

Neurologische Klinik und Poliklinik der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Hemmer)

**Expression des GABA_A-Rezeptors in *ex vivo* Präparaten von Patienten mit
extratemporaler Epilepsie bei fokaler kortikaler Dysplasie**

Nicole Clara (geb.Kiemer)

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

1. Prüfer: Priv.-Doz. Dr. A. Berthele

2. Prüfer: Univ.-Prof. Dr.Dr. Th. R. Tölle

Die Dissertation wurde am 14.05.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 18.03.2009 angenommen.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. GABA_A-Rezeptoren	3
1.1.1. Struktur.....	3
1.1.2. Funktionsmechanismen	4
1.1.3. Erkrankungen des Nervensystems.....	5
1.1.4. Epilepsie	6
1.1.5. Pharmakologie.....	7
1.2. GAD	10
1.3. Fokale Dysplasien	11
1.3.1. PET-Befunde bei kortikaler Dysplasie	14
2. Aufgabenstellung	17
3. Material und Methoden	18
3.1. Gewinnung und Präparation des Untersuchungsmaterials	18
3.2. In situ Hybridisierung	19
3.2.1. Markierung der Oligonukleotide	19
3.2.2. Ablauf der in situ Hybridisierung.....	20
3.2.3. Autoradiographische Nachweismethoden	21
3.3. Immunhistochemie	23
4. Ergebnisse	24
4.1. Immunhistochemische Evaluation des Gewebes	24
4.2. Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten mRNA	25
4.2.1. Film-Autoradiographien der Expression von GABA _A -Rezeptor-Untereinheiten mRNA im dysplastischen Gewebe.....	25
4.2.2. Expression der GABA _A -Rezeptor-Untereinheiten mRNA in Pyramidenzellen	29
4.2.3. Expression der GABA _A -Rezeptor-Untereinheiten mRNA in Interneuronen.....	36
4.3. Expression der GAD mRNA	46
4.3.1. Film-Autoradiographie der Expression von GAD67 mRNA im dysplastischen Gewebe.....	46
4.3.2. Expression der GAD67 mRNA in Pyramidenzellen	47
4.3.3. Expression der GAD67 mRNA in Interneuronen.....	47
5. Diskussion	50
5.1. Immunhistochemischer Nachweis von MAP2 in der fokalen kortikalen Dysplasie	50
5.2. GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten	50
5.3. GAD	54
5.4. Gabaerge Inhibition bei fokaler kortikaler Dysplasie	56
5.5. Glutamaterge Exzitation bei fokaler kortikaler Dysplasie	58
5.6. Kritische Würdigung und Arbeitsmodell	59
5.7. Ausblick	60
6. Zusammenfassung	61
7. Anhang	63
7.1. Versuchsprotokolle	63
7.2. Literaturverzeichnis	69

Verwendete Abkürzungen:

A	Adenosin
ATP	Adenosin-Triphosphat
AMP	Adenosin-Monophosphat
bp	Basenpaare
C	Cytidin
¹⁴ C	Kohlenstoff-14
°C	Grad Celsius
cAMP	Cyclo-Adenosin-Monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidin-Triphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
DNA	Desoxy-Nukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleinsäure-Triphosphat-Gemisch
dT	Desoxy-Thymidin
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin-Triphosphat
FCD	Fokale cortikale Dysplasie
G	Guanosin
g	Gramm bzw. Gravitationskraft
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
GDP	Guanosin-Diphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanosin-Triphosphat
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
ISH	in situ Hybridisierung
kDa	Kilodalton
L.	Lamina
l	Liter
M	molar
MG	Molekulargewicht
mGluR	metabotrope Glutamat Rezeptoren
min.	Minute(n)
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PBS	phosphate buffered saline
PLP	Pyridoxalphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
³⁵ S	Schwefel-35
sek.	Sekunde(n)
SSC	standard saline citrate
T	Thymidin
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TLE	Temporallappen-Epilepsie

1. Einleitung

Neurotransmitter sind biochemische Substanzen, die Informationen an den Synapsen von einer Nervenzelle zu einer anderen Nervenzelle weitergeben. Die wichtigsten Transmitter sind Acetylcholin, die Monoamine, Glutamat, Glycin und die Aminosäure γ -Aminobuttersäure (GABA). Die regulierte Freisetzung dieser Botenstoffe aktiviert bestimmte Rezeptoren in nachgeschalteten Nervenzellen. Diese Aktivierung der Rezeptoren führt dazu, dass die Zielzellen entweder angeregt oder gehemmt werden. Der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem (ZNS) ist GABA. Sie wurde vor über fünfzig Jahren erstmals im Gehirn von Säugetieren entdeckt (Awapara et al. 1950, Roberts and Frankel 1950). In den folgenden Jahren zeigten unterschiedliche Untersuchungen an Nerven- und Muskelzellen von Wirbeltieren und Wirbellosen, dass GABA eine inhibitorische Wirkung entfaltet (Bazemore et al. 1957, Kuffler und Edwards 1958, Kuffler 1960). Schließlich konnte sie 1971 an Nervenendigungen im cerebralen Cortex von Säugetieren nachgewiesen werden (Bloom und Iversen 1971).

GABA wird in inhibitorischen Neuronen durch das Enzym GAD aus Glutamat synthetisiert, durch den Vesikulären-Neurotransmitter-Transporter (VGAT) in Vesikel überführt und gespeichert (Fon und Edwards 2001). Die Freisetzung erfolgt Calcium-abhängig an terminalen Nervenendigungen. Ihre Wirkung kann an metabotropen oder ionotropen Rezeptoren, die prä- oder postsynaptisch lokalisiert sind, übertragen werden. Durch Wiederaufnahme mittels membranständiger GABA-Transporter (GAT) in Nervenendigungen oder in die umgebenden Gliazellen wird die Signalübertragung des Neurotransmitters beendet (Cherubini und Conti 2001). Anschließend wird GABA durch die GABA-Transaminase (GABA-T) in Glutamat umgesetzt. In Gliazellen kann das Glutamat durch das Enzym Glutamin-Synthetase zu Glutamin metabolisiert werden. Dies wird von Neuronen mit Hilfe von Aminosäure-Transportern aufgenommen und kann wieder zu GABA umgesetzt werden (Lüddens und Korpi 1995).

Im Zentralnervensystem sind bislang drei verschiedene GABA-Rezeptorsysteme zu unterscheiden (siehe Abb. 1.1). GABA_A-Rezeptoren gehören, wie die GABA_C-Rezeptoren, zu der Familie der ligandenaktivierten Ionenkanäle, ebenso wie die ionotropen Glutamatrezeptoren, nikotinischen Acetylcholinrezeptoren, die 5-HT₃-Rezeptoren und die Glycin-Rezeptoren. Binden Transmittermoleküle an die GABA_A- oder GABA_C-Rezeptoren, öffnet sich die Kanalpore durch eine Konformationsänderung und ermöglicht so den Ein- bzw. Ausstrom von Chloridionen, aber auch in geringerem Maße anderer Ionen wie Bikarbonat (HCO₃⁻), entsprechend ihrem elektrochemischen Gradienten zwischen Extra- und Intrazellulärraum. Dieser Ionenstrom führt zu einer Hyper- bzw. Hypopolarisation der postsynaptischen Membran, folglich zur Hemmung oder Förderung eines postsynaptischen Aktionspotentials (Owens und Kriegstein 2002).

Wie bereits erwähnt existiert neben GABA_A-Rezeptoren ein weiterer Rezeptor, der aus einem Chloridionenkanal besteht, der GABA_C-Rezeptor. Er ist aus ρ -Untereinheiten zusammengesetzt und haupt-

sächlich in der Retina aber auch im Cortex, Hippocampus und im Mesenzephalon nachgewiesen worden (Enz und Cutting 1998 und 1999). Um einen funktionellen Rezeptor bilden zu können, scheint sowohl die Untereinheit $\rho 1$ als auch $\rho 2$ eine notwendige Voraussetzung zu sein (Boue-Grabot et al. 1998). GABA_C-Rezeptoren sind insensitive gegenüber dem GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Bicullin, Medikamenten wie Benzodiazepinen und Barbituraten, aber auch insensitive gegenüber dem GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen (Bormann und Feigenspan 1995).

Zudem wurde eine gabaerge Reaktion im Gehirn nachgewiesen, die Bicullin insensitive, Chlorid unabhängig abläuft. Sie wird über einen metabotropen Rezeptor vermittelt, der GABA_B-Rezeptor genannt wurde (Hill und Bowery 1981). Diese Rezeptoren sind weit verbreitet im ZNS exprimiert und sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert (Berthele et al. 2001). Die präsynaptische Hemmung erfolgt über die Reduktion der Kalzium-Leitfähigkeit und darausfolgender verminderter Neurotransmitterausschüttung, wohingegen postsynaptische GABA_B-Rezeptoren die Neurone durch Aktivierung von Kaliumströmen, welche dem späten inhibitorischen postsynaptischen Potential zugrunde liegen, hyperpolarisieren (Bormann 1988). Zusätzlich können GABA_B-Rezeptoren auch über eine Hemmung der Adenylatcyclase und dadurch bedingter Reduktion der Synthese von cAMP wirken (Wojcik und Neff 1984).

Der erste GABA_B-Rezeptor wurde 1997 kloniert (Kaupmann et al. 1997). Funktionelle Rezeptoren werden durch Heterodimerisierung von GABA_{B1}- und GABA_{B2}-Rezeptoren gebildet (Jones et al. 1998, Kaupmann et al. 1998, Kuner et al. 1999, White et al. 1998). Beide Untereinheiten gehören zur Familie der 7-transmembranären G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die strukturelle Ähnlichkeit mit den metabotropen Glutamat-Rezeptoren aufweisen. Es wurden zudem mehrere Splice-Varianten von GABA_{B1}-Rezeptoren identifiziert (Billinton et al. 2001). Mittels Immunopräzipitations-Versuchen wurde darauf geschlossen, dass GABA_{B1} und GABA_{B2} nur in Form von Heterodimeren funktionelle GABA_B-Rezeptoren bilden können (Billinton et al. 2001).

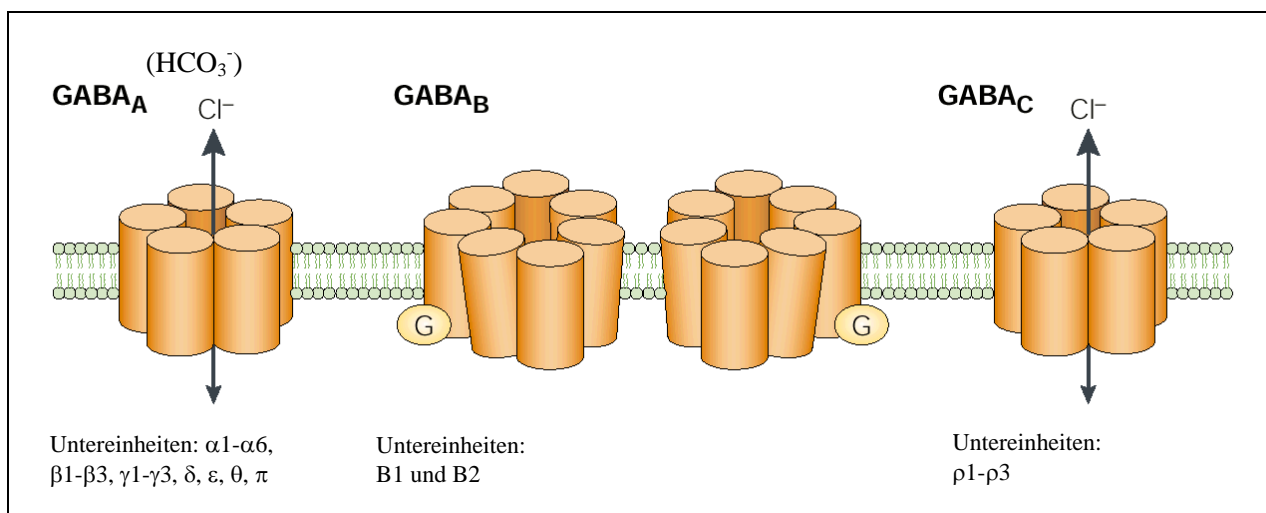


Abb. 1.1: Die verschiedenen GABA-Rezeptoren mit ihren Untereinheiten. GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren bilden Chloridkanäle. Die metabotropen GABA_B-Rezeptoren aktivieren G-Proteine (modifiziert nach Owens und Kriegstein 2002).

1.1. GABA_A-Rezeptoren

1.1.1. Struktur

Der GABA_A-Rezeptor ist ein Heteromer aus fünf Polypeptid-Untereinheiten, die um eine zentrale Chloridionenpore angeordnet sind. Jede dieser Untereinheiten weist einen längeren extrazellulären N-Terminus, vier transmembranäre Domänen mit einer intrazellulären Schleife zwischen der ersten und zweiten sowie der dritten und vierten Domäne und ein kurzes C-terminales extrazelluläres Ende auf. Gebildet wird die Ionenpore von den zweiten transmembranären Domänen der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten (Möhler et al. 1997).

Der Rezeptor wird bei Säugern aus 19 verschiedenen Untereinheiten in den unterschiedlichsten Variationen gebildet ($\alpha 1\text{-}\alpha 6$, $\beta 1\text{-}\beta 3$, $\gamma 1\text{-}\gamma 3$, $\rho 1\text{-}\rho 3$, δ , ϵ , θ , π). Zusätzlich wurden Splicevarianten von $\beta 2$ und $\gamma 2$ entdeckt, die auch funktionell zu unterschiedlichen Rezeptoren führen. So bestimmt die längere Form der $\gamma 2$ -Untereinheit die Ethanol-Sensitivität des GABA_A-Rezeptors (Wafford et al. 1991). Der Großteil der Rezeptoren ist aus α -, β -, und γ -Untereinheiten zusammengesetzt (Barnard et al. 1998). Die am weitesten verbreitete Stöchiometrie besteht aus zwei α -, zwei β -, und einer γ -Untereinheit (Baumann et al. 2001, Farrar et al. 1999). Dabei ist die Kombination $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ am häufigsten nachzuweisen, gefolgt von $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ und $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ (Fritschy und Brünig 2003). Diese Rezeptoren sind sensitiv gegenüber Diazepam. Die Benzodiazepin-Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor liegt zwischen einer α -Untereinheit ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ oder $\alpha 5$) und der Untereinheit $\gamma 2$ (Möhler et al. 2001). Rezeptoren, die die Untereinheiten $\alpha 4\text{-}\alpha 6$, $\beta 1$ -, $\gamma 1$ -, $\gamma 3$ -, δ -, π -, und θ - Untereinheiten enthalten, werden in geringerem Maße gebildet (Fritschy und Brünig 2003).

Die Verteilung der hauptsächlich im Gehirn vorkommenden Untereinheiten wurde an Ratten untersucht. Dabei zeigte sich, dass die $\alpha 1$ -Untereinheit vor allem im Cerebellum nachzuweisen ist, im Hippocampus jedoch nur in geringem Maße ausgebildet wird. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass die Untereinheiten $\alpha 2$ - $\alpha 5$ vor allem im Hippocampus zu finden sind, hingegen im Cerebellum praktisch nicht nachzuweisen sind. Der cerebrale Cortex weist eine mittelgradige Expression von $\alpha 1$ - $\alpha 4$ -Untereinheiten und nur eine geringe Expression von $\alpha 5$ auf. Die $\alpha 6$ -Untereinheit wurde ausschließlich in den Körnerzellen des Kleinhirns nachgewiesen. Die Zahl der $\beta 1$ - und $\beta 3$ -Untereinheiten nimmt vom Hippocampus über den Cortex zum Cerebellum ab. Hingegen zeigt sich für die $\beta 2$ -Untereinheit eine abnehmende Häufigkeit vom Cerebellum über den Cortex und den Hippocampus. Bei den γ -Untereinheiten zeigt sich, dass $\gamma 1$ vor allem in Amygdala und Septum exprimiert wird. Die Untereinheit $\gamma 2$ ist in fast allen Regionen des Gehirns in hoher Zahl nachzuweisen. Hingegen wurde $\gamma 3$ hauptsächlich im Cortex und den basalen Kernen gefunden (Wisden et al. 1992). Bei den $\gamma 2$ -Splicevarianten zeigte sich ebenfalls ein Unterschied in der Verteilung. So ist die $\gamma 2S$ -Untereinheit im Vergleich zur $\gamma 2L$ -Untereinheit in größerer Zahl im Hippocampus und cerebralen Cortex nachzuweisen. Im Gegensatz dazu zeigt sich, dass im Colliculus inferior, in der Medulla und im Cerebellum mehr $\gamma 2L$ - als $\gamma 2S$ -Untereinheiten nachzuweisen sind (Gutierrez et al. 1994).

Die Zusammensetzung des $GABA_A$ -Rezeptors bestimmt auch das Bindungsverhalten für verschiedene Pharmaka, wie Benzodiazepine, Barbiturate und Anästhetika. So werden etwa Diazepam-sensitive Rezeptoren aus einer $\gamma 2$ -, einer β - und einer $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -, oder $\alpha 5$ -Untereinheit gebildet (Sieghart 1995). Rezeptoren, die die Untereinheiten $\alpha 4$ und $\alpha 6$ enthalten, sind insensitive gegenüber Diazepam (Benson et al. 1998, Wingrove et al. 2002). Die Benzodiazepin-Bindungsstelle ist zwischen den α -Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$) und der $\gamma 2$ -Untereinheit lokalisiert (Wong et al. 1992, Zezula et al. 1996).

1.1.2. Funktionsmechanismen

$GABA_A$ -Rezeptoren werden direkt durch GABA aktiviert. Die schematische Darstellung der Synthese und des Transportes der GABA an den Synapsen wird in Abbildung 1.2 gezeigt. Die verschiedenen Subtypen der Rezeptoren besitzen zwei Bindungsstellen für GABA, die sich zwischen den α - und β -Untereinheiten befinden. Wenn diese Bindungsstellen durch den Transmitter besetzt werden, folgt eine Konformationsänderung des Rezeptors und der Ionenkanal wird geöffnet. Im Inneren des Kanals befinden sich an exponierter Stelle positiv geladene Aminosäurereste, die als Filter dienen und nur die einfach negativ geladenen Chloridionen, in geringerem Maße auch Bikarbonationen, passieren lassen (Kaila 1994, Sieghart 1995). Dies ermöglicht eine schnelle Auslösung des inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSP) nach der Neurotransmitterausschüttung.

Das Ausmaß der gabaergen postsynaptischen Hemmung der Neurone ist unter anderem abhängig von der Anzahl der präsynaptischen gabaergen Neurone, deren Membraneigenschaften und der Verteilung und Eigenschaften der unterschiedlichen Rezeptorkanäle.

Im ZNS zeigt sich eine Vielfalt gabaerger Funktionsweisen, die durch spezifische hemmende Neurone mit besonderen morphologischen, physiologischen und funktionellen Eigenschaften einhergeht (Bernard et al. 2000).

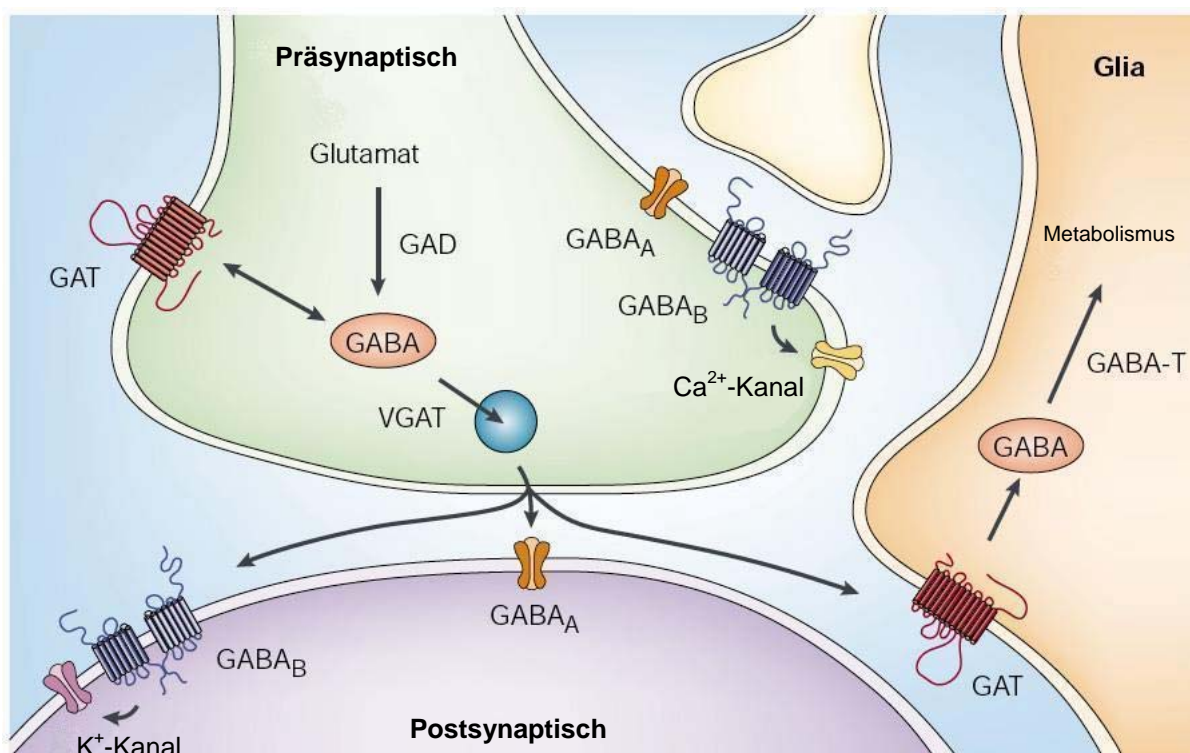


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Synthese und des Transportes der GABA an den Synapsen. GABA wird in hemmenden Neuronen durch das Enzym GAD aus Glutamat gebildet. Sie wird durch den vesikulären Neurotransmitter-Transporter (VGAT) in Vesikel transportiert. Die Rezeptoren sind prä- und postsynaptisch lokalisiert. Die Wiederaufnahme des Transmitters erfolgt nach der Freisetzung von den Bindungsstellen durch die GABA-Transporter (GAT) in Neurone und Glia (modifiziert nach Owens und Kriegstein 2002).

1.1.3. Erkrankungen des Nervensystems

Diverse Erkrankungen des ZNS werden mit dem gabaergen System und insbesondere mit den GABA_A-Rezeptoren in Verbindung gebracht.

So zeigt sich bei der Huntington'schen Erkrankung die Degeneration von gabaergen Neuronen. Im Nucleus caudatus und im Putamen ist dies verbunden mit einer deutlichen Reduktion von Benzodiazepin-Bindungsstellen und reduzierter Immunreaktivität der Untereinheiten des Rezeptors (Faull et al. 1993, Kunig et al. 2000). Jedoch wurde im Globus pallidus eine vermehrte Expression von GABA_A-Rezeptoren nachgewiesen, was eine kompensatorische Aufregulierung in den verbleibenden Synapsen nahelegt (Fritschy und Brünig 2003).

Das Stiff-person-Syndrom ist eine seltene Erkrankung, die mit Muskelsteifigkeit und schmerzhaften Spasmen einhergeht (Stayer und Meinck 1998). Bei betroffenen Patienten wurden Autoantikörper gegen die beiden Isoformen der GAD, GAD65 und GAD67 nachgewiesen (Ellis und Atkinson 1996). Medikamente, die die gabaerge Wirkung unterstützen, wie hoch dosiertes Diazepam und Vigabatrin, zeigen eine Besserung der Symptome (Cohen 1966, Prevett et al. 1997).

Der GABA_A-Rezeptor ist auch bei Angststörungen von Interesse, da in diesem Bereich Benzodiazepine zur Behandlung eingesetzt werden. So zeigte sich in Positronenemissionstomographien (PET) von Patienten mit Panikattacken eine verminderte Benzodiazepin-Bindung temporal und letztlich über dem gesamten Gehirn (Tiihonen et al. 1997).

Es gibt zahlreiche Theorien zur Pathophysiologie der Schizophrenie. Eine dieser Hypothesen postuliert eine Störung der gabaergen Neurotransmission (Benes und Berreta 2001). In Untersuchungen an *post mortem* Gewebe schizophrener Patienten wurden Veränderungen der Genexpression von GABA_A-Untereinheiten und GAD nachgewiesen (Akbarian et al. 1995a, Akbarian et al. 1995b, Volk et al. 2000).

An β 3-defizienten Mäusen konnten unter anderem die Symptome des Angelman-Syndrom nachgewiesen werden (Reis et al. 1993). Dies stimmt mit Untersuchungen überein, dass das für die β 3-Untereinheit kodierende Gen mit dem Bereich übereinstimmt, der auf dem Chromosom 15 für das Angelman-Syndrom verantwortlich ist. Diese Erkrankung ist gekennzeichnet durch mentale Retardierung, Ataxie, kraniofaziale Anomalien und zerebrale Anfallsleiden. Ebenfalls in dieser Region wird der Gendefekt vermutet, der dem Prader-Willi Syndrom zugrunde liegt, das durch mentale Retardierung, Hypogonadismus und Adipositas charakterisiert ist (Knoll et al. 1993, Wagstaff et al. 1991).

1.1.4. Epilepsie

Experimentelle und klinische Studien zeigen, dass GABA eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie und Therapie der Epilepsie spielt. Störungen des gabaergen Systems wurden sowohl in genetisch bedingten als auch erworbenen Formen der Epilepsie nachgewiesen. Es wird angenommen, dass ein Ungleichgewicht zwischen neuronaler Hemmung und Erregung besteht. Ein Defizit in der gabaergen hemmenden synaptischen Transmission könnte zu synchronen neuronalen Entladungen führen, die sich durch fokale oder generalisierte epileptische Anfälle äußern (Meldrum 1979, Olsen et al. 1986, Olsen et al. 1992). Diese Hypothesen werden durch den antikonvulsiven Effekt antiepileptischer Medikamente unterstützt, die eine Verstärkung der gabaergen Wirkung zeigen (Gale 1992, Leach und Brodie 1995). Die zelluläre Pathogenese ist letztlich im Detail noch nicht verstanden. In Tierversuchen wurde unter anderem das sogenannte Kindling-Modell untersucht. Dabei wurde eine erhöhte Bindung an GABA_A-Rezeptoren im Gyrus dentatus und Hippocampus beschrieben (Nobrega et al. 1990, Shin et al. 1985). Außerdem wurde eine erhöhte mRNA Expression der GABA_A-Untereinheiten α 4, β 1 und β 3 in granulären Zellen des Gyrus dentatus aufgezeigt (Clark et al. 1994, Kamphuis et al. 1994). Ver-

schiedene Untersuchungen an Familien, in denen gehäuft generalisierte Anfälle und Fieberkrämpfe sowie kindliche Absencen-Epilepsien mit Fieberkrämpfen auftraten, zeigten eine Mutation in der $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (Baulac et al. 2001, Harkin et al. 2002, Kananura et al. 2002, Wallace et al. 2001). In einer anderen Studie wurde eine Familie mit einer autosomal dominanten Form der juvenilen myoklonischen Epilepsie untersucht, in der eine Mutation der $\alpha 1$ -Untereinheit nachgewiesen wurde (Cossette et al. 2002).

An PET-Untersuchungen von Patienten mit idiopathischen partiellen Anfällen wurde eine verminderte Bindung des Benzodiazepin-Rezeptor-Liganden Ro 15-1788 (Flumazenil) im epileptischen Fokus nachgewiesen (Savic et al. 1988). Möglicherweise ist dies auf einen Zellverlust und nicht auf eine selektive Regulation des GABA_A-Rezeptors zurückzuführen. Bei Patienten mit Temporallappenepilepsie konnte ebenfalls eine Verminderung der Benzodiazepin-Rezeptor-Dichte nachgewiesen werden (Sadzot et al. 1994).

In neuropathologischen Studien chirurgisch behandelter Patienten mit fokaler Epilepsie wurde ein Verlust von GABA_A-Rezeptoren, aber keine Veränderung am Rezeptor beschrieben (Olsen et al. 1990, Olsen et al. 1992).

Autoradiographische und immunhistochemische Untersuchungen an humanem *post mortem* Gewebe bei Patienten mit Epilepsie, die Veränderungen am GABA_A-Rezeptorsystem zeigen, sind nur in geringer Zahl vorhanden. Ein großer Teil dieser Untersuchungen bezieht sich auf komplex-fokale temporale Epilepsien. So wurden Untersuchungen an Geweben von Patienten mit temporo-mesialer Epilepsie durchgeführt, die ein vermindertes Benzodiazepin-binding zeigten. Dies wurde auf einen Zellverlust im Hippocampus zurückgeführt (Burdette et al. 1995). Hinsichtlich des Neuronenuntergangs im epileptogenen Gewebe liegen jedoch noch keine eindeutigen Ergebnisse vor (Hand et al. 1997). Auch extratemporale Epilepsien und Epilepsien bei fokalen Läsionen sind bisher nur wenig untersucht. Die Ergebnisse der bisher veröffentlichten Studien sind noch uneinheitlich. So zeigten Untersuchungen eine Reduktion der gabaergen Interneurone und eine verminderte Immunreaktivität der Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors, andere hingegen wiesen zum Teil erhöhte Reaktivität einzelner Untereinheiten oder aber auch keine einheitliche Veränderung der nachgewiesenen Rezeptordichte auf (Spreafico et al. 1998a, Wolf et al. 1995, Wolf et al. 1996, Zilles et al. 1999).

1.1.5. Pharmakologie

Die Steigerung der neuronalen Hemmung durch GABA ist eine der wirksamsten therapeutischen Strategien für die Behandlung von Erkrankungen des ZNS, wie generalisierte Angststörungen, Schlafstörungen, Muskelspasmen und Epilepsien (Rudolph et al. 2001). GABA_A-Rezeptoren sind ubiquitär im ZNS lokalisiert und stellen deshalb ein exzellentes Ziel in der pharmakologischen Therapie dar. Eine Vielzahl von Medikamenten entfalten ihre Wirkung an unterschiedlichen Bindungsstellen des GABA_A-Rezeptors (siehe Abb. 1.3).

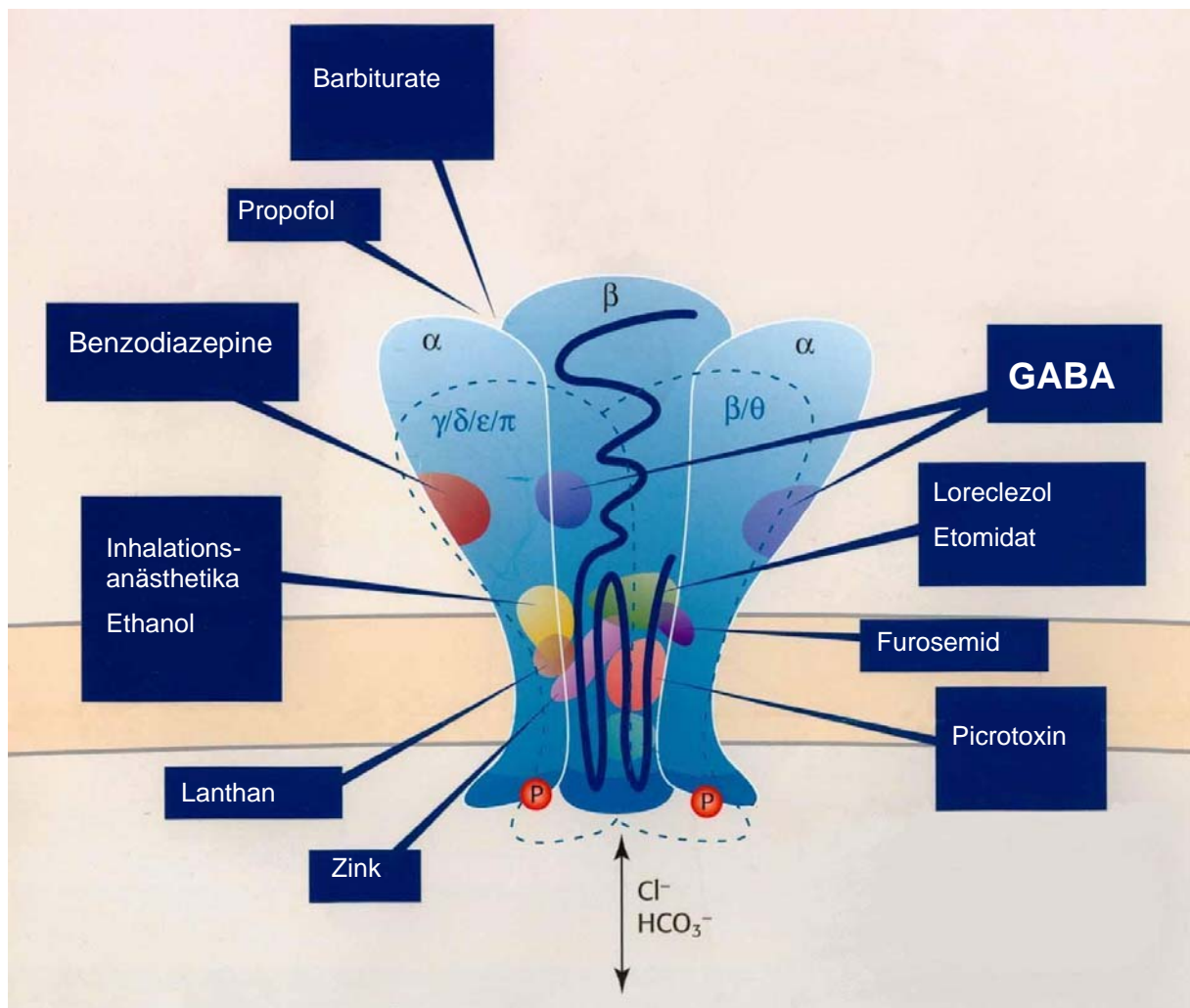


Abb. 1.3: Schematische Darstellung einiger Ligandenbindungsstellen am GABA_A-Rezeptor (modifiziert nach Whiting und Wafford 2002).

