebot an freiem Zink und wurde nicht sofort an Histidin gebunden, welches durch ein positives Färbeergebnis nach Timm zu sehen ist (Abbildungen 22 und 24 F).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine therapeutische Kombination aus Calcium-Kanal Blockern und die zusätzliche Gabe von Zink einen maximal positiven Effekt haben könnte.

4.7 Abschluss

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass intraperitoneal verabreichtes Kainat bei Wildtyp Mäusen schwerere Konvulsionen auslösen kann und dadurch mehr Mäuse einen Status Epilepticus mit Todesfolge erreichen als $\text{Ca}_v2.3$ KO-Mäuse. Es stellte sich heraus, dass die zusätzliche intracerebroventrikuläre Gabe von Histidin selbst eine protektive Wirkung bei der Kainat induzierten Epilepsie über den $\text{Ca}_v2.3 \text{ Ca}^{2+}$ -Kanal entfaltet. Möglicherweise wird aber auch das durch Kainat zusätzlich freigesetzte Zink durch Histidin cheliiert und es werden dadurch Folgeaktionen vermieden. Wieso die kombinierte Zugabe von Zink und Histidin bei intaktem $\text{Ca}_v2.3 \text{ Ca}^{2+}$ -Kanal einen verschlimmernden Effekt hatte, lässt sich nicht vollständig klären. Fest steht jedoch, dass die Aufrechterhaltung einer gesunden Homöostase essenziell für die Funktionalität vieler biologischer Prozesse ist. Möglicherweise spielen aber auch weitere Zink affine Kanäle, wie der $\text{Ca}_v3.2$ T-Typ Ca^{2+} -Kanal eine Rolle und sollten in

Zukunft weiter erforscht werden, um neue Therapieansätze im Kampf gegen neurodegenerative Erkrankungen wie Epilepsie zu finden.

Literaturverzeichnis

Alpdogan, Serdar; Neumaier, Felix; Dibué-Adjei, Maxine; Hescheler, Jürgen; Schneider, Toni (2019): Intracerebroventricular administration of histidine reduces kainic acid-induced convulsive seizures in mice. In: *Experimental brain research* 237 (10), S. 2481–2493. DOI: 10.1007/s00221-019-05605-z.

Alpdogan, Serdar; Neumaier, Felix; Hescheler, Jürgen; Albanna, Walid; Schneider, Toni (2020): Experimentally Induced Convulsive Seizures Are Modulated in Pat by Zinc Ions through the Pharmacoresistant Cav2.3 Calcium Channel. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2020 (54), S. 180–194.

Andersen, Per (2007): The hippocampus book. Oxford, New York: Oxford University Press.

Barnham, Kevin J.; Bush, Ashley I. (2008): Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. In: *Current opinion in chemical biology* 12 (2), S. 222–228. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.02.019.

Bedussi, Beatrice; van Lier, Monique G. J. T. B.; Bartstra, Jonas W.; Vos, Judith de; Siebes, Maria; VanBavel, Ed; Bakker, Erik N. T. P. (2015): Clearance from the mouse brain by convection of interstitial fluid towards the ventricular system. In: *Fluids and barriers of the CNS* 12, S. 23. DOI: 10.1186/s12987-015-0019-5.

Benkert, Julia; Hess, Simon; Roy, Shoumik; Beccano-Kelly, Dayne; Wiederspohn, Nicole; Duda, Johanna et al. (2019): Cav2.3 channels contribute to dopaminergic neuron loss in a model of Parkinson's disease. In: *Nature communications* 10 (1), S. 5094. DOI: 10.1038/s41467-019-12834-x.

Borman, Beatrice de; Lakaye, Bernard; Minet, Arlette; Zorzi, Willy; Vergnes. Marguerite; Marescaux, Christian; Grisar, Thierry (1999): Expression of mRNA encoding alpha1E and alpha1G subunit in the brain of a rat model of epilepsy²³. In: *NeuroReport* 1999 (10), S. 569–574.

