

Aus der Neurologischen Klinik der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Peter Hartung

**GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation
in der Umgebung ibotensäureinduzierter
kortikaler Dysgenesien**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Stephan Clasen

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Otto W. Witte
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	
1.1 Geschichte der Epilepsie	1
1.2 Kortikale Dysgenesien	2
1.2.1 Zu kortikalen Dysgenesien assoziierte Krankheitsbilder	2
1.2.2 Klassifikation kortikaler Dysgenesien	3
1.2.3 Entstehung kortikaler Dysgenesien	3
1.2.3.1 Regulation der Kortextentwicklung	3
1.2.3.2 Exogene Ursachen	4
1.2.3.3 Genetische Ursachen	5
1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	7
1.3.1 Pathophysiologie der zu kortikalen Dysgenesien assoziierten Epilepsie	7
1.3.2 GABA _A Rezeptoruntereinheiten und deren pharmakologische Implikationen	8
2 Material und Methoden	
2.1 Versuchstiere	9
2.2 Anästhesie	9
2.3 Induktion der Dysplasie	10
2.4 Transkardiale Perfusion	11
2.5 Hirnentnahme und Kryoprotektion	11
2.6 Gewebepreparation für Immunhistochemie	11
2.6.1 Mikrowellen-Behandlung	11
2.6.2 Anfertigung der Hirnschnitte	11
2.6.3 Auswahl und Vorbehandlung der Schnitte	12
2.7 Immunhistochemie	12
2.7.1 Spezifität der verwendeten Antikörper	12
2.7.2 Inkubation mit Primärantikörper	12
2.7.3 Inkubation im Sekundärantikörper	13
2.7.4 Detektion	13
2.8 Histologie	14
2.9 Lösungen	14
2.10 Digitale Datenauswertung	15
2.11 Statistische Auswertung	17
3 Ergebnisse	
3.1 Morphologie der Malformationen	18
3.2 Verteilungsmuster der GABA _A Rezeptoruntereinheiten bei Kontroll-Tieren	19
3.3 Ergebnisse in der Untersuchungsgruppe: fokale kortikale Dysplasie	21
3.3.1 Arealspezifische Auswertung der GABA _A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung in der Umgebung fokaler kortikaler Dysplasien	21
3.3.2 GABA _A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung im Areal der fokalen kortikalen Dysplasie	27
3.3.3 Vergleich der GABA _A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung ektopter Zellpopulationen mit neokortikaler laminärer Verteilung	29
3.4 Ergebnisse in der Untersuchungsgruppe: subkortikale Heterotopie	31
3.4.1 Arealspezifische Auswertung der GABA _A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung in der Umgebung subkortikaler Heterotopien	31
3.4.2 GABA _A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung im Bereich subkortikaler Heterotopien	35

3.4.3	Vergleich der GABA _A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung subkortikaler Zellpopulationen mit neokortikaler laminärer Verteilung	38
3.5	Veränderungen im Bereich dysmorpher Hemisphären	39
4	Diskussion	
4.1	Tiermodelle und deren Bedeutung für die Erforschung der zu kortikalen Dysgenesien assoziierten Epilepsie	40
4.2	Diskussion der Methoden	43
4.2.1	Diskussion des Ibotensäure-Tiermodells	43
4.2.2	Diskussion der Immunhistochemie	48
4.2.2.1	Verfahren der immunhistochemischen Darstellung	48
4.2.2.2	Aussagekraft der verwendeten Immunhistochemie	50
4.2.3	Diskussion der Auswertung	51
4.3	Diskussion der Ergebnisse	54
4.3.1	Diskussion der Ergebnisse in der Untersuchungsgruppe: fokale kortikale Dysplasie	54
4.3.1.1	Weitreichende Veränderungen der GABA _A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung in der Umgebung fokaler kortikaler Dysplasien	54
4.3.1.2	Auswirkung der GABA _A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation auf GABA _A Rezeptor-Anzahl und Untereinheiten-Komposition	56
4.3.1.3	Vergleich zu GABA _A Rezeptor-Veränderungen im Gefrier-Läsion Tiermodell	56
4.3.1.4	Funktionelle Konsequenzen der GABA _A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation	58
4.3.1.5	Weitere Einflußgrößen der GABAergen Inhibition	58
4.3.1.6	Zusammenhang zwischen Modifikationen des GABAergen Systems und assoziierter Hyperexzitabilität	61
4.3.1.7	Zusätzliche pathophysiologische Veränderungen	61
4.3.1.8	Schwerpunkt der GABA _A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation im Areal der fokalen kortikalen Dysplasie betrifft die oberen Kortexschichten	63
4.3.1.9	Ektopien besitzen GABA _A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung entsprechend ihrer physiologischen Zielposition in den oberen Kortexschichten	64
4.3.1.10	Klinische Relevanz der Befunde bei fokalen kortikalen Dysplasien	65
4.3.2	Diskussion der Ergebnisse in der Untersuchungsgruppe: subkortikale Heterotopie	68
4.3.2.1	Morphologische Veränderungen im die subkortikalen Heterotopien bedeckenden Neokortex	68
4.3.2.2	Veränderungen der GABA _A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung in der Umgebung subkortikaler Heterotopien	69
4.3.2.3	Vergleich morphologischer und funktioneller Befunde im Ibotensäure- und MAM-Tiermodell	71
4.3.2.4	GABA _A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung subkortikaler Heterotopien	72
4.3.2.5	Klinische Relevanz der Befunde bei subkortikalen Heterotopien	74
5	Literaturverzeichnis	76

Abkürzungen

4-AP	4 Aminopyridin
A	Avidin
AIS	Axon-initiales-Segment
AK	Antikörper
AMPA	DL-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalone propionic acid
AP	Aktionspotential
AP7	DL-2-amino-7-phosphonoheptanoic
ApoE2	Apolipoprotein E2
AS	Aminosäure
B	Biotin
BCNU	1-3-bis-chlorethyl-nitrosurea
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BMI	bicuculline methiodide
BPP	bilateral perisylvian polymicrogyria
BFPP	bilateral frontoparietal polymicrogyria
BZ	Benzodiazepin
CB	Calbindin
CBP	Calcium bindende Proteine
CCD	charge-coupled device
cdk5	cyclin dependent kinase 5
cDNA	cellular deoxyribonucleic acid
CLO	Cobblestone lissencephaly only syndrome
CR	Calretinin
Da	Dalton
DAB	3,3 Diaminobenzidin
E	embryonaler Tag
ECoG	Elektrokortikographie
EEG	Elektroenzephalogramm
EGF	epidermal growth factor
eIPSP	evozierte inhibitorische postsynaptische Potentiale
Fc	fragment crystalline
FCD	focal cortical dysplasia
FCMD	Fukuyama-congenital-muscular-Dystrophy
FL	forelimb area
Fr	frontal cortex
Fr1	frontal cortex area 1 = primary motor cortex
Fr2	frontal cortex area 2
GABA	γ -aminobutyric-acid
HL	hindlimb area
IgG	Immunglobulin G
ILS	isolierte Lissenzephalie
K-S-Test	Kolmogorov und Smirnov Test
kDa	kilo Dalton
L-AP3	L(+)-2-amino-3-phosphonopropionic
LCH	lissenzephalie with cerebella hypoplasia
MAM	Methylazoxymethanol Azetat
MAP	microtubule associated protein
MAP-2	microtubule-associated protein type 2

mDab1	murine homolog of Drosophila diasabeld
MDS	Miller-Dieker Syndrom
MEB	Muscle-Eye-Brain Disease
MEG	Magnetenzephalographie
mIPSP	miniatur inhibitorische postsynaptische Potentiale
MK-801	dizocilpine
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
NGF	nerve growth factor
NGS	normal goat serum
NMDA	N-methyl-D-aspartate
P	postnataler Tag
PAF	platelet activating factor
PAFAH	platelet activating factor acetylhydrolase
Par1	primärer somatosensorischer Kortex
Par2	supplementärer somatosensorischer Kortex
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatgepufferte Normalsalzlösung
PET	Positronenemissionstomographie
pH	pondus hydrogenii
p. m.	post menstruationem
PNH	periventrikuläre noduläre Heterotopie
PV	Parvalbumin
PVL	perivenntricular leukomalacia
rpm	row per minute
SEEG	Stereoelektroenzephalographie
SHAM	schein-operiert
sIPSP	spontane inhibitorische postsynaptische Potentiale
SPECT	Single-Photon-Emissionscomputertomographie
TBS	trizma bufferd saline
tish	telencephalic internal structural heterotopia
TSC	tuberous sclerosis complex
TTFC	Taylor type focal cortical dysplasia
VIP	vasoactive intestinal peptide
VLDL	very low density lipoprotein
WWS	Walker-Warburg Syndrom
XLAG	X-linked lissencephaly and ambiguous genitalia

1.1 Geschichte der Epilepsie

Die Epilepsie ist eine sehr häufige und ubiquitäre Krankheit, deren Erscheinungsformen von jeher die Aufmerksamkeit von Wissenschaftlern und Laien auf sich gezogen haben (Schneble 1987). Im Buch von Schneble (1987) – Krankheit der ungezählten Namen – werden über 800 Bezeichnungen für Epilepsie aufgeführt. Je nach religiöser und sozialer Einstellung der Bevölkerung wechselte der Stellenwert der Krankheit von der „Krankheit der Götter“ über „Die Heilige Krankheit“ bis zur „Bösen Seuche“ und damit jeweils die soziale Stellung der Epileptiker. Einmal sah man darin eine Auszeichnung, einmal eine Bestrafung des Betroffenen (Pies 1990). Das erste schriftliche Dokument über die Epilepsie findet sich in dem Gesetzkodex des Königs Hammurabi (1728 – 1686 v. Chr.), in dem es heißt: „Wenn jemand einen Sklaven oder eine Sklavin kauft und vor Ablauf eines Monats die bēnu-Krankheit sie befällt, soll er sie dem Verkäufer zurückgeben und der Käufer das Silber, das er gezahlt, zurückerhalten.“. Dabei ist die Übersetzung des Ausdruckes „bēnu-Krankheit“ mit Epilepsie hinreichend gesichert (Schneble 1987). Um das 7. bis 6. vorchristliche Jahrhundert begann eine zunehmend „naturalistische“ Betrachtungsweise der Medizin, die bis dahin vorherrschenden mystisch-religiösen Anschauungen über Krankheiten abzulösen (Schneble 1987). Von Hippokrates (460 – ca. 375 v. Chr.) stammt die erste Monographie über Epilepsie. In seiner Abhandlung „Über die heilige Krankheit“ heißt es: „Mit der sogenannten heiligen Krankheit (hiēra nosos) verhält es sich folgendermaßen: Um nichts halte ich sie für göttlicher als die anderen Krankheiten oder für heiliger, sondern sie hat eine natürliche Ursache wie die übrigen Krankheiten, aus der sie entsteht.“ (Heintel 1975). Bemerkenswerterweise heißt es weiter: „In Wirklichkeit aber ist das Gehirn schuld an diesem Leiden...“. Die differenzierten Erscheinungen epileptischer Anfälle setzt Hippokrates dabei in zeitliche und anatomische Beziehung zu einem vom Kopf ausgehenden Phlegma-Abfluß (Heintel 1975). Dieser Ansatz einer rationalen Betrachtungsweise findet in der römischen Medizin ihre Fortsetzung. Galen (129 – 199) teilt die Auffassung, daß der „morbus sacer“ eine Erkrankung des Gehirns ist. Dabei ist das Gehirn unmittelbar Ausgangspunkt der Epilepsie oder die Erkrankung nimmt in einem beliebigen Körperteil ihren Anfang und zieht dann in einer dem Kranken als kalter Lufthauch (Aura) fühlbaren Weise zum Kopf hoch (Heintel 1975). Avicenna (980 – 1037), der bekannteste Vertreter der arabischen Medizin, verband die Lehren der Hippokratiker mit denen Galens in seinem Werk „Canon medicinae“ (Schneble 1990; Heintel 1975). Den Ursprung der Epilepsie lokalisiert er ebenfalls im Gehirn und vermutet „einen Krampf in den Hirnventrikeln und den Ursprüngen der Nerven“ (Heintel 1975). Zur Zeit des Mittelalters war der Einfluß der Religion auf die Medizin wieder stark geworden. Das wissenschaftliche Denken, das die Medizin von Hippokrates, Galen und Avicenna geprägt hatte, geriet in den Hintergrund und wurde wieder durch mystisch-religiöse Vorstellungen ersetzt (Schneble 1987). Dabei war Krankheit Strafe für sündiges Verhalten, Folge von Hexerei oder Besessenheit durch den Dämon. Aus diesen Vorstellungen heraus wurde die Epilepsie mit Gebeten, Handauflegen, Buße, Exorzismen und teilweise bis in das 17. Jahrhundert hinein mit Schädeltrepanationen, um dem bösen Geist ein Ausschlußfloch aus dem Kopf es Patienten zu schaffen, „therapiert“ (Schneble 1987; Pies 1990). Die Renaissance war die Wiedergeburt eines rationalen Denkens und stellte einen erneuten Wendepunkt in der Medizin dar. Dieser Übergang wird in der um Synthese zwischen Religiosität und einer auf rationalen Erkenntnissen beruhenden Naturwissenschaft bestrebt Arbeit über Epilepsie von Paracelsus (1493 – 1541) deutlich (Schneble 1987). Im 18. Jahrhundert und in der ersten Hälfte des 19. Jahrhundert wurden die Grundlagen geschaffen, auf denen die Epilepsie in der Folgezeit endgültig einen wissenschaftlichen Zugang erfuhr (Schneble 1990). Dabei lieferte die Arbeit

von Tissot (1728 – 1797) „Traité de l'Épilepsie“ aus dem Jahre 1770 einen grundlegenden Beitrag (Schneble 1987). Zwar wurde das Gehirn zu dieser Zeit erneut als der Ausgangspunkt epileptischen Geschehens angesehen. Allerdings wurden von vielen Ärzten bis in die zweite Hälfte des 19. Jahrhundert die Meinung vertreten, daß epileptische Anfälle zusätzlich ihren Ursprung in inneren Organen oder Gliedmaßen nehmen können. Dies führte teilweise zu fatalen Behandlungsmethoden wie Amputationen (Schneble 1987). Erst 1870 konnten Fritsch und Hitzig durch Reizversuche am Großhirn des Hundes nachweisen, daß die Epilepsie abhängig von elektrischen Vorgängen im Gehirn entsteht (Heintel 1975). Der Zeitraum von 1850 – 1950 war aufgrund medizinischer Fortschritte für die Geschichte der Epilepsie von großer Bedeutung. Begünstigt wurde dies durch entscheidende Erkenntniszugewinne in den Nachbardisziplinen der Medizin wie Physik, Chemie und Physiologie (Schneble 1987). Brom wurde 1857 von Locock als erstes wirksames Antiepileptikum eingeführt. Weitere bedeutende Fortschritte waren die Entdeckung des Phenobarbitals durch Hauptmann (1912) und die Einführung des Elektroenzephalogramms im Jahre 1924 durch Berger (Schneble 1990). Die Beobachtungen und die Forschungen einiger Persönlichkeiten führten zu differenzierten Erkenntnissen über die Epilepsie. Z. B. sind die Namen von W. J. West (1794 – 1848), J. H. Jackson (1835 – 1911), A. J. Koževnikov (1836 – 1902) und W. G. Lennox (1884 – 1960) in Form von Eponymen noch immer lebendig (Schneble 1987; Pies 1990). Durch zahlreiche Fortschritte ist die Diagnose und Therapie eines großen Teiles der Epilepsie-Patienten möglich. Und doch ist die Geschichte der Epilepsie damit nicht am Ende (Matthes 1987).

Unter Epilepsie wird heute ein Spektrum von Erkrankungen verstanden, welches eine große Bandbreite hinsichtlich der Ursachen und der epileptischen Symptome aufweist. Man unterscheidet idiopathische und symptomatische Epilepsien. So können akute oder chronische Gehirnkrankheiten oder ein Zustand nach organischer Hirnschädigung, wie z. B. nach einem Trauma oder einem Schlaganfall, einer symptomatischen Epilepsie zugrunde liegen. Bei der idiopathischen Epilepsie lassen Anamnese und Befund keine organische oder metabolische Hirnkrankheit als kausale Ursache erkennen. Durch die zunehmend verbesserte Diagnostik ist es möglich, immer kleinere strukturelle Veränderungen des Gehirns in vivo nachzuweisen. Dies führt zu einem erheblichen Wissenszuwachs über die Epilepsie-Entstehung und zur Aufdeckung einer kausalen Genese bei einem Teil der zuvor als idiopathisch klassifizierten Epilepsien.

1.2 Kortikale Dysgenesien

1.2.1 Zu kortikalen Dysgenesien assoziierte Krankheitsbilder

Kortikale Dysgenesien umfassen eine heterogene Gruppe von Defekten der Kortex-Architektur, die in zunehmender Zahl im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern diagnostiziert werden. Eine sensitive und differenzierte Detektion wird im Besonderen durch Fortschritte in den modernen bildgebenden Verfahren möglich. Einen hohen Stellenwert nimmt dabei die hochauflösende MRT ein (Hagemann et al. 2000b; Barkovich et al. 2001a; Barkovich 2002). Das Spektrum der assoziierten Krankheitsmanifestationen umfaßt kognitive Störungen (Clark et al. 2000a, b; Peiffer et al. 2001), neuropsychologische Defizite (Rosen et al. 1995; Galaburda 1993a, b), psychiatrische Erkrankungen wie die Schizophrenie (Bullmore et al. 1998; Keshavan 1999) und vor allem epileptische Anfallsleiden. Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist dabei die Beziehung von kortikalen Dysgenesien zur Epilepsie. Ein systematischer Zusammenhang zwischen dysplastischen Veränderungen und der Epilepsie-Entstehung wurde 1971 erstmals von Taylor et al. beschrieben. Dabei zeigten sich bei 10 Epilepsie-Patienten im chirurgisch entfernten Fokus dysplastische Veränderungen der Kortex-Architektur. Die Korrelation wurde durch neuropathologische Untersuchungen in

autoptisch (Hanefeld und Crome 1979; Meencke und Veith 1992) oder chirurgisch (Corsellis und Bruton 1979; Palmini et al. 1991a) gewonnenem Gewebe von Epilepsie-Patienten weiter gefestigt. Die post mortem Untersuchungen bei 591 Epilepsie-Patienten offenbarten bei 14 % der Betroffenen dysplastische Veränderungen, während im Kontroll-Gewebe von über 7300 Personen ohne Epilepsie in 1,5 % der Fälle Malformationen des Kortex gefunden wurden (Meencke und Veith 1992). Die Angaben zur Inzidenz kortikaler Dysgenesien bei Epilepsie-Patienten schwanken in Abhängigkeit vom Alter des gewählten Kollektivs und der unterschiedlichen Patienten-Selektion verschiedener Epilepsie-Zentren (Chassoux et al. 2000; Roper und Yachnis 2002). Die Epilepsie der betroffenen Patienten erweist sich dabei häufig gegenüber der medikamentösen und operativen Therapie als refraktär, was die klinische Relevanz kortikaler Dysgenesien unterstreicht (Raymond et al. 1995; Sisodiya 2000).

1.2.2 Klassifikation kortikaler Dysgenesien

Kortikale Dysgenesien sind hinsichtlich Morphologie, Pathogenese und Klinik heterogen. Durch die moderne Bildgebung wird zu Lebzeiten zunehmend eine differenzierte Diagnose und Klassifikation kortikaler Dysgenesien möglich (Hagemann et al. 2000b; Barkovich 2002). Eine von Barkovich et al. (1996) vorgestellte Klassifikation basiert auf den Stufen der embryonalen Kortex-Entwicklung und wird durch genetische, histo-pathologische und neuro-radiologische Befunde ergänzt. Hierbei werden die Dysgenesien abhängig von der Stufe, auf der eine abweichende Kortexentwicklung einsetzt, als Störungen der Zell-Proliferation, Störungen der Zell-Migration oder Störungen der Zell-Organisation klassifiziert. In einer Überarbeitung von Barkovich et al. (2001b) wurde eine Differenzierung zwischen fokalen und generalisierten Dysgenesien fallengelassen, zusätzlich wurden aktuelle Erkenntnisse der genetischen Zusammenhänge berücksichtigt. Die modifizierte Klassifikation ist in Tabelle 1.1 wiedergegeben. Vorteile dieser Klassifikation sind ein flexibler Rahmen, der eine Anpassung an aktuelle Forschungsbefunde erlaubt, und die Möglichkeit einer Einordnung anhand von MRT-Befunden (Barkovich 2002). Daneben existieren zusätzliche, auf neuropathologischen Befunden basierende Einteilungen, deren Ziel eine vereinfachte Anwendbarkeit und erhöhte klinische Relevanz ist (Tassi et al. 2002; Palmini und Luders 2002). Durch zunehmende Kenntnisse der Pathogenese und Pathophysiologie der kortikalen Dysgenesien wird es in Zukunft zu ergänzenden Anpassungen der Klassifikationen kommen. Dadurch sind weitere Implikationen für einzelne Subtypen im Hinblick auf Therapie und Prognose zu erwarten.

1.2.3 Entstehung kortikaler Dysgenesien

1.2.3.1 Regulation der Kortexentwicklung

Die Regulation der Kortexentwicklung ist ein komplexer und bisher nur partiell verstandener Prozeß. Untersuchungen der physiologischen Kortexentwicklung und die Identifizierung von pathophysiologischen Entstehungsmechanismen einer abweichenden Kortexentwicklung decken zunehmend kausale Zusammenhänge der Entstehung von kortikalen Dysgenesien auf. Dabei wird zunehmend die Beteiligung einiger verantwortlicher Gene, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Enzyme, Neurotransmitter und exogener Faktoren an der Regulation der Kortexentwicklung aufgedeckt (Gressens 1998, 2000). Eine Übersicht über die Kortexgenese und die pathophysiologisch relevanten Aspekte liefern Redecker et al. (2000a). Von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Kortexentwicklung sind Cajal-Retzius Zellen. Diese transient in der marginalen Zone des unreifen Neokortex nachweisbaren Zellen steuern über die Sekretion des Glykoproteins Reelin die horizontale und vertikale Kortex-Architektur (D´Arcangelo und Curran 1998; Frotscher 1997; Nishikawa et al. 2002). Dabei reguliert Reelin die Interaktion zwischen migrierenden Neuronen und der als Leitstruktur

fungierenden Radiärfaserglia und ist essentiell für einen physiologischen Ablauf des sogenannten „inside-outside layering“ (Hack et al. 2002; Frotscher 1997). Die Signal-Kaskade verläuft dabei von dem extrazellulären Protein Reelin über VLDL- und ApoE2-Rezeptoren zu dem zytoplasmatischen Protein mDab1 (Hack et al. 2002; Walsh 2000). Die Kinase cdk5 und deren Aktivator p35 interagieren möglicherweise mit dieser Signal-Kaskade und sind ebenfalls Regulatoren der Neuronen-Migration (Feng und Walsh 2001). Wachstumsfaktoren wie Neurotrophin-4, BDNF und Neuregulin (Brunstrom et al. 1997; Rio et al. 1997) sind ebenso wie die Neurotransmitter GABA und Glutamat (Behar et al. 1998, 1999, 2001; Kihara et al. 2002) an der Modulation der Neuronen-Migration beteiligt. Das Neuropeptid VIP stimuliert die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen über eine Verkürzung des Zell-Zyklus (Gressens et al. 1998; Hill et al. 1999). Daneben sind die Membranproteine Astrotactin, β 1 Integrin und α 3 Integrin sowie das sekretorische Protein Slit an der Kortextwicklung beteiligt (Walsh 2000). Diese Liste von Regulatoren der Kortextwicklung wird sich in Zukunft weiter verlängern und deren Interaktion zunehmend aufgedeckt werden. Die Veränderungen dieser Abläufe im Zusammenhang mit der Entstehung kortikaler Dysgenesien sind weitestgehend ungeklärt, allerdings werden zunehmend für die Pathogenese verantwortliche exogene Faktoren und genetische Ursachen identifiziert (Feng und Walsh 2001; Gressens et al. 2001).

1.2.3.2 Exogene Ursachen

Exogene Faktoren sind mögliche Ursachen für die Entstehung kortikaler Dysgenesien. Die Morphologie und das Ausmaß der induzierten Läsion sind dabei von der Art der Noxe und dem Reifezustand des Gehirns zum Zeitpunkt der Exposition abhängig (Mischel et al. 1995). Die sensible Phase liegt beim Menschen für die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen zwischen der 6. und 12. Schwangerschaftswoche p. m. (Redecker et al. 2000a) und für die Neuronen-Migration zwischen der 12. und 24. Gestationswoche (Gressens 2000). Das Zeitfenster für Störungen der Organisation neuronaler Netzwerke reicht möglicherweise bis in die Neugeborenenperiode (Lombroso 2000). Der Phänotyp kortikaler Dysgenesien ist abhängig von der Stufe der Kortextwicklung, auf der ein Defekt induziert wird (Barkovich et al. 1996). Exogene Noxen können durch eine phasenabhängige Wirksamkeit die Stufen der Kortextwicklung spezifisch beeinflussen. Für Koffein ist im Tierexperiment eine pathogene Wirkung auf die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen nachgewiesen (Marret et al. 1997), deren Relevanz für den Menschen noch nicht abschließend beurteilbar ist (Gressens et al. 2001). Pränatale γ -Strahlenexposition führt im Tierexperiment ebenfalls zu Störungen der Neuronen-Proliferation und durch eine Schädigung der Radiärfasergliazellen zu Migrationsstörungen (Roper 1998). Fetale Zytomegalievirusinfektionen sind eine exogene Ursache zerebraler Mikrogyrien, als deren Pathomechanismus eine durch die Virusinfektion hervorgerufene Perfusionsstörung (Marques Dias et al. 1984) oder eine Virus induzierte Degeneration der Radiärfasergliazellen (van Den Pol et al. 1999) diskutiert werden. Ein hohes potentiell Risiko zur Induktion kortikaler Dysgenesien geht von Alkohol und einer diabetischen Stoffwechsellaage der Mutter aus (Gressens et al. 2001). Eine Übersicht über das weite Spektrum chemischer, physikalischer und biologischer Noxen und deren Relevanz für die Entstehung kortikaler Dysgenesien liefern Gressens et al. (2001).

Tabelle 1.1: Klassifikation kortikaler Dysgenesien nach Barkovich et al. (2001b)

<p>I. Malformationen durch gestörte neuronale und gliale Proliferation oder Apoptose</p> <p>A. Verminderte Proliferation / vermehrte Apoptose: Mikrozephalie</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mikrozephalie mit normalem oder verdünnten Kortex 2. Mikrolissenzephalie (extreme Mikrozephalie mit dickem Kortex) 3. Mikrozephalie mit Polymikrogyrie oder kortikaler Dysplasie <p>B. Vermehrte Proliferation / verminderte Apoptose (normale Zelltypen): Megalenzephalien</p> <p>C. Gestörte Proliferation (atypische Zelltypen)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nicht neoplastisch <ol style="list-style-type: none"> a. Tuberöse Sklerose b. Fokale kortikale Dysplasie mit Ballon-Zellen c. Hemimegalenzephalie 2. Neoplastisch (assoziiert mit dysplastischem Kortex) 	<p>III. Malformationen durch gestörte kortikale Organisation</p> <p>A. Polymikrogyrie und Schizenzephalie</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Bilaterale Polymikrogyrie-Syndrome 2. Schizenzephalie (Polymikrogyrie mit Spalt-Bildung) 3. Polymikrogyrie mit zusätzlichen zerebralen Malformationen 4. Polymikrogyrie oder Schizenzephalie als Teil von multiplen kongenitalen Anomalien oder von Syndromen mit mentaler Retardierung <p>B. Kortikale Dysplasie ohne Ballon-Zellen</p> <p>C. Mikrodysgenesien</p>
<p>II. Malformationen durch gestörte neuronale Migration</p> <p>A. Lissenzephalie / Spektrum subkortikaler Band-Heterotopien</p> <p>B. Cobblestone-Komplex</p> <p>C. Heterotopien</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Subependymal (periventrikulär) 2. Subkortikal (ohne Band-Heterotopien) 3. Marginal glioneuronal 	<p>IV. Malformationen der kortikalen Entwicklung (nicht weiter klassifizierbar)</p> <p>A. Malformationen sekundär durch angeborene, metabolische Erkrankungen</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mitochondrial 2. Peroxisomal <p>B. Nicht weiter klassifizierte Malformationen</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sublobuläre Dysplasie 2. Andere

1.2.3.3 Genetische Ursachen

Genetische Ursachen werden im Zusammenhang mit kortikalen Dysgenesien zunehmend aufgedeckt. Die auf Gen-Mutationen beruhenden kortikalen Dysgenesien treten isoliert auf oder sind Teil von Syndromen. Die Lokalisation der betroffenen Gene und die Aufdeckung der Funktionen der kodierten Proteine führen zu einem wachsenden Verständnis der Pathogenese einzelner Subtypen der kortikalen Dysgenesien (Walsh 2000; Feng und Walsh 2001). Die klassische Lissenzephalie kann in ca. 75 % der Fälle auf Mutationen der Gene LIS1 oder XLIS (= DCX) zurückgeführt werden (Pilz et al. 1998). Das auf Chromosom 17

lokalisierte Gen LIS1 kodiert das Protein PAFAH1B1, einer Untereinheit der am Abbau des PAF beteiligten Acetylhydrolase (Cardoso et al. 2002). Die Signifikanz eines möglicherweise verminderten enzymatischen Abbaus von PAF zur Entstehung von Lissenzephalien ist nicht quantifiziert (Feng und Walsh 2001). Das Genprodukt von LIS1 ist darüber hinaus ein Mikrotubuli assoziiertes Protein (MAP) und interagiert mit den zellulären Lokomotionsmechanismen (Feng und Walsh 2001; Aumais et al. 2001). Das Ausmaß des Phänotypus von isolierten, klassischen Lissenzephalien (ILS) korreliert mit dem Funktionsverlust des LIS1 Genes (Leventer et al. 2001; Cardoso et al. 2002). Ein Gendefekt des LIS1 ist auch an der Entstehung des Miller-Dieker Syndroms (MDS) beteiligt (Dobyns et al. 1999b). Eine klassische Lissenzephalie kann ebenfalls durch eine Mutation im XLIS Gen bedingt sein. Typischerweise führt die Mutation auf dem X-chromosomal lokalisierten Gen bei Männern zu einer klassischen Lissenzephalie und bei Frauen zu einem „Doppelkortex-Syndrom“ bzw. zu subkortikalen Bandheterotopien (SBH) (Pilz et al. 1998; des Portes et al. 1998). Durch XLIS wird das Protein Doublecortin kodiert, welches ebenfalls als MAP mit dem für die Lokomotion bedeutendem Zytoskelett interagiert. Die durch LIS1- und XLIS-Mutationen induzierten Migrationsstörungen sind vermutlich durch einen ähnlichen aber nicht identischen Pathomechanismus bedingt (Feng und Walsh 2001). Dies äußert sich zusätzlich in differierenden Phänotypen. Während die durch XLIS Mutationen bedingten Lissenzephalien einen Schwerpunkt im okzipitalen Kortex zeigen, führen Mutationen im LIS1 Gen zu einem umgekehrten Gradienten mit Betonung frontaler und parietaler Bereiche (Pilz et al. 1998). Ein weniger stark ausgeprägter Funktionsverlust von XLIS, wie er bei Frauen durch teilweise Kompensation des nicht betroffenen X-Chromosoms bedingt ist, führt zur Entwicklung von subkortikalen Bandheterotopien (des Portes et al. 1998). Abgeschwächte Phänotypen bei geringfügigeren Mutationen von XLIS wie subkortikale Bandheterotopien bei Männern oder diskontinuierliche subkortikale Heterotopien bei Frauen sind ebenfalls möglich (des Portes et al. 2002; D'Agostino et al. 2002; Poolos et al. 2002). Eine autosomal rezessiv vererbte Form (LCH) von Lissenzephalien, assoziiert mit Defekten im Kleinhirn, Hippokampus und Hirnstamm, wird durch Mutation im Reelin Genlokus verursacht (Hong et al. 2001). Eine X-chromosomal vererbte Lissenzephalie mit Genitalanomalien (XLAG) wird vermutlich durch eine Mutation im Homebox-Gen ARX verursacht (Dobyns et al. 1999a; Kitamura et al. 2002). Zum Cobblestone-Komplex gehörende Lissenzephalien treten als isoliertes Syndrom (CLO) oder als Teil der autosomal rezessiv vererbten Muskeldystrophien Walker-Warburg Syndrom (WWS), Muscle-Eye-Brain Disease (MEB) und Fukuyama-congenital-muscular-Dystrophy (FCMD) auf (Barkovich 1998). Durch Mutation im X-chromosomal lokalisierten Gen FLN1 werden periventriculäre noduläre Heterotopien (PNH) induziert. Diese werden überwiegend bei Frauen diagnostiziert, da die Mutation für Männer häufig letal ist (Sheen et al. 2001). Das von FLN1 kodierte Protein Filamin1 ist ein Regulator der Zellform und Migration (Walsh 2000). Bisher ist wenig bekannt über mögliche genetische Ursachen bei Patienten mit FCD, jedoch läßt die Beobachtung von familiären Zusammenhängen (Montenegro et al. 2002) und eine veränderte Expression der Kinase cdk5 (Sisodiya et al. 2002) zumindest partiell einen genetischen Hintergrund vermuten. Polymikrogyrien (Chang et al. 2003; Villard et al. 2002) und Schizenzephalien (Guerrini und Carrozzo 2002) sind teilweise durch genetische Ursachen bedingt. Eine Zusammenstellung der Erkenntnisse über genetische Ursachen von kortikalen Dysgenesien liefern Barkovich et al. (2001b) und Guerrini und Carrozzo (2002). Eine Übersicht über genetische Ursachen im Zusammenhang mit kortikalen Dysgenesien liefert Tabelle 1.2. Von der weiteren Aufdeckung genetischer Zusammenhänge sind zusätzliche Einblicke in die physiologische Kortexentwicklung und in die Pathogenese von kortikalen Dysgenesien zu erwarten (Feng und Walsh 2001). Dadurch wird eine gezielte genetische Beratung für die betroffenen Familien ermöglicht (Lagae 2000; Guerrini und Carrozzo 2002).

Tabelle 1.2: Übersicht genetischer Ursachen kortikaler Dysgenesien nach Barkovich et al. (2001b), Lagae (2000), Guerrini und Carrozzo (2002), Dobyns et al. (1999a), Chang et al. (2003), Villard et al. (2002).

Syndrom	Gen-Lokus	Gen	Protein
Klassische Lissenzephalie			
ILS	17p13.3	LIS1	PAFAH1B1
	Xq22.3-q23	XLIS	Doublecortin
MDS	17p13.3	LIS1	PAFAH1B1
LCH	7q22	RELN	Reelin
XLAG	Xp22.13	ARX	Homebox-Gen
Cobblestone Lissenzephalie			
CLO	unbekannt	unbekannt	unbekannt
MEB	1p32-34	unbekannt	unbekannt
WWS	unbekannt	unbekannt	unbekannt
FCMD	9q31-33	FCMD	FCMD/Fukutin
Heterotopien			
SBH	Xq22.3-q23	XLIS	Doublecortin
	17p13.3	LIS1	PAFAH1B1
PNH	Xq28	FLN1	Filamin 1
Tuberöse Sklerose			
TSC1	9q32	TSC1	Hamartin
TSC2	16p13.3	TSC2	Tuberin
Schizenzephalie	10q26.1	EMX2	Homebox Gen
FCD	unbekannt	unbekannt	cdk5
Polymikrogyrie			
BPP	Xq28	unbekannt	unbekannt
BFPP	16q12-21	unbekannt	unbekannt

1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

1.3.1 Pathophysiologie der zu kortikalen Dysgenesien assoziierten Epilepsie

Die Pathophysiologie der zu kortikalen Dysgenesien assoziierten Epilepsie ist nur partiell aufgedeckt. Die Epilepsie der betroffenen Patienten erweist sich häufig gegenüber der medikamentösen Therapie als refraktär. Zwar ist durch eine chirurgische Behandlung bei einem Teil der Patienten eine Heilung oder Senkung der Anfallshäufigkeit zu erreichen, dennoch sind diese Ergebnisse weniger befriedigend als die Resultate der Epilepsiechirurgie bei anderen Pathologien (Palmini et al. 1991b). Ursächlich scheinen weitreichende, über die dysplastisch veränderten Gewebeanteile hinausreichende, Netzwerkveränderungen zu sein, die an der Entstehung epileptischer Aktivität beteiligt sind (Palmini et al. 1995; Li et al. 1997; Tassi et al. 2002). Eine Imbalance zwischen Exzitation und Inhibition sowie eine veränderte Konnektivität im Bereich kortikaler Dysgenesien scheinen die Entstehung einer assoziierten Hyperexzitabilität zu verursachen (Jacobs et al. 1999b; Chevassus-au-Louis et al. 1999a). In der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Beteiligung einer GABA_A Rezeptor-Dysregulation an der Pathogenese einer zu kortikalen Dysgenesien assoziierten Epilepsie untersucht. Die Verteilung von GABA_A Rezeptoruntereinheiten im Bereich tierexperimentell induzierter kortikaler Dysgenesien wurde durch Immunhistochemie visualisiert (Fritschy und Mohler 1995). Als Tiermodell wurde die intrakortikale Injektion von Ibotensäure am Tag der Geburt gewählt. Ibotensäure-Injektionen induzieren durch eine fokale Störung der Neuronen-Migration und Kortex-Organisation kortikale Dysgenesien (Redecker et al. 1998a; Marret et

al. 1995; Gressens et al. 1996). Neben morphologischen Charakteristika von kortikalen Dysgenesien des Menschen wird auf einer funktionellen Ebene ebenfalls eine assoziierte Hyperexzitabilität imitiert (Redecker et al. 1998b). Eine differenzierte Auswertung erfolgte mittels Bestimmung von optischen Dichtewerten im Bereich der kortikalen Dysgenesien und in den angrenzenden, morphologisch unveränderten, neokortikalen Arealen. Das Ziel war die Beurteilung von fokalen Effekten im Bereich der kortikaler Dysgenesien und von einer möglicherweise weitreichenden Reorganisation im benachbarten Neokortex. Erkenntnisse über ein mögliches Ausmaß von funktionellen Veränderungen sind relevant sowohl für die Indikationsstellung und Interpretation von Zusatzdiagnostischen Maßnahmen und Befunden bei Patienten mit Epilepsie (PET, SPECT, MRT, Elektrophysiologie und Neuropsychologie) als auch für das anzustrebende Resektionsausmaß von epilepsiechirurgischen Eingriffen.

1.3.2 GABA_A Rezeptoruntereinheiten und deren pharmakologische Implikationen

Aufgrund zunehmender Erkenntnisse über weitreichende Netzwerkveränderungen auch in morphologisch unauffälligen Kortexarealen erscheinen funktionelle Störungen und die Ausbildung eines Epilepsie-Fokus in einem weit über die dysplastischen Veränderungen hinausgehenden Bereich möglich. Dies läßt vermuten, daß die Verbesserungsmöglichkeiten einer chirurgischen Therapie aufgrund einer begrenzten Resektabilität limitiert sind. Aus diesem Grund stellt die Erhöhung der Effektivität einer pharmakologischen Therapie einen weiteren wichtigen Ansatz zur Behandlung einer zu kortikalen Dysgenesien assoziierten Epilepsie dar. GABA_A Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle neuronaler Aktivität und sind Ansatzpunkt zahlreicher im klinischen Einsatz befindlicher Antikonvulsiva. GABA_A Rezeptoren sind Pentamere, von denen durch unterschiedliche Untereinheiten-Komposition zahlreiche Rezeptor-Subtypen existieren. Bisher konnten die 19 Untereinheiten α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ , ρ 1-3 differenziert werden (Barnard et al. 1998; Bonnert et al. 1999; Whiting et al. 1999). Die GABA_A Rezeptor-Subtypen besitzen auf zellulärer und subzellulärer Ebene ein charakteristisches Verteilungsmuster (Fritschy und Mohler 1995; Nusser et al. 1996; Loup et al. 1998; Fritschy et al. 1998). Die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der GABA_A Rezeptoren werden durch deren Untereinheiten-Komposition bestimmt (Lavoie et al. 1997; Maric et al. 1999). Die Diversität der GABAergen Inhibition erlaubt zahlreiche funktionelle Adaptationen (Owens und Kriegstein 2002). Die α -Untereinheiten zeigen verschiedene Sensitivitäten gegenüber diversen Pharmaka und sind ein möglicher Ansatzpunkt einer GABA_A Rezeptoruntereinheiten spezifischen Therapie (Smith et al. 2001). In dieser Arbeit wurden die vier häufigsten α -Untereinheiten α 1, α 2, α 3 und α 5 untersucht, die darüber hinaus zusammen mit der ebenfalls untersuchten Untereinheit γ 2 für die Bildung von Benzodiazepin-Bindungsstellen verantwortlich sind (Mohler et al. 2002). Der Beitrag einzelner GABA_A Rezeptoruntereinheiten zum breiten Wirkungsspektrum der klassischen Benzodiazepine wird zunehmend selektioniert (Rudolph et al. 1999; Low et al. 2000; Crestani et al. 2001). Die Entwicklung einer neuen Generation von GABA_A Rezeptoruntereinheiten-spezifischen Pharmaka verspricht selektive klinische Effekte bei einem reduzierten Nebenwirkungsspektrum (Mohler et al. 2002). Für welche GABA_A Rezeptoruntereinheiten eine gezielte Pharmakotherapie Fortschritte erwarten läßt, hängt von der physiologischen Rolle einzelner GABA_A Rezeptoren und von deren Veränderung unter pathophysiologischen Bedingungen ab (Whiting 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Dysregulation von fünf GABA_A Rezeptoruntereinheiten, die eine besondere Relevanz für die pharmakologischen Eigenschaften von GABA_A Rezeptoren besitzen, nach Induktion kortikaler Dysgenesien untersucht. Ziel war es, mögliche Ursachen der Pharmako-Resistenz der zu kortikalen Dysgenesien assoziierten Epilepsie aufzudecken. Zusätzlich können sich hieraus Hinweise für eine modifizierte und wirksamere Pharmakotherapie ergeben.

2.1 Versuchstiere

Zur Dysplasieinduktion wurden Wistar-Ratten beider Geschlechter am Tag ihrer Geburt verwendet. Sowohl Versuchstiere als auch deren Muttertiere wurden in der Tierversuchsanlage Düsseldorf bei 22 – 24 °C, 60 – 80 % relativer Luftfeuchtigkeit, einem Tag / Nacht Rhythmus von je 12 h und bei freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme waren die Versuchstiere 66 – 178 Tage alt und wogen 206 – 371 g. Eine Aufstellung der Versuchstiere ist in Tabelle 2.1 wiedergegeben.

Tabelle 2.1: Immunhistochemisch untersuchte Wistar-Ratten in der Gruppe der mit Ibotensäure injizierten Tiere und in der Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe bestand aus scheinoperierten Tieren (SHAM) und unbehandelten (∅) Tieren. Angegeben sind das Alter in Tagen (d), das Geschlecht und das Körpergewicht in Gramm (g) zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme.

Behandlung	Tier	Alter (d)	Geschlecht		Gewicht (g)
			♀	♂	
Ibotensäure	24/06	120		X	371
	37/02	113	X		315
	40/05	88		X	332
	43/01	72		X	297
	43/03	72		X	320
	43/06	72	X		249
	43/08	72	X		285
	44/01	73	X		328
	45/09	80	X		265
	45/11	80		X	356
	45/12	80		X	360
	49/01	178	X		223
	49/02	178	X		206
	49/03	178	X		216
	49/05	178		X	355
	49/06	178		X	351
	49/07	178		X	360
	49/08	178		X	363
SHAM	K1	66		X	278
	K2	66		X	306
	K3	66		X	295
	K4	66		X	247
	K5	66		X	263
∅	K6	90	X		238
	K7	90	X		250
	K8	120		X	344
	K9	120		X	325
	K10	120		X	362
	K11	120	X		287
	K12	120	X		274
	K13	120	X		304

2.2 Anästhesie

Die Tiere wurden kurz vor der Dysplasieinduktion von der Mutter getrennt. Zur Narkose wurden die neugeborenen Ratten für 30 s in ein am Boden mit Diethylether bedecktes Glasgefäß gesetzt, wobei Papier direkten Hautkontakt zum Narkotikum verhinderte. Während der Trennung von der Mutter, die so kurz wie möglich gehalten wurde, verhinderte eine konventionelle Rotlichtlampe ein Auskühlen der Jungtiere.

2.3 Induktion der Dysplasie

Durch exzitotoxische Wirkung von Ibotensäure auf den Reifungsprozeß des Rattenhirnes wurden in der Experimentalgruppe kortikale Dysgenesien induziert. (Redecker et al. 1998b; Innocenti und Berbel 1991; Marret et al. 1995, 1996; Gressens et al. 1996; Kihara et al. 2002) Die Ibotensäure (Sigma, St Louis, MO) wurde mit 0,1 M phosphatgepufferter Normalsalzlösung (PBS, pH 7,4) verdünnt und blasenfrei in eine mittels Stativ an dem Versuchstisch montierte Spritze aufgezogen. Der Kopf der anästhesierten Versuchstiere wurde manuell in waagerechter Position zur Unterlage fixiert. Eine 27-gauge Nadel wurde auf dem Schädel zwischen Sutura coronalis und Sutura lambdoidea ca. 2 mm lateral der Mittellinie aufgesetzt (Abb. 2.1) und mittels einer Mechanik 3 mm in vertikaler Richtung in das Hirn vorgeführt. Eine Dosis von 10 µg Ibotensäure wurde injiziert, verteilt auf zwei Bolusgaben von je 1 µl im Abstand von 45 s. Während jeder Bolusgabe wurde die Spritze automatisch um 1 mm retrahiert. Vor dem Entfernen der Kanüle wurde diese für weitere 45 s in ihrer Position belassen. Bei SHAM operierten Tieren der Kontrollgruppe wurde bei gleichem Prozedere Ibotensäure durch PBS pH 7,4 substituiert. Nach Erholung von der Anästhesie wurden die Jungtiere zu ihrer Mutter zurückgesetzt. Epileptische Anfälle konnten bei den mit Ibotensäure behandelten Tieren weder akut noch im Verlauf beobachtet werden.

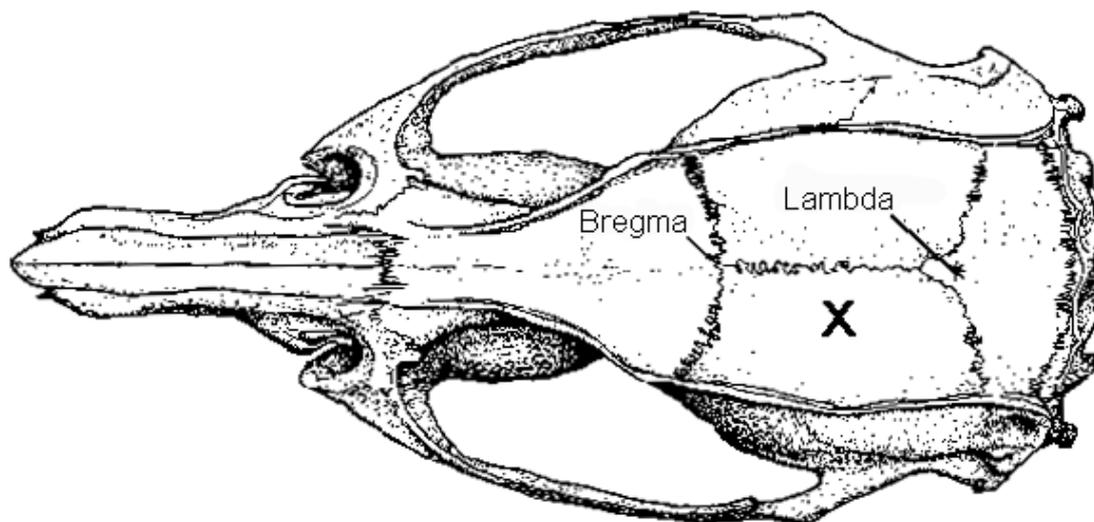


Abb. 2.1: Schematische Lokalisation der Ibotensäure-Injektionsstelle (X) in Bezug auf Sutura coronalis, Sutura sagittalis und Sutura lambdoidea. Modifiziert nach Paxinos und Watson (1986).

2.4 Transkardiale Perfusion

Zur immunhistologischen Untersuchung wurde das Gewebe mittels transkardialer Perfusion fixiert. Die Tiere wurden zu diesem Zweck ca. 6 min bei 5 % Enfluran (Abott GmbH) im Lachgas / Sauerstoffgemisch von 7 : 3 tief narkotisiert und anschließend auf dem Rücken liegend in der Versuchswanne an den Extremitäten befestigt. Zunächst wurde der Bauchraum mittels Medianschnitt eröffnet, welcher nach kranial zur Eröffnung des Brustraumes verlängert wurde. Das Herz wurde an den Ventrikeln mit einer Klemme gefaßt und im Bereich der Herzspitze inzidiert. Eine Sonde wurde durch den eröffneten linken Ventrikel bis in den Aortenbogen vorgeschoben und mittels einer Klemme dort fixiert. Nach Punktion des rechten Vorhofes wurde über die Sonde zunächst 75 ml 0,1 M phosphatgepufferte Normalsalzlösung (PBS, pH 7,4) und anschließend 450 ml formaldehydhaltiges Fixativ perfundiert. Eine Perfusionspumpe (505S, Watson-Marlow, England) gewährleistete einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom von 50 ml/min.