In knockout-Mäusen, in denen sowohl die Expression der Untereinheit $\gamma 2S$ als auch $\gamma 2L$ ausgeschaltet wurde, zeigte sich eine 94%ige Reduktion der Benzodiazepin-Bindungsstellen; die Zahl der GABA-Bindungsstellen dagegen war nur leicht reduziert. Die meisten homozygoten $\gamma 2$ -knockout-Mäuse starben perinatal. An Tieren, die bis zu zwei Wochen überlebten, zeigte sich kein sedierender Effekt durch Diazepam (Günther et al. 1995). Diese Ergebnisse zeigen, dass die $\gamma 2$ -Untereinheit eine Voraussetzung für die Bildung der Benzodiazepin-Bindungsstelle darstellt (Smith und Olsen 1995). Bezüglich der anxiolytischen Wirkung von Diazepam wurden Untersuchungen an Mäusen durchgeführt, die eine Punktmutation im für die $\alpha 2$ -Untereinheit kodierenden Gen aufwiesen. An diesen Tieren konnte keine anxiolytische Wirkung von Diazepam nachgewiesen werden, was zu der Annahme führte, dass diese Wirkung über Neurone vermittelt wird, die die $\alpha 2$ -Untereinheit exprimieren (Rudolph et al. 2001). Sie repräsentieren nur etwa 15% der Diazepam-sensitiven GABA_A-Rezeptoren, sodass selektive Liganden zur Therapie von Angststörungen das Nebenwirkungsspektrum deutlich reduzieren könnten (Möhler et al. 2002). Die unterschiedlichen Wirkungen von Diazepam werden durch verschiedene GABA_A-

Rezeptor Subtypen übertragen. Die sedative, amnestische und zum Teil antikonvulsive Wirkung scheint über Rezeptoren vermittelt zu werden, die eine $\alpha 1$ -Untereinheit enthalten, die anxiolytische Wirkung hingegen über Rezeptoren, die $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -, oder $\alpha 5$ -Untereinheiten enthalten (Sieghart 2000). Ebenfalls durch Untersuchungen an knockout-Mäusen wurde nachgewiesen, dass die muskelrelaxierende Wirkung von Diazepam hauptsächlich über $\alpha 2$ -GABA_A-Rezeptoren vermittelt wird. Dieser Effekt wird allerdings erst unter höheren Dosen erreicht (Crestani et al. 2001).

Die antikonvulsive Wirkung von Zolpidem wird ausschließlich über Rezeptoren vermittelt, die eine $\alpha 1$ -Untereinheit aufweisen (Crestani et al. 2000).

Antiepileptika verändern das Gleichgewicht zwischen neuronaler Erregung und Hemmung (White 1999). Bisher wurden drei verschiedene Wirkungsweisen identifiziert: Modulation der spannungsabhängigen Ionenkanäle (Na^+ , Ca^{2+} , K^+), Verminderung der erregenden Transmission und Steigerung der gabaergen hemmenden Neurotransmission (Meldrum 1996). Es ist bekannt, dass eine Verminderung der gabaergen Wirkung zerebrale Krampfanfälle provozieren kann, deren Verstärkung jedoch einen antikonvulsiven Effekt aufweist (Löscher 1999). So wirkt Phenobarbital unter anderem über eine Verlängerung der Öffnungszeit des Chloridkanals. Es kann den GABA_A-Rezeptor jedoch auch direkt aktivieren (MacDonald et al. 1989, White 1999). Aufgrund seiner Nebenwirkungen wird es in der Dauertherapie nicht als Medikament der ersten Wahl eingesetzt. Vigabatrin entfaltet seine Wirkung über die Hemmung der GABA-Transaminase. Durch den reduzierten Katabolismus von GABA führt dies zu einem erhöhten Spiegel des Neurotransmitters und damit zu einer Verstärkung der hemmenden Neurotransmission im Gehirn (Jung et al. 1977, Schlechter et al. 1977). Tiagabine verhindert die Aufnahme von GABA in Neuronen und Gliazellen, wobei es die Aufnahme an Gliazellen in größerem Maße beeinträchtigt (Braestrup et al. 1990). Es verlängert dadurch die Dauer des postsynaptischen inhibitorischen Potentials (Roepstorff und Lambert 1992).

Benzodiazepine, wie etwa Diazepam, auf das schon näher eingegangen wurde, erhöhen die Frequenz der Chloridkanal-Öffnung (Twyman et al. 1989). Im Gegensatz zu den Barbituraten sind sie jedoch nicht in der Lage, ohne GABA den GABA_A-Rezeptor direkt zu aktivieren (White 1999). Die direkte Aktivierung findet erst durch höhere Konzentrationen von Barbituraten statt, in niedrigerer Konzentration potenzieren sie den Effekt von GABA (Amin und Weiss 1993).

Untersuchungen mit Anästhetika wie Propofol, Etomidate, Enfluran und Halothan zeigen eine Interaktion mit dem GABA_A-Rezeptor (Concas et al. 1991, Jones et al. 1992, Uchida et al. 1995). Auch Etomidate und Propofol können sowohl den Effekt der GABA verstärken als auch eine direkte Aktivierung des Rezeptors hervorrufen. Diese unterschiedlichen Wirkungsweisen scheinen aber verschiedene Domänen des Rezeptors zu betreffen (Korpi et al. 2002).

1.2. GAD

1950 entdeckten Roberts und Frankel sowie Awapara et al. unabhängig voneinander ein Enzym im Gehirn von Mäusen, das die Decarboxylierung von L-Glutamat zu GABA katalysiert, die Glutamatdecarboxylase (GAD) (Awapara et al. 1950, Roberts und Frankel 1950). Betrachtet man die Neurotransmittersynthese ist GAD einzigartig, denn sowohl das Substrat als auch das Produkt sind Neurotransmitter mit gegensätzlicher Wirkungsweise. In den folgenden Jahren führten weitere Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass GAD in erster Linie auf das Nervensystem beschränkt ist (Roberts 1956). Heute ist bekannt, dass das Enzym neben den gabaergen Neuronen im Gehirn und peripheren Nervensystem auch in den β -Zellen des Pankreas, im Eileiter, Hoden, Leber, Niere und der Nebenniere vorkommt (Erdo und Wolff 1990, Folli 1998, Vianello et al. 2002).

Es existieren zwei Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht, GAD65 (65,4 kDa) und GAD67 (66,6 kDa), die bei Säugetieren von zwei verschiedenen Genen kodiert werden (Erlander et al. 1991). Sie befinden sich für das humane GAD65 auf Chromosom 10p11.23, für humanes GAD67 auf dem Chromosom 2q31 (Bu et al. 1992). Beide Enzyme benötigen Pyridoxalphosphat als Kofaktor, wobei die Aktivität des Enzym GAD65 offenbar mehr von Pyridoxalphosphat (PLP) abhängig ist. Dies ließ sich durch exogenes Zuführen von PLP bestätigen. Die Enzymaktivität von GAD65 wurde dadurch siebenfach, dagegen die von GAD67 nur zweifach erhöht (Erlander et al. 1991). Fast die gesamte GAD67 liegt als aktives Holoenzym gesättigt mit dem Kofaktor PLP vor, dagegen existiert nur etwa die Hälfte der GAD65 als aktives Holoenzym (Kaufman et al. 1991). Unter depolarisierenden Bedingungen verbindet sich PLP mit dem inaktiven Apoenzym und bildet so aktives Holoenzym, das die GABA-Produktion in Nervenendigungen mit erhöhter neuronaler Aktivität steigert (Gold und Roth 1979, Miller und Walters 1979).

In mehreren Untersuchungen ließ sich die unterschiedliche Verteilung der zwei Isoenzyme im Gehirn der Ratte zeigen. GAD65 wurde vor allem in Nervenendigungen und Axonen nachgewiesen, hingegen GAD67 mehr in Neuronen und Dendriten (Erlander et al. 1991, Kaufman et al. 1991). Außerdem wurde gezeigt, dass GAD67 mRNA vermehrt im Cortex, Bulbus olfactorius, Colliculus inferior, Globus pallidus und im Kleinhirn exprimiert wird. Die Intensität des Signals für GAD65 mRNA ist im Nucleus geniculatus lateralis, Colliculus superior und in den Hypothalamuskernen höher. Beide GAD mRNAs konnten in Interneuronen und Projektionsneuronen, sowie in Neuronen unterschiedlicher Synapsen nachgewiesen werden (Erlander et al. 1991, Feldblum et al. 1993).

An GAD-knockout Mäusen wurde gezeigt, dass in GAD67-defizienten Mäusen (GAD67^{-/-}) nur 7% GABA-Gehalt und weniger als 20% GAD-Aktivität im cerebralen Cortex (Asada et al. 1997), in GAD65-defizienten Mäusen (GAD65^{-/-}) jedoch keine Veränderung des GABA-Gehalts im Gehirn nachzuweisen war (Asada et al. 1996, Kash et al. 1997). Diese Untersuchungsergebnisse zeigen, dass der hauptsächliche Bestandteil von GAD in sich entwickelnden Gehirnen von Mäusen GAD 67 ist.

1.3. Fokale Dysplasien

In der fetalen Entwicklung des menschlichen Gehirns folgt dem Schluss des Neuralrohrs und der Ausbildung der telencephalen Vesikel die topische Differenzierung und Proliferation der germinalen Matrix, die Differenzierung der telencephalen Stammzellen und die Migration der entstehenden Nervenzellen (Barth 1987, Berry und Rogers 1965, Rakic 1988). Die cortikale Entwicklung findet zwischen der 8. und 24. Schwangerschaftswoche statt (Crino und Eberwine 1997). Neuroblasten entwickeln sich in der ventrikulären Zone des Gehirns. Die Migration der noch unreifen Zellen erfolgt zentrifugal in Richtung der pialen Oberfläche entlang radial orientierter glialer Fortsätze zur cortikalen Platte, dem späteren Neocortex (Sarnat 1991, Sidman und Rakic 1973). Die cortikale Platte wird von innen nach außen aufgebaut. Die zuerst die cortikale Platte erreichenden Neuroblasten bilden im späteren Neocortex die innerste Schicht. Die später ankommenden Neuroblasten müssen die schon dort angelangten Zellen passieren, um ihren Zielort in einer oberflächlicher gelegenen Schicht des Cortex zu erreichen (Sidman und Rakic 1973). Während der Migration bleiben die Neuroblasten weitestgehend undifferenziert (Sarnat 1992). Nach Abschluss der neuronalen Migration beginnt die weitere Organisation des Cortex: Zellwachstum, axonale Verästelung und die Ausbildung synaptischer Verbindungen (Kuzniecky und Barkovich 1996).

Die Anzahl der Schichten des cerebralen Cortex und deren Aufbau unterscheiden sich in den verschiedenen Hirnregionen, sind jedoch grundsätzlich gleichartig aufgebaut. Der Neocortex ist aus sechs Schichten aufgebaut (Isocortex). Schicht I (Lamina zonalis) enthält vor allem tangentielle Faserzüge und Nervenzellen mit oberflächenparallel verlaufenden Fortsätzen. In der Lamina multiformis (Lamina VI) sind neben Schaltzellen unterschiedlicher Form, vor allem auch Zellen zu finden, deren Neuriten oberflächliche mit tieferen Rindenschichten verbinden. Lamina III und V beherbergen kleinere (Lamina III, Lamina pyramidalis externa) bzw. größere (Lamina V, Lamina pyramidalis interna) Pyramidenzellen mit efferenten Axonen, die Schicht II (Lamina granularis externa) und IV (Lamina granularis interna) hauptsächlich Schaltzellen, Interneurone oder Körnerzellen, die für die intracortikale Verschaltung wichtig sind.

Die cortikale Entwicklung kann durch genetische und äußere Faktoren gestört werden. Beschrieben wurden unter anderem Mikroencephalie nach Exposition ionisierender Strahlung (Miller 1956), Mikroencephalien sowie Dysplasie des Corpus callosum und Mikrodysplasien nach Alkoholexposition des Föten (Jones und Smith 1973), außerdem Methylquecksilber als toxisches Agens (Marsh 1980, Matsumoto 1965).

Im Tierversuch wurden Störungen der Migration durch ionisierende Strahlung oder toxische Substanzen wie Methylazoxymethanol, Kokain und Alkohol nachgewiesen (Collier und Ashwell 1993, Gressens et al. 1992, Miller 1986, Yurkewicz et al. 1984).

An genetisch bedingten cortikalen Malformationen wurde die durch Veränderungen des Chromosom X hervorgerufene Lissencephalie und subcortikale bandförmige Heterotopien (Dobyns et al. 1996b,

Ross et al. 1997), sowie die durch Schädigung des Genoms am Chromosom 17 verursachte Lissencephalie beschrieben (Dobyns et al. 1993, Dobyns et al. 1996a).

Cortikale Malformationen umfassen sehr unterschiedliche fokale und diffuse anatomisch-pathologische Veränderungen, die zum größten Teil vom Zeitpunkt der Störung in der zerebralen Entwicklung und nicht so sehr von dem verursachenden Agens abhängen (Barkovich et al. 1996).

Eine einfache pathologische Klassifikation der neuronalen Migrationsstörungen unterscheidet: Agyrie bzw. Pachygyrie (einschließlich Lissencephalie), Heterotopien, Polymikrogyrie und cortikale Dysplasien (Copp und Harding 1999).

Taylor et al. beschrieben als erste fokale Anomalien der cortikalen Struktur (Taylor et al. 1971). Der Begriff der fokalen cortikalen Dysplasie wurde geprägt. Seither wurden zahlreiche Klassifikationen dieser komplexen strukturellen Anomalien veröffentlicht (Barkovich et al. 1996, Kuzniecky et al. 1991, Palmini et al. 2004, Tassi et al. 2002).

Durch Tassi et al. wurden die fokalen cortikalen Dysplasien in drei histopathologische Gruppen eingeteilt (Tassi et al. 2002). Keine der darin unterschiedenen Dysplasien weist eine normale cortikale Laminierung auf. Anhand der veränderten Zellen in der Dysplasie werden die architektonische Dysplasie, die zytoarchitektonische Dysplasie und die fokale Dysplasie nach Taylor unterschieden (siehe Tabelle 1). Es können verschiedene in Morphologie und Größe unterschiedliche Neurone in der cortikalen Dysplasie gefunden werden. Die großen Pyramidenzellen sind ähnlich groß oder sogar größer als die Neurone, die normalerweise in Lamina V zu finden sind und liegen außerhalb der Lamina V. Ihre Morphologie ist im Gegensatz zu den dysmorphen Pyramidenzellen und den ballonierten Zellen normal. Abnorm groß und ohne physiologische Ausrichtung zeigen sich die dysmorphen Neurone. Die ballonierten Zellen sind sehr groß, charakteristisch ist ihre unscharf abzugrenzende Zellmembran, das blasse eosinophile Zytoplasma und ein oder mehrere exzentrisch liegende Zellkerne.

Tabelle 1: Histopathologische Klassifikation nach Tassi (Tassi et al. 2002).

	Architektonische Dysplasie (AD)	Zyto-architektonische Dysplasie (CD)	Taylor's Fokale Cortikale Dysplasie (TFCD)
Störung der cortikalen Laminierung	+	+	+
große Pyramiden-Neurone (außerhalb L.V)	-	+	+
dysmorphe Pyramiden-Neurone	-	-	+
ballonierte Zellen	-	-	+
ektope Neurone in der weißen Substanz	-	-	+

Palmini et al. unterschieden zwischen zwei Gruppen von Malformationen: cortikale Entwicklungsstörungen und fokale cortikale Dysplasien (Palmini et al. 2004). Die milden Malformationen cortikaler Entwicklungsstörungen (MCD) werden in zwei Typen eingeteilt, wobei Typ I ektope Neurone in oder angrenzend an Lamina I aufweist. Hingegen liegen bei Typ II die neuronalen Heterotopien außerhalb von Lamina I. Die fokalen cortikalen Dysplasien werden in 6 Typen unterteilt: Typ I: keine dysmorphen Neurone oder ballionierte Zellen, Typ IA: isolierte architektonische Dysplasie (Störung der Laminierung, mit oder ohne Veränderungen von MCD), Typ IB: architektonische Dysplasie mit großen oder unreifen Neuronen, keine dysmorphen Neurone, Typ II: Taylors fokale cortikale Dysplasie, dysmorphe Neurone, mit oder ohne ballionierte Zellen, Typ IIA: architektonische Dysplasie mit dysmorphen Neuronen, keine ballionierten Zellen, Typ IIB: architektonische Dysplasie mit dysmorphen Neuronen und ballionierten Zellen.

Derartige Fehlbildungen gehen mit neurologischen, kognitiven Defiziten und teilweise mit epileptischen Anfällen einher. 8-12% der pharmakologisch nicht ausreichend therapierbaren Epilepsien gehen auf derartige Veränderungen zurück (Tassi et al. 2002).

Insgesamt ist die erhöhte Epileptogenität in der fokalen cortikalen Dysplasie vermutlich auf eine verminderte gabaerge Wirkung und eine erhöhte glutamaterge Wirkung zurückzuführen. Die gabaerge Inhibition ist von vielen Faktoren abhängig. Zum einen trägt die Zahl der präsynaptischen Endigungen, die von einem gabaergen Neuron ausgebildet werden, zum Ausmaß der gabaergen Inhibition bei, wobei verständlicherweise die Anzahl der präsynaptischen gabaergen Neurone dafür ganz entscheidend ist. Zum anderen sind die Membraneigenschaften der Neurone, sowie die Verteilung und Eigenschaften der Rezeptoren ein ganz wesentlicher Faktor für das Ausmaß der hemmenden Wirkung des gabaergen Systems. Eine mögliche Erklärung ist, dass die erhöhte oder verminderte Transkription einzelner GABA_A-Untereinheiten die Zusammensetzung des Rezeptors so verändert, dass die Funktion des Chloridkanals gestört ist und somit die inhibitorische gabaerge Wirkung in der fokalen cortikalen Dysplasie derart reduziert ist, dass eine suffiziente Hemmung nicht mehr gegeben ist.

Verschiedene Studien zeigen vermehrte exzitatorische und verminderte inhibitorische Neurotransmission in oder an die Läsion angrenzend bei Typ IIA und IIB (Ferrer et al. 1992; Spreafico et al. 1998a; Spreafico et al. 1998b). Zudem wurde ein hoher Grad an intrinsischer Epileptogenität nachgewiesen. Die meisten Patienten mit Typ IIA oder IIB litten an epileptischen Anfällen, die pharmakologisch nicht ausreichend behandelbar waren (Gambardella et al. 1996, Palmini et al. 1994, Palmini et al. 1995). Patienten mit architektonischer Dysplasie hatten weniger häufig zerebrale Krampfanfälle als Patienten mit zytoarchitektonischer oder Taylors fokaler Dysplasie. Der epileptogene Fokus lag in den meisten Fällen im Temporallappen. Dagegen lag der Fokus bei Patienten mit Taylors fokaler Dysplasie meist extratemporal (Tassi et al. 2002). Ebenso waren Typ I fokale cortikale Dysplasien meist im Temporallappen lokalisiert, hingegen Typ II (Taylor) extratemporal (Palmini et al. 2004).

Zum histologischen Nachweis dysplastischer Zellen eignet sich das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 (MAP2): In cortikalen Dysplasien wurde die MAP2 Expression erhöht in dysplastischen cortikalen

Neuronen und dysplastischen ektopen Neuronen im Vergleich zu Zellen histologisch normaler Form in der Dysplasie und in physiologisch aufgebautem Cortex nachgewiesen. Es ist bekannt, dass MAP2 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung, Verzweigung und Regeneration der Neurone zukommt (Edson 1993, Tucker 1990). Die verstärkte Expression von MAP2 in dysplastischen Neuronen lässt sich daher möglicherweise auf einen erhöhten Anteil von MAP2C zurückführen, dessen hohe Expression charakteristisch für unreife Neurone ist (Mizoguchi et al. 1998, Yamanouchi et al. 1996, Yamanouchi et al. 1998).

1.3.1. PET-Befunde bei kortikaler Dysplasie

Bei pharmakologisch resistenten Epilepsien setzt sich als therapeutische Option in den letzten Jahren die Epilepsiechirurgie durch. Ein klinisches Problem bei diesem Vorgehen ist es, präoperativ die Lokalisation und Ausdehnung des epileptogenen Fokus exakt zu bestimmen und somit die Resektionsgrenzen zwar möglichst sparsam, aber eben auch ausreichend weit zu planen. Ob und inwieweit sich Informationen aus nicht-invasiv bildgebenden Verfahren wie der PET oder SPECT eignen, diese Planung zu optimieren, wird in vielen Zentren evaluiert. Flumazenil-PET Studien haben bei Patienten mit Temporallappenepilepsie zeigen können, dass die Ausdehnung des Areals mit einer geminderten Bindung des Tracers gut mit dem elektrophysiologisch identifizierten epileptogenen Fokus übereinstimmt, während interiktuale FDG-PET Untersuchungen als Maß eines fokal geänderten Stoffwechsels häufig ein deutlich größeres Areal nachwiesen.

Bei extratemporalen Epilepsien auf dem Boden einer kortikalen Dysplasie sind die Befunde des Flumazenil-PETs dagegen sehr uneinheitlich. Savic et al. wiesen mittels Flumazenil-PET eine Reduzierung der Benzodiazepin-Rezeptoren am Ort des Anfallsursprungs bei Patienten mit Frontallappen-Epilepsie nach (Savic et al. 1995). Die komplette Resektion der kortikalen Dysplasie bzw. der Areale, die im EEG epileptiforme Entladungen zeigen, scheinen eine Voraussetzung für die postoperative Anfallsfreiheit zu sein. Die makroskopisch mittels MRT identifizierten Areale der kortikalen Dysplasie waren begrenzter als die im EEG als epileptogene Areale nachgewiesenen Strukturen. So scheinen postoperativ verbliebene mikroskopische Veränderungen und angrenzender Cortex, der epileptiforme Entladungen aufweist, trotz fehlender makroskopischer kortikaler Malformation ein hohes Risiko für postoperativ fortbestehende cerebrale Krampfanfälle zu sein (Palmini et al. 1995). Eine PET-Studie an Patienten mit verschiedenen kortikalen Malformationen zeigte ebenfalls eine verminderte Flumazenil-Bindung in den pathologisch veränderten Foki, wohingegen in angrenzenden Cortexarealen zum Teil eine höhere Bindung nachgewiesen werden konnte. Ob eine erhöhte Affinität der Rezeptoren oder eine größere Dichte der Benzodiazepin-Bindungsstellen bzw. der GABA_A-Rezeptoren zugrunde liegt, ist aufgrund der Methode nicht zu klären (Hammers et al. 2001). Allerdings war nur bei einem der untersuchten Patienten postoperativ eine fokale kortikale Dysplasie nachzuweisen. In der Fallserie von

Ryvlin et al. versagten dagegen sowohl Flumazenil-PET als auch FDG-PET, den epileptogenen Fokus zu identifizieren (Ryvlin et al. 1998).

Von Richardson et al. (1996) wurde daher diskutiert, ob Auffälligkeiten in der Flumazenil-PET bei Patienten mit kortikaler Dysplasie nicht eher das Ausmaß der dysontogenetischen Störung als das epileptogene Gewebe widerspiegeln. Das Ausmaß der veränderten Expression der Benzodiazepin-Bindungsstellen ist in Korrelation mit dem Schweregrad der fokalen kortikalen Dysplasie zu sehen, wie es Matsuda et al. in einer Studie belegten. Dabei war die Dichte der Benzodiazepin-Rezeptoren um so niedriger, je stärker die nach Palmini klassifizierte fokale kortikale Dysplasie ausgeprägt war (Matsuda et al. 1996).

In einer Arbeit von Arnold et al. wurde daher erstmals bei Patienten mit extratemporaler Epilepsie auf dem Boden einer kortikalen Dysplasie untersucht, ob fokale Änderungen in der Belegung des PET-Tracers innerhalb neurophysiologisch identifizierter epileptogener Foci tatsächlich auf einen geminderten Besatz an GABA_A-Rezeptoren zurückzuführen sind und nicht (nur) auf eine geänderte Zelldichte oder kortikale Architektur. Als Tracer wurde der Benzodiazepin-Antagonist Flumazenil eingesetzt, um eine von der möglicherweise alterierten GABA-Ligandenaffinität des Rezeptors unabhängige Quantifizierung der GABA_A Rezeptor Besatzes zu ermöglichen. Es zeigte sich sowohl im Flumazenil PET als auch in postoperativen autoradiographischen Untersuchungen ein reduzierter Benzodiazepin-Rezeptor-Nachweis im Zentrum der kortikalen Dysplasie, hingegen waren am Rand der resezierten Präparate, der ebenfalls dysplastische Neurone oder normale kortikale Laminierung aufwies, die Benzodiazepin-Rezeptoren weniger reduziert oder zeigten eine normale Bindung. Die Areale mit einem verminderten Nachweis an Benzodiazepin-Rezeptoren stimmten mit den präoperativ mittels Flumazenil-PET nachgewiesenen Foki überein und entsprachen dem Ort des Anfallsursprungs. Hingegen waren in den durchgeführten subduralen EEGs auch epilepsie-typische Potentiale in den perifokalen Arealen nachzuweisen (Arnold et al. 2000). Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass die GABA_A-Rezeptoren bzw. Benzodiazepin-Bindungsstellen an den Rezeptoren in der fokalen kortikalen Dysplasie in reduzierter Form vorliegen. Allerdings exprimieren nicht alle Rezeptoren Benzodiazepin-Bindungsstellen, sodass nicht auf die gesamte Zahl der GABA_A-Rezeptoren geschlossen werden kann.

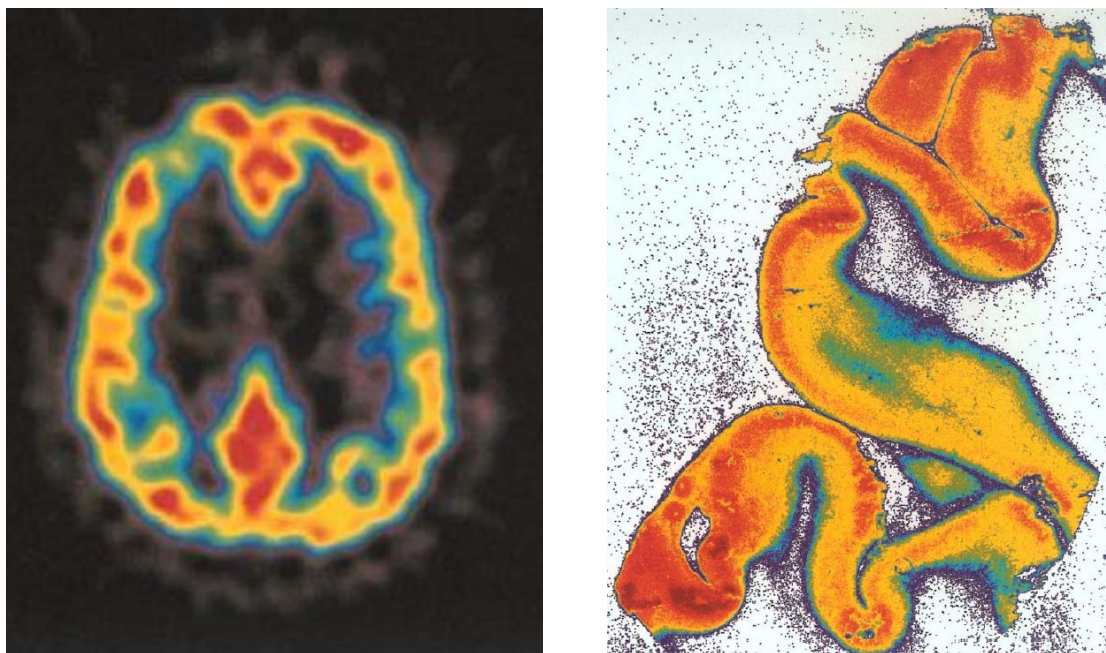


Abb. 1.4: Flumazenil-PET (links) und Flumazenil-Binding eines Patienten mit kortikaler Dysplasie (Gyrus frontalis medialis rechts) (aus: Arnold et al. 2000).

2. Aufgabenstellung

Die zellulären Mechanismen epileptischer Entladungen sind im Detail schlecht verstanden, und insbesondere extratemporale Epilepsien wurden in dieser Hinsicht bisher kaum untersucht.

Die Hypothese, dass epileptischen Entladungen eine Imbalance zwischen erregenden und hemmenden kortikalen Inputs zugrunde liegt, wird jedoch weitestgehend akzeptiert. Nachdem GABA der am weitesten verbreitete inhibitorische Transmitter im Zentralnervensystem ist, wird ihr also eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Epilepsie zugeschrieben.

Eine Ursache extratemporaler Epilepsien können fokale kortikale Dysplasien sein, und in den letzten Jahren ergaben sich erste Hinweise auf ein hypofunktionales gabaerges System bei dieser Erkrankung.

Zum besseren Verständnis der Pathogenese von Epilepsien bei fokalen Dysplasien als auch für die Entwicklung selektiver antiepileptisch wirkender Pharmaka sind daher detaillierte Untersuchungen des GABA-Rezeptorsystems essentiell.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expressionsmuster verschiedener GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im epileptogenen Fokus von Patienten mit extratemporalen Epilepsien bei kortikaler Dysplasie zu untersuchen und damit weitere Schlüsse zu den Pathomechanismen der inhibitorischen Neurotransmission bei diesen Anfallsleiden zu ermöglichen. Zudem wurde die mRNA-Expression des GABA synthetisierenden Enzym GAD untersucht, um zu erkennen, ob auch eine Modulation bereits auf der Ebene der GABA-Synthese erfolgt.

Dazu wurde Gewebe von pharmakologisch nicht ausreichend therapierbaren Patienten untersucht, die einer epilepsie-chirurgischen Behandlung zugeführt worden waren. In den Präparaten wurden sowohl dysplastische Areale als auch Zellen im histologisch normalen umgebenden Gewebe (peridysplastisch) untersucht. Als Kontrolle diente Gewebe von Verstorbenen ohne bekannte neurologische oder psychiatrische Erkrankung. Die mRNA-Expressionsmuster wurden durch in situ Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden untersucht; die Identifizierung der Dysplasie in den untersuchten Geweben erfolgte mittels immunhistochemischer Färbung von MAP2.

3. Material und Methoden

3.1. Gewinnung und Präparation des Untersuchungsmaterials

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Hirngewebe von fünf Patienten mit extratemporaler Epilepsie, die pharmakologisch nicht ausreichend therapierbar waren und deshalb epilepsie-chirurgisch behandelt werden mussten, untersucht. Bei den zu untersuchenden Patienten erfolgte eine präoperative Evaluation mittels Magnetresonanztomographie (MRT), F-18 FDG/C-11 Flumazenil Positronenemissionsspektroskopie (PET) und ictualer Single-photon-Emissionstomographie (SPECT) sowie ictualen, interiktualen invasiven und nicht-invasiven EEG-Registrierungen zur Lokalisation des Anfallauslösenden Areal. Auf der Basis dieser Daten erfolgte die operative Entfernung des Gewebes. Die Präparate wurden nach der Dokumentation der makroskopischen Anatomie sofort auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die untersuchten Patienten waren zwischen 17 und 35 Jahren alt, vier waren männlich eine weiblich. Der Anfallsbeginn lag zwischen dem 4. und 20. Lebensjahr. Es zeigte sich eine Anfallsfrequenz von 2-3 Anfällen im Monat bis zu maximal 20 Anfällen am Tag. In 3 von 5 Patienten konnte in der Magnetresonanztomographie eine cortikale Dysplasie nachgewiesen werden. Eine Minderung der Benzodiazepin-Rezeptor-Dichte konnte im Flumazenil-PET bei allen Patienten gezeigt werden. Bei der histopathologischen Untersuchung wurde bei allen Resektaten eine cortikale Dysplasie nachgewiesen. Im postoperativen Verlauf waren alle Patienten anfallsfrei.

Als Kontrolle dienten Gewebeproben des cingulären Cortex von drei Personen ohne bekannte neuropsychiatrische Erkrankung, die im Rahmen von gerichtsmedizinischen Sektionen entnommen worden sind. Dieses Gewebe wurde ebenfalls möglichst zeitnah auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die neuropathologische Untersuchung ergab keinen auffälligen Befund. Es handelte sich um männliche Personen im Alter von 56-67 Jahren. Alle Personen verstarben an Herz-Kreislaufversagen als Folge ihrer Grunderkrankungen (Kardiomyopathie, Rectum-Carcinom, Pankreatitis). Die Postmortemzeiten bis zum Einfrieren der Proben lagen zwischen 6,0 und 29,5 Stunden. In der Literatur wird für menschliches Gewebe ein Zeitraum von bis zu 36 Stunden angegeben, in dem funktionsfähige mRNA isoliert werden kann (Barton et al. 1993, Walker und McNicol 1992). Zudem ist ein Nachweis der mRNA mittels in situ Hybridisierung trotz einiger Degradation gut möglich (Wisden und Morris 1994, Platzer 2005).

Die Schnittplanung zur histologischen Aufarbeitung des unfixierten Präparates erfolgte anhand der präoperativ erhobenen Daten. Bis zur Weiterverarbeitung wurde das Gewebe bei -80°C aufbewahrt. Die Schnitte des unfixierten, tiefgefrorenen Gewebes wurden im Kryostaten bei -25°C mit einer Schnittdicke von $20\mu\text{m}$ hergestellt. Sie wurden auf geputzten, heißluftsterilisierten und mit 0,01% Poly-L-Lysin-Lösung beschichteten Glasobjektträgern aufgenommen, bei Raumtemperatur getrocknet

und bei -80°C gelagert. Nach jeweils 20 Schnitten wurde ein zusätzlicher Gewebeschnitt zur histologischen Beurteilung angefertigt, luftgetrocknet und mit Thioninblau gefärbt. Vor der Hybridisierung erfolgte eine Fixierung mit Paraformaldehyd, um die Gewebemorphologie und die mRNA in der Zelle zu erhalten.

Die verwendeten Versuchsprotokolle sowie die Chemikalien und Reagenzien sind im Anhang dokumentiert.