Catterall, William A. (2000): Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels. In: *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000 (16), S. 521–555.

Catterall, William A.; Perez-Reyes, Edward; Snutch, Terrance P.; Striessnig, Joerg (2005): International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. In: *Pharmacological reviews* 57 (4), S. 411–425. DOI: 10.1124/pr.57.4.5.

Catterall, William A.; Wisedchaisri, Goragot; Zheng, Ning (2017): The chemical basis for electrical signaling. In: *Nature chemical biology* 13 (5), S. 455–463. DOI: 10.1038/nchembio.2353.

Danscher, Gorm (1981a): Histochemical demonstration of heavy metals. In: *Histochemistry* (71), S. 1–16.

Danscher, Gorm (1981b): Histochemical demonstration of heavy metals. In: *Histochemistry* (71), S. 1–16.

Danscher, Gorm; Stoltenberg, Meredin (2006): Silver enhancement of quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans, (2) in vivo, in vitro and immersion created zinc-sulphur/zinc-selenium nanocrystals, (3) metal ions liberated from metal implants and particles. In: *Progress in histochemistry and cytochemistry* 41 (2), S. 57–139. DOI: 10.1016/j.proghi.2006.06.001.

Danscher, Gorm.; Jensen, Knud Bjarne.; Frederickson, Christopher J.; Kemp, Kare.; Andreasen, Arne.; Juhl, Soren. et al. (1997): Increased amount of zinc in the hippocampus and amygdala of Alzheimers diseased brains. In: *Journal of Neuroscience Methods* (76), S. 53–59.

Dibué-Adjei, Maxine; Kamp, Marcel A.; Alpdogan, Serdar; Tevoufouet, Etienne E.; Neiss, Wolfram F.; Hescheler, Jürgen; Schneider, Toni (2017): Cav2.3 (R-Type) Calcium Channels are Critical for Mediating Anticonvulsive and Neuroprotective Properties of Lamotrigine In Vivo. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 44 (3), S. 935–947. DOI: 10.1159/000485361.

Domnguez, M.I; Blasco-Ibez, J.M; Crespo, C.; Marqus-Mar, A.I; Martnez-Guijarro, F.J (2003): Zinc chelation during non-lesioning overexcitation results in neuronal death in the mouse hippocampus. In: *Neuroscience* 116 (3), S. 791–806. DOI: 10.1016/S0306-4522(02)00731-5.

F. Timm (1958): Zur Histochemie der Schwermetalle Das Sulfid-Silberverfahren. In: *Deutsche Zeitschrift für gerichtliche Medizin* 1958 (46), S. 706–711.

Fisher, Robert S.; van Emde Boas, Walter; Blume, Warren; Elger, Christian; Genton, Pierre; Lee, Phillip; Engel, Jerome (2005): Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). In: *Epilepsia* 46 (4), S. 470–472. DOI: 10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x.

Frederickson, Christopher J.; Koh, Jae-Young; Bush, Ashley I. (2005): The neurobiology of zinc in health and disease. In: *Nature reviews. Neuroscience* 6 (6), S. 449–462. DOI: 10.1038/nrn1671.

G Danscher and B Møller-Madsen (1985): Silver amplification of mercury sulfide and selenide: a histochemical method for light and electron microscopic localization of mercury in tissue. In: *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (33), S. 219–228.

Gasparini, Sonia; Kasyanov, Alexander M.; Pietrobon, Daniela; Voronin, Leon L.; Cherubini, Enrico (2001): Presynaptic R-Type Calcium Channels Contribute to Fast Excitatory Synaptic Transmission in the Rat Hippocampus 2001 (21), S. 8715–8721.

Grabrucker, Andreas M.; Rowan, Magali; and Garner, Craig C. (2011): Brain delivery of Zinc ions a sPotential treatment for neurological diseases. In: *Drug Delivery Letter* 2011 (1), S. 13–23.