2.5 Hirnentnahme und Kryoprotektion

Unmittelbar im Anschluß an die Perfusion wurden die Hirne vorsichtig entnommen und für ca. 4 h in Fixativ inkubiert. Anschließend wurden die Hirne zur Kryoprotektion in Kunststoffröhrchen, die mit je 40 ml 10 % (W/V) Saccharose gefüllte waren, eingebracht. Nach dem Absinken (ca. 24 h) der Hirne wurden diese in 30 % (W/V) Saccharose überführt und bis zum erneuten Absinken inkubiert. Anschließend wurden die Hirne eingefroren und bei $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.6 Gewebepreparation für Immunhistochemie

2.6.1 Mikrowellen-Behandlung

Das Hirngewebe wurde mittels Mikrowellen-Behandlung auf die Immunhistochemie vorbereitet um eine verbesserte Darstellung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung zu erhalten (Fritschy et al. 1998; Loup et al. 1998). Dazu wurden die tiefgefrorenen Hirne nach Entnahme aus dem Gefrierschrank in Zitrat pH 4,5 bei $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde mittels Skalpell ein Gewebeblock aus den Hirnen angefertigt, indem frontal und okzipital für die weiteren Untersuchungen nicht relevantes Gewebe abgetragen wurde. Dabei wurde vor allem auf eine Eröffnung der Ventrikel geachtet um zu verhindern, daß verbliebene Luft im Ventrikelsystem bei der anschließenden Mikrowellenbehandlung zu Gewebeerreißen führt. Das Gewebe wurde erneut in 80 ml Zitrat pH 4,5 überführt und in einem Mikrowellengerät bei 650 W für 135 s erhitzt. Die optimale Dauer der Mikrowellenbehandlung wurde im Vorfeld dadurch ausgetestet, daß die Zeit bis zum Sieden der Zitratlösung ermittelt und anschließend die Gesamtzeit des Kochvorganges so gewählt wurde, daß sich die Hirne eine Minute im siedenden Zitrat-Puffer befinden. Nach 15 min Abkühlen des Gewebes bei Zimmertemperatur wurden die Hirne in Methylbutan, welcher mittels Trockeneis auf $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt worden war, schockgefroren.

2.6.2 Anfertigung der Hirschnitte

Der Hirschnitte wurden mit einem Schlittenmicrotom (Micron, Heidelberg) angefertigt. Die tiefgefrorenen Hirne wurden in koronarer Ausrichtung mit dem temperaturregulierbaren Probenhalter verbunden. Im viskösen Zustand des bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aushärtenden Klebers war kurzfristig ein Nachjustieren möglich, bevor durch Einschalten des Kühlaggregates der Gewebeblock endgültig fixiert wurde. Die Temperatur wurde beim folgenden Schneide-

vorgang nach Bedarf nachreguliert, um eine optimale Schnittqualität zu gewährleisten. Die linke Hemisphäre wurde durch eine basale Inzision markiert. Es wurden Serienschritte mit einer Schnittdicke von 50 µm hergestellt. Durch einen weichen Pinsel wurden die Schnitte einzeln in mit gekühlter PBS gefüllte Kavitäten überführt.

2.6.3 Auswahl und Vorbehandlung der Schnitte

Bei Tieren der Versuchstiergruppe wurden Schnitte aus der Dysplasie-region ausgewählt, war diese makroskopisch nicht erkennbar erfolgte die Auswahl unter Verwendung eines Mikroskops. Die Hirnschnitte der Kontrollgruppe wurden aus vergleichbaren Hirnregionen verwendet. Es wurden, wenn es die Ausdehnung des Dysplasieareals zuließ, drei Schnitte pro GABA_A Rezeptoruntereinheit ausgewählt. In dem folgenden Waschvorgang wurden die Schnitte für die Inkubation im ersten Antikörper vorbereitet. Die Schnitte wurden für drei mal zehn Minuten in TBS pH 7,4 unter kontinuierlicher Bewegung durch einen Rüttler gewaschen. Der ersten Waschlösung war 0,05 % Triton zugesetzt. In den zwei folgenden Schritten wurde darauf verzichtet, um Artefakte durch ungleichmäßige Antikörperverteilung während der Inkubation, verursacht durch Seifenrückstände, zu vermeiden. Dieses Vorgehen wurde auch bei den nachfolgenden Waschgängen beibehalten.

2.7 Immunhistochemie

2.7.1 Spezifität der verwendeten Antikörper

Um die Verteilung der untersuchten GABA_A Rezeptoruntereinheiten darzustellen, wurde ein immunhistochemisches Verfahren gewählt. Es wurde die „free-floating“ Technik angewandt. D. h., die Hirnschnitte waren während der Inkubations- und Waschschr- itte vollständig von Flüssigkeit umgeben und wurden erst nach abgeschlossener Färbereaktion auf Objektträger aufgezogen. Zur Detektion der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ sind spezifische Primärantikörper verwendet worden, die im Labor von Herrn Prof. Fritschy hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden (Fritschy und Mohler 1995). Die polyklonalen Antiseren wurden in Meerschweinchen und Kaninchen gegen synthetische Peptide gebildet, hergestellt mittels von Ratten stammender cDNA der entsprechenden GABA_A Rezeptoruntereinheiten. Alle Antikörper sind gegen extrazellulär gelegene Epitope der GABA_A Rezeptoruntereinheiten gerichtet und aus AS-Sequenzen des N-terminalen Proteinabschnittes hergestellt (Fritschy und Mohler 1995; Fritschy et al. 1998). Die Spezifität der Antiseren wurde durch Immunopräzipitation und Western-blotting verifiziert und hinsichtlich der immunhistochemischen Verwendbarkeit getestet. Für Details der Herstellung und Testung siehe Fritschy und Mohler (1995) und Benke et al (1991). Die anatomische Verteilung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten bei Wistar-Ratten wurde von Fritschy et al. (1995, 1998) untersucht, und die dabei erstellten Färbeprotokolle für die vorliegende Arbeit zugrunde gelegt. Durch Testläufe im Vorfeld wurde durch Anpassungen des Protokolls diese Methode im Labor der Neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf etabliert. Hierzu sind für die Antikörper Verdünnungsreihen zur Bestimmung einer bezüglich Signal-Rausch-Verhältnis optimalen Antikörper-Konzentration durchgeführt. Die dabei erzielte Darstellung der anatomischen Verteilung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten war in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Fritschy und Mohler (1995).

2.7.2 Inkubation mit Primärantikörper

Die Primärantikörperlösungen gegen GABA_A Rezeptoruntereinheiten wurden in TBS pH 7,4 wie folgt verdünnt: $\alpha 1$ 1:20000, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ 1:2000, $\alpha 5$ 1:5000 und $\gamma 2$ 1:3000. Zur Blockade

unspezifischer Bindungsstellen für den in Ziegen hergestellten Sekundärantikörper wurden den Primärantikörperlösungen 2 % Ziegennormalserum (NGS: Normal Goat Serum) zugesetzt. Die Hirnschnitte wurden mit einem weichen Pinsel in mit Primärantikörperlösung gefüllte Kavitäten einer Glasplatte überführt. Um einen gleichmäßigen Kontakt zwischen Gewebe und Antikörperlösung sicherzustellen, wurde wie bei allen Inkubationsschritten auf eine vollständige Entfaltung der Hirnschnitte geachtet, und während der Inkubation durch einen Rüttler für kontinuierliche Bewegung (100 rpm) gesorgt. Die Hirnschnitte wurden über Nacht in einer Kühlkammer bei 4 °C inkubiert.

2.7.3 Inkubation im Sekundärantikörper

Der biotinylierte Sekundärantikörper wurde in Ziegen hergestellt und war gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet. Zum Nachweis des gegen die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ gerichteten Primärantikörpers wurden Anti-Kaninchen IgG-AK (Jackson Immunoresearch) verwendet. Zum Nachweis der gegen die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ gerichteten Primärantikörper wurden Anti-Meerschweinchen IgG-AK (Jackson Immunoresearch) eingesetzt. Die Antikörper waren gegen Rattenproteine präabsorbiert. Die Sekundärantikörper wurden mittels TBS pH 7.4 auf 1:100 verdünnt. Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurde 2 % Ziegennormalserum (NGS) zugefügt. Nach einem vorbereitenden Waschvorgang erfolgte bei Raumtemperatur die Inkubation über eine Stunde unter kontinuierlicher Bewegung.

2.7.4 Detektion

Die Antikörper Nachweise wurden mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (ABC-Methode) durchgeführt (Abb. 2.2). Der Komplex wird aus Avidin, einem 68 kDa großen, basischen Glykoprotein und dem 244 Da kleinen, wasserlösliche Vitamin Biotin gebildet, die eine hohe Affinität zueinander besitzen (Beesley 1993). Avidin stellt dabei eine Brücke zwischen den an den Sekundärantikörper gekoppelten Biotin-Molekülen und den mit Peroxidase gekoppelten Biotin-Molekülen des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes her. Zur Visualisierung wurde durch die an Biotin gekoppelte Peroxidase das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) unter H₂O₂ Katalyse zu einem braunen Phenazinpolymer umgesetzt. Die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Lösung wurde mindestens 30 Minuten vor ihrer Verwendung bei Raumtemperatur hergestellt, um eine Präformierung des Komplexes zu ermöglichen (Beesley 1993). Die Konzentration von Reagenz A und B betrug je 1 % (Elite Kit 6100 AB, Vecta Stain). Die Hirnschnitte wurden nach einem vorbereitenden Waschgang für 45 Minuten unter Bewegung inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Hirnschnitte in 2 ml DAB-Lösung für 5 Minuten präinkubiert. Zum Starten der Farbreaktion wurden 2 ml 0,006 % H₂O₂ (Sigma) enthaltende DAB-Lösung rasch hinzugefügt. Zur Herstellung der DAB-Lösung wurden 3,3 Diaminobenzidin (Sigma) 50 mg/ml im Verhältnis 1:100 mit TBS pH 7,7 verdünnt. Die Farbreaktion fand unter kontinuierlicher Bewegung durch einen Rüttler statt, wobei auf eine Entfaltung der Hirnschnitte geachtet wurde, um Artefakte durch ungleichmäßiges Ablaufen der Chromogenumsetzung zu vermeiden. Die Detektion fand bei Raumtemperatur statt. Durch Überführen der Schnitte in gekühlte PBS pH 7,4 Lösung wurde die Farbreaktion beendet. Das Kriterium zur Beendigung war ein Erreichen, der in den Vorversuchen hinsichtlich Darstellung der anatomischen Verteilung als optimal ermittelten Färbeniveaus und Kontrastes. Die Schnitte eines Primärantikörpers wurden gleichzeitig entnommen. Die Zeiten zwischen den einzelnen Primärantikörpern differierten. Ziel war es, sowohl ein gleichmäßiges Färbeniveau als auch einen gleichmäßigen Kontrast innerhalb einer Rezeptoruntereinheit bei den verschiedenen Versuchsdurchgängen zu erreichen. Als Negativkontrolle wurde bei im übrigen identischem Prozedere der erste oder zweite

Antikörper durch TBS pH 7,4 ersetzt. Nach abschließendem Waschen wurden die Schnitte mit Gelatine auf Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Behandlung mit Xylol wurden die Hirnschnitte mit Entellan (Merck) eingedeckt.

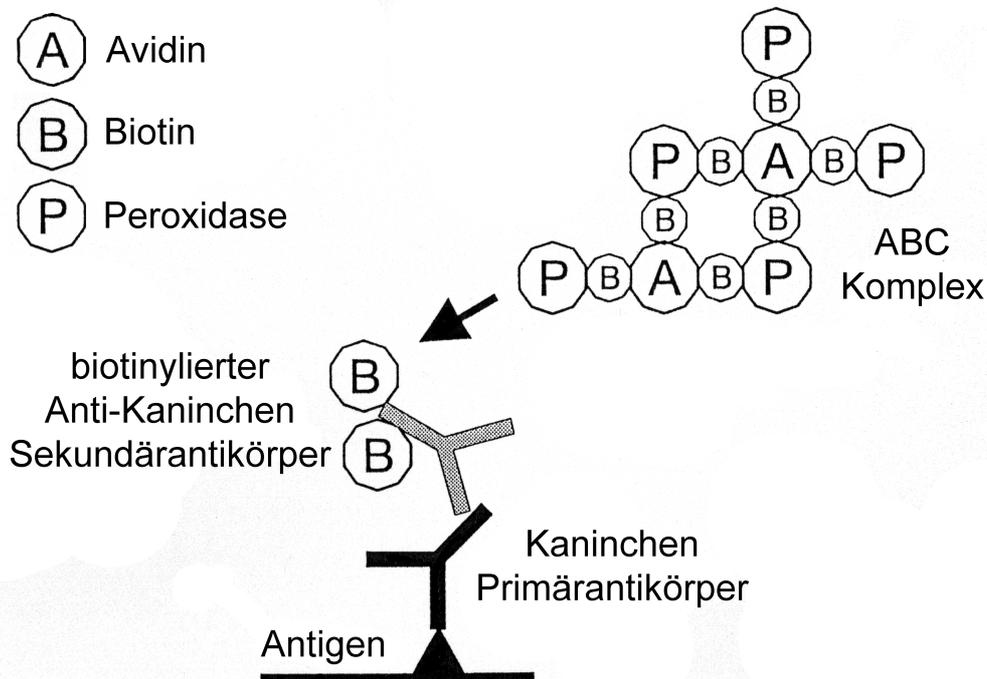


Abb. 2.2: Prinzip der Detektion nach der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode am Beispiel eines in Kaninchen hergestellten Primärantikörpers. Durch die an Avidin und Biotin gekoppelte Peroxidase wird das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) umgesetzt. Schema modifiziert nach Beesley (1993).

2.8 Histologie

Zur histologischen Beurteilung wurden zusätzlich Hirnschnitte nach Nissl mit Kresylviolett gefärbt. Dazu wurde die Schnitte zunächst mit Xylol entfettet und in einer absteigenden Ethanol-Reihe in Stufen von 100 %, 96 % und 70 % für je 2,5 min inkubiert. Der Färbeporgang erfolgt in Kresylviolett-Lösung bei 60 °C für 5 min. Zur anschließenden Dehydrierung wurden die vorbereitenden Schritte in umgekehrter Reihenfolge erneut durchlaufen. Abschließend wurden die Schnitte mit Entellan (Merck) eingedeckt.

2.9 Lösungen

Im folgendem werden die Zusammensetzungen der Lösungen beschrieben, die im Text nicht vollständig aufgeführt sind.

- 1) Tris-Puffer (TBS): Stocklösung Trizma Base (M_r 121,1): Tris 0,5 M 60,55 g/l und NaCl 1,5 M 73,3 g/l; Zur Herstellung von TBS pH 7,4 bzw. pH 7,7 wurde Stock 1:10 verdünnt und mit HCl auf pH 7,4 bzw. 7,7 titriert. Bei Bedarf wurde 0,05 % Triton zugefügt.
- 2) Phosphatgepufferte Normalsalzlösung (PBS) 0,1 M: Stock I (Base): 14,196 g Na_2HPO_4 anhydriert und 79,478 g NaCl in 1000,0 H_2O bidest; Stock II (Säure): 13,799 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 79,478 g NaCl in 1000,0 H_2O bidest; Zum Gebrauch: 1800,0 ml H_2O bidest und 35,0 ml Stock II mit ca. 165 ml Stock I auf pH 7,4 titriert.

- 3) Zitrat - Puffer: Stock I (Base: 0,2 M): 35.6 g/l Na₂HPO₄ anhydriert; Stock II (Säure: 0,1 M): 21,0 g/l Citric acid monohydriert; Zum Gebrauch: ca. 50 % des benötigten Volumen aus Stock II entnommen und mit Stock I auf pH 4,5 titriert.
- 4) Phosphatpuffer (PB 0,2 M): 22,99 g Na₂HPO₄ anhydriert und 5,25 g NaH₂PO₄ * H₂O in 1000,0 ml H₂O bidest
- 5) Fixativ für transkardiale Perfusion (Fixativ nach Zamboni): 500 ml PB 0,2 M, 150 ml Pikrinsäure (aus gesättigter Lösung), 40 g Paraformaldehyd (in 300 ml H₂O bidest bei 60 °C frisch aufgelöst und mit wenigen Tropfen NaOH geklärt), ad 1000,0 ml H₂O bidest und filtriert; Endkonzentration: PB 0,1 M, Paraformaldehyd 4 % (W/V), Pikrinsäure 15 % (V/V).
- 6) Kresylviolett-Lösung nach Nissl: 1,6326 g Natriumacetat wasserfrei, 2,8 ml Eisessig, 100 g Kresylviolett (Schmidt) in 300 ml H₂O bidest; Die Lösung wurde bei 60 °C hergestellt und filtriert.
- 7) Kryoprotektions-Lösungen: 10 % und 30 % (W/V) Saccharose in 0,1 M PBS pH 7,4

2.10 Digitale Datenauswertung

Die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden auf einem Helligkeitsstabilisierten Leuchttisch aufgelegt, und mit einer CCD-Kamera eingelesen. Das Kamerasignal wurde durch einen Videometrieprozessor (DVS-3000, Hamamatsu) digitalisiert, auf einen MacIntosh Computer (Apple IIfx) übertragen und mit der Bildbearbeitungssoftware (NIH-Image, 1.44β, 1.54) analysiert. Das Graustufenbild wurde zur übersichtlichen Darstellung in Falschfarben (Level 256) umgerechnet. Über den Videometrieprozessor waren Einstellungen von Kontrast und Intensitätsniveau möglich. Der Kontrast wurde verstärkt aber innerhalb einer Untergruppe gleicher GABA_A Rezeptoruntereinheiten nicht verändert. Zwischen den Untergruppen wurde eine Kontrastanpassung aufgrund der unterschiedlichen anatomischen Verteilungen der GABA_A Rezeptoruntereinheiten vorgenommen, um eine übersichtliche Darstellung der Verteilung zu erlangen. Das Intensitätsniveau wurde beim Einlesen jedes Schnittes so angepaßt, daß es in einem vergleichbaren Bereich mit den übrigen Schnitten einer GABA_A Rezeptoruntereinheit lag.

Ausgewertet wurden die neokortikalen Areale Fr1/Fr2, HL/FL, Par1 und Par2 jeweils beider Hemisphären (Abb. 2.3). Die Definition der Kortexareale erfolgte nach Zilles (1985). Zusätzlich wurden die Kortexschichten I - IV und V - VI des Dysplasiaareals und des korrespondierenden kontralateralen Bereiches ausgemessen (Abb.2.4). Beim Vorliegen einer Ektopie oder einer subkortikalen Heterotopie wurde dieser Bereich separat ausgemessen. Bei den Messungen wurde jeweils der mittlere semiquantitative Dichtewert des Areals und deren Fläche bestimmt. Zur Festlegung der Arealgrenzen wurden diese aus der zum jeweils vorliegendem Hirnschnitt vergleichbaren Ebene des Atlas des erwachsenen Rattengehirns von Zilles (1985) mit Bildbearbeitungssoftware in die Abbildungen der Hirnschnitte übertragen (Abb. 2.5). Dabei differierten die Arealgrenzen des Atlas teilweise geringfügig von denen durch die GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung suggerierten anatomischen Arealgrenzen, wobei letztere der Auswertung zugrunde gelegt wurden. Diese Entscheidung erfolgte aufgrund der hohen Spezifität der Immunhistochemie für definierte anatomische Bereiche (Fritschy und Mohler 1995). Die Dichte des Corpus callosum wurde als Hintergrundsignal von den Meßwerten des entsprechenden Hirnschnittes subtrahiert.

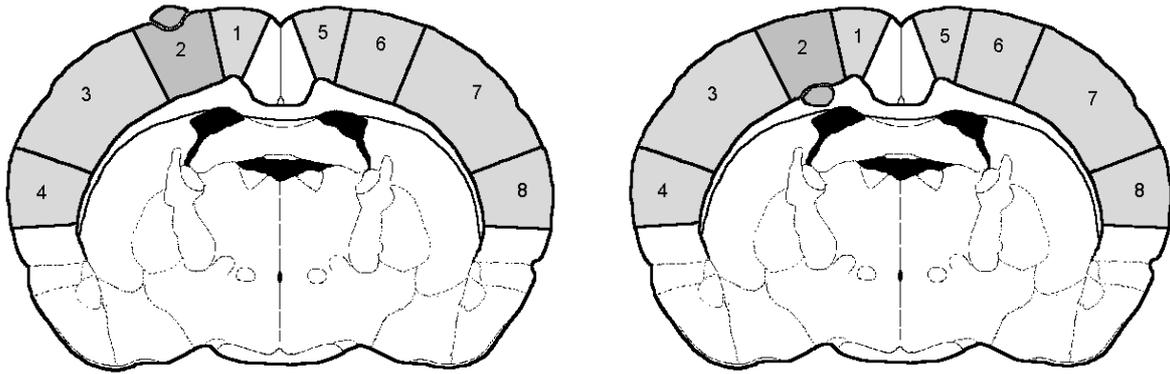


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Meßbereiche. Die mittlere optische Dichte wurde in den neokortikalen Arealen Fr1/Fr2 (1 und 5), HL/FL (2 und 6), Par1 (3 und 7) und Par2 (4 und 8) beider Hemisphären bestimmt. Das Areal HL/FL der ibotensäureinjizierten Hemisphäre entspricht dem Dysplasieareal, welches durch fokale kortikale Dysplasien (links) oder subkortikale Heterotopien (rechts) gekennzeichnet war. Modifiziert nach Zilles (1985) und Paxinos und Watson (1986).

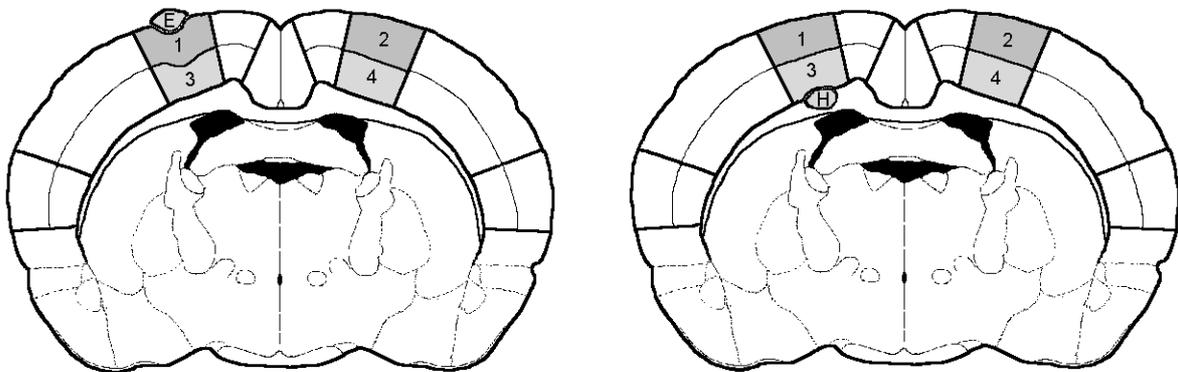


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Meßbereiche im Areal HL/FL. Die mittlere optische Dichte wurde in den Kortexschichten I – IV (1 und 2) und V – VI (3 und 4) der korrespondierenden Bereiche beider Hemisphären bestimmt. Bei Vorliegen einer Ektopie (E) oder einer subkortikalen Heterotopie (H) wurde dieser Bereich separat ausgemessen. Modifiziert nach Zilles (1985) und Paxinos und Watson (1986).

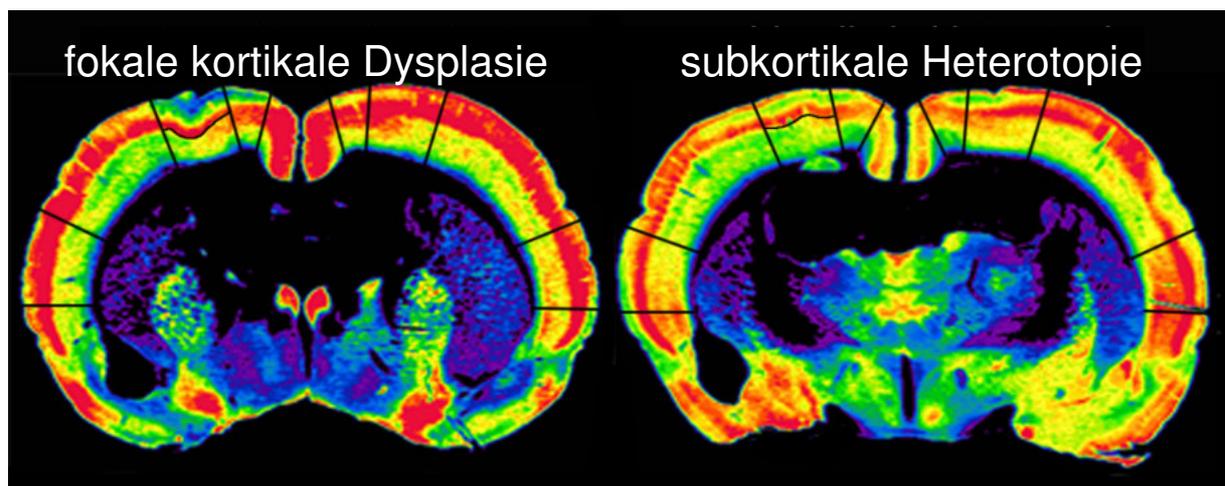


Abb. 2.5: Darstellung der Grenzziehung zwischen den Meßbereichen in immunhistochemisch behandelten Hirnschnitten. Als Beispiele sind Färbungen der GABA_A Rezeptoruntereinheit γ_2 aus den Untersuchungsgruppen fokale kortikale Dysplasie (links) und subkortikale Heterotopie (rechts) ausgewählt. Die semiquantitativen optischen Dichtewerte sind zur übersichtlichen Darstellung in Falschfarben (Level 256) umgerechnet.

2.11 Statistische Auswertung

Die quantitativen Daten der Dichtemessungen wurde mit Hilfe der Statistiksoftware Excel (Microsoft) und WinSTAT (R. Fitch Software) durchgeführt. Zur Überprüfung der Nullhypothese wurde der parametrische t-Test verwendet. Der t-Test wurde zweiseitig durchgeführt. Beim Vergleich der Daten zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hemisphäre wurde der t-Test für gepaarte bzw. verbundene Stichproben angewandt. Da die Anwendbarkeit dabei Normalverteilung voraussetzt, wurde dies für die Stichproben sowie für die Differenzen zwischen den verbundenen Stichproben durch den Test auf Normalverteilung nach Kolmogorov und Smirnov (K-S-Test) überprüft. Um dabei das Risiko eines β -Fehlers – fälschlicherweise Nullhypothese (H_0 : Stichprobe sei normalverteilt) annehmen – zu verringern, wurde bei einem $\alpha = 25\%$ -Niveau für H_0 entschieden. Anderenfalls wurde eine Normalverteilung abgelehnt und der Wilcoxon-Test, der keine Normalverteilung zur Voraussetzung hat, verwendet. Die Verwendung des Wilcoxon-Test ist in diesem Fall explizit erwähnt. Zur Beurteilung von Unterschieden zwischen nicht verbundenen Stichproben, wurde ein t-Test für unverbundene Stichproben angewandt, welcher neben einer Normalverteilung, die mittels K-S-Test überprüft wurde, einen nur zufälligen Unterschied der Varianzen beider Stichproben voraussetzt. Die Homogenität der Varianzen der zu vergleichenden Gruppen wurde mit dem F-Test untersucht. Eine Varianzenhomogenität wurde bei $p < 0,05$ abgelehnt. Bei Verletzung der Voraussetzung wurde der U-Test von Mann-Whitney für zwei unabhängige Stichproben eingesetzt. Lag ein Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen mit der Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ vor wurde dies als signifikant, bei einer Wahrscheinlichkeit $p < 0,01$ als sehr signifikant und für $p < 0,001$ als hoch signifikant beurteilt.

3.1 Morphologie der Malformationen

In der mit Ibotensäure am Tag der Geburt injizierten Experimentalgruppe zeigten sich typische morphologische Veränderungen (n=18) (Tabelle 3.1 und Abb. 3.1). Von den behandelten Wistar-Ratten zeigten 13 fokale kortikale Dysplasien in Form einer Abnahme der neuronalen Zelldichte tiefer Kortexschichten. Besonders dominierend in den Schichten V und VIa und eine gleichzeitige Verbreiterung der Schichten II und III. Die Kortexoberfläche war im Bereich der Dysplasie durch eine Sulcus- und Mikrogyrus-Bildung gekennzeichnet. Bei acht Tieren bildeten sich begleitend oberflächliche Neuronenpopulationen im Bereich der Lamina molecularis. Diese Ektopie wurde trichterförmig in die durch Einfaltung des Kortex entstandene Sulcus-Mikrogyrus-Formation eingebettet. Drei Tiere zeigten über den Bereich der Injektionsstelle hinausreichende zytoarchitektonische Veränderungen mit nach lateral reichenden Verlusten neuronaler Zellpopulationen und Migrationsstörungen. Die dadurch verursachte zusätzliche Mikrogyrus-Bildung führte zu einem dysmorphen Erscheinungsbild der betroffenen Hemisphären. Bei vier Tieren war ipsilateral zur Injektion der Seitenventrikel dilatiert. Die Auswertung der neokortikalen Fläche in aus der Dysplasie-region angefertigten Hirnschnitten ergab einen signifikant ($p < 0,01$) verminderten Neokortex in diesen Ebenen gegenüber der kontralateralen Hemisphäre.

Bei acht Tieren fanden sich subkortikal gelegene Neuronenpopulationen. Bei zwei dieser Tiere traten diese subkortikalen Heterotopien isoliert ohne gleichzeitige kortikale Mikrogyrus-Bildung auf. Bei sechs Tieren fand sich die subkortikale Heterotopie synchron zur kortikalen Mikrogyrus-Bildung in frontaler (n=1) oder okzipitaler (n=5) Verlängerung des in fronto-okzipitaler Ausrichtung verlaufenden Mikrogyrus. Die in der weißen Substanz liegenden Heterotopien befanden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum Kortex bzw. in einem Fall zum Thalamus. Bezüglich der neokortikalen Laminierung des die subkortikalen Heterotopien bedeckenden Kortex gab es unterschiedliche Muster. Bei zwei Tieren fand sich mit einer Verschmälerung der tiefen Kortexschichten V und VI und gleichzeitiger Verbreiterung der Schichten II und III ein übereinstimmender Befund zu den beschriebenen kortikalen Dysplasien. Im Gegensatz dazu trat bei vier Tieren im entsprechendem Kortexbereich eine Verbreiterung der Kortexschichten V und VI in Kombination mit einer Verschmälerung in den Kortexschichten II und III auf. Zwei Tiere zeigten lediglich ein wellenförmiges Erscheinungsbild der Laminierung ohne eindeutige Verschiebung der Proportionen zwischen den Kortexschichten.



Abb. 3.1: Histologische Darstellung der Malformationen im Bereich der Ibotensäureinjektion (Pfeil). In A + B liegt eine Mikrogyrus-Bildung vor, wobei in B zusätzlich eine Ektopie zur Darstellung kommt. In C ist eine subkortikale Heterotopie dargestellt (Pfeilspitzen).

Tabelle 3.1: Malformationen in der ibotensäureinjizierten Hemisphäre der Wistar-Ratten.

Tier	Morphologie			
	Mikrogyrus	Ektopie	subkortikale Heterotopie	dysmorphe Hemisphäre
24/06			X	
37/02	X	X		
40/05	X	X	X	
43/01				X
43/03				X
43/06	X	X		
43/08	X	X		
44/01				X
45/09	X	X		
45/11	X		X	
45/12	X			
49/01	X	X	X	
49/02	X		X	
49/03	X	X		
49/05	X			
49/06	X	X	X	
49/07	X		X	
49/08			X	
Häufigkeit	13	8	8	3

Bei sieben der mit Ibotensäure injizierten Tieren fanden sich keinerlei Veränderungen in Form von Mikrogyrus-Bildung oder subkortikaler Heterotopie.

Insgesamt wurden 13 Kontrolltiere untersucht. Die fünf zuerst untersuchten Tiere waren SHAM operiert und wiesen keine Veränderungen hinsichtlich Kortexstruktur oder Laminierung auf. Die anschließend untersuchten acht Kontrolltiere waren unbehandelt und zeigten wie SHAM behandelte Tiere keine morphologischen Veränderungen, wie sie bei mit Ibotensäure behandelten Tieren beobachtet werden konnten.

3.2 Verteilungsmuster der GABA_A Rezeptoruntereinheiten bei Kontroll-Tieren

Für die untersuchten GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ ergab sich ein selektives Verteilungsmuster für definierte Neuronenpopulationen. Die Grenzen zwischen Bereichen unterschiedlicher Rezeptorausstattungen sind kongruent zu anatomischen Arealgrenzen. Es wurden Koronarschnitte im Bezug zu Bregma aus dem Bereich +0.5 mm bis -2.5 mm angefertigt und immunhistochemisch behandelt. Unter den untersuchten GABA_A Rezeptoruntereinheiten ergab sich die ausgeprägteste Immunreaktivität für die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\gamma 2$, die über weite Bereiche des Gehirns eine hohe Dichte bei ähnlichem Verteilungsmuster aufwiesen. Die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ zeigten geringere Intensitäten, obgleich in spezifischen Hirnarealen hohe Dichtewerte zu beobachten waren. Im Neokortex gab es nur geringe Unterschiede in der Verteilung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten zwischen verschiedenen Kortexarealen mit Ausnahme der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ die parietal eine geringere und im frontal motorischen Kortex eine höhere Dichte aufwiesen. Die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$ und $\gamma 2$ zeigten eine hohe Intensität in den Schichten III und IV, die Schichten I und VIa waren ebenfalls deutlich gefärbt, während die übrigen Schichten eine geringere Immunreaktivität aufwiesen.

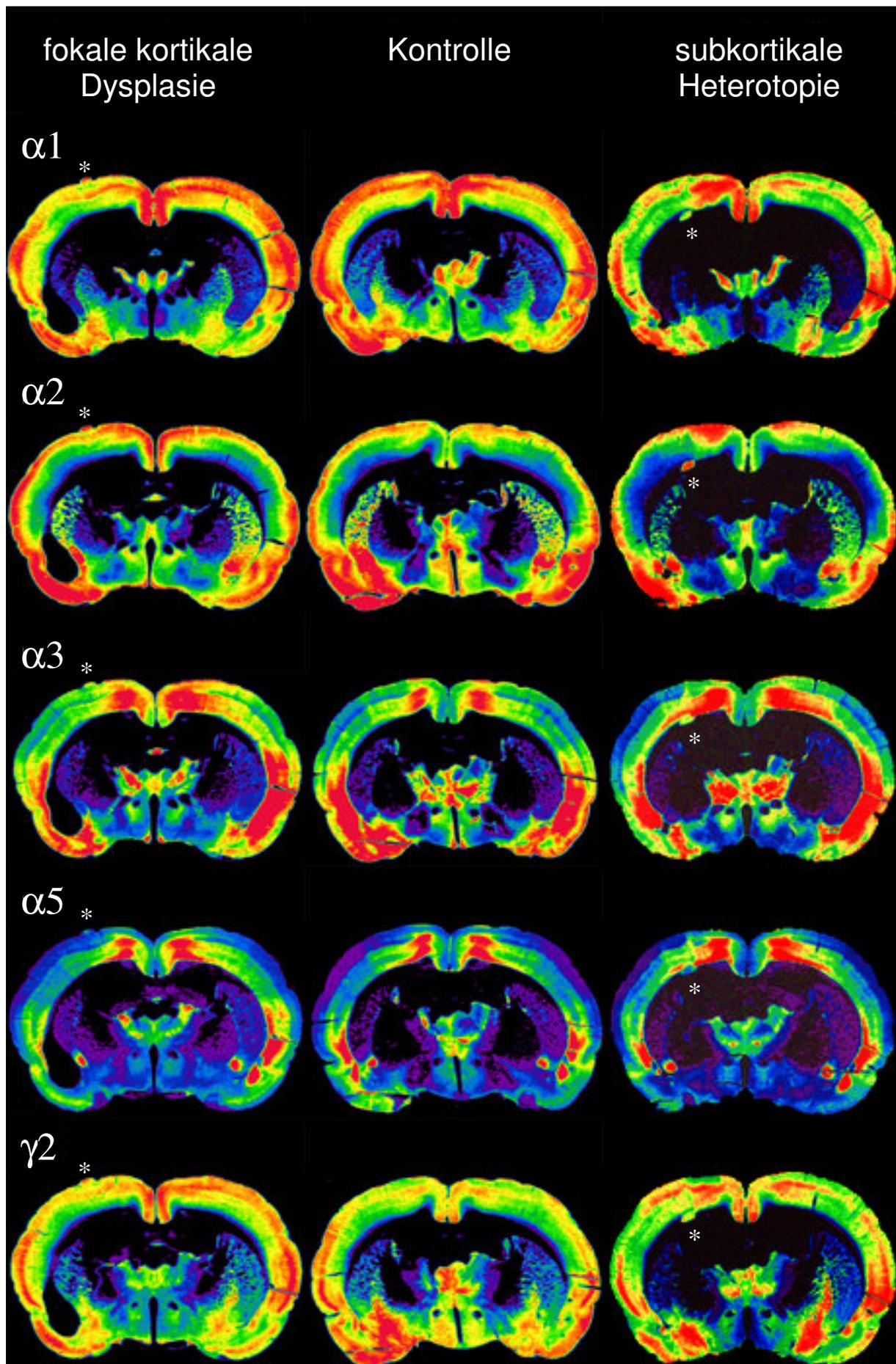


Abb. 3.2: Übersicht der immunhistochemisch dargestellten GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung. Die Verteilung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ ist jeweils dargestellt am Beispiel eines Tieres aus der Untersuchungsgruppe fokale kortikale Dysplasie und aus der Untersuchungsgruppe subkortikale Heterotopie. Die pathologischen Strukturen sind durch Sterne gekennzeichnet. Zusätzlich ist eine Kontrolle dargestellt. Die Hirnschnitte wurden konsekutiv im Bereich Bregma $-1,3$ mm angefertigt. Die semiquantitativen optischen Dichtewerte sind zur übersichtlichen Darstellung in Falschfarben (Level 256) umgerechnet.

Für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ war eine starke Anfärbung der Kortexschichten I – IV, bei geringerer Dichte in den Kortexschichten V und VI zu erkennen. Komplementär dazu war die Immunoreaktivität der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ in den neokortikalen Schichten V und VI ausgeprägt. Bei der Untereinheit $\alpha 5$ lag die Betonung auf Schicht VIb. Die Kortexschichten I – IV zeigten demgegenüber nur eine schwache Immunoreaktivität für die Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$. Allokortikale Bereiche wiesen hohe Dichtewerte für die Untereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 3$ bei ebenfalls deutlicher Anwesenheit der Untereinheiten $\alpha 1$ und $\gamma 2$ auf. Die Untereinheit $\alpha 5$ zeigte im Allokortex eine geringe Präsenz. Der Hippokampus offenbarte eine hohe Dichte an GABA_A Rezeptoruntereinheiten, deren spezifische Verteilung auf deutlich abgrenzbare Abschnitte den anatomischen Aufbau widerspiegelt. Die Immunoreaktivität des Hippokampus für die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ war sehr hoch bei ebenfalls deutlicher Darstellung für die Untereinheit $\alpha 1$ und schwacher Darstellung für die Untereinheit $\alpha 3$. Im Thalamus war die Immunoreaktivität der Untereinheiten $\alpha 1$ und $\gamma 2$ stark bei nur geringer Anfärbbarkeit für die Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$. Das Corpus Striatum war durch hohe Intensität der Untereinheiten $\alpha 2$ und $\gamma 2$ und geringe Intensität der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ gekennzeichnet. Die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ war im Corpus Striatum kaum nachweisbar. Die Abbildung 3.2 gibt eine vergleichende Übersicht über die Verteilung der Immunoreaktivität für die untersuchten GABA_A Rezeptoruntereinheiten.

3.3 Ergebnisse in der Untersuchungsgruppe: fokale kortikale Dysplasie

3.3.1 Areal spezifische Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung in der Umgebung fokaler kortikaler Dysplasien

Bereich der Auswertung

Bei 13 der mit Ibotensäure am Tag der Geburt injizierten Tiere entwickelten sich fokale kortikale Dysplasien. Die morphologischen Veränderungen befanden sich im Bereich der Kortexareale HL/FL, bei zwei Tieren an der Grenze zwischen den Arealen HL/FL und Fr1/Fr2. Aus dem Abschnitt der ausgeprägtesten strukturellen Kortexveränderung wurde mittels Immunhistochemie in unmittelbar aufeinanderfolgenden Koronarschnitten (Schnittdicke 50 μ m) das Verteilungsmuster der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ visualisiert. Durch die Auswahl aufeinanderfolgender Schnitte wurde erreicht, daß diese in einer für die verschiedenen Rezeptoruntereinheiten vergleichbaren Ebene lagen. Bei der semiquantitativen Auswertung wurden die optischen Dichtewerte sowohl für das dysplastisch veränderte Areal HL/FL als auch für die in der gleichen Ebene liegenden neokortikalen Areale Fr1/Fr2, Par1 und Par2 bestimmt. In den korrespondierenden Kortexarealen der kontralateralen Hemisphäre wurden die entsprechenden Meßwerte erhoben und denen der mit Ibotensäure behandelten Hemisphäre gegenübergestellt. Die Daten der absoluten Dichtewerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Prozentuale Unterschiede sind normiert auf die kontralaterale Kontrollregion. Als Kontrollregion fungiert das homotope Areal der nicht injizierten Hemisphäre. Die Prozentangaben entsprechen dem Mittelwert der relativen Unterschiede zwischen korrespondierenden Kortexarealen.

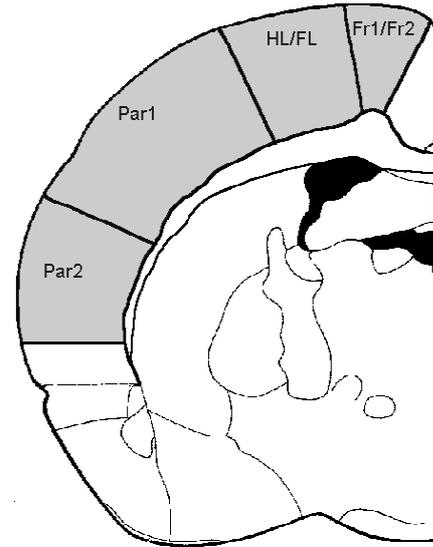
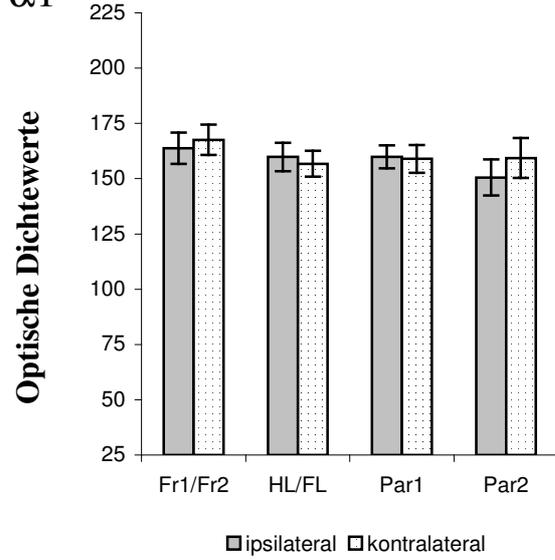
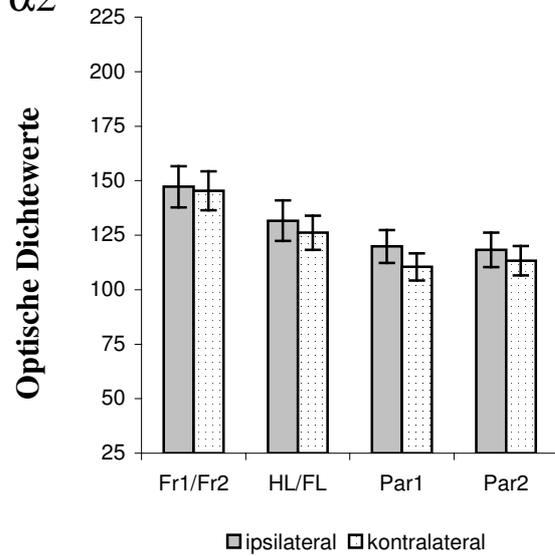
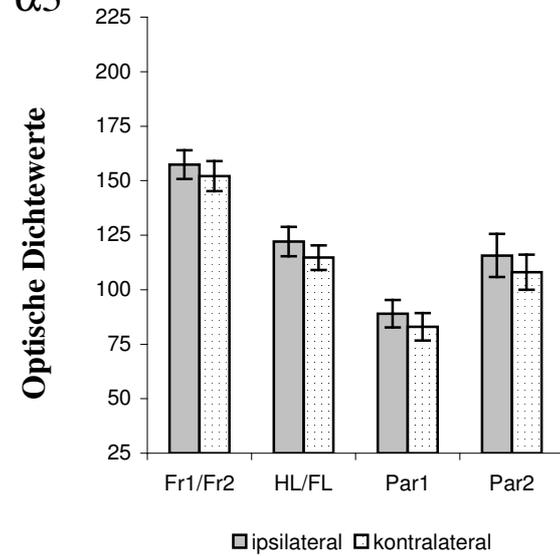
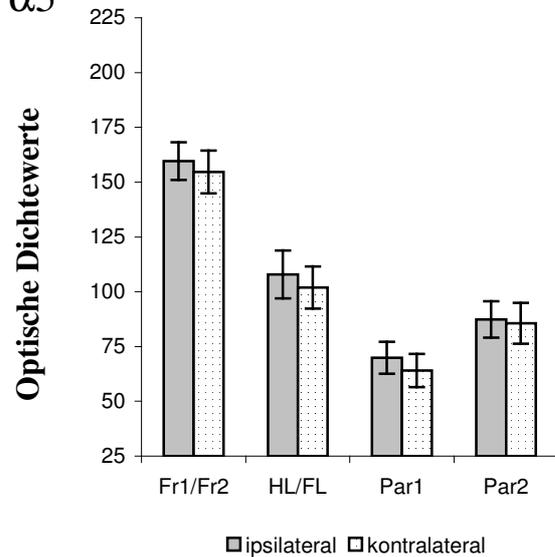
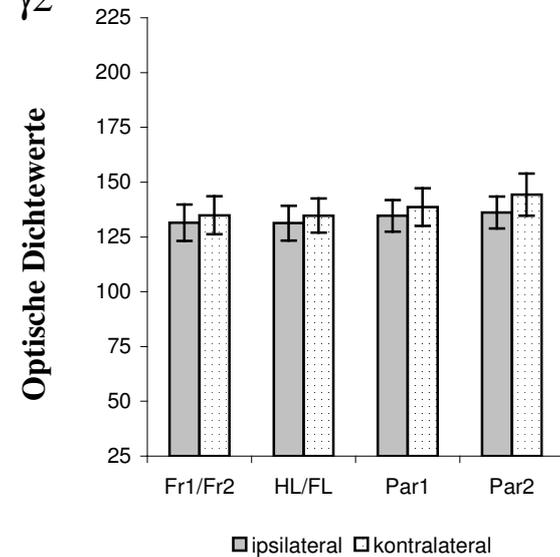
α_1  α_2  α_3  α_5  γ_2 

Abb. 3.3: Areal spezifische Auswertung der GABA_A-Immunhistochemie bei Kontrolltieren. Dargestellt sind die absoluten Dichtewerte der semiquantitativen optischen Auswertung. Dabei wurden in der seitenvergleichenden Untersuchung neokortikaler Areale keine signifikanten Unterschiede der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung beobachtet.

Die statistische Analyse der Unterschiede zwischen ipsilateralen und kontralateralen Arealen wurde mittels t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt. In der Gruppe der Kontrolltiere (n=13) wurden bei identischer Auswertung in der seitenvergleichenden Untersuchung neokortikaler Areale keine signifikanten Unterschiede der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung beobachtet (Abb. 3.3).

Untersuchung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ in Hirnschnitten mit fokaler kortikaler Dysplasie

Für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ (n=13) ergab die semiquantitative Analyse für den frontal motorischen Kortex Fr1/Fr2 der ipsilateralen Hemisphäre eine optische Dichte von $164,8 \pm 24,9$ und kontralateral von $170,4 \pm 20,2$. Der mittlere relative Unterschied zwischen ipsilateralen und kontralateralen Areal Fr1/Fr2 von $-2,2 \%$ war nicht signifikant (Wilcoxon-Test). Im Dysplasieareal HL/FL zeigte sich eine signifikante Abnahme der Immunoreaktivität von $-9,2 \%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollregion. Die absoluten Dichtewerte betragen ipsilateral $147,2 \pm 27$ und kontralateral $162,9 \pm 19,5$. Für das Areal Par1 ergab sich eine signifikante Abnahme von $-10,5 \%$ ($p < 0,01$). Die Mittelwerte der Dichte betragen ipsilateral $151,8 \pm 24,3$ und kontralateral $170,2 \pm 18,3$. Im Areal Par2 fand sich im Seitenvergleich ebenfalls eine signifikante Abnahme der Untereinheit $\alpha 1$ von $-9,5 \%$ ($p < 0,01$) in der läsierten Hemisphäre. Die absoluten optischen Dichtewerte beliefen sich im Areal Par2 ipsilateral auf $153,2 \pm 20,9$ und kontralateral auf $169,6 \pm 16,1$ (Abb. 3.4).