3.2. In situ Hybridisierung

3.2.1. Markierung der Oligonukleotide

Die Auswahl der Oligonukleotid-Proben erfolgte nach folgenden Kriterien:

1. Der Anteil der Basen Cytosin und Guanin sollte zwischen 40% und 65% liegen, diese Basenpaarung ist durch drei Wasserstoffbrückenbindungen gebunden. Adenosin und Thymin sind dagegen nur durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen gebunden. Die Stabilität der sich bildenden Hybride ist somit durch einen höheren Gehalt an Cytosin und Guanin besser, sollte jedoch nicht zu hoch sein, da sich möglicherweise die unspezifischen Bindungen der Probe an die nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen erhöhen.
2. Spezifische Oligonukleotide sollten eine Länge von 35 bis 60 Nukleotiden haben; kürzere Sequenzen einer Probe bilden instabile Hybride. Die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Bindung ist erhöht.
3. Die benötigten Sequenzen der GABA_A-Untereinheiten sollten eine 100%ige Komplementarität zum nachzuweisenden Transkript aufweisen ohne an weitere genetische Sequenzen des Menschen zu binden. Die Sondenauswahl erfolgte mit Hilfe ausführlicher Datenbank-Recherche (NIH BLAST).

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidproben finden sich ausführlich im Anhang.

Die Oligonukleotid-Proben wurden mit 35-Schwefel Desoxy-Adenosin-Triphosphat (dATP) durch das Enzym Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) radioaktiv 3'-endmarkiert. 35-Schwefel ist ein niederenergetischer β -Strahler, hat eine Halbwertszeit von 87,4 Tagen und eine Zerfallsenergie von 0,167 MeV (E_{max}).

Mit der Flüssigszintillationsmethode lässt sich die Aktivität der radioaktiven Probe messen, sie wird in dpm (decays per minute) angegeben. Die hier verwendeten Proben zeigten eine spezifische Aktivität von $0,4-1,2 \times 10^6$ dpm/ μl .

3.2.2. Ablauf der in situ Hybridisierung

Bei der in situ Hybridisierung wird eine radioaktiv oder nicht radioaktiv markierte einzelsträngige Nukleinsäuresequenz direkt mit dem zu untersuchenden Gewebe in Kontakt gebracht. Diese Sonde bildet mit der komplementären RNA- oder DNA-Sequenz des Untersuchungsmaterials doppelsträngige Hybride, die durch die markierte Sonde sichtbar gemacht werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine in situ Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotid-Proben durchgeführt. Dabei wurde die markierte Sonde in einem Hybridisierungspuffer auf die fixierten Schnitte aufgebracht und inkubiert. In dem der Hybridisierung folgenden Waschvorgang wurde nicht oder unspezifisch gebundenes Probenmaterial entfernt und anschließend die emittierte Strahlung der Hybride detektiert.

Der Prozess des Aufschmelzens von DNA-DNA- bzw. DNA-RNA-Doppelsträngen ist reversibel, von der Temperatur abhängig und zeigt einen sigmoidalen Verlauf. Die Stabilität eines Nukleinsäuredoppelstrangs lässt sich durch Berechnung der Schmelztemperatur (T_m) bestimmen. Bei dieser Temperatur dissoziiert die Hälfte der doppelsträngigen Moleküle unter bestimmten definierten Bedingungen in Einzelstränge.

In der Literatur werden unterschiedliche Näherungsformeln zur Berechnung des Schmelzpunktes von RNA-Oligonukleotid-Hybriden angegeben. Folgende Formel ist in guter Näherung für die in situ Hybridisierung mit Oligonukleotiden einer Länge von 14 bis 70 Basen anzuwenden:

$$T_m = 81,5 + 16,6 * \log [I^+] + 0,41 * (\%GC) - (600/L) - 0,63 * (\%Formamid)$$

T_m	Schmelztemperatur [$^{\circ}C$],
$[I^+]$	Konzentration an einwertigen Ionen,
%CG	prozentualer Anteil an Guanin und Cytosin der Sondensequenz,
% Formamid	Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer in Volumenprozent (Sambrook et al. 1989).

Durch Festlegung der Hybridisierungstemperatur und -dauer sowie die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffer wird die optimale Ausbeute an RNA-Oligonukleotid-Hybriden erreicht.

Die Hybridisierungstemperatur muss, um thermisch bedingten Strangbrüchen vorzubeugen, erniedrigt werden. Durch dem Hybridisierungspuffer zugesetzte denaturierende Substanzen wie Formamid wird dies möglich. Hohe Salzkonzentrationen ebenso wie die Zugabe von Dextransulfat unterstützen die Bildung der Hybride. Unspezifische Bindungen der Sonde werden durch dem Hybridisierungspuffer hinzugefügte hydrolysierte DNA-Fragmente, Denhardt's Lösung, Poly-Adenylat und Natriumpyrophosphat reduziert.

Die Wahl der Hybridisierungsdauer ist insofern wichtig, da sich abhängig von der nachzuweisenden Sequenz erst nach einer gewissen Zeit die maximale Anzahl spezifischer Hybride ausbildet, jedoch

über diesen Zeitpunkt hinaus die unspezifische Bindung der Probe zunimmt. Auch hierzu finden sich Berechnungen zur Optimierung der Hybridisierungszeiten in der Literatur (Meinkoth und Wahl 1984). Die Formeln zur Hybridisierungsdauer und -temperatur werden als Anhaltspunkte betrachtet. Im Allgemeinen hat sich jedoch bewährt, die Versuchsbedingungen der *in situ* Hybridisierung empirisch zu optimieren.

Durch den an die Hybridisierung anschließenden Waschvorgang werden unspezifisch oder nicht vollständig hybridisierte Oligonukleotide entfernt. Wichtig ist dabei eine möglichst niedrige Salzkonzentration und eine möglichst hohe Temperatur der Waschlösung („stringentes Waschen“).

Als interne Kontrolle, zum Ausschluss einer unspezifischen Probenbindung, wird bei der Hybridisierung unmarkierte Probe im Überschuss zugegeben. Die spezifische Bindung der markierten Probe an die nachzuweisende Nukleinsäure ist nicht kovalent und daher reversibel. Die unspezifische Bindung hingegen beruht häufig auf einer irreversiblen Bindung (Berthele 1996). Diese Form der Kontrolle wurde durchgeführt, indem routinemäßig zu jedem hybridisierten Schnittpräparat der gleichen Serie ein Gewebeschnitt mit einem 100fachen Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid verarbeitet und exponiert wurde.

3.2.3. Autoradiographische Nachweismethoden

Autoradiographie ist die Gesamtheit aller Verfahren, nach denen Abbildungen der örtlichen Verteilung von Radionukliden in einem Objekt direkt oder indirekt durch die Wirkung der von ihnen emittierten Strahlung erhalten werden können. Dieser Effekt kann bei der *in situ* Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden benutzt werden. Dabei werden die hybridisierten Gewebeschnitte gegenüber emulsionsbeschichtetem Röntgenfilm exponiert oder direkt mit Fotoemulsion beschichtet. Die markierenden Isotope setzen beim radioaktiven Zerfall β -Strahlung frei. Diese kann mit Silberhalogenid-Kristallen der Fotoemulsion wechselwirken, was zu freien Elektronen im Kristall führt. Silberionen, die sich nahe einem Kristalldefekt befinden, können durch diese freien Elektronen in atomares Silber überführt werden. Dieses Silber ist noch nicht sichtbar, und wird erst durch die reduzierenden Substanzen im Entwickler in metallisches Silber überführt und damit sichtbar gemacht.

3.2.3.1. Film-Autoradiographie

Bei der Film-Autoradiographie wird ein Röntgenfilm auf die hybridisierten Gewebeschnitte gelegt. In der Regel sind die Silberhalogenid-Kristalle in der Emulsionsschicht der Röntgenfilme größer als in der Fotoemulsion, daher ist deren Auflösungsvermögen geringer, aber auch mit kürzeren Expositionszeiten verbunden. Der verwendete Biomax[®]-Film ist nur einseitig mit Fotoemulsion beschichtet, und zeichnet sich durch vergleichsweise hohe Auflösung bei niedrigem Hintergrundsignal aus. Diese Me-

thode eignet sich besonders, um eine Übersicht über die Verteilung der hybridisierten Probe im Gewebeschnitt zu gewinnen.

Die Filme wurden nach 28 Tagen entwickelt. Sie dienten dazu, die dysplastischen Areale anhand der pathologisch veränderten Gyrierung der Gewebe zu identifizieren und einen Überblick bezüglich der Signalintensität der einzelnen Oligonukleotide zu erhalten. Außerdem wurden die Gewebeschnitte mit unmarkierter Probe, wie oben beschrieben, als Kontrolle gegen Röntgenfilm exponiert.

Anhand der Filme wurde eine Vorauswahl der dysplastischen Areale getroffen, die im Weiteren bei der Auswertung der Flüssig-Emulsions-Autoradiographien mikroskopisch untersucht werden sollten. Auch die Normalgewebe wurden gegen Röntgenfilm exponiert, um einen Überblick über die Verteilung und Signalintensität der einzelnen Oligonukleotide zu erhalten und, in den Kontrollexperimenten, eine relevante unspezifische Bindung der verwendeten Proben auszuschließen.

3.2.3.2. Flüssig-Emulsions-Autoradiographie

Die Emulsions-Autoradiographie ermöglicht durch Beschichtung der hybridisierten Gewebeschnitte den direkten Nachweis der radioaktiv markierten Sonde. Dazu wird die Fotoemulsion geschmolzen, die Objektträger darin eingetaucht („Dipping“) und getrocknet. Bei der Verwendung des Isotops ^{35}S werden nach einer Expositionszeit von acht Wochen die hybridisierten Schnitte entwickelt und gegengefärbt. Die zelluläre Verteilung der nachzuweisenden Oligonukleotide lässt sich durch Auszählen der entstandenen Silberkörner (Grains) mit Hilfe eines Mikroskops, wie im Folgenden beschrieben, darstellen.

Zur Auswertung wurden die einzelnen Zellen der dysplastischen und nicht-dysplastischen Hirnareale der Epilepsie-Gewebe sowie die Zellen der Normalgewebe mikroskopisch bei 500facher Vergrößerung identifiziert und mit einer Videokamera im Hell- und Dunkelfeld aufgezeichnet. Dies erfolgte mit Hilfe der Software Optimas 5.0, um nach der manuellen Definition der Zellgrenzen die Messung der Zellfläche (im Hellfeld) und Bestimmung der Fläche der Grains über den definierten Zellen (im Dunkelfeld) durchführen zu können. Die Messwerte der Grainfläche in μm^2 beziehen sich auf $100 \mu\text{m}^2$ Zellfläche. Es wurden fünf Epilepsie-Gewebe und drei *post mortem* Gewebe von Personen ohne neurologische oder psychiatrische Erkrankung ausgewertet. Bei den Oligonukleotiden GAD67 und der GABA_A-Untereinheit $\gamma 3$ wurden nur vier Epilepsie-Gewebe beurteilt. In die Mittelwerte der Epilepsie-Patienten sind bei den dysplastischen Zellen fünf Gewebe eingegangen, bei den peridysplastischen Zellen nur jeweils vier Gewebe, da in einem der ausgewerteten Gewebe keine normale cortikale Laminierung zu identifizieren war, sodass nur dysplastische Zellen ausgewertet werden konnten. In den einzelnen Epilepsiegeweben wurden jeweils 8 Pyramidenzellen und Interneurone in der cortikalen Dysplasie sowie im umgebenden Gewebe mit normaler cortikaler Laminierung (peridysplastisch) aus-

gewertet. Ebenso wurden in den Kontrollgeweben jeweils 8 Pyramidenzellen und Interneurone untersucht.

Diese Emulsions-Autoradiographie eignet sich zur qualitativen Beschreibung zellulärer mRNA Expression unterschiedlicher Zellpopulationen. Hierzu wurden die ermittelten Graindichten in relative optische Dichte umgerechnet und diese Werte auf die Anzahl der radioaktiven Zerfälle in Abhängigkeit von der spezifischen Aktivität der markierten Oligonukleotidproben normalisiert. Hierdurch ist es möglich, die Expression der einzelnen Oligonukleotide in den Gewebeschnitten zu vergleichen. Um eine zusätzliche Korrektur der Messwerte bezüglich des unspezifischen Hintergrundes durchführen zu können, wurde eine Hybridisierung der Gewebe mit einem Oligonukleotid der $\alpha 6$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors durchgeführt. Die $\alpha 6$ -Untereinheit wird im cerebralen Cortex nicht exprimiert (Fritschy und Brüning 2003; Mehta und Ticku 1999). So wurde diese Signalaktivität als unspezifisches Hintergrundsignal gewertet und von den ermittelten Werten subtrahiert. Zur statistischen Auswertung wurde eine Analyse der Varianz (ANOVA) mit dem Programm GraphPadPrism 3.0 der Firma GraphPad Inc. durchgeführt und die Ergebnisse bei multiplen Vergleichen Bonferroni-korrigiert.

3.3. Immunhistochemie

Mit einem primären, in Mäusen gewonnenen Antikörper wurde immunhistochemisch das Mikrotubulus-assoziierte-Protein 2 (MAP2) in Gewebeschnitten der dysplastischen OP-Präparate nachgewiesen. Hierzu wurde ein monoklonaler Anti-MAP2 (Klon HM-2) verwendet, welcher die MAP2 Isoformen A, B und C des Menschen zu erkennen vermag, was anhand eines Immunoblots festgestellt wurde. Dies geschieht mit hoher Spezifität, da der Antikörper keine Kreuzreaktionen mit MAP1, Tubulinen oder anderen Strukturproteinen zeigt. Ein mit Biotin versehener sekundärer Antikörper gegen Maus IgG wird an diesen gebunden. Daraufhin bildet das Biotin einen makromolekularen Biotin/Avidin-Merrettichperoxidasekomplex (ABC-Komplex). Die Färbung entsteht durch eine Peroxidasevermittelte Umsetzung eines Farbstoffes. Eine Signalverstärkung wird erreicht, da mehrere ABC-Komplexe an einem Zweitantikörper binden, die wiederum in der Lage sind viele Farbstoffmoleküle umzusetzen.

Zur Kontrolle unspezifischer Reaktionen (des zweiten Antikörpers, des ABC-Komplexes oder der Färbung) wurden Gewebeschnitte ohne den Primärantikörper mit Pufferlösung inkubiert und in den folgenden Arbeitsschritten wie die Gewebe mit Primärantikörper behandelt.

Auswertung der Immunhistochemie

Die immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte wurden lichtmikroskopisch beurteilt, und es erfolgte eine Bewertung der Zellen der dysplastischen Gewebe in MAP2 positiv und MAP2 negativ.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sind die mRNA-Expressionsmuster der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$ - $\alpha 6$, $\beta 1$ - $\beta 3$, $\gamma 1$ - $\gamma 3$ und dem Enzym GAD67 in fokalen kortikalen Dysplasien epilepsie-chirurgisch behandelter Patienten und gesundem Kontrollgewebe in der Lamina V des cerebralen Cortex mittels radioaktiver in situ Hybridisierung mit Oligonukleotid-Proben untersucht worden. In den Resektaten der Epilepsie-Patienten wurden sowohl Zellen im dysplastischen Fokus als auch Zellen in umgebenden histologisch unveränderten Arealen (peridysplastisch), ebenfalls in der Lamina V des cerebralen Cortex, untersucht.

Die Ergebnisse der qualitativen Auswertung der angefertigten Film-Autoradiogramme sowie der semiquantitativen Auswertung der Emulsions-Autoradiogramme der verschiedenen Areale werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.1. Immunhistochemische Evaluation des Gewebes

Die immunhistochemische Untersuchung der Gewebe diente dazu, die ausgeprägten Veränderungen der Zytoarchitektur in der fokalen Dysplasie hervorzuheben und die dysmorphen Areale zu identifizieren. Alle ausgewerteten Gewebe erfüllten die Kriterien einer nach Taylor klassifizierten kortikalen Dysplasie (Taylor et al. 1971). Die Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 (MAP2)-Färbung hebt die pathologisch veränderten Zellen hervor, da die dysplastischen Neurone und deren apikale Dendriten eine deutlich höhere Immunreaktivität aufweisen als die Neurone mit normaler Größe und Form in der kortikalen Dysplasie.

Abbildung 4.1 zeigt exemplarisch MAP2 positive dysplastische Neurone in der kortikalen Dysplasie, wobei sie in unterschiedlicher Vergrößerung dargestellt sind.

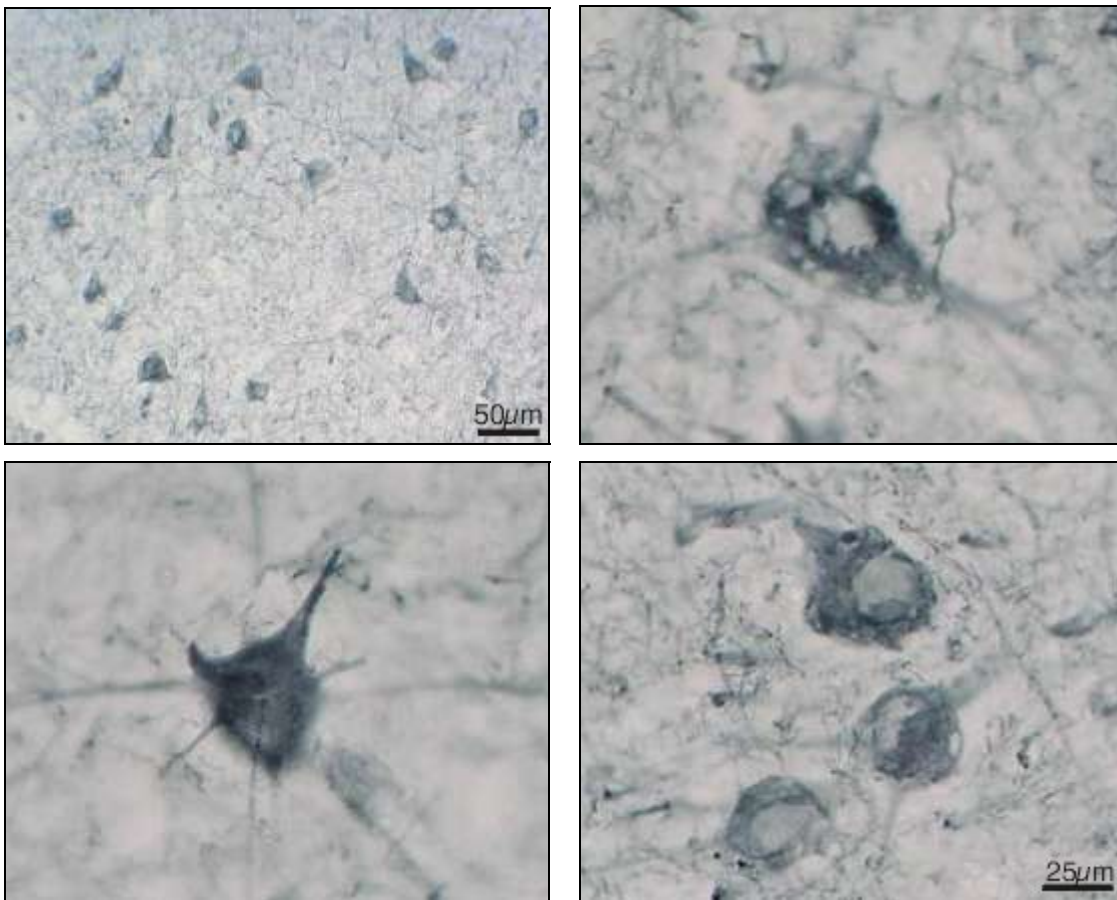


Abb. 4.1: Immunhistochemische Färbung des Mikrotubulus-assoziierten Protein 2 (MAP2) von dysplastischen Neuronen in der corticalen Dysplasie.

4.2. Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten mRNA

Ebenso wie bei der Untersuchung der GAD wurde bei den GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten sowohl eine makroskopische qualitative Film-Autoradiographie als auch eine mikroskopische semiquantitative Emulsions-Autoradiographie durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Untereinheiten beschrieben.

4.2.1. Film-Autoradiographien der Expression von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten mRNA im dysplastischen Gewebe

Es wurden Film-Autoradiographien der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$ - $\alpha 6$, $\beta 1$ - $\beta 3$ und $\gamma 1$ - $\gamma 3$ angefertigt. Sie dienen zur makroskopischen Beurteilung der verschiedenen Areale in der corticalen Dysplasie. Zudem konnte ein Überblick über die Signalintensität der verschiedenen Oligonukleotide gewonnen werden. Jedoch wurde auf eine Auswertung mittels Densitometrie verzichtet, da bei unterschiedlicher Zelldichte in den fokalen Dysplasien verfälschte Werte gemessen worden wären. So kön-

nen die hier dargestellten Film-Autoradiographien der dysplastischen Gewebe nicht mit dem Normalgewebe verglichen werden.

Abbildung 4.2 und 4.3 zeigen die Film-Autoradiographien der 12 oben genannten GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten. Es wird die Schnittserie eines der Resektate mit fokaler Dysplasie dargestellt. Im Einschub sind die Filmautoradiographien der entsprechenden Rezeptor-Untereinheiten eines *post mortem* Kontrollgewebes abgebildet. Wie schon erwähnt, ist allerdings aufgrund der unterschiedlichen Zelldichte in der kortikalen Dysplasie und dem Normalgewebe ein direkter makroskopischer Vergleich anhand der Film-Autoradiographien nicht möglich.

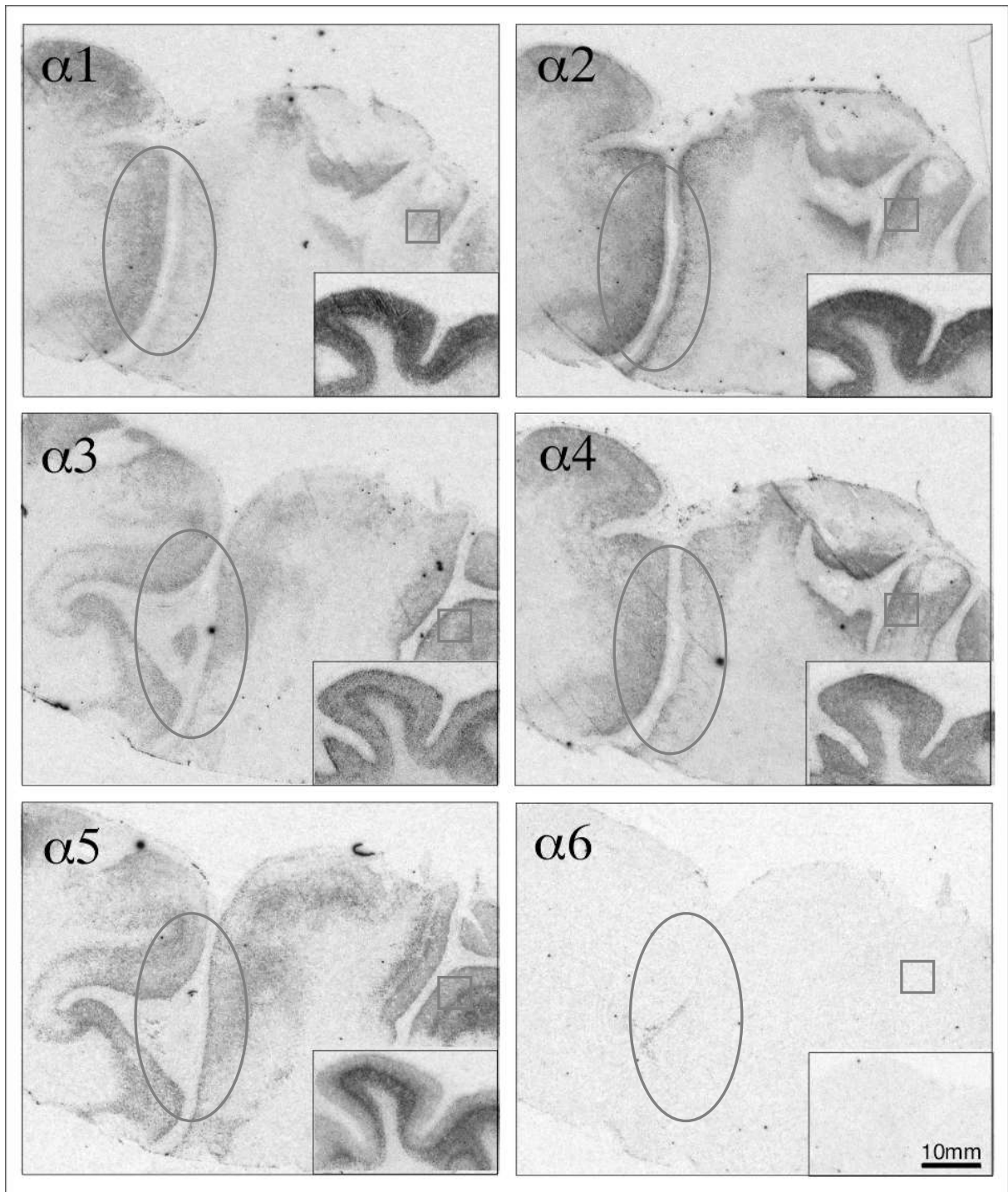


Abb. 4.2: Film-Autoradiographien der Expression von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$ - $\alpha 6$ mRNA in einem Resektat mit fokaler kortikaler Dysplasie. Das oval markierte Areal zeigt den dysplastischen Fokus. Das Rechteck kennzeichnet Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung. Im Einschub sind Filmautoradiographien der entsprechenden GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten eines *post mortem* Kontrollgewebes abgebildet.

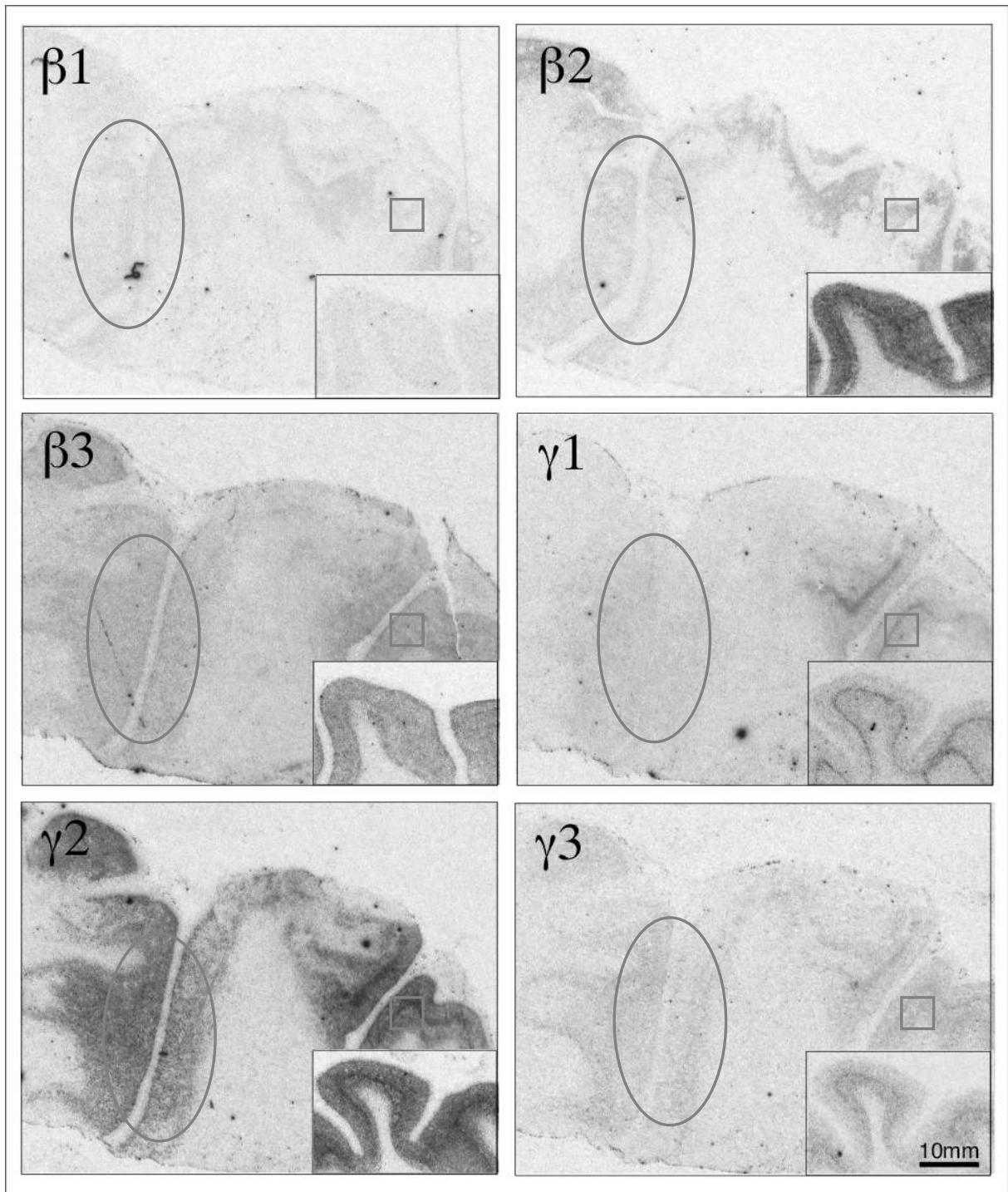


Abb. 4.3: Film-Autoradiographien der Expression von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\beta 1$ - $\beta 3$, $\gamma 1$ - $\gamma 3$ mRNA in einem Resektat mit fokaler kortikaler Dysplasie. Das oval markierte Areal zeigt den dysplastischen Fokus. Das Rechteck kennzeichnet Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung. Im Einschub sind Filmautoradiographien der entsprechenden GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten eines *post mortem* Kontrollgewebes abgebildet.

4.2.2. Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten mRNA in Pyramidenzellen

Bei der Auswertung der Untereinheiten $\alpha 1$ - $\alpha 5$ zeigte sich bei allen mit Ausnahme der Untereinheit $\alpha 2$ eine höhere Expression in den Pyramidenzellen der *post mortem* Kontrollgewebe im Vergleich zu den dysplastischen Neuronen und den peridysplastischen Pyramidenzellen. Bei der $\alpha 2$ -Untereinheit zeigte sich bei den Pyramidenzellen des *post mortem* Gewebes ein niedrigeres Signal als bei den peridysplastischen Pyramidenzellen. Dabei wiesen die dysplastischen Neurone im Verhältnis das höchste Signal auf. Bei allen α -Untereinheiten konnte eine höhere mRNA Expression in den dysplastischen Neuronen im Vergleich zu den peridysplastischen Pyramidenzellen nachgewiesen werden. Bei den Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 5$ war der Unterschied der ermittelten Werte nur marginal. Ein signifikanter Unterschied konnte bei keiner der untersuchten Untereinheiten gezeigt werden. Die Signalintensität war insgesamt relativ niedrig. Die Abbildungen 4.4-4.8 zeigen diesen Zusammenhang. Die statistische Auswertung der Ergebnisse ist in Tabelle 2 dargestellt. Wie bereits oben erwähnt wurde ebenfalls eine Hybridisierung der Gewebe mit einem Oligonukleotid der $\alpha 6$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors durchgeführt. Es konnte kein spezifisches Signal gemessen werden, da die $\alpha 6$ -Untereinheit im cerebralen Cortex nicht exprimiert wird (Fritschy und Brüning 2003; Mehta und Ticku 1999).

GABA_A $\alpha 1$ mRNA

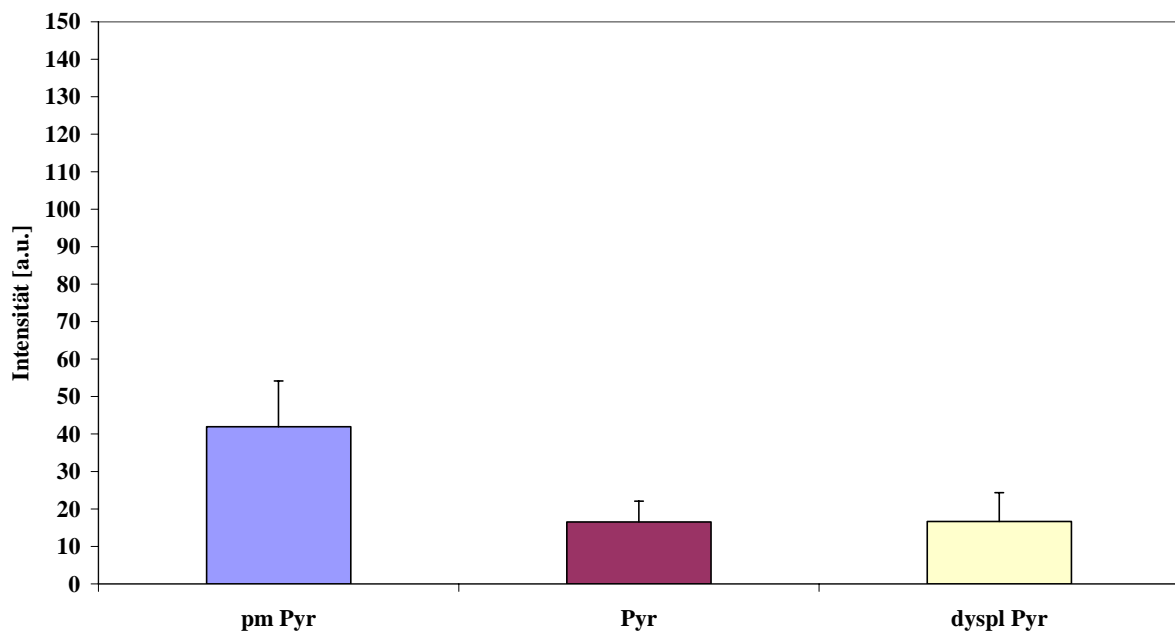


Abb. 4.4: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit $\alpha 1$ mRNA in Pyramidenzellen des *post mortem* Gewebes (pm Pyr), Pyramidenzellen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Pyr) und dysplastischen Pyramidenzellen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Pyr). Die Messwerte sind \pm SEM dargestellt.