Helbig, Katherine L.; Lauerer, Robert J.; Bahr, Jacqueline C.; Souza, Ivana A.; Myers, Candace T.; Uysal, Betül et al. (2018): De Novo Pathogenic Variants in CACNA1E Cause Developmental and Epileptic Encephalopathy with Contractures, Macrocephaly, and Dyskinesias. In: *American journal of human genetics* 103 (5), S. 666–678. DOI: 10.1016/j.ajhg.2018.09.006.

Helbig, Katherine L.; Lauerer, Robert J.; Bahr, Jacqueline C.; Souza, Ivana A.; Myers, Candace T.; Uysal, Betül et al. (2019): De Novo Pathogenic Variants in CACNA1E Cause Developmental and Epileptic Encephalopathy with Contractures, Macrocephaly, and Dyskinesias. In: *American journal of human genetics* 104 (3), S. 562. DOI: 10.1016/j.ajhg.2019.02.015.

Holm, Ida E.; Geneser, Finn A. (1989): Histochemical demonstration of zinc in the hippocampal region of the domestic pig: I. Entorhinal area, parasubiculum, and presubiculum. In: *The Journal of comparative Neurology* (287), S. 145–163, zuletzt geprüft am 14.08.2019.

Inyushkin, A. N. (2003): Comparative Characteristics of Respiratory Pattern Responses to Microinjection of Kainic Acid into Different Parts of the Nucleus Ambiguus. In: *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 2001 (33), S. 914–924.

Jacobs, Julia; LeVan, Pierre; Chander, Rahul; Hall, Jeffery; Dubeau, François; Gotman, Jean (2008): Interictal high-frequency oscillations (80-500 Hz) are an indicator of seizure onset areas independent of spikes in the human epileptic brain. In: *Epilepsia* 49 (11), S. 1893–1907. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2008.01656.x.

Jing, Xingjun (2005): CaV2.3 calcium channels control second-phase insulin release. In: *J. Clin. Invest.* 115 (1), S. 146–154. DOI: 10.1172/JCI200522518.

Kimm, Tilia; Bean, Bruce P. (2014): Inhibition of A-type potassium current by the peptide toxin SNX-482. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (28), S. 9182–9189. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0339-14.2014.

Mathie, Alistair; Sutton, Gemma L.; Clarke, Catherine E.; Veale, Emma L. (2006): Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. In: *Pharmacology & therapeutics* 111 (3), S. 567–583. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2005.11.004.

Morrison, Richard S. (1996): Loss of p53 Tumor Suppressor Gene protects Neurons from Kainate-induced Cell Death. In: *The Journal of Neuroscience* 1996 (16(4)), S. 1337–1345.

Morrison, Richard S.; Wenzel, H. Jurgen; Kinoshita, Yoshito; Robbins, Carol A.; Donehower, Larry A.; Schwartzkroin, Phillip A. (1996): Loss of p53 Tumor Suppressor Gene protects Neurons from Kainate-induced Cell Death. In: *The Journal of Neuroscience* 1996 (16(4)), S. 1337–1345.

Myoga, Michael H.; Regehr, Wade G. (2011): Calcium microdomains near R-type calcium channels control the induction of presynaptic long-term potentiation at parallel fiber to purkinje cell synapses. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (14), S. 5235–5243. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5252-10.2011.

Nanou, Evanthia; Catterall, William A. (2018): Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. In: *Neuron* 98 (3), S. 466–481. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.03.017.

Neumaier, F.; Alpdogan, S.; Hescheler, J.; Schneider, T. (2018a): A practical guide to the preparation and use of metal ion-buffered systems for physiological research. In: *Acta physiologica (Oxford, England)* 222 (3). DOI: 10.1111/apha.12988.

Neumaier, Felix; Akhtar-Schäfer, Isha; Lüke, Jan Niklas; Dibué-Adjei, Maxine; Hescheler, Jürgen; Schneider, Toni (2018b): Reciprocal modulation of Cav 2.3 voltage-gated calcium channels by copper(II) ions and kainic acid. In: *Journal of neurochemistry* 147 (3), S. 310–322. DOI: 10.1111/jnc.14546.