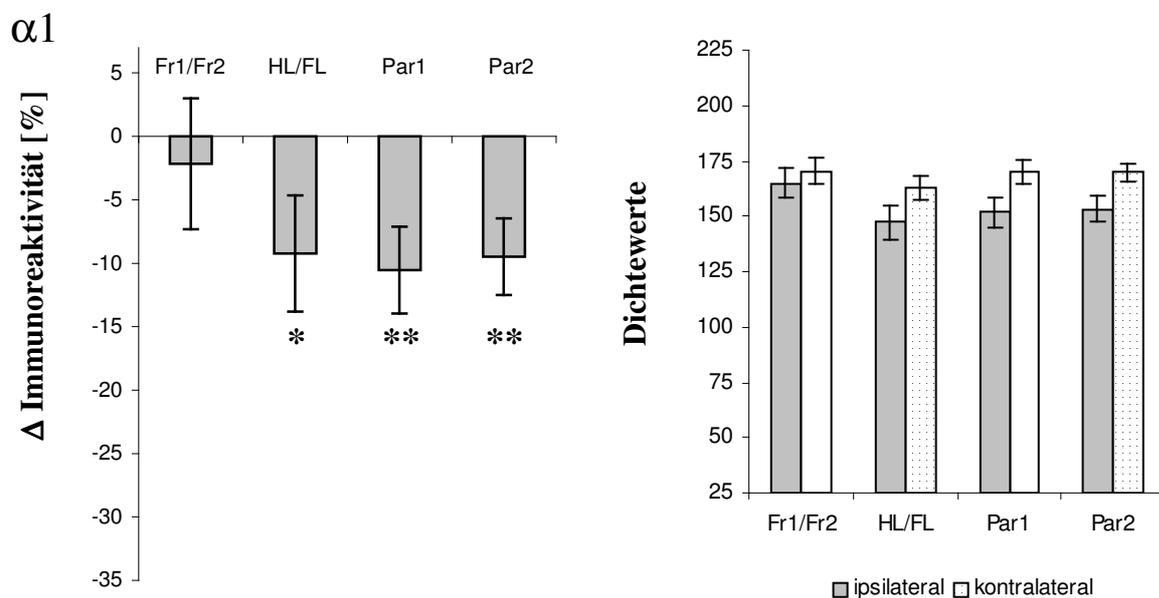


Abb. 3.4: Areal spezifische semiquantitative Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ in der Ebene der fokalen kortikalen Dysplasie. Links: Darstellung der prozentualen optischen Dichteminderung der ibotensäure-injizierte Hemisphäre in Relation zur Gegenseite. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (t-Test, $p < 0,05$) bzw. zwei Sterne (t-Test, $p < 0,01$) gekennzeichnet. Rechts: Darstellung der absoluten Dichtewerte korrespondierender neokortikaler Areale.

Untersuchung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ in Hirnschnitten mit fokaler kortikaler Dysplasie

Im Bereich Fr1/Fr2 fanden sich für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ (n=13) optische Dichtewerte von $142,2 \pm 19,9$ auf der Seite der Dysplasie und kontralateral von $141 \pm 26,7$. Der mittlere prozentuale Unterschied zwischen den homotopen Arealen betrug $+2,6 \%$ (nicht signifikant). Die optische Dichte im Areal der Dysplasie HL/FL betrug $124,9 \pm 16,5$, im Areal HL/FL der Gegenseite $126,4 \pm 25,8$. Der mittlere relative Unterschied von $+1,4 \%$ war nicht signifikant. Im Vergleich der Immunoreaktivität der Areale Par1 und Par2 zur Gegenseite waren bei mittleren prozentualen Unterschieden von $+1,1 \%$ bzw. $+5,6 \%$ bezogen auf die kontralaterale Hemisphäre ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Die Absolutwerte in den neokortikalen Arealen Par1 und Par2 betragen ipsilateral $119,2 \pm 24,2$ bzw. $130,6 \pm 20,7$. Die Werte der korrespondierenden kontralateralen Areale beliefen sich auf $119,7 \pm 19,6$ bzw. $126,3 \pm 24,5$ (Abb. 3.5).

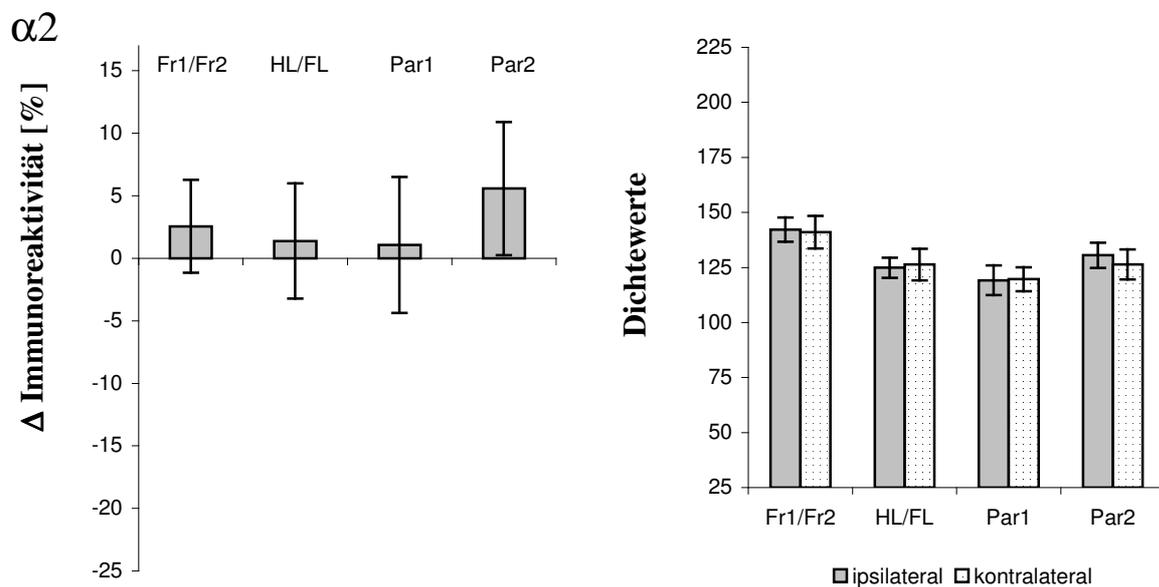


Abb. 3.5: Areal-spezifische semiquantitative Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ in der Ebene der fokalen kortikalen Dysplasie. Links: Dargestellt ist der prozentuale optische Dichteunterschied der ibotensäure-injizierten Hemisphäre in Relation zur Gegenseite. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede der optischen Dichte im Hemisphärenvergleich. Rechts: Darstellung der absoluten Dichtewerte korrespondierender neokortikaler Areale.

Untersuchung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 3$ in Hirnschnitten mit fokaler kortikaler Dysplasie

Die Immunoreaktivität für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 3$ (n=13) lag im frontal motorischen Kortex Fr1/Fr2 beider Hemisphären bei Werten ipsilateral von $155,4 \pm 40,3$ bzw. kontralateral von $160,1 \pm 35,1$ auf einem höherem Intensitätsniveau gegenüber den lateral gelegenen neokortikalen Areale. Dies spiegelt eine lokale Präferenz der Untereinheit $\alpha 3$ für diesen Bereich wider. Im Seitenvergleich ergab sich kein signifikanter Unterschied bei einer durchschnittlich um $-3,5 \%$ verminderten Dichte. Im Bereich der fokalen kortikalen Dysplasie HL/FL fand sich eine signifikante Abnahme der optischen Dichte um $-13,7 \%$ ($p < 0,01$) im Vergleich zum korrespondierenden Areal HL/FL der kontralateralen Hemisphäre. Die Absolutwerte der entsprechenden Bereiche lagen ipsilateral bei $105,5 \pm 34,4$ und kontralateral bei $121,9 \pm 35,1$. Im zur Dysplasie benachbarten Areal Par1 fanden sich optische Dichtewerte von $81,7 \pm 29$ und in der Kontrollregion von $98,5 \pm 36,1$. Der Unterschied von $-14,7 \%$

($p < 0,05$) im Vergleich zur Region Par1 der Gegenseite war signifikant. Parallel dazu war auch im Areal Par2 bei Absolutwerten ipsilateral von $106,7 \pm 35,1$ und kontralateral von $127,7 \pm 36,9$ eine um $-16,3 \%$ ($p < 0,01$) signifikant reduzierte Immunoreaktivität zu beobachten (Abb. 3.6).

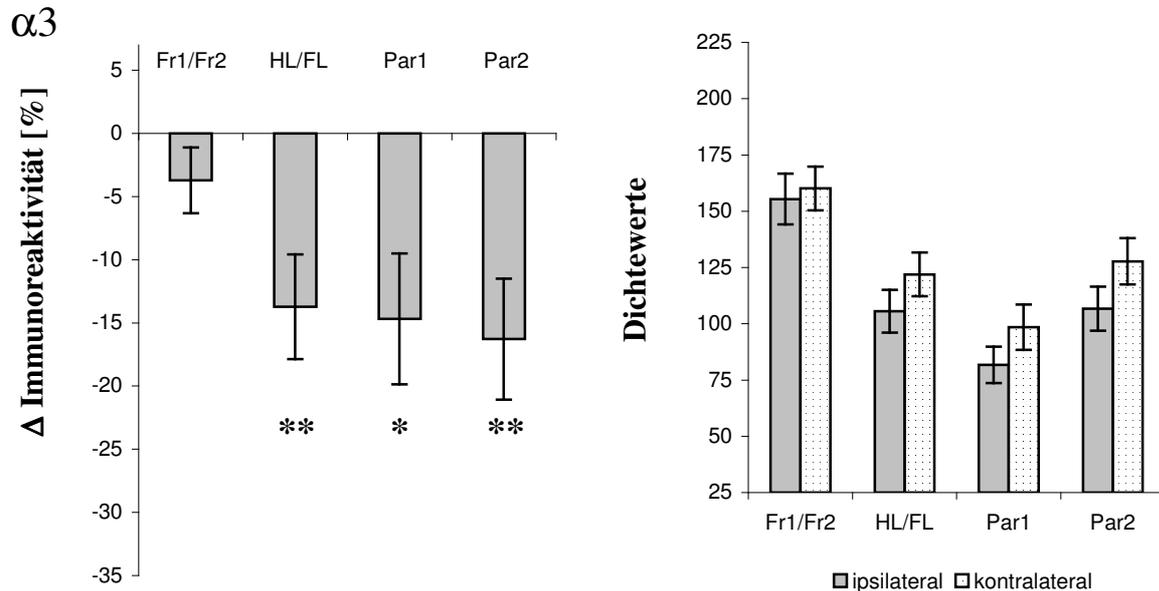


Abb. 3.6: Areal-spezifische semiquantitative Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 3$ in der Ebene der fokalen kortikalen Dysplasie. Links: Dargestellt ist die prozentuale optische Dichteminderung der ibotensäure-injizierten Hemisphäre in Relation zur Gegenseite. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (t-Test, $p < 0,05$) bzw. zwei Sterne (t-Test, $p < 0,01$) gekennzeichnet. Rechts: Darstellung der absoluten Dichtewerte korrespondierender neokortikaler Areale.

Untersuchung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 5$ in Hirnschnitten mit fokaler kortikaler Dysplasie

Die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 5$ ($n=11$) zeigte wie die Untereinheit $\alpha 3$ eine, in Relation zu den parietal gelegenen neokortikalen Arealen, erhöhte Immunoreaktivität im frontal motorischen Kortex. Die absoluten Meßwerte lagen ipsilateral bei $150,8 \pm 17,5$ und kontralateral bei $157,4 \pm 20,3$. Der Unterschied von $-3,7 \%$ im Seitenvergleich war nicht signifikant. Das dysplastisch veränderte Areal HL/FL wies eine signifikant reduzierte optische Dichte von $-18,8 \%$ ($p < 0,01$) gegenüber der kontralateralen Kontrollregion auf. Die entsprechenden Absolutwerte betragen ipsilateral $79,1 \pm 10,8$ und kontralateral $100,2 \pm 18,5$. Parallel dazu traten bezogen auf die korrespondierenden Areale der Gegenseite signifikante Unterschiede in den Arealen Par1 und Par2 von $-27,5 \%$ ($p < 0,001$) bzw. $-25,1 \%$ ($p < 0,01$) auf. Die absoluten Meßwerte der Areale Par1 und Par2 betragen ipsilateral $50,3 \pm 11,1$ bzw. $66 \pm 18,3$ und kontralateral $70,5 \pm 15,8$ bzw. $90,2 \pm 18,8$ (Abb. 3.7).

Untersuchung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\gamma 2$ in Hirnschnitten mit fokaler kortikaler Dysplasie

Im frontal motorischen Kortex fand sich im Vergleich zum kontralateralen Areal eine signifikant verminderte Dichte für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\gamma 2$ ($n=13$) mit einer mittleren prozentualen Abnahme von -8% ($p < 0,01$). Die entsprechenden Absolutwerte im Areal Fr1/Fr2 betragen ipsilateral $142,6 \pm 22,4$ und kontralateral $155,7 \pm 25$. Im Dysplasieareal HL/FL war die optische Dichte für die Untereinheit $\gamma 2$ bei Absolutwerten von ipsilateral $138,4 \pm 18,7$ und kontralateral $159,2 \pm 23,6$ in Relation zur Kontrollregion

signifikant um -12% ($p < 0,01$) vermindert. Im Areal Par1 betragen die absoluten optischen Dichtewerte $151 \pm 24,2$ ipsilateral zur Dysplasie und $157,6 \pm 18,9$ kontralateral. Der mittlere relative Unterschied zwischen den korrespondierenden Arealen Par1 lag bei $-3,8\%$ (nicht signifikant). In den korrespondierenden Arealen Par2 fand sich bei einem mittleren prozentualen Unterschied von $-4,4\%$ ebenfalls keine signifikante Differenz bei Meßwerten von ipsilateral $153,2 \pm 22,1$ und kontralateral $161,2 \pm 23,5$ (Abb. 3.8).

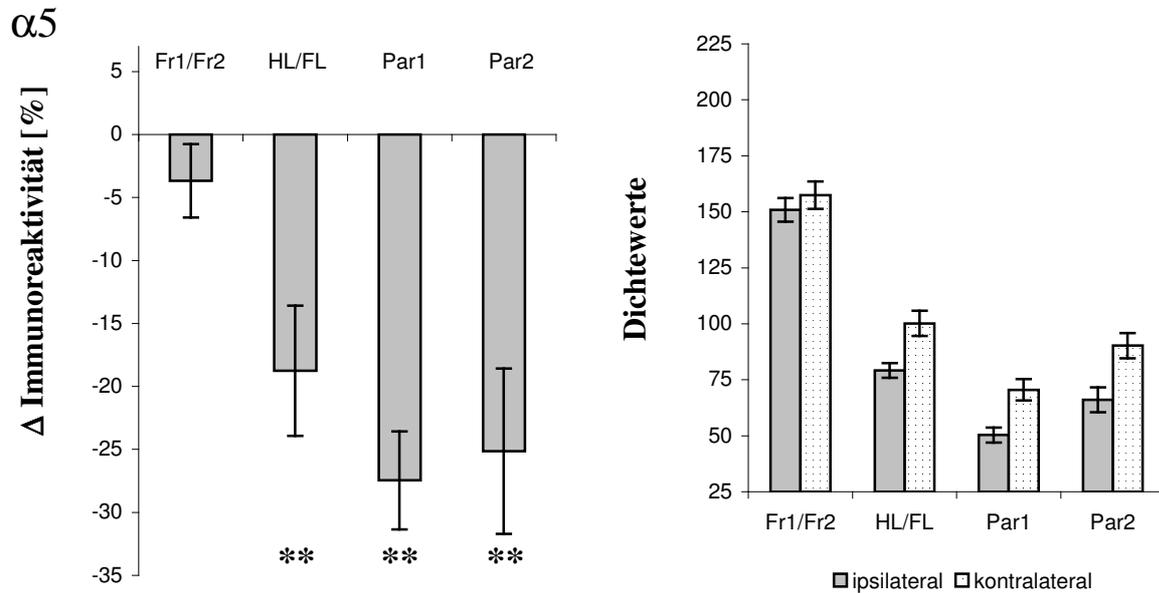


Abb. 3.7: Areal-spezifische semiquantitative Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 5$ in der Ebene der fokalen kortikalen Dysplasie. Links: Dargestellt ist die prozentuale optische Dichteminderung der ibotensäure-injizierten Hemisphäre in Relation zur Gegenseite. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (t-Test, $p < 0,05$) bzw. zwei Sterne (t-Test, $p < 0,01$) gekennzeichnet. Rechts: Darstellung der absoluten Dichtewerte korrespondierender neokortikaler Areale.

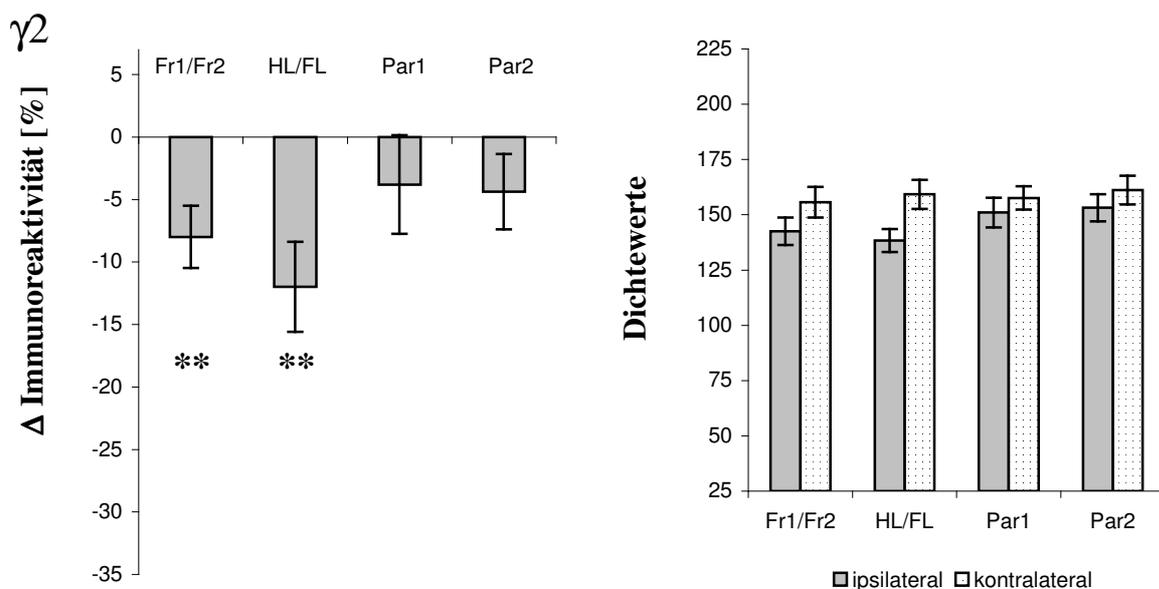


Abb. 3.8: Areal-spezifische semiquantitative Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\gamma 2$ in der Ebene der fokalen kortikalen Dysplasie. Links: Dargestellt ist die prozentuale optische Dichteminderung der ibotensäure-injizierten Hemisphäre in Relation zur Gegenseite. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (t-Test, $p < 0,05$) bzw. zwei Sterne (t-Test, $p < 0,01$) gekennzeichnet. Rechts: Darstellung der absoluten Dichtewerte korrespondierender neokortikaler Areale.

3.3.2 GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung im Areal der fokalen kortikalen Dysplasie

Seitenvergleich der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung in den Kortexschichten I – IV und V – VI des Dysplasieareals

Der Bereich der fokalen kortikalen Dysplasien war durch die in Kapitel 3.1 beschriebenen Laminierungsstörungen gekennzeichnet. In den morphologisch unterschiedlich veränderten Bereichen der Kortexschichten I – IV bzw. der Kortexschichten V – VI wurden die optischen Dichtewerte für die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ getrennt ermittelt. In dem durch die fokale Dysplasie veränderten Areal HL/FL wurden die Meßbereiche in die Kortexschichten I – IV bzw. V – VI gelegt. Dabei wurden die ektopen Neuronenpopulationen nicht einbezogen. In der korrespondierenden Kontrollregion der kontralateralen Hemisphäre wurden ebenfalls Dichtewerte in den Kortexschichten I – IV bzw. V – VI bestimmt. Zur statistischen Analyse wurde der t-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Bei Kontrolltieren (n=13) wurden entsprechende Daten in den Arealen HL/FL beider Hemisphären erhoben. Hierbei war im Seitenvergleich keine signifikanter Unterschied in der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung zu beobachten.

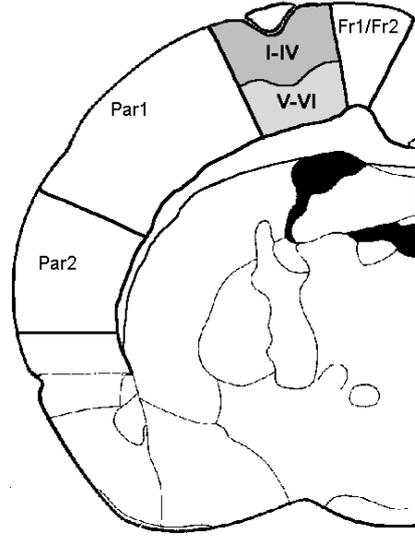
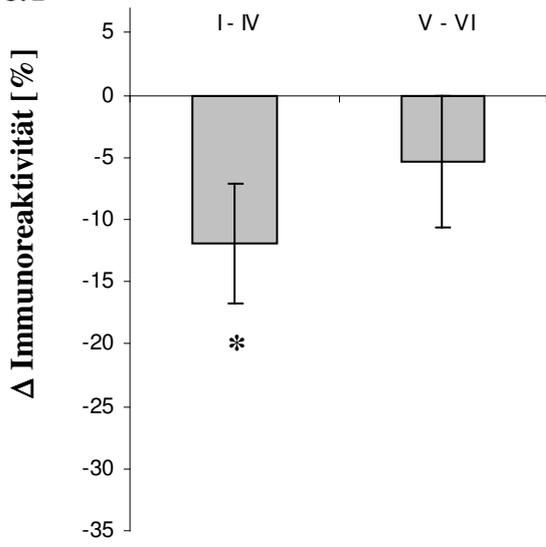
Für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ (n=13) war in den äußeren Kortexschichten I – IV der Dysplasie-region eine um $-11,9\%$ ($p < 0,05$) signifikant gegenüber der kontralateralen Kontrollregion geminderte Immunoreaktivität zu beobachten. Die durchschnittlichen optischen Dichtewerte betragen ipsilateral $159 \pm 30,8$ und kontralateral $181,1 \pm 21,3$. In den tiefen Kortexschichten V – VI des Dysplasieareals fand sich für die Untereinheit $\alpha 1$ bei Absolutwerten von ipsilateral $135,4 \pm 28,2$ und kontralateral $144,1 \pm 20,1$ eine mittlere prozentuale Differenz von $-5,2\%$ (nicht signifikant).

Die immunhistochemische Untersuchung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ (n=13) im dysplastisch veränderten Areal HL/FL ergab im Bezug auf die kontralateral gelegene Kontrollregion eine mittlere prozentuale Differenz von -3% (nicht signifikant) in den Kortexschichten I – IV und von $-1,3\%$ (nicht signifikant) in den Kortexschichten V – VI. Die Absolutwerte betragen für die Kortexschichten I – IV ipsilateral $155,6 \pm 22,6$ bzw. kontralateral $163,9 \pm 33,8$ und für die Kortexschichten V – VI ipsilateral $91,6 \pm 13,1$ bzw. kontralateral 96 ± 20 .

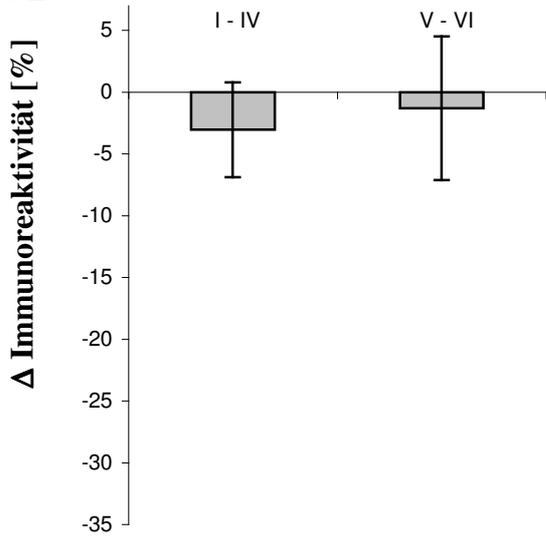
Für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 3$ (n=13) wurde im Bereich der fokalen kortikalen Dysplasie in den Kortexschichten I – IV eine um $-15,3\%$ ($p < 0,01$) und in den tiefen Kortexschichten V – VI eine um $-8,1\%$ ($p < 0,05$) reduzierte Immunoreaktivität gegenüber den korrespondierenden Meßbereichen der kontralateralen Hemisphäre nachgewiesen. Die entsprechenden absoluten Meßwerte betragen im Bereich der Kortexschichten I – IV ipsilateral $82,5 \pm 35,2$ bzw. kontralateral $96,9 \pm 37,7$ und in den Kortexschichten V – VI ipsilateral $134,7 \pm 29,5$ bzw. kontralateral $148,2 \pm 31,9$.

Die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 5$ (n=11) zeigte in den neokortikalen Schichten V – VI mit optischen Dichtewerten von ipsilateral $122,2 \pm 19,7$ bzw. kontralateral $137,9 \pm 22,1$ gegenüber den Kortexschichten I – IV mit Werten von ipsilateral $40,7 \pm 13$ bzw. kontralateral $59,6 \pm 24,9$ eine stärkere Immunoreaktivität. Der Seitenvergleich mit korrespondierenden Meßbereichen der kontralateralen Hemisphäre ergab sowohl für die Kortexschichten I – IV mit $-25,3\%$ ($p < 0,01$), als auch für die tiefen Kortexschichten V – VI mit $-10,2\%$ ($p < 0,05$) eine signifikante verringerte Dichte im Bereich der fokalen kortikalen Dysplasie.

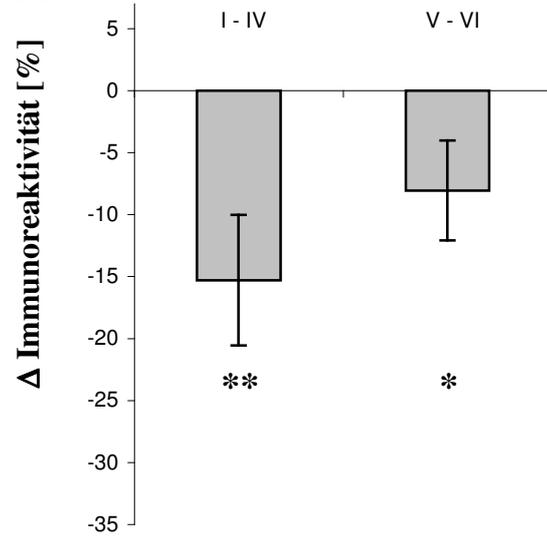
$\alpha 1$



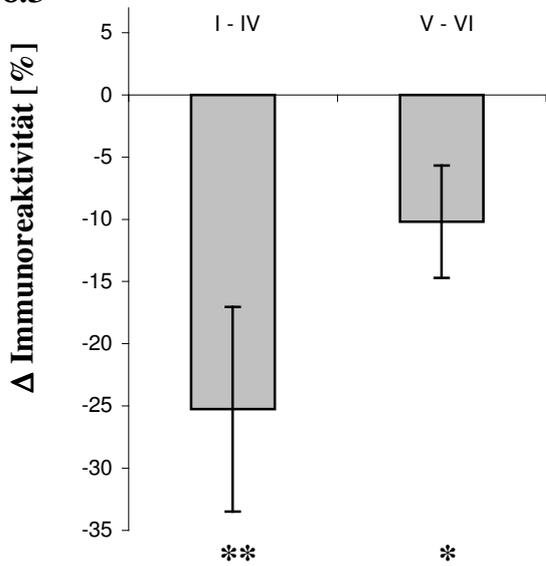
$\alpha 2$



$\alpha 3$



$\alpha 5$



$\gamma 2$

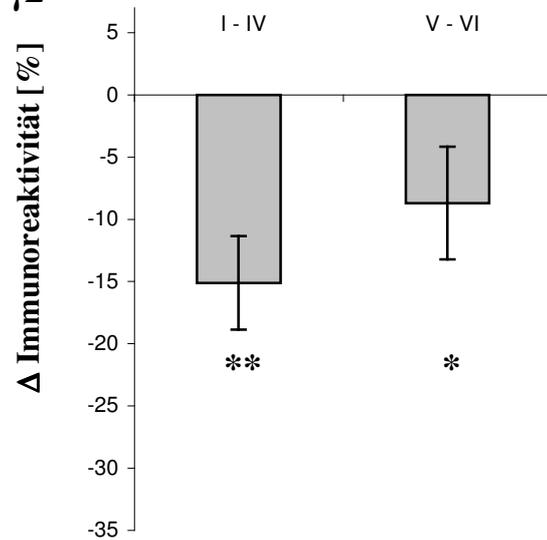


Abb. 3.9: Laminaspezifische Auswertung der GABA_A-Immunhistochemie nach Ibotensäureläsion im Areal fokaler kortikaler Dysplasien. Dargestellt ist die prozentuale optische Dichteminderung der Kortexschichten I – IV und V – VI innerhalb der Dysplasieareale in Relation zur Gegenseite. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (t-Test, p<0,05) bzw. zwei Sterne (t-Test, p<0,01) gekennzeichnet.

Im dysplastisch veränderten Areal HL/FL ergab sich für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\gamma 2$ (n=13) eine signifikante Abnahme im Vergleich zur kontralateralen Kontrollregion in den äußeren Kortexschichten I – IV um durchschnittlich –15,1 % (p<0,01). Die Absolutwerte lagen ipsilateral bei $145,3 \pm 20,8$ und kontralateral bei $174 \pm 29,5$. Die Abnahme in den Kortexschichten V – VI um –8,7 % (p<0,05) bei Absolutwerten von ipsilateral $130,2 \pm 23,2$ bzw. kontralateral von $144,6 \pm 24,3$ war ebenfalls signifikant gegenüber der Gegenseite.

Eine Übersicht über die relativen Unterschiede in der seitenvergleichenden Auswertung liefert die Abbildung 3.9.

Vergleich der Veränderungen zwischen den Kortexschichten I – IV und V – VI

Der Schwerpunkt der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation im Areal der Dysplasie lag in den äußeren neokortikalen Schichten I – IV. Die prozentualen Veränderungen zwischen Dysplasieareal und kontralateraler Kontrollregion zeigten in den Kortexschichten I – IV eine stärkere Abnahme als in den tiefen Kortexschichten V – VI. Der mittels t-Test für verbundene Stichproben durchgeführte Vergleich unter gleichzeitiger Betrachtung aller untersuchter GABA_A Rezeptoruntereinheiten zeigte eine signifikant (p<0,001) stärkere prozentuale Abnahme in Relation zur korrespondierenden Kontrollregion in den Kortexschichten I – IV gegenüber den Kortexschichten V – VI. Die Verringerung der Absolutwerte gegenüber der homotopen Kontrollregion der kontralateralen Hemisphäre war in den Kortexschichten I – IV des Dysplasieareals ebenfalls signifikant stärker ausgeprägt (p<0,001) als in den Kortexschichten V – VI. Zur Analyse der Differenzen zwischen Absolutwerten wurde der t-Test für verbundene Stichproben unter Berücksichtigung immunhistochemischer Färbungen aller untersuchter GABA_A Rezeptoruntereinheiten verwendet. Die differenzierte Betrachtung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$ und $\gamma 2$ ergab, daß sowohl die Abnahme der absoluten Dichtewerte als auch die relativen Unterschiede, jeweils bezogen auf die homotope Kontrollregion der kontralateralen Hemisphäre, in den Kortexschichten I – IV signifikant (p<0,05) stärker ausgeprägt waren als in den Kortexschichten V – VI. Bei den GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ waren die Abnahmen der absoluten Dichtewerte in den Kortexschichten I – IV und V – VI gegenüber der jeweiligen Kontrollregion nicht signifikant voneinander abweichend. Im Gegensatz dazu waren die prozentualen Abnahmen in Relation zur korrespondierenden Kontrollregion in den Kortexschichten I – IV signifikant (p<0,05) stärker ausgeprägt. Dieser Unterschied im Verhalten von Absolut- und Relativwerten war dadurch begründet, daß die Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ in den Kortexschichten I – IV nur eine geringe Immunoreaktivität zeigten, so daß eine Verringerung der absoluten Dichtewerte in diesem Bereich zu deutlichen prozentualen Unterschieden führte. Die Veränderungen der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ zeigten weder bezüglich der Absolut- noch der Relativwerte ein signifikant differierendes Verhalten zwischen den Kortexschichten I – IV und V – VI.

3.3.3 Vergleich der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung ektooper Zellpopulationen mit neokortikaler laminärer Verteilung

Optische Beurteilung

Bei acht Tieren bildeten sich begleitend zu fokalen kortikalen Dysplasien oberflächliche Neuronenpopulationen im Bereich der Lamina molecularis. Bei der optischen Beurteilung des

Verteilungsmusters der GABA_A Rezeptoruntereinheiten innerhalb der Ektopien fiel eine starke Intensität der Untereinheit $\alpha 2$ auf. Dadurch ergab sich eine Ähnlichkeit zu der für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ typischerweise starken Immunoreaktivität in den äußeren Kortexschichten I – IV und kontrastierte mit der geringen Präsenz der Untereinheit $\alpha 2$ in den Kortexschichten V – VI. Die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ zeigten innerhalb der Ektopie eine auf gleichem Niveau mit den äußeren Kortexschichten I – IV liegende Immunoreaktivität. Die tiefen Kortexschichten V – VI wiesen eine deutlich intensivere Immunoreaktivität der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ auf. Für die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$ und $\gamma 2$ sind hohe Intensitäten in den Schichten III und IV bei ebenfalls deutlicher Darstellung der Schichten I und VIa und geringerer Immunoreaktivität in den übrigen Schichten charakteristisch. Die optischen Dichtewerte für die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\gamma 2$ innerhalb der Ektopie lagen auf einem Niveau mit dem benachbarten dysplastischen Kortex dabei war eine Zuordnung zur Laminierung im Neokortex, aufgrund des im Vergleich zu den Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ schwächer ausgeprägten Kontrastes zwischen den einzelnen Kortexschichten nicht möglich. Damit ergab sich für die ektopen Neuronenpopulationen eine zu den äußeren Kortexschichten vergleichbare GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung, mit hohen Dichtewerten für die Untereinheit $\alpha 2$ und schwacher Präsenz der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ sowie deutlicher Immunoreaktivität für die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\gamma 2$.

Analyse der Dichtewerte

Neben der optischen Beurteilung wurden für die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ die semiquantitativen Dichtewerte innerhalb der Ektopie separat ausgemessen und auf Kongruenz zur laminären Verteilung im assoziierten Neokortex analysiert. Aufgrund des begrenzten Volumens der ektopen Zellpopulationen war eine Anfertigung von Hirnschnitten in ausreichender Anzahl zur parallelen Untersuchung der fünf Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ nicht in allen Fällen möglich. Dadurch konnten bei drei von acht Tieren nicht für alle GABA_A Rezeptoruntereinheiten Meßwerte aus der Ektopie ermittelt werden. Die Meßwerte aus den benachbarten Kortexschichten I – IV bzw. V – VI wurden mittels t-Test für verbundene Stichproben mit den innerhalb der Ektopien gewonnenen Daten verglichen. Die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ (n=6) zeigte in dem Ektopiebereich eine Immunoreaktivität von $168,5 \pm 32,2$ die sich um $-1,4 \%$ von der mittleren optischen Dichte $170,9 \pm 26$ in den assoziierten Kortexschichten I – IV unterschied. Diese Differenz war ebenso wenig signifikant wie der Unterschied von $+16,5 \%$ zu den Meßwerten $144,6 \pm 21,8$ der Kortexschichten V – VI. Die ektopen Zellpopulationen zeigten hohe Intensitäten für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ (n=7) mit Werten von $175,72 \pm 37,7$ die einen signifikanten Unterschied zu den Werten $153,4 \pm 27,9$ in den Kortexschichten I – IV von $+14,5 \%$ ($p < 0,05$) aufwiesen. Die Immunoreaktivität lag im Ektopiebereich um $+100,2 \%$ über den optischen Dichtewerten $87,8 \pm 13$ der Kortexschichten V – VI und ergab bei einem α -Fehler von $p < 0,001$ einen signifikanten Unterschied zu diesen. Die Meßwerte innerhalb der Ektopie von $102,6 \pm 38$ für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 3$ (n=7) zeigten bei einem relativen Unterschied von $+6,5 \%$ keine signifikante Differenz gegenüber den Werten $96,4 \pm 36,3$ der Kortexschichten I – IV. Bei einem Unterschied von $-27,1 \%$ ($p < 0,05$) in Relation zu den Absolutwerten von $140,7 \pm 30,4$ in den Kortexschichten V – VI zeigte die Untereinheit $\alpha 3$ in der Ektopie eine signifikant niedrigere optische Dichte. Die Immunoreaktivität für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 5$ (n=5) lag bei Absolutwerten von $42,9 \pm 13,9$ innerhalb der Ektopie auf dem für die Untereinheit $\alpha 5$ charakteristisch niedrigen Intensitätsniveau wie in den benachbarten Kortexschichten I – IV mit $43,6 \pm 10,7$. Dieser Unterschied war bei einer relativen Differenz von $-1,6 \%$ im Gegensatz zu der um $-65,3 \%$ ($p < 0,01$) signifikant geringeren Immunoreaktivität innerhalb der Ektopie gegenüber der optischen Dichte von

123,6 ± 22,5 in den Kortexschichten V – VI nicht signifikant. Die mittlere Immunoreaktivität für die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\gamma 2$ (n=6) betrug im zur Ektopie assoziierten Neokortex in den Schichten I – IV 155 ± 35,7 und in den Schichten V – VI 130,9 ± 25,3. Damit lag die Immunoreaktivität innerhalb der Ektopie für die Untereinheit $\gamma 2$ mit Werten von 133,6 ± 35,2 um –13,8 % niedriger als in den Kortexschichten I – IV und um +2,1 % höher als in den Kortexschichten V – VI, ohne sich signifikant von diesen Bereichen zu unterscheiden.

3.4 Ergebnisse in der Untersuchungsgruppe: subkortikale Heterotopie

3.4.1 Areal spezifische Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung in der Umgebung subkortikaler Heterotopien

Bereich der Auswertung

Acht der mit Ibotensäure injizierten Tieren entwickelten subkortikale Heterotopien. Diese traten in zwei Fällen isoliert ohne zusätzliche kortikale Malformationen wie Mikrogyrus oder Ektopie auf. Bei sechs Tieren lagen die Heterotopien synchron zu fokalen kortikalen Dysplasien vor. In diesen Fällen befanden sich die subkortikalen Heterotopien in einer ausreichenden fronto-okzipitalen Distanz zu den Bereichen der fokalen kortikalen Dysplasien, so daß aus beiden Ebenen Schnitte für immunhistochemische Färbungen verwendet und getrennt ausgewertet werden konnten. Bei den acht Tieren lag die subkortikale Heterotopie unterhalb dem Areal HL/FL, in zwei Fällen zentral, bei zwei Tieren nach medial und bei vier Tieren nach lateral versetzt. Bei der Auswertung wurden semiquantitative Dichtewerte der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ für die neokortikalen Areale Fr1/Fr2, HL/FL, Par1 und Par2 beider Hemisphären ermittelt und seitenvergleichend mittels t-Test für verbundene Stichproben analysiert. Das durch Laminierungsstörungen gekennzeichnete Areal HL/FL der ibotensäureinjizierten Hemisphäre wurde zusammen mit einer unmittelbar subkortikal gelegenen Heterotopie zu einem Meßbereich zusammengefaßt. Die Gruppe der Kontrolltiere (n=13) zeigte bei seitenvergleichender Auswertung der untersuchten neokortikalen Areale keine signifikanten Unterschiede in der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung.

Untersuchung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ in Hirnschnitten mit subkortikaler Heterotopie

Bei der seitenvergleichenden Untersuchung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ (n=8) konnte in der Hemisphäre der subkortikalen Heterotopie eine verminderte Immunoreaktivität in den untersuchten neokortikalen Arealen beobachtet werden. Diese Unterschiede waren in der statistischen Auswertung nicht signifikant. Die mittlere prozentuale Differenz zwischen den Arealen Fr1/Fr2 beider Hemisphären betrug –3,8 % (nicht signifikant), bei Absolutwerten von ipsilateral 156,1 ± 21,2 und kontralateral 164,3 ± 20,3. Im Areal HL/FL zeigte sich bei Meßwerten ipsilateral von 151 ± 8,7 und kontralateral von 160,2 ± 19,1 eine prozentuale Differenz von –4,7 % (nicht signifikant). Die Unterschiede in den Arealen Par1 und Par2 im Vergleich zur den entsprechenden Arealen der kontralateralen Hemisphäre betragen –2,8 % (nicht signifikant) bzw. –5,6 % (nicht signifikant). Die Absolutwerte in den Arealen Par1 und Par2 lagen bei ipsilateral 156 ± 16,3 bzw. 154,3 ± 14,9 und kontralateral bei 161,3 ± 15,4 bzw. 164 ± 12,9 (Abb. 3.10).

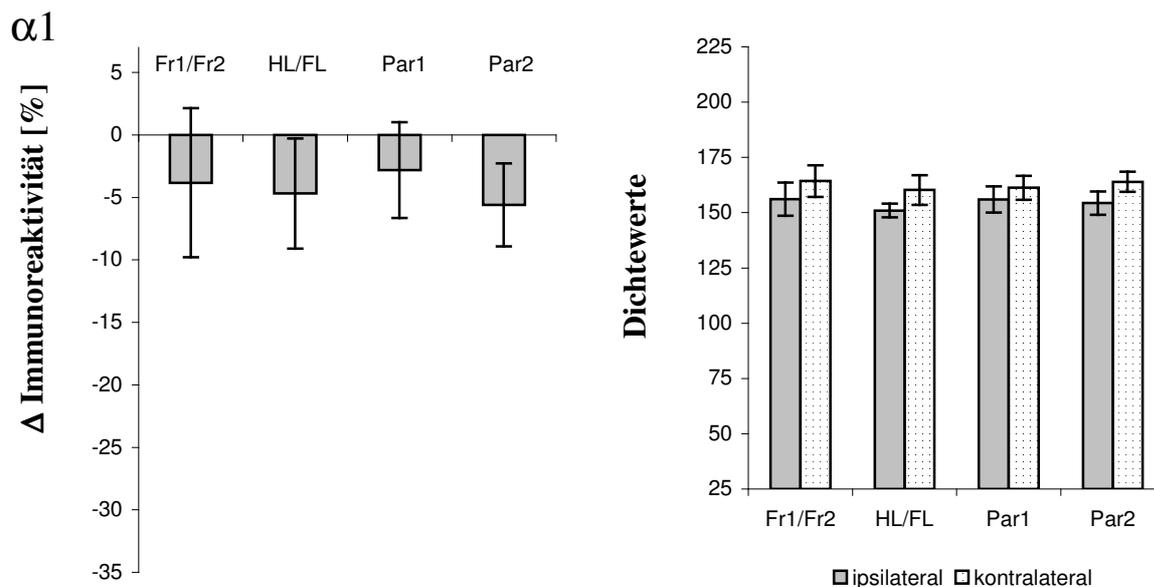


Abb. 3.10: Arealspezifische semiquantitative Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ in der Ebene der subkortikalen Heterotopie. Links: Dargestellt ist die prozentuale optische Dichteminderung der ibotensäureinjizierten Hemisphäre in Relation zur Gegenseite. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede der optischen Dichte in Hemisphärenvergleich. Rechts: Darstellung der absoluten Dichtewerte korrespondierender neokortikaler Areale.

Untersuchung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ in Hirnschnitten mit subkortikaler Heterotopie

Die Analyse der Immunoreaktivität für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ (n=8) in den untersuchten neokortikalen Arealen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Hemisphären. Im Areal Fr1/Fr2 war eine Differenz von $-1,3\%$ nicht signifikant, bei Absolutwerten von ipsilateral $154,8 \pm 15,5$ und kontralateral von $157,2 \pm 13,7$. Der mittlere prozentuale Unterschied für das Areal HL/FL betrug $-5,9\%$ (nicht signifikant), bei optischen Dichtewerten ipsilateral von $134 \pm 13,9$ und in der Kontrollregion von $143 \pm 15,7$. Die Abnahme auf der Seite der subkortikalen Heterotopie für das Areal Par1 von $-7,1\%$ erreichte ebenso wie die Differenz im Areal Par2 von -7% im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollregionen kein signifikantes Niveau. Die absoluten optischen Dichtewerte im Areal Par1 betragen ipsilateral $118,3 \pm 21,2$ und kontralateral $128,2 \pm 21,1$. Im Areal Par2 beliefen sich die Werte ipsilateral auf $131,4 \pm 15,4$ und kontralateral auf $142,3 \pm 19,6$ (Abb. 3.11).

Untersuchung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 3$ in Hirnschnitten mit subkortikaler Heterotopie

In dem Areal Fr1/Fr2 betragen die Meßwerte für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 3$ (n=8) auf der Seite der subkortikalen Heterotopie $157,7 \pm 24,4$ und $163 \pm 28,5$ im entsprechenden kontralateralen Areal. Der Mittelwert der prozentualen Unterschiede betrug für das Areal Fr1/Fr2 $-2,9\%$ (nicht signifikant). Im Areal HL/FL der ibotensäureinjizierten Hemisphäre fand sich eine um $-12,7\%$ ($p < 0,05$) signifikant geminderte Immunoreaktivität gegenüber der homotopen kontralateralen Kontrollregion. Die optischen Dichtewerte im Areal HL/FL betragen ipsilateral $113,1 \pm 25,8$ und kontralateral $129,8 \pm 25,4$. Parallel dazu traten bezogen auf die korrespondierenden Areale der Gegenseite signifikante Unterschiede in den Arealen Par1 und Par2 von $-17,3\%$ ($p < 0,01$) bzw. $-18,4\%$ ($p < 0,01$) auf. Die Absolutwerte in den Arealen Par1 und Par2 betragen ipsilateral $81,3 \pm 20,5$ bzw. $110,1 \pm 27,5$ und kontralateral $97,9 \pm 20,5$ bzw. $135 \pm 25,8$ (Abb. 3.12).

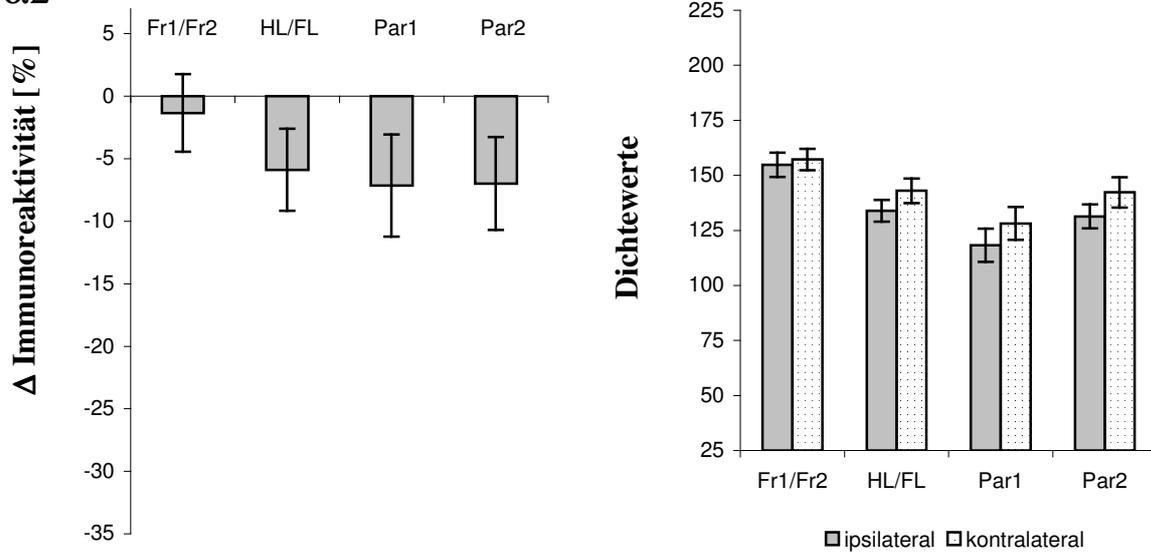
$\alpha 2$ 

Abb. 3.11: Areal-spezifische semi-quantitative Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ in der Ebene der subkortikalen Heterotopie. Links: Dargestellt ist die prozentuale optische Dichteminderung der ibotensäure-injizierten Hemisphäre in Relation zur Gegenseite. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede der optischen Dichte im Hemisphärenvergleich. Rechts: Darstellung der absoluten Dichtewerte korrespondierender neokortikaler Areale.