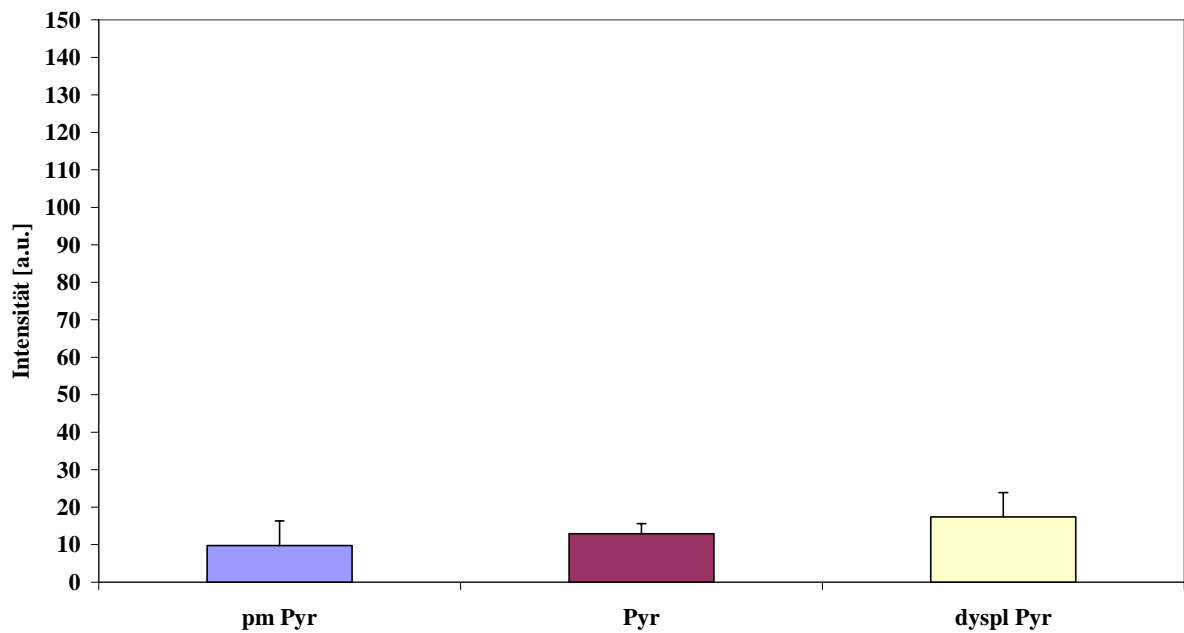
GABA_A α2 mRNA

Abb. 4.5: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit α2 mRNA in Pyramidenzellen des *post mortem* Gewebes (pm Pyr), Pyramidenzellen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Pyr) und dysplastischen Pyramidenzellen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Pyr). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

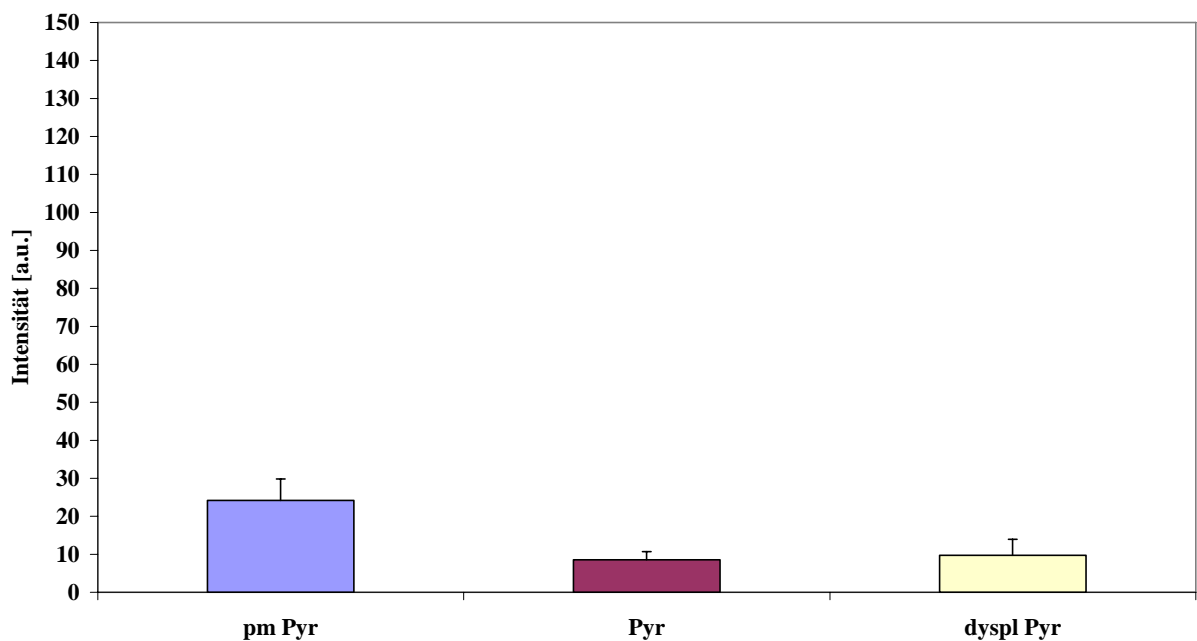
GABA_A α3 mRNA

Abb. 4.6: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit α3 mRNA in Pyramidenzellen des *post mortem* Gewebes (pm Pyr), Pyramidenzellen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Pyr) und dysplastischen Pyramidenzellen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Pyr). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

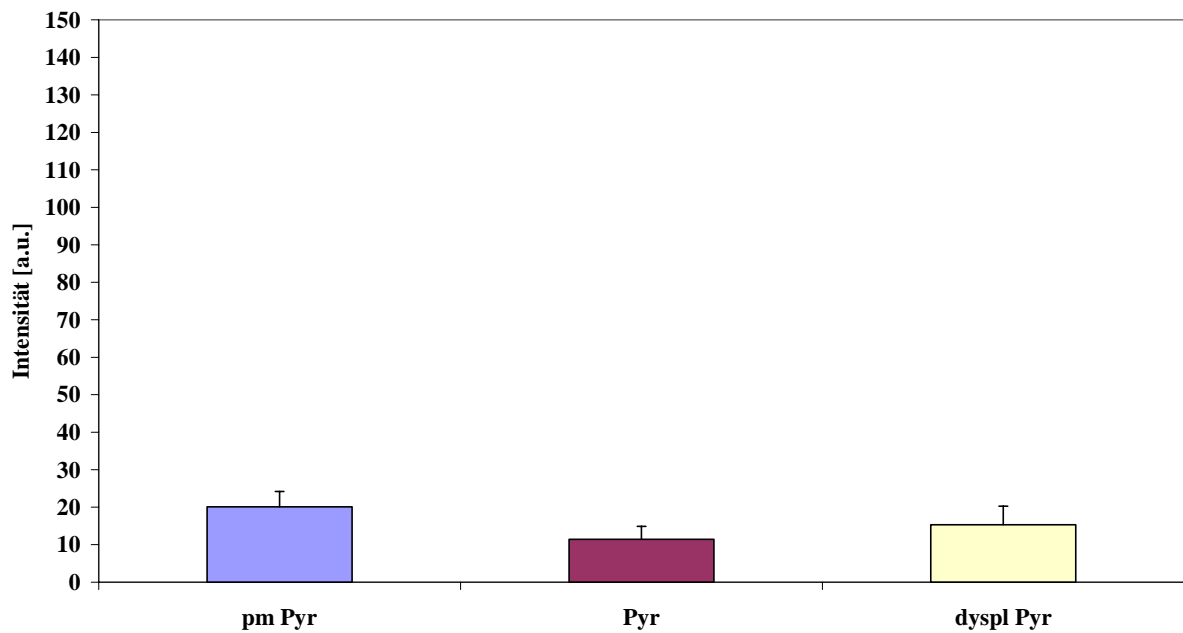
GABA_A α4 mRNA

Abb. 4.7: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit α4 mRNA in Pyramidenzellen des *post mortem* Gewebes (pm Pyr), Pyramidenzellen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Pyr) und dysplastischen Pyramidenzellen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Pyr). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

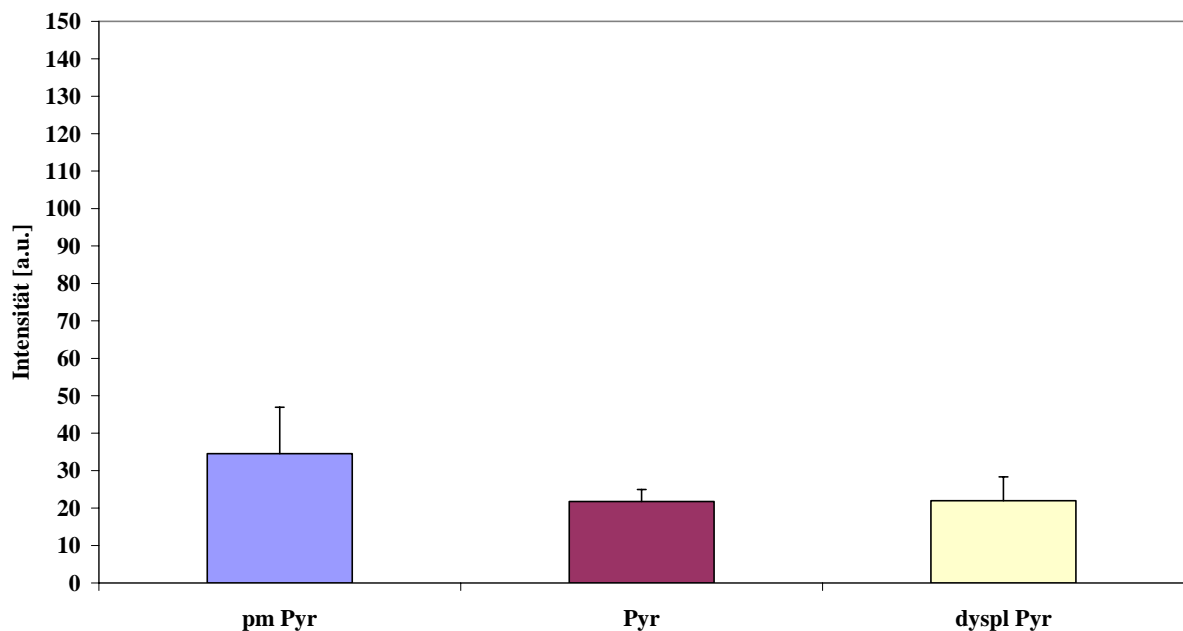
GABA_A α5 mRNA

Abb. 4.8: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit α5 mRNA in Pyramidenzellen des *post mortem* Gewebes (pm Pyr), Pyramidenzellen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Pyr) und dysplastischen Pyramidenzellen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Pyr). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

Bei den Untereinheiten $\beta 1$ - $\beta 3$ und $\gamma 1$ - $\gamma 3$ zeigte sich bei allen untersuchten Geweben im Verhältnis das niedrigste Signal bei den *post mortem* Kontrollgeweben. Bei $\beta 1$ und $\beta 2$ zeigte sich ein höheres Signal in den dysplastischen Neuronen im Vergleich zu den peridysplastischen Pyramidenzellen; bei den übrigen Untereinheiten $\beta 3$ und $\gamma 1$ - $\gamma 3$ ließ sich eine höhere mRNA Expression in den peridysplastischen Neuronen als in den dysplastischen Pyramidenzellen nachweisen. Die Unterschiede der Signalintensität war zwischen den peridysplastischen Pyramidenzellen und den dysplastischen Neuronen in den Epilepsiegeweben mit Ausnahme der Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 2$ relativ gering. Signifikante Unterschiede konnten bei der $\beta 2$ -Untereinheit zwischen den Pyramidenzellen in den *post mortem* Geweben und den dysplastischen Neuronen gezeigt werden. Die ermittelten Werte waren bei den dysplastischen Neuronen deutlich höher als bei den Pyramidenzellen in den *post mortem* Geweben.

Ein ebenfalls signifikanter Unterschied zeigte sich bei der $\gamma 1$ -Untereinheit zwischen den Pyramidenzellen in den *post mortem* Geweben und den peridysplastischen Pyramidenzellen. Die mRNA Expression war in den peridysplastischen Pyramidenzellen deutlich höher. In den folgenden Diagrammen sind die Mittelwerte der ausgewerteten Neurone der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\beta 1$ - $\beta 3$ und $\gamma 1$ - $\gamma 3$ dargestellt (siehe Abb. 4.9-4.14). Wie in Abschnitt 3.2.3.2. beschrieben wurden die ermittelten Graindichten in relative optische Dichte umgerechnet und diese Werte auf die Anzahl der radioaktiven Zerfälle in Abhängigkeit von der spezifischen Aktivität der markierten Oligonukleotidproben normalisiert. Die statistische Auswertung der Ergebnisse ist in Tabelle 2 dargestellt.

GABA_A $\beta 1$ mRNA

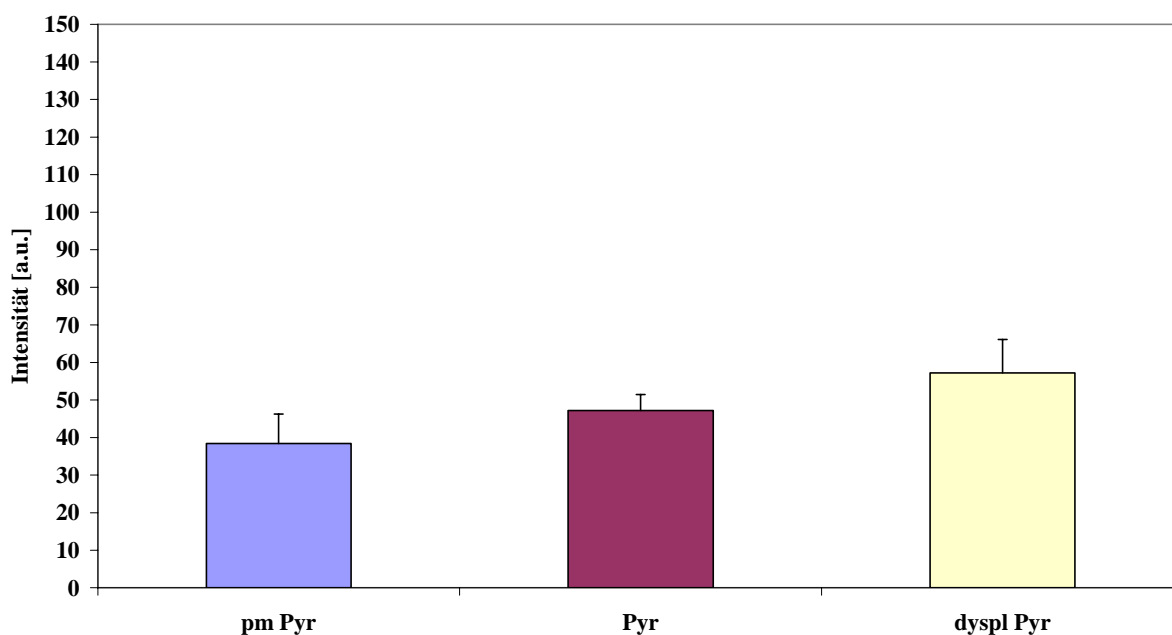


Abb. 4.9: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit $\beta 1$ mRNA in Pyramidenzellen des *post mortem* Gewebes (pm Pyr), Pyramidenzellen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Pyr) und dysplastischen Pyramidenzellen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Pyr). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

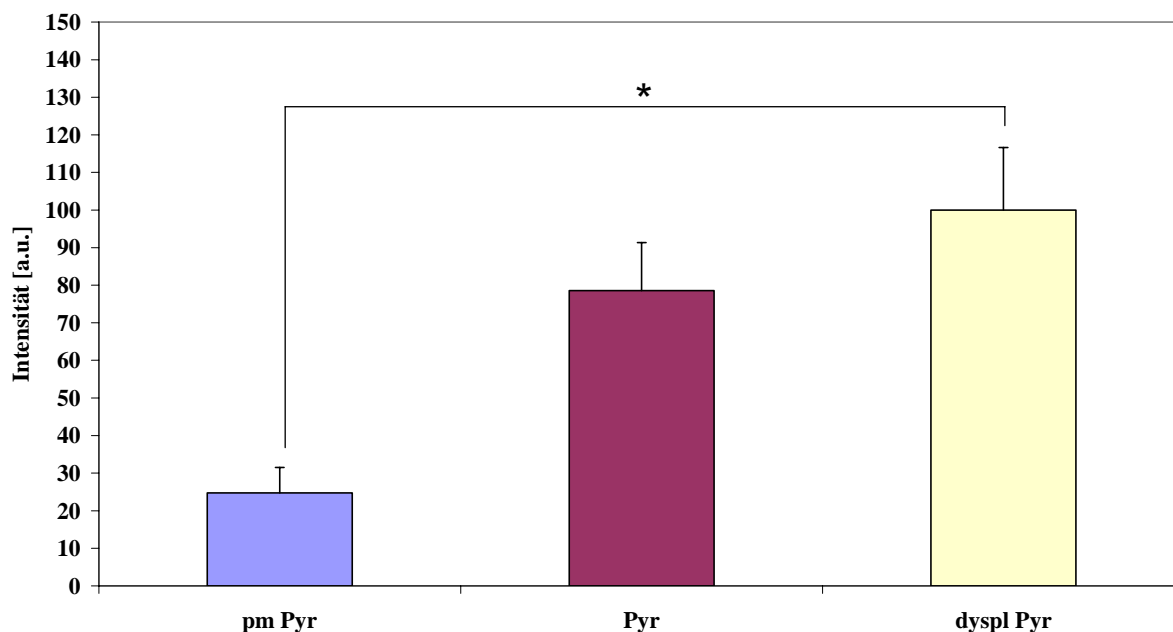
GABA_A β2 mRNA

Abb. 4.10: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit β2 mRNA in Pyramidenzellen des *post mortem* Gewebes (pm Pyr), Pyramidenzellen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridyplastisch, Pyr) und dysplastischen Pyramidenzellen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Pyr). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Werten der verschiedenen Neurone sind (*) gekennzeichnet (ANOVA; $p < 0,05$).

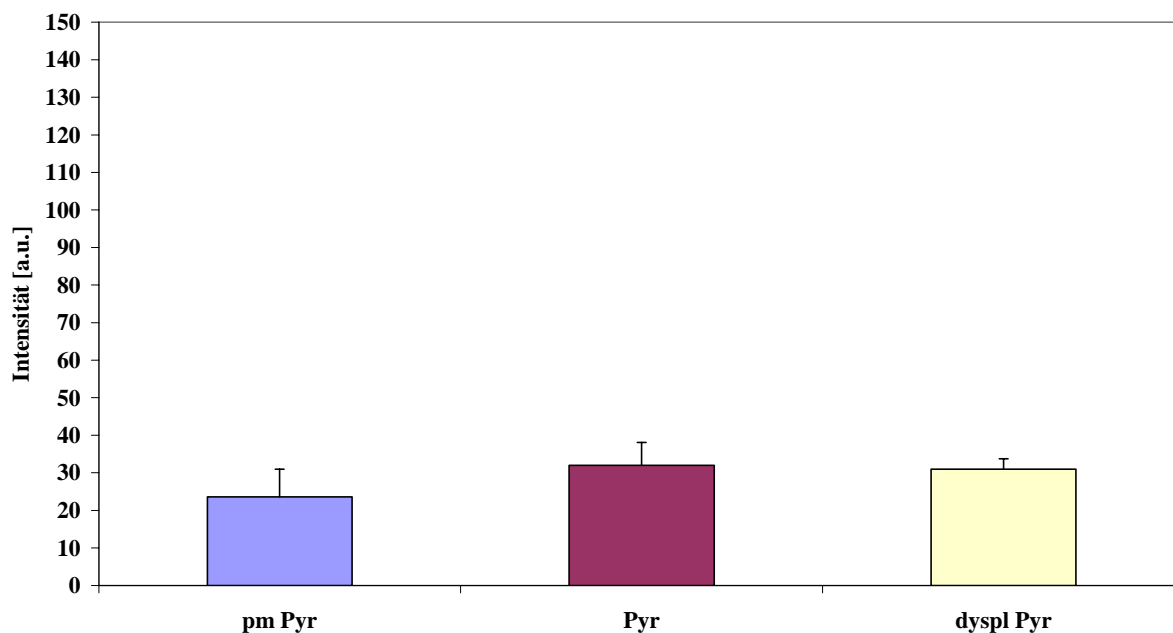
GABA_A β3 mRNA

Abb. 4.11: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit β3 mRNA in Pyramidenzellen des *post mortem* Gewebes (pm Pyr), Pyramidenzellen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridyplastisch, Pyr) und dysplastischen Pyramidenzellen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Pyr). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

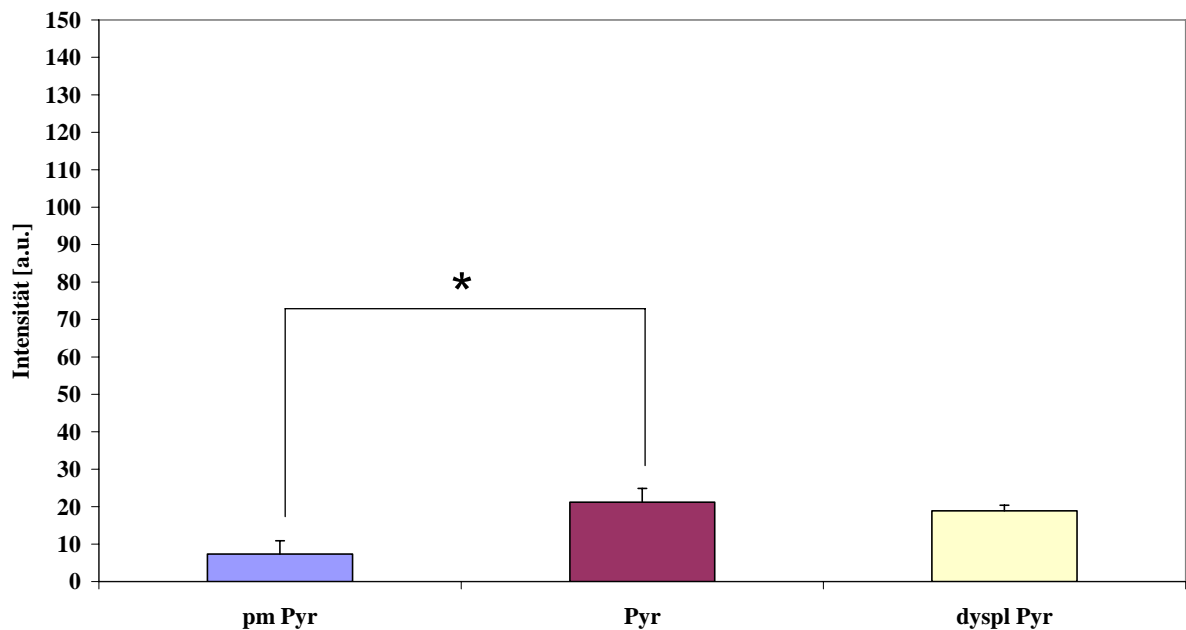
GABA_A γ 1 mRNA

Abb. 4.12: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit γ 1 mRNA in Pyramidenzellen des *post mortem* Gewebes (pm Pyr), Pyramidenzellen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Pyr) und dysplastischen Pyramidenzellen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Pyr). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Werten der verschiedenen Neurone sind (*) gekennzeichnet (ANOVA; $p < 0,05$).

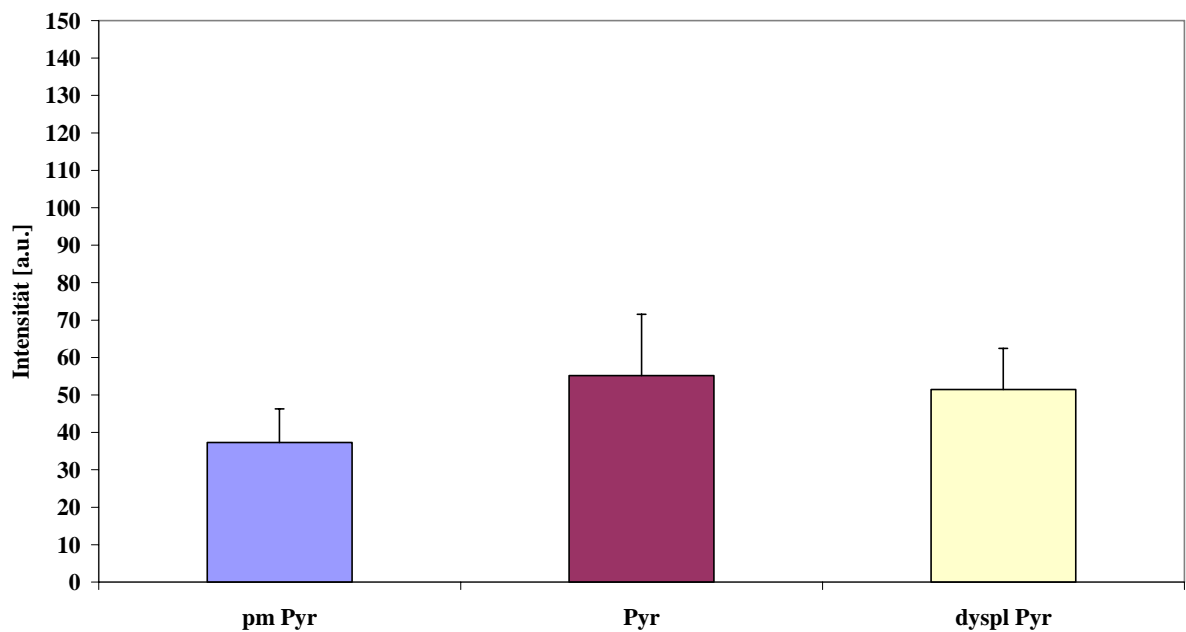
GABA_A γ 2 mRNA

Abb. 4.13: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit γ 2 mRNA in Pyramidenzellen des *post mortem* Gewebes (pm Pyr), Pyramidenzellen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Pyr) und dysplastischen Pyramidenzellen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Pyr). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

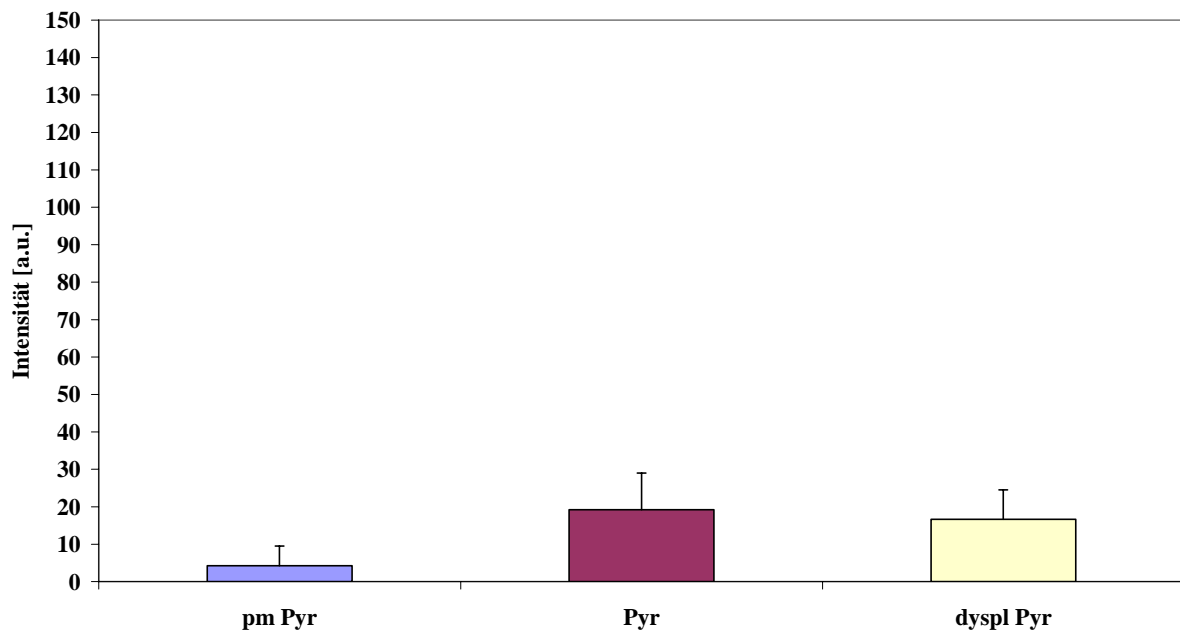
GABA_A γ 3 mRNA

Abb. 4.14: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit γ 3 mRNA in Pyramidenzellen des *post mortem* Gewebes (pm Pyr), Pyramidenzellen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Pyr) und dysplastischen Pyramidenzellen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Pyr). Die Messwerte sind \pm SEM dargestellt.

Tabelle 2: Statistische Auswertung der Flüssig-Emulsions-Autoradiographien von GABA_A-Rezeptoruntereinheiten der Pyramidenneurone.

<i>mRNA</i> <i>Transkript</i>	ANOVA			Posthoc-Test (Bonferroni) p		
	F	df	p	postmortem-Kontrollgewebe vs. peridysplastische Neuronen	postmortem-Kontrollgewebe vs. dysplastische Neuronen	peridysplastische vs. dysplastische Neuronen
GABA _A α 1	2,654	2, 11	0,124	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A α 2	0,441	2, 11	0,657	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A α 3	3,817	2, 11	0,063	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A α 4	0,798	2, 11	0,480	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A α 5	0,877	2, 11	0,449	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A β 1	1,424	2, 11	0,290	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A β 2	6,225	2, 11	0,020	p > 0,05	p < 0,05	p > 0,05
GABA _A β 3	0,695	2, 11	0,524	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A γ 1	5,891	2, 11	0,023	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A γ 2	0,436	2, 11	0,660	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A γ 3	2,846	2, 9	0,125	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

4.2.3. Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten mRNA in Interneuronen

Die Auswertung der Untereinheiten α 1- α 5 bei den Interneuronen zeigte insgesamt ein relativ niedriges Signal. Bei der α 1-Untereinheit war die höchste Signalintensität bei den peridysplastischen Interneuronen zu messen. Im Vergleich niedriger lagen die Werte der Interneurone in der Dysplasie und am niedrigsten bei den Interneuronen in den *post mortem* Geweben. Ebenso zeigte sich bei der Untereinheit α 2 das niedrigste Signal bei den Interneuronen der *post mortem* Gewebe, etwas höher lag es bei den peridysplastischen Interneuronen und am höchsten bei den Interneuronen in der Dysplasie. Die ermittelten Ergebnisse der α 3-Untereinheit zeigten die höchsten Werte bei den Interneuronen in den *post mortem* Geweben, etwas niedriger bei den Interneuronen in der Dysplasie und die niedrigsten Werte wiesen die peridysplastischen Interneurone auf. Die Signalintensität bei der α 4-Untereinheit war bei den Interneuronen in der Dysplasie und den peridysplastischen Interneuronen gleich hoch. Die Interneurone in den *post mortem* Geweben zeigten ein etwas niedrigeres Signal. Bei der α 5-Untereinheit war der höchste Wert ebenso wie bei α 3 bei den Interneuronen in den *post mortem* Geweben zu messen, etwas niedriger lag die mRNA Expression in den peridysplastischen Interneuronen und am niedrigsten bei den Interneuronen in der Dysplasie. Ein signifikanter Unterschied ließ sich bei den einzelnen α -Untereinheiten zwischen den untersuchten Zellen der verschiedenen Gewebe nicht zeigen. In den Abbildungen 4.15-4.19 sind die Mittelwerte der ausgewerteten Interneurone dargestellt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse ist in Tabelle 3 dargestellt. Wie bei den Pyramidenzellen wurde auch hier eine Hybridisierung der Gewebe mit einem Oligonukleotid der α 6-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors durchgeführt. Es konnte ebenfalls kein spezifisches Signal gemessen werden.