Neumaier, Felix; Dibué-Adjei, Maxine; Hescheler, Jürgen; Schneider, Toni (2015): Voltage-gated calcium channels: Determinants of channel function and modulation by inorganic cations. In: *Progress in neurobiology* 129, S. 1–36. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2014.12.003.

Newcomb, R.; Szoke, B.; Palma, A.; Wang, G.; Chen, X. h.; Hopkins, W. et al. (1998): Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. In: *Biochemistry* 37 (44), S. 15353–15362. DOI: 10.1021/bi981255g.

Osredkar, Josko; Sustar, Natasa (2011): Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. In: *J Clin Toxicol* s3 (01). DOI: 10.4172/2161-0495.S3-001.

Paxinos, George; Franklin, Keith B. J. (2004): The mouse brain in stereotaxic coordinates. Compact 2. ed. Amsterdam: Elsevier Acad. Press. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/description/els041/2003113435.html>.

Pereverzev, Alexey; Mikhna, Marina; Vajna, Rolf; Gissel, Cornelia; Henry, Margit; Weiergräber, Marco et al. (2002): Disturbances in Glucose-Tolerance, Insulin-Release and Stress/Induced Hyperglycemia upon Disruption of the Cav2.3 (alpha 1E) Subunit of Voltage/Gated Ca²⁺ Channels. Disturbances in Glucose-Tolerance, Insulin-Release and Stress/Induced Hyperglycemia upon Disruption of the Cav2.3 (alpha 1E) Subunit of Voltage/Gated Ca²⁺ Channels. In: *Molecular Endocrinology* (16), S. 884–895.

Pereverzev, Alexey; Salehi, Albert; Mikhna, Marina; Renström, Erik; Hescheler, Jürgen; Weiergräber, Marco et al. (2005): The ablation of the Ca(v)2.3/E-type voltage-gated Ca²⁺

channel causes a mild phenotype despite an altered glucose induced glucagon response in isolated islets of Langerhans. In: *European journal of pharmacology* 511 (1), S. 65–72. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.01.044.

Pringos, Emilie; Vignes, Michel; Martinez, Jean; Rolland, Valerie (2011): Peptide neurotoxins that affect voltage-gated calcium channels: a close-up on ω -agatoxins. In: *Toxins* 3 (1), S. 17–42. DOI: 10.3390/toxins3010017.

Ricoy, Ulises M.; Frerking, Matthew E. (2014): Distinct roles for Cav2.1-2.3 in activity-dependent synaptic dynamics. In: *Journal of neurophysiology* 111 (12), S. 2404–2413. DOI: 10.1152/jn.00335.2013.

Robert S. Sloviter (1982): A Simplified Timm Stain Procedure Compatible with Formaldehyde Fixation and Routine Paraffin Embedding of Rat Brain. In: *Brain Research Bulletin* (8), S. 771–774.

Saegusa, Hironao.; Yoshihiro Matsuda; Tsutomu Tanabe (2002): Effects of ablation of N- and R-Type Ca²⁺-Channels on Pain transmission. In: *Neuroscience Research* 2002 (43), S. 1–7.

Shcheglovitov, Aleksandr; Vitko, Iuliia; Lazarenko, Roman M.; Orestes, Peihan; Todorovic, Slobodan M.; Perez-Reyes, Edward (2012): Molecular and biophysical basis of glutamate and trace metal modulation of voltage-gated Ca(v)2.3 calcium channels. In: *The Journal of general physiology* 139 (3), S. 219–234. DOI: 10.1085/jgp.201110699.

Sochivko, Dmitry; Pereverzev, Alexey; Smyth, Neil; Gissel, Cornelia; Schneider, Toni; Beck, Heinz (2002): The Ca(V)2.3 Ca(2+) channel subunit contributes to R-type Ca(2+) currents in murine hippocampal and neocortical neurones. In: *The Journal of physiology* 542 (Pt 3), S. 699–710. DOI: 10.1113/jphysiol.2002.020677.