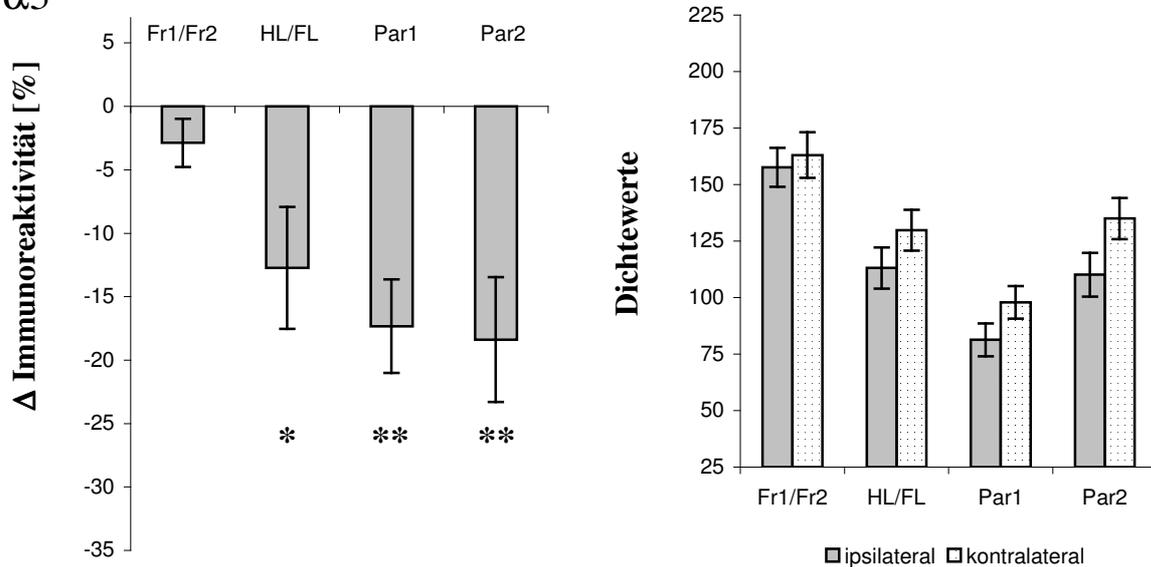
 $\alpha 3$ 

Abb. 3.12: Areal-spezifische semi-quantitative Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 3$ in der Ebene der subkortikalen Heterotopie. Links: Dargestellt ist die prozentuale optische Dichteminderung der ibotensäure-injizierten Hemisphäre in Relation zur Gegenseite. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (t-Test, $p < 0,05$) bzw. zwei Sterne (t-Test, $p < 0,01$) gekennzeichnet. Rechts: Darstellung der absoluten Dichtewerte korrespondierender neokortikaler Areale.

Untersuchung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 5$ in Hirnschnitten mit subkortikaler Heterotopie

Die Dichtewerte im Areal Fr1/Fr2 ipsilateral zur subkortikalen Heterotopie betragen für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 5$ (n=7) $151,3 \pm 22,7$ und auf der Gegenseite $156,8 \pm 23,2$. Der mittlere prozentuale Unterschied von $-3,3 \%$ war nicht signifikant. Im Areal HL/FL konnte, bei Absolutwerten von $86,7 \pm 27,5$ ipsilateral zur subkortikalen Heterotopie und von $102,4 \pm 18,3$ kontralateral, eine signifikante Abnahme um $-16,3 \%$ ($p < 0,05$) beobachtet werden. Darüber hinaus war die optische Dichte im Areal Par1 um -25% ($p < 0,01$) signifikant zur kontralateralen Kontrollregion gemindert. Die entsprechenden Absolutwerte betragen ipsilateral $50,2 \pm 14$ bzw. kontralateral $66,3 \pm 9,7$. Auch im Areal Par2 konnte in der durch subkortikale Heterotopie veränderten Hemisphäre eine um -22% ($p < 0,05$) signifikant geminderte Dichte beobachtet werden. Die Absolutwerte im Areal Par2 lagen ipsilateral bei $72,8 \pm 20$ und kontralateral bei $93,3 \pm 6,8$ (Abb. 3.13).

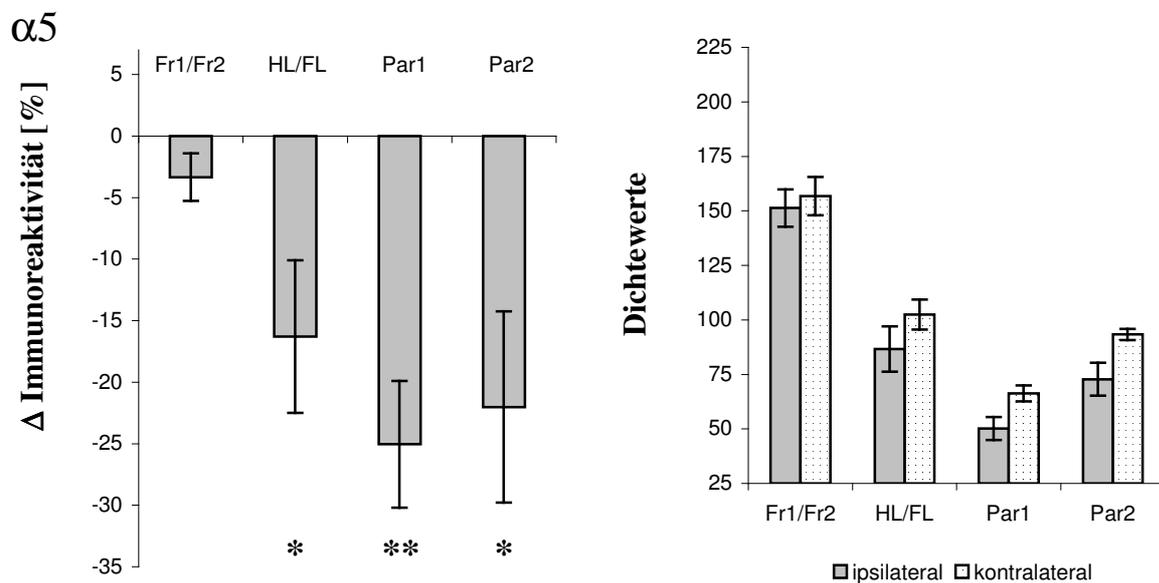


Abb. 3.13: Areal-spezifische semiquantitative Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 5$ in der Ebene der subkortikalen Heterotopie. Links: Dargestellt ist die prozentuale optische Dichteminderung der ibotensäure-injizierten Hemisphäre in Relation zur Gegenseite. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (t-Test, $p < 0,05$) bzw. zwei Sterne (t-Test, $p < 0,01$) gekennzeichnet. Rechts: Darstellung der absoluten Dichtewerte korrespondierender neokortikaler Areale.

Untersuchung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\gamma 2$ in Hirnschnitten mit subkortikaler Heterotopie

Die Untersuchung der Immunoreaktivität für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\gamma 2$ (n=8) ergab im frontal motorischen Kortex ipsilateral zur subkortikalen Heterotopie eine signifikante Abnahme um $-4,1 \%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Gegenseite. Die Absolutwerte im Areal Fr1/Fr2 betragen ipsilateral $157,8 \pm 13,5$ und kontralateral $165,3 \pm 19,9$. Der Seitenvergleich im Areal HL/FL ergab eine mittlere prozentuale Differenz von $-5,6 \%$ (nicht signifikant). Die entsprechenden Absolutwerte lagen ipsilateral im Areal HL/FL bei $151,6 \pm 11,9$ und kontralateral bei $161,4 \pm 15,1$. Die Meßwerte im Areal Par1 der ipsilateralen Hemisphäre betragen $147,8 \pm 27$ und auf der Gegenseite $154,5 \pm 18,1$. Der mittlere prozentuale Unterschied betrug $-3,6 \%$ (nicht signifikant). Im Areal Par2 lag die optische Dichte ipsilateral bei $147,4 \pm 27$ und kontralateral bei $165,5 \pm 29,5$. Im Seitenvergleich war die Immunoreaktivität im Areal Par2 signifikant um $-10,3 \%$ ($p < 0,05$) reduziert (Abb. 3.14).

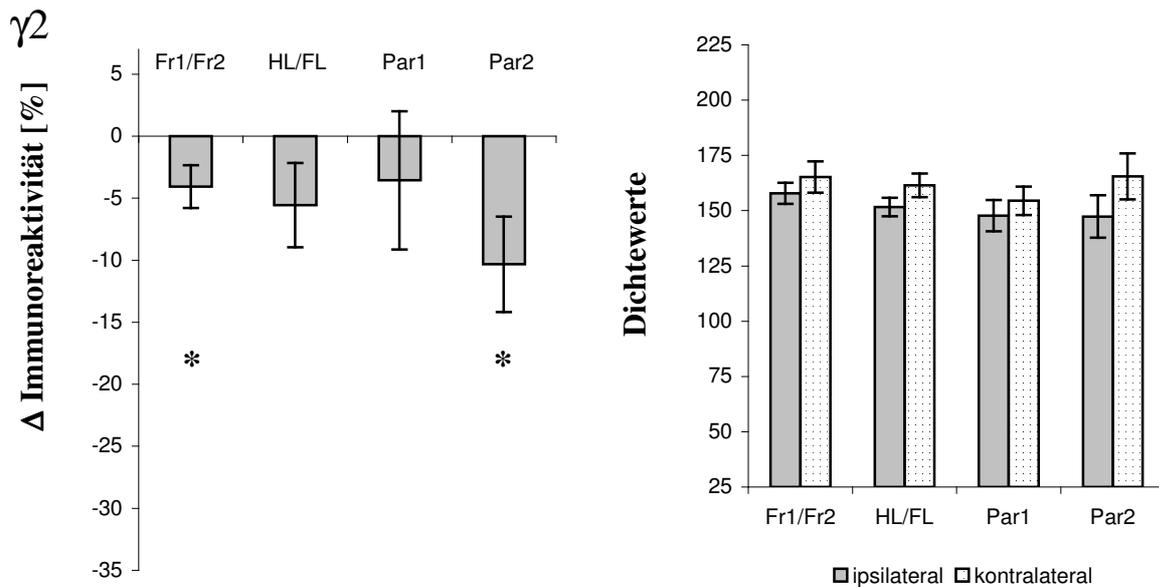


Abb. 3.14: Areal-spezifische semiquantitative Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\gamma 2$ in der Ebene der subkortikalen Heterotopie. Links: Dargestellt ist die prozentuale optische Dichteminderung der ibotensäure-injizierten Hemisphäre in Relation zur Gegenseite. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (t-Test, $p < 0,05$) bzw. zwei Sterne (t-Test, $p < 0,01$) gekennzeichnet. Rechts: Darstellung der absoluten Dichtewerte korrespondierender neokortikaler Areale.

3.4.2 GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung im Bereich subkortikaler Heterotopien

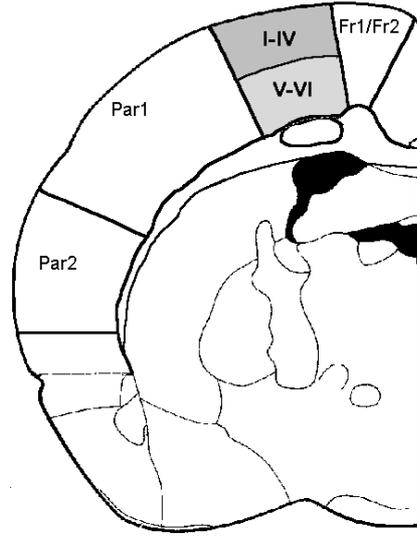
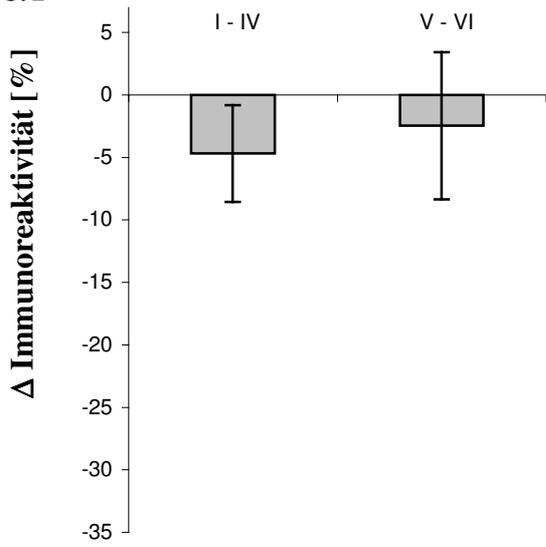
Seitenvergleich der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung in den Kortexschichten I – IV und V – VI im Bereich subkortikaler Heterotopien

Das die subkortikale Heterotopie bedeckende neokortikale Areal HL/FL zeigte die in Kapitel 3.1 beschriebenen unterschiedlichen Veränderungen der Laminierung. In diesem Areal wurde für die Kortexschichten I – IV und V – VI die Verteilung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ untersucht und mit den entsprechenden Meßwerten im kontralateralen Areal HL/FL verglichen. Des weiteren wurde untersucht, ob unterschiedliche Veränderungen in den Kortexschichten I – IV und V – VI auftraten. Die seitenvergleichende Analyse und die gegenüberstellende Auswertung zwischen den Kortexschichten I – IV und V – VI wurde mit dem t-Test für verbundene Stichproben vorgenommen. In der Gruppe der Kontrolltiere ($n=13$) wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

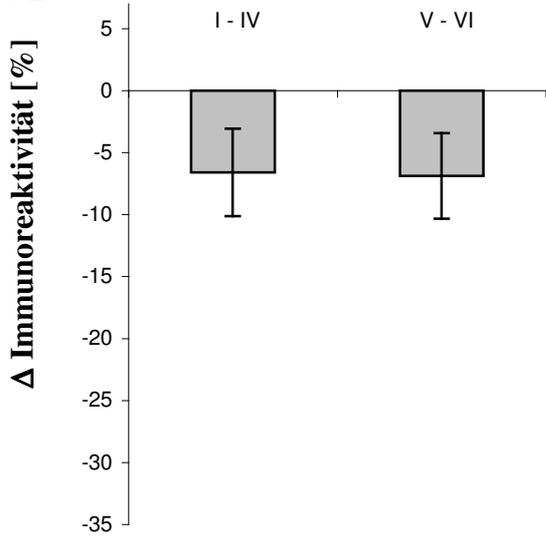
Für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ ($n=8$) war in den äußeren Kortexschichten I – IV eine Differenz von $-4,7 \%$ (nicht signifikant), und in den Kortexschichten V – VI von $-2,5 \%$ (nicht signifikant), gegenüber den entsprechenden Kontrollregionen im Areal HL/FL der Gegenseite zu beobachten. Die Absolutwerte betragen in den Schichten I – IV ipsilateral $170,3 \pm 14$ und kontralateral $179,7 \pm 15,8$. In den Kortexschichten V – VI lagen die Werte ipsilateral bei $140,6 \pm 13,4$ und kontralateral bei $146,9 \pm 23,3$.

Die in den äußeren Kortexschichten I – IV zu beobachtende Abnahme von Immunoreaktivität der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ ($n=8$) von $-6,6 \%$ im ipsilateralen Areal HL/FL erreichte ebenso wie die Abnahme in den Kortexschichten V – VI von $-6,9 \%$ kein signifikantes Niveau. Die entsprechenden Absolutwerte betragen in den Schichten I – IV ipsilateral $162,6 \pm 17,1$ und kontralateral $174,8 \pm 17,7$, in den Kortexschichten V – VI ipsilateral $106,2 \pm 12,2$ und kontralateral $114,7 \pm 13,6$.

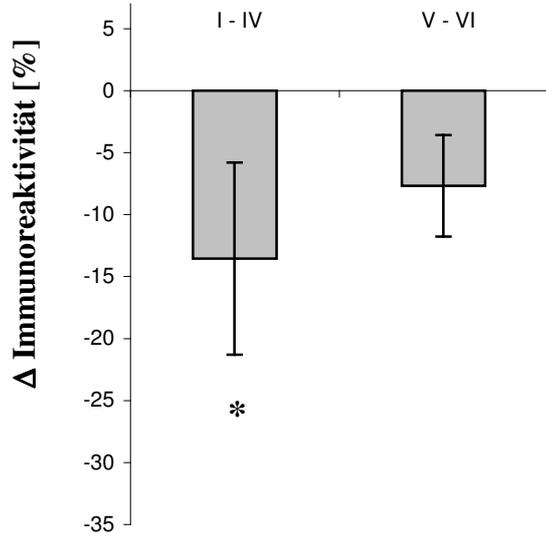
$\alpha 1$



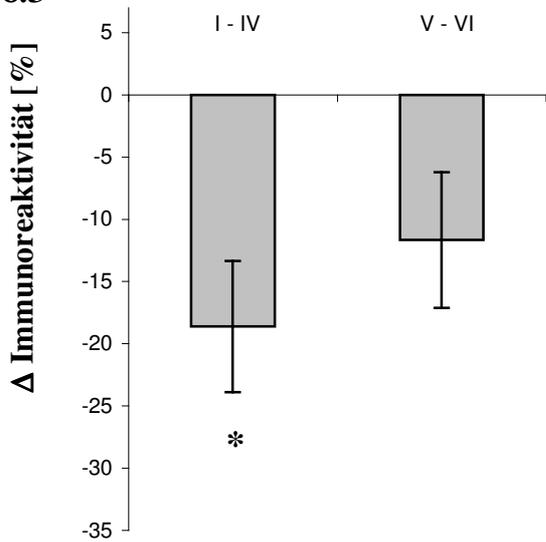
$\alpha 2$



$\alpha 3$



$\alpha 5$



$\gamma 2$

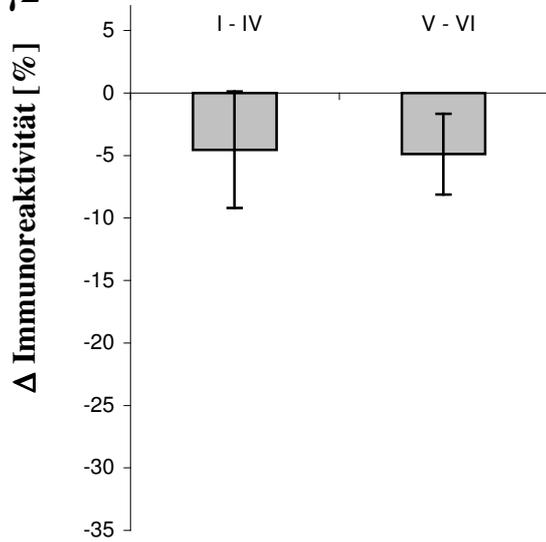


Abb. 3.15: Laminaspezifische Auswertung der GABA_A-Immunhistochemie nach Ibotensäureläsion im Bereich subkortikaler Heterotopien. Dargestellt ist die prozentuale optische Dichteminderung der Kortexschichten I – IV und V – VI des die subkortikalen Heterotopien bedeckenden Neokortex in Relation zur Gegenseite. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (t-Test, p<0,05) gekennzeichnet.

Die optischen Dichtewerte in den Kortexschichten I – IV der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 3$ (n=8) von $81,6 \pm 22,9$ unterschieden sich signifikant von denen der korrespondierenden Kontrollregion $96,1 \pm 26,2$. Dabei betrug der prozentuale Unterschied im Mittel $-13,5 \%$ (p<0,05). Der Unterschied von $-7,7 \%$ gegenüber dem korrespondierenden Bereich im kontralateralen Areal HL/FL erreichte in den Kortexschichten V – VI bei Absolutwerten von ipsilateral $143,7 \pm 28,8$ und kontralateral von $156,2 \pm 29,7$ kein signifikantes Niveau.

Im die subkortikale Heterotopie bedeckenden Areal HL/FL war die Immunoreaktivität für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 5$ (n=7) in den Kortexschichten I – IV bei Absolutwerten von $42 \pm 14,6$ signifikant gegenüber den Werten der kontralateralen Kontrollregion von $51 \pm 13,7$ gemindert. Der mittlere relative Unterschied betrug dabei $-18,6 \%$ (p<0,05). In den Kortexschichten V – VI war eine Abnahme um durchschnittlich $-11,7 \%$ (nicht signifikant) gegenüber den Kortexschichten V – VI im kontralateralen Areal HL/FL zu beobachten. Die Absolutwerte lagen ipsilateral bei $123,7 \pm 37,9$ und kontralateral bei $138,5 \pm 27,6$.

Die in den Kortexschichten I – IV der korrespondierenden Areale HL/FL zu beobachtende Differenz an Immunoreaktivität der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\gamma 2$ (n=8) von $-4,5 \%$ war ebenso wie der Unterschied von $-4,9 \%$ in den Kortexschichten V – VI nicht signifikant. Die entsprechenden Absolutwerte betragen in den Kortexschichten I – IV ipsilateral $166,1 \pm 14,2$ und kontralateral $176,4 \pm 26,8$. Die Meßwerte lagen in den Kortexschichten V – VI ipsilateral bei $143 \pm 15,6$ und kontralateral bei $151 \pm 16,1$.

Eine Übersicht über die relativen Unterschiede in der seitenvergleichenden Auswertung liefert die Abbildung 3.15.

Vergleich der Veränderungen zwischen den Kortexschichten I – IV und V – VI

Zur Untersuchung auf differierende Veränderungen zwischen den Kortexschichten I – IV und V – VI wurden die relativen und absoluten Unterschiede in den Kortexschichten I – IV bzw. V – VI zu den jeweils korrespondierenden Kortexabschnitten der kontralateralen Hemisphäre mit dem t-Test für verbundene Stichproben analysiert. Bei gleichzeitiger Betrachtung aller untersuchter GABA_A Rezeptoruntereinheiten ergab die Analyse weder für Differenzen der Absolutwerte noch für die relativen Unterschiede gegenüber der Gegenseite signifikant unterschiedliche Veränderungen zwischen den Kortexschichten I – IV und V – VI. Für die Untereinheit $\alpha 5$ war die prozentuale Abnahme in den Kortexschichten I – IV signifikant ausgeprägter als in den Kortexschichten V – VI. Im Gegensatz dazu zeigte die Differenz der Absolutwerte gegenüber der kontralateralen Kontrollregion kein signifikant differierendes Verhalten zwischen äußeren und tiefen Kortexschichten. Dieses abweichende Verhalten von absoluten und relativen Unterschieden wurde dadurch ermöglicht, daß die Untereinheit $\alpha 5$ in den Kortexschichten I – IV nur eine geringe Immunoreaktivität zeigte, weshalb eine Veränderung der absoluten Dichtewerte in diesem Bereich zu deutlichen prozentualen Unterschieden führte. Die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\gamma 2$ zeigten weder bezüglich der Absolut- noch der Relativwerte sich signifikant unterscheidende Veränderungen zwischen den Kortexschichten I – IV und V – VI.

3.4.3 Vergleich der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung subkortikaler Zellpopulationen mit neokortikaler laminärer Verteilung

Optische Beurteilung

Die GABA_A Rezeptoruntereinheiten α_1 , α_2 , α_3 , α_5 und γ_2 zeigten unterschiedliche Intensitäten an Immunoreaktivität mit der sie subkortikale Heterotopien zur Darstellung brachten. Die Falschfarben-Darstellung der immunhistochemischen Färbungen erlaubte eine Visualisierung dieser Unterschiede. Die subkortikal gelegenen Zellnester wiesen eine hohe optische Dichte für die GABA_A Rezeptoruntereinheit α_2 auf, wie sie für die Kortexschichten I – IV im Gegensatz zu der geringen Dichte in den Kortexschichten V – VI charakteristisch war. Die GABA_A Rezeptoruntereinheiten α_3 und α_5 waren innerhalb der subkortikalen Heterotopien auf einem Intensitäts-Niveau vertreten, welches in einem intermediären Bereich zu den für diese beiden Untereinheiten charakteristisch schwach zur Darstellung kommenden Kortexschichten I – IV und deutlich zur Darstellung kommenden Kortexschichten V – VI lag. Die Immunoreaktivität der subkortikalen Heterotopien für die GABA_A Rezeptoruntereinheit γ_2 war schwächer ausgeprägt als die der neokortikalen Laminae. Die GABA_A Rezeptoruntereinheit α_1 war sowohl in subkortikalen Heterotopien als auch in dem diese bedeckenden Neokortex deutlich vertreten.

Analyse der Dichtewerte

Zur vergleichenden Analyse der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung innerhalb subkortikaler Heterotopien mit der neokortikalen Laminierung des Neokortex wurden semiquantitative Dichtewerte bestimmt und mittels t-Test für verbundene Stichproben verglichen. Die Dichtewerte wurden sowohl für den Bereich der Heterotopie als auch in den Kortexschichten I – IV bzw. V – VI des die subkortikale Heterotopie bedeckenden Areals HL/FL bestimmt. Aufgrund des begrenzten Volumens der subkortikalen Zellpopulationen kamen diese nicht bei allen der acht Tiere in für die Untersuchung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten α_1 , α_2 , α_3 , α_5 und γ_2 notwendigen fünf Hirnschnitten in ausreichender Größe zur Darstellung. Dadurch konnten bei diesen Tieren nicht für alle GABA_A Rezeptoruntereinheiten Meßwerte aus der subkortikalen Heterotopie bestimmt werden. Die subkortikalen Neuronenpopulationen wiesen eine hohe optische Dichte für die GABA_A Rezeptoruntereinheit α_2 auf, wie sie für Neurone der Kortexschichten I – IV charakteristisch ist. Die mittlere optische Dichte für die Untereinheit α_2 (n=6) betrug innerhalb subkortikaler Heterotopien $171,2 \pm 34,1$ bei einem relativen Differenz von +3,5 % (nicht signifikant) gegenüber den Dichtewerten $165,5 \pm 16,2$ der Kortexschichten I – IV. Bei einem relativen Unterschied von +61,3 % (p<0,01) wiesen die subkortikalen Heterotopien eine signifikant stärkere Immunoreaktivität als die Kortexschichten V – VI mit Werten von $106,1 \pm 12,3$ auf. Für die GABA_A Rezeptoruntereinheiten α_3 (n=7) und α_5 (n=6) zeigten sich innerhalb der subkortikalen Heterotopien Immunoreaktivitäten, die sich signifikant von der schwachen Darstellung der neokortikalen Schichten I – IV und der deutlichen Darstellung der Kortexschichten V – VI unterschieden. Die GABA_A Rezeptoruntereinheit α_3 wies bei einer mittleren optischen Dichte von $104,2 \pm 36,7$ innerhalb subkortikaler Neuronenpopulationen eine um +32,2 % (p<0,05) höhere Intensität als die Kortexschichten I – IV mit $78,8 \pm 23,3$ und eine um -26,4 % (p<0,01) geringere optische Dichte als die Kortexschichten V – VI mit $141,5 \pm 30,4$ auf. Für die GABA_A Rezeptoruntereinheit α_5 ergab sich für die subkortikalen Heterotopien bei einem relativen Unterschied von +89,1 % (p<0,05) gegenüber den Kortexschichten I – IV und von -33,8 % (p<0,01) gegenüber den Kortexschichten V – VI eine intermediäre Immunoreaktivität mit Werten von $84,5 \pm 37,5$. Die Meßwerte für die

Untereinheit $\alpha 5$ lagen bei $44,7 \pm 14$ in den Kortexschichten I – IV bzw. bei $127,5 \pm 40$ in den Kortexschichten V – VI. Im Gegensatz zur der deutlichen Präsenz der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\gamma 2$ (n=6) im Neokortex waren die optischen Dichtewerte innerhalb subkortikaler Heterotopien auf einem niedrigerem Niveau. Dabei zeigten die subkortikalen Zellnester bei Meßwerten von $126,4 \pm 21,6$ eine um -24% ($p < 0,05$) signifikant geringere Intensität gegenüber den Kortexschichten I – IV mit Werten von $166,4 \pm 16,5$. Die um $-8,6 \%$ reduzierte Immunoreaktivität gegenüber den Kortexschichten V – VI bei Meßwerten von $138,2 \pm 13,3$ erreichte kein signifikantes Niveau. Die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ (n=5) war bei optischen Dichtewerten von $148 \pm 9,9$ innerhalb subkortikaler Heterotopien wie im assoziierten Neokortex mit Werten in den Kortexschichten I – IV von $170 \pm 15,8$ und in den Kortexschichten V – VI von $137,3 \pm 16,3$ deutlich vertreten. Bei relativen Unterschieden von $-12,9 \%$ gegenüber den Kortexschichten I – IV und von $+7,8 \%$ gegenüber den Kortexschichten V – VI zeigten subkortikale Heterotopien für die Untereinheit $\alpha 1$ keinen signifikanten Unterschied an Immunoreaktivität.

3.5 Veränderungen im Bereich dysmorpher Hemisphären

Bei drei der mit Ibotensäure injizierten Tiere entstanden in ihrem Ausmaß über fokale kortikale Veränderungen hinausreichende Organisationsstörungen des Neokortex. Die Veränderungen erstreckten sich dabei von dem Bereich der Injektion, Areal HL/FL, bis in den parietalen Kortex, wodurch die betroffenen Hemisphären ein dysmorphes Erscheinungsbild erlangten. Durch Verluste neuronaler Zellpopulationen und Migrationsstörungen war der Neokortex verschmälert und abschnittsweise die Laminierung unterbrochen. Begleitend war die Kortexoberfläche durch multiple Sulcus-Mikrogyrus-Bildung gekennzeichnet. Bei einem Tier war die Kontinuität des Neokortex durch einen Sulcus, in dem pilzförmig eine Ektopie lag, unterbrochen. Bei diesen Tieren wurden keine semiquantitativen Messungen in den neokortikalen Arealen vorgenommen, da die gestörte Kortexarchitektur eine Grenzbestimmung und eine vergleichende Auswertung mit korrespondierenden kontralateralen Arealen verhinderte. Bei der optischen Beurteilung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung fiel eine Dichteabnahme im dysplastisch veränderten Kortex auf. Diese Abnahme war für die Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ stark, für die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\gamma 2$ mäßig und für die Untereinheit $\alpha 2$ schwach ausgeprägt.

4.1 Tiermodelle und deren Bedeutung für die Erforschung der zu kortikalen Dysgenesien assoziierten Epilepsie

Aufgabenstellungen und Anforderungen an Tiermodelle

Experimentelle Untersuchungen kortikaler Dysgenesien sind von großer Bedeutung um zugrunde liegende pathophysiologische Prozesse aufzudecken, Ursachen einer häufig vorliegenden medikamentösen und chirurgischen Therapieresistenz zu erkennen und um schließlich die Behandlung zu optimieren. Messungen an humanem Gewebe sind schwierig, daher sind Analysen an Modellen sinnvoll. Durch Tiermodelle bietet sich die Möglichkeit einer systematischen Untersuchung kortikaler Dysgenesien. Dabei stellt sich grundsätzlich die Frage der Übertragbarkeit der Befunde von Tieren auf den Mensch. Im Idealfall imitiert ein Tiermodell alle relevanten Aspekte der zu untersuchenden klinischen Situation. Im Fall der mit kortikalen Dysgenesien assoziierten Epilepsie sind dies im Besonderen eine vergleichbare Morphologie der Dysgenesien, bei ähnlichem Entstehungsmechanismus, sowie eine daraus resultierende Epileptogenität.

Vorstellung von Tiermodellen mit kortikalen Dysgenesien

Es wurden zahlreiche Tiermodelle entwickelt, die unterschiedliche Aspekte der heterogenen Gruppe kortikaler Dysgenesien zu imitieren versuchen. Einen Überblick über verwendete Tiermodelle liefern Roper und Yachnis (2002), Chevassus-au-Louis et al. (1999a) und Jacobs et al. (1999b). Dabei lassen sich drei grundsätzliche Gruppen unterscheiden. Durch fokale Läsion des noch in der Entwicklung befindlichen neonatalen Kortex können umschriebene dysplastische Veränderungen induziert werden. Durch systemische Applikation teratogener Noxen auf embryonales Gewebe lassen sich diffuse dysplastische Veränderungen in utero erzeugen. In genetischen Tiermodellen führen Mutationen zu dysplastischen Phänotypen.

Zur ersten Gruppe gehören das Ibotensäure Modell, welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde und weiter unten ausführlich diskutiert wird, und das Gefrier-Läsion („freeze-lesion“) Modell. Bei letzterem wird ein tiefgekühlter Metallzylinder kurz nach der Geburt auf den Kortex aufgesetzt (Dvorak und Feit 1977; Dvorak et al. 1978). So behandelte Ratten entwickeln einen Mikrogyrus im Bereich der Läsion, der mit seinem vierschichtigem Aufbau menschlichen Polymikrogyrien ähnelt (Rosen et al. 1995; Hablitz und DeFazio 1998).

Zur zweiten Gruppe gehört die systemische Gabe von Methylazoxymethanol (MAM), einem durch Methylierung antiproliferativ wirkendem Teratogen (Colacitti et al. 1998), an trächtige Ratten. Dabei kommt es bei den Rattenfeten zu Mikrozephalie mit kortikaler Verschmälerung und Laminierungsstörung sowie nodulären Heterotopien periventrikulär und perihippokampal (Baraban und Schwartzkroin 1996; Sancini et al. 1998; Chevassus-au-Louis 1998a, b). Die teratogene Wirkung von Röntgenstrahlen bei trächtigen Ratten verursacht ebenfalls diffuse Dysplasien während der kortikalen Entwicklung (Roper 1998). Dabei entstehen Mikrozephalie, diffuse kortikale Dysplasien, subkortikale und periventrikuläre Heterotopien, heterotope Neurone im Hippokampus und Agenesie oder Hypoplasie des Corpus Callosum (Zhu und Roper 2000; Roper et al. 1999). Die Applikation von Carmustin (BCNU) während der Embryonalzeit induziert bei Ratten laminäre Desorganisation, zytomegale Neurone, neuronale Heterotopien und Veränderungen der Radiärfaserglia (Benardete und Kriegstein 2002).

In der dritten Gruppe liegen Gendefekte vor, die durch Spontanmutation oder Knockout entstanden sind und zu Malformationen führen. Bereits 1951 beschrieb Falconer deskriptiv die Mauslinien *reeler* und *trembler* anhand der neurologischen Phänotypen. 1960 wurde von Hamburg die Neuropathologie des *reeler* Phänotyps beschrieben. Eine Übersicht von Maus-Mutanten mit zerebellären Entwicklungsstörungen geben Sidman et al. (1965), in der von den Typen *reeler*, *weaver*, *staggerer* und *leaner* berichtet wird. D'Arcangelo und Curran (1998) geben einen Überblick über die erwähnten und weitere bekannte Mutationen mit Auswirkung auf die Hirnentwicklung. Besonders der autosomal rezessiv vererbte *reeler*-Phänotyp wurde intensiv erforscht. Die Mäuse zeigen eine durch fehlendes „inside-outside layering“ charakterisierte Laminierungsstörung (Frotscher 1997; D'Arcangelo und Curran 1998). Ursächlich ist dabei eine verminderte Reelin-Wirkung, ein von Cajal-Retzius Zellen synthetisiertes, sekretorisches Protein, welches die Neuronenmigration steuert und die Differenzierung der Neuronennetzwerke moduliert (Hack et al. 2002; Frotscher 1997; Mienville 1999). Ein zum *reeler*-Phänotyp ähnlichen Befund zeigen Knockout Mäuse für die Kinase *cdk5* oder für deren Aktivator *p35* (Chae et al. 1997). Im Tiermodell der *tish*-Ratte (telencephalic internal structural heterotopia) liegt ein autosomal rezessiv vererbter Gendefekt vor, der zu einem, dem menschlichen, X-chromosomal vererbten (Pilz et al. 1998) Doppel-Kortex-Syndrom ähnlichen, Phänotyp mit subkortikalen Bandheterotopien führt (Lee et al. 1997). *Otx 1* Knockout Mäuse zeigen eine Mikrozephalie mit Verlust tiefer Kortexschichten (Sancini et al. 2001). Jenner et al. (2000) beschreiben Mäuse, die Autoimmundefekte zeigen und eine genetische Neigung zur Ektopiebildung in der Kortexschicht I haben. Weitere genetische Tiermodelle werden in den Arbeiten von Roper und Yachnis (2002) und Chevassus-au-Louis (1999a) zusammengefaßt.

Auftreten epileptiformer Aktivität bei Tiermodellen mit kortikalen Dysgenesien

Die zahlreich zur Verfügung stehenden Modelle, im besonderen die auf genetischen Mutationen beruhenden, haben zu einem großen Erkenntnisgewinn in der physiologischen und pathophysiologischen Regulation der Kortexentwicklung beigetragen (Walsh 2000). Zur tierexperimentellen Untersuchung der mit kortikalen Dysgenesien assoziierten Epilepsie ist es erforderlich, daß im Tiermodell ebenfalls eine zu morphologischen Veränderungen assoziierte Hyperexzitabilität besteht. Dies kann eine spontane epileptische Aktivität in Form von Anfällen oder EEG-Veränderungen, der Nachweis einer verminderten Krampfschwelle unter konvulsiven Bedingungen oder der in vitro Nachweis einer Hyperexzitabilität in Hirnschnitten sein (Chevassus-au-Louis 1999a).

Ibotensäure behandelte Wistar-Ratten zeigen keine spontanen epileptischen Anfälle, es wird lediglich eine transiente Hyperexzitabilität der betroffenen Tiere nach Dysplasieinduktion beobachtet (Redecker et al. 1998a). Mit Ibotensäure injizierte Mäuse zeigen ebenfalls eine transiente Hyperexzitabilität, die sich bei hohen Dosen in spontanen Anfällen innerhalb der ersten sechs Stunden nach Injektion äußern kann (Marret et al. 1995). Die beschriebenen Effekte sind vorübergehend, so daß als deren Ursachen die Narkose, durch Injektion verursachtes Trauma oder die akut toxische Ibotensäure-Wirkung zu vermuten sind. Über den akuten Zeitraum hinaus wurden keine epileptischen Anfälle beobachtet. Es liegen allerdings keine Daten kontinuierlicher Beobachtungen vor, die ein Auftreten spontaner epileptischer Anfälle mit Sicherheit ausschließen. Im Gegensatz dazu weisen Hirnschnitte der mit Ibotensäure behandelten Ratten eine dauerhafte Hyperexzitabilität mit epileptiformen Potentialen bei der elektrophysiologischen Untersuchung auf (Redecker et al 1998b, 2000a). Mit Ibotensäure injizierte Ratten zeigen eine mit kortikalen Dysgenesien assoziierte dauerhaft veränderte Hyperexzitabilität in Neuronennetzwerken und bieten ein Modell zur Untersuchung der zugrunde liegenden pathophysiologischen Prozesse. Bei mit einer Gefrier-

Läsion behandelten Ratten werden bisher ebenfalls keine spontanen epileptischen Anfälle beobachtet, in vitro zeigen Hirnschnitte aber spontan oder unter Stimulation epileptische Aktivität (Luhmann et al. 1998b; Jacobs et al. 1999).

In utero mit MAM behandelte Tiere zeigen keine spontanen Anfälle, unter konvulsiven Bedingungen wie Hyperthermie (Germano et al. 1996) oder Flurothyl-Gabe (Baraban und Schwartzkroin 1996) ist die Krampfschwelle jedoch erniedrigt. Zusätzlich zeigen Hirnschnitte unter Hippokampus Stimulation eine Hyperexzitabilität (Chevassus-au-Louis 1998a). Durch Röntgenbestrahlung behandelte Tiere weisen in Gegenwart bestimmter Sedativa eine erhöhte Anfallshäufigkeit auf. Roper (1998) berichtet darüber hinaus lediglich von einem Tier mit einem spontanen Anfall. Mit Carmustin behandelte Ratten zeigen eine erhöhte epileptiforme Aktivität in Hirnschnitten aber keine spontanen Anfälle (Benardete und Kriegstein 2002).

Einige Tiermodelle mit auf genetischen Mutationen beruhenden kortikalen Dysgenesien heben sich durch die Tatsache des spontanen Auftretens epileptischer Anfälle von durch exogene Noxen induzierte Dysplasien ab. Spontane elektrographische und Verhaltensanfälle werden bei *tish*-Ratten (Lee et al. 1997), bei Otx 1 Knockout Mäusen (Sancini et al. 2001) und bei p35 Knockout Mäusen (Chae et al. 1997) beobachtet. Eine Tierlinie mit spontanen Anfällen sind Ihara-Ratten (Amano et al. 1996), welche morphologische Veränderungen ähnlich zu Mikrodysgenesien zeigen. Ausdrücklich sei darauf hingewiesen, daß *reeler*-Ratten zu Migrationsstörungen assoziierte neurologische Symptome ohne epileptische Anfälle zeigen (Chevassus-au-Louis et al. 1999a).

Vergleichbarkeit von kortikalen Dysgenesien in Tiermodellen und beim Menschen im Bezug auf die assoziierte Epileptogenität

Die zahlreichen beschriebenen Tiermodelle imitieren wesentliche morphologische Aspekte des breiten Spektrums kortikaler Dysgenesien. Zusätzlich ist bei vielen dieser Modelle unter in vivo oder in vitro Bedingungen eine erhöhte Exzitabilität oder epileptische Aktivität nachweisbar. Allerdings gibt es auch Kritikpunkte bei der Vergleichbarkeit zwischen den beschriebenen Tiermodellen und dem Menschen. In der Arbeit von Mischel et al. (1995) werden neun pathohistologische Befunde vorgestellt und für eine Einteilung in leichte, mittlere und schwere Dysplasieformen verwendet. Dabei ist die Anwesenheit von Ballon-Zellen oder zytomegalen Neuronen mit oder ohne Zytoskelett-Veränderungen ein Marker für eine Störung auf einer frühen Stufe der Kortextentwicklung. Eine Störung zu diesem frühen Zeitpunkt der Kortextentwicklung ist mit schweren Dysplasieformen assoziiert (Mischel et al. 1995). Zwei Subformen kortikaler Dysgenesien, die in einem hohen Maß mit Epilepsie assoziiert sind, sind die TTFCD (Taylor type focal cortical dysplasia) und die Hemimegalenzephalie, welche beide auf histologischer Ebene durch dysmorphe Neurone und fakultativ durch Ballon-Zellen charakterisiert sind (Palmini 2000; Tassi et al. 2002; Palmini et al. 1994). Definitionen der Begriffe dysmorphe Neurone und Ballon-Zellen liefern Palmini und Lüders (2002). Für die so definierten zellulären Veränderungen sind bislang keine Tiermodelle bekannt. (Palmini 2000). Lediglich durch BCNU induzierte kortikale Dysgenesien zeigen zytomegale Neurone wobei in der dieses Modell beschreibenden Arbeit nicht auf weitere dysmorphe Charakteristika der betroffenen Neurone eingegangen wird (Benardete und Kriegstein 2002). Zusammenfassend imitieren die bekannten Tiermodelle zahlreiche morphologische Subtypen der mit Epilepsie assoziierten kortikalen Dysgenesien. Allerdings fehlen bislang Modelle der beim Menschen mit hoher Epileptogenität assoziierten TTFCD und Hemimegalenzephalie.

Ein weiterer Kritikpunkt betrifft die Tatsache, daß die auf postnatalen oder in utero Läsionen beruhenden Tiermodelle im Gegensatz zu einigen genetischen Tiermodellen nicht mit spontanen epileptischen Anfällen assoziiert sind. Zwar zeigen die Tiere entweder unter konvulsiven Bedingungen oder in Hirnschnitten eine Hyperexzitabilität, die sich aber nicht in Form epileptischer Anfälle manifestiert. Diese Diskrepanz läßt vermuten, daß neben den durch kortikale Dysgenesien verursachten Veränderung der Exzitabilität weitere additiv wirkende Ursachen zur Auslösung eines epileptischen Phänotyps notwendig sind oder daß das Ausmaß der dysplastischen Veränderungen nicht weitreichend genug ist. Kortikale Dysgenesien könnten als Prädisposition wirken, auf deren Basis sich durch zusätzliche möglicherweise epileptogen wirkende Faktoren wie genetische Prädisposition, perinatale Hypoxie oder Fieberkrämpfe eine Epilepsie entwickelt (Chevassus-au-Louis et al. 1999a). Bei diesem „Two-Hit“ Modell würden kortikale Dysgenesien einem „First-Hit“ entsprechen (Roper und Yachnis 2002). Für die untersuchten Tiermodelle würde dies bedeuten, daß sich mit ihnen nur ein Teilaspekt einer Epilepsie-Manifestation experimentell untersuchen läßt. Diese anscheinend geringere Assoziation von Epilepsie mit kortikalen Dysgenesien in einigen Tiermodelle gegenüber dem Menschen wird durch folgende Punkte relativiert. Es wurden keine systematischen Beobachtungen der betroffenen Tiere vorgenommen, so daß das Auftreten spontaner epileptischer Phänomene eventuell übersehen wurde. Bei Personen, die einer zur Diagnose kortikaler Dysgenesien notwendigen Bildgebung, wie hochauflösende MRT (Hagemann et al. 2000b; Kuzniecky 1995), zugeführt werden, handelt es sich um eine selektierte Population, in der von einer höheren Epilepsie-Inzidenz im Vergleich zur Normalbevölkerung auszugehen ist (Redecker et al. 1998b). Dadurch könnte die Assoziation von Epilepsie zu kortikalen Dysgenesien überschätzt und deren Inzidenz durch nur zufällige Diagnosen bei asymptomatischen Personen unterschätzt werden. Eine autoptische Studie bei über 7000 Kontrollpersonen ohne Epilepsie ergab bei 1,5 % der Fälle Malformationen des Nervensystems (Meencke und Veith 1992). Dies zeigt, daß dysplastische Veränderungen beim Mensch nicht zwangsläufig mit Epilepsie verbunden sind.

Mögliche Ziele für die zukünftige Entwicklung von Tiermodellen wären eine größere Vergleichbarkeit zu den Subtypen TTFCD und Hemimegalenzephalie, sowie die Präsenz von spontanen epileptischen Anfällen im Zusammenhang mit kortikalen Dysgenesien. Dies könnte Erkenntnisse zur Beantwortung der Frage liefern, welche Faktoren im Zusammenhang mit kortikalen Dysgenesien zur Manifestation eines epileptischen Phänotyps notwendig sind. Die Koordination von tierexperimenteller Grundlagenforschung, genetischen Untersuchungen und klinischen Studien verspricht für die Zukunft weitere Einblicke in die Entstehung und Pathogenität von kortikalen Dysgenesien zu liefern, mit dem Ziel verbesserter präventiver und therapeutischer Maßnahmen.

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Diskussion des Ibotensäure-Tiermodells

Ibotensäure-Wirkung auf Kortextentwicklung

Ibotensäure ist ein aus muscarina amanita Pilzen gewonnenes Glutamat-Analogon, welches ein Agonist für NMDA und metabotrope Glutamat-Rezeptoren ist (Marret et al. 1995). Innocenti und Berbel (1991) beschreiben eine dysplasieinduzierende Wirkung durch Ibotensäure-Injektion in den visuellen Kortex bei neugeborenen Katzen. Im Bereich der Injektionsstelle entsteht dabei ein Mikrogyrus mit einer dem menschlichen vierschichtigen Kortex bei Polymikrogyrie ähnlichen Laminierung. Durch Ibotensäure Injektion am Tag der Geburt von Goldhamstern werden Migrationsstörungen verursacht in Form von nodulären

periventriculären Heterotopien, Band- oder diffusen Heterotopien, sub- oder intrakortikalem Arrest der Migration und Ektopien in der Molekularschicht. Dagegen ist bei postmigratorischen Neuronen der Schichten V und VIa nur ein Zellverlust zu beobachten (Marret et al. 1996). Eine systematische Untersuchung von Ibotensäure-Injektionen auf unterschiedliche Schritte der Kortexentwicklung zeigt einen vom Injektionszeitpunkt abhängigen Wandel der induzierten Läsionen. Die Applikation von Ibotensäure während der Migration supragranulärer Neurone verursacht Heterotopien. Infragranuläre Neurone der Schichten V – VI nach Abschluß ihrer Migration werden in der Phase der Reifung durch Ibotensäure zerstört, so daß durch Einfaltung der Kortexoberfläche in diesem Bereich ein Mikrogyrus entsteht. Da die Migration supragranulärer Neurone und die Reifung infragranulärer Neurone teilweise überlappend stattfindet, können Heterotopien und Mikrogyrus parallel entstehen.