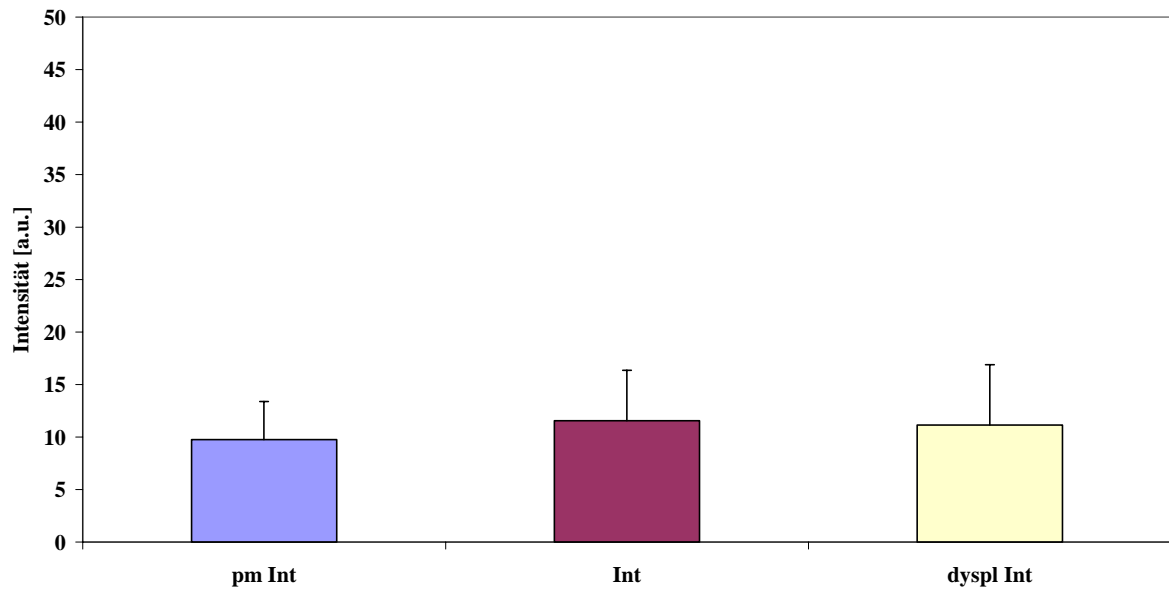
GABA_A α1 mRNA

Abb. 4.15: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit α1 mRNA in Interneuronen des *post mortem* Gewebes (pm Int), Interneuronen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Int) und Interneuronen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Int). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

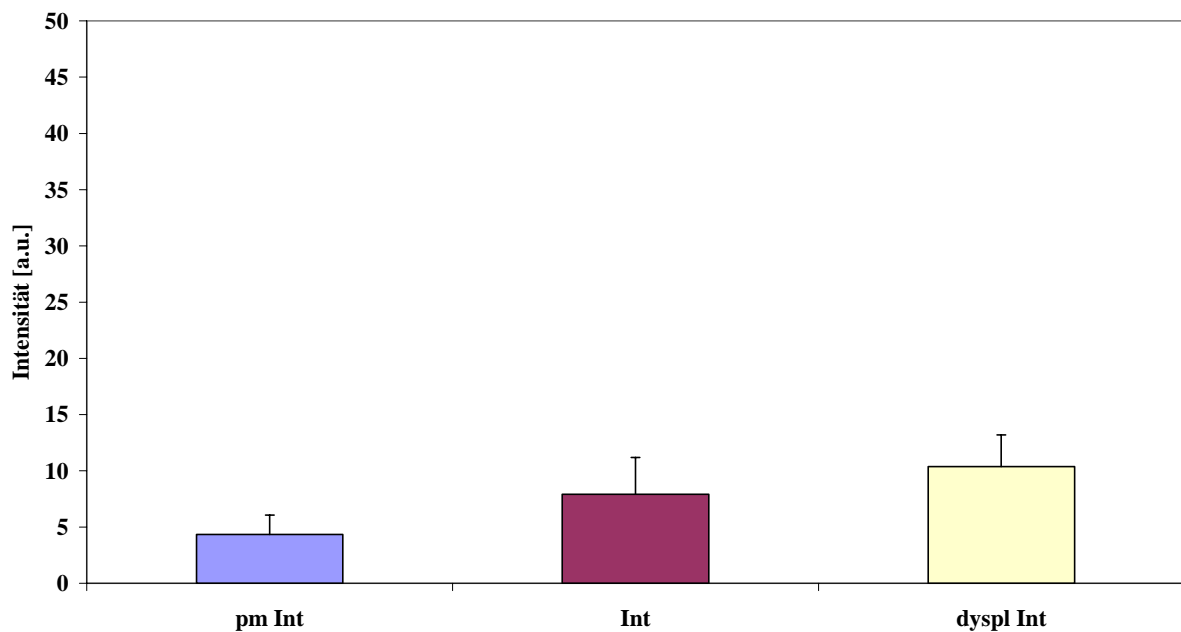
GABA_A α2 mRNA

Abb. 4.16: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit α2 mRNA in Interneuronen des *post mortem* Gewebes (pm Int), Interneuronen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Int) und Interneuronen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Int). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

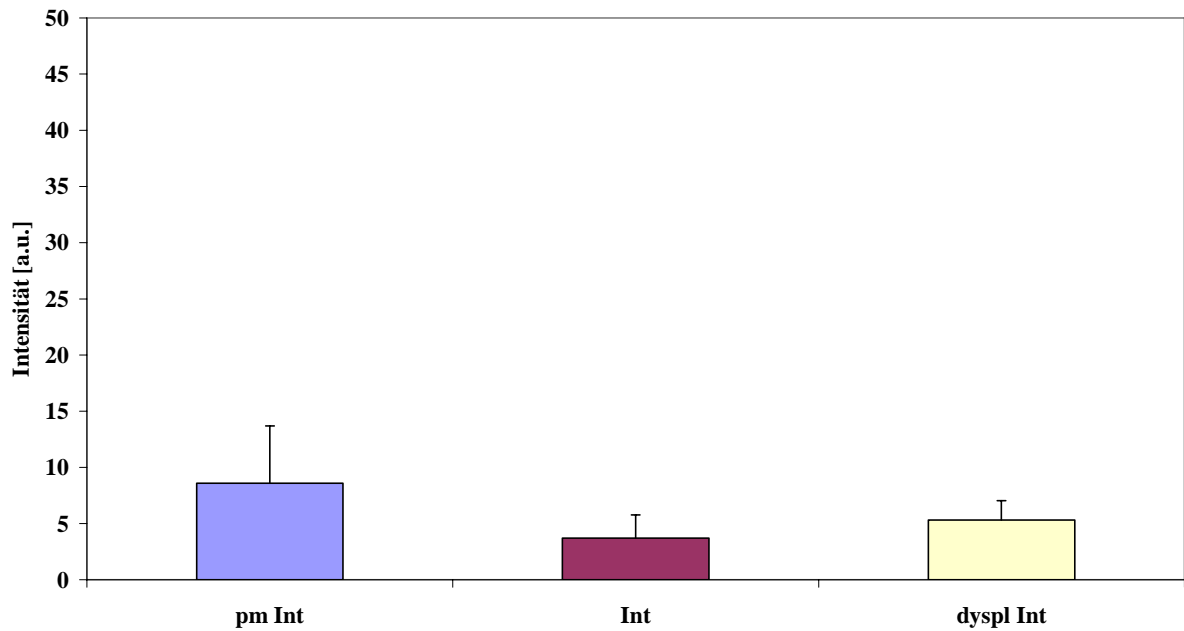
GABA_A α3 mRNA

Abb. 4.17: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit α3 mRNA in Interneuronen des *post mortem* Gewebes (pm Int), Interneuronen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Int) und Interneuronen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Int). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

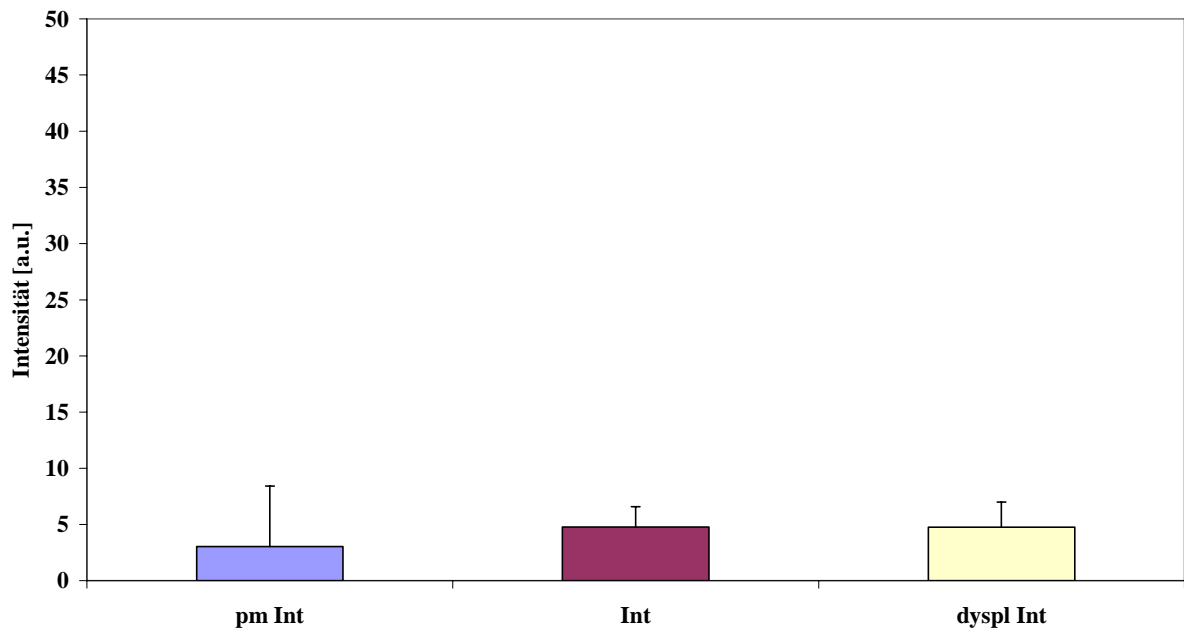
GABA_A α4 mRNA

Abb. 4.18: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit α4 mRNA in Interneuronen des *post mortem* Gewebes (pm Int), Interneuronen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Int) und Interneuronen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Int). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

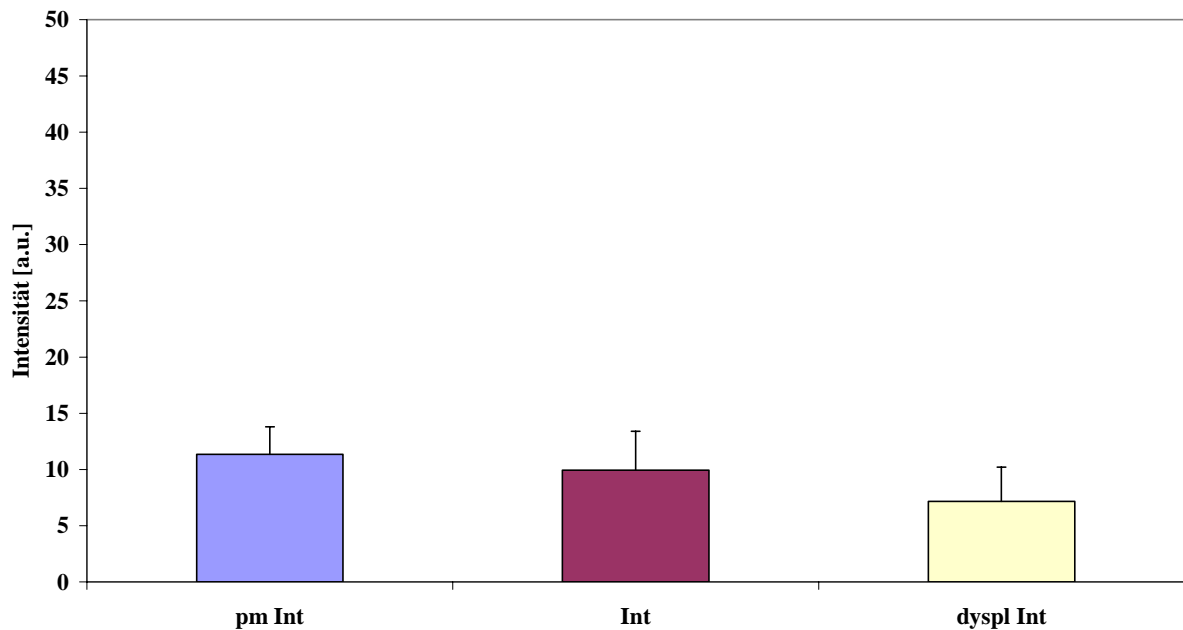
GABA_A α5 mRNA

Abb. 4.19: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit α5 mRNA in Interneuronen des *post mortem* Gewebes (pm Int), Interneuronen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Int) und Interneuronen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Int). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

Bei der Auswertung der Untereinheiten β1-β3 und γ1-γ3 zeigte sich bei den Interneuronen in den *post mortem* Geweben die niedrigste mRNA Expression bei allen Untereinheiten. Die höchste Signalintensität war bei den dysplastischen Interneuronen mit einer Ausnahme zu messen. Bei der Untereinheit β3 war der höchste Wert bei den peridysplastischen Interneuronen zu ermitteln, auf einem etwas niedrigeren Niveau lag der Wert der dysplastischen Interneurone. Bei den Untereinheiten β2, γ1 und γ3 zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Interneuronen der *post mortem* Gewebe und den Interneuronen in der Dysplasie.

Die Signalintensität lag insgesamt bei den β- und γ-Untereinheiten auf einem relativ niedrigen Niveau (siehe Abb. 4.20-4.25). Die statistische Auswertung der Ergebnisse ist in Tabelle 3 dargestellt.

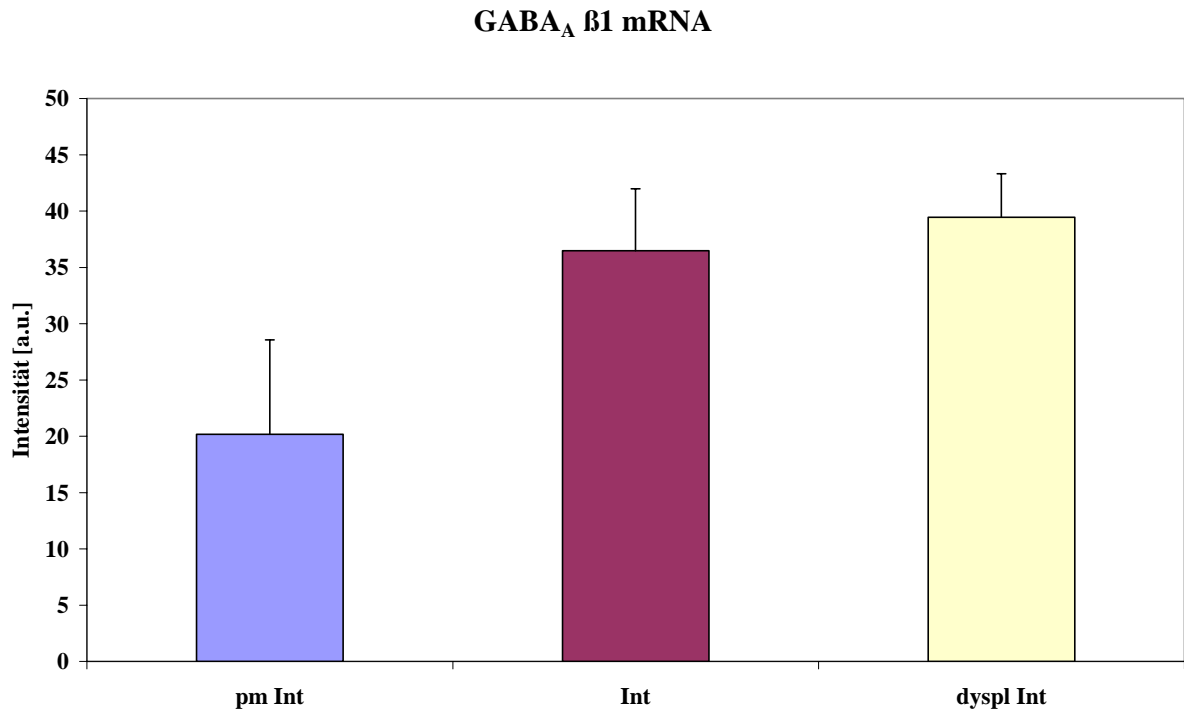


Abb. 4.20: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit β1 mRNA in Interneuronen des *post mortem* Gewebes (pm Int), Interneuronen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Int) und Interneuronen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Int). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

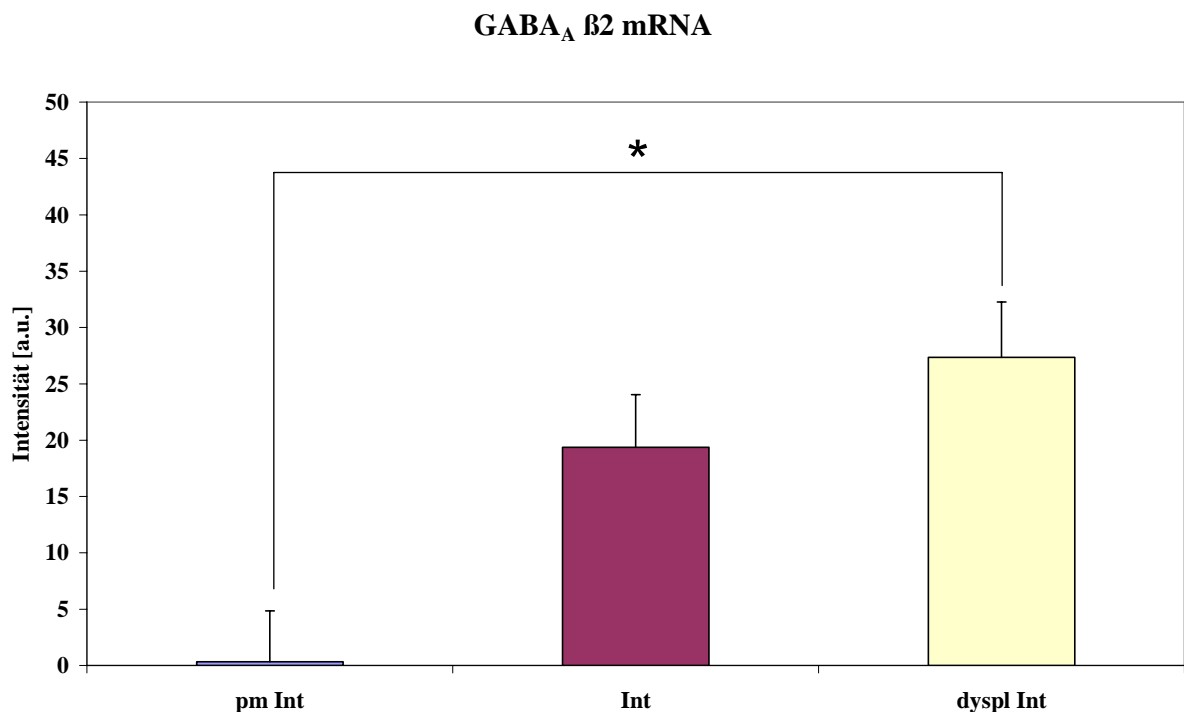


Abb. 4.21: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit β2 mRNA in Interneuronen des *post mortem* Gewebes (pm Int), Interneuronen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Int) und Interneuronen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Int). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Werten der verschiedenen Neurone sind (*) gekennzeichnet (ANOVA; $p < 0,05$).

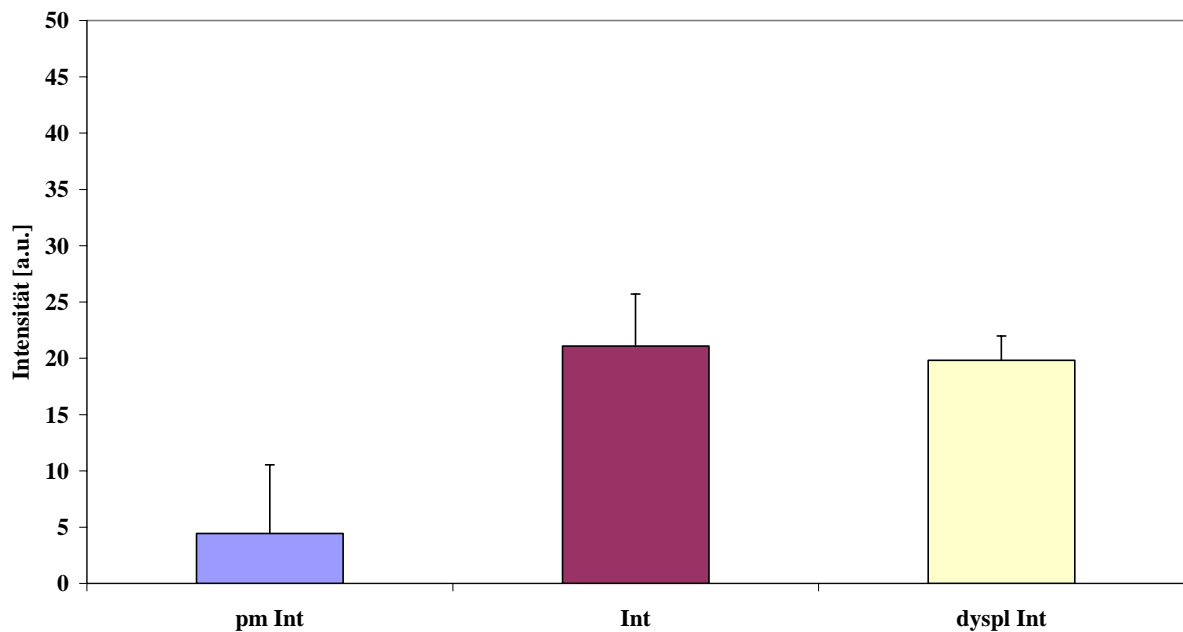
GABA_A β3 mRNA

Abb. 4.22: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit β3 mRNA in Interneuronen des *post mortem* Gewebes (pm Int), Interneuronen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Int) und Interneuronen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Int). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

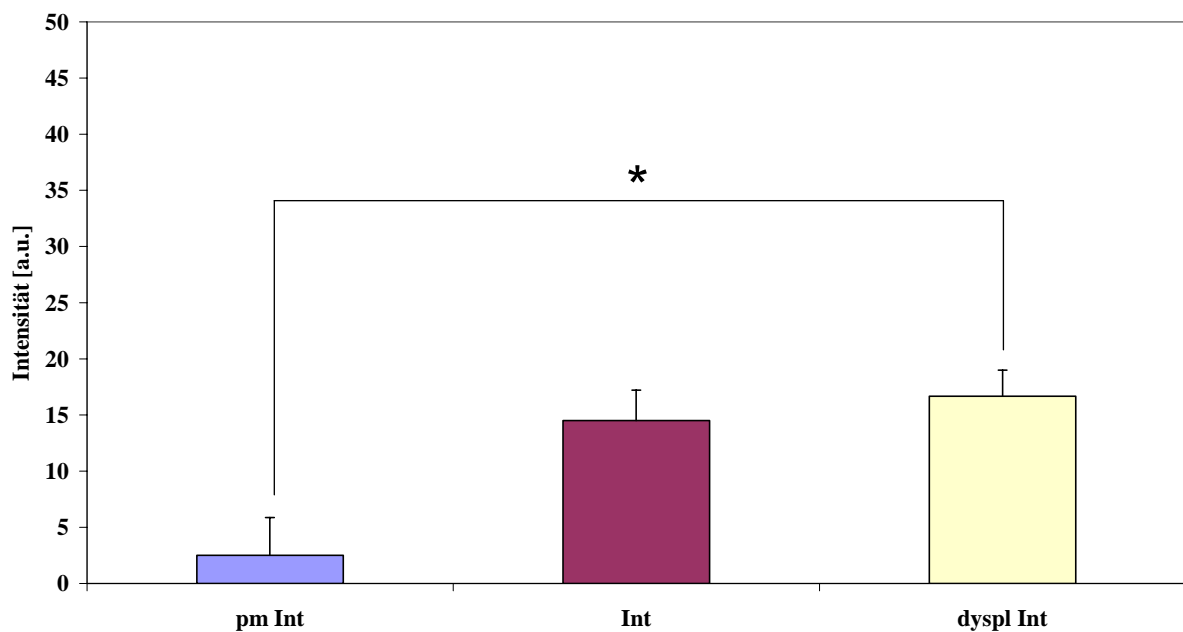
GABA_A γ1 mRNA

Abb. 4.23: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit γ1 mRNA in Interneuronen des *post mortem* Gewebes (pm Int), Interneuronen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Int) und Interneuronen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Int). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Werten der verschiedenen Neurone sind (*) gekennzeichnet (ANOVA; $p < 0,05$).

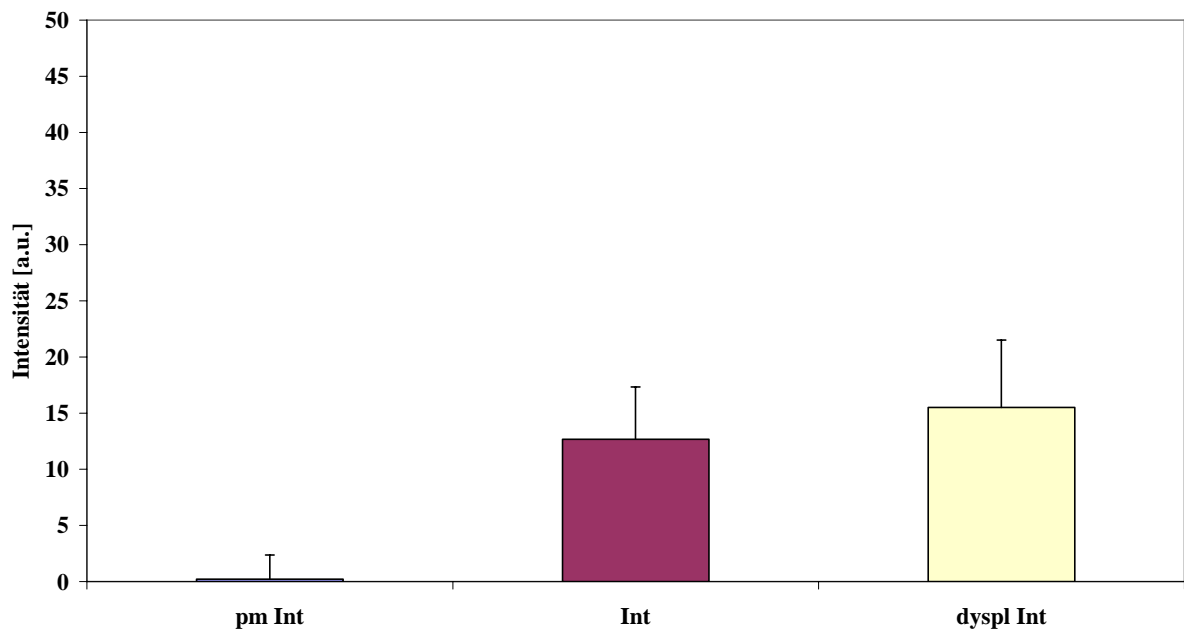
GABA_A γ 2 mRNA

Abb. 4.24: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit γ 2 mRNA in Interneuronen des *post mortem* Gewebes (pm Int), Interneuronen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Int) und Interneuronen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Int). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

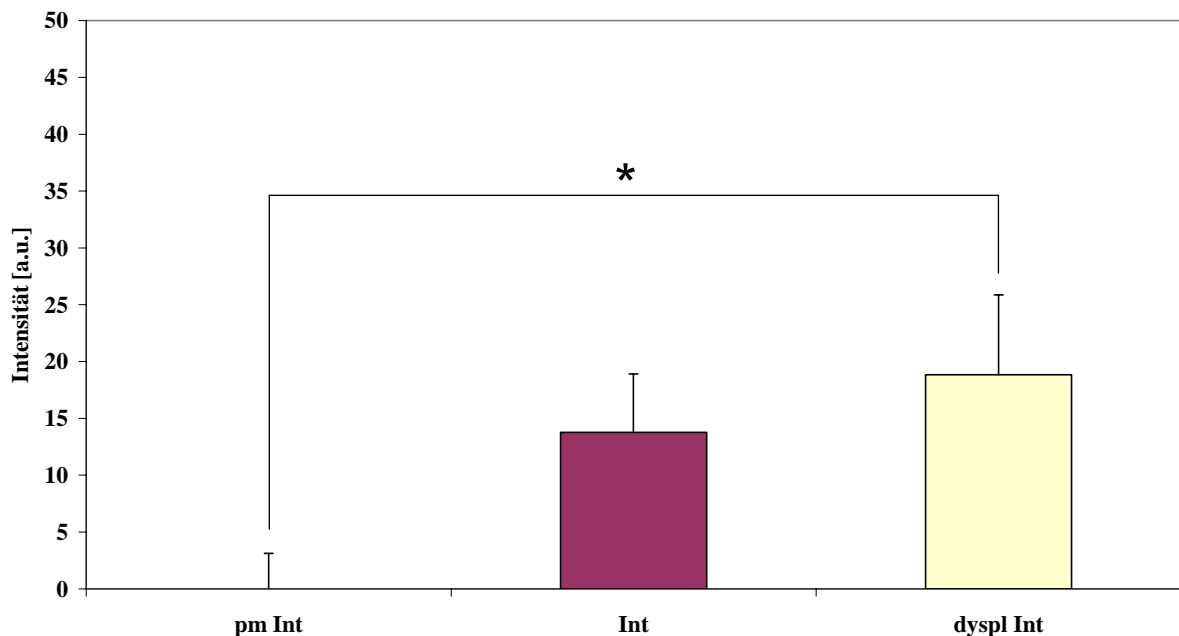
GABA_A γ 3 mRNA

Abb. 4.25: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheit γ 3 mRNA in Interneuronen des *post mortem* Gewebes (pm Int), Interneuronen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Int) und Interneuronen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Int). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Werten der verschiedenen Neurone sind (*) gekennzeichnet (ANOVA; $p < 0,05$).

Tabelle 3: Statistische Auswertung der Flüssig-Emulsions-Autoradiographien von GABA_A-Rezeptoruntereinheiten der Interneurone.

<i>mRNA Transkript</i>	ANOVA			Posthoc-Test (Bonferroni) p		
	F	df	p	postmortem- Kontrollgewebe vs. peridysplastische Neuronen	postmortem- Kontrollgewebe vs. dysplastische Neuronen	peridysplastische vs. dysplastische Neuronen
GABA _A α1	0,025	2, 11	0,975	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A α2	1,008	2, 11	0,403	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A α3	0,702	2, 11	0,521	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A α4	0,099	2, 11	0,906	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A α5	0,448	2, 11	0,652	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A β1	3,100	2, 11	0,095	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A β2	7,206	2, 11	0,014	p > 0,05	p < 0,05	p > 0,05
GABA _A β3	4,523	2, 11	0,044	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A γ1	6,883	2, 11	0,015	p > 0,05	p < 0,05	p > 0,05
GABA _A γ2	2,059	2, 11	0,184	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
GABA _A γ3	8,480	2, 9	0,014	p > 0,05	p < 0,05	p > 0,05

In den Abbildungen 4.26 und 4.27 sind die Emulsions-Autoradiographien der 12 untersuchten GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten dargestellt. Sie zeigen dysplastische Pyramidenzellen und Interneurone in einem Resektat mit kortikaler Dysplasie.

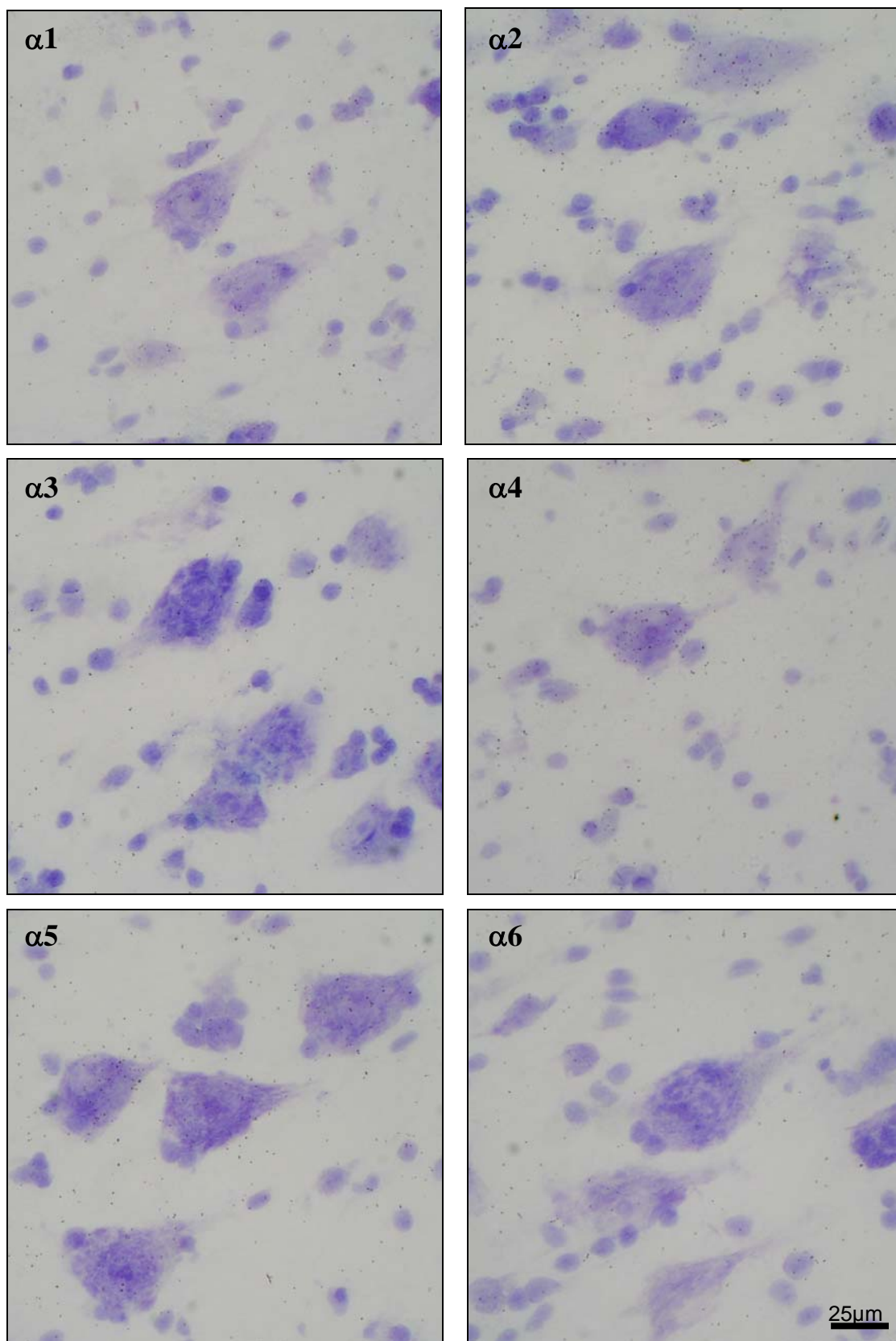


Abb. 4.26: Emulsions-Autoradiographien der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$ - $\alpha 6$. Abgebildet sind dysplastische Pyramidenzellen und Interneurone in der corticalen Dysplasie.