Soong, T. W.; Stea, A.; Hodson, C. D.; Dubel, S. J.; Vincent, S. R.; Snutch, T. P. (1993): Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. In: *Science (New York, N.Y.)* 260 (5111), S. 1133–1136. DOI: 10.1126/science.8388125.

Stephen, Linda J.; Brodie, Martin J. (2020): Pharmacological Management of the Genetic Generalised Epilepsies in Adolescents and Adults. In: *CNS drugs*. DOI: 10.1007/s40263-020-00698-5.

Striessnig, Jörg; Bolz, Hanno Jörn; Koschak, Alexandra (2010): Channelopathies in Cav1.1, Cav1.3, and Cav1.4 voltage-gated L-type Ca²⁺ channels. In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 460 (2), S. 361–374. DOI: 10.1007/s00424-010-0800-x.

Suzuki, Toshimitsu; Delgado-Escueta, Antonio V.; Aguan, Kripamoy; Alonso, Maria E.; Shi, Jun; Hara, Yuji et al. (2004): Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. In: *Nature genetics* 36 (8), S. 842–849. DOI: 10.1038/ng1393.

Takeda, Atsushi; Hirate, Maki; Tamano, Haruna; Oku, Naoto (2003): Zinc movement in the brain under kainate-induced seizures. In: *Epilepsy Research* 54 (2-3), S. 123–129. DOI: 10.1016/S0920-1211(03)00063-9.

Takeda, Atsushi; Tamano, Haruna; Oku, Naoto (2005): Involvement of unusual glutamate release in kainate-induced seizures in zinc-deficient adult rats. In: *Epilepsy Research* 66 (1-3), S. 137–143. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2005.07.011.

Weiergräber, M.; Hescheler, J.; Schneider, T. (2008): Kalziumkanalopathien des Menschen. Spannungsgesteuerte Ca(2+)-Kanäle in Ätiologie, Pathogenese und Pharmakotherapie neurologischer Krankheitsbilder. In: *Der Nervenarzt* 79 (4), S. 426–436. DOI: 10.1007/s00115-007-2398-6.

Weiergräber, Marco; Henry, Margit; Radhakrishnan, Kayalvizhi; Hescheler, Jürgen; Schneider, Toni (2007): Hippocampal seizure resistance and reduced neuronal excitotoxicity in mice lacking the Cav2.3 E/R-type voltage-gated calcium channel. In: *Journal of neurophysiology* 97 (5), S. 3660–3669. DOI: 10.1152/jn.01193.2006.

Weiergräber, Marco; Kamp, Marcel A.; Radhakrishnan, Kayalvizhi; Hescheler, Jürgen; Schneider, Toni (2006): The Ca(v)2.3 voltage-gated calcium channel in epileptogenesis--shedding new light on an enigmatic channel. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 30 (8), S. 1122–1144. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2006.07.004.

Wiebe Samuel; Blume Warren T.; Girvin John P.; Eliasziw Michael (2001): A Randomized, Controlled Trial of Surgery for Temporal-Lobe Epilepsy. In: *The new England Journal of medicine*, S. 313–318.

Williams, Philip; White, Andrew; Ferraro, Damien; Clark, Suzanne; Staley, Kevin; Dudek, F. Edward (2006): The use of radiotelemetry to evaluate electrographic seizures in rats with

kainate-induced epilepsy. In: *Journal of Neuroscience Methods* 155 (1), S. 39–48. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2005.12.035.

Zamponi, Gerald W.; Striessnig, Joerg; Koschak, Alexandra; Dolphin, Annette C. (2015): The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. In: *Pharmacological reviews* 67 (4), S. 821–870. DOI: 10.1124/pr.114.009654.