Wird Ibotensäure zu einem späteren Zeitpunkt injiziert, wenn die supragranulären Neurone ihre Migration abgeschlossen haben und sich wie die infragranulären Neurone in der Phase der Reifung befinden, wird eine Destruktion in allen Kortexschichten verursacht. Nach Abschluß der Kortexentwicklung induzieren Ibotensäure-Injektionen in der weißen Substanz zur menschlichen PVL (periventriculäre Leukomalazie) vergleichbare Veränderungen (Gressens et al. 1996; Gressens 1999). Simultane Injektion von Ibotensäure mit dem NMDA-Antagonist AP7 oder dem metabotropen Glutamatrezeptor Antagonist L-AP3 ergibt, daß eine Blockade der über NMDA-Rezeptoren vermittelten Ibotensäure-Wirkung die Entwicklung der oben beschriebenen Veränderungen verhindert. Die Blockade der metabotropen Rezeptoren hat im Gegensatz dazu keinen protektiven Effekt. Dies zeigt, daß die dysplasieinduzierende Wirkung der Ibotensäure auf den in der Entwicklung befindlichen Kortex über NMDA-Rezeptoren vermittelt wird (Marret et al. 1995, 1996; Gressens et al. 1996). Dabei wird die exzitotoxische Wirkung vermutlich über einen NMDA-Rezeptor vermittelten Ca^{2+} -Einstrom verursacht. Dies führt zum Zelltod von postmigratorischen Neuronen, im Unterschied dazu werden migrierende Neurone verschont, was evtl. auf einen Reifeunterschied der NMDA-Rezeptoren zurückzuführen ist (Innocenti und Berbel 1991; Marret et al. 1996). Dabei könnte ein geringerer Reifezustand der NMDA-Rezeptoren in migrierenden Neuronen zu einem geringeren Ca^{2+} -Influx führen, was diese Zellen vor der Destruktion bewahrt. Dennoch werden durch ein verändertes Ionen-Verhältnis vermutlich an der Migration beteiligte Schritte beeinflusst, die zu einem vorzeitigen Stopp der Migration und damit zu Heterotopien führen können (Marret et al. 1996). In Gewebekulturen neuronaler Vorläuferzellen des Kortex von Ratten zeigt Ibotensäure in hoher Dosierung eine über NMDA-Rezeptoren vermittelte inhibierende Wirkung auf die Migration (Kihara et al. 2002). Behar et al. (1999) zeigen eine dosisabhängige Wirkung von Glutamat auf NMDA-Rezeptoren bei der Regulation der Migration in dissoziierten, embryonalen, kortikalen Zellen von Mäusen. Dabei werden bei sehr kleinen und sehr großen Glutamat-Dosen wenige migrierende Neurone und bei mittleren Dosen sehr hohe Zahlen migrierender Neurone beobachtet. Dabei vermittelt Glutamat über NMDA-Rezeptoren eine vom Konzentrations-Gradient abhängige, gerichtete Migration (Chemotaxis) und in einem geringeren Maße eine Gradient unabhängige, ungerichtete Migration (Chemokinese). Dieser Effekt ist allerdings bei Mäusen stärker ausgeprägt als bei Ratten, bei denen die GABA vermittelte Regulation der Migration (Behar et al. 1998, 2000, 2001) der Glutamat vermittelten Wirkung überwiegt. Über NMDA-Rezeptoren können somit die Migration stimulierende oder hemmende Signale vermittelt werden, ohne daß abschließend geklärt ist welche Mechanismen, wie z. B. Dosisabhängigkeit oder Abhängigkeit von der Gewebeart und dessen Reifezustand, dieses differierende Verhalten erklären. Durch Ibotensäure Injektionen werden keine sichtbaren Veränderungen extrazellulärer Proteine oder der Radiärfaserglia verursacht, was alternative Mechanismen zur Beeinflussung der Migration wären (Gressens et al. 1996).

Dysplasie-Induktion bei Wistar-Ratten durch Ibotensäure-Injektion

Redecker et al. (1998a) etablierten das zuvor für Katzen (Innocenti und Berbel 1991), Mäusen (Marret et al. 1995) und Hamstern (Marret et al. 1996) beschriebene Tiermodell bei Wistar-Ratten. Die Menge von 10µg Ibotensäure besaß dabei die Potenz, bei allen am Tag der Geburt (P 0) injizierten Tieren einen Mikrogyrus zu induzieren, bei geringerer Mortalität gegenüber höheren Dosen. Für die vorliegende Arbeit wurden ebenfalls 10 µg Ibotensäure verwendet, allerdings konnten dabei nur in 72 % der Wistar-Ratten Malformationen erzeugt werden, was vermutlich auf eine geringere Potenz der verwendeten Ibotensäure-Chargen zurückzuführen ist. Die induzierten fokalen kortikalen Dysplasien waren durch Depopulation und Verschmälerung der Kortexschichten V und VIa gekennzeichnet. Neurone des Kortex erreichen drei bis vier Tage nach ihrer letzten Mitose durch Migration ihr Ziel in der kortikalen Platte. Somit sind die um E 15, der bei Ratten bis E 21 dauernden Embryonalzeit, gebildeten Neurone der Schichten V und VI zum Geburtszeitpunkt in der kortikalen Platte präsent (Rosen et al. 1996). Aufgrund der zytotoxischen Wirkung der Ibotensäure auf postmigratorische Neurone kommt es zum Zellverlust in diesen Kortexschichten. Die zwischen E 17 und E 19 gebildeten Neurone der Schichte II – IV haben ihre Migration zum Zeitpunkt der Ibotensäure-Injektion (P 0) nicht abgeschlossen und bleiben von der destruktiven Ibotensäure-Wirkung verschont (s. o.). Diese Neurone bilden wahrscheinlich den oberhalb des Zellverlustes entstehenden Kortexbereich, wie dies im Gefrier-Läsion Modell gezeigt werden konnte (Rosen et al. 1996), mit Ausnahme der Schicht I. Dabei erscheint die Kortexschicht IV unverändert, während die Kortexschichten II und III geringfügig verbreitert sind. Rosen et al. (1996) konnten zeigen, daß die zum Zeitpunkt der Geburt abgeschlossene Neurogenese bei Ratten nach Gefrier-Läsion nicht verlängert oder erneut initiiert wird. Ibotensäure-Injektion bei neugeborenen Katzen oder Hamstern führt ebenfalls nicht zu einer kompensatorischen Neuronenproliferation (Innocenti und Berbel 1991; Marret et al. 1996). Eine gesteigerte Neuronenbildung ist deshalb als Ursache einer Verbreiterung der Schichten II und III nicht wahrscheinlich. Weitere Erklärungen wären ein verminderter Zelltod in den oberen Kortexschichten nach Zellverlust in den Kortexschichten V und VI oder eine Akkumulation einer unveränderten Neuronenzahl der Schichten II bis III, die für eine größere Kortexoberfläche bestimmt waren, oberhalb des Zellverlustes der tiefen Kortexschichten. Die Auswertung der neokortikalen Fläche in aus der Dysplasie-region angefertigten Hirnschnitten ergab einen signifikant verminderten Neokortex in diesen Ebenen, was auf einen fokalen Volumenverlust der neokortikalen Schichten V und VI im Bereich der Injektionsstelle schließen läßt. Durch die Verschmälerung der Kortexschichten V und VI und die gleichzeitige relative Zunahme des Volumens der obren Kortexschichten läßt sich die zu beobachtende Sulcus-Mikrogyrus-Bildung erklären.

Die entstehende Laminierungsstruktur im Bereich des Mikrogyrus zeigt ein vergleichbares Muster zum vierschichtigen Kortex der Polymikrogyrie des Menschen (Innocenti und Berbel 1991; Marret et al. 1995; Redecker et al. 1998a). Dabei entspricht die 1. Schicht einer Fortsetzung der Molekularschicht des unveränderten Kortex. Die 2. Schicht ist dabei besonders breit und enthält Zellen der Schichten II, III und teilweise IV. Die schmale 3. Schicht besteht aus Neuropil und nur sehr wenigen Pyramidenzellen aus den Schichten V, VI und teilweise IV, während die 4. Schicht einer Fortsetzung der Schicht VIb des unveränderten Neokortex entspricht (Marret et al. 1995). Im Unterschied zur menschlichen Polymikrogyrie ist der durch Ibotensäure induzierte Sulcus nur sehr flach ausgeprägt, was einerseits auf Artunterschiede in den Kortexproportionen zurückzuführen ist (Innocenti und Berbel 1991). Andererseits ist die bei Wistar-Ratten durch eine fokale Ibotensäure-Injektion induzierte Depopulation nicht so ausgeprägt, wie sie für die 3. Schicht der Polymikrogyrie typisch ist. Dies ist durch eine bei der gewählten Dosierung begrenzte Zytotoxizität zu erklären. Durch

höhere Ibotensäure-Mengen werden ausgeprägtere Läsionen induziert bei einem allerdings deutlichen Anstieg der Mortalität (Redecker et al. 1998a), weshalb auf eine Dosiserhöhung verzichtet wurde. Die Pathomechanismen der Mikrogyrus-Bildung bei Ibotensäure injizierten Wistar-Ratten und der menschlichen Polymikrogyrie zeigen Überschneidungen. Dabei führt beim Menschen eine vermutlich vaskulär-ischämisch bedingte Destruktion mit anschließender Neuronenmigration zur Polymikrogyrie (McBride und Kemper 1982). Ein großer Teil der Ischämie bedingten Gewebeerstörung wird über die Wirkung freigesetzter Exzitotoxine auf NMDA-Rezeptoren vermittelt (Simon et al. 1984), ähnlich der Ibotensäure-Wirkung. Somit imitiert das Ibotensäure-Tiermodell in einem umschriebenen Areal nicht nur den morphologischen Aspekt der menschlichen Polymikrogyrie, sondern auch deren Entstehungsmechanismus (Innocenti und Berbel 1991).

Eine Ähnlichkeit des Dysplasieareals besteht auch zur FCD Typ I (Palmini und Luders 2002), einer umschriebenen kortikalen Desorganisation der Laminierung, welche auf Störungen der Kortexorganisation zurückzuführen ist (Barkovich et al. 1996). Dabei fehlen dysmorphe Neurone, die in fakultativer Begleitung von Ballon-Zellen häufig im Zusammenhang mit fokalen kortikalen Dysplasien auftreten (Battaglia et al. 1996; Spreafico et al. 1998a; Tassi et al. 2002). Diese Form wird TTFCD (Taylor et al. 1971; Garbelli et al. 1999) oder FCD Typ II (Palmini und Luders 2002) genannt, wobei Ballon-Zellen sowohl neuronale als auch gliale Differenzierung zeigen (Hilbig et al. 1999), was auf eine Störung der Kortextwicklung bereits auf der Stufe der Vorläuferzell-Proliferation hindeutet (Barkovich et al. 1996). In den nach Abschluß der Proliferation induzierten Dysplasien nach Ibotensäure-Injektion lassen sich bei histologischer Betrachtung keine dysomorphen Zellen erkennen. Durch MAP-2 Immunhistochemie lassen sich lediglich leichte Abweichungen im Dendritenbaum in der Umgebung von Ektopien beobachten, bei im übrigen normalem radiären Dendritenverlauf (Redecker et al. 1998b).

Neben einer gestörten Kortexorganisation sind auch Migrationsstörungen bei mit Ibotensäure injizierten Wistar-Ratten zu beobachten. Im Bereich der Sulcus-Mikrogyrus-Formation entwickelt sich fakultativ eine ektopye Neuronenpopulation in der Molekularschicht, die trichterförmig in den durch Einfaltung des Kortex entstandenen Sulcus eingebettet ist. In der Arbeit von Redecker et al. (1998a) wurden bei 58 % der SHAM injizierten Tiere ebenfalls Ektopien in der Schicht I bei sonst unverändertem Kortex beobachtet. Piale Stichverletzungen können Ektopien in der Molekularschicht verursachen (Rosen et al. 1992). Bei den fünf SHAM injizierten Tieren dieser Arbeit wurden solche ektopen Zellnester nicht beobachtet, was vermutlich durch den kleinen Stichprobenumfang zu erklären ist. Die Mikrogyrus assoziierten Ektopien der ibotensäureinjizierten Tiere treten nach einer kürzeren Latenz auf und haben ein größeres Volumen als die bei SHAM Tieren zu beobachtenden Ektopien (Redecker et al. 1998a). Bei der Entstehung scheint eine mechanische Komponente beteiligt zu sein, wobei eine durch den Stichkanal verursachte Gewebeerstörung einen verlängerten Migrationsweg bis in die Molekularschicht ermöglicht. Durch Ibotensäure-Wirkung scheint dabei eine beschleunigte Migration von mehr Neuronen verursacht zu sein. Der Beitrag der mechanischen und der durch Ibotensäure vermittelten Komponente zur Pathogenese der Ektopien läßt sich dabei aufgrund der Koinzidenz beider Mechanismen nur schwer differenzieren (Redecker et al. 1998a). Eine erhöhte Neuronenzahl in der Schicht I wird gehäuft bei Epilepsie-Patienten beobachtet und im Zusammenhang mit Mikrodygenesien beschrieben (Meencke und Veith 1992), einer bezüglich Definition und klinischen Relevanz kontrovers diskutierten Dysplasieform (Eriksson et al. 2002; Kasper 2002).

Ein weiterer Effekt der Ibotensäure-Injektionen zeigt sich durch die fakultative Bildung von subkortikalen Heterotopien bei Wistar-Ratten (Hagemann et al. 2001). Diese wurden bei der

vorliegenden Experimentalgruppe isoliert oder synchron zur Mikrogyrusbildung beobachtet. Diese nodulären subkortikalen Heterotopien entstehen durch eine migrationshemmende Wirkung der Ibotensäure auf supragranuläre Neurone (Marret et al. 1996; Hagemann et al. 2001). Die Morphologie der Ibotensäure induzierten Läsionen ist abhängig vom Reifezustand des Hirnes zum Zeitpunkt der Injektion (Gressens et al. 1996). Durch Ibotensäure Injektion zum Zeitpunkt der Geburt werden bei Hamstern ausgeprägte Migrationsstörungen verursacht (Marret et al. 1996), während bei Mäusen die destruktive Wirkung mit anschließender Mikrogyrus-Bildung bestimmend ist (Marret et al. 1995). Dieser Unterschied läßt sich durch einen artspezifischen, funktionellen Reifeunterschied der Hirnentwicklung zum Zeitpunkt der Geburt erklären, wobei Hamster zu diesem Zeitpunkt einen unreiferen Entwicklungsstand aufweisen (Gressens et al. 1996; Redecker et al. 1998a). Wistar-Ratten scheinen einen intermediären Reifezustand im Vergleich zu Hamstern und Mäusen zu besitzen, so daß aufgrund einer Überlappung der Zeitfenster für migrationshemmende und destruirende Ibotensäure-Wirkung bei Wistar-Ratten beide Mechanismen parallel auftreten können (Gressens et al. 1996; Redecker et al. 1998a). Die Tatsache, daß bei einigen Tieren subkortikale Heterotopien auftreten, während diese bei anderen Tieren fehlen ist möglicherweise auf funktionelle Reifeunterschiede zwischen den Tieren zurückzuführen. Dabei kommen interindividuelle Unterschiede zwischen den Tieren in Betracht oder eventuell geringfügige Schwankungen der Schwangerschaftsdauer, die einen differierenden Reifezustand der Hirnentwicklung zum Zeitpunkt der Geburt zwischen verschiedenen Würfen erklären könnten. Ein Indiz für diese Annahme ist, daß fünf der acht beobachteten subkortikalen Heterotopien in einem von sieben injizierten Würfen zu beobachten waren. Eine allerdings nicht belegte leichte Verkürzung der Schwangerschaft in diesem Wurf könnte durch eine relative Unreife das Auftreten von subkortikalen Heterotopien bei diesen Tieren begünstigt haben. Eine alternative Erklärung wäre eine unterschiedliche Ibotensäure-Potenz zwischen verschiedenen Chargen, die für die Injektion der Würfe verwendet wurden. Die induzierten nodulären subkortikalen Heterotopien zeigen eine morphologische Ähnlichkeit zu den beim Menschen spontan (Spalice et al. 2002) oder familiär (Sheen et al. 2001) auftretenden nodulären periventrikulären oder subkortikalen Heterotopien, die mit Epilepsie assoziiert sind (Raymond et al. 1995; Battaglia et al. 1996; Porter et al. 2002).

Kritische Beurteilung des Ibotensäure-Tiermodells bei Wistar-Ratten und Vergleich zum Gefrier-Läsion Tiermodell

Ein Nachteil für experimentelle Untersuchungen ist die Variabilität der durch Ibotensäure-Injektionen induzierten Läsionen, die von unverändertem Kortex, über geringfügige Verschiebungen laminärer Proportionen, Mikrogyrus- und Ektopie-Bildung, Heterotopie-Bildung bis zu einem komplett dysmorphen Erscheinungsbild der injizierten Hemisphäre reichen. Um die Homogenität in den Experimentalgruppen zu erhöhen ist es erforderlich die Tiere nach den Läsionen zu gruppieren. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Allerdings bleibt innerhalb der Gruppen eine Restvariabilität bestehen. Einige Tiere entwickelten synchron einen Mikrogyrus und eine subkortikale Heterotopie, die jeweils deutlich in fronto-okzipitaler Richtung voneinander getrennt waren. Dennoch besteht die Möglichkeit, daß sich die morphologischen Ausläufer und besonders evtl. nicht sichtbare, weitreichende Netzwerk-Restrukturierungen überlagern, wodurch die Interpretation experimenteller Ergebnisse erschwert wird.

Ein weiteres Tiermodell, welches eine dem Ibotensäure induzierten Mikrogyrus vergleichbare Läsion hervorruft ist das Gefrier-Läsion Modell. Bei diesem Modell wird kurz nach Geburt ein tiefgekühlter Metallzylinder für wenige Sekunden auf die Schädelkalotte aufgesetzt und durch Konduktion eine vom Kontaktpunkt konzentrisch ausgehende Nekrose im

darunterliegenden Kortex erzeugt. Diese von mehreren Arbeitsgruppen angewandte Methode wird von den einzelnen Autoren dabei geringfügig bezüglich Zeitpunkt (P 0 bis P 2), Zylinderdurchmesser (0,5 bis 2 mm), Zylindertemperatur ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$), Zylindermaterial (Kupfer oder Stahl) und Kontaktzeit (2 bis 10 s) variiert (Luhmann und Raabe 1996; Defazio und Hablitz 1999; Rosen et al. 2000; Jacobs et al. 1999a). Aufgrund der fokalen Nekrose mit anschließender Migration von Neuronen in den Bereich der Nekrose entsteht ein Mikrogyrus, umgeben von einem vierschichtigen Kortex (Zilles et al. 1998). Dieser vierschichtige Kortex hat einen vergleichbaren Aufbau zur menschlichen Polymikrogyrie und zum Ibotensäure-Tiermodell. Das Gefrier-Läsion Modell hat dabei eine höhere Reproduzierbarkeit gegenüber Ibotensäure-Injektionen, zusätzlich ist die induzierte Destruktion in den Kortexschichten V und VI ausgeprägter. Durch longitudinale Anordnung mehrerer Zylinder läßt sich wahlweise ein Sulcus über einige Millimeter erzeugen, mit dem Vorteil eine größere Zahl an Hirnschnitten zur experimentellen Untersuchung zur Verfügung zu haben (Luhmann und Raabe 1996; Redecker et al. 2000b; Kraemer et al. 2001). Ähnlich dem Ibotensäure-Modell können zum Mikrogyrus begleitende Ektopien entstehen (Redecker et al. 2000b). Durch Gabe des NMDA-Antagonisten MK-801 läßt sich die Größe der Gefrier-Läsionen signifikant verringern, was auf eine Beteiligung von NMDA-Rezeptoren an einer ausgelösten neurotoxischen Kaskade schließen läßt, die zum Gewebeschaden beiträgt (Rosen et al. 1995). Damit besteht neben einer morphologischen Parallele zum Ibotensäure-Tiermodell auch eine zumindest teilweise Überschneidung des Pathomechanismus. Subkortikale Heterotopien werden nach Gefrier-Läsionen nicht beobachtet, weshalb im Gegensatz zum Ibotensäure-Tiermodell keine Aussagen über diesbezügliche Pathophysiologien möglich sind. Ein größerer Mikrogyrus bei stärkerer Destruktion in den tiefen Kortexschichten gegenüber dem Ibotensäure-Tiermodell führt wahrscheinlich zu einer weitreichenderen Beeinflussung neuronaler Netzwerke. Dies läßt vermuten, daß mögliche Effekte im Gefrier-Läsion Tiermodell ausgeprägter zur Darstellung kommen.

4.2.2 Diskussion der Immunhistochemie

4.2.2.1 Verfahren der immunhistochemischen Darstellung

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob es begleitend zur Entwicklung von kortikalen Dysgenesien zu lokalen oder weitreichenden Veränderungen im Verteilungsmuster der GABA_A Rezeptoruntereinheiten kommt, wurde ein immunhistochemisches Verfahren gewählt. Zur Detektion der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ wurden spezifische Primärantikörper eingesetzt, die im Labor von Herrn Prof. Fritschy hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden (Fritschy und Mohler 1995). Die Spezifität der Antiseren wurde durch Immunopräzipitation und Western-blotting verifiziert und hinsichtlich der immunhistochemischen Verwendbarkeit getestet (Benke et al. 1991; Fritschy und Mohler 1995; Fritschy et al. 1998). Darüber hinaus konnte in zahlreichen Arbeiten ein spezifisches Verteilungsmuster der GABA_A Rezeptoruntereinheiten bei Wistar-Ratten dokumentiert werden (Neumann-Haefelin et al. 1998; Redecker et al. 2000b; Hagemann et al. 2001; Redecker et al. 2002). Das Hirngewebe wurde mittels Mikrowellen-Behandlung auf die Immunhistochemie vorbereitet, dadurch konnte aufgrund einer Erhöhung der Zelloberflächen-Darstellung und Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbung ein deutlich verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht werden (Fritschy et al. 1998; Loup et al. 1998). Die erhöhte Zelloberflächen-Darstellung ist evtl. durch eine Aufweitung des synaptischen Spaltes und einer damit verbesserten Zugänglichkeit für die verwendeten Antikörper zu den Epitopen der dort lokalisierten GABA_A Rezeptoren zu erklären (Fritschy et al. 1998). Mögliche Ursachen für die Reduktion unspezifischer Hintergrundfärbung könnten eine Inaktivierung endogener Peroxidasen und eine Neutralisierung unspezifischer Bindungsstellen für Sekundärantikörper

sein (Loup et al. 1998). Durch die Mikrowellen-Behandlung wird eine subzelluläre Lokalisation der GABA_A Rezeptoruntereinheiten mittels hochauflösender Methoden wie der konfokalen Lasermikroskopie möglich (Fritschy et al. 1998; Loup et al. 1998). Dies wurde bei der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, da die Untersuchung regionaler Veränderungen im Vordergrund stand, ist aber eine Option für weitere Experimente. Durch die verwendete „free-floating“ Technik wird ein optimaler Kontakt zwischen Gewebe und umgebender Flüssigkeit gewährleistet. Allerdings besteht durch die Notwendigkeit des Überführens der Hirnschnitte nach jedem Vorgang eine erhöhte mechanische Beanspruchung des Gewebes, was auch bei sorgfältiger Behandlung zu kleineren Artefakten führen kann. Ein mögliches Problem ist, daß bei nicht vollständiger Entfaltung der Hirnschnitte während der Inkubationsschritte ein ungleichmäßiger Antigen-Antikörper Kontakt entstehen kann mit der Folge einer inhomogenen Immunreaktivität. Deshalb wurde bei allen Inkubations- und Waschschrinen auf eine vollständige Entfaltung geachtet. Eine weitere Ursache einer inhomogenen Immunreaktivität ist eine durch Seifenrückstände verursachte ungleichmäßige Dispersion der Inkubationslösungen. Aus diesem Grund wurde bei einem aus drei Waschschrinen bestehenden Waschvorgang nur im ersten Schritt Triton hinzugefügt. Durch dieses Vorgehen konnten Artefakte minimiert werden. Hirnschnitte, die dennoch geringfügige Artefakte zeigten wurden nicht aus der Untersuchungsgruppe entfernt, um nicht durch selektives Entfernen einem Untersuchungsfehler Vorschub zu gewähren. Zur Visualisierung der Antikörper-Bindungsstellen wurde die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (ABC-Methode) gewählt mit anschließender Umsetzung des Chromogens DAB. Dieses Verfahren ermöglicht durch die indirekte Kopplung mehrerer Peroxidase Enzyme an den Primärantikörper hohe Signalintensitäten im Bereich des nachzuweisenden Antigens (Hsu et al. 1981; Beesley 1993). Die Farbreaktion wurde mit dem Ziel beendet sowohl ein gleichmäßiges Färbeniveau als auch einen gleichmäßigen Kontrast innerhalb einer Rezeptoruntereinheit bei den verschiedenen Versuchsdurchgängen zu erreichen. Dieses Vorgehen wurde im Gegensatz zu einer durch Vorgabe einer konstanten Färbezeit begrenzten Chromogenumsetzung gewählt. Zwischen verschiedenen Versuchsdurchgängen konnten die Zeiten bis zum Erreichen eines vergleichbaren Färbeniveaus variieren, ohne daß als Erklärung eine unterschiedliche GABA_A Rezeptorausstattung zwischen den untersuchten Hirnen der verschiedenen Serien plausibel wäre. Mögliche Ursachen für die unterschiedliche Geschwindigkeit in der Chromogenumsetzung sind veränderte Antigenität verursacht durch geringfügige Unterschiede bei der Fixation oder durch Unterschiede in der Fixationsdauer (Loup et al. 1998). Die Fixationsdauer konnte erheblich variieren, um jeweils größere Serien in einem Versuchsdurchgang immunhistochemisch behandeln zu können. Ein weiterer potentieller Einflußfaktor ist eine variable Anzahl von indirekt an die untersuchten Antigene gebundenen Peroxidase-Enzymen, z. B. durch schwankende Affinität der Primär- und Sekundär-Antikörper zwischen verschiedenen Chargen oder eine unterschiedliche Größe der assoziierten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe wie sie durch Schwankungen der Raumtemperatur entstehen können. Schließlich sind nicht kontrollierte Einflußgrößen während der Farbreaktion selber wie unterschiedliche katalytische Potenz der verwendeten H₂O₂ Lösungen, Differenzen in der Umgebungstemperatur oder unterschiedliche Eigenschaften verschiedener DAB-Chargen als mögliche Gründe für die zwischen verschiedenen Untersuchungsserien differierenden Geschwindigkeiten in der Chromogenumsetzung anzusehen.

Die immunhistochemisch behandelten Hirnschnitte zeigten ein selektives und sehr konsistentes Verteilungsmuster für die untersuchten GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$. Das in Kapitel 3.2 beschriebene Verteilungsmuster der GABA_A Rezeptoruntereinheiten entspricht den Ergebnissen von Fritschy und Mohler (1995) und

Redecker et al. (2000b) und ist ein guter Qualitätsmaßstab für das in dieser Arbeit verwendete immunhistochemische Verfahren und zeigt dessen Reliabilität.

4.2.2.2 Aussagekraft der verwendeten Immunhistochemie

Immunhistochemie und tatsächliche Anzahl an GABA_A Rezeptoren

Die entwickelten Primärantikörper wurden gegen AS-Sequenzen der verschiedenen GABA_A Rezeptoruntereinheiten entwickelt. Ziel der immunhistochemischen Visualisierung ist es eine Aussage über die Verteilung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten Proteine zu treffen. Dabei läßt sich die Immunoreaktivität durch zwei Variablen beeinflussen, durch eine Zu- oder Abnahme der entsprechenden GABA_A Rezeptoruntereinheit oder durch Veränderungen der Affinität der Antikörper-Bindungsstelle. Aus diesem Grund geben die erkennbaren optischen Dichtewerte eine Auskunft über die Dichte der Bindungsstellen für die Primärantikörper, und nicht notwendigerweise über Quantität der untersuchten GABA_A Rezeptoruntereinheiten Proteine (Zilles et al. 1998). Der Vergleich zwischen Immunoreaktivität und mRNA Verteilung, ermittelt durch in situ Hybridisierung, ergab eine hohe Übereinstimmung in der regionalen Verteilung und der relativen Signalintensitäten (Fritschy und Mohler 1995). Zusätzlich zu einer guten Korrelation zwischen Immunoreaktivität und mRNA Level der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1-3$ und $\gamma 2$ konnten Chen et al. (1999) ein paralleles Verhalten von Immunoreaktivität und Proteinmenge, gemessen durch quantitativen Western-Blot, am Beispiel der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\beta 3$ zeigen. Ein Vergleich der Immunoreaktivität für die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 5$ mit dem quantitativen Nachweis der entsprechenden Proteine durch Immunoblot ergab ebenfalls eine hohe Übereinstimmung (Poulter et al. 1999) Diese Daten lassen auf eine Regulation der GABA_A Rezeptoruntereinheiten auf Transkriptions-Ebene schließen (Fritschy und Mohler 1995; Penschuck et al. 1999; Chen et al. 1999) und auf eine gute Validität der Immunhistochemie im Bezug auf die tatsächliche Proteinmenge der untersuchten GABA_A Rezeptoruntereinheiten (Chen et al. 1999; Poulter et al. 1999). Unter der pathophysiologischen Situation kortikaler Dysgenesen wurde die Methode allerdings nicht validisiert.

Zusammenhang zwischen Immunhistochemie und GABA_A Rezeptor-Funktion

Eine weiteres Ziel ist die Abschätzung funktioneller Veränderungen der über GABA_A Rezeptoren vermittelten Signalübertragung anhand quantitativer Veränderungen der Immunoreaktivität und der Verschiebung der Relation der GABA_A Rezeptoruntereinheiten untereinander. Die Signalübertragung wird dabei über GABA_A Rezeptoren der Zellmembran vermittelt. Die Primärantikörper sind gegen extrazellulär gelegene Epitope der GABA_A Rezeptoruntereinheiten gerichtet. Durch die Detergenzien-Wirkung stellt die Zellmembran jedoch keine Barriere für die Antikörper da. Der größte Teil der Immunoreaktivität entsteht im Bereich der Zellmembran, zusätzlich lassen sich aber auch Bindungsstellen intrazellulär nachweisen (Fritschy und Mohler 1995). Damit werden auch intrazelluläre, nicht an der Signalübertragung beteiligte GABA_A Rezeptoruntereinheiten mitgemessen. Dabei handelt es sich entweder um in der Synthese oder im Abbau befindliche Proteine oder um einen intrazellulären Reservepool von GABA_A Rezeptoren, der bei der Kurzzeit-Adaptation durch Verlagerung an die Zelloberfläche und umgekehrt beteiligt ist (Brunig et al. 2001). GABA_A Rezeptoren können sich extrasynaptisch befinden oder über Linker-Proteine im Bereich von Synapsen geclustert sein (Essrich et al. 1998; Chen et al. 2000), was Einfluß auf die funktionellen Eigenschaften der GABA_A Rezeptoren hat (Chen et al. 2000). Die in dieser Arbeit ermittelten regionalen optischen Dichtewerte ergeben sich durch Summierung der im intrazellulären, extrasynaptischen und synaptischen Bereich der Neurone und evt. im Bereich

von Glia-Zellen entstandenen Immunreaktivität (Fritschy und Mohler 1995), ohne daß sich der Beitrag der einzelnen Komponenten differenzieren läßt. Die Mikrowellen-Behandlung bewirkt einen überwiegenden Nachweis von im Bereich von Synapsen lokalisierten GABA_A Rezeptoruntereinheiten (Fritschy et al. 1998). Es ist zu vermuten, daß Veränderungen der Immunreaktivität hauptsächlich eine veränderte Anzahl der im Bereich von Synapsen gelegenen GABA_A Rezeptoruntereinheiten widerspiegelt. Ein unterschiedliches Verhalten für die einzelnen GABA_A Rezeptoruntereinheiten läßt zwar keine exakte Aussage über die Untereinheiten-Stöchiometrie zu, dennoch lassen sich verstärkte oder verminderte Beteiligung einzelnen Untereinheiten an GABA_A Rezeptoren mit entsprechenden Veränderungen der Rezeptorfunktion vermuten (Brussaard et al. 1997; Brussaard und Herbison 2000; Lavoie et al. 1997; Lorez et al. 2000; Maric et al. 1999). Zusätzliche modulierende Faktoren der GABA_A Rezeptor-Funktion wie Rezeptor-Phosphorylierung (Penschuck et al. 1999; Owens und Kriegstein 2002) werden bei der Immunhistochemie nicht erkannt. Eine Aussage über die GABA-Rezeptorbindung, wie dies in der Rezeptor-Autoradiographie gemessen wird (Zilles et al. 1998), ist durch Immunhistochemie ebenfalls nicht möglich. Serafini et al. (1998) konnten eine sehr gute Korrelation der Cl⁻ Kanal Kinetik mit dem Transkriptions-Level einzelner GABA_A Rezeptoruntereinheiten aufzeigen. Aufgrund der oben beschriebenen Übereinstimmung von mRNA Level und Immunreaktivität läßt dies vermuten, durch Immunhistochemie die Rezeptor-Funktion annähernd abschätzen zu können.

Die GABAerge Signalübertragung unterliegt neben der Zahl und den Eigenschaften der GABA_A Rezeptoren zahlreichen zusätzlichen Variablen wie Lokalisation der Synapsen und weiteren prä- und post-synaptischen Faktoren (Bernard et al. 2000; Schwartzkroin 1997; Owens und Kriegstein 2002). Somit liefert die Untersuchung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung bei kortikalen Dysgenesen nur eine Facette der möglichen Pathophysiologie der assoziierten Epileptogenität. Aufgrund der fast unüberschaubaren Anzahl möglicher epileptogener und kompensatorischer Faktoren ist die Relevanz einzelner Befunde für das gesamte neuronale Netzwerk nur schwer abzuschätzen (Bernard et al. 2000) und ermöglicht eine evtl. nur vorläufige Einordnung der Befunde nur im Kontext mit anderen Untersuchungsergebnissen.

4.2.3 Diskussion der Auswertung

Auswertungsmethode

Zur Auswertung der immunhistochemisch behandelten Hirnschnitte wurden semiquantitative optische Dichtewerte bestimmt. Das Kamerasignal wurde durch einen Videometrieprozessor digitalisiert und auf einen MacIntosh Computer übertragen. Die erzeugten Dateien wurden mit Bildbearbeitungssoftware analysiert. Das Graustufenbild wurde zur übersichtlichen Darstellung in Falschfarben (Level 256) umgerechnet. Über den Videometrieprozessor waren Einstellungen von Kontrast und Intensitätsniveau möglich. Der Kontrast wurde verstärkt, aber innerhalb einer Untergruppe gleicher GABA_A Rezeptoruntereinheiten nicht verändert. Dadurch wurde sichergestellt, daß die konstanten Abstände zwischen aufeinanderfolgenden Skalenwerten gleichbleibenden Unterschieden in der Immunreaktivität innerhalb einer Primärantikörper-Gruppe entsprechen. Zwischen den Untergruppen wurde eine Kontrastanpassung aufgrund der unterschiedlichen anatomischen Verteilungen der GABA_A Rezeptoruntereinheiten vorgenommen, um eine übersichtliche Darstellung der Verteilung zu erlangen. Dies hat zur Folge, daß absolute Differenzen der optischen Dichtewerte innerhalb einer GABA_A Rezeptoruntereinheit nicht den gleichen Unterschieden an Immunreaktivität einer anderen GABA_A Rezeptoruntereinheiten entsprechen. Deshalb sind relative Veränderungen innerhalb einer GABA_A Rezeptoruntereinheit aussagekräftiger für den

Vergleich gegenüber anderen GABA_A Rezeptoruntereinheiten. Das Intensitätsniveau wurde beim Einlesen eines jeden Schnittes so angepaßt, daß es in einem vergleichbaren Bereich mit den übrigen Schnitten einer GABA_A Rezeptoruntereinheit lag. Die Nachregulierung der Intensität mittels Videometrieprozessor bei gleichzeitiger Kontrastverstärkung wurde notwendig, um alle Hirnschnitte mit ihrem kompletten Intensitätsbereich in den Grenzen der möglichen optischen Dichtewerte (0 und 240) darzustellen. Anderenfalls ergaben sich für einige Hirnschnitte größere Areale, die über diesen Wertebereich hinausreichten und somit einer differenzierten Auswertung nicht mehr zugänglich waren. Durch dieses Vorgehen und durch den Versuch, die Chromogenumsetzung auf einem konstanten Färbeniveau zu beenden, wurde eine einheitliche und differenzierte Darstellung der Hirnschnitte für eine GABA_A Rezeptoruntereinheit erreicht. Dadurch ergibt sich aber das Problem, daß Unterschiede im Intensitätsniveau zwischen verschiedenen Hirnschnitten, z. B. aus der Ibotensäure- und der Kontrolltier-Gruppe nivelliert wurden. Zusätzlich waren diese Schritte vom Untersucher abhängig, zum einen durch Beeinflussung der Färbezeiten und zum anderen durch subjektive Nachregulierung der Intensität vor dem Speichern der Bilddateien. Damit besteht die Gefahr, die Ergebnisse der anschließenden optischen Dichtewert-Messung im Sinne eines Untersucherfehlers zu beeinflussen. Deshalb wurden die Hirnschnitte seitenvergleichend ausgewertet, da Färbereaktion und Bildbearbeitung für beide Hemisphären unter absolut identischen, vom Untersucher unabhängigen, Bedingungen stattgefunden haben. Ein möglicher systematischer Fehler wäre eine unterschiedliche Schnittdicke beider Hemisphären. Um einen solchen Effekt von tatsächlichen Effekten durch Ibotensäure Wirkung zu separieren, wurden Kontrollschnitte auf die gleiche Art behandelt und seitenvergleichend ausgewertet. Da dabei keine signifikanten Seitenunterschiede auftraten, ist ein Bias durch Schnittdickenartefakte unwahrscheinlich. Ein Nachteil der seitenvergleichenden Untersuchung ist eine verminderte Aussagekraft im Falle von Effekten, die über die injizierte Hemisphäre hinausreichen und der Beobachtung entgehen würden. Dabei läßt sich nicht erkennen, inwieweit eine im Seitenvergleich geminderte Immunoreaktivität der injizierten Hemisphäre durch eine z. B. kompensatorisch gesteigerte GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung der Gegenseite mitbegründet ist. Eine weitere möglicherweise relevante Konstellation ist eine GABA_A Rezeptoruntereinheiten Verminderung der injizierten Hemisphäre, die von einer Abnahme der kontralateralen Seite begleitet wird. In diesem Fall würden die Effekte in der seitenvergleichenden Auswertung unterschätzt oder dieser entgehen. Die gewählte seitenvergleichende Auswertung ist robust gegenüber unterschiedlichen Intensitätsniveaus, verursacht durch Unterschiede im Versuchsablauf oder durch den Untersucher, bei allerdings vermindelter Aussagekraft. Ein Ansatz für weitere Untersuchungen, um über die injizierte Hemisphäre hinausreichende Effekte zu erkennen, ist ein Vergleich der Ibotensäure-Gruppe gegenüber der Kontrolltier-Gruppe. Die Voraussetzung dafür wäre eine quantitative Dichtebestimmung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten.

Terminologie

Der Begriff „kortikale Dysgenese“ wurde zur Beschreibung der möglichen Manifestationen einer abweichenden kortikalen Entwicklung verwendet (Roper und Yachnis 2002; Redecker et al. 2000a; Hagemann et al. 2000b). Synonym verwendete Termini sind „malformations of cortical development“ (Barkovich et al. 1996, 2001a, 2001b) oder „disorders of cortical development“ (Palmini 2000; Porter et al. 2002). Ein älterer, ursprünglich synonym zu verstehender Begriff „neuronal migration disorder“ unterstellt dabei eine Migrationsstörung als Ursache der abweichenden Kortextentwicklung. Dies ist aber nur einer von mehreren möglichen Pathomechanismen, aus diesem Grund sollte der Begriff nicht mehr verwendet werden. In Anlehnung an Roper und Yachnis (2002) beschreibt der Begriff „kortikale Dysplasie“ einen veränderten Kortex in seiner normalen Lokalisation im Gegensatz zu dem

Begriff „heterotoper Kortex“, der einen veränderten Kortex in veränderter Position beschreibt. Der in dieser Arbeit verwendete Terminus „fokale kortikale Dysplasie“ meint in Übereinstimmung dazu einen dysplastisch veränderten Kortex in normaler Lokalisation, wobei durch den Zusatz „fokal“ die umschriebene Ausdehnung betont wird. Die Bezeichnung ist nicht synonym zu der in Klassifikationen verwendeten spezifischen Untergruppe FCD (Barkovich et al. 1996; Palmieri und Luders 2002). Unter Ektopie sind in dieser Arbeit Zellnester in der Molekularschicht zu verstehen. Zur Beschreibung von neokortikalem Gewebe in der weißen Substanz wurde der Begriff „subkortikale Heterotopie“ verwendet. Der Begriff „Mikrogyrus“ beschreibt das makroskopische Erscheinungsbild einer durch Nekrose in den tiefen Kortexschichten verursachten zytoarchitektonischen Veränderung mit einer Mikrosulcus-Bildung auf der bei Ratten normalerweise glatten Kortexoberfläche (Marret et al. 1995).

Untersuchungsgruppen und Meßbereiche

In der Ebene des Mikrogyrus angefertigte Koronarschnitte wurden zur Untersuchungsgruppe der fokalen kortikalen Dysplasie zusammengefaßt, während Hirnschnitte aus dem Bereich subkortikaler Heterotopien in einer getrennten Untersuchungsgruppe ausgewertet wurden. In den Untersuchungsgruppen war von jedem Tier nur ein Hirnschnitt pro Primärantikörper vertreten, um selbst bei größeren fokalen kortikalen Dysplasien oder subkortikalen Heterotopien nicht einzelne Tiere überzupräsentieren. Bei sechs Tieren, die in ausreichender fronto-okzipitaler Distanz beide Veränderungen synchron zeigten, wurde aus beiden Ebenen jeweils ein Hirnschnitt in der Gruppe der fokalen kortikalen Dysplasie und der subkortikalen Heterotopie ausgewertet, auf Kosten der oben erwähnten Interpretationsschwierigkeiten. Um weitreichende Veränderungen der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung feststellen zu können, wurden die in den untersuchten Ebenen enthaltenen neokortikalen Areale Fr1/Fr2, HL/FL, Par1 und Par2 ausgewertet. Die kortikalen Dysgenesen wurden konstant im Areal HL/FL induziert. Die Größe der fokalen kortikalen Dysplasie entsprach dabei ungefähr der Arealgröße. Bei zwei von 13 Tieren war die fokale kortikale Dysplasie leicht zum Areal Fr1/Fr2 verschoben, wobei die Grenze der sichtbaren Laminierungsstörung als Trennlinie zwischen den getrennt ausgewerteten Arealen gewählt wurde. Dadurch wurde ein sehr kleiner Teil des frontalen Kortex zum Areal HL/FL hinzugemessen. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um mögliche Effekte der kortikalen Dysplasie auf morphologisch unveränderte Bereiche beurteilen zu können, ohne vereinzelt Dysplasieanteile in benachbarte Areale einzubeziehen. Subkortikale Heterotopien befanden sich ebenfalls konstant in der Nachbarschaft zum sie bedeckenden Areal HL/FL, teilweise geringfügig nach medial oder lateral verschoben. Bei der Auswertung der Areale wurden subkortikale Heterotopien oder Ektopien zum benachbarten Areal HL/FL hinzugemessen, da diese Zellen für die oberen Kortexschichten dieses Areals bestimmt waren (Marret et al. 1995; Gressens et al. 1996; Hagemann et al. 2001). Eine Nichtberücksichtigung dieser Zellen könnte die mittlere optische Dichte des Dysplasieareals sonst systematisch gegenüber der kontralateralen Kontrollregion verändern, besonders für die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$, die eine deutlich unterschiedliche Dichte zwischen oberen und tieferen Kortexschichten zeigen. Für den Vergleich der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung von subkortikalen Heterotopien und von Ektopien mit der laminären Ausstattung wurden diese zusätzlich separat ausgemessen, falls deren Größe dies zuließ. Zur Untersuchung differenzierter Effekte der Ibotensäure-Injektion auf die oberen und tieferen Kortexschichten wurde innerhalb des Dysplasieareals die optische Dichte für die Kortexschichten I – IV und V – VI bestimmt. Die Wahl dieser Bereiche hat mehrere Gründe. Zum Zeitpunkt der Geburt befinden sich die Neurone der Kortexschichten II – IV noch in der Migrationsphase, während die Neurone der Kortexschichten V – VI ihre Migration bereits abgeschlossen haben und sich in Organisation befinden (Rosen et al. 1996). Zusätzlich hat die

Ibotensäure-Injektion differenzierte Effekte auf diese unterschiedlichen Reifestadien (s. o.), die sich morphologisch in den Kortexschichten V und VI mit einer Verschmälerung und in den Kortexschichten II – IV mit einer unveränderten oder verbreiterten Schichtdicke äußern. Die GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung für die Kortexschichten I – IV differiert gegenüber den Kortexschichten V – VI. Diese funktionellen und morphologischen Unterschiede zwischen den Kortexschichten II – IV und V – VI lassen differenzierte Veränderungen in der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung vermuten. Bei der Messung der oberen Kortexschichten wurde die Schicht I aus praktischen Gründen miteinbezogen, was aber aufgrund ihrer geringen Neuronenzahl keinen großen Einfluß auf die mittlere optische Dichte der oberen Kortexschichten hat. Veränderungen der optischen Dichtewerte in den oberen Kortexschichten sind deshalb durch Effekte in den Kortexschichten II – IV und besonders in den breiteren Schichten II und III zu interpretieren.

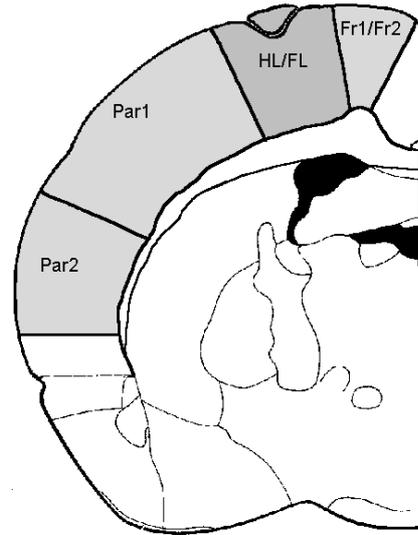
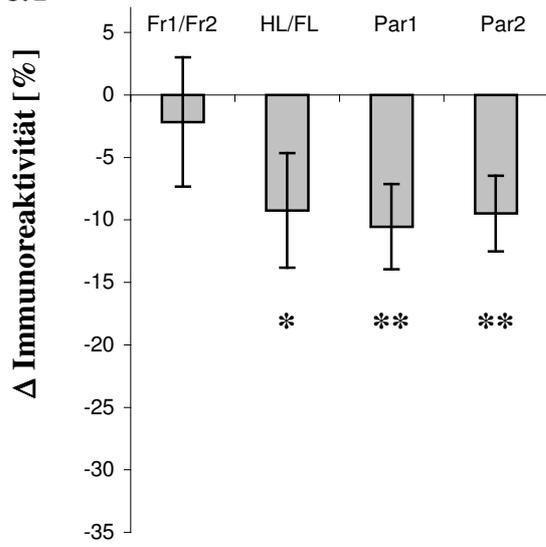
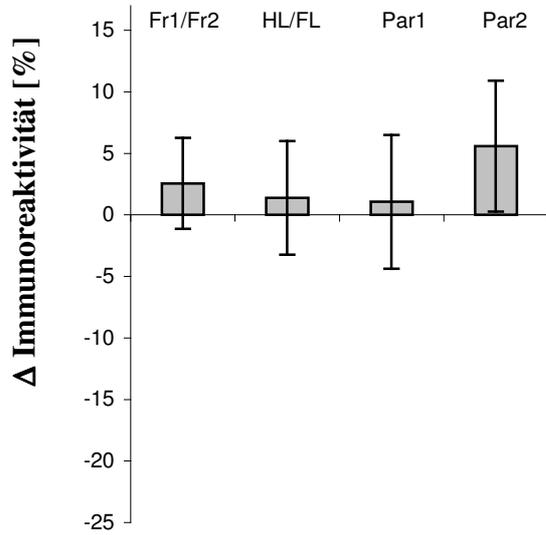
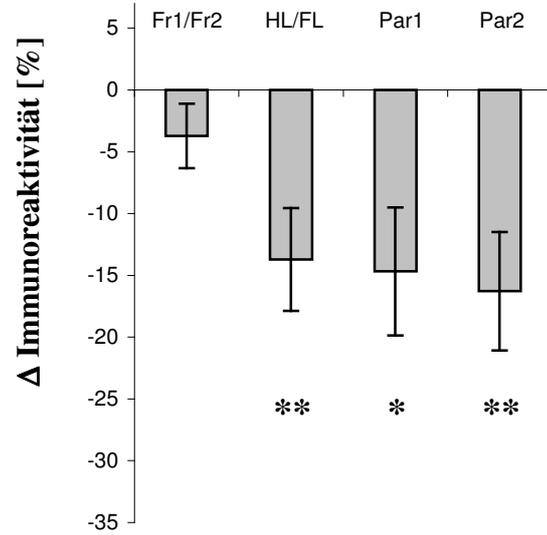
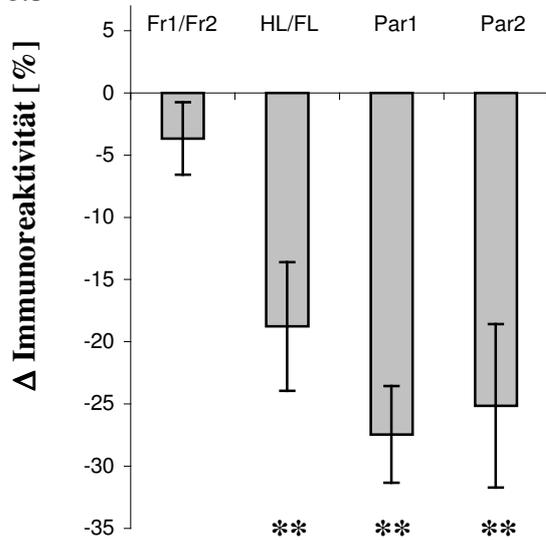
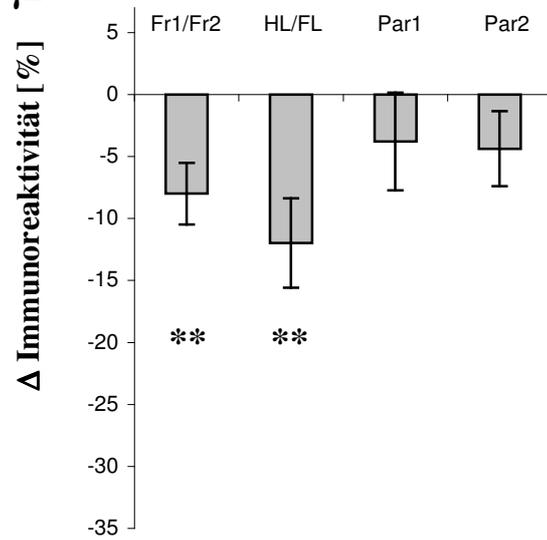
4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Diskussion der Ergebnisse in der Untersuchungsgruppe: fokale kortikale Dysplasie

4.3.1.1 Weitreichende Veränderungen der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung in der Umgebung fokaler kortikaler Dysplasien

In der Umgebung Ibotensäure induzierter fokaler kortikaler Dysplasien kommt es zu einer weitreichenden Dysregulation der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung. Die betroffene Hemisphäre zeigt eine Herunter-Regulation wichtiger an der GABA_A Rezeptoren Komposition beteiligter Untereinheiten gegenüber der kontralateralen Hemisphäre und eine Verschiebung in der Relation der GABA_A Rezeptoruntereinheiten untereinander. Das Dysplasieareal HL/FL ist durch eine signifikant geminderte Dichte der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ gekennzeichnet (Abb. 4.1). Zusätzlich sind weitreichende Veränderungen in benachbarten neokortikalen Arealen zu beobachten. Der lateral des Mikrogyrus gelegene somatosensorische Kortex mit den Arealen Par1 und Par2 zeigt für die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ eine signifikant geminderte Dichte. Neben dem Dysplasieareal ist die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\gamma 2$ auch im frontalen motorischen Kortex signifikant reduziert. Die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ zeigt keine signifikanten Unterschiede zur Gegenseite und ist nicht von einer Herunter-Regulation betroffen. In der mit Ibotensäure injizierten Hemisphäre lassen sich lang anhaltende, multiphasische Feldpotentiale evozieren (Redecker et al. 1998b, 2000a). Die Ausdehnung dieser Hyperexzitabilität betrifft wie die GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation weite Bereiche des Kortex in der Umgebung des Mikrogyrus und läßt auf eine Beteiligung der GABA_A Rezeptor-Dysregulation an den zugrundeliegenden Mechanismen schließen.