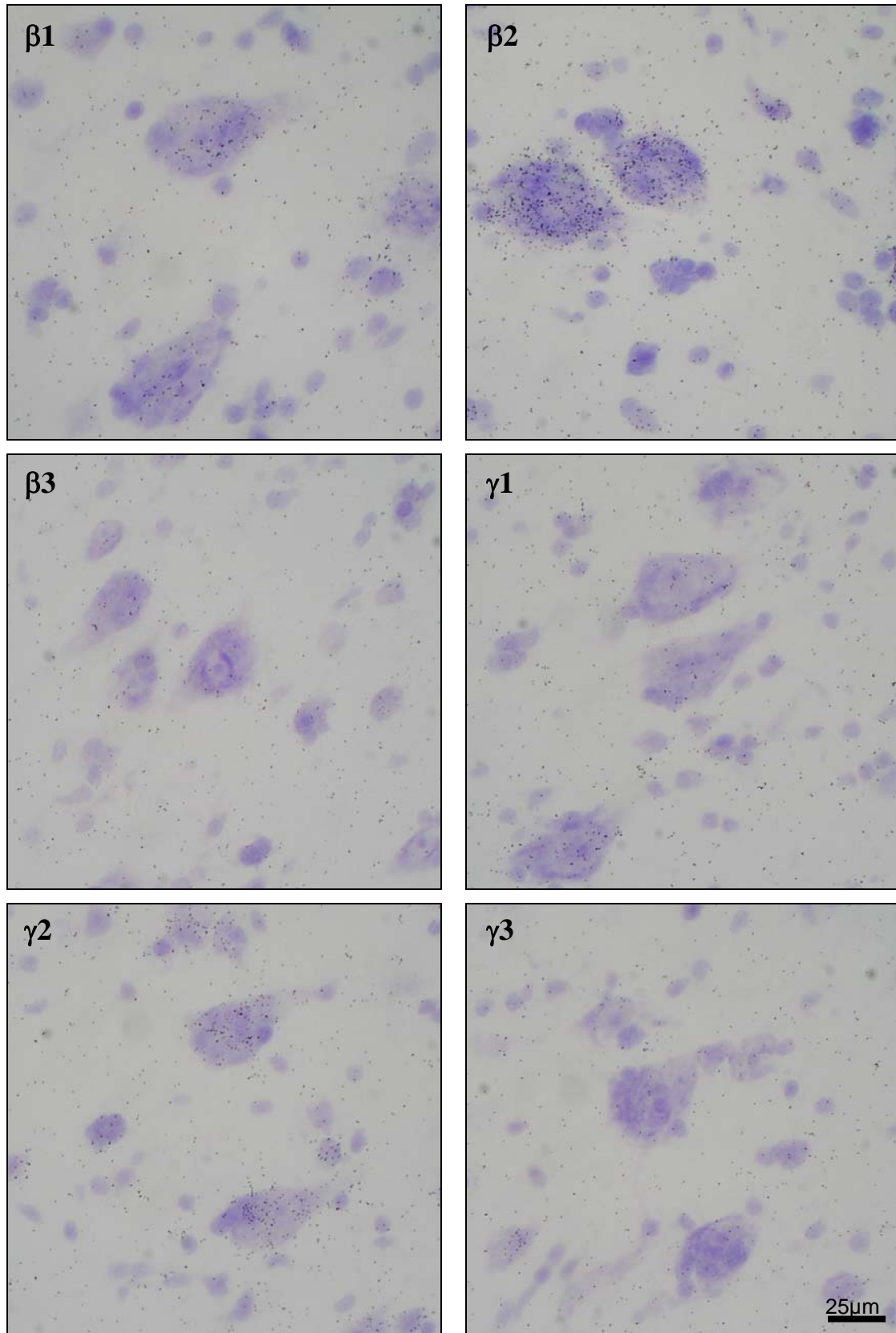


Abb.4.27: Emulsions-Autoradiographien der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\beta 1$ - $\beta 3$ und $\gamma 1$ - $\gamma 3$. Abgebildet sind dysplastische Pyramidenzellen und Interneurone in der kortikalen Dysplasie.

4.3. Expression der GAD mRNA

Ebenso wie bei der Untersuchung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten erfolgte der Nachweis der GAD67 mRNA zum einen makroskopisch durch qualitative Film-Autoradiographie und zum anderen mikroskopisch durch semiquantitative Emulsions-Autoradiographie, wie im Folgenden gezeigt wird.

4.3.1. Film-Autoradiographie der Expression von GAD67 mRNA im dysplastischen Gewebe

Auch hier dienten die Film-Autoradiogramme dazu, die dysplastischen Areale anhand der pathologisch veränderten Gyrierung der Gewebe zu identifizieren und einen Überblick bezüglich der Signalintensität der GAD67 mRNA zu erhalten. Zudem wurden die Gewebeschnitte mit unmarkierter Probe, wie oben beschrieben, als Kontrolle gegen Röntgenfilm exponiert.

Eine Film-Autoradiographie der GAD67 wird in Abbildung 4.28 dargestellt. Sie zeigt eine fokale kortikale Dysplasie aus dem Resektat eines epilepsie-chirurgisch behandelten Patienten. Die gekennzeichneten Areale zeigen zum einen den dysplastischen Fokus, zum anderen Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung. Im Einschub ist die Film-Autoradiographie der GAD67 eines Kontrollgewebes abgebildet, um einen Eindruck der Signalintensität zu gewinnen. Auf eine densitometrische Messung wurde aus schon genanntem Grund verzichtet. So können auch die hier dargestellten Film-Autoradiographien der dysplastischen Gewebe nicht mit dem Normalgewebe verglichen werden.

Anhand der Filme wurde eine Vorauswahl der dysplastischen Areale getroffen, die im Weiteren bei der Auswertung der Emulsions-Autoradiographien mikroskopisch untersucht wurden.

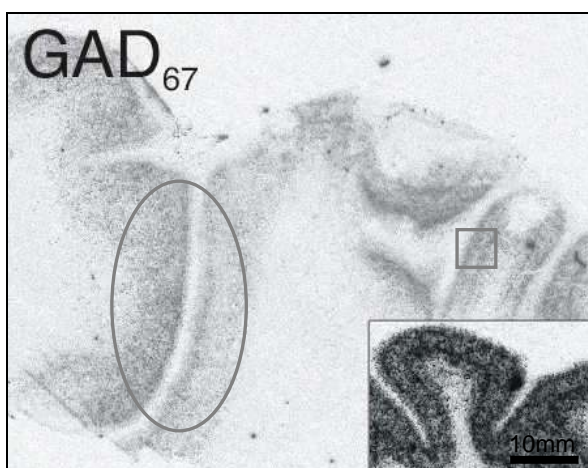


Abb. 4.28: Film-Autoradiographie der Expression von GAD67 mRNA in einem Resektat mit kortikaler Dysplasie. Das oval markierte Areal zeigt den dysplastischen Fokus. Das Rechteck kennzeichnet Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung. Im Einschub ist die Filmautoradiographie der GAD67 eines *post mortem* Kontrollgewebes abgebildet.

4.3.2. Expression der GAD67 mRNA in Pyramidenzellen

In den Resektaten der epilepsie-chirurgisch behandelten Patienten zeigten sich in den Emulsions-Autoradiographien nur geringe Mengen an Silberkörnern über den Pyramidenzellen, entsprechend einer geringen Expression von GAD67. Ausgewertet wurden sowohl dysplastische Neurone als auch peridysplastische Pyramidenzellen. Dabei ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Expression der GAD67 mRNA nachweisen. Die GAD67 ist etwas niedriger im Normalgewebe als in den Epilepsie-Geweben, sowohl im dysplastischen als auch im peridysplastischen Gewebe, exprimiert (siehe Abb. 4.29). Die statistische Auswertung der Ergebnisse ist in Tabelle 4 dargestellt.

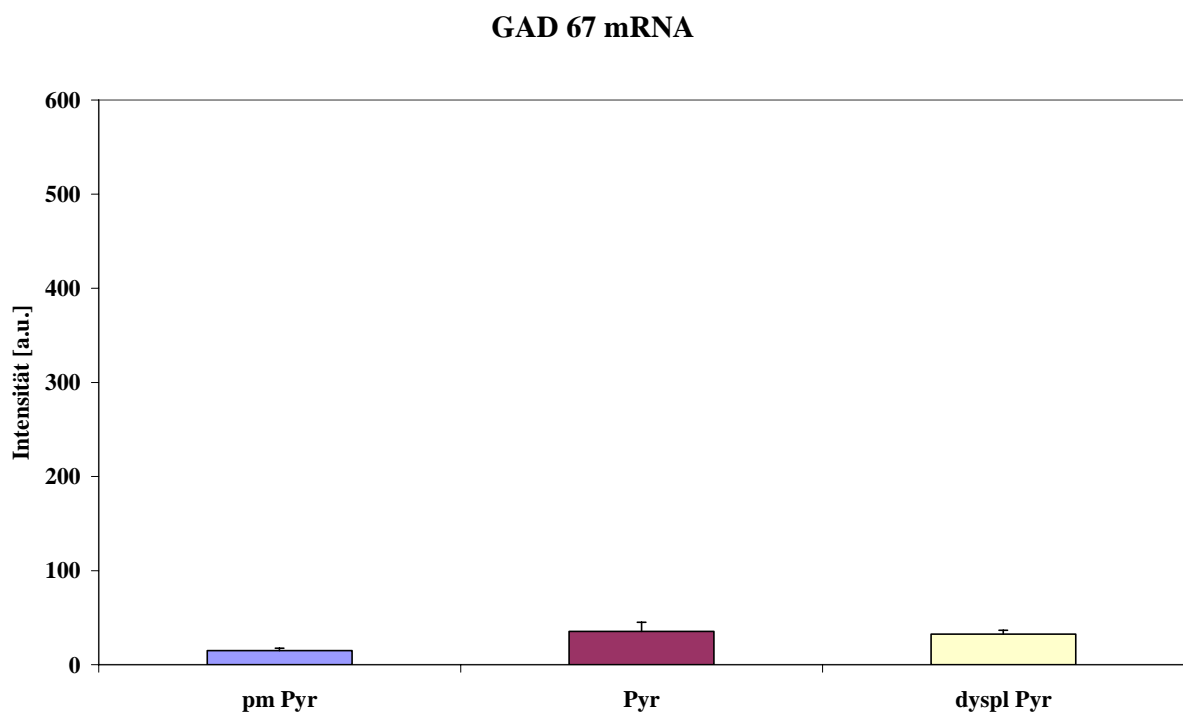


Abb.4.29: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression von GAD67 mRNA in Pyramidenzellen des *post mortem* Gewebes (pm Pyr), Pyramidenzellen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler kortikaler Laminierung (peridysplastisch, Pyr) und dysplastischen Pyramidenzellen in der kortikalen Dysplasie (dyspl Pyr). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt.

4.3.3. Expression der GAD67 mRNA in Interneuronen

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen der GAD67 Expression der Interneurone in den peridysplastischen Arealen und den Interneuronen im dysplastischen Cortex. Die Interneurone in der Dysplasie zeigten ein signifikant höheres Signal als die Interneurone im umgebenden Gewebe. Über den Interneuronen des Kontrollgewebes ließ sich ein höheres Signal als über den Interneuronen im peridysplastischen Gewebe messen, jedoch lag die Expression der GAD mRNA deutlich niedriger als in den dysplastischen Zellen (siehe Abb.4.30).

In Abbildung 4.31 sind sowohl Interneurone als auch dysplastische Neurone in der corticalen Dysplasie dargestellt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse ist in Tabelle 4 dargestellt.

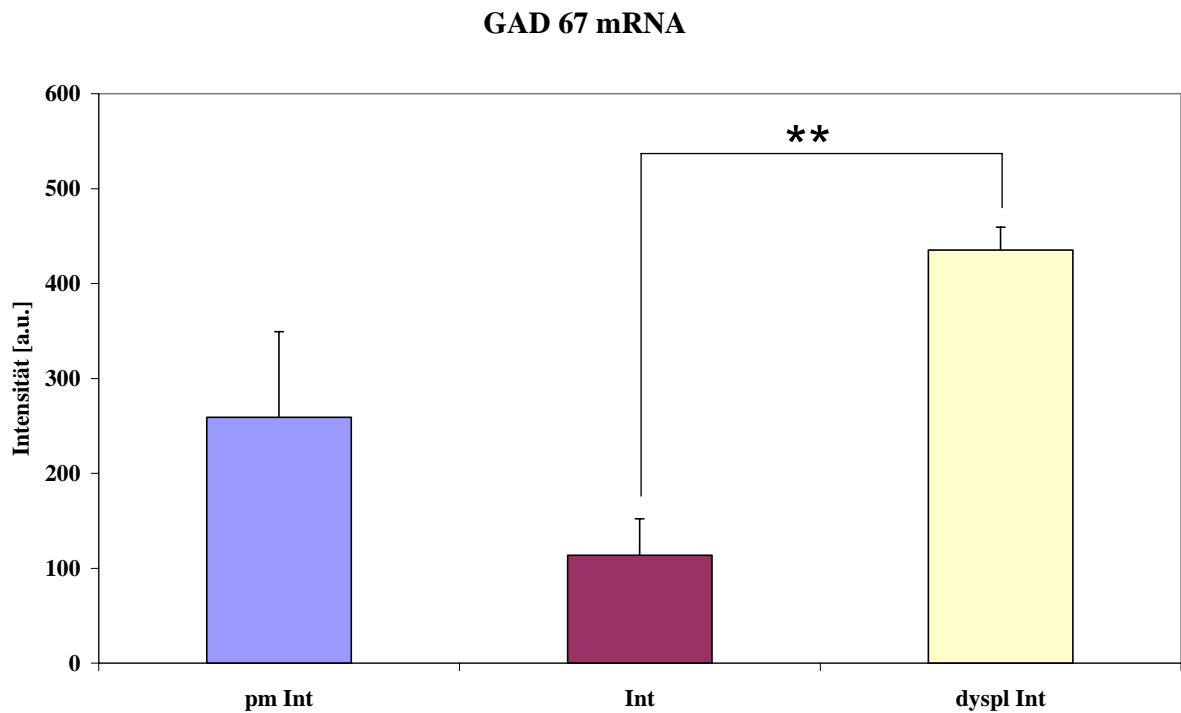


Abb. 4.30: Semiquantitative Darstellung der zellulären Expression von GAD67 mRNA in Interneuronen des *post mortem* Gewebes (pm Int), Interneuronen im die Dysplasie umgebenden Gewebe mit normaler corticaler Laminierung (peridysplastisch, Int) und Interneuronen in der corticalen Dysplasie (dyspl Int). Die Messwerte sind +/- SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Werten der verschiedenen Neurone sind (**) gekennzeichnet (ANOVA; $p < 0,01$).

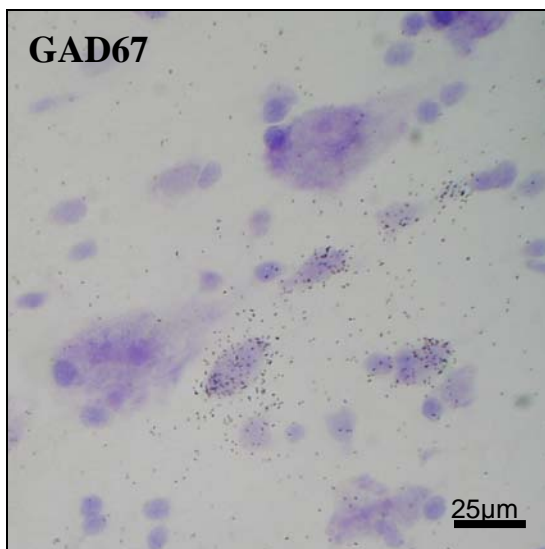


Abb. 4.31: Emulsions-Autoradiographie der Expression von GAD67 mRNA. Abgebildet sind dysplastische Neurone und Interneurone in der corticalen Dysplasie.

Tabelle 4: Statistische Auswertung der Flüssig-Emulsions-Autoradiographien von GAD67.

<i>Zellart</i>	ANOVA			Posthoc-Test (Bonferroni) p		
	F	df	p	postmortem-Kontrollgewebe vs. peridysplastische Neuronen	postmortem-Kontrollgewebe vs. dysplastische Neuronen	peridysplastische vs. dysplastische Neuronen
Pyramiden-Neurone	3,375	2, 9	0,094	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Interneurone	9,809	2, 9	0,009	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,01

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA Expression von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten und dem GABA synthetisierenden Enzym GAD67 in Gewebe von epilepsie-chirurgisch behandelten Patienten mit fokaler kortikaler Dysplasie sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch untersucht. Die Bestimmung der Expressionsmuster erfolgte sowohl in dysplastischen Zellen als auch im peridyplastischem, histologisch unauffälligem cerebralem Cortex und wurde zusätzlich mit der Expression in *post mortem* Gewebe von Personen ohne neurologische oder psychiatrische Erkrankung (*post mortem* Kontrollgewebe) verglichen. Es erfolgte der qualitative und semiquantitative Nachweis von mRNA der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$ - $\alpha 6$, $\beta 1$ - $\beta 3$, $\gamma 1$ - $\gamma 3$ und GAD67 durch in situ Hybridisierung. Um die zytoskelettalen Veränderungen bzw. die ausgeprägten histopathologischen Veränderungen in der fokalen kortikalen Dysplasie hervorzuheben und den dysplastischen Fokus besser abgrenzen zu können, wurde außerdem ein immunhistochemischer Nachweis von Mikrotubulus-assoziiertem Protein 2 (MAP2), eines der am weitest verbreiteten neuronalen Mikrotubulus-assoziierten Proteine, durchgeführt.

5.1. Immunhistochemischer Nachweis von MAP2 in der fokalen kortikalen Dysplasie

Die untersuchten Gewebe der epilepsie-chirurgisch behandelten Patienten wiesen in der histologischen Übersichtsfärbung alle eine gestörte Laminierung des cerebralen Cortex, große Pyramidenzellen, große dysmorphe Neurone sowie ballonierete Zellen auf, sodass die Kriterien einer fokalen kortikalen Dysplasie nach Taylor erfüllt waren. Die dysplastischen Neurone zeigten eine deutlich höhere Immunoreaktivität mit dem Mikrotubulus-assoziierten Protein 2 (MAP2) Antikörper als die Zellen mit normaler Form im dysplastischen Fokus (siehe Abschnitt 4.1).

5.2. GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten

Eine mögliche Erklärung der erhöhten Erregbarkeit in der fokalen kortikalen Dysplasie wäre die selektive Reduktion der Expression einzelner GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten, die dazu führte, dass die neuronale Inhibition in dem epileptogenen Fokus durch Veränderung der Rezeptormenge oder der Rezeptorzusammensetzung und einer damit einhergehenden Funktionseinschränkung vermindert ist.

Anhand der gewonnenen Untersuchungsergebnisse ist zunächst festzustellen, dass eine relevante und betrachtet man alle untersuchten Untereinheiten mit dem histologisch unauffälligen *post mortem* Gewebe vergleichbare Expression von GABA_A-Rezeptor Untereinheiten im Bereich der kortikalen

Dysplasie nachzuweisen ist - die Voraussetzung für die Expression funktionaler GABA_A-Rezeptoren ist also gegeben.

Allerdings zeigte sich in den untersuchten Pyramidenzellen eine deutlich niedrigere Expression der Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 3$ in den dysplastischen Neuronen im Vergleich zu den *post mortem* Geweben und eine deutlich niedrigere Expression der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ in den peridysplastischen histologisch normalen Pyramidenzellen im Vergleich zu den Pyramidenzellen im *post mortem* Gewebe. Eine Ausnahme bildete die $\alpha 2$ Untereinheit; hier zeigte sich eine etwas höhere Expression in den dysplastischen Neuronen im Vergleich zu den peridysplastischen und den Pyramidenzellen in den *post mortem* Geweben. Insgesamt handelte es sich bei diesen differenziellen Expressionsmuster allerdings nur um Trends, die das Signifikanzniveau nicht erreichten (siehe Abschnitt 4.2.2.).

Anders verhält es sich bei den β - und γ -Untereinheiten. Hier liegt, verglichem mit dem *post mortem* Kontrollgewebe, die Expression in den dysplastischen Geweben höher. Die $\beta 2$ -Untereinheit zeigt sogar ein signifikant höheres Signal in den Neuronen der kortikalen Dysplasie im Vergleich zu den Pyramidenzellen in den *post mortem* Geweben und auch ein deutlich höheres Signal zu den peridysplastischen Pyramidenzellen. Zudem ist die mRNA Expression der Untereinheit $\gamma 1$ in den peridysplastischen Pyramidenzellen signifikant höher im Vergleich zu den Pyramidenzellen in den *post mortem* Geweben. In den Neuronen in der kortikalen Dysplasie ist sie nur etwas niedriger als bei den peridysplastischen Pyramidenzellen (siehe Abschnitt 4.2.2.).

Bei den *Interneuronen* zeigte sich in der mRNA-Expression der α -Untereinheiten ein vergleichbares Niveau wie in den Interneuronen der Kontrollgewebe. Deutlicher als in den Pyramidenzellen war die mRNA-Expression der β - und γ -Untereinheiten in den Interneuronen der dysplastischen Gewebe höher als im Kontrollgewebe. Signifikante Unterschiede wiesen die Untereinheiten $\beta 2$, $\gamma 1$ und $\gamma 3$ zwischen den Interneuronen in der Dysplasie und dem *post mortem* Gewebe auf. Dabei war die mRNA Expression bei den Interneuronen in der Dysplasie höher als in den Interneuronen in peridysplastischen Gewebsabschnitten (siehe Abschnitt 4.2.3.).

Aufgrund der unterschiedlichen mRNA Expression einzelner GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten der Epilepsie-Präparate und den *post mortem* Kontrollgeweben liegt es nahe, dass sich die Rezeptorkompositionen in den untersuchten Geweben unterscheiden. Allerdings ist es anhand der rein morphologisch getroffenen Auswahl der detektierten Interneurone nur schwer möglich, eine Aussage über die Gesamtheit der Interneurone im cerebralen Cortex zu treffen, da eine Vielzahl von Subtypen kortikaler Interneurone existieren, die sich in ihren elektrophysiologischer Eigenschaften, der Expression Calcium bindender Proteine und ihren axonalen und dendritischen Verzweigungen unterscheiden (Cauli et al. 1997, Gupta et al. 2000, Kawaguchi und Kubota 1993). So ist bekannt, dass verschiedene Klassen von Interneuronen Synapsen an unterschiedlichen Domänen von Pyramidenzellen im Cortex bilden (Deuchars und Thomson 1995, Xiang et al. 2002), und es ist zu vermuten, dass unterschiedliche inhibitorische Wirkungen von verschiedenen Interneuron-Subtypen ausgehen. Hinsichtlich der Eigenschaften inhibitorischer synaptischer Transmission zwischen den verschiedenen Klassen von Interneu-

ronen im cerebralen Cortex ist bisher nur wenig bekannt, vor allem ist es strittig, ob diese auf unterschiedlichen Zusammensetzungen der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten beruhen (Bacci et al. 2003).

Die hier erhobenen Ergebnisse lassen sich nun mit Befunden aus der Literatur vergleichen.

- Untersuchungen von Crino et al. an Präparaten epilepsie-chirurgisch behandelter Patienten mit kortikaler Dysplasie im temporalen Cortex zeigten eine verminderte mRNA Expression der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ und $\beta 2$ im Vergleich zu ebenfalls epilepsie-chirurgisch behandelten Patienten ohne histologischen Nachweis einer fokalen Dysplasie im temporalen Cortex (Crino et al. 2001). Daraus wurde gefolgert, dass diese Veränderungen der mRNA Expression in der kortikalen Dysplasie nicht nur auf die rezidivierenden cerebralen Anfälle zurückzuführen sind, da die Vergleichsgruppe ebenfalls aus Patienten mit medikamentös nicht beherrschbarer Epilepsie bestand.

Möglicherweise basieren diese im Detail differierenden Ergebnisse zur vorliegenden Arbeit darauf, dass Crino et al. Studien an fokalen Dysplasien im temporalen Cortex durchgeführt hat, die hier vorliegenden Untersuchungen jedoch extratemporales Gewebe beschreiben. Auch die Kontrollgewebe sind unterschiedlich, denn hier wurden Gewebe mit kortikaler Dysplasie im Vergleich zu *post mortem* Gewebe von Personen ohne neuropsychiatrische Erkrankung untersucht, bei Crino et al. jedoch bestand die Kontrollgruppe zwar aus Gewebe ohne histopathologische Veränderungen, es stammte jedoch auch von Patienten, die an Epilepsie erkrankt waren.

- Bei Pilocarpin-induzierter temporaler Epilepsie im Tierversuch zeigte sich eine verminderte mRNA Expression der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Untereinheiten in Neuronen des Gyrus dentatus (Brooks-Kayal et al. 1998). Dies wurde als Erklärung für eine verminderte Sensitivität gegenüber dem Benzodiazepinagonisten Zolpidem herangezogen, da die antikonvulsive Wirkung über Rezeptoren vermittelt wird, die eine $\alpha 1$ -Untereinheit exprimieren.

Auch wenn es sich im Pilocarpin-Modell hier um einen ganz anderen epileptogenen Mechanismus handeln mag, sind diese Ergebnisse insofern von Interesse, als sie zumindest bezüglich der Expression der $\alpha 1$ -Untereinheit mit den in dieser Arbeit beschriebenen übereinstimmen.

- Am Tiermodell mit induzierter kortikaler Malformation wurde ein verminderter Nachweis einzelner GABA_A-Rezeptoruntereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$) gezeigt. Auch in diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Veränderungen am GABA_A-Rezeptor nicht nur auf die strukturell veränderten Areale beschränkt waren, sondern ebenso angrenzendes Gewebe und teilweise sogar den kontralateralen Cortex betrafen, was erneut unterstreicht, dass kortikale Malformationen offenbar weitreichende Störungen des kortikalen Netzwerkes hervorrufen können (Redecker et al. 2000). Hiermit zeigt sich, dass ebenso bei induzierter fokaler kortikaler Malformation einzelne GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten in reduzierter Form exprimiert werden. Allerdings sind diese Formen der kortikalen Malformation nicht direkt mit der hier untersuchten fokalen kortikalen Dysplasie zu vergleichen, denn es liegt zwar ein pathologisch veränderter Aufbau des cerebralen Cortex vor, zelluläre Veränderungen und dabei insbesondere dysmorphe Neurone und deren pathophysiologischer Einfluss fehlen jedoch.

- Am Tiermodell mit induzierter kortikaler Dysplasie konnte weiterhin eine deutlich reduzierte Bindung des GABA_A-Rezeptor Agonisten Muscimol in der dysplastischen Läsion gezeigt werden, was auf eine verminderte Dichte der GABA_A-Rezeptoren zurückgeführt wurde. In geringerem Maße war auch im umgebenden histologisch normalem Gewebe und in entfernter gelegenen Arealen wie dem Hippocampus und dem Cortex piriformis eine reduzierte Bindung nachweisbar (Zilles et al. 1998). Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu den hier aufgeführten Untersuchungen, denn die veränderte Expression einzelner GABA_A-Rezeptoruntereinheiten scheint nicht auf die fokale Dysplasie beschränkt zu sein, sondern umgebendes histologisch unauffälliges Gewebe in die Pathophysiologie miteinzubeziehen.
- Zusätzlich wies eine Untersuchung an Patienten mit kortikaler Dysplasie nach, dass im EEG als epileptische Areale detektierte Foki histologisch unverändert waren. Dies unterstreicht, dass diese Areale ebenso eine erhöhte Epileptogenität aufweisen können, ohne dass dies zwingend mit einer morphologischen Veränderung einhergehen muss und somit ein anderer Mechanismus ursächlich für die erhöhte Erregbarkeit sein kann. So könnten etwa abnorme synaptische Verbindungen oder veränderte Zellmembraneigenschaften der normal differenzierten Neurone einen Teil zur erhöhten Erregbarkeit beitragen (Spreafico et al. 1998b).
- Immunhistochemisch ließ sich in einer Studie eine erhöhte Expression von β -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors an vielen großen dysmorphen Neuronen in kortikalen Dysplasien zeigen. Daraus wurde geschlossen, dass diese Zellen GABA_A-Rezeptoren exprimieren und mit dem inhibitorischen Neurotransmitter GABA reagieren können (Kerfoot et al. 1999). Aufgrund des selektiven Nachweises der β -Untereinheiten kann jedoch nicht nachgewiesen werden, ob eine normale Funktion der GABA_A-Rezeptoren besteht, da trotz des Nachweises der β -Untereinheiten die Rezeptorkomposition so verändert sein kann, dass eine normale Funktion nicht mehr gegeben ist und dadurch keine suffiziente Inhibition mehr vorliegt. Auch in der hier durchgeführten in situ Hybridisierung konnte bei den β -Untereinheiten eine erhöhte Expressierung in dysplastischen Neuronen im Vergleich zum Kontrollgewebe gezeigt werden (bei der Untereinheit $\beta 2$ liegt ein signifikanter Unterschied vor), was die Ergebnisse von Kerfoot et al. unterstützt.

Berücksichtigt man diesen Stand der Literatur, so sind die hier erhobenen Befunde zunächst derart zu interpretieren, dass etwaige Veränderungen am GABA_A-Rezeptor nicht nur auf die fokale Dysplasie und deren histologisch veränderten Neuronen beschränkt sind, sondern auch die nicht direkt im Fokus liegenden Pyramidenzellen betreffen, die morphologisch keine Auffälligkeiten zeigen. Die Tatsache, dass peridysplastisches Gewebe ebenfalls eine erhöhte elektrische Aktivität im EEG zeigt, spricht dafür, dass die pathophysiologischen Veränderungen nicht auf die fokale Dysplasie beschränkt zu sein scheinen (Arnold et al. 2000, Spreafico 1998b, Tassi et al. 2001).

In den vorliegenden Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede der mRNA Expression der einzelnen GABA_A-Untereinheiten zwischen den dysplastischen und den perifokalen Neuronen im Epilesiegewebe aufgezeigt werden. Dies spricht dafür, dass die Veränderungen an den GABA_A-

Rezeptoren nicht auf die histologisch veränderten Zellen beschränkt sind, obwohl gewisse Unterschiede in der Expression der Untereinheiten bei den dysplastischen und perifokalen Neuronen nicht auszuschließen sind. Insofern liegt es nahe, dass Gewebe trotz histologisch normaler Zellen und physiologischem Aufbau des cerebralen Cortex in der Umgebung fokaler Dysplasien einen veränderten Aufbau bzw. eine veränderte Expression der GABA_A-Rezeptoren in den Neuronen aufweist.

Betrachtet man zum zweiten die Expression der α -Untereinheiten, so können die erhobenen Ergebnisse zumindest in ihrem Trend unterstützen, dass die Zahl der funktionellen GABA_A-Rezeptoren in pyramidalen Neuronen des dysplastischen Gewebes herabgesetzt ist, die eine Benzodiazepin-Bindungsstelle tragen. Dies würde einige Ergebnisse aus Bindungsuntersuchungen *in vitro* und *in vivo* erklären. Zudem ist bekannt, dass die Rezeptor Affinität gegenüber GABA maßgeblich von den α -Untereinheiten bestimmt wird (Ebert et al. 1997), sodass ein relativer Mangel oder differentielle Stöchiometrie der α -Untereinheiten hier die Funktionalität des Rezeptors beeinflussen kann.

Zusätzliche Hypothesen ließen sich jedoch aus den Befunden zu den eher regulatorischen β - und γ -Untereinheiten generieren. Hier ist beschrieben, dass die subzelluläre Verteilung des Rezeptors (das „trafficking“) und Anordnung an der Postsynapse (das „clustering“) maßgeblich von den β - und γ -Untereinheiten bestimmt werden (Connolly et al. 1996, Connolly et al. 1999, Essrich et al. 1998). Die hier beobachtete relative Überexpression dieser Untereinheiten in dysplastischem Gewebe könnte daher auf einen kompensatorischen Mechanismus deuten, der darauf zielt, mehr inhibitorische GABA_A-Rezeptoren an die Synapse gelangen zu lassen.

5.3. GAD

Das GABA synthetisierende Enzym GAD hat eine besondere Funktion, da sowohl das Substrat Glutamat als auch das Produkt GABA Neurotransmitter sind. Von den zwei existierenden Isoenzymen GAD65 und GAD67 wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA in situ Hybridisierung von GAD67 durchgeführt, da dieses Isoenzym unter anderem vermehrt in Neuronen, insbesondere in Interneuronen, des cerebralen Cortex nachgewiesen wurde (Erlander et al. 1991, Feldblum et al. 1993, Kaufman et al. 1991).

In den hier durchgeführten Untersuchungen ließ sich bei den dysplastischen Neuronen, bei den perifokalen Pyramidenzellen des umgebenden Gewebes, das eine normale cortikale Laminierung aufwies, und bei den Pyramidenzellen im *post mortem* Kontrollgewebe eine geringe mRNA Expression der GAD67 nachweisen (siehe Abschnitt 4.3.2.). Das Signal war im *post mortem* Gewebe etwas niedriger als in den dysplastischen und peridysplastischen Neuronen.

Bei den *Interneuronen* ließ sich dagegen eine deutlich höhere Expression der GAD67 mRNA im dysplastischen Fokus im Vergleich zu dem *post mortem* Kontrollgewebe zeigen. Allerdings ist im Kontrollgewebe, das aus cingulärem Cortex besteht, ein höheres GAD67 mRNA Signal als im peridysplastischen Gewebe nachzuweisen (siehe Abschnitt 4.3.3.). Dies ist möglicherweise auf den hohen

Gehalt an GAD67 mRNA im cingulären Cortex zurückzuführen, wie es in der Arbeit von Retaux et al. gezeigt wurde (Retaux et al. 1992). Dabei wurden in Versuchen an frontalem Cortex von Ratten verschiedene Niveaus der GAD67 mRNA in Lamina I-VI gefunden. Die höchsten Werte wurden in Lamina V und VI des anterioren cingulären Cortex gemessen. Diesem Ergebnis könnte eine unterschiedliche Stabilität oder aber eine unterschiedliche Produktion der mRNA zugrunde liegen. Der verschiedenen hohe Gehalt an GAD67 mRNA in den Interneuronen des frontalen Cortex legt nahe, dass Subpopulationen gabaerger Interneurone existieren und im anterioren cingulären Cortex eine stärkere gabaerge hemmende Kontrolle vorliegt.

Die signifikant höhere Expression von GAD67 mRNA in Interneuronen in der kortikalen Dysplasie (verglichen mit Interneuronen des peridysplastischen Gewebes) ist jedoch das weitaus interessantere Ergebnis. Dieser Befund könnte auf eine Überexpression von GAD als Antwort auf die erhöhte Epileptogenität mit ihrem Ursprung in diesem Fokus sein.