Anhang

Lebenslauf

Serdar Alpdogan

Adresse: An der Thomaskirche 23, 40470 Düsseldorf
Geburtsdatum: 09. April 1980 in Hilden
Nationalität: Deutsch
Telefon: +49 1731534011
Email: s_alpdogan@hotmail.com

Werdegang

09/2015 – Gegenwart	Promotion Dr. rer. nat. Universität zu Köln, Institut für Neurophysiologie,
04/2012 – 09/2015	M.Sc. in klinische und experimentelle Neurowissenschaften Universität zu Köln
01/2013 – 06/2013	Austausch Programm Dalhousie University in Halifax, NS, Canada Department of Anatomy & Neurobiology, AG Dr. S. Darvesh and Department of Psychology & Neurobiology AG Dr. R. Brown
04/2010 – 09/2011	B.Sc. in Neurowissenschaften Universität zu Köln
10/2009 – 04/2009	B.Sc. in medizinischer Physik Heinrich Heine Universität Düsseldorf
04/2002 – 08/2008	Studium der Zahnmedizin Justus-Liebig Universität Giessen
08/1996 – 07/1999	Abitur Helmholtz-Gymnasium, Hilden

Publikationen

Dibué M, Tevoufouet EE, Neumaier F, Krieger A, Kiel A, Evdokimov D, Galetin T, **Alpdogan S.**, Akhtar I, Scharf S, Clemens R, Radhakrishnan K, Hescheler J, Schneider T and Kamp MA (2013) Protein Interaction Partners of Cav 2.3 R-Type Voltage-Gated Calcium Channels. (Stephens GJ, Mochida S eds; Basel Switzerland: MDPI), *Pharmaceuticals* 6: 151-174

Alpdogan, S., Tevoufouet E.E., Dibué, M., Hescheler, J., Schneider, T., The expression of amyloid precursor protein (APP) changes after kainite injection in Cav2.3 competent mice differently compared to Cav2.3- deficient mice. submitted

Albanna, W., Lueke, J. N., Sjapic, V., Kotliar, K., Hescheler, J., Clusmann, H., Sjapic S., **Alpdogan S.**, Schneider T., Schubert G.A. & Neumaier, F. (2017). Electroretinographic Assessment of Inner Retinal Signaling in the Isolated and Superfused Murine Retina. *Current Eye Research*, 42(11), 1518–1526. <http://doi.org/10.1080/02713683.2017.1339807>

Dibué-Adjei, M., Kamp, M. A., **Alpdogan, S.**, Tevoufouet, E. E., Neiss, W. F., Hescheler, J., & Schneider, T. (2017). Cav2.3 (R-Type) Calcium Channels are Critical for Mediating Anticonvulsive and Neuroprotective Properties of Lamotrigine In Vivo. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 935–947. <http://doi.org/10.1159/000485361>

Neumaier, F., Paterno, M., **Alpdogan, S.**, Tevoufouet, E.E., Schneider, T., (2017). iLiterature Review Surgical Approaches in Psychiatry: A Survey of the World Literature on Psychosurgery. *World Neurosurg.* (2017) 97:603-634. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2016.10.008>

Neumaier, F., **Alpdogan, S.**, Hescheler, J., & Schneider, T. (2017). A practical guide to the preparation and use of metal ion-buffered systems for physiological research. *Acta Physiologica*, (October). <http://doi.org/10.1111/apha.12988>

Neumaier F., **Alpdogan S.**, Hescheler J., Schneider T. (2018). Protein phosphorylation maintains the normal function of cloned human Cav2.3 channels. *J Gen Physiol.* 2018 Feb 16. doi: 10.1085

Schneider, T., **Alpdogan, S.**, Hescheler, J., & Neumaier, F. (2018). In vitro and in vivo phosphorylation of the Cav 2.3 voltage-gated R-type calcium channel. *Channels*, 0(0), 19336950.2018.1516984. <http://doi.org/10.1080/19336950.2018.1516984>