Abb. 4.1: Areal spezifische Auswertung der GABA_A-Immunhistochemie nach Ibotensäureläsion in der Ebene der fokalen kortikalen Dysplasie. Dargestellt ist die prozentuale optische Dichteminderung der ibotensäureinjizierten Hemisphäre in Relation zur Gegenseite. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (t-Test, $p < 0,05$) bzw. zwei Sterne (t-Test, $p < 0,01$) gekennzeichnet.

$\alpha 1$  $\alpha 2$  $\alpha 3$  $\alpha 5$  $\gamma 2$ 

4.3.1.2 Auswirkung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation auf GABA_A Rezeptor-Anzahl und Untereinheiten-Komposition

GABA_A Rezeptoren sind Pentamere, die in unterschiedlicher Komposition aus den mindestens 19, bisher differenzierten, Untereinheiten α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ , ρ 1-3 gebildet werden (Barnard et al. 1998; Bonnert et al. 1999; Whiting et al. 1999; Kardos 1999; Sieghart et al. 1999). Von den über 150 000 denkbaren GABA_A Rezeptoren werden jedoch viel weniger tatsächlich gebildet (Sieghart et al. 1999). Die exakte Stöchiometrie der GABA_A Rezeptoren wird kontrovers diskutiert, dabei scheint die überwiegende Anzahl aus 2α , 2β und γ (Sieghart et al. 1999; Tretter et al. 1997) evtl. auch aus 2α , β und 2γ (Barnard et al. 1998) Untereinheiten zu bestehen. Hierbei zeigen sich für die α GABA_A Rezeptoruntereinheiten unterschiedliche Häufigkeiten für deren Beteiligung an der Rezeptorbildung mit α 1 (ca. 60 %), α 2 (15-20 %), α 3 (10-15 %), α 4 (<5 %), α 5 (<5 %) und α 6 (<5 %) (Mohler et al. 2002). Die GABA_A Rezeptoruntereinheiten γ 2 ist in über 80 % der GABA_A Rezeptoren enthalten (Mohler et al. 2002; Whiting et al. 1999). Die in dieser Arbeit beobachtete signifikante Abnahme der GABA_A Rezeptoruntereinheiten α 1, α 3, α 5 und γ 2 lassen aufgrund deren Relevanz bei der GABA_A Rezeptor-Bildung auf eine absolute Abnahme der GABA_A Rezeptoren schließen. Dies läßt sich aufgrund möglicher kompensatorischer Zunahmen von in dieser Arbeit nicht untersuchten GABA_A Rezeptoruntereinheiten aber nicht eindeutig belegen. Eine auf genetischer Ebene blockierte Bildung der wichtigsten GABA_A Rezeptoruntereinheiten α 1 führt zu einer absoluten Abnahme der GABA_A Rezeptoren, ohne daß dies durch Kompensation vollständig ausgeglichen wird (Sur et al. 2001; Kralic et al. 2002). Durch Knockout der GABA_A Rezeptoruntereinheit γ 2 kommt es nicht zu einer erhöhten Translation anderer Untereinheiten (Gunther et al. 1995), bzw. zu keinem „molecular rescue“ (Mohler et al. 1998). Dies läßt vermuten, daß die Abnahme der bedeutenden GABA_A Rezeptoruntereinheiten in der Umgebung fokaler kortikaler Dysplasien ebenfalls nicht vollständig durch Kompensation ausgeglichen wird und somit die Zahl der GABA_A Rezeptoren reduziert ist.

Die GABA_A Rezeptoruntereinheit α 2 ist im Gegensatz zu den weiteren untersuchten α Untereinheiten nicht von einer Herunter-Regulation in der Umgebung des Mikrogyrus betroffen. Aus diesem Grund ist eine relativ erhöhte Beteiligung der Untereinheit α 2 an der GABA_A Rezeptor-Bildung vor allem gegenüber der Untereinheit α 1 aber auch den weniger häufigen Untereinheiten α 3 und α 5 zu erwarten mit weiter unten diskutierten Auswirkungen auf die GABA_A Rezeptor-Funktion, Lokalisation und Pharmakologie.

4.3.1.3 Vergleich zu GABA_A Rezeptor-Veränderungen im Gefrier-Läsion Tiermodell

Der durch Gefrier-Läsion verursachte Mikrogyrus zeigt neben der vergleichbaren Morphologie zu dem durch Ibotensäure induzierten Mikrogyrus auch eine Dysregulation der GABA_A Rezeptoren im dysplastisch veränderten und normal erscheinenden Neokortex. Die Rezeptor-Autoradiographie mittels GABA_A Rezeptor-Ligand [³H] Muscimol ergab eine signifikante Abnahme der Bindungsstellen in der läsionierten Hemisphäre. Eine Abnahme der GABA_A Rezeptor-Bindungsstellen in dem im Areal Par1 gelegenen Mikrogyrus war von einer Reduktion in dem lateral gelegenen extrafokalen Bereich des Areals Par1 (-16 %) und in den medial gelegenen Arealen HL (-21 %) und Fr1 (-17 %) begleitet (Zilles et al. 1998). Diese Abnahme ist in Lokalisation und Ausmaß vergleichbar zu den Befunden nach Ibotensäure-Injektion. In der GABA_A Rezeptoruntereinheiten Immunhistochemie ergab sich bei Tieren mit einer Gefrier-Läsion ebenfalls eine differenzierte Herunter-Regulation einzelner Untereinheiten (Redecker et al. 2000b). Dabei waren neben neokortikalen Arealen

der betroffenen Hemisphäre auch der kontralaterale frontale Kortex und der ipsilaterale Hippokampus von einer signifikanten Reduktion für einige GABA_A Rezeptoruntereinheiten betroffen. Der Bereich des Mikrogyrus zeigte eine Reduktion der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$, während $\alpha 2$ nicht reduziert war. Die sich dadurch ergebenden Untereinheiten-Relationen mit einem Überwiegen der Untereinheit $\alpha 2$ ist vergleichbar zu den Befunden nach Ibotensäure-Injektion. Der parietale Neokortex bei Tieren mit Gefrier-Läsionen zeigte eine geringe Reduktion für alle α Untereinheiten, diese war jedoch nur für die Untereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 5$ im Areal Par2 signifikant. Die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 3$ zeigte im somatosensorischen Kortex die geringsten Veränderungen, so daß in diesem Bereich eine relative Zunahme die Untereinheit $\alpha 3$ enthaltener Rezeptoren zu vermuten ist (Redecker et al. 2000b). Der frontale Kortex beider Hemisphären zeigte für alle untersuchten GABA_A Rezeptoruntereinheiten eine Herunter-Regulation mit Werten von -12% bis -37% mit Schwerpunkt in der läsierten Hemisphäre. Die unter physiologischen Bedingungen bei adulten Ratten dominierende Untereinheit $\alpha 1$ (Fritschy und Mohler 1995; Whiting et al. 1999) zeigte die geringste Reduktion, so daß in den Arealen Fr beider Hemisphären mit einer reduzierten aber in ihrer Untereinheiten-Komposition nicht wesentlich veränderten GABA_A Rezeptoren Ausstattung zu rechnen ist. Zusammenfassend zeigen Ibotensäure und Gefrier-Läsion induzierte Mikrogyri ähnliche Veränderungen der GABA_A Rezeptoren in ihrer Umgebung. Dabei sind die Befunde bei Tieren mit Gefrier-Läsionen tendenziell ausgeprägter im Bezug auf deren Ausdehnung und prozentuale Reduktion. Während nach Ibotensäure Injektion neben der Dysplasie-region vor allem die lateral gelegenen Areale Par1 und Par2 in eine Herunter-Regulation gegenüber der kontralateralen Hemisphäre miteinbezogen sind, zeigt sich nach Gefrier-Läsion das Maximum der Veränderungen in den medial der Läsion gelegenen Arealen Fr beider Hemisphären. Mögliche Erklärungen liefern zwei methodische Unterschiede in Bezug auf die Auswertung und Läsions-Induktion. In der vorliegenden Arbeit wurde seitenvergleichend ausgewertet, lägen dabei wie nach Gefrier-Läsion ausgeprägte Veränderungen in den korrespondierenden Arealen Fr mit Schwerpunkt in der zur Injektion ipsilateralen Hemisphäre vor, würden sich die Befunde teilweise aufheben und so das tatsächliche Ausmaß der Veränderungen im frontalen Kortex unterschätzt. Allerdings zeigte der frontale Kortex bei der optischen Beurteilung keine Unterschiede in der Relation zur Umgebung im Vergleich von Ibotensäure- und Kontroll-Tieren. Somit ergibt sich daraus kein Anhalt für die bilaterale Veränderungen nach Ibotensäure-Injektion. Möglicherweise ist die unterschiedliche Ausdehnung der Effekte nach Gefrier-Läsion in der Arbeit von Redecker et al. (2000b) durch eine in dieser Arbeit mehr mediale und dorsale Lokalisation des insgesamt größeren Mikrogyrus zu erklären.

Eine Erklärung für ausgedehntere Netzwerkeffekte nach Gefrier-Läsion ergibt sich aus einer stärkeren Zerstörung der tiefen Kortexschichten V und VI gegenüber Ibotensäure Injektionen. Durch Gefrier-Läsion wird teilweise eine vollständige Kontinuitätsunterbrechung der tiefen Kortexschichten verursacht (Redecker et al 2000b), während durch Ibotensäure nur eine Verschmälerung in den tiefen Kortexschichten hervorgerufen wird. Die funktionelle Relevanz dieses Unterschiedes zeigt sich in einem geringeren Ausmaß elektrophysiologischer Veränderungen in der Umgebung nur oberflächlich durchgeführter Gefrier-Läsionen (Luhmann und Raabe 1996). Ein Zusammenhang zwischen Beteiligung tiefer Kortexschichten und Ausmaß von assoziierter Hyperexzitabilität und Veränderung der GABA_A Rezeptoren zeigt sich ebenfalls im Photothrombose-Tiermodell. Bei diesem in der Schlaganfall-Forschung verwendeten Tiermodell wird eine fokale Nekrose induziert, in deren Umgebung eine partiell reversible Hyperexzitabilität auftritt (Schiene et al. 1996). Dabei führen oberflächliche Läsionen nur zu ipsilateralen Effekten (Buchkremer-Ratzmann und Witte 1997), während es bei Beteiligung tiefer Kortexschichten zu einer bilateral verminderten Inhibition (Buchkremer-Ratzmann et al. 1996) und Reduktion von GABA_A

Rezeptor-Bindungsstellen (Qu et al. 1998; Que et al. 1999) mit weitreichender Netzwerk-Reorganisation (Witte et al. 1997) kommt. Dies läßt vermuten, daß es aufgrund der geringeren Beteiligung der tiefen Kortexschichten durch Ibotensäure Injektion nicht zu bilateralen Effekten kommt, auch wenn sich dies bei der seitenvergleichenden Auswertung nicht mit Sicherheit ausschließen läßt.

Insgesamt zeigen durch Ibotensäure-Injektion und Gefrier-Läsion induzierte Mikrogyri neben morphologischen Übereinstimmungen auch ähnliche Veränderungen der GABA_A Rezeptoren, die sich jedoch graduell in Ausmaß und Lokalisation unterscheiden, möglicherweise begründet durch ein unterschiedliches Ausmaß der Beteiligung tiefer Kortexschichten.

4.3.1.4 Funktionelle Konsequenzen der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation

Die Herunter-Regulation von GABA_A Rezeptor-Bindungsstellen und Reduktion des immunhistochemischen Nachweises bedeutender GABA_A Rezeptoruntereinheiten legt einen Verlust der GABAergen Inhibition als Ursache einer assoziierten Epileptogenität nahe. Differenzierte elektrophysiologische Untersuchungen lassen jedoch weniger auf eine prominente Disinhibition als alleinige Ursache der Hyperexzitabilität als auf komplexere, weniger eindeutige Veränderungen der exzitatorischen und inhibitorischen Netzwerk-Komponenten schließen. Die Doppelpuls-Stimulation („paired-pulse“) setzt evozierte Signal-Amplituden zweier konsekutiver Stimuli in Relation, woraus sich auf die Stärke des zwischen beiden Stimuli aktivierten inhibitorischen Systems schließen läßt. Dabei zeigte die Ibotensäure injizierte Hemisphäre keine signifikanten Veränderungen der mittels Doppelpuls-Stimulation gemessenen Inhibition (Hagemann et al. 2000a). Dies läßt auf eine unter diesen Bedingungen funktionell weitgehend intakte Inhibition schließen. Unter Applikation von 4 Aminopyridin (4-AP), einem Kalium-Kanal-Blocker, erzeugte epileptiforme Feldpotentiale lassen auf eine möglicherweise veränderte, aber nicht abwesende Inhibition in der Umgebung durch Gefrier-Läsion induzierter Mikrogyri schließen (Hablitz und DeFazio 1998). Die an unterschiedlichen Lokalisationen durchgeführten Bestimmungen inhibitorischer postsynaptischer Potentiale (IPSP) im Gefrier-Läsion Tiermodell ergaben differierende Befunde. Dabei zeigte sich die GABA_A Rezeptor vermittelte Inhibition um 27 % reduziert bei der Messung polysynaptischer IPSP innerhalb der Kortexschichten II und III in unmittelbarer Nachbarschaft des Mikrogyrus (Luhmann et al. 1998a). Monosynaptische IPSP bestimmt unter Blockade von NMDA- und AMPA-Rezeptoren unterschieden sich jedoch nicht signifikant von Kontrollschnitten. Die funktionelle Disinhibition erklärt sich aus diesem Grund durch eine partielle Reduktion des exzitatorischen Antriebes auf GABAerge Interneurone (Luhmann et al. 1998a). Im Gegensatz dazu zeigten sich verstärkte eIPSP und sIPSP in Pyramidenzellen der Schicht V innerhalb der paramikrogyralen Zone durch einen vermutlich erhöhten exzitatorischen Einfluß auf GABAerge Interneurone (Prince und Jacobs 1998; Jacobs et al. 1999b). In den Kortexschichten II und III bestimmte mIPSP in einem Bereich ein bis zwei Millimeter lateral des Mikrogyrus zeigten eine erhöhte Amplitude (Defazio und Hablitz 1999).

4.3.1.5 Weitere Einflußgrößen der GABAergen Inhibition

Rolle Calcium-bindender-Proteine zu Beurteilung von GABAergen Interneuronen bei kortikalen Dysplasien

Menschliche kortikale Dysplasien zeigen eine Reduktion Calcium bindender Proteine (CBP), die Marker für Interneuron-Subpopulationen darstellen (Ferrer et al. 1992). Dabei sind sowohl FCD vom Typ I (Spreafico et al. 1998b) und Typ II bzw. TTFCD (Spreafico et al. 1998a)

durch einen verminderten immunhistochemischen Nachweis der Calcium bindenden Proteine Parvalbumin (PV), Calbindin (CB) und Calretinin (CR) gekennzeichnet. Diese Proteine markieren unterschiedliche Subpopulationen GABAerger Interneurone (Kawaguchi und Kubota 1997). Diese Subpopulationen unterscheiden sich in der postsynaptischen Lokalisation der Synapsen. Parvalbumin markiert Chandelier-Zellen und Basket-Zellen, die Synapsen auf das Axon-initiale-Segment (AIS) bzw. auf Soma und proximalen Dendriten bilden (Baimbridge et al. 1992; Celio 1986). Durch diesen perisomatischen Input wird eine starke Inhibition ausgeübt (Buhl et al. 1994; DeFelipe 1999). Calbindin und Calretinin markieren Interneurone, deren Synapsen weiter distal auf den Ziel-Zellen lokalisiert sind (Ferrer et al. 1992; Luth et al. 1993; Tamas et al. 1998). Eine Abnahme dieser CBP läßt auf eine veränderte Funktion oder Reduktion GABAerger Interneurone im Zusammenhang mit kortikalen Dysplasien schließen. Als möglicher Kompensations-Mechanismus konnte um dysplastische Neurone der TTFCD eine erhöhte Anzahl PV positiver Terminalen nachgewiesen werden (Spreafico et al. 1998a; 2000). Für CB und CR konnten keine vermehrten Terminalen beobachtet werden. Damit könnte durch „sprouting“ von axonalen Terminalen auf perisomatische Bereiche oder auf das AIS exzitatorischer Neurone eine gesteigerte Effektivität GABAerger Inhibition erreicht werden (Spreafico et al. 1998a). Allerdings berichten Garbelli et al. (1999) von einer ineffektiven Synaptogenese der vermehrten Terminalen. Nach Gefrier-Läsion konnten Rosen et al. (1998) in den Kortexschichten II und III eine transiente Abnahme der PV Immunoreaktivität in bis zu zwei Millimeter Entfernung des Mikrogyrus beobachten. In den tiefen Kortexschichten war eine dauerhafte PV Reduktion im Bereich des Mikrogyrus und der unmittelbaren Nachbarschaft zu beobachten (Rosen et al. 1998). In dieser Region war ein erhöhter exzitatorischer Einfluß auf GABAerge Interneurone beobachtet worden (Prince und Jacobs 1998), was einer Kompensation auf einen lokalen Verlust GABAerger Interneurone entsprechen könnte. Hablitz und DeFazio (1998) zeigten eine auf den Mikrogyrus beschränkte Abnahme der Immunoreaktivität für PV, CB und CR. Die Resultate von Schwarz et al. (2000) deuten auf keine generelle Abnahme von GABAergen Interneuronen hin bei einer möglicherweise geringfügigen Verschiebung der Relation zugunsten PV positiver Interneurone gegenüber CR und Somatostatin positiver Interneurone.

Zusammenfassend ergeben sich im Gegensatz zu einer weitreichenden Hyperexzitabilität und entsprechender durch Immunhistochemie und Rezeptor-Autoradiographie nachgewiesener Dysregulation der GABA_A Rezeptoren nur eine umschriebene funktionelle Reduktion der GABAergen Inhibition in der Umgebung mit Ibotensäure oder mit Gefrier-Läsion induzierter kortikaler Dysplasien. Ein verminderter präsynaptischer Input aufgrund eines Verlustes von Interneuronen scheint ebenfalls nicht Ursache der weitreichenden postsynaptischen GABA_A Rezeptor-Veränderungen zu sein. Dabei könnte die von der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Komposition abhängige Lokalisation und Funktion der verbliebenen GABA_A Rezeptoren zu einer Aufrechterhaltung einer suffizienten Inhibition beitragen.

Einfluß der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Komposition auf Rezeptorfunktion

Durch signifikante Reduktion der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ kommt es zu einem in der Relation erhöhten Anteil die Untereinheit $\alpha 2$ enthaltener GABA_A Rezeptoren. Diese Verschiebung der Relationen findet vor allem auf Kosten der Untereinheit $\alpha 1$ statt, welche unter physiologischen Bedingungen mit ca. 60 % die wichtigste α Untereinheit ist (Mohler et al. 2002). Die Untersuchungen an Oxytocin bildenden Neuronen, die einen physiologischen Wechsel zwischen den Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ während der Schwangerschaft erfahren, zeigen verlängerte Öffnungszeiten der GABA_A Rezeptoren während das Verhältnis zu Gunsten der Untereinheit $\alpha 2$ verschoben ist (Brussaard et al. 1997;

Brussaard und Herbison 2000). Lavoie et al. (1997) konnten zeigen, daß ein Austausch der Untereinheit $\alpha 1$ durch $\alpha 2$ zu einer Verdopplung der Öffnungsgeschwindigkeit der GABA_A Rezeptoren führt. Zusätzlich war die Öffnungszeit um den Faktor sechs bis sieben verlängert. GABA entwickelt über Bindung an die Untereinheit $\alpha 2$ enthaltende GABA_A Rezeptoren eine sechs- bis zehnfach stärkere Potenz gegenüber der Bindung an die Untereinheit $\alpha 1$ enthaltende GABA_A Rezeptoren (Lavoie et al. 1997). Im Gefrier-Läsion Tiermodell zeigte sich neben einer relativen Zunahme der Untereinheit $\alpha 2$ in der Dysplasie-region in den lateral gelegenen Arealen Par1 und Par2 ein in der Relation erhöhter Anteil die Untereinheit $\alpha 3$ enthaltender GABA_A Rezeptoren (Redecker et al. 2000b). Dabei führt die Untereinheit $\alpha 3$ ebenfalls zu verlängerten Öffnungszeiten der GABA_A Rezeptoren gegenüber der Untereinheit $\alpha 1$ (Verdoorn 1994). Diese Verlängerung ist ausgeprägter gegenüber der Untereinheit $\alpha 2$ (Serafini et al. 1998). Trotz einer anzunehmenden Reduktion der GABA_A Rezeptoren persistieren in der Umgebung induzierter Mikrogyri GABA_A Rezeptoruntereinheiten, die einen sehr effektiven GABA vermittelten Ionen-Austausch ermöglichen.

Subzelluläre Lokalisation einzelner GABA_A Rezeptor-Subtypen

GABA_A Rezeptoren besitzen neben einer spezifischen regionalen Verteilung auch eine spezifische subzelluläre Verteilung (Fritschy und Mohler 1995; Fritschy et al. 1998). Die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ ist in den postsynaptischen Membranabschnitten der Pyramidenzellen auf Dendriten, Soma und AIS gleichmäßig vertreten (Nusser et al. 1996). Im Gegensatz dazu besitzt die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ im Hippokampus und Kortex eine deutliche Präferenz für das AIS, welches bei Ratten (Fritschy et al. 1998) und beim Menschen (Loup et al. 1998) nachgewiesen wurde. Auf Pyramidenzellen des Hippokampus wurde dies verifiziert. Dabei waren 81 % der Synapsen im AIS positiv für die Untereinheit $\alpha 2$ im Gegensatz zu 17 % in anderen Lokalisationen (Nusser et al. 1996). Obwohl nur 0,1 % der GABA Synapsen auf Pyramidenzellen im AIS liegen, sind 25 % aller immunhistochemisch nachgewiesener $\alpha 2$ Untereinheiten in diesem Abschnitt lokalisiert (Nyiri et al. 2001; Volk et al. 2002). Die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 3$ ist ebenfalls prominent im AIS von neokortikalen Pyramidenzellen vertreten (Loup et al. 1998; Fritschy et al. 1998) wobei dies vor allem die Kortexschichten V und VI betrifft, während die Untereinheit $\alpha 2$ auf Pyramidenzellen der Kortexschichten II und III besonders häufig lokalisiert ist (Fritschy et al. 1998). Ein Verlust der im Bereich von Soma und Dendriten lokalisierten GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 5$ führt nicht zu einer subzellulären Umverteilung der Untereinheit $\alpha 2$, die im AIS verbleibt (Mohler et al. 1998). GABA_A Rezeptoren werden abhängig von ihrer Untereinheiten-Komposition in ihre Ziellokalisierungen transportiert (Nusser et al. 1996; Mohler et al. 1998). Dies läßt vermuten, daß die nach Ibotensäure-Injektion zu beobachtende Dysregulation der GABA_A Rezeptoruntereinheiten zu einer relativen Abnahme der auf Soma und Dendriten lokalisierten GABA_A Rezeptoren führt, während die Untereinheit $\alpha 2$ enthaltende GABA_A Rezeptoren im AIS unverändert bleiben. Das AIS wird von als Chandelier-Zellen bezeichneten GABAergen Interneuronen innerviert. Aufgrund der strategisch wichtigen Lokalisation der Synapsen im AIS üben diese Interneurone eine starke Inhibition aus (DeFelipe 1999; Arellano et al. 2002).

Zusammenfassend sind unter Beteiligung der Untereinheit $\alpha 2$ gebildete GABA_A Rezeptoren durch ihre anatomische Positionierung und funktionellen Eigenschaften in der Lage, einen potenten inhibitorischen Einfluß auf Pyramidenzellen zu nehmen (Volk et al. 2002). Damit könnte die Aussparung der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ von einer Herunter-Regulation in der Umgebung Ibotensäure induzierter fokaler kortikaler Dysplasien ein wesentlicher Mechanismus zur Aufrechterhaltung einer suffizienten GABAergen Inhibition sein.

4.3.1.6 Zusammenhang zwischen Modifikationen des GABAergen Systems und assoziierter Hyperexzitabilität

Modifikationen des GABAergen Systems können die Entstehung epileptiformer Aktivität durch zwei theoretische, sich nicht gegenseitig ausschließende, Mechanismen unterstützen (Bernard et al. 2000). Zum einen kann eine Disinhibition zu verstärkter Depolarisation mit anschließender Aktionspotential (AP) Entstehung führen. Zum anderen kann eine durch veränderte Inhibition getriggerte synchrone Aktivität an der Entstehung epileptiformer Aktivität beteiligt sein. Epileptische Aktivität kann in Gegenwart starker Inhibition entstehen. Chagnac-Amitai und Connors (1989) konnten ein Auftreten synchroner Aktivität bereits bei einer um nur ca. 20 % geminderten Inhibition nachweisen. Eine zumindest fokale Reduktion der GABAergen Inhibition um diesen Betrag in der Umgebung induzierter Mikrogyri erscheint möglich (Zilles et al. 1998; Luhmann et al. 1998a, Redecker et al. 2000b). Eine verstärkte Innervation des AIS könnte sowohl zu einer gesteigerten Inhibition, als auch zu einer intensivierten Synchronisationsneigung führen und so zur Entstehung oder Verstärkung epileptischer Aktivität beitragen (Wittner et al. 2001). Dabei können bereits wenige Interneurone durch perisomatische Inhibition eine große Population von Pyramidenzellen synchronisieren. Dies könnte eine wesentliche Funktion von Chandelier- oder Basket-Zellen sein (Cobb et al. 1995). Eine geänderte GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Komposition mit einem erhöhten Ladungstransfer kann ebenfalls zu einer verstärkten Synchronisation und zu regenerativen AP führen (Serafini et al. 1998; Nusser et al. 2001). Damit bleibt unklar, ob die Persistenz der unter Beteiligung der Untereinheit $\alpha 2$ gebildeten GABA_A Rezeptoren mit langen Öffnungszeiten und einer Präferenz für das AIS zu einer Begrenzung epileptiformer Aktivität im Sinne einer Kompensation beiträgt oder seinerseits eine erhöhte Neigung zur Synchronisation verursacht und kausal zur Hyperexzitabilität beiträgt.

4.3.1.7 Zusätzliche pathophysiologische Veränderungen bei kortikalen Dysgenesien

Kortikale Dysplasien zeigen Charakteristika eines unreifen Entwicklungszustandes

Ein Charakteristikum dysplastischer Veränderungen scheint die Persistenz von Merkmalen eines unreifen Entwicklungszustandes zu sein. Nach Ibotensäure-Injektion in den visuellen Kortex von Katzen persistieren Afferenzen aus dem auditorischen Kortex, die normalerweise während der Entwicklung eliminiert werden (Innocenti und Berbel 1991). Neurone in der Umgebung durch Gefrier-Läsionen induzierter kortikaler Dysplasien zeigen ein unreifes AP-Muster (Luhmann et al. 1998a). Normalerweise während der postnatalen Reifung eliminierte Cajal-Retzius Zellen persistieren in der Molekularschicht beider Hemisphären nach Gefrier-Läsion Induktion (Super et al. 1997) ähnlich zur menschlichen Polymikrogyrie (Eriksson 2002). Ein unreifer Zustand der Kortextentwicklung spiegelt sich ebenfalls in der beobachteten GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation nach Ibotensäure-Injektion wider. Dabei variiert die physiologische GABA_A Rezeptoruntereinheiten Expression in unterschiedlichen Reifestadien. Bereits ab E 15 sind die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 3$ nachweisbar, ab E 17 zusätzlich die Untereinheit $\alpha 5$ und schließlich ist die Untereinheit $\alpha 1$ erst kurz vor der Geburt ab E 19 darstellbar (Poulter et al. 1992). Innerhalb der ersten postnatalen Woche beginnen die hohen Level der Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ zu sinken, während parallel dazu die Untereinheit $\alpha 1$ verstärkt exprimiert wird (Laurie et al. 1992; Poulter et al. 1992; Fritschy et al. 1994). Eine Zunahme der Untereinheit $\alpha 1$ während der Entwicklung führt dabei zu einer Verkürzung der GABA_A Rezeptor-Kinetik (Vicini et al. 2001). Nach Ibotensäure-Injektion scheint ein Wechsel von der Untereinheit $\alpha 2$ zu $\alpha 1$ nicht vollständig vollzogen zu sein. Im Gefrier-Läsion Tiermodell liegt ebenfalls ein unreifer GABA_A Rezeptor-Status vor (Redecker et al. 2000b), da es zu einer verminderten Zolpidem-

Sensitivität kommt (Defazio und Hablitz 1999; Hablitz und DeFazio 2000). Dies erklärt sich durch eine hohe Zolpidem-Affinität gegenüber der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ und nur niedriger Affinität gegenüber den Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ (Whiting 1999). Ein unreifes GABA System führt ebenfalls zu einer verminderten Ansprechbarkeit auf Antikonvulsiva (Mecarelli et al. 1988). Die Relevanz eines ausbleibenden GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Wechsel zur Epilepsie-Entstehung zeigt sich in der Untersuchung von zwei gezüchteten Ratten-Linien, die eine hohe bzw. niedrige Krampfschwelle besitzen. Ratten mit niedriger Krampfschwelle zeigten keinen Wechsel der GABA_A Rezeptoruntereinheiten mit erhöhten Werten der Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ bei einem niedrigen Level der Untereinheit $\alpha 1$. Im Gegensatz dazu besaßen Tiere mit nur schwer auslösbaren Krampfanfällen eine reziproke GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung (Poulter et al. 1999). Als mögliche Pathophysiologie beschreiben Poulter et al. (1999) eine fehlende zeitliche Abstimmung der Inhibition dadurch, daß Netzwerke des adulten ZNS „gezwungen“ werden mit embryonalen GABA_A Rezeptoren Synapsen zu bilden mit der Folge einer langsamen Netzwerk-Oszillation. Dies könnte die Entwicklung einer diffusen, weitreichenden Netzwerk-Synchronisation begünstigen.

Modifikationen exzitatorischer Transmitter-Systeme im Zusammenhang mit kortikalen Dysplasien

Neben einer modifizierten Inhibition ergaben elektrophysiologische Untersuchungen eine Beteiligung von Glutamat-Rezeptoren bei Entstehung und Ausbreitung induzierter epileptiformer Aktivität im Gefrier-Läsion Tiermodell. Stimulation im Bereich des Mikrogyrus führt zu einer AMPA-Rezeptor vermittelten horizontalen Erregungsausbreitung über mehrere Millimeter (Luhmann und Raabe 1996). Eine erhöhte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren ist ebenfalls an der Entstehung epileptiformer Aktivität beteiligt (Luhmann et al. 1998a). In der Umgebung menschlicher kortikaler Dysplasien zeigte sich ebenfalls eine NMDA-Rezeptor abhängige Entstehung iktaler Entladungen, welche sich über non-NMDA-Rezeptoren ausbreiten (Avoli et al. 1999). Zusätzlich ergeben sich auch Hinweise auf qualitativ und quantitativ veränderte Glutamat Rezeptoren. Im Bereich des Mikrogyrus und der unmittelbaren Umgebung ist die Zahl der Bindungsstellen für AMPA, Kainat und NMDA-Rezeptoren und im benachbarten unveränderten Kortex für AMPA und Kainat Rezeptoren erhöht (Zilles et al. 1998). Diese Modifikationen sind vermutlich nicht auf eine Dysregulation der Rezeptoruntereinheiten zurückzuführen (Hagemann et al. 2003). NMDA-Rezeptoren bestehen aus Untereinheiten der Klassen NR1 und NR2, wobei während der Reifung ein Wechsel innerhalb der Untereinheit NR2 vom Typ NR2B zu NR2A stattfindet (DeFazio und Hablitz 2000). Bei Tieren mit Gefrier-Läsion persistiert ein erhöhter Anteil der Untereinheit NR2B, die zu einer erhöhten Leitfähigkeit der NMDA-Rezeptoren führt (DeFazio und Hablitz 2000; Hablitz und DeFazio 2000). Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine verminderte funktionelle Reifung nach Dysplasie-Induktion und erklärt einen erhöhten exzitatorischen Ladungsaustausch. Menschliches aus kortikalen Dysplasien stammendes Gewebe zeigt in Übereinstimmung dazu einen erhöhten mRNA Level für die Untereinheit NR2B und eine Abnahme für die Untereinheit NR2A (Crino et al. 2001).

Veränderungen der Netzwerk-Verknüpfungen in der Umgebung kortikaler Dysplasien

Neben Veränderungen in den Transmitter-Systemen könnte eine Reorganisation afferenter und efferenter Verbindungen im Bereich kortikaler Dysplasien zu einer erhöhten Exzitabilität führen. Die Analyse der Verbindungen im Gefrier-Läsion Tiermodell zeigt eine Zunahme ipsilateraler intrakortikaler Afferenzen und Efferenzen der im Bereich des Mikrogyrus lokalisierten Neurone bei gleichzeitiger Reduktion kontralateraler Projektionen (Rosen et al.

2000). Bei den vermehrten ipsilateralen Verbindungen handelt es sich um horizontale Bahnen zu medial und lateral gelegenen neokortikalen Arealen, die während einer physiologischen Reifung eliminiert werden (Rosen et al. 2000). Die paramykrogyrale Zone zeigt in der Zytochrom-Oxidase Darstellung eine veränderte Organisation von Zell-Nestern und thalamo-kortikalen Verbindungen (Jacobs et al. 1999c). Durch einen Neuronenverlust innerhalb der tiefen Kortexschichten des Mikrogyrus verlieren thalamo-kortikale Afferenzen ihr Ziel und es kommt zu einer verstärkten Synapsen Bildung dieser Fasern in der paramikrogyralen Zone (Jacobs et al. 1999b; Rosen et al. 2000). Dadurch erhält der angrenzende, morphologisch unverändert erscheinende Neokortex eine vermehrte, vom Thalamus ausgehende, Exzitation (Jacobs et al. 1999a).

4.3.1.8 Schwerpunkt der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation im Areal der fokalen kortikalen Dysplasie betrifft die oberen Kortexschichten

Die Herunter-Regulation der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ ist dominierend innerhalb der oberen Kortexschichten der Dysplasie (Abb. 4.2). Die Herunter-Regulation der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ ist in den oberen Kortexschichten signifikant stärker ausgeprägt gegenüber den tiefen Kortexschichten und läßt auf ein Maximum der GABA_A Rezeptor-Dysregulation in den Kortexschichten II und III schließen. Keine signifikanten Veränderungen sind für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ zu beobachten. Diese Befunde lassen sowohl eine stärkere Modifikation der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Komposition als auch auf eine in den Kortexschichten II und III betonte GABA_A Rezeptor-Reduktion vermuten. Dadurch könnte eine lokale Imbalance zwischen Inhibition und Exzitation entstehen. Rezeptor-Autoradiographie im Gefrier-Läsion Tiermodell zeigt eine maximale Imbalance zwischen GABA_A Rezeptoren und AMPA Rezeptoren in den supragranulären Schichten II und III (Zilles et al. 1998). Möglicherweise liefern diese Befunde eine neurochemische Basis für die beobachtete weitreichende Erregungsausbreitung in der Umgebung des Mikrogyrus (Luhmann und Raabe 1996). Die GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation könnte zusammen mit einem reduzierten exzitatorischen Antrieb auf Interneurone für eine um 27 % geminderte GABAerge Inhibition in den Kortexschichten II und III der Dysplasie region verantwortlich sein (Luhmann et al. 1998a). Im Gegensatz dazu scheint die geringere GABA_A Rezeptor-Dysregulation und ein Verlust PV positiver Interneurone (Rosen et al. 1998) in den tiefen Kortexschichten durch einen erhöhten Einfluß auf Interneurone kompensierbar zu sein und führt zu einer funktionell intakten GABAergen Inhibition in den tiefen Kortexschichten (Prince und Jacobs 1998). Diese Befunde deuten auf größere Bedeutung der oberen Kortexschichten bei Entstehung und Ausbreitung epileptiformer Aktivität hin. Allerdings gibt es auch Hinweise für die Relevanz der tiefen Kortexschichten wie z. B. eine maximale Imbalance zwischen GABA_A Rezeptoren und Kainat Rezeptoren (Zilles et al. 1998) und die Tatsache, daß eine ausgeprägte Beteiligung der tiefen Kortexschichten bei der Mikrogyrus Induktion zu einer weitreichenderen Hyperexzitabilität führt (s. o.). Im Gefrier-Läsion Tiermodell konnten Jacobs et al. (1999a) nur geringe, inkonstante Unterschiede in der epileptischen Aktivität zwischen den Kortexschichten beobachten. Die in den oberen Kortexschichten dominierende GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation erfordert weitere Untersuchungen hinsichtlich der funktionellen Relevanz dieses Befundes.

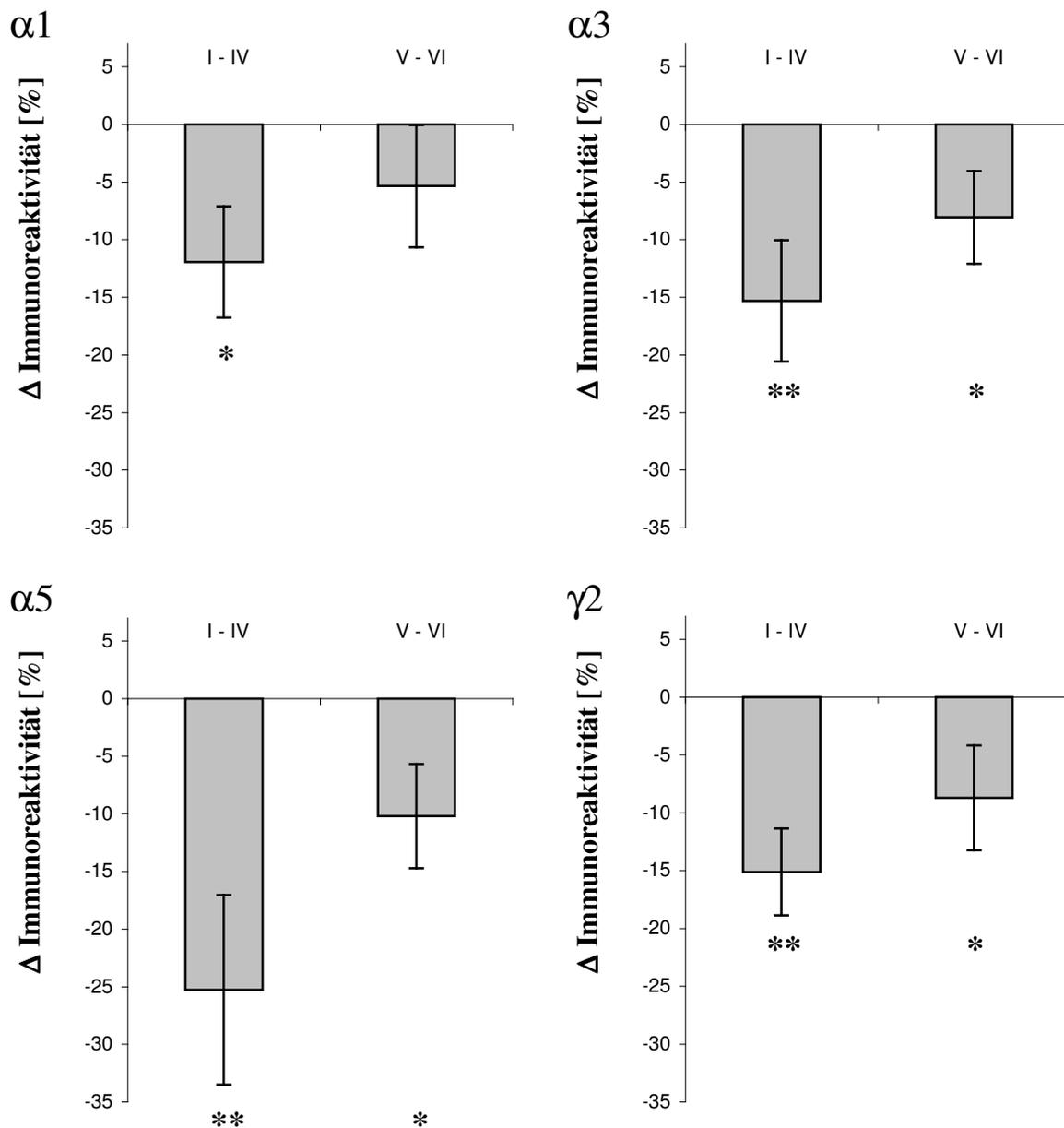


Abb. 4.2: Laminaspezifische Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ im Areal fokaler kortikaler Dysplasien. Dargestellt ist die prozentuale optische Dichteminderung der Kortexschichten I – IV und V – VI innerhalb der Dysplasieareale in Relation zur Gegenseite. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (t-Test, $p < 0,05$) bzw. zwei Sterne (t-Test, $p < 0,01$) gekennzeichnet

4.3.1.9 Ektopien besitzen GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung entsprechend ihrer physiologischen Zielposition in den oberen Kortexschichten

Die GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung der Ektopien zeigt bei der optischen Beurteilung ein übereinstimmendes Muster zu den oberen Kortexschichten. Dabei fällt die starke Immunoreaktivität für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ im Gegensatz zu den Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ auf. Diese Verteilung ist typisch für die oberen neokortikalen Schichten (Fritschy und Mohler 1995). Die statistische Analyse der mittleren optischen Dichtewerte ergab für die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ keinen signifikanten Unterschied zwischen Ektopien und angrenzenden Kortexschichten I – IV. Allerdings könnte die um 13,8 % geminderte Immunoreaktivität für die Untereinheit $\gamma 2$, auch wenn nicht signifikant, ein Hinweis auf eine verminderte GABA_A Rezeptor-Zahl innerhalb der Ektopie sein. Lediglich die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ zeigte eine signifikant

höhere Immunoreaktivität gegenüber den oberen Kortexschichten (Abb. 4.3). Zum Zeitpunkt der Ibotensäure-Injektion haben die Neurone der Kortexschichten II – IV im Gegensatz zu infragranulären Neuronen ihre Ziellokalisation nicht erreicht (Rosen et al. 1996) und gelangen durch gesteigerte Migration in die Molekularschicht. Neurone erhalten zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung ihre schichtspezifischen Eigenschaften (Frantz und McConnell 1996), so daß die GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung frühzeitig vorprogrammiert ist und lediglich durch thalamische Afferenzen modifiziert wird (Paysan et al. 1997). Die trotz ektopter Position erhaltene GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung bestätigt diesen Befund. Eine fehlende oder geringfügige Modifikation durch die anschließende Bildung thalamo-kortikaler Verbindungen läßt auf einen in der ektopter Position nicht wesentlich geänderten afferenten Input schließen.

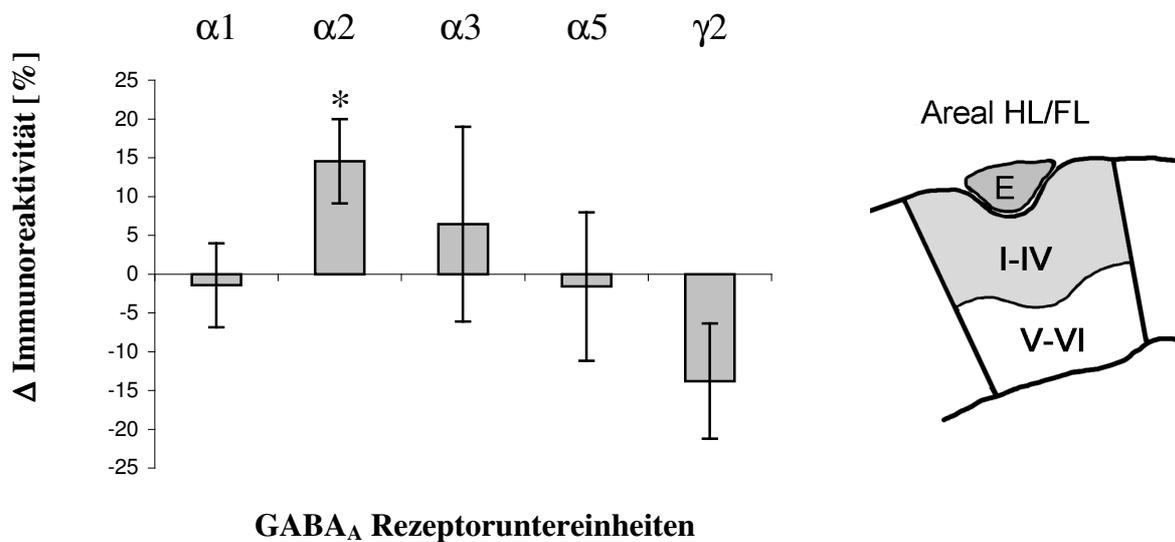


Abb. 4.3: Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung von Ektopien. Dargestellt ist die optische Dichte ektopter Zellpopulationen (E) in Relation zu den Kortexschichten I – IV der Dysplasieareale. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (t-Test, p<0,05) gekennzeichnet.

4.3.1.10 Klinische Relevanz der Befunde bei fokalen kortikalen Dysplasien

Hinweise auf GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation beim Menschen

Die im Ibotensäure-Tiermodell beobachtete weitreichende GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation korreliert mit klinischen Daten aus in vivo Untersuchungen bei Epilepsie-Patienten mit fokalen kortikalen Dysgenesen. In der PET-Analyse zentraler Benzodiazepin-Bindungsstellen unter Verwendung des Tracers [¹¹C]-Flumazenil, einem spezifischen neutralen Antagonisten zentraler BZ-Rezeptoren, zeigt sich eine weitreichende Dysregulation im Bereich fokaler kortikaler Dysgenesen und in deren morphologisch intakt erscheinenden Umgebung (Richardson et al. 1996, 1997; Hammers et al. 2001). BZ-Bindungsstellen befinden sich auf GABA_A Rezeptoren am Übergang der α Untereinheiten α1, α2, α3 und α5 zu einer γ Untereinheit (Mohler et al. 2002). Dies läßt auf eine weitreichende Dysregulation dieser Untereinheiten als Ursache der BZ-Bindungsstellen Veränderungen schließen. Eine GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation scheint somit, in Übereinstimmung zum Tiermodell, an der Pathophysiologie von kortikalen Dysplasien des Menschen beteiligt zu sein.