Allerdings muss noch gezeigt werden, dass die erhöhte Expression der GAD67 mRNA tatsächlich eine gesteigerte Aktivität des Enzyms GAD zur Folge hat. Die hier aufgeführten Ergebnisse deuten zwar darauf hin, dass die Synthese der GABA in der fokalen Dysplasie erhöht ist. Dies wäre jedoch nur mit dem Nachweis einer funktionellen GAD und deren Produkt GABA mit Sicherheit zu sagen.

Tatsächlich ließ sich nämlich in einer immunhistochemischen Studie an Patienten mit kortikaler Dysplasie kein signifikanter Unterschied in der GAD Immunreaktivität zur Kontrollgruppe nachweisen (Kerfoot et al. 1999). Allerdings stammte das Kontrollgewebe von Patienten mit Rasmussen Encephalitis, die ebenfalls unter medikamentös nicht ausreichend therapierbarer Epilepsie litten. Die dysmorphen Neurone wiesen in dieser Untersuchung keine verminderte GAD-Färbung auf, sodass eine reduzierte GABA-Produktion als Ursache der cerebralen Krampfanfälle nicht nahegelegt werden konnte. Mit immunhistochemischen Methoden können zwar die Epitope nachgewiesen werden, eine Aussage über die Funktionalität des Proteins ist jedoch nicht möglich. Somit ist aufgrund dieser Untersuchungen nicht mit Sicherheit zu sagen, ob das Enzym und die synthetisierte GABA tatsächlich eine normale Funktion aufweisen.

Bei Patienten mit fokaler kortikaler Dysplasie im temporalen Cortex ist sogar eine verminderte GAD Immunreaktivität nachgewiesen worden (Spreafico et al. 2000). Diese Daten würden wiederum nahelegen, dass im dysplastischen Fokus eine verminderte gabaerge Hemmung vorliegt.

Zu diesem Zeitpunkt muss also offen bleiben, warum die Expression der GAD67 mRNA im dysplastischen Fokus in den hier durchgeführten Untersuchungen erhöht ist, in der Arbeit von Spreafico et al. jedoch eine verminderte GAD Immunreaktivität im dysplastischen Fokus vorliegt (Spreafico et al. 2000).

Zum einen ließe sich postulieren, dass sich die Regulation des GABA-synthetisierenden Enzyms zwischen temporalen und extra-temporalen Dysplasien unterscheidet. Es wäre aber auch vorstellbar, dass die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse ihre Ursache in einer gestörten Translation haben, also die verstärkte GAD mRNA Expression nur kompensatorisch bei einer erniedrigten Proteinsynthese ist.

Andererseits liegt dem verminderten GAD Nachweis in der Arbeit von Spreafico et al. vielleicht eine geringere Anzahl von gabaergen Interneuronen in der Dysplasie zugrunde, wie es durch eine verminderte Immunoreaktivität von drei Calcium-bindenden Proteinen (Parvalbumin, Calretinin und Calbindin), die als indirekter Nachweis einer reduzierten Zahl von gabaergen Interneuronen anzusehen ist, nachgewiesen wurde (Ferrer et al. 1992, Spreafico et al. 1998a). Anhand der hier vorliegenden Daten können diese Ergebnisse weder unterstützt noch widerlegt werden, da eine quantitative Aussage über die Zahl der gabaergen Interneurone mit den verwendeten Methoden nicht möglich ist.

Schließlich ist auch ein weiterer Mechanismus zu beachten: Petroff et al. zeigten, dass die Aktivität von GAD bei steigenden Konzentrationen von neu produzierter GABA vermindert ist (Petroff und Rothman 1998; Petroff et al. 1998). Selbst wenn sich also die auf dem Boden unserer Daten naheliegende verstärkte Expression von GAD bestätigen ließe, müsste offen bleiben, ob diese nur Zeichen des Mangels an GABA oder tatsächlich Ausdruck einer verstärkten Bereitstellung dieses inhibitorischen Transmitters ist.

Dennoch könnte es sein, dass die erhöhte Expression von GAD67 mRNA in den Interneuronen der fokalen kortikalen Dysplasie einen Kompensationsmechanismus bezüglich der verminderten gabaergen Hemmung darstellt.

Leider wurden bisher nur wenige Untersuchungen bezüglich der GAD in der humanen fokalen kortikalen Dysplasie insbesondere bei extratemporaler Lokalisation durchgeführt, sodass weitere Studien notwendig sind, um diesen Teil der gabaergen Inhibition besser zu verstehen.

5.4. Gabaerge Inhibition bei fokaler kortikaler Dysplasie

Das gabaerge System ist sehr komplex und es ist kaum möglich, alle potentiellen Veränderungen in einer Arbeit abzuhandeln. Sowohl prä- als auch postsynaptische Veränderungen im gabaergen System können Ursache erhöhter Epileptogenität sein. Die präsynaptischen Veränderungen können eine verminderte GABA Synthese, ein erhöhter Katabolismus der GABA, eine verminderte Freisetzung aufgrund fehlerhafter Freisetzungsmechanismen in den Nervenendigungen oder aber eine verminderte Anzahl gabaerger Nervenendigungen sein. Die postsynaptischen Veränderungen können auf einer verminderten Anzahl oder auf strukturellen Veränderungen der GABA_A-Rezeptoren beruhen, die möglicherweise einen nicht mehr oder nicht mehr ausreichend funktionstüchtigen Rezeptor hervorbringen und somit eine suffiziente Inhibition zur Vermeidung cerebraler Krampfanfälle nicht mehr gegeben zu sein scheint.

Welcher Mechanismus liegt der erhöhten Epileptogenität der fokalen Dysplasie zugrunde? Hierzu existieren verschiedene Hypothesen. Es wurde gezeigt, dass ein verminderter inhibitorischer Tonus in der fokalen Dysplasie vorliegt (Garbelli et al. 1999, Houser 1991), zum anderen wurde aber sowohl ein verminderter inhibitorischer als auch ein erhöhter exzitatorischer Tonus nachgewiesen (Spreafico et al. 1998a, Crino et al. 2001). Anhand von Untersuchungen an Menschen und Ratten mit physiologisch aufgebautem Cortex wurde festgestellt, dass eine geringe Reduktion der gabaergen inhibitorischen

schen Wirkung zu einer starken Zunahme der Ausbreitung exzitatorischer Potentiale führt und cerebrale Krampfanfälle verursachen kann (Avoli et al. 1997, Chagnac-Amitai und Connors 1989a, Chagnac-Amitai und Connors 1998b).

Untersuchungen an Biopsien von Patienten mit medikamentös nicht behandelbarer Epilepsie unterschiedlicher Genese zeigten insbesondere bei Patienten mit milder kortikaler Dysplasie einen deutlich erhöhten GABA-Gehalt, der zum Teil auf die medikamentöse antiepileptische Therapie zurückgeführt wurde; allerdings wurden nur wenige der Patienten mit Medikamenten behandelt, die den GABA-Gehalt erhöhen (Aasly et al. 1999). Das Ergebnis könnte jedoch als mögliche kompensatorische Antwort gedeutet werden. Ein Schutz vor cerebralen Krampfanfällen war dadurch jedoch nicht gegeben. Insgesamt schließen auch diese Studien darauf, dass eine geringere Zahl an gabaergen Interneuronen in kortikalen Malformationen vorliegt, die darauf zurückzuführen sind, dass weniger gabaerge Zellen entstehen, diese Neurone in ihrer Entwicklung nicht der physiologischen Zellmigration folgen oder ein erhöhter Zelltod vorliegt.

Zudem zeigte sich bei Untersuchungen an Taylor's kortikalen Dysplasien ebenfalls eine verminderte Immunoreaktivität Calcium bindender Proteine und eine fehlende Ausbildung funktionaler Synapsen der gabaergen Nervenendigungen in der Nähe dysplastischer Zellen in der fokalen Dysplasie (Garbelli et al. 1999). Anhand von elektronenmikroskopischen und elektrophysiologischen Untersuchungen wurde ebenfalls gezeigt, dass ballonierte Zellen in der fokalen kortikalen Dysplasie keine funktionalen Synapsen ausbilden (Alonso-Nanclares et al. 2005, Cepeda et al. 2003). Nach diesen Ergebnissen scheint es eher unwahrscheinlich, dass diese Zellen direkt an der Entstehung bzw. Unterhaltung cerebraler Überaktivität beteiligt sein können. Dagegen wurden jedoch an diesen Neuronen erhöhte Kalziumströme gemessen, die möglicherweise aufgrund einer verstärkten Ausbildung von Kalziumkanälen zustande kommen. Speckmann et al. zeigten, dass diese Kanäle entscheidend involviert sind in der Entwicklung epileptiformer Entladungen (Speckmann et al. 1993). Zudem wurde eine erhöhte Immunoreaktivität exzitatorischer Neurotransmitter an diesen dysmorphen Zellen gezeigt, was ebenfalls dafür spricht, dass sie einen entscheidenden Anteil an der Übererregbarkeit dieser cerebralen Malformation haben (Kerfoot et al. 1999). Eine mögliche Erklärung wurde von Cepeda et al. postuliert. So wurde vermutet, dass jene dysmorphen Neurone eine Reorganisation von Synapsen in der Dysplasie induzieren könnten und so zu einer aberranten Innervation anderer Neurone führen und dies so wiederum zur erhöhten Erregbarkeit beitragen könnte (Cepeda et al. 2003). Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, ob diese Veränderungen eine Folge der Malformation sind oder ein Resultat der vermehrten epileptischen Entladungen im Fokus darstellen. Möglich wäre, dass einige pathologische Veränderungen in der Dysplasie als Kompensationsmechanismus zur Vermeidung cerebraler Krampfanfälle dienen. Zu welchem Zeitpunkt diese Mechanismen einsetzen und ob sie überhaupt als Reaktion auf die erhöhte Epileptogenität dieser Areale auftreten, bleibt unklar. Nichtsdestotrotz scheint bei dieser Form der kortikalen Malformation nicht nur eine Störung im Neurotransmittersystem sondern auch eine fehlende bzw. verminderte synaptische Übertragung vorzuliegen, was eine ausreichende

inhibitorische Wirkung nicht mehr möglich machen könnte. Allerdings wurde in der Arbeit von Alonso-Nanclares et al. sowohl eine erhöhte als auch eine verminderte Dichte exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen aufgezeigt (Alonso-Nanclares et al. 2005). Ebenso war die Proportionalität der hemmenden und erregenden Synapsen in den dysplastischen Arealen verändert im Vergleich zum angrenzenden normalen cerebralen Cortex, jedoch konnte kein gemeinsames Muster aufgezeigt werden, was zu der Annahme führte, dass verschiedenste Veränderungen der exzitatorischen und inhibitorischen synaptischen Verbindungen in der kortikalen Dysplasie bestehen können (Alonso-Nanclares et al. 2005). So wird deutlich, dass dieses komplexe System und die pathophysiologische Grundlage der Epilepsie möglicherweise nicht allein durch Veränderungen am Rezeptor erklärt werden kann.

Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob die erhöhte Epileptogenität der fokalen kortikalen Dysplasie auf der Pathogenität einzelner Neurone oder der pathologisch veränderten interneuronalen Wechselwirkung beruht. Es ist bekannt, dass cerebrale Krampfanfälle eine Konsequenz synchroner Entladungen einer Vielzahl von Neuronen sind, aber es ist ebenso bekannt, dass diese große Gruppe von Neuronen von einer kleinen Zahl bestimmter Zellen, die diese Entladungen initiieren oder unterhalten, reguliert werden kann (Roper und Yachnis 2002). Die hier aufgeführten Ergebnisse und zum Teil bereits erwähnte Studien zeigen, dass an dysomorphen Neuronen eine veränderte postsynaptische Rezeptorkomposition nachzuweisen war (Crino et al. 2001; Ying et al. 1999). Zudem wurde in einer elektrophysiologischen Studie an kortikaler Dysplasie bei Kindern eine erhöhte Erregbarkeit bei einem Teil der untersuchten dysomorphen Neurone festgestellt (Mathern et al. 2000). Insgesamt scheint es deshalb möglich zu sein, dass die relativ kleine Zahl an pathologisch veränderten Neuronen, nach Mathern et al. sind dies nur etwa 15%, die Aktivität der umgebenden Zellen so verändern bzw. beeinträchtigen, dass cerebrale Krampfanfälle entstehen können.

5.5. Glutamaterge Exzitation bei fokaler kortikaler Dysplasie

Es wird wie bereits erwähnt vermutet, dass die mit der fokalen kortikalen Dysplasie assoziierte Epilepsie auf einer Imbalance zwischen hemmenden und erregenden synaptischen Mechanismen beruht. So wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass nicht nur Veränderungen an GABA_A-Rezeptoren sondern auch eine erhöhte Expression einzelner Glutamat-Rezeptor-Untereinheiten in der fokalen Dysplasie vorliegen. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass erhöhte exzitatorische synaptische Aktivität zwischen den dysplastischen Neuronen Ursache der Epileptogenität der fokalen Dysplasie sein kann (Crino et al. 2001, Kerfoot et al. 1999, Spreafico et al. 1998a, Ying et al. 1998). Zudem wurde bei in vitro Experimenten mit fokaler kortikaler Dysplasie gezeigt, dass eine erhöhte Aktivität an Glutamat-Rezeptoren zu Übererregbarkeit und Ausbreitung epileptiformer Entladungen führte (Avoli et al. 1999, Mattia et al. 1995, Mikuni et al. 1999). Ebenso wurde eine erhöhte Bindung an NMDA- und AMPA-Rezeptoren im dysplastischen Cortex, aber auch eine erhöhte Bindung an AMPA-Rezeptoren im umgebenden Gewebe nachgewiesen, was ebenso hier wie schon bei den GABA_A-

Rezeptoren zeigt, dass sich die Veränderungen nicht auf den dysplastischen Fokus beschränken, sondern auch histologisch normales Gewebe in den pathophysiologischen Mechanismus der erhöhten Epileptogenität mit einbezogen zu sein scheint (Zilles et al. 1998).

5.6. Kritische Würdigung und Arbeitsmodell

Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse können sowohl hinsichtlich ihrer Validität als auch ihrer Interpretation nur Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen sein:

1. Zum einen ist die Aussagekraft aufgrund der nur geringen Zahl untersuchter dysplastischer Gewebe ($n=5$) eingeschränkt. Es bleibt dabei allerdings zu beachten, dass Patienten mit extratemporaler Dysplasie in der Gesamtgruppe epilepsie-chirurgisch behandelter Patienten weiterhin selten sind, sodass eine Erweiterung des Kollektivs nur langfristig möglich ist.
2. Bei der Untersuchung von differentiellen Expressionsmustern ist die Wahl des Vergleichsgewebes schwierig. In dieser Arbeit wurde *post-mortem* Gewebe von nicht an einer Epilepsie erkrankten Personen benutzt. Dies erlaubt zwar Aussagen zu grundsätzlichen Expressionsveränderungen (also sowohl innerhalb der Dysplasie als auch in dem umgebenden Gewebe), kann jedoch wiederum zu Artefakten führen, weil das *post-mortem* Gewebe zum Beispiel post-mortalen Veränderungen unterliegt.
3. Die Untersuchung von mRNA-Expressionen erlaubt zwar ein breites Untersuchungsspektrum, nicht jedoch die Interpretation hinsichtlich des tatsächlich vorhandenen Proteins. Weiterführende Untersuchungen auf dieser Ebene sind also notwendig.

Trotzdem erlauben die gewonnenen Daten einige Rückschlüsse und Hypothesen zum gabaergen System in der kortikaler Dysplasie, die sich als Arbeitsmodell für weitere Untersuchungen zusammenfassen lassen:

1. Qualitativ ist das Repertoire der exprimierten Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors in dysplastischen Neuronen nicht anders als im gesunden Gewebe.
2. Quantitativ ergeben sich Hinweise, dass die Bereitstellung von Benzodiazepin-sensitiven GABA_A-Rezeptoren vermindert ist, da die Expression der α -Untereinheiten mRNA relativ vermindert erscheint.
3. Zusätzlich ergeben sich Hinweise auf eine relative Überexpression regulatorischer Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors. Hieraus lässt sich die Hypothese generieren, dass innerhalb des dysplastischen Cortex möglicherweise die Bereitstellung des GABA_A-Rezeptors unterstützt wird.
4. Auf der Seite des GABA-Synthese lässt sich umschrieben innerhalb der Dysplasie eine signifikant höhere Expression der GAD mRNA beobachten. Hieraus lässt sich als weiter zu untersuchende Hypothese formulieren, dass möglicherweise eine verstärkte GABA-Synthese als kompensatorischer Mechanismus einer verstärkten glutamatergen Exzitation gegenüber steht.

5.7. Ausblick

Epilepsie ist eine weitverbreitete Erkrankung, die weltweit etwa 1-2% der Bevölkerung betrifft (Browne und Holmes 2001). Es wird angenommen, dass diese Erkrankung auf einem Ungleichgewicht der exzitatorischen glutamatergen und der inhibitorischen gabaergen Neurotransmission beruht. In welchem Ausmaß die neuronale Transmission verändert ist und ob die inhibitorische oder die exzitatorische Komponente überwiegt ist, bei einer so vielfältigen Krankheit wie der Epilepsie noch nicht auf einen Nenner zu bringen. Auch bei der fokalen kortikalen Dysplasie wurde sowohl eine verminderte inhibitorische aber auch eine erhöhte exzitatorische Aktivität nachgewiesen. Die Untersuchung des gabaergen Systems scheint schon in Anbetracht der antiepileptischen Pharmakotherapie und deren Wirkung am GABA_A-Rezeptor ein lohnendes Ziel zu sein. Die fokale kortikale Dysplasie betrifft nur einen kleinen Teil der an Epilepsie erkrankten Patienten. Jedoch wurde aufgrund von chirurgischen Resektaten geschätzt, dass Epilepsien aufgrund von kortikaler Dysgenese etwa 39% der behandelten Kinder und etwa 14% der Erwachsenen betrifft (Farrell et al. 1992, Prayson und Estes 1995). So ist es für diese Patienten aufgrund der medikamentös bis jetzt häufig nicht ausreichend zu behandelnden Erkrankung essentiell, die Pathophysiologie der fokalen kortikalen Dysplasie und der damit assoziierten Epilepsie zu untersuchen, um in Zukunft eine antiepileptische Therapie entwickeln zu können, die ein operatives Vorgehen vielleicht nicht mehr erforderlich machen würde. Dies scheint in Anbetracht der Tatsache, dass trotz hoher Qualität der Lokalisationsdiagnostik und neurochirurgischer Technik weniger als 50% der epilepsie-chirurgisch behandelten Patienten vollkommen anfallsfrei bleiben und einige Patienten nicht für eine Operation in Frage kommen, ein erstrebenswertes Ziel zu sein (Crino et al. 2002).

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen Veränderungen auf molekularer Ebene. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Pathophysiologie der fokalen kortikalen Dysplasie und der damit assoziierten Epilepsie besser zu verstehen und so auch neue antiepileptisch wirkende Pharmaka entwickeln zu können. Medikamente selektiv für verschiedene Untereinheiten würden das bisher vorhandene Spektrum der Medikamente erweitern, Nebenwirkungen könnten reduziert und neue therapeutische Indikationen entdeckt werden.

6. Zusammenfassung

Die fokale kortikale Dysplasie ist eine Malformation, die durch neuronale Entwicklungs- und Migrationsstörungen entsteht. Die hier untersuchte nach Taylor klassifizierte Dysplasie zeichnet sich durch eine gestörte kortikale Laminierung und verschiedene charakteristische dysmorphe Neurone aus. Sie ist häufig mit neurologischen Krankheitsbildern, insbesondere mit Epilepsie assoziiert. GABA ist der am weitesten verbreitete inhibitorische Transmitter im Zentralnervensystem. Ihr hauptsächlicher Wirkungsort sind die GABA_A-Rezeptoren. Experimentelle und klinische Studien zeigen, dass GABA eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie und Therapie der Epilepsie spielt. Störungen des gabaergen Systems wurden sowohl in genetisch bedingten als auch erworbenen Formen der Epilepsie nachgewiesen. Es wird angenommen, dass ein Ungleichgewicht zwischen neuronaler Hemmung und Erregung besteht.

Der GABA_A-Rezeptor ist ein Heteromer aus fünf Polypeptid-Untereinheiten, die um eine zentrale Chloridionenpore angeordnet sind. Er wird aus 19 verschiedenen Untereinheiten in den unterschiedlichsten Variationen gebildet (α 1- α 6, β 1- β 3, γ 1- γ 3, ρ 1- ρ 3, δ , ϵ , θ , π) Die am weitesten verbreitete Stöchiometrie besteht aus zwei α -, zwei β -, und einer γ -Untereinheit.

In der vorliegenden Arbeit wurden die mRNA Expressionsmuster der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten (α 1- α 6, β 1- β 3, γ 1- γ 3) und des GABA synthetisierenden Enzyms GAD67 durch in situ Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotid-Proben semiquantitativ beschrieben. Die Untersuchungen wurden an Gewebe mit fokaler kortikaler Dysplasie von epilepsie-chirurgisch behandelten Patienten, die pharmakologisch nicht ausreichend therapierbar waren, durchgeführt. Dabei wurden dysplastische Neurone bzw. Pyramidenzellen und Interneurone in der fokalen kortikalen Dysplasie, im die Dysplasie umgebenden Gewebe ohne histologische Veränderungen und an *post mortem* Gewebe von Patienten ohne neuropsychiatrische Erkrankung untersucht. Zudem wurde ein immunhistochemischer Nachweis von Mikrotubulus-assoziiertem Protein 2 (MAP2) durchgeführt, um die zytoskelettalen Veränderungen bzw. die ausgeprägten histopathologischen Veränderungen in der fokalen kortikalen Dysplasie hervorzuheben und den dysplastischen Fokus besser abgrenzen zu können.

Bei der Untersuchung der einzelnen GABA_A-Rezeptoruntereinheiten zeigten sich als Trend eine erniedrigte mRNA-Expression von α -Untereinheiten und signifikant höhere Signale der Untereinheit β 2 bei den dysplastischen Neuronen im Vergleich zu den Pyramidenzellen in den *post mortem* Geweben. Ebenso konnte eine signifikant höhere Expression der γ 1-Untereinheit bei den Pyramidenzellen im Epilepsiegewebe außerhalb der Dysplasie im Vergleich zu den Pyramidenzellen in den *post mortem* Kontrollgeweben nachgewiesen werden.

Auch bei den Interneuronen ließen sich Unterschiede in der Expression der einzelnen Rezeptor-Untereinheiten zeigen. So war die Expression der Untereinheiten β 2, γ 1 und γ 3 signifikant höher bei

den Interneuronen in der Dysplasie im Vergleich zu den Interneuronen der *post mortem* Kontrollgewebe.

Die unterschiedlichen Expressionen der einzelnen GABA_A-Rezeptoruntereinheiten lassen auf eine veränderte Rezeptorkomposition in der fokalen kortikalen Dysplasie aber auch im umgebenden histologisch unauffälligen Gewebe schließen, sodass möglicherweise die Rezeptorkomposition so verändert ist, dass eine normale Funktion und damit eine ausreichende Inhibition nicht mehr gegeben ist.

Außerdem war die mRNA Expression der GAD67 in den Interneuronen der fokalen kortikalen Dysplasie deutlich höher als in den Interneuronen des die Dysplasie umgebenden histologisch unauffälligen Gewebes. Dies deutet auf eine Regulation der GABA-Synthese im dysplastischen Fokus hin.

7. Anhang

7.1. Versuchsprotokolle

7.1.1. Fixierung des Gewebes

Im Kryostat angefertigte Schnitte (20µm)

1. 5 min. fixieren in 4% Paraformaldehyd-Lösung bei 4°C.
2. 1 min. waschen in 1x PBS bei Raumtemperatur (Rt).
3. 5 min. 70% Ethanol bei Rt.
4. 5 min. 96% Ethanol bei Rt.
5. Aufbewahren der Schnitte in 96% Ethanol bei 4°C.

PBS Stammlösung:

1 Liter 10x PBS: 75,79g NaCl
9,93g wasserfreies Na₂HPO₄
4,68g NaH₂PO₄•H₂O
in DEPC Wasser lösen und autoklavieren.

DEPC-Behandlung von Wasser:

1. Aqua dest. 1000:1 mit DEPC mischen (unter dem Abzug).
2. Über Nacht bei Rt rühren (unter dem Abzug).
3. Autoklavieren.

4%ige Paraformaldehyd-Lösung:

1. 10g Paraformaldehyd in 125ml DEPC-behandeltes Wasser (weißliche Suspension).
2. Unter rühren auf 60-65°C erhitzen.
3. Einige Tropfen NaOH zugeben (Klärung der Lösung).
4. 125ml 2x PBS zugeben, auf 4°C kühlen.

7.1.2. Beschichten der Objektträger

1. 25mg Poly L-Lysin in 5ml DEPC-behandeltem Wasser lösen, aliquotieren, bei -20°C lagern.
2. Ein Aliquot von 200µl auftauen, mit DEPC-behandeltem Wasser auf 10ml Endvolumen verdünnen (0,1% Poly L-Lysin Lösung).
3. Poly L-Lysin auf hitzesterilisierten Objektträgern austreichen und trocknen.

7.1.3. Radioaktive Markierung der Oligonukleotide

1. 4µl TdT-Puffer
1,2µl CoCl₂
11,3µl DEPC-behandeltes Wasser
1µl Oligonukleotid
1,5µl [α-³⁵S]dATP
in Eppendorf-Cups auf Eis pipettieren und mischen.
2. 1µl TdT (auf Eis transportieren) zugeben und mischen.
3. 3-10 min. bei 38°C und leichter Bewegung inkubieren.

4. Abstoppen der Reaktion durch Umsetzen der Cups auf Eis und Zugabe von 30µl TNES-Puffer.
5. Chromatographie-Säulen für jeden Ansatz vorbereiten:
 - Pufferüberstand abtropfen lassen
 - Säulen bei 4°C und 2000U/min 2 min. zentrifugieren
 - abgetrennten Puffer verwerfen
 - Säulen nochmals bei 4°C und 2000U/min 2 min. zentrifugieren
6. Markierungsansatz auf die Säule pipettieren, Säule bei 4°C und 2500U/min 2 min. zentrifugieren.
7. 2µl des Eluats (markierte Oligonukleotide) mit 3ml Szintillationscocktail versetzen, im Counter messen (eine spezifische Aktivität von 0,1-0,5x10⁶dpm/µl wird angestrebt).
8. Übriges Reaktionsgemisch mit 2µl DTT Lösung versetzen, bei -20°C lagern.

TNES-Stoppuffer:

14ml 5M NaCl
 10ml 1M Tris-HCl (pH 7,5)
 5ml 0,5M EDTA (pH 8)
 5ml 10% SDS
 466ml DEPC-behandeltes Wasser zugeben

7.1.4. Oligonukleotid-Proben

GAD 67

5`-CCTGCACACATCTGGTTGCATCCTTGGAGTATACCCTTTTCCTTG-3`

Länge: 45mer GC-Gehalt: 48,9% Tm¹: 54,0 °C**GABA_A-Untereinheiten**

Alpha 1

5`-GGGTGCCCCCTGGCCAAATTAGGGGTGTAGCTGGTTGCTGTTGGT-3`

Länge: 45mer GC-Gehalt: 60,0% Tm¹: 58,6 °C

Alpha 2

5`-GGCAACAGCCACTGCATAAGCGTTGTTCTGTATCATAACGGAAGC-3`

Länge: 45mer GC-Gehalt: 48,9% Tm¹: 54,0 °C

Alpha 3

5`-ATAGGTGGTCCCCACGATGTTGAAGGTAGTGCTGGTTTTTCCTTTC-3`

Länge: 45mer GC-Gehalt: 48,9% Tm¹: 54,0 °C

Alpha 4

5`-ACCATCGAGCAAAGTGTCCAGGATGCGGGTGAAATTTTCTGTGCA-3`

Länge: 45mer GC-Gehalt: 48,9% Tm¹: 54,0 °C

Alpha 5

5`-TTGATCTTGGCTGCTTCCAAGGCTTTTTTGCCATCCCAGGCCAG-3`

Länge: 45mer GC-Gehalt: 53,3% Tm¹: 55,8 °C

Alpha 6

5`-GGCCTCGGAAGATGAAACTATTGGCAAAGACAGAGAAGTGATCC-3`

Länge: 44mer GC-Gehalt: 47,2% Tm¹: 53,0 °C

Beta 1

5`-CTTGCGGTACTGGATGCTGGCGCTGTCATAGGAGTACATGGTGGC-3`

Länge: 45mer GC-Gehalt: 57,8% Tm¹: 57,7 °C

Beta 2

5`-TCGTTCCAGAGCATTTTCGGCCAAAAGTATGCCTGGGCAACCCAGC-3`

Länge: 45mer GC-Gehalt: 55,6% Tm¹: 56,8 °C

Beta 3

5`-TCTGTCCCCAGGAATCGCCCATGCCCTTCTCGAGGCATGCTCTG-3`

Länge: 45mer GC-Gehalt: 62,2% Tm¹: 59,5 °C**Gamma 1**

5`-CTGCAGTCTTCAAAGCAACAGAAGAAGCTGGCACAATCTTTGCCC-3`

Länge: 45mer GC-Gehalt: 48,9% Tm¹: 54,0 °C**Gamma 2**

5`-CATTTGAATGGTTGCTGATCTTGGGCGGATATCAATGGTAGGGGC-3`

Länge: 45mer GC-Gehalt: 48,9% Tm¹: 54,0 °C**Gamma 3**

5`-GGAAGGGGCTTGTAGGCTTATTCGCTCAGGAATCCATCTTGAGGA-3`

Länge: 45mer GC-Gehalt: 51,1% Tm¹: 54,9 °C¹ berechnet nach Formel 1 für 50% Formamid und 0,69 molarer Ionenkonzentration**7.1.5. Hybridisierung**

1. 1µl markierte Oligonukleotidprobe
100µl Hybridisierungspuffer
1µl 1M DDT
für Kontrollversuche zusätzlich 2µl der Oligonukleotid-Stammlösung zugeben.
2. Puffer-Oligonukleotid-Gemisch auf einen Objektträger pipettieren und Schnitte mit Parafilm abdecken.
3. Papierbäusche mit Lösung aus 50% Formamid und 4xSSC tränken und zu den Objektträgern in die Petrischalen legen.
4. Hybridisierung über 48 Stunden bei 42°C.
5. Waschen:
 - 30 min. in 1x SSC bei 55°C unter geringer Bewegung
 - 3 min. in 1x SSC bei Rt
 - 3 min. in 0,1x SSC bei Rt
 - 3 min. in 70% Ethanol bei Rt
 - 3 min. in 96% Ethanol bei Rt
6. Schnitte mind. 30 min. bei Raumluft trocknen.
7. Schnitte gegen Röntgenfilm exponieren bzw. mit Fotoemulsion beschichten.

Hybridisierungspuffer:

25ml 100% Formamid p.a.
10ml 20xSSC
2,5ml 0,5M Na-Phosphat
0,5ml 0,1M Na-Pyrophosphat
5ml 50xDenhardt`s Lösung
2,5ml hydrolysiertes Lachssperma-DNA
1ml Poly-A Säure
5g Dextransulfat

20xSSC-Lösung:

3M NaCl
0,3M Na-Citrat Lösung
Mit HCl auf pH 7,0 einstellen, filtrieren,
mit DEPC behandeln, autoklavieren.

Na-Phosphat Lösung:

0,5M Na₂HPO₄

0,5M NaH₂PO₄

auf pH 7,0 titrieren, filtrieren,

mit DEPC behandeln, autoklavieren.

7.1.6. Exposition der Präparate gegen Biomax Film

Die hybridisierten und getrockneten Gewebeschnitte werden zusammen mit einem ¹⁴C-Standard auf Pappkarton mit Klebeband fixiert und in Röntgenfilmkassetten für 28 Tage gegen Biomax Film exponiert.

1. Filme für 3 min. bei Rt in Kodak D-19 Entwicklerlösung entwickeln.
2. 30 sek. in Stopbad tauchen.
3. 3 min. in Fixierlösung Ilford 2000 fixieren.
4. 5 min. in aqua dest. Wässern.
5. Lufttrocknung.

7.1.7. Beschichtung der Objektträger mit Fotoemulsion

Durchführung der Beschichtung in einer Dunkelkammer unter minimaler Beleuchtung:

1. Fotoemulsion mit einem gleichen Volumen aqua dest. mit 0,5Vol% Glycerin in einem Wasserbad bei 43°C schmelzen, für 30 min. unter gelegentlichem Schütteln temperieren.
2. Objektträger kurz in die Emulsionslösung eintauchen („Dipping“), zum Trocknen für 2-3 Stunden in eine lichtdichte Box einstellen.
3. Die getrockneten Objektträger in einen Objektträgerkasten einsortieren, mit Klebeband versiegeln, in lichtdichte Plastiksäcke verpacken und für 8 Wochen bei 4°C lagern.

7.1.8. Entwicklung der emulsionsbeschichteten Objektträger

1. Die Objektträger über 2 bis 3 Stunden auf Rt bringen.
2. Für 250ml Kodak D-19 Entwickler 30g Entwicklerpulver in aqua dest. Lösen.
3. Den Ilford 2000 Fixierer 1+9 mit aqua dest verdünnen.
4. Objektträgerkästen unter Dunkelkammerbedingungen öffnen.
5. 3 min. in D-19 bei 17°C entwickeln.
6. 2 min. in aqua dest. bei Rt wässern.
7. 2 min. in Ilford 2000 bei Rt fixieren.
8. 2 min. in aqua dest. bei Rt wässern.
9. 10 min. in aqua dest. bei Rt wässern (keine Dunkelkammerbedingungen mehr nötig).
10. 10 min. in aqua dest. bei Rt wässern.
11. 10 min. in aqua dest. bei Rt wässern.
12. Objektträger bei Raumluft trocknen.

7.1.9. Gegenfärbung

1. 30 sek. in 0,05% Thioninlösung färben.
2. 1 min. in 70% Ethanol differenzieren.
3. 3 min. in 96% Ethanol.
4. 3 min. in 100% Ethanol.