Albanna, W., Lüke, J.N., **Alpdogan, S.**, Conzen, C., Weiss, M., Hescheler, J., Clusmann, H., & Lüke, M., Schubert, G. A. and Schneider, T. (2018). Selected aspects of retinal signaling and energy metabolism and its perspective as a cerebral surrogate model, 4(2), 1–6. <http://doi.org/10.15761/NFO.1000198>

Albanna W., Kotliar K., Lüke J.N., **Alpdogan S.**, Conzen C., et al. (2018) Non-invasive evaluation of neurovascular coupling in the murine retina by dynamic retinal vessel analysis. PLOS ONE 13(10): e0204689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204689>

Alpdogan, S., Neumaier, F., Dibué, M., Hescheler, J., & Schneider, T. (2019). Intracerebroventricular administration of histidine reduces kainic acid - induced convulsive seizures in mice. *Experimental Brain Research*, (0123456789). <http://doi.org/10.1007/s00221-019-05605-z>

Alpdogan, S., Neumaier, F., Hescheler, J., Albanna, W., Schneider, T. (2020). Experimentally Induced Convulsive Seizures Are Modulated in Part by Zinc Ions through the Pharmacoresistant Cav2.3 Calcium Channel. *Cell Physiol Biochem* (2020).54:180-194 DOI:10.33594/000000313

Schneider, T., Neumaier, F., Hescheler, J., **Alpdogan, S.**, Understanding the de novo mutations of CACNA1E (Cav2.3) in humans. submitted

Neumaier, F., Alpdogan, S., Hescheler, J. and Schneider, T.; (2020) Zn²⁺-induced changes in Cav2.3 channel function: An electrophysiological and modeling study." *J. Gen. Physiology*,doi: 10.1085/jgp.202012585

Lüke, J.N., Neumaier, F., Alpdogan, S., Hescheler, J., Schneider, T., Albanna, W. and Akhtar-Schäfer, I.(2020) Submicromolar copper (II) ions stimulate transretinal signaling in the isolated retina from wild type but not from Cav2.3-deficient mice. *BMC Ophthalmology*, in press.

Schneider, T., Neumaier, F., Hescheler, J., Alpdogan, S., (2020) Cav2.3 R-type calcium channels: from its discovery to pathogenic de novo CACNA1E variants: a historical perspective. *Pflügers Archive European J. Physiology*, 2020, DOI 10.1007/s00424-020-02395-0

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle einen Dank aussprechen an Herrn Professor Dr. Toni Schneider für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit. Seine Förderung, Aufgeschlossenheit gegenüber neuen Ideen und konstruktiven Kritiken haben mir in all den Jahren stets Kraft und Zuversicht gegeben weiterzumachen.

Herrn Professor Dr. Jürgen Hescheler danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten im Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Schneider (Felix Neumaier, Etienne E. Tevoufouet, Renate Clemens, Walid Albanna) für das freundliche Arbeitsklima in all den Jahren. Besonderen Dank gilt dabei Felix, der mit mir durch diese Zeit gegangen ist und mit Rat und Tat zur Seite stand.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

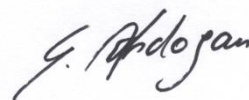
Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. rer. nat. Toni Schneider betreut worden.

Publikation 1:

Alpdogan, Serdar; Neumaier, Felix; Dibué-Adjei, Maxine; Hescheler, Jürgen; Schneider, Toni (2019): Intracerebroventricular administration of histidine reduces kainic acid-induced convulsive seizures in mice. In: *Experimental brain research* 237 (10), S. 2481–2493. DOI: 10.1007/s00221-019-05605-z.

Publikation 2:

Alpdogan, Serdar; Neumaier, Felix; Hescheler, Jürgen; Albanna, Walid; Schneider, Toni (2020): Experimentally Induced Convulsive Seizures Are Modulated in Pat by Zinc Ions through the Pharmacoresistant Cav2.3 Calcium Channel. In: *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2020 (54), S. 180–194.



Serdar Alpdogan

Köln, den 23.03.2020