Beurteilung der operativen Therapie der zu kortikalen Dysplasien assoziierten Epilepsie

Von klinischer Relevanz ist die Frage nach dem Fokus epileptischer Aktivität im Hinblick auf eine effektive, möglichst gezielte chirurgische Resektion. Die Lokalisation im Tiermodell zeigt differierende Resultate. Im Ibotensäure Modell läßt sich keine eindeutige Korrelation zwischen Dysplasie und Ort evozierter multiphasischer Aktivität erkennen, wobei diese sowohl im morphologisch intakten Neokortex als auch im Bereich des Mikrogyrus entstehen kann (Redecker et al. 1998b). Während die Resultate von Luhmann et al. (1998a, b) auf eine Trigger-Zone epileptischer Aktivität im Bereich der durch Gefrier-Läsion induzierten Mikrogyri schließen lassen, zeigt sich in den Untersuchungen von Prince und Jacobs (1998) in 0,5 – 2 mm Entfernung zum Mikrogyrus der Fokus epileptogener Feldpotentiale. Diese bleiben von einem Schnitt zwischen Mikrogyrus und paramikrogyraler Zone unbeeinflusst was zeigt, daß der im morphologisch intakten Kortex liegende Fokus unabhängig zur Dysplasie aktiv sein kann (Jacobs et al. 1999a). Auch wenn die zitierten Befunde nicht widerspruchsfrei sind, so zeigen sie die Problematik einer exakten Fokus-Lokalisation. Die weitreichende GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation zeigt, daß pathophysiologische Veränderungen nicht auf die fokale kortikale Dysplasie beschränkt sind, wodurch die Fokus-Entstehung in einem weiten Bereich möglich erscheint.

Die Resultate chirurgischer Resektion deuten auf eine intrinsische Epileptogenität fokaler kortikaler Dysplasien beim Menschen hin (Palmini et al. 1991b). Die Entfernung dysplastisch veränderten Gewebes korreliert positiv mit dem postoperativem Ergebnis. Insgesamt sind die Ergebnisse bei dysplastischen Läsionen jedoch unbefriedigend gegenüber aufgrund anderer Indikationen durchgeführter Epilepsie-Chirurgie (Palmini et al. 1991b; Chassoux et al. 2000). Funktionelle Untersuchungen zur Demarkierung des epileptogenen Gewebes zeigen eine nur begrenzte Überlappung zur Dysplasie-region. So können Stereoelektroenzephalographie (SEEG) (Chassoux et al. 2000; Tassi et al. 2002) oder intraoperativ durchgeführte ECoG (Palmini et al. 1994, 1995) die postoperativen Resultate weiter verbessern. Eine Re-Operation kann in vielen Fällen die Anfallskontrolle verbessern (Palmini 2000) was zeigt, daß sich epileptogenes Gewebe außerhalb der Dysplasie und des initial als epileptogen identifizierten Bereichs befunden hat. Durch Gewebeentfernung wird evtl. ein bis dahin unerkannter Fokus demaskiert (Chevassus-au-Louis et al. 1999a; Tassi et al. 2002). Durch Verbesserungen der präoperativen Diagnostik läßt sich deren Sensitivität zur Erkennung kleinster dysplastischer Areale oder zusätzlicher epileptogener Bereiche wahrscheinlich weiter erhöhen. Durch verbesserte Bildgebung, im Besonderen der MRT, wird eine zunehmende in vivo Detektierung und Subtypisierung kortikaler Dysgenesien möglich (Hagemann et al. 2000b; Barkovich 2002). Zusätzlich können weitere Verfahren wie z. B. die MEG die präoperative Lokalisation epileptogener Bereiche im Zusammenhang mit kortikalen Dysplasien verbessern (Ishibashi et al. 2002). Ein weiterer Ansatzpunkt zur Verbesserung der postoperativen Ergebnisse ist die Identifizierung von positiven und negativen Prognosefaktoren (Sisodiya 2000). Zum Beispiel bedeuten ein geringer histopathologischer Dysplasiegrad und eine Lokalisation im Temporallappen eine günstige Prognose (Palmini 2000). Bei der Planung operativer Maßnahmen ist die mögliche Beteiligung dysplastischer Areale an normalen Hirnfunktionen zu berücksichtigen und abzuklären (Leblanc et al. 1995; Richardson et al. 1998). Gute Aussichten auf erfolgreiche chirurgische Therapie bestehen in Fällen einer hohen Übereinstimmung zwischen ichtalen Anfallscharakteristika und Befunden eines funktionellen und anatomischen Neuro-Imaging (Lagae 2000). Palmini (2000) liefert eine Übersicht der Resultate verschiedener Studien operativer Dysplasie-Behandlung. So schwankt der Anteil guter Ergebnisse, definiert als Anfallsreduktion um mindestens 75 %, zwischen 15 – 90 % und die Rate anfallsfreier Patienten zwischen 10 – 60 %. Eine Übersicht von Sisodiya (2000) zeigt eine durchschnittliche Anfallsfreiheit von ca. 40 % bei Patienten mit kortikalen

Dysgenesien und bei dem als FCD bezeichneten Subtyp. Neuere Studien lassen einen Aufwärtstrend erkennen. So erzielen z. B. Kral et al. (2003) bei 72 % der Patienten mit FCD eine Anfallsfreiheit durch chirurgische Resektion. Epilepsie-Chirurgie verspricht durch weitere Verbesserungen des morphologischen und funktionellen Brain-Mapping sowie Selektion positiver Prädiktoren eine weitere Therapieverbesserung bei zu fokalen kortikalen Dysplasien assoziierten Epilepsie. Allerdings lassen zunehmende Erkenntnisse über weitreichende Netzwerkveränderungen auch im morphologisch unauffälligen Kortex vermuten, daß die Verbesserungsmöglichkeiten der chirurgische Therapie aufgrund begrenzter Resektabilität limitiert sind. Bei Versagen der Pharmakotherapie ist die Operation jedoch neben der Vagus-Nerv-Stimulation (Ben-Menachem 2002) zur Zeit die einzig mögliche Therapie.

Beurteilung der medikamentösen Therapie der zu kortikalen Dysplasien assoziierten Epilepsie

Die Pharmakotherapie der zu kortikalen Dysgenesien assoziierten Epilepsie bleibt häufig erfolglos bzw. kortikale Dysplasien werden vielfach erst in der weiterführenden Diagnostik spezialisierter Therapie-Zentren zur Abklärung pharmako-resistenter Epilepsie diagnostiziert (Raymond et al. 1995; Mischel et al. 1995; Battaglia et al. 1996; Eriksson et al. 1999). Nur ca. ein Viertel der in ein tertiäres Epilepsie-Zentrum überwiesenen Patienten mit kortikalen Dysgenesien läßt sich für mindestens ein Jahr medikamentös einstellen (Semah et al. 1998). Dabei schwankt die Erfolgsquote abhängig vom Subtyp der kortikalen Dysgenese. Es lassen sich nur 4 % der Patienten mit TTFCD oder Hemimegalenzephalie aber 41 % der Patienten mit Polymikrogyrie oder Schizenzephalie medikamentös einstellen (Palmini 2000). Insgesamt sind diese Resultate unbefriedigend. Das Ziel weiterer Forschung ist es, Ursachen für diese Pharmako-Resistenz aufzudecken, um daraus Ansätze für eine modifizierte und wirksamere medikamentöse Behandlung abzuleiten. Ziel dieser Arbeit war es, zur Beantwortung dieser Fragestellungen einen Beitrag zu leisten. Potenzierung GABA_Aerger Inhibition ist der Wirkungsmechanismus zahlreicher im klinischen Einsatz befindlicher Antikonvulsiva. Durch zunehmende Erkenntnisse der Diversität von GABA_A Rezeptoren und deren Komposition aus mindestens 19 verschiedenen Untereinheiten bietet sich nun die Möglichkeit, eine neue Medikamenten-Generation mit selektiver Wirkung auf einzelne Untereinheiten zu entwickeln. Für welche GABA_A Rezeptoruntereinheiten eine gezielte Pharmakotherapie Fortschritte verspricht hängt von der physiologischen Rolle einzelner GABA_A Rezeptoren und von deren Veränderung unter pathophysiologischen Bedingungen ab (Whiting 1999). Die α Untereinheiten zeigen verschiedene Sensitivitäten gegenüber diversen Pharmaka und sind ein möglicher Ansatzpunkt einer GABA_A Rezeptoruntereinheiten spezifischen Therapie (Smith et al. 2001). In dieser Arbeit wurden die vier häufigsten α Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ untersucht, die zusammen mit der Untereinheit $\gamma 2$ gleichzeitig für die Bildung von Benzodiazepin-Bindungsstellen verantwortlich sind (Mohler et al. 2002). Benzodiazepine entwickeln ihre Wirkung auf GABA_A Rezeptoren durch einer Erhöhung der GABA-Affinität ohne die Kanal-Öffnungs-Kinetik zu verändern (Lavoie und Twyman 1996). Durch Mutationen einzelner GABA_A Rezeptoruntereinheiten wurde erreicht, daß diese Rezeptoren insensitiv für Diazepam wurden, ohne ihre physiologischen Eigenschaften gegenüber GABA zu verlieren (Benson et al. 1998). Dadurch ist es möglich, den Beitrag einzelner GABA_A Rezeptoruntereinheiten zum breiten Wirkungsspektrum klassischer Benzodiazepine zu selektionieren. Mäuse, deren GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ durch Punktmutation insensitiv gegenüber Diazepam ist, zeigen bei Diazepam-Gabe eine erhaltene Anxiolyse, Muskelrelaxation, Störung der Motorik und Ethanol-Potenzierung. Im Gegensatz dazu fehlt eine Sedierung und Amnesie, während die Anfallsprotektion um ca. die Hälfte gemindert ist. Dies zeigt, daß Sedierung, Amnesie und ein erheblicher Teil der antikonvulsiven BZ-Wirkung über die Untereinheit $\alpha 1$ vermittelt werden (Rudolph et al. 1999). Die verbliebene

Anfallsprotektion sowie Anxiolyse, Muskelrelaxation, Störung der Motorik und Ethanol-Potenzierung werden über die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ vermittelt. Untersuchungen zur weiteren Differenzierung zeigen, daß die Untereinheit $\alpha 5$ nicht an der antikonvulsiven Wirkung beteiligt ist (Crestani et al. 2002). Die Anxiolyse wird über die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ vermittelt (Low et al. 2000). Eine myorelaxierende Wirkung wird hauptsächlich über die Untereinheit $\alpha 2$ vermittelt und erst bei hohen Diazepam-Dosen zusätzlich über die Untereinheit $\alpha 3$ (Crestani et al. 2001). Ein Teil der Anfallsprotektion wird über die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 3$ bewirkt (Collins et al. 2002).

Möglicher Ansatzpunkt einer GABA_A Rezeptoruntereinheiten-spezifischen Pharmakotherapie

Die im Ibotensäure-Tiermodell und im Gefrier-Läsion Tiermodell (Redecker et al. 2000b) zu beobachtende Reduktion der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ ist ein möglicher Mechanismus für ein vermindertes Ansprechen konventioneller Antikonvulsiva bei Patienten mit kortikalen Dysplasien (Rudolph et al. 1999; Kralic et al. 2002). Eine funktionell weitgehend intakte Inhibition zeigt in der Umgebung fokaler kortikaler Dysplasien, daß GABA_A Rezeptoren weiterhin eine mögliche Angriffsfläche für eine gezielte pharmakologische Modulation bieten. Im Ibotensäure-Tiermodell ist die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ nicht von einer Herunter-Regulation betroffen. Im Gefrier-Läsion Tiermodell sind die Untereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 3$ arealabhängig von einer signifikanten Reduktion ausgenommen (Redecker et al. 2000b). Die relative Persistenz dieser GABA_A Rezeptoruntereinheiten zusammen mit den Möglichkeiten über die Untereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 3$ eine Anfallsprotektion zu vermitteln ergibt eine zumindest theoretische Therapieoption. GABA_A Rezeptoruntereinheiten spezifische Substanzen sind im Stadium der Entwicklung (Mohler et al. 2002; Yu et al. 1999; Collins et al. 2002). So zeigen zu den 3-Heteroaryl-2-Pyridone gehörende Substanzen eine relative Selektivität für die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 3$ gegenüber der Untereinheit $\alpha 1$ (Collins et al. 2002). Die Substanz SL651498 wirkt als voller Agonist auf die Untereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 3$ und als partialer Agonist auf die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 5$. Dadurch wird eine gute Anxiolyse und eine gute antikonvulsive Wirkung erzielt. Allerdings ist die antikonvulsive Potenz von SL651498 schwächer gegenüber Diazepam, unterliegt aber im Gegensatz zu Diazepam keiner Toleranz (Griebel et al. 2001). Von solchen Substanzen sind weniger sedierende, amnestische und motorische Nebenwirkungen gegenüber klassischen Benzodiazepinen zu erwarten. Möglicherweise läßt sich eine zur Anfallsprotektion ausreichende Dosierung dieser Substanzen bei unter Epilepsie leidenden Patienten mit kortikalen Dysgenesien erreichen. Inwieweit sich die theoretisch ergebende Brücke von pathophysiologischen Veränderungen der GABA_A Rezeptoren im Tiermodell über Fortschritte in der Erforschung von GABA_A Rezeptoruntereinheiten-spezifischer Pharmaka zu einer effektiveren Behandlung der betroffenen Patienten ausbauen läßt, bedarf weiterer Forschung.

4.3.2 Diskussion der Ergebnisse in der Untersuchungsgruppe: subkortikale Heterotopie

4.3.2.1 Morphologische Veränderungen im die subkortikalen Heterotopien bedeckenden Neokortex

Zusätzlich zur Ausbildung nodulärer subkortikaler Heterotopien zeigte sich der bedeckende Neokortex fokal verändert. Dabei wurden unterschiedliche Muster der Laminierung oberhalb der Heterotopien beobachtet. Bei vier von acht Tieren waren die Kortexschichten V und VI in der Relation zu den Kortexschichten II und III verbreitert. Im Gegensatz dazu war bei zwei Tieren eine zum Aufbau eines Mikrogyrus vergleichbare Laminierung mit einer

Verschmälerung der tiefen Kortexschichten und Verbreiterung der oberen Kortexschichten zu beobachten. Zwei Tiere zeigten lediglich ein wellenförmiges Erscheinungsbild der Laminierung ohne eindeutige Verschiebung der Proportionen zwischen den Kortexschichten. Zur Veränderung der Kortexstruktur im die subkortikalen Heterotopien bedeckenden Kortex kommt es durch zwei Mechanismen. Zum einen führt die destruiende Ibotensäure-Wirkung bei postmitotischen Neuronen der unteren Kortexschichten zu einem Zellverlust und Ausdünnung dieser Schichten (Marret et al. 1995). Zum anderen beenden die zum Zeitpunkt der Geburt migrierenden Neurone der Kortexschichten II und III sowie teilweise IV (Rosen et al. 1996) durch Ibotensäure-Wirkung vorzeitig ihre Migration und bleiben subkortikal liegen (Marret et al. 1996; Gressens et al. 1996). Die physiologische durch „inside-outside layering“ charakterisierte Kortextentstehung wird dadurch gestört und die betroffenen Neurone erreichen nicht ihre physiologische Position in den oberen Kortexschichten (Hagemann et al. 2001). Dadurch wird eine umschriebene Verschmälerung der oberen Kortexschichten verursacht. Bei sechs von acht Tieren fand sich die subkortikale Heterotopie synchron zur kortikalen Mikrogyrus-Bildung in frontaler oder okzipitaler Verlängerung des in fronto-okzipitaler Ausrichtung verlaufenden Mikrogyrus. Vermutlich liegen subkortikale Heterotopien nicht im Zentrum der Ibotensäure-Wirkung, welches mit dem Mikrogyrus übereinstimmen dürfte, sondern im Randbereich. In diesem Bereich führt vermutlich ein unterschiedliches Ausmaß der Überlappung zwischen einer durch Ibotensäure erzeugten Nekrose in den tiefen Kortexschichten sowie eine durch fehlende Neurone verursachten Verschmälerung in den oberen Kortexschichten zu unterschiedlichen Laminierungs-Mustern des die subkortikalen Heterotopien bedeckenden Neokortex. Dies zeigt, daß Ibotensäure induzierte subkortikale Heterotopien von Umstrukturierungen des bedeckenden Kortex begleitet sind.

4.3.2.2 Veränderungen der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung in der Umgebung subkortikaler Heterotopien

Der die subkortikalen Heterotopien bedeckende Kortex sowie die angrenzenden neokortikalen Areale sind von einer konsistenten Reduktion der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ gegenüber der kontralateralen Hemisphäre betroffen (Abb. 4.4). Die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ zeigen eine in allen neokortikalen Arealen vergleichbare, allerdings nicht signifikante Dichteminderung. Das die subkortikalen Heterotopien unmittelbar bedeckende und von Laminierungsstörungen betroffene Areal HL/FL zeigt für die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ eine signifikante Herunter-Regulation, die von einer noch ausgeprägteren Abnahme dieser Untereinheiten in den lateral gelegenen Arealen Par1 und Par2 begleitet wird. Die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\gamma 2$ zeigt in der Umgebung subkortikaler Heterotopien eine Reduktion, die in den Arealen Fr1/Fr2 und Par2 ein signifikantes Niveau erreicht. Die Befunde lassen eine geminderte GABA_A Rezeptoren Anzahl in weiten Bereichen des die subkortikalen Heterotopien bedeckenden Neokortex vermuten. Unter physiologischen Bedingungen sind die Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ am Aufbau von weniger als 20 % der GABA_A Rezeptoren beteiligt. Dieser Anteil dürfte zugunsten der Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ im morphologisch veränderten Kortex und in den intakt erscheinenden parietalen Arealen reduziert sein. Neben morphologischen Laminierungsstörungen im subkortikale Heterotopien bedeckenden Kortex zeigt sich eine darüber hinausreichende GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation.

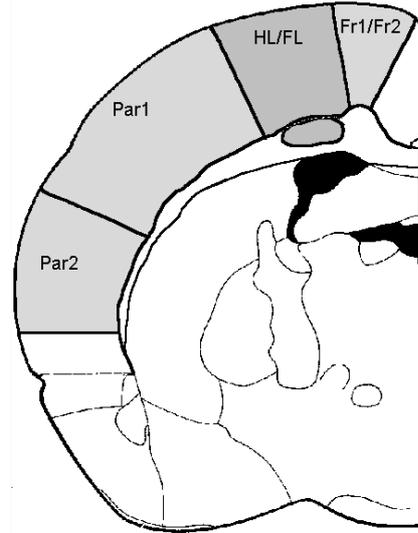
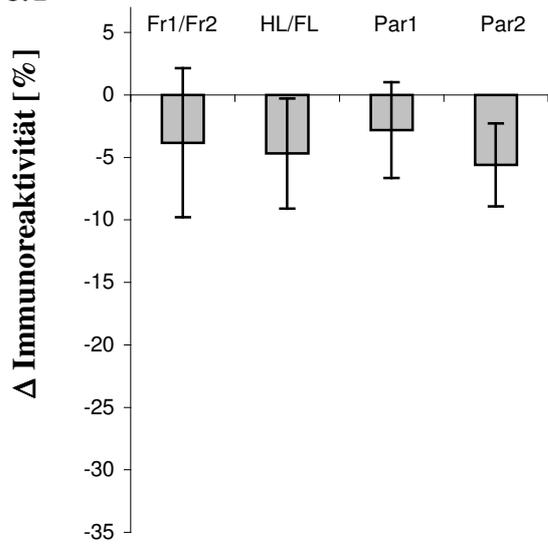
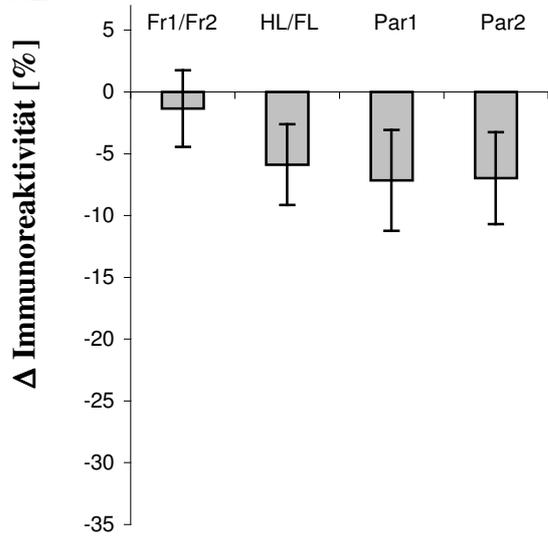
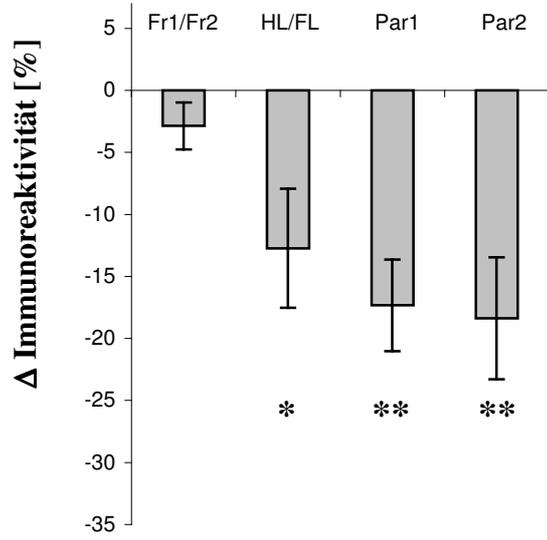
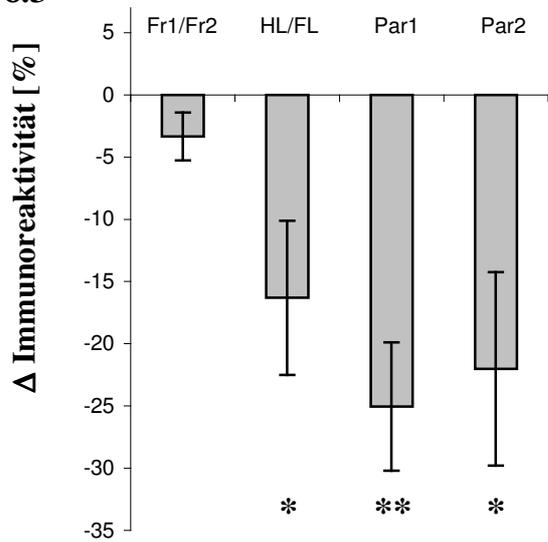
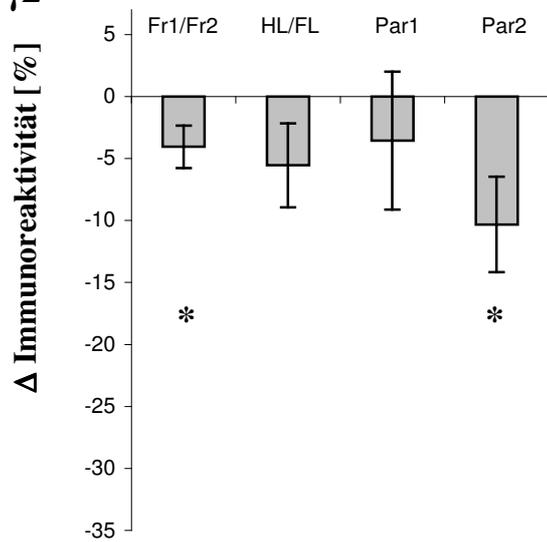
$\alpha 1$  $\alpha 2$  $\alpha 3$  $\alpha 5$  $\gamma 2$ 

Abb. 4.4: Areal spezifische Auswertung der GABA_A-Immunhistochemie nach Ibotensäureläsion in der Ebene der subkortikaler Heterotopie. Dargestellt ist die prozentuale optische Dichteminderung der ibotensäureinjizierten Hemisphäre in Relation zur Gegenseite. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (t-Test, $p < 0,05$) bzw. zwei Sterne (t-Test, $p < 0,01$) gekennzeichnet.

4.3.2.3 Vergleich morphologischer und funktioneller Befunde im Ibotensäure- und MAM-Tiermodell

Ein weiteres und besser untersuchtes Tiermodell mit nodulären, subkortikalen Heterotopien ist das MAM Tiermodell. Durch systemische Gabe des Teratogen Methylazoxymethanol (MAM) bei schwangeren Ratten an E 15 werden bei deren Neugeborenen dysplastische Veränderungen induziert. Die Tiere entwickeln subkortikale Heterotopien im Bereich der Ventrikel und im Hippokampus, begleitet von einer Verschmälerung der supragranulären Kortexschichten und Laminierungsstörungen im Neokortex (Chevassus-au-Louis et al. 1998b, 1999a; Sancini et al. 1998). Die Neurone der subkortikalen Heterotopien haben wie im Ibotensäure Modell ihre physiologische Zielposition in den oberen Kortexschichten (Calcagnotto et al. 2002; Chevassus-au-Louis et al. 1999a). Mit MAM behandelte Tiere zeigen unter Provokation eine erniedrigte Krampfschwelle als Ausdruck einer zu Heterotopien assoziierten Hyperexzitabilität (Chevassus-Au-Louis et al. 1998a; Germano et al. 1996; Baraban und Schwartzkroin 1996). Diese zeigt eine erhöhte Resistenz gegenüber klassischen Antiepileptika (Smyth et al. 2002). Begleitend zur heterotopen Lage der Neurone werden weitreichende Veränderungen in der Verknüpfung neuronaler Netzwerke beobachtet. Die Neurone scheinen in ihrer heterotopen Position afferente und efferente Projektionen entsprechend ihrer physiologischen Position in den oberen Kortexschichten beizubehalten (Chevassus-au-Louis und Represa 1999; Chevassus-Au-Louis et al. 1998b). Aus diesem Grund bestehen zahlreiche bidirektionale, monosynaptische Bahnen zum ipsilateralen und kontralateralen Neokortex (Colacitti et al. 1998). Zusätzlich bilden Heterotopien Verbindungen zu Neuronen entsprechend ihrer pathologischen Position aus (Chevassus-au-Louis und Represa 1999), wodurch es zu funktionellen Brücken zwischen normalerweise nicht verbundenen Netzwerken kommt. Auf diese Weise entsteht in MAM Ratten eine funktionelle Brücke zwischen Neokortex und dem Hippokampus über die eine pathologische Erregungsausbreitung möglich ist (Chevassus-Au-Louis et al. 1998b). Trotz zahlreicher Verbindungen heterotoper Neurone zeigen Heterotopien eine partielle Deafferenzierung bei möglicherweise gleichzeitig erhöhter Anzahl von Verbindungen innerhalb der Heterotopie. Dadurch könnte ein zur synchronen Aktivität fähiger Fokus entstehen (Chevassus-au-Louis und Represa 1999). Der die subkortikalen Heterotopien bedeckende Neokortex zeigt im MAM-Tiermodell ebenfalls pathologische Bahnen. Unterhalb der Molekularschicht breiten sich abnorme, tangentielle Bahnen innerhalb des Neokortex aus (Chevassus-Au-Louis et al. 1999b). Die im MAM-Tiermodell beschriebenen pathologischen Verbindungen weisen auf weitreichende Reorganisationen neuronaler Netzwerke, hin wodurch die Entstehung und Ausbreitung epileptiformer Aktivität begünstigt werden könnte (Chevassus-au-Louis und Represa 1999; Chevassus-au-Louis et al. 1999a). Im Ibotensäure-Tiermodell wurden bisher keine Untersuchungen zur Aufdeckung pathologischer Verbindungen in der Umgebung subkortikaler Heterotopien durchgeführt. Aus diesem Grund läßt sich nur spekulieren, daß aufgrund einer übereinstimmenden physiologischen Zielposition der Neurone in den oberen Kortexschichten und einer vergleichbaren subkortikalen Lage der Heterotopien ähnliche Verbindungen im Ibotensäure- und MAM-Tiermodell bestehen. Allerdings bilden mit Ibotensäure injizierte Tiere keine Heterotopien im Bereich des Hippokampus, weshalb eine Brückenbildung zwischen Neokortex und Hippokampus dort nicht zu erwarten ist. Zusätzlich zu den im MAM-Tiermodell beschriebenen pathologischen Netzwerkverbindungen zeigt eine Neuronen-Subpopulation ein verändertes Entladungsmuster mit lang anhaltenden und repetitiven Entladungen. Diese Neurone befinden sich innerhalb der Heterotopien und in den

oberen Kortexschichten des bedeckenden, morphologisch veränderten Neokortex (Sancini et al. 1998). Die elektrophysiologische Untersuchung zeigt verkleinerte IPSP in Neuronen des somatosensorischen Kortex während sich innerhalb der Heterotopien zusätzlich zu Neuronen mit verkleinerten IPSP auch Neurone mit verlängerten, biphasischen IPSP nachweisen lassen (Sancini et al. 1998). Eine mögliche Erklärung für die im somatosensorischen Kortex von mit MAM behandelten Ratten reduzierte Inhibition ist eine GABA_A Rezeptoren-Dysregulation, wie sie sich im die subkortikalen Heterotopien bedeckenden Neokortex Ibotensäure injizierter Ratten nachweisen läßt. Befunde im MAM- und Ibotensäure-Tiermodell deuten auf eine Imbalance zwischen Exzitation und Inhibition hin, die zusammen mit einer weitreichenden Reorganisation von Netzwerk-Verknüpfungen die Entstehung und Ausbreitung epileptischer Aktivität im Zusammenhang mit nodulären subkortikalen Heterotopien begünstigen können.

4.3.2.4 GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung subkortikaler Heterotopien

Zu einem frühen Zeitpunkt der Neuronen-Entwicklung werden Programme aktiviert, die über deren funktionelle Eigenschaften in ausgereiften Netzwerken entscheiden. Die Zugehörigkeit zu den oberen Kortexschichten scheint bereits bei der Neurogenese determiniert zu sein (Frantz und McConnell 1996). Die GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung einzelner Neurone scheint dabei ebenfalls zu einem frühen Zeitpunkt durch genetische Programme fixiert zu sein und lediglich durch lokale Faktoren und thalamischen Input modifiziert zu werden (Paysan et al. 1997). Die subkortikalen Heterotopien bei Ibotensäure injizierten Ratten bestehen aus Neuronen, die ihre physiologische Zielposition in den oberen Kortexschichten nicht erreicht haben (s. o.). Die optische Beurteilung der durch Immunhistochemie nachgewiesenen GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung zeigt übereinstimmende Charakteristika zwischen Neuronen in den oberen Kortexschichten und subkortikalen Heterotopien mit hohen Intensitäten für die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ und einer sehr niedrigen Dichte für die Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ (Hagemann et al. 2001). Die Analyse der in subkortikalen Heterotopien gewonnenen Dichtewerte zeigte Modifikationen gegenüber der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung der Kortexschichten I – IV (Abb. 4,5).

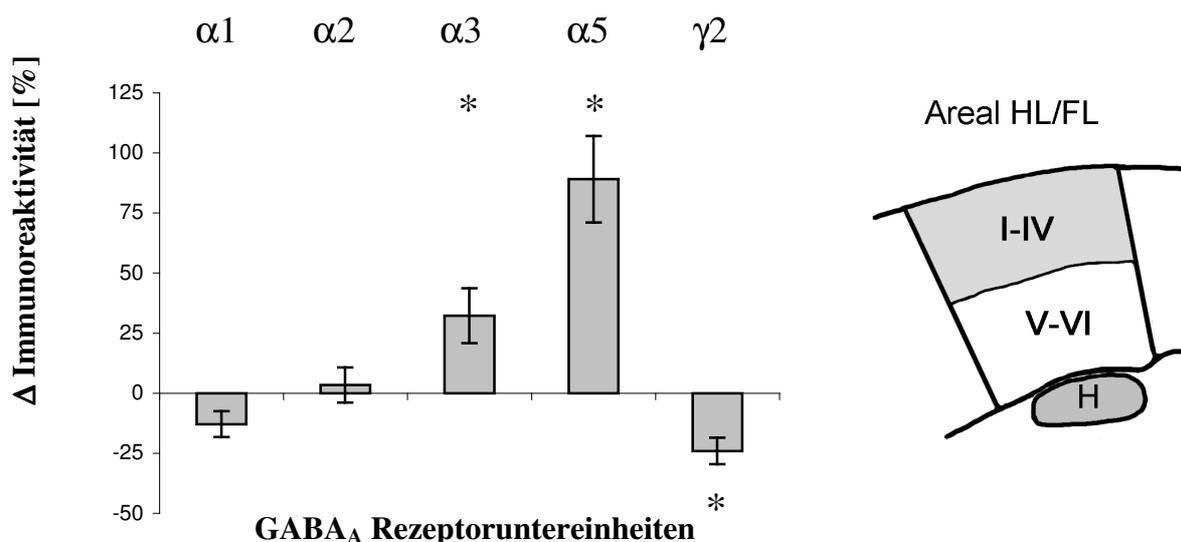


Abb. 4.5: Auswertung der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung subkortikaler Heterotopien. Dargestellt ist die optische Dichte subkortikaler Zellpopulationen (H) in Relation zu den Kortexschichten I – IV des die subkortikalen Heterotopien bedeckenden Neokortex. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern (t-Test, $p < 0,05$) gekennzeichnet.

Dabei zeigen sich gegenüber den oberen Kortexschichten des bedeckenden Neokortex erhöhte Dichtewerte für die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$, die normalerweise kaum in Neuronen, die ihre Zielposition in den Kortexschichten I – IV besitzen, exprimiert werden. Eine Reduktion der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\gamma 2$ um 24 % läßt aufgrund ihrer Relevanz eine reduzierte GABA_A Rezeptor-Anzahl in subkortikalen Heterotopien vermuten. Eine deutliche relative Zunahme der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ kommt im Gegensatz dazu keiner wesentlichen absoluten Zunahme an GABA_A Rezeptoren gleich, da sich die prozentuale Zunahme auf die sehr geringe Anzahl dieser Untereinheiten in den oberen Kortexschichten bezieht. Allerdings findet eine Verschiebung der Relation zwischen den α Untereinheiten statt bei einer relativen Abnahme der Untereinheit $\alpha 1$ gegenüber den Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$. Dies entspricht einer „unreifen“ GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung, was ein generelles Charakteristikum kortikaler Dysgenesien zu sein scheint (s. o.). Eine weitere Ursache einer Modifikation der GABA_A Rezeptoren könnte ein veränderter afferenter Input in subkortikalen Heterotopien sein. Untersuchungen zeigen, daß heterotop verlagerte Neurone die Fähigkeit behalten, afferente und efferente Verbindungen entsprechend ihrer physiologischen Herkunft zu bilden (Garnier et al. 1996; Chevassus-au-Louis und Represa 1999; Frappe et al. 1999; Gaillard und Roger 2000). Dennoch ergibt sich durch zusätzliche, lokale Verbindungen und durch eine partielle Deafferenzierung eine unphysiologische Netzwerk-Verknüpfung für subkortikale Heterotopien (Chevassus-au-Louis und Represa 1999). Untersuchungen bei Meerschweinchen zeigen, daß ein Verlust thalamischer Afferenzen des somatosensorischen Kortex zur Reduktion der GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ bei gleichzeitiger Zunahme der Untereinheit $\alpha 5$ in den Kortexschichten III und IV führt (Paysan et al. 1997). Durch einen ähnlichen Mechanismus könnte die beobachtete partielle Deafferenzierung in subkortikalen Heterotopien eine Verschiebung zwischen den GABA_A Rezeptoruntereinheiten verursachen. Eine erhöhte Anzahl der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ führt zur Bildung von GABA_A Rezeptoren mit sehr langen Öffnungszeiten (Serafini et al. 1998). Dies kann zur Verlängerung von IPSP in Heterotopien führen, wie sie im MAM-Tiermodell nachweisbar sind (Calcagnotto et al. 2002; Sancini et al. 1998). Auf präsynaptischer Ebene scheint ein verminderter GABA-Reuptake vorzuliegen (Calcagnotto et al. 2002), während GABAerge Interneurone in Heterotopien nicht reduziert sind (Hagemann et al. 2001). GABA_A Rezeptoren mit sehr langen Öffnungszeiten können die Effektivität GABAerger Inhibition steigern und zur Kompensation einer möglicherweise reduzierten GABA_A Rezeptor-Anzahl in subkortikalen Heterotopien beitragen. Eine geänderte GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Komposition mit einem erhöhten Ladungstransfer kann allerdings auch zu einer verstärkten Netzwerk-Synchronisation führen (Serafini et al. 1998; Nusser et al. 2001). Ein weiterer möglicher Pathomechanismus zur Entstehung synchroner Aktivität ist eine fehlende zeitliche Abstimmung zwischen „reifen“ Netzwerken in der Umgebung subkortikaler Heterotopien und „unreifen“ GABA_A Rezeptoren auf heterotopen Neuronen (Poulter et al. 1999) (s. o.).

Die in dem MAM- und Ibotensäure-Tiermodell gewonnen Erkenntnisse deuten auf zahlreiche und weitreichende Netzwerkveränderungen in subkortikalen Heterotopien und dem bedeckenden Neokortex hin. Die Abklärung der Relevanz einzelner Befunde zur Entstehung oder Kompensation einer assoziierten Hyperexzitabilität erfordert weitere Untersuchungen. Zur funktionellen Beurteilung der beobachteten GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation bedarf es zusätzlicher elektrophysiologischer Untersuchungen.

4.3.2.5 Klinische Relevanz der Befunde bei subkortikalen Heterotopien

Vergleich zur Pathophysiologie bei subkortikalen Heterotopien des Menschen

Parallel zu der im Ibotensäure Modell beobachteten GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation in der Umgebung subkortikaler Heterotopien zeigen sich Veränderungen der GABAergen Inhibition bei Epilepsie-Patienten mit Heterotopien. Durch PET-Analyse läßt sich ein Verlust zentraler Benzodiazepin-Bindungsstellen in subkortikalen Heterotopien nachweisen (Hammers et al. 2001) analog zu der beobachteten Herunter-Regulation der GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$ und $\gamma 2$ innerhalb der Heterotopien. Das Gewebe menschlicher subkortikaler Heterotopien zeigt qualitative Veränderungen von mit Neuropeptid Y und Calretinin markierten Interneuronen. Dabei läßt die morphologische Unreife dieser Neurone auf eine verzögerte Reifung des GABAergen Systems mit der Ausbildung funktionell unreifer Synapsen schließen (Hannan et al. 1999). Diese lediglich auf morphologischen Kriterien von Interneuronen basierende Vermutung wird durch die Befunde dieser Arbeit bestärkt. Auf der Ebene der Synapsen zeigt sich innerhalb der subkortikalen Heterotopien die Persistenz eines für unreife Gewebe typischen GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Musters mit einem in Relation zur Untereinheit $\alpha 1$ erhöhten Anteil der „unreifen“ GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$. Ein abnormes, unreifes GABA-System kann zu einem Überwiegen der Exzitation führen und eine beim Menschen gezeigte intrinsische Epileptogenität subkortikaler Heterotopien mitbegründen (Francione et al. 1994; Dubeau et al. 1995; Hannan et al. 1999). Klinische Daten deuten jedoch darauf hin, daß der bedeckende Neokortex ebenfalls an der Epilepsie-Genese beteiligt ist (Li et al. 1997; Francione et al. 1994; Spreafico et al. 1998b). Die in dieser Arbeit im bedeckenden Neokortex beobachteten Laminierungsstörungen und GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Veränderungen lassen ebenfalls eine nicht auf die Heterotopien beschränkte Pathophysiologie vermuten. Der Nachweis von morphologisch veränderten Interneuronen im bedeckenden Neokortex deutet auf eine über die Heterotopien hinausreichende Dysregulation des GABA-Systems hin (Hannan et al. 1999). Allerdings zeigt der in vivo Nachweis von Benzodiazepin-Bindungsstellen keine Veränderungen im bedeckenden Neokortex (Hammers et al. 2001). Die im MAM-Tiermodell nachgewiesene partielle Deafferenzierung bei gleichzeitiger Ausbildung zahlreicher reziproker Verbindungen zum bedeckenden Neokortex (Chevassus-au-Louis und Represa 1999) ist beim Menschen an epilepsiechirurgisch gewonnenem Material mittels Tract-Tracing ebenfalls nachweisbar (Hannan et al. 1999). Als möglicher Pathomechanismus der Epilepsieentstehung kommt dabei eine Imbalance zwischen Exzitation und einer funktionell unreifen Inhibition in Frage, wobei es zu einer Erregungsausbreitung in den bedeckenden Neokortex kommen kann. Der ebenfalls Veränderungen aufweisende Kortex kann dabei als Verstärker (Hannan et al. 1999) fungieren oder ist seinerseits zur Generierung epileptischer Aktivität fähig.

Beurteilung von Therapieansätzen bei der zu subkortikalen Heterotopien assoziierten Epilepsie

Beim Menschen sind subkortikale Heterotopien häufig mit Epilepsie assoziiert (Raymond et al. 1995; Meencke und Veith 1992). In einer Serie von Dubeau et al. (1995) leiden 82 % der Patienten mit subkortikalen Heterotopien an rezidivierenden Anfällen. Die meisten Patienten zeigen normale intellektuelle und motorische Funktion mit, wenn überhaupt, nur milder mentaler oder motorischer Retardierung (Dubeau et al. 1995). Auch wenn die Läsionen meist umschrieben sind und eine Resektion unproblematisch erscheint, ist zu beachten, daß heterotopes Gewebe an normalen Funktionen beteiligt sein kann (Richardson et al. 1998; Morioka et al. 1999). Das Hauptproblem der chirurgischen Therapie ist jedoch eine häufig nur

ungenügende Anfallskontrolle (Li et al. 1997; Porter et al. 2002). Dies deutet auf über die Heterotopien hinausreichende Pathologien hin. Dabei sollte besonders eine sogenannte „duale Pathologie“ mit dem Vorliegen einer synchronen Hippokampus-Sklerose als Kontraindikation für eine Operation angesehen werden (Li et al. 1997; Sisodiya 2000). Zusätzlich sollte versucht werden, durch funktionelle Untersuchungen wie die SEEG das Ausmaß epileptogener Veränderungen im bedeckenden Neokortex zu ermitteln (Spreafico et al. 1998b). Zu subkortikalen Heterotopien assoziierte Anfälle sind häufig refraktär gegenüber der medikamentösen Therapie (Raymond et al. 1995; Battaglia et al. 1996; Porter et al. 2002). Die beobachtete GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation liefert dafür ein mögliches funktionelles Korrelat. Inwieweit eine im Abschnitt 4.3.1.10 diskutierte GABA_A Rezeptoruntereinheiten-spezifische Pharmakotherapie die Anfallskontrolle verbessern kann bleibt Spekulation und bedarf zahlreicher weiterer Untersuchungen. Ein weiterer therapeutischer Ansatz ergibt sich durch zunehmende genetische Erkenntnisse im Zusammenhang mit der Entstehung kortikaler Dysgenesien (Walsh 2000). Dadurch wird eine gezielte genetische Beratung bei familiärem Auftreten von subkortikalen Heterotopien möglich (Lagae 2000; Guerrini und Carrozzo 2002).

- Amano S**, Ihara N, Uemura S, Yokoyama M, Ikeda M, Serikawa T, Sasahara M, Kataoka H, Hayase Y, Hazama F (1996) Development of a novel rat mutant with spontaneous limbic-like seizures. *Am J Pathol* 149:329-336
- Arellano JI**, DeFelipe J, Munoz A (2002) PSA-NCAM immunoreactivity in chandelier cell axon terminals of the human temporal cortex. *Cereb Cortex* 12:617-624
- Aumais JP**, Tunstead JR, McNeil RS, Schaar BT, McConnell SK, Lin SH, Clark GD, Yu-Lee LY (2001) NudC associates with Lis1 and the dynein motor at the leading pole of neurons. *J Neurosci* 21:RC187
- Avoli M**, Bernasconi A, Mattia D, Olivier A, Hwa GG (1999) Epileptiform discharges in the human dysplastic neocortex: in vitro physiology and pharmacology. *Ann Neurol* 46:816-826
- Baimbridge KG**, Celio MR, Rogers JH (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 15:303-308
- Baraban SC**, Schwartzkroin PA (1996) Flurothyl seizure susceptibility in rats following prenatal methylazoxymethanol treatment. *Epilepsy Res* 23:189-194
- Barkovich AJ** (1996) Subcortical heterotopia: a distinct clinicoradiologic entity. *AJNR Am J Neuroradiol* 17:1315-1322
- Barkovich AJ** (1998) Neuroimaging manifestations and classification of congenital muscular dystrophies. *AJNR Am J Neuroradiol* 19:1389-1396
- Barkovich AJ** (2002) Magnetic resonance imaging: role in the understanding of cerebral malformations. *Brain Dev* 24:2-12
- Barkovich AJ**, Chuang SH, Norman D (1988) MR of neuronal migration anomalies. *AJR Am J Roentgenol* 150:179-187
- Barkovich AJ**, Kuzniecky RI, Dobyns WB (2001a) Radiologic classification of malformations of cortical development. *Curr Opin Neurol* 14:145-149
- Barkovich AJ**, Kuzniecky RI, Dobyns WB, Jackson GD, Becker LE, Evrard P (1996) A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics* 27:59-63
- Barkovich AJ**, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB (2001b) Classification system for malformations of cortical development: update 2001. *Neurology* 57:2168-2178
- Barnard EA**, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50:291-313

Battaglia G, Arcelli P, Granata T, Selvaggio M, Andermann F, Dubeau F, Olivier A, Tampieri D, Villemure JG, Avoli M, Avanzini G, Spreafico R (1996) Neuronal migration disorders and epilepsy: a morphological analysis of three surgically treated patients. *Epilepsy Res* 26:49-58

Beesley JE (1993) *Immunocytochemistry*. IRL Press, Oxford 14-42

Behar TN, Li YX, Tran HT, Ma W, Dunlap V, Scott C, Barker JL (1996) GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci* 16:1808-1818

Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, Greene CL, Barker JL (2000) GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb Cortex* 10:899-909

Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, O'Connell C, Barker JL (1998) Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to GABA as a migration stimulus. *J Neurosci* 18:6378-6387

Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA, Barker JL (1999) Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J Neurosci* 19:4449-4461

Behar TN, Smith SV, Kennedy RT, McKenzie JM, Maric I, Barker JL (2001) GABA(B) receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells. *Cereb Cortex* 11:744-753

Benardete EA, Kriegstein AR (2002) Increased excitability and decreased sensitivity to GABA in an animal model of dysplastic cortex. *Epilepsia* 43:970-982

Benke D, Mertens S, Trzeciak A, Gillessen D, Mohler H (1991) GABAA receptors display association of gamma 2-subunit with alpha 1- and beta 2/3-subunits. *J Biol Chem* 266:4478-4483

Benson JA, Low K, Keist R, Mohler H, Rudolph U (1998) Pharmacology of recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated alpha subunits. *FEBS Lett* 431:400-404

Bernard C, Cossart R, Hirsch JC, Esclapez M, Ben-Ari Y (2000) What is GABAergic inhibition? How is it modified in epilepsy? *Epilepsia* 41 Suppl 6:90-95

Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, le Bourdelles B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsinghji DJ, Brown N, Wafford KA, Whiting PJ (1999) theta, a novel gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9891-9896

Brunig I, Penschuck S, Berninger B, Benson J, Fritschy JM (2001) BDNF reduces miniature inhibitory postsynaptic currents by rapid Downregulation of GABA(A) receptor surface expression. *Eur J Neurosci* 13:1320-1328

Brunstrom JE, Gray-Swain MR, Osborne PA, Pearlman AL (1997) Neuronal heterotopias in the developing cerebral cortex produced by neurotrophin-4. *Neuron* 18:505-517

- Brussaard AB**, Herbison AE (2000) Long-term plasticity of postsynaptic GABAA-receptor function in the adult brain: insights from the oxytocin neurone. *Trends Neurosci* 23:190-195
- Brussaard AB**, Kits KS, Baker RE, Willems WP, Leyting-Vermeulen JW, Voorn P, Smit AB, Bicknell RJ, Herbison AE (1997) Plasticity in fast synaptic inhibition of adult oxytocin neurons caused by switch in GABA(A) receptor subunit expression. *Neuron* 19:1103-1114
- Buchkremer-Ratzmann I**, August M, Hagemann G, Witte OW (1996) Electrophysiological transcortical diaschisis after cortical photothrombosis in rat brain. *Stroke* 27:1105-1109
- Buchkremer-Ratzmann I**, Witte OW (1997) Extended brain disinhibition following small photothrombotic lesions in rat frontal cortex. *Neuroreport* 8:519-522
- Buhl EH**, Halasy K, Somogyi P (1994) Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 368:823-828
- Bullmore ET**, Woodruff PW, Wright IC, Rabe-Hesketh S, Howard RJ, Shuriquie N, Murray RM (1998) Does dysplasia cause anatomical dysconnectivity in schizophrenia? *Schizophr Res* 30:127-135
- Calcagnotto ME**, Paredes MF, Baraban SC (2002) Heterotopic neurons with altered inhibitory synaptic function in an animal model of malformation-associated epilepsy. *J Neurosci* 22:7596-7605
- Cardoso C**, Leventer RJ, Dowling JJ, Ward HL, Chung J, Petras KS, Roseberry JA, Weiss AM, Das S, Martin CL, Pilz DT, Dobyns WB, Ledbetter DH (2002) Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: Mutations in the LIS1 gene (PAFAH1B1). *Hum Mutat* 19:4-15
- Celio MR** (1986) Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science* 231:995-997
- Chae T**, Kwon YT, Bronson R, Dikkes P, Li E, Tsai LH (1997) Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* 18:29-42
- Chagnac-Amitai Y**, Connors BW (1989) Synchronized excitation and inhibition driven by intrinsically bursting neurons in neocortex. *J Neurophysiol* 62:1149-1162
- Chang BS**, Piao X, Bodell A, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Dobyns WB, Qasrawi B, Winter RM, Innes AM, Voit T, Grant PE, Barkovich AJ, Walsh CA (2003) Bilateral frontoparietal polymicrogyria: Clinical and radiological features in 10 families with linkage to chromosome 16. *Ann Neurol* 53:596-606
- Chassoux F**, Devaux B, Landre E, Turak B, Nataf F, Varlet P, Chodkiewicz JP, Dumas-Duport C (2000) Stereoelectroencephalography in focal cortical dysplasia: a 3D approach to delineating the dysplastic cortex. *Brain* 123:1733-1751
- Chen L**, Wang H, Vicini S, Olsen RW (2000) The gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABAA receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11557-11562

Chen S, Huang X, Zeng XJ, Sieghart W, Tietz EI (1999) Benzodiazepine-mediated regulation of alpha1, alpha2, beta1-3 and gamma2 GABA(A) receptor subunit proteins in the rat brain hippocampus and cortex. *Neuroscience* 93:33-44

Chevassus-au-Louis N, Baraban SC, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (1999a) Cortical malformations and epilepsy: new insights from animal models. *Epilepsia* 40:811-821

Chevassus-au-Louis N, Ben-Ari Y, Vergnes M (1998a) Decreased seizure threshold and more rapid rate of kindling in rats with cortical malformation induced by prenatal treatment with methylazoxymethanol. *Brain Res* 812:252-255

Chevassus-Au-Louis N, Congar P, Represa A, Ben-Ari Y, Gaiarsa JL (1998b) Neuronal migration disorders: heterotopic neocortical neurons in CA1 provide a bridge between the hippocampus and the neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10263-10268

Chevassus-Au-Louis N, Jorquera I, Ben-Ari Y, Represa A (1999b) Abnormal connections in the malformed cortex of rats with prenatal treatment with methylazoxymethanol may support hyperexcitability. *Dev Neurosci* 21:385-392

Chevassus-au-Louis N, Represa A (1999) The right neuron at the wrong place: biology of heterotopic neurons in cortical neuronal migration disorders, with special reference to associated pathologies. *Cell Mol Life Sci* 55:1206-1215

Clark MG, Rosen GD, Tallal P, Fitch RH (2000a) Impaired two-tone processing at rapid rates in male rats with induced microgyria. *Brain Res* 871:94-97

Clark MG, Rosen GD, Tallal P, Fitch RH (2000b) Impaired processing of complex auditory stimuli in rats with induced cerebrocortical microgyria: An animal model of developmental language disabilities. *J Cogn Neurosci* 12:828-839

Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378:75-78

Colacitti C, Sancini G, Franceschetti S, Cattabeni F, Avanzini G, Spreafico R, Di Luca M, Battaglia G (1998) Altered connections between neocortical and heterotopic areas in methylazoxymethanol-treated rat. *Epilepsy Res* 32:49-62

Collins I, Moyes C, Davey WB, Rowley M, Bromidge FA, Quirk K, Atack JR, McKernan RM, Thompson SA, Wafford K, Dawson GR, Pike A, Sohal B, Tsou NN, Ball RG, Castro JL (2002) 3-Heteroaryl-2-pyridones: benzodiazepine site ligands with functional selectivity for alpha 2/alpha 3-subtypes of human GABA(A) receptor-ion channels. *J Med Chem* 45:1887-1900

Corsellis JAN, Bruton CJ (1979) Neuropathologische Aspekte der Temporallappenepilepsie. In: Doose H, Groß-Selbeck G (Hrsg.): *Epilepsie 1978. Epilepsiebedingte Hirnschäden-Psychogene Anfälle-Audiovisuelle Anfallsanalyse*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 58-66

Crestani F, Keist R, Fritschy JM, Benke D, Vogt K, Prut L, Bluthmann H, Mohler H, Rudolph U (2002) Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8980-8985

Crestani F, Low K, Keist R, Mandelli M, Mohler H, Rudolph U (2001) Molecular targets for the myorelaxant action of diazepam. *Mol Pharmacol* 59:442-445

Crino PB, Duhaime AC, Baltuch G, White R (2001) Differential expression of glutamate and GABA-A receptor subunit mRNA in cortical dysplasia. *Neurology* 56:906-913

D'Agostino MD, Bernasconi A, Das S, Bastos A, Valerio RM, Palmini A, Costa Da Costa J, Scheffer IE, Berkovic S, Guerrini R, Dravet C, Ono J, Gigli G, Federico A, Booth F, Bernardi B, Volpi L, Tassinari CA, Guggenheim MA, Ledbetter DH, Gleeson JG, Lopes-Cendes I, Vossler DG, Malaspina E, Franzoni E, Sartori RJ, Mitchell MH, Mercho S, Dubeau F, Andermann F, Dobyns WB, Andermann E (2002) Subcortical band heterotopia (SBH) in males: clinical, imaging and genetic findings in comparison with females. *Brain* 125:2507-2522

D'Arcangelo G, Curran T (1998) Reeler: new tales on an old mutant mouse. *Bioessays* 20:235-244

Defazio RA, Hablitz JJ (1999) Reduction of zolpidem sensitivity in a freeze lesion model of neocortical dysgenesis. *J Neurophysiol* 81:404-407

DeFazio RA, Hablitz JJ (2000) Alterations in NMDA receptors in a rat model of cortical dysplasia. *J Neurophysiol* 83:315-321

DeFelipe J (1999) Chandelier cells and epilepsy. *Brain* 122:1807-1822

des Portes V, Abaoub L, Joannard A, Souville I, Francis F, Pinard JM, Chelly J, Beldjord C, Jouk PS (2002) So-called 'cryptogenic' partial seizures resulting from a subtle cortical dysgenesis due to a doublecortin gene mutation. *Seizure* 11:273-277

des Portes V, Francis F, Pinard JM, Desguerre I, Moutard ML, Snoeck I, Meiners LC, Capron F, Cusmai R, Ricci S, Motte J, Echenne B, Ponsot G, Dulac O, Chelly J, Beldjord C (1998) doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum Mol Genet* 7:1063-1070

Dobyns WB, Berry-Kravis E, Havernick NJ, Holden KR, Viskochil D (1999a) X-linked lissencephaly with absent corpus callosum and ambiguous genitalia. *Am J Med Genet* 86:331-337

Dobyns WB, Truwit CL, Ross ME, Matsumoto N, Pilz DT, Ledbetter DH, Gleeson JG, Walsh CA, Barkovich AJ (1999b) Differences in the gyral pattern distinguish chromosome 17 linked and X-linked lissencephaly. *Neurology* 53:270-277

Dubeau F, Tampieri D, Lee N, Andermann E, Carpenter S, Leblanc R, Olivier A, Radtke R, Villemure JG, Andermann F (1995) Periventricular and subcortical nodular heterotopia. A study of 33 patients. *Brain* 118:1273-1287

Dvorak K, Feit J (1977) Migration of neuroblasts through partial necrosis of the cerebral cortex in newborn rats-contribution to the problems of morphological development and developmental period of cerebral microgyria. Histological and autoradiographical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 38:203-212

- Dvorak K**, Feit J, Jurankova Z (1978) Experimentally induced focal microgyria and status verrucosus deformis in rats--pathogenesis and interrelation. Histological and autoradiographical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 44:121-129
- Eriksson S**, Malmgren K, Rydenhag B, Jonsson L, Uvebrant P, Nordborg C (1999) Surgical treatment of epilepsy--clinical, radiological and histopathological findings in 139 children and adults. *Acta Neurol Scand* 99:8-15
- Eriksson SH**, Rydenhag B, Uvebrant P, Malmgren K, Nordborg C (2002) Widespread microdysgenesis in therapy-resistant epilepsy--a case report on post-mortem findings. *Acta Neuropathol (Berl)* 103:74-77
- Eriksson SH**, Thom M, Heffernan J, Lin WR, Harding BN, Squier MV, Sisodiya SM (2002) Persistent reelin-expressing Cajal-Retzius cells in polymicrogyria. *Brain* 124:1350-1361
- Essrich C**, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B (1998) Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1:563-571
- Falconer D** (1951) Two new mutants, "trembler" und "reeler," with neurologic actions in the house mouse (*Mus musculus*). *J Genetics* 50:192-201
- Feng Y**, Walsh CA (2001) Protein-protein interactions, cytoskeletal regulation and neuronal migration. *Nat Rev Neurosci* 2:408-416
- Ferrer I**, Pineda M, Tallada M, Oliver B, Russi A, Oller L, Noboa R, Zujar MJ, Alcantara S (1992) Abnormal local-circuit neurons in epilepsia partialis continua associated with focal cortical dysplasia. *Acta Neuropathol (Berl)* 83:647-652
- Francione S**, Kahane P, Tassi L, Hoffmann D, Durisotti C, Pasquier B, Munari C (1994) Stereo-EEG of interictal and ictal electrical activity of a histologically proved heterotopic gray matter associated with partial epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 90:284-290
- Frantz GD**, McConnell SK (1996) Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron* 17:55-61
- Frappe I**, Roger M, Gaillard A (1999) Transplants of fetal frontal cortex grafted into the occipital cortex of newborn rats receive a substantial thalamic input from nuclei normally projecting to the frontal cortex. *Neuroscience* 89:409-421
- Fritschy JM**, Mohler H (1995) GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol* 359:154-94
- Fritschy JM**, Paysan J, Enna A, Mohler H (1994) Switch in the expression of rat GABAA-receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *J Neurosci* 14:5302-5324

Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke D (1998) Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 390:194-210

Frotscher M (1997) Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development. *Cell Tissue Res* 290:315-322

Gaillard A, Roger M (2000) Early commitment of embryonic neocortical cells to develop area-specific thalamic connections. *Cereb Cortex* 10:443-453

Galaburda AM (1993a) Neuroanatomic basis of developmental dyslexia. *Neurol Clin* 11:161-173

Galaburda AM (1993b) Neurology of developmental dyslexia. *Curr Opin Neurobiol* 3:237-242

Garbelli R, Munari C, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L, Galli C, Bramerio M, Mai R, Battaglia G, Spreafico R (1999) Taylor's cortical dysplasia: a confocal and ultrastructural immunohistochemical study. *Brain Pathol* 9:445-461

Garnier C, Arnault P, Letang J, Roger M (1996) Development of projections from transplants of embryonic medial or lateral frontal cortex placed in the lateral frontal cortex of newborn hosts. *Neurosci Lett* 213:33-36

Germano IM, Zhang YF, Sperber EF, Moshe SL (1996) Neuronal migration disorders increase susceptibility to hyperthermia-induced seizures in developing rats. *Epilepsia* 37:902-910

Gressens P (1998) Mechanisms of cerebral dysgenesis. *Curr Opin Pediatr* 10:556-560

Gressens P (1999) VIP neuroprotection against excitotoxic lesions of the developing mouse brain. *Ann N Y Acad Sci* 897:109-124

Gressens P (2000) Mechanisms and disturbances of neuronal migration. *Pediatr Res* 48:725-730

Gressens P, Marret S, Evrard P (1996) Developmental spectrum of the excitotoxic cascade induced by ibotenate: a model of hypoxic insults in fetuses and neonates. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22:498-502

Gressens P, Mesples B, Sahir N, Marret S, Sola A (2001) Environmental factors and disturbances of brain development. *Semin Neonatol* 6:185-194

Gressens P, Paindaveine B, Hill JM, Evrard P, Brenneman DE (1998) Vasoactive intestinal peptide shortens both G1 and S phases of neural cell cycle in whole postimplantation cultured mouse embryos. *Eur J Neurosci* 10:1734-1742

- Griebel G**, Perrault G, Simiand J, Cohen C, Granger P, Decobert M, Francon D, Avenet P, Depoortere H, Tan S, Oblin A, Schoemaker H, Evanno Y, Sevrin M, George P, Scatton B (2001) SL651498: an anxiolytic compound with functional selectivity for alpha2- and alpha3-containing gamma-aminobutyric acid(A) (GABA(A)) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 298:753-768
- Guerrini R**, Carrozzo R (2002) Epileptogenic brain malformations: clinical presentation, malformative patterns and indications for genetic testing. *Seizure* 11:532-543
- Gunther U**, Benson J, Benke D, Fritschy JM, Reyes G, Knoflach F, Crestani F, Aguzzi A, Arigoni M, Lang Y, Bluethmann H, Mohler H, Lueschner B (1995) Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeted disruption of the gamma 2 subunit gene of gamma aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7749-7753
- Hablitz JJ**, DeFazio T (1998) Excitability changes in freeze-induced neocortical microgyria. *Epilepsy Res* 32:75-82
- Hablitz JJ**, DeFazio RA (2000) Altered receptor subunit expression in rat neocortical malformations. *Epilepsia* 41 Suppl 6:82-85
- Hack I**, Bancila M, Loulier K, Carroll P, Cremer H (2002) Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci* 5:939-945
- Hagemann G**, Fritschy JM, Witte OW, Redecker C (2001) Differentiation of GABA(A) receptors in subcortical heterotopias: subunit distribution of displaced cortex reflects original commitment. *Neuroreport* 12:3413-3417
- Hagemann G**, Kluska MM, Redecker C, Luhmann HJ, Witte OW (2003) Distribution of glutamate receptor subunits in experimentally induced cortical malformations. *Neuroscience* 117:991-1002
- Hagemann G**, Redecker C, Witte OW (2000a) Intact functional inhibition in the surround of experimentally induced focal cortical dysplasias in rats. *J Neurophysiol* 84:600-603
- Hagemann G**, Redecker C, Witte OW (2000b) Cortical dysgenesis: current classification, MRI diagnosis, and clinical review *Nervenarzt* 71:616-628
- Hamburgh M** (1960) Observations on the neuropathology of "reeler," a neurological mutation in mice. *Experientia* 16:460-461
- Hammers A**, Koeppe MJ, Richardson MP, Labbe C, Brooks DJ, Cunningham VJ, Duncan JS (2001) Central benzodiazepine receptors in malformations of cortical development: A quantitative study. *Brain* 124:1555-1565
- Hanefeld F**, Crome L (1979) Beziehungen zwischen Epilepsie und neuropathologischen Befunden im Kindesalter. In: Doose H, Groß-Selbeck G (Hrsg.): *Epilepsie 1978. Epilepsiebedingte Hirnschäden-Psychogene Anfälle-Audiovisuelle Anfallsanalyse*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 66-77
- Hannan AJ**, Servotte S, Katsnelson A, Sisodiya S, Blakemore C, Squier M, Molnar Z (1999) Characterization of nodular neuronal heterotopia in children. *Brain* 122:219-238

Heintel H (1975) Quellen zur Geschichte der Epilepsie. In: Ackerknecht EH, Buess H (Hrsg.): Hubers Klassiker der Medizin und Naturwissenschaften, Band XIV, Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Wien, 7-32, 95-100

Hilbig A, Babb TL, Najm I, Ying Z, Wyllie E, Bingaman W (1999) Focal cortical dysplasia in children. *Dev Neurosci* 21:271-280

Hill JM, Glazner GW, Lee SJ, Gozes I, Gressens P, Brenneman DE (1999) Vasoactive intestinal peptide regulates embryonic growth through the action of activity-dependent neurotrophic factor. *Ann N Y Acad Sci* 897:92-100

Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA (2001) Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat Genet* 26:93-96

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29:577-580

Innocenti GM, Berbel P (1991) Analysis of an experimental cortical network: I. Architectonics of visual areas 17 and 18 after neonatal injections of ibotenic acid; similarities with human microgyria. *J Neural Transplant Plast* 2:1-28

Ishibashi H, Simos PG, Wheless JW, Baumgartner JE, Kim HL, Castillo EM, Davis RN, Papanicolaou AC (2002) Localization of ictal and interictal bursting epileptogenic activity in focal cortical dysplasia: agreement of magnetoencephalography and electrocorticography. *Neurol Res* 24:525-530

Jacobs KM, Hwang BJ, Prince DA (1999a) Focal epileptogenesis in a rat model of polymicrogyria. *J Neurophysiol* 81:159-173

Jacobs KM, Kharazia VN, Prince DA (1999b) Mechanisms underlying epileptogenesis in cortical malformations. *Epilepsy Res* 36:165-188

Jacobs KM, Mogensen M, Warren E, Prince DA (1999c) Experimental microgyri disrupt the barrel field pattern in rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 9:733-744

Jenner AR, Galaburda AM, Sherman GF (2000) Connectivity of ectopic neurons in the molecular layer of the somatosensory cortex in autoimmune mice. *Cereb Cortex* 10:1005-1013

Kardos J (1999) Recent advances in GABA research. *Neurochem Int* 34:353-358

Kasper BS (2002) Microdysgenesis--relevant finding in refractory epilepsy? A response to S. H. Eriksson et al., *Acta Neuropathologica* (2002) 103:74-77. *Acta Neuropathol (Berl)* 103:307

Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7:476-486

Keshavan MS (1999) Development, disease and degeneration in schizophrenia: a unitary pathophysiological model. *J Psychiatr Res* 33:513-521

Kihara M, Yoshioka H, Hirai K, Hasegawa K, Kizaki Z, Sawada T (2002) Stimulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors inhibits neuronal migration in embryonic cerebral cortex: a tissue culture study. *Brain Res Dev Brain Res* 138:195-198

Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, Omichi K, Suzuki R, Kato-Fukui Y, Kamiirisa K, Matsuo M, Kamijo S, Kasahara M, Yoshioka H, Ogata T, Fukuda T, Kondo I, Kato M, Dobyns WB, Yokoyama M, Morohashi K (2002) Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat Genet* 32:359-369

Kral T, Clusmann H, Blumcke I, Fimmers R, Ostertun B, Kurthen M, Schramm J (2003) Outcome of epilepsy surgery in focal cortical dysplasia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:183-188

Kralic JE, Korpi ER, O'Buckley TK, Homanics GE, Morrow AL (2002) Molecular and pharmacological characterization of GABA(A) receptor alpha1 subunit knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 302:1037-1045

Kuzniecky RI (1995) MRI in cerebral developmental malformations and epilepsy. *Magn Reson Imaging* 13:1137-1145

Lagae L (2000) Cortical malformations: a frequent cause of epilepsy in children. *Eur J Pediatr* 159:555-562

Laurie DJ, Wisden W, Seeburg PH (1992) The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci* 12:4151-4172

Lavoie AM, Tingey JJ, Harrison NL, Pritchett DB, Twyman RE (1997) Activation and deactivation rates of recombinant GABA(A) receptor channels are dependent on alpha-subunit isoform. *Biophys J* 73:2518-2526

Lavoie AM, Twyman RE (1996) Direct evidence for diazepam modulation of GABAA receptor microscopic affinity. *Neuropharmacology* 35:1383-1392

Leblanc R, Robitaille Y, Andermann F, Ptito A (1995) Retained language in dysgenic cortex: case report. *Neurosurgery* 37:992-997

Lee KS, Schottler F, Collins JL, Lanzino G, Couture D, Rao A, Hiramatsu K, Goto Y, Hong SC, Caner H, Yamamoto H, Chen ZF, Bertram E, Berr S, Omary R, Scrabble H, Jackson T, Goble J, Eisenman L (1997) A genetic animal model of human neocortical heterotopia associated with seizures. *J Neurosci* 17:6236-6242

Leventer RJ, Cardoso C, Ledbetter DH, Dobyns WB (2001) LIS1 missense mutations cause milder lissencephaly phenotypes including a child with normal IQ. *Neurology* 57:416-422

Li LM, Dubeau F, Andermann F, Fish DR, Watson C, Cascino GD, Berkovic SF, Moran N, Duncan JS, Olivier A, Leblanc R, Harkness W (1997) Periventricular nodular heterotopia and intractable temporal lobe epilepsy: poor outcome after temporal lobe resection. *Ann Neurol* 41:662-668

- Lombroso CT** (2000) Can early postnatal closed head injury induce cortical dysplasia. *Epilepsia* 41:245-253
- Lorez M**, Benke D, Luscher B, Mohler H, Benson JA (2000) Single-channel properties of neuronal GABAA receptors from mice lacking the $\gamma 2$ subunit. *J Physiol* 527:11-31
- Loup F**, Weinmann O, Yonekawa Y, Aguzzi A, Wieser HG, Fritschy JM (1998) A highly sensitive immunofluorescence procedure for analyzing the subcellular distribution of GABAA receptor subunits in the human brain. *J Histochem Cytochem* 46:1129-1139
- Low K**, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Rulicke T, Bluethmann H, Mohler H, Rudolph U (2000) Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 290:131-134 Erratum in: *Science* 290:936
- Luhmann HJ**, Karpuk N, Qu M, Zilles K (1998a) Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures. II. Intracellular in vitro recordings. *J Neurophysiol* 80:92-102
- Luhmann HJ**, Raabe K (1996) Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: I. Expression of epileptiform activity in an animal model. *Epilepsy Res* 26:67-74
- Luhmann HJ**, Raabe K, Qu M, Zilles K (1998b) Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: extracellular in vitro recordings. *Eur J Neurosci* 10:3085-3094
- Luth HJ**, Blumcke I, Winkelmann E, Celio MR (1993) The calcium-binding protein calretinin is localized in a subset of interneurons in the rat cerebral cortex: a light and electron immunohistochemical study. *J Hirnforsch* 34:93-103
- Maric D**, Maric I, Wen X, Fritschy JM, Sieghart W, Barker JL, Serafini R (1999) GABAA receptor subunit composition and functional properties of Cl⁻ channels with differential sensitivity to zolpidem in embryonic rat hippocampal cells. *J Neurosci* 19:4921-4937
- Marques Dias MJ**, Harmant-van Rijckevorsel G, Landrieu P, Lyon G (1984) Prenatal cytomegalovirus disease and cerebral microgyria: evidence for perfusion failure, not disturbance of histogenesis, as the major cause of fetal cytomegalovirus encephalopathy. *Neuropediatrics* 15:18-24
- Marret S**, Gressens P, Evrard P (1996) Arrest of neuronal migration by excitatory amino acids in hamster developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15463-15468
- Marret S**, Gressens P, Van-Maele-Fabry G, Picard J, Evrard P (1997) Caffeine-induced disturbances of early neurogenesis in whole mouse embryo cultures. *Brain Res* 773:213-216
- Marret S**, Mukendi R, Gadisseux JF, Gressens P, Evrard P (1995) Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:358-370
- Matthes A** (1987) Geleitwort. In: Schneble H: Krankheit der ungezählten Namen. Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Toronto, IX-X

- McBride MC**, Kemper TL (1982) Pathogenesis of four-layered microgyric cortex in man. *Acta Neuropathol (Berl)* 57:93-98
- Mecarelli O**, de Feo MR, Rina MF, Ricci GF (1988) Effects of progabide on bicuculline-induced epileptic seizures in developing rats. *Clin Neuropharmacol* 11:443-453
- Meencke HJ**, Veith G (1992) Migration disturbances in epilepsy. *Epilepsy Res Suppl* 9:31-40
- Mischel PS**, Nguyen LP, Vinters HV (1995) Cerebral cortical dysplasia associated with pediatric epilepsy. Review of neuropathologic features and proposal for a grading system. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:137-153
- Mienville JM** (1999) Cajal-Retzius cell physiology: just in time to bridge the 20th century. *Cereb Cortex* 9:776-782
- Mohler H**, Fritschy JM, Rudolph U (2002) A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 300:2-8
- Mohler H**, Luscher B, Fritschy JM, Benke D, Benson J, Rudolph U (1998) GABA(A)-receptor assembly in vivo: lessons from subunit mutant mice. *Life Sci* 62:1611-1615
- Montenegro MA**, Guerreiro MM, Lopes-Cendes I, Guerreiro CA, Li LM, Cendes F (2002) Association of family history of epilepsy with earlier age at seizure onset in patients with focal cortical dysplasia. *Mayo Clin Proc* 77:1291-1294
- Morioka T**, Nishio S, Sasaki M, Yoshida T, Kuwabara Y, Ohta M, Fukui M (1999) Functional imaging in periventricular nodular heterotopia with the use of FDG-PET and HMPAO-SPECT. *Neurosurg Rev* 22:41-44
- Najm IM**, Ying Z, Babb T, Mohamed A, Hadam J, LaPresto E, Wyllie E, Kotagal P, Bingaman W, Foldvary N, Morris H, Luders HO (2000) Epileptogenicity correlated with increased N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A/B in human focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 41:971-976
- Neumann-Haefelin T**, Staiger JF, Redecker C, Zilles K, Fritschy JM, Mohler H, Witte OW (1998) Immunohistochemical evidence for dysregulation of the GABAergic system ipsilateral to photochemically induced cortical infarcts in rats. *Neuroscience* 87:871-879
- Nishikawa S**, Goto S, Hamasaki T, Yamada K, Ushio Y (2002) Involvement of reelin and cajal-retzius cells in the developmental formation of vertical columnar structures in the cerebral cortex: evidence from the study of mouse presubicular cortex. *Cereb Cortex* 12:1024-1030
- Nusser Z**, Kay LM, Laurent G, Homanics GE, Mody I (2001) Disruption of GABA(A) receptors on GABAergic interneurons leads to increased oscillatory power in the olfactory bulb network. *J Neurophysiol* 86:2823-2833
- Nusser Z**, Sieghart W, Benke D, Fritschy JM, Somogyi P (1996) Differential synaptic localization of two major gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha subunits on hippocampal pyramidal cells *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11939-11944

Nyiri G, Freund TF, Somogyi P (2001) Input-dependent synaptic targeting of alpha(2)-subunit-containing GABA(A) receptors in synapses of hippocampal pyramidal cells of the rat. *Eur J Neurosci* 13:428-442

Owens DF, Kriegstein AR (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3:715-727

Palmini A (2000) Disorders of cortical development. *Curr Opin Neurol* 2:183-192

Palmini A, Andermann F, Olivier A, Tampieri D, Robitaille Y (1991b) Focal neuronal migration disorders and intractable partial epilepsy: results of surgical treatment. *Ann Neurol* 30:750-757

Palmini A, Andermann F, Olivier A, Tampieri D, Robitaille Y, Andermann E, Wright G (1991a) Focal neuronal migration disorders and intractable partial epilepsy: a study of 30 patients. *Ann Neurol* 30:741-749

Palmini A, Gambardella A, Andermann F, Dubeau F, da Costa JC, Olivier A, Tampieri D, Gloor P, Quesney F, Andermann E (1995) Intrinsic epileptogenicity of human dysplastic cortex as suggested by corticography and surgical results. *Ann Neurol* 37:476-487

Palmini A, Gambardella A, Andermann F, Dubeau F, da Costa JC, Olivier A, Tampieri D, Robitaille Y, Paglioli E, Paglioli Neto E (1994) Operative strategies for patients with cortical dysplastic lesions and intractable epilepsy. *Epilepsia* 35 Suppl 6:57-71

Palmini A, Luders HO (2002) Classification issues in malformations caused by abnormalities of cortical development. *Neurosurg Clin N Am* 13:1-16

Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sydney

Paysan J, Kossel A, Bolz J, Fritschy JM (1997) Area-specific regulation of gamma-aminobutyric acid type A receptor subtypes by thalamic afferents in developing rat neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6995-7000

Peiffer AM, Dunleavy CK, Frenkel M, Gabel LA, LoTurco JJ, Rosen GD, Fitch RH (2001) Impaired detection of variable duration embedded tones in ectopic NZB/BINJ mice. *Neuroreport* 12:2875-2879

Penschuck S, Paysan J, Giorgetta O, Fritschy JM (1999) Activity-dependent regulation of GABAA receptors. *Ann N Y Acad Sci* 868:654-666

Pies NJ (1990) *Biographisches und Bibliographisches aus der Geschichte der Epilepsie*. Robert Pfützner GmbH, München, 9-17

Pilz DT, Matsumoto N, Minnerath S, Mills P, Gleeson JG, Allen KM, Walsh CA, Barkovich AJ, Dobyns WB, Ledbetter DH, Ross ME (1998) LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. *Hum Mol Genet* 7:2029-2037

Poolos NP, Das S, Clark GD, Lardizabal D, Noebels JL, Wyllie E, Dobyns WB (2002) Males with epilepsy, complete subcortical band heterotopia, and somatic mosaicism for DCX. *Neurology* 58:1559-1562

Porter BE, Brooks-Kayal A, Golden JA (2002) Disorders of cortical development and epilepsy. *Arch Neurol* 59:361-365

Poulter MO, Barker JL, O'Carroll AM, Lolait SJ, Mahan LC (1992) Differential and transient expression of GABAA receptor alpha-subunit mRNAs in the developing rat CNS. *J Neurosci* 12:2888-2900

Poulter MO, Brown LA, Tynan S, Willick G, William R, McIntyre DC (1999) Differential expression of alpha1, alpha2, alpha3, and alpha5 GABAA receptor subunits in seizure-prone and seizure-resistant rat models of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 19:4654-4661

Prince DA, Jacobs K (1998) Inhibitory function in two models of chronic epileptogenesis. *Epilepsy Res* 32:83-92

Qu M, Buchkremer-Ratzmann I, Schiene K, Schroeter M, Witte OW, Zilles K (1998) Bihemispheric reduction of GABAA receptor binding following focal cortical photothrombotic lesions in the rat brain. *Brain Res* 813:374-80

Que M, Witte OW, Neumann-Haefelin T, Schiene K, Schroeter M, Zilles K (1999) Changes in GABA(A) and GABA(B) receptor binding following cortical photothrombosis: a quantitative receptor autoradiographic study. *Neuroscience* 93:1233-1240

Raymond AA, Fish DR, Sisodiya SM, Alsanjari N, Stevens JM, Shorvon SD (1995) Abnormalities of gyration, heterotopias, tuberous sclerosis, focal cortical dysplasia, microdysgenesis, dysembryoplastic neuroepithelial tumour and dysgenesis of the archicortex in epilepsy. Clinical, EEG and neuroimaging features in 100 adult patients. *Brain* 118:629-660

Redecker C, Hagemann G, Gressens P, Evrard P, Witte OW (2000a) Cortical dysgenesis. Current views on pathogenesis and pathophysiology *Nervenarzt* 71:238-248

Redecker C, Hagemann G, Witte OW, Marret S, Evrard P, Gressens P (1998a) Long-term evolution of excitotoxic cortical dysgenesis induced in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 109:109-113

Redecker C, Luhmann HJ, Hagemann G, Fritschy JM, Witte OW (2000b) Differential downregulation of GABAA receptor subunits in widespread brain regions in the freeze-lesion model of focal cortical malformations. *J Neurosci* 20:5045-5053

Redecker C, Lutzenburg M, Gressens P, Evrard P, Witte OW, Hagemann G (1998b) Excitability changes and glucose metabolism in experimentally induced focal cortical dysplasias. *Cereb Cortex* 8:623-634

Redecker C, Wang W, Fritschy JM, Witte OW (2002) Widespread and long-lasting alterations in GABA(A)-receptor subtypes after focal cortical infarcts in rats: mediation by NMDA dependent processes. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1463-1475

Richardson MP, Friston KJ, Sisodiya SM, Koepp MJ, Ashburner J, Free SL, Brooks DJ, Duncan JS (1997) Cortical grey matter and benzodiazepine receptors in malformations of cortical development. A voxel-based comparison of structural and functional imaging data. *Brain* 120:1961-1973

Richardson MP, Koepp MJ, Brooks DJ, Coull JT, Grasby P, Fish DR, Duncan JS (1998) Cerebral activation in malformations of cortical development. *Brain* 121:1295-1304

Richardson MP, Koepp MJ, Brooks DJ, Fish DR, Duncan JS (1996) Benzodiazepine receptors in focal epilepsy with cortical dysgenesis: an 11C-flumazenil PET study. *Ann Neurol* 40:188-198

Rio C, Rieff HI, Qi P, Khurana TS, Corfas G (1997) Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 19:39-50 Erratum in: *Neuron* 19:1349

Roper SN (1998) In utero irradiation of rats as a model of human cerebrocortical dysgenesis: a review. *Epilepsy Res* 32:63-74

Roper SN, Eisenschenk S, King MA (1999) Reduced density of parvalbumin- and calbindin D28-immunoreactive neurons in experimental cortical dysplasia. *Epilepsy Res* 37:63-71

Roper SN, Yachnis AT (2002) Cortical dysgenesis and epilepsy. *Neuroscientist* 8:356-371

Rosen GD, Burstein D, Galaburda AM (2000) Changes in efferent and afferent connectivity in rats with induced cerebrocortical microgyria. *J Comp Neurol* 418:423-440

Rosen GD, Jacobs KM, Prince DA (1998) Effects of neonatal freeze lesions on expression of parvalbumin in rat neocortex. *Cereb Cortex* 8:753-761

Rosen GD, Sherman GF, Galaburda AM (1996) Birthdates of neurons in induced microgyria. *Brain Res* 727:71-78

Rosen GD, Sherman GF, Richman JM, Stone LV, Galaburda AM (1992) Induction of molecular layer ectopias by puncture wounds in newborn rats and mice. *Brain Res Dev Brain Res* 67:285-291

Rosen GD, Sigel EA, Sherman GF, Galaburda AM (1995) The neuroprotective effects of MK-801 on the induction of microgyria by freezing injury to the newborn rat neocortex. *Neuroscience* 69:107-114

Rosen GD, Waters NS, Galaburda AM, Denenberg VH (1995) Behavioral consequences of neonatal injury of the neocortex. *Brain Res* 681:177-189

Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Mohler H (1999) Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* 401:796-800 Erratum in: *Nature* 404:629

Sancini G, Franceschetti S, Battaglia G, Colacitti C, Di Luca M, Spreafico R, Avanzini G (1998) Dysplastic neocortex and subcortical heterotopias in methylazoxymethanol-treated rats: an intracellular study of identified pyramidal neurones. *Neurosci Lett* 246:181-185

Sancini G, Franceschetti S, Lavazza T, Panzica F, Cipelletti B, Frassoni C, Spreafico R, Acampora D, Avanzini G (2001) Potentially epileptogenic dysfunction of cortical NMDA- and GABA-mediated neurotransmission in Otx1-/- mice. *J Neurosci* 14:1065-1074

Schiene K, Bruehl C, Zilles K, Qu M, Hagemann G, Kraemer M, Witte OW (1996) Neuronal hyperexcitability and reduction of GABAA-receptor expression in the surround of cerebral photothrombosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:906-914

Schneble H (1987) Krankheit der ungezählten Namen. Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Toronto, 1-9, 54-57, 99-113, 124-136, 152-158

Schneble H (1990) Vorwort. In: Biographisches und Bibliographisches aus der Geschichte der Epilepsie. Robert Pfützner GmbH, München, 7-8

Schwarz P, Stichel CC, Luhmann HJ (2000) Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: loss or preservation of inhibitory interneurons? *Epilepsia* 41:781-787

Schwartzkroin PA (1997) Origins of the epileptic state. *Epilepsia* 38:853-858

Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, Cavalcanti D, Baulac M (1998) Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 51:1256-1262

Serafini R, Maric D, Maric I, Ma W, Fritschy JM, Zhang L, Barker JL (1998) Dominant GABA(A) receptor/Cl⁻ channel kinetics correlate with the relative expressions of alpha2, alpha3, alpha5 and beta3 subunits in embryonic rat neurones. *Eur J Neurosci* 10:334-349

Sheen VL, Dixon PH, Fox JW, Hong SE, Kinton L, Sisodiya SM, Duncan JS, Dubeau F, Scheffer IE, Schachter SC, Wilner A, Henchy R, Crino P, Kamuro K, DiMario F, Berg M, Kuzniecky R, Cole AJ, Bromfield E, Biber M, Schomer D, Wheless J, Silver K, Mochida GH, Berkovic SF, Andermann F, Andermann E, Dobyns WB, Wood NW, Walsh CA (2001) Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum Mol Genet* 10:1775-1783

Sidman RL, Green MC, Appel SH (1965) Catalog of the neurological mutants of the mouse. Boston: Harvard University Press

Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Hoyer H, Adamiker D (1999) Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem Int* 34:379-385

Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS (1984) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 226:850-852

Sisodiya SM (2000) Surgery for malformations of cortical development causing epilepsy. *Brain*. 123:1075-1091

Sisodiya SM, Thom M, Lin WR, Bajaj NP, Cross JH, Harding BN (2002) Abnormal expression of cdk5 in focal cortical dysplasia in humans. *Neurosci Lett* 328:217-220

- Smith AJ**, Alder L, Silk J, Adkins C, Fletcher AE, Scales T, Kerby J, Marshall G, Wafford KA, McKernan RM, Atack JR (2001) Effect of alpha subunit on allosteric modulation of ion channel function in stably expressed human recombinant gamma-aminobutyric acid(A) receptors determined using (36)Cl ion flux. *Mol Pharmacol* 59:1108-1118
- Smyth MD**, Barbaro NM, Baraban SC (2002) Effects of antiepileptic drugs on induced epileptiform activity in a rat model of dysplasia. *Epilepsy Res* 50:251-264
- Spalice A**, Taddeucci G, Perla FM, Pascali MP, Iannetti P (2002) Periventricular nodular heterotopia: report of a pediatric series. *J Child Neurol* 17:300-304
- Spreafico R**, Battaglia G, Arcelli P, Andermann F, Dubeau F, Palmieri A, Olivier A, Villemure JG, Tampieri D, Avanzini G, Avoli M (1998a) Cortical dysplasia: an immunocytochemical study of three patients. *Neurology* 50:27-36
- Spreafico R**, Pasquier B, Minotti L, Garbelli R, Kahane P, Grand S, Benabid AL, Tassi L, Avanzini G, Battaglia G, Munari C (1998b) Immunocytochemical investigation on dysplastic human tissue from epileptic patients. *Epilepsy Res* 32:34-48
- Spreafico R**, Tassi L, Colombo N, Brammerio M, Galli C, Garbelli R, Ferrario A, Lo Russo G, Munari C (2000) Inhibitory circuits in human dysplastic tissue. *Epilepsia* 41 Suppl 6:168-173
- Super H**, Perez Sust P, Soriano E (1997) Survival of Cajal-Retzius cells after cortical lesions in newborn mice: a possible role for Cajal-Retzius cells in brain repair. *Brain Res Dev Brain Res* 98:9-14
- Sur C**, Wafford KA, Reynolds DS, Hadingham KL, Bromidge F, Macaulay A, Collinson N, O'Meara G, Howell O, Newman R, Myers J, Atack JR, Dawson GR, McKernan RM, Whiting PJ, Rosahl TW (2001) Loss of the major GABA(A) receptor subtype in the brain is not lethal in mice. *J Neurosci* 21:3409-3418
- Tamas G**, Somogyi P, Buhl EH (1998) Differentially interconnected networks of GABAergic interneurons in the visual cortex of the cat. *J Neurosci* 18:4255-4270
- Tassi L**, Colombo N, Garbelli R, Francione S, Lo Russo G, Mai R, Cardinale F, Cossu M, Ferrario A, Galli C, Brammerio M, Citterio A, Spreafico R (2002) Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. *Brain* 125:1719-1732
- Taylor DC**, Falconer MA, Bruton CJ, Corsellis JA (1971) Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 34:369-387
- Tretter V**, Ehya N, Fuchs K, Sieghart W (1997) Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype. *J Neurosci* 17:2728-2737
- van Den Pol AN**, Mocarski E, Saederup N, Vieira J, Meier TJ (1999) Cytomegalovirus cell tropism, replication, and gene transfer in brain. *J Neurosci* 19:10948-10965
- Verdoorn TA** (1994) Formation of heteromeric gamma-aminobutyric acid type A receptors containing two different alpha subunits. *Mol Pharmacol* 45:475-480

- Vicini S**, Ferguson C, Prybylowski K, Kralic J, Morrow AL, Homanics GE (2001) GABA(A) receptor alpha1 subunit deletion prevents developmental changes of inhibitory synaptic currents in cerebellar neurons. *J Neurosci* 21:3009-3016
- Villard L**, Nguyen K, Cardoso C, Martin CL, Weiss AM, Sifry-Platt M, Grix AW, Graham JM Jr, Winter RM, Leventer RJ, Dobyns WB (2002) A locus for bilateral perisylvian polymicrogyria maps to Xq28. *Am J Hum Genet* 70:1003-1008
- Volk DW**, Pierri JN, Fritschy JM, Auh S, Sampson AR, Lewis DA (2002) Reciprocal alterations in pre- and postsynaptic inhibitory markers at chandelier cell inputs to pyramidal neurons in schizophrenia. *Cereb Cortex* 12:1063-1070
- Walsh CA** (2000) Genetics of neuronal migration in the cerebral cortex. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 6:34-40
- Whiting PJ** (1999) The GABA-A receptor gene family: new targets for therapeutic intervention. *Neurochem Int* 34:387-390
- Whiting PJ**, Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, Le Bourdelles B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsinghji DJ, Thompson SA, Wafford KA (1999) Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Ann N Y Acad Sci* 868:645-653
- Witte OW**, Buchkremer-Ratzmann I, Schiene K, Neumann-Haefelin T, Hagemann G, Kraemer M, Zilles K, Freund HJ (1997) Lesion-induced network plasticity in remote brain areas. *Trends Neurosci* 20:348-349
- Wittner L**, Magloczky Z, Borhegyi Z, Halasz P, Toth S, Eross L, Szabo Z, Freund TF (2001) Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 108:587-600
- Yu S**, He X, Ma C, McKernan R, Cook JM (1999) Studies in search of alpha2 selective ligands for GABAA/BzR receptor subtypes. Part 1. Evidence for the conservation of pharmacophoric descriptors for DS subtypes. *Med Chem Res* 9:186-202
- Zhu WJ**, Roper SN (2000) Reduced inhibition in an animal model of cortical dysplasia. *J Neurosci* 20:8925-8931
- Zilles K** (1985) *The Cortex of the Rat: A Stereotaxic Atlas*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Zilles K**, Qu M, Schleicher A, Luhmann HJ (1998) Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: quantitative receptor autoradiography of ionotropic glutamate, GABA(A) and GABA(B) receptors. *Eur J Neurosci* 10:3095-3106

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Clasen
Vorname:	Stephan
Geburtsdatum/-ort:	20.01.1975, Krefeld
Familienstand:	ledig
Anschrift:	Pappelweg 8 72076 Tübingen
Telefon:	0 70 71 – 650 953
E-Mail:	stephan.clasen@med.uni-tuebingen.de

Schulbildung:

1981 – 1985	Grundschule Buscherholzweg in Krefeld Traar
1985 – 1994	Gymnasium am Stadtpark in Krefeld
	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

1994 – 1995	im Sanitätsdienst der Bundeswehr in Würzburg und Köln
-------------	---

Hochschulbildung:

10/1995	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
09/1997	Ärztliche Vorprüfung
08/1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4/2001 – 3/2002	Praktisches Jahr in: Zürich, Krefeld, Kapstadt
05/2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

berufl. Tätigkeit:

03/2003 – 8/2004	Arzt im Praktikum in der Radiologischen Klinik Abteilung Radiologische Diagnostik des Universitätsklinikums Tübingen
seit 9/2004	Assistenzarzt in der Radiologischen Klinik Abteilung Radiologische Diagnostik des Universitätsklinikums Tübingen

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Otto W. Witte
Direktor der Klinik und Poliklinik für Neurologie
der Friedrich-Schiller-Universität Jena,
danke ich für die Überlassung des Themas,
die stets hilfreichen Anregungen und das
angenehme Arbeitsklima in seinem Labor

Herrn PD Dr. med. Georg Hagemann
Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Neurologie
der Friedrich-Schiller-Universität Jena,
danke ich für zahlreiche wertvolle Diskussionen
und die stetige Unterstützung

Herrn Prof. Dr. med. Hans-Peter Hartung
Direktor der Neurologischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
danke ich für die Möglichkeit zur Dissertation
in seiner Klinik

Mein Dank gilt außerdem:
Dr. med. Christoph Redecker
Kalyani Bondre
Dr. rer. nat. Michael Lutzenburg
PD Dr. med. Tobias Neumann-Haefelin
Dr. rer. nat. Claus Brühl
Sabine Hamm
Daniela Steinhoff
Dipl.-Kfm. Bernd Krudewig
für zahlreiche Diskussionen und Hilfen bei
den vielen kleinen und großen Problemen
während der Arbeit

Besonders danken möchte ich meinen Eltern
Helga und Prof. Dr.-Ing. Peter Clasen,
die mir mein Studium ermöglicht haben und
mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen

Zusammenfassung

Kortikale Dysgenesien umfassen eine heterogene Gruppe von Defekten der Hirnentwicklung, die durch verbesserte bildgebende Verfahren immer häufiger im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern diagnostiziert werden. So lassen sich kortikale Dysgenesien als Ursache von mentaler Retardierung, neuropsychologischen Defiziten, psychiatrischen Erkrankungen und zerebralen Anfallsleiden nachweisen. Die hierdurch bedingten Epilepsien erweisen sich dabei häufig gegenüber der medikamentösen und operativen Therapie als refraktär, was die klinische Relevanz kortikaler Dysgenesien unterstreicht. Die Erforschung der zugrundeliegenden Pathogenese und Pathophysiologie sowie die Entwicklung suffizienter Therapien stellen medizinische Herausforderungen dar.

Die durch fokale kortikale Dysgenesien induzierten funktionellen Auswirkungen die, zu einer assoziierten Hyperexzitabilität und zu einem reduzierten Ansprechen auf konventionelle Antiepileptika führen, sind weitestgehend ungeklärt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Beteiligung einer GABA_A Rezeptor-Dysregulation an der Pathogenese der Hyperexzitabilität bei kortikalen Dysgenesien untersucht.

Die Verteilung von GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ im Bereich tierexperimentell induzierter kortikaler Dysgenesien wurde durch Immunhistochemie mit Untereinheiten-spezifischen Antikörpern visualisiert. Als Tiermodell wurde die intrakortikale Injektion von Ibotensäure am Tag der Geburt von Wistar-Ratten gewählt. Ibotensäure-Injektionen induzieren kortikale Dysgenesien in Form von fokalen kortikalen Dysplasien und subkortikalen Heterotopien. Eine differenzierte Auswertung erfolgte mittels Bestimmung von optischen Dichtewerten im Bereich der fokalen kortikalen Dysplasien und der subkortikalen Heterotopien sowie in dem jeweils angrenzenden, morphologisch unveränderten Neokortex.

In der Umgebung Ibotensäure induzierter fokaler kortikaler Dysgenesien trat eine weitreichende Dysregulation der GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Verteilung auf. Die betroffene Hemisphäre zeigte eine Herunter-Regulation wichtiger an der GABA_A Rezeptoren-Komposition beteiligter Untereinheiten gegenüber der kontralateralen Hemisphäre und eine Verschiebung in der Relation der GABA_A Rezeptoruntereinheiten untereinander. Der durch fokale kortikale Dysplasie veränderte Neokortex sowie die angrenzenden neokortikalen Areale waren durch eine signifikante Reduktion für die GABA_A Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ gekennzeichnet. Die GABA_A Rezeptoruntereinheit $\alpha 2$ zeigte keine signifikanten Unterschiede zur Gegenseite und war nicht von einer Herunter-Regulation betroffen. In der Umgebung subkortikaler Heterotopien kam es zu einer konsistenten Reduktion der untersuchten GABA_A Rezeptoruntereinheiten, welche jedoch nur für die Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ ein signifikantes Niveau erreichte. Die Ausdehnung einer im Ibotensäure-Tiermodell nachgewiesenen Hyperexzitabilität betrifft wie die GABA_A Rezeptor-Dysregulation weite Bereiche des Kortex in der Umgebung kortikaler Dysgenesien und läßt auf eine Beteiligung der GABA_A Rezeptor-Dysregulation an den zugrundeliegenden Mechanismen schließen.

Ektopien in der Molekularschicht und subkortikale Heterotopien besitzen eine GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung entsprechend ihrer physiologischen Zielposition in den Kortexschichten II – IV. Dabei ist die GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Ausstattung von Neuronen subkortikaler Heterotopien dahingehend modifiziert, daß sie vergleichbar zu unreifen Neuronen einen erhöhten Anteil der Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ aufweisen. Die Persistenz eines unreifen Entwicklungszustandes scheint ein Charakteristikum kortikaler Dysgenesien zu sein.

In welcher Weise die beobachtete GABA_A Rezeptoruntereinheiten-Dysregulation kausal zu der mit kortikalen Dysgenesien assoziierten Epileptogenität beiträgt und für die häufig auftretende Therapieresistenz gegenüber den konventionellen Antiepileptika verantwortlich ist bedarf weiterer Forschung.

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Otto W. Witte