5. 2 min. in 100% Ethanol.
6. 2 min. in Rotihistol.
7. 5 min. in Rotihistol.
8. In Roti HistoKitt eindecken.

7.1.10. Immunhistochemie

Für den immunhistochemischen Nachweis werden Kryostatschnitte der einzelnen Gewebe aufgetaut und bei Raumluft für 30 min. getrocknet.

1. Fixierung in 4% Paraformaldehyd-Lösung bei 4°C für 5 min.
2. Waschen der Schnitte in 1x PBS bei Raumtemperatur für 5 min..
Unmittelbar nach der Fixierung der Schnitte wird fortgefahren, wobei ein Eintrocknen der Schnitte unbedingt zu vermeiden ist.
3. Inkubation in Blockierungspuffer (1x PBST mit 2,5% NGS) für 10 min. bei Raumtemperatur.
4. Inkubation mit den Primärantikörpern (anti-MAP2 (Klon HM2) 1:500 in 1x PBST mit 2,5% NGS für die Kontrollreaktion PBST mit 2,5% NGS ohne Antikörper) für 60 min. bei Raumtemperatur.
5. Dreimaliges Waschen der Schnitte in 1xPBS für je 5 min. bei Raumtemperatur.
6. Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (1:20 in 1x PBS mit 10% NGS) für 60 min. bei Raumtemperatur.
7. Dreimaliges Waschen der Schnitte in 1x PBS für je 5 min. bei Rt.
8. Inkubation mit ABC-Komplex (1:25 in 1x PBS) für 60 min. bei Raumtemperatur.
9. Dreimaliges Waschen der Schnitte in 1x PBS für je 5 min. bei Rt.
10. Farbreaktion mit Vector SG (1:33 in 1x PBS) für 15 min. bei Rt.
11. Waschen der Schnitte in H₂O für 5 min. bei Rt.
12. Dehydrieren der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) für je 2 min..
13. Überführen in Xylolersatz für 5 min. und Eindecken der Schnitte.

Verwendete Materialien:

Anti-MAP2 (Klon HM-2)	Sigma M-4403
BioSpin6 Chromatography columns	Bio Rad 732-6002
35S dATP	NEN Life Science Products GmbH
Denhardt`s solution	Fluka 30915
DEPC	Sigma D-5758
Dextransulfat	Fluka 31403
DTT	Sigma D-9779
Entwickler D19	Kodak 1464593 (IBS)
Entwicklerlösung GBX	Kodak 1900984 (IBS)
Ethanol absolut unvergällt	Merck
Fixiererlösung GBX	Kodak
Fixierer RT2000	Ilford
Formamid	Fluka 47671
GBX Fixer and Replenisher	1902485 (IBS)
Glycerol	Sigma G-5516
HAc (Essigsäure 100%/ Eisessig)	Merck
Kodak Biomax Kassette 35x43cm	Kodak 8354367
Kodak Biomax MR-1 35x43cm	IBO5187 (Integra Bioscience)
Kodak NTB2 Fotoemulsion	IB 01433 (IBS)
Kodak Indicator Stop Solution	Kodak 1464247
Kodak Savelight Filter Nr.2	Kodak 1521525
Kodak Savelight	Kodak IB 02735
NaAcetat	Sigma S 3272
NaCl	Sigma 1679
Na ₃ Citrat2H ₂ O	Sigma S-1804
Na ₂ HPO ₄	Sigma S-3264
NaH ₂ PO ₄	Sigma S-3139
Parafilm 50cm,15m	1-6597 Neo Lab
Paraformaldehyd	Merck
Poly-A (5mg/ml) Potassium salt	Sigma P-9403
Poly-L-Lysin	Sigma P-1524
RotiHistol	Roth 6640.2
RotiHistolKitt	Roth 6638.2
Terminale Transferase	Roche Diagnostics 0220582
Thionin	Sigma T-3387
ssDNA (4mg/ml)	Sigma D-7290

7.2. Literaturverzeichnis

- Aasly, J., Silfvenius, H., Aas, T.C., Sonnewald, U., Olivecrona, M., Juul, R., White, L.R. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain biopsies from patients with intractable epilepsy. *Epilepsy Res.* 35 (1999) 211-217.
- Akbarian, S., Huntsman, M.M., Kim, J.J., Tafazzoli, A., Potkin, S.G., Bunney, W.E. Jr., Jones, E.G. GABA_A receptor subunit expression in human prefrontal cortex: comparison of schizophrenics and controls. *Cereb Cortex.* 5 (1995a) 550-560.
- Akbarian, S., Kim, J.J., Potkin, S.G., Hagman, J.O., Tafazzoli, A., Bunney, W.E. Jr., Jones, E.G. Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry.* 52 (1995b) 258-278.
- Alonso-Nanclares, L., Garbelli, R., Sola, R.G., Pastor, J., Tassi, L., Spreafico, R., DeFelipe, J. Microanatomy of the dysplastic neocortex from epileptic patients. *Brain.* 128 (2005) 158-173.
- Amin, J., Weiss, D.S. GABA_A receptor needs two homologous domains of the β -subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature.* 366 (1993) 565-569.
- Arnold, S., Berthele, A., Drzegza, A., Tölle, T.R., Weis, S., Werhahn, K.J., Henkel, A., Yoursry, T.A., Winkler, P.A., Bartenstein, P., Noachtar, S. Reduction of benzodiazepin receptor binding is related to the seizure onset zone in extratemporal focal cortical dysplasia. *Epilepsia.* 41 (2000) 818-824.
- Asada, H., Kawamura, K., Kume, H., Ding, R., Ji, F.Y., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T., Obata, K. Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but susceptible to seizures. *Biochem Biophys Res Commun.* 229 (1996) 891-895.
- Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T., Obata, K. Cleft palate and decrease brain γ -aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94 (1997) 6496-6499.
- Avoli, M., Hwa, G., Louvel, J., Kurcewicz, I., Pumain, R., Lacaille, J.C. Functional and pharmacological properties of GABA-mediated inhibition in the human neocortex. *Can J Physiol Pharmacol.* 75 (1997) 526-534.
- Avoli, M., Bernasconi, A., Mattia, D., Olivier, A., Hwa, G.G. Epileptiform discharges in the human dysplastic neocortex: in vitro physiology and pharmacology. *Ann Neurol.* 84 (1999) 816-826.
- Awapara, J., Landua, A., Fuerst, R., Seale, B. Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J Biol Chem.* 187 (1955) 35-39.
- Bacci, A., Rudolph, U., Huguenard, J.R., Prince, D.A. Major differences in inhibitory synaptic transmission onto two neocortical interneuron subclasses. *J Neurosci.* 23 (2003) 9664-9674.
- Bateson, A. N., Langer, S. Z. International union of pharmacology.XV. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of subunit structure and function. *Pharmacol Rev.* 50 (1998) 291-313.
- Barkovich, A.J., Kuzniecky, R.I., Dobyns W.B., Jackson, G.D., Becker, L.E., Evrard, P. A. Classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics.* 27 (1996) 59-63.
- Barth, R.G. Disorders of neuronal migration. *Can J Neurol Sci.* 14 (1987) 1-16.
- Barton, A.J.L., Pearson, R.C.A., Najlerahim, A., Harrison, P.J. Pre- and postmortem influences on brain mRNA. *J Neurochem.* 61 (1993) 1-11.
- Baulac, S., Huberfeld, G., Gourfinkel-An, I., Mitropoulou, G., Beranger, A., Prud'homme, J.F., Baulac, M., Brice, A., Bruzzone, R., LeGuern, E., First genetic evidence of GABA_A receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the γ 2-subunit gene. *Nat Genet.* 28 (2001) 46-48.
- Baumann, S.W., Baur, R., Sigel, E. Subunit arrangement of γ -aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem.* 276 (2001) 36275-36280.

- Bazemore, A.W., Elliot, K.A.C., Florey, E. Isolation of factor .II. *Neurochem.* 1 (1957) 334-339.
- Benes, F.M., Berreta, S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology.* 25 (2001) 1-27.
- Benardete, E.A., Kriegstein, A.R. Increased excitability and decreased sensitivity to GABA in an animal model of dysplastic cortex. *Epilepsia.* 43 (2002) 970-982.
- Benson, J.A., Low, K., Keist, R., Mohler, H., Rudolph, U. Pharmacology of recombinant γ -aminobutyric acid_A receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated α -subunits. *FEBS Lett.* 431 (1998) 400-404.
- Bernard, C., Cossart, R., Hirsch, J.C., Esclapez, M., Ben-Ari, Y. What is gabaergic inhibition? How is it modified in epilepsy? *Epilepsia.* 41 (2000) 90-95.
- Berry, M., Rogers, A.W. The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J Anat.* 99 (1965) 691-709.
- Berthele, A. Die Expression der Transkripte von Glutamat-Rezeptor-Untereinheiten und ihrer Splice-Varianten im lumbalen Rückenmark der Ratte: Eine in situ Hybridisierungsstudie. Dissertation, TU München (1996) 52.
- Berthele, A., Platzer, S., Conrad, B., Tölle, T.R. Expression of GABA_B receptor 1 and 2 mRNA in the human brain. *Neuroreport.* 12 (2001) 3269-3275.
- Billinton, A., Ige, A.O., Bolam, P.J., White, J.H., Marshall, F.H., Emson, P.C. Advances in the molecular understanding of GABA_B receptors. *Trends Neurosci.* 24 (2001) 277-282.
- Bloom, F.E., Iversen, L.L. Localizing ³H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature.* 229 (1971) 628-630.
- Bormann, J. Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. *Trends Neurosci.* 11 (1988) 112-116.
- Bormann, J., Feigenspan, A. GABA_C receptors. *Trends Neurosci.* 18 (1995) 515-519.
- Boue-Grabot, E., Roudbaraki, M., Bascles, L., Tramu, G., Bloch, B., Garret, M. Expression of GABA receptor ρ subunits in rat brain. *J Neurochem.* 70 (1998) 899-907.
- Bowery, N.G. GABA_B receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 10 (1989) 401-407.
- Braestrup, C., Nielsen, G.B., Sonnewald, U., Knutsen, L.J.S., Andersen, K.E., Jansen, J.A., Frederiksen, K., Andersen, P.H., Mortensen, A., Suzdak, P.D. $\text{[}^3\text{H]-N-[4,4-bis(3-methyl-2-thienyl)but-3-en-1-yl]nipecotic acid}$ binds with high affinity to the brain γ -aminobutyric acid uptake carrier. *J Neurochem.* 54 (1990) 639-647.
- Brooks-Kayal, A.R., Shumate, M.D., Jin, H., Rikhter, T.Y., Coulter, D.A. Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med.* 4 (1998) 1166-1172.
- Browne, T.R., Holmes, G.L. Epilepsy. *N Engl J Med.* 344 (2001) 1145-1151.
- Bu, D.-F., Erlander, M.G., Hitz, B.C., Tillakaratne, N.J.K., Kaufman, D.L., Wagner-McPherson, C.B., Evans, G.A., Tobin, A.J. Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89 (1992) 2115-2119.
- Burdette, D.E., Sakurai, S.Y., Henry, T.R., Ross, D.A., Pennell, P.B., Frey, K.A., Sackellares, J.C., Albin, R.L. Temporal lobe central benzodiazepine binding in unilateral mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 45 (1995) 934-941.
- Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B, Angulo, M.C., Ropert, N., Tsuzuki, K., Hestrin, S., Rossier, J. Molecular and physiological diversity of cortical non-pyramidal cells. *J Neurosci.* 17 (1997) 3894-3906.

- Cepeda, C., Hurst, R.S., Flores-Hernandez, J., Hernandez-Echeagaray, E., Klapstein, G.J., Boylan, M.K., Calvert, C.R., Locoy, E.L., Nguyen, O.K., Andre, V.M., Vinters, H.V., Ariano, M.A., Levine, M.S., Mather, G.W. Morphological and electrophysiological characterization of abnormal cell types in pediatric cortical dysplasia. *J Neurosci Res.* 72 (2003) 472-486.
- Chagnac-Amitai, Y., Connors, B.W. Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J Neurophysiol.* 61 (1989a) 747-758.
- Chagnac-Amitai, Y., Connors, B.W. Synchronized excitation and inhibition driven by intrinsically bursting neurons in neocortex. *J. Neurophysiol.* 62 (1989b) 1149-1162.
- Cherubini, E., Conti, F., Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci.* 24 (2001) 155-162.
- Clark, M., Massenburg, G.S., Weiss, S.R.B., Post, R.M. Analysis of the hippocampal GABA_A receptor system in kindled rats by autoradiographic and in situ hybridization techniques: contingent tolerance to carbamazepine. *Brain Res Mol Brain Res.* 26 (1994) 309-319.
- Cohen, L. Stiff-man syndrome. Two patients treated with diazepam. *JAMA.* 195 (1966) 222-224.
- Collier, P.A., Ashwell, K.W.S. Distribution of neuronal heterotopias following prenatal exposure to methylzoxymethanol. *Neurotoxicol Teratol.* 15 (1993) 439-444.
- Concas, A., Santoro, G., Serra, M., Sanna, E., Biggio, G. Neurochemical action of the general anesthetic propofol on the chloride ion channel coupled with GABA_A receptors. *Brain Res.* 542 (1991) 225-232.
- Connolly, C.N., Woollorton, J.R., Smart, T.G., Moss, S.J. Subcellular localization of gamma-aminobutyric acid type A receptors is determined by receptor beta subunits. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93 (1996) 9899-9904
- Connolly, C.N., Uren, J.M., Thomas, P., Gorrie, G.H., Gibson, A., Smart, T.G., Moss, S.J. Subcellular localization and endocytosis of homomeric gamma2 subunit splice variants of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol Cell Neurosci.* 13 (1999) 259-271
- Copp, A.J., Harding, B.N. Neuronal migration disorders in humans and mouse models- an overview. *Epilepsy Res.* 36 (1999) 133-141.
- Cossette, P., Liu, L., Brisebois, K., Dong, H., Lortie, A., Vanasse, M., Saint-Hilaire, J.M., Carmant, L., Verner, A., Lu, W.Y., Wang, Y.T., Rouleau, G.A. Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 31 (2002) 184-189.
- Crestani, F., Martin, J.R., Möhler, H., Rudolph, U. Mechanism of action of the hypnotic zolpidem in vivo. *Br J Pharmacol.* 131 (2000) 1251-1256.
- Crestani, F., Löw, K., Keist, R., Mandelli, M., Möhler, H., Rudolph, U. Molecular targets for the myorelaxant action of diazepam. *Mol Pharmacol.* 59 (2001) 442-445.
- Crino, P.B., Eberwine, J. Cellular and molecular basis of cerebral dysgenesis. *J Neurosci Res.* 50 (1997) 907-916.
- Crino, P.B., Duhaime, A.C., Baltuch, G., White, R. Differential expression of glutamate and GABA-A receptor subunit mRNA in cortical dysplasia. *Neurology.* 56 (2001) 906-913.
- Crino, P.B., Miyata, H., Vinters, H.V. Neurodevelopmental disorders as a cause of seizures: neuropathologic, genetic, and mechanistic consideration. *Brain Pathol.* 12 (2002) 212-233.
- Deuchars, J., Thomson, A.M. Single axon fast inhibitory postsynaptic potentials elicited by a sparsely spiny interneuron in rat neocortex. *Neuroscience.* 65 (1995) 935-942.
- Dobyns, W.B., Reiner, O., Carrozzo, R., Ledbetter, D.H. Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *JAMA.* 270(1993):2838-2842.

- Dobyns, W.B., Andermann, E., Andermann, F., Czapansky-Beilman, D., Dubeau, F., Dulac, O., Guerrini, R., Hirsch, B., Ledbetter, D.H., Lee, N.S., Motte, J., Pinard, J.M., Radtke, R.A., Ross, M.E., Tampieri, D., Walsh, C.A., Truwit, C.L. X-linked malformations of neuronal migration. *Neurology*. 47 (1996) 331-339.
- Ebert, B., Thompson, S.A., Saounatsou, K., McKernan, R., Krogsgaard-Larsen, P., Wafford, K.A. Differences in agonist/antagonist binding affinity and receptor transduction using recombinant human gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol Pharmacol*. 52 (1997) 1150-1156
- Ellis, M.T., Atkinson, M.A. The clinical significance of an autoimmune response against glutamic acid decarboxylase. *Nat Med*. 2 (1996) 148-153.
- Enz, R., Cutting, G.R. Molecular composition of GABA_C receptors. *Vision Res*. 38 (1998) 1431-1441.
- Enz, R., Cutting, G.R. GABA_C receptor ρ subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *Eur J Neurosci*. 11 (1999) 41-50.
- Erdo, S., Wolff, J. Gamma-aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J Neurochem*. 54 (1990) 363-372.
- Erlander, M.G., Tillakaratne, N.J.K., Feldblum, S., Patel, N., Tobin, A.J. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*. 7 (1991) 91-100.
- Essrich, C., Lopez, M., Benson, J.A., Fritschy, J.M., Lüscher, B. Postsynaptic clustering of major GABA_A receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci*. 1 (1998) 563-571
- Faull, R.L.M., Waldvogel, H.J., Nicholson, L.F.B., Synek, B.J.L. The distribution of GABA_A-benzodiazepine receptors in the basal ganglia in Huntington's disease and in the quinolinic acid-lesioned rat. *Prog Brain Res*. 99 (1993) 105-123.
- Farrar, S.J., Whiting, P.J., Bonnert, T.P., McKernan, R.M. Stoichiometry of a ligand-gated ion channel determined by fluorescence energy transfer. *J Biol Chem*. 274 (1999) 10100-10104.
- Farrell, M.A., DeRosa, M.J., Curran, J.G., Lenard Secor, D., Conford, M.E., Comair, Y.G., Peacock, W.J., Shields, W.D., Vinters, H.V. Neuropathologic findings in cortical resections (including hemispherectomies) performed for the treatment of intractable childhood epilepsy. *Acta Neuropathol*. 83 (1992) 246-259.
- Feldblum, S., Erlander, M.G., Tobin, A.J. Different distributions of GAD65 and GAD67 mRNAs suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles. *J Neurosci Res*. 34 (1993) 689-706.
- Ferrer, I., Pineda, M., Tallada, M., Oliver, B., Russi, A., Oller, L., Noboa, R., Zujar, M.J., Alcantara, S. Abnormal local circuit neurons in epilepsy partialis continua associated with focal cortical dysplasia. *Acta Neuropathol*. 83 (1992) 647-652.
- Folli, F. Stiff man syndrome, 40 years later. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 5 (1998) 618.
- Fon, E.,A., Edwards, R.,H.,. Molecular mechanisms of neurotransmitter release. *Muscle Nerve*. 24 (2001) 581-601.
- Fritschy, J.-M., Brünig, I. Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol Ther*. 98 (2003) 299-323.
- Gale, K. GABA and epilepsy: Basic concepts from preclinical research. *Epilepsia*. 33 (1992) 3-12.
- Gambardella, A., Palmi, A., Andermann, F., Dubeau, F., Da Costa, J.C., Queney, L.F., Andermann, E., Olivier, A. Usefulness of focal rhythmic discharges on scalp EEG of patients with focal cortical dysplasia and intractable epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 98 (1996) 243-249.
- Garbelli, R., Munari, C., De Biasi, S., Vitellaro-Zuccarello, L., Galli, C., Bramerio, M., Mai, R., Battaglia, G., Spreafico, R. Taylor's cortical dysplasia: a confocal and ultrastructural immunohistochemical study. *Brain Pathol*. 9 (1999) 445-461.

- Gold, B.I., Roth, R.H. Glutamate decarboxylase activity in striatal slices: characterization of the increase following depolarization. *J Neurochem.* 32 (1979) 883-888.
- Gressens, P., Kosofsky, B.E., Evrard, P. Cocaine-induced disturbances of corticogenesis in the developing murine brain. *Neurosci Lett.* 140 (1992) 113-116.
- Günther, U., Benson, J., Fritschy, J.M., Reyes, G., Knoflach, F., Crestani, F., Aguzzi, A., Arigoni, A., Arigoni, M., Lang, Y. Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeted disruption of the $\gamma 2$ subunit gene of γ -aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92 (1995) 7749-7753.
- Gupta, A., Wang, Y., Makram, H. Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science.* 287 (2000) 273-278.
- Gutierrez, A., Khan, Z.U., De Blas, A.L. Immunocytochemical localization of $\gamma 2$ short and $\gamma 2$ long subunits of the GABA_A receptor in the rat brain. *J Neurosci.* 14 (1994) 7168-7179.
- Hammers, A., Koepp, M.J., Richardson, M.P., Labbe, C., Brooks, D.J., Cunningham, V.J., Duncan, J.S. Central benzodiazepine receptors in malformations of cortical development. A quantitative study. *Brain* 124 (2001) 1555-1565.
- Hand, K.S.P., Baird, V.H., Van Paesschen, W., Koepp, M.J., Revesz, T., Thom, M., Harkness, W.F.J., Duncan, J.S., Bowery, N.G. Central benzodiazepine receptor autoradiography in hippocampal sclerosis. *Br J Pharmacol.* 122 (1997) 358-364.
- Harkin, L.A., Bowser, D.N., Dibbens, L.M., Singh, R., Phillips, F., Wallace, R.H., Richards, M.C., Williams, D.A., Mulley, J.C., Berkovic, S.F., Scheffer, I.E., Petrou, S. Truncation of the GABA(A)-receptor gamma2 subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Genet.* 70 (2002) 530-536.
- Hill, D.R., Bowery, N.G. ³H-baclofen and ³H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA_B sites in rat brain. *Nature.* 290 (1981) 149-152.
- Houser C.R. GABA neurons in seizure disorders: a review of immunocytochemical studies. *Neurochem Res.* 16 (1991) 295-308.
- Jones, K.L., Smith, D.W. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet.* 1 (1973) 999-1001.
- Jones, K.A., Borowsky, B., Tamm, J.A., Craig, D.A., Durkin, M.M., Dai, M., Yao, W.J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L.Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J.A., Morse, K., Laz, T., Smith, K.E., Nagarathnam, D., Noble, S.A., Branchek, T.A., Gerald, C. GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_B R1 and GABA_B R2. *Nature.* 396 (1998) 674-679.
- Jones, M.V., Brooks, P.A., Harrison, N.L. Enhancement of γ -aminobutyric acid Cl⁻ currents in cultured rat hippocampal neurones by three volatile anaesthetics. *J Physiol.* 449 (1992) 279-293.
- Jung; M.J., Lippert, B., Metcalf, B., Böhlen, P., Schlechter, P.J. γ -Vinyl GABA (4-amino-hex-5-enoic acid), a new irreversible inhibitor of GABA-T: effects on brain GABA metabolism in mice. *J Neurochem.* 29 (1977) 797-802.
- Kaila, K. Ionic basis of GABA_A receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 42 (1994) 489-537.
- Kamphuis, W., De Rijk, T.C., Lopes da Silva, F.H. GABA_A receptor $\beta 1$ -3 subunit gene expression in the hippocampus of kindled rats. *Neurosci Lett.* 174 (1994) 5-8.
- Kananura, C., Haug, K., Sander, T., Runge, U., Gu, W., Hallmann, K., Rebstock, J., Heils, A., Steinlein, O.K. A splice-site mutation in GABRG2 associated with childhood absence epilepsy and febrile convulsions. *Arch Neurol.* 59 (2002) 1137-1141.
- Kash, S.F., Johnson, R.S., Tecott, L.H., Noebels, J.L., Mayfield, R.D., Hanahan, D., Baekkeskov, S. Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94 (1997) 14060-14065.

- Kaufman, D.L., Houser, C.R., Tobin, A.J. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J Neurochem.* 56 (1991) 720-723.
- Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P.J., Bischoff, S., Mickel, S.J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W., Bettler, B. Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature.* 386 (1997) 239-246.
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A., Bettler, B. GABA_B-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature.* 396 (1998) 683-687.
- Kawaguchi, Y., Kubota, Y. Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J Neurophysiol.* 70 (1993) 387-396.
- Kerfoot, C., Vinters, H.V., Mathern, G.W. Cerebral cortical dysplasia: giant neurons show potential for increased excitation and axonal plasticity. *Dev Neurosci.* 21 (1999) 260-270.
- Kerr, D.I., Ong, J., Prager, R.H., Gynther, B.D., Curtis, D.R. Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. *Brain Res.* 405 (1987) 150-154.
- Knoll, J.H., Wagstaff, J., Lalonde, M. Cytogenetic and molecular studies in the Prader-Willi and Angelman syndromes: an overview. *Am J Med Genet.* 46 (1993) 2-6.
- Korpi, E.R., Gründer, G., Lüddens, H. Drug interactions at GABA_A receptors. *Prog Neurobiol.* 67 (2002) 113-159.
- Kuffler, S.W., Edwards, C. Mechanisms of γ -aminobutyric acid (GABA) action and its relation to synaptic inhibition. *J Neurophysiol.* 21 (1958) 589-610.
- Kuffler, S.W. Excitation and inhibition in single nerve cells. *Harvey Lect.* 54 (1960) 176-218.
- Kuner, R., Köhr, G., Grünwald, S., Eisenhardt, G., Bach, A., Kornau, H.C. Role of heteromer formation in GABA_B receptor function. *Science.* 283 (1999) 74-77.
- Kunig, G., Leenders, K.L., Sanchez-Pernaute, R., Antonini, A., Vontobel, P., Verhagen, A., Gunther, I. Benzodiazepine receptor binding in Huntington's disease: [¹¹C]flumazenil uptake measured using positron. *Ann Neurol.* 47 (2000) 644-648.
- Kuzniecky, R., Garcia, J.H., Faught, E., Morawetz, R.B. Cortical dysplasia in temporal lobe epilepsy: magnetic resonance imaging correlations. *Ann Neurol.* 29 (1991) 293-298.
- Kuzniecky, R.I., Barkovich, A.J. Pathogenesis and pathology of focal malformations of cortical development and epilepsy. *J Clin Neurophysiol.* 13(6) (1996) 468-480.
- Leach, J.P., Brodie, M. New antiepileptic drugs-an explosion of activity. *Seizure* 4 (1995) 5-17.
- Löscher, W. Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog Neurobiol.* 58 (1999) 31-59.
- Lüddens, H., Korpi, E. Biological function of GABA_A/benzodiazepine receptor heterogeneity. *J Psychiatr Res.* 29 (1995) 77-94.
- MacDonald, R.L., Rogers, C.J., Twyman, R.E. Barbiturate regulation of kinetic properties of the GABA_A receptor channel of mouse spinal neurones in culture. *J Physiol.* 417 (1989) 483-500.
- Marsh, D.O., Myers, G.Y., Clarkson, T.W., Amin-Zaki, L., Tikriti, S., Majeed, M.A. Fetal methylmercury poisoning: clinical and toxicological data on 29 cases. *Ann Neurol.* 7 (1980) 348-353.
- Mathern, G.W., Cepeda, C., Hurst, R.S., Flores-Hernandez, J., Mendoza, D., Levine, M.S. Neurons recorded from pediatric epilepsy surgery patients with cortical dysplasia. *Epilepsia.* 41 (2000) 162-167.

- Matsuda, K., Yonezawa, A., Doi, T., Kubota, Y., Nishimura, S., Tottori, T., Ohtsubo, T., Mihara, T., Yagi, K., Seino, M. Autoradiographic and Single-Proton Emission-Computed Tomography for central-type benzodiazepine receptors in focal cortical dysplasia. *Epilepsia*. 37 (1996) 107.
- Matsumoto, H., Koya, G., Takeuchi, T. A study of two cases of intrauterine intoxication by methylmercury compound. *J Neuropathol Exp Neurol*. 24 (1965) 348-353.
- Mattia, D., Olivier, A., Avoli, M. Seizure-like discharges recorded in human dysplastic neocortex maintained in vitro. *Neurology*. 45 (1995) 1391-1395.
- Meinkoth, J., Wahl, G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem*. 138 (1984) 267-284.
- Meldrum, B.S. Convulsant drugs, anticonvulsants and GABA-mediated neuronal inhibition. In: „GABA-Neurotransmitters“, Krosgard-Larsen, P., Scheell-Kruger, J., Kofod, H. (eds.), Munksgaard, Copenhagen, 1979, 390-405.
- Meldrum, B.S. Update on the mechanism of action of antiepileptic drugs. *Epilepsia* 37 (1996) 4-11.
- Mehta, A.K., Ticku, M.K. An update on GABA_A receptors. *Brain Res Rev*. 29 (1999) 196-217.
- Mikuni, N., Babb, T.L., Ying, Z., Najm, I., Nishiyama, K., Wylie, C., Yacubora, K., Okamoto, T., Bingaman, W. NMDA-receptors 1 and 2A/B coassembly increased in human epileptic focal cortical dysplasia. *Epilepsia*. 40 (1999) 1683-1687.
- Miller, M.W. Effects of alcohol on generation and migration of cerebral cortex neurons. *Science*. 233 (1986) 1308-1311.
- Miller, R.W. Delayed effects occurring within the first decade after exposure of individuals to the Hiroshima atomic bomb. *Pediatrics*. 18 (1956) 1-17.
- Miller, L.P., Walters, J.R. Effects of depolarization on cofactor regulation of glutamic acid decarboxylase in substantia nigra synaptosomes. *J Neurochem*. 33 (1979) 533-539.
- Mizoguchi, M., Iwaki, T., Morioka, T., Fukui, M., Tateishi, J. Abnormal cytoarchitecture of cortical dysplasia verified by immunohistochemistry. *Clin Neuropathol*. 17 (1998) 100-109.
- Möhler, H., Benke, D., Benson, J., Lüscher, B., Rudolph, U., Fritschy, J.M. Diversity in structure, pharmacology and regulation of GABA_A receptors. In „The GABA Receptors“, Enna SJ, Bowery NG (Eds.), Humana Press, Totowa New Jersey (1997) 2. edition, 11-36.
- Möhler, H., Fritschy, J.M., Rudolph, U. A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*. 300 (2002) 2-8.
- Nobrega, J.N., Kish, S.J., Burnham, W.M. Regional brain [³H] muscimol binding in kindled rat brain: A quantitative autoradiographic examination. *Epilepsy Res*. 6 (1990) 102-109.
- Olsen, R.W., Wamsley, J.K., Lee, R.J., Lomax, P. Benzodiazepine/barbiturate/GABA receptor-chloride ionophore complex in a genetic model for generalized epilepsy. *Adv Neurol*. 44 (1986) 365-378.
- Olsen, R.W., Bureau, M., Houser, C.R., Delgado-Escueta, A.V., Richards, J.G., Mohler, H. GABA/Benzodiazepine receptors in human focal epilepsy. In: „Neurotransmitters in epilepsy, advances in the neurobiology of epilepsy“, Avanzini, G., (ed.) Demos Publications, New York, 1990, 515-527.
- Olsen, R.W., Bureau, M., Houser, C.R., Delgado-Escueta, A.V., Richards, J.G., Mohler, H. GABA/benzodiazepine receptors in human focal epilepsy. *Epilepsy Res Suppl*. 8 (1992) 383-391.
- Owens, D.F., Kriegstein, A.R., Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci*. 3 (2002) 715-727.

- Palmini, A., Gambardella, A., Andermann, F., Dubeau, F., da Costa, J.C., Olivier, A., Tampieri, D., Robitaille, Y., Paglioli, E., Paglioli Neto, E. Operative strategies for patients with cortical dysplastic lesions and intractable epilepsy. *Epilepsia*. 35 (1994) 57-71.
- Palmini, A., Gambardella, A., Andermann, F., Dubeau, F., da Costa, J.C., Olivier, A., Tampieri, D., Gloor, R., Quesney, F., Andermann, E., Paglioli, E., Paglioli Neto, E., Coutinho, L., Leblanc, R., Kim, H.I. Intrinsic epileptogenicity of human dysplastic cortex as suggested by corticography and surgical results. *Ann Neurol*. 37 (1995) 476-487.
- Palmini, A., Najm, I., Avanzini, G., Babb, T., Guerrini, R., Foldvary-Schaefer, N., Jackson, G., Lüders, H.O., Prayson, R., Spreafico, R., Vinters, H.V. Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology*. 62 (2004) 2-8.
- Petroff, O.A.C., Rothman; D.L., Behar, K.L., Mattson, R.H. Human brain GABA levels rise after initiation of vigabatrin therapy but fail to rise further with increasing dose. *Neurology*. 46 (1996) 1459-1463.
- Petroff, O.A.C., Rothman; D.L. Measuring human brain GABA in vivo: effects of GABA-transaminase inhibition with vigabatrin. *Mol Neurobiol*. 16 (1998) 97-121.
- Platzer, S.C. Expression der GABA_B Rezeptoren im Gehirn des Menschen. Dissertation, TU München (2005) 17.
- Prayson, R.A., Estes, M.L. Cortical dysplasia: a histopathologic study of 52 cases of partial lobectomy in patients with epilepsy. *Hum Pathol*. 26 (1995) 493-500.
- Prevett, M.C., Brown, P., Duncan, J.S. Improvement of stiff-man syndrome with vigabatrin. *Neurology*. 48 (1997) 1133-1134.
- Rakic, P. Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations. *Prog Brain Res*. 73 (1988) 5-37.
- Redecker, C., Luhmann, H.J., Hagemann, G., Fritschy, J.M. Witte, O.W. Differential downregulation of GABA_A receptor subunits in widespread brain regions in the freeze-lesion model of focal cortical malformations. *J Neurosci*. 20 (2000) 5045-5053.
- Reis, A., Kunze, J., Ladanyi, L., Enders, H., Klein-Vogler, U., Niemann, G. Exclusion of the GABA_A-receptor $\beta 3$ subunit gene as the Angelman's syndrome gene. *Lancet* 341 (1993) 122-123.
- Retaux, S., Caboche, J., Rogard, M., Julien, J.-F., Penit-Soria, J., Besson, M.-J. GABA interneurons in the rat medial frontal cortex: characterization by quantitative in situ hybridization of the glutamic acid decarboxylase (GAD67) mRNA. *Brain Res*. 611 (1992) 187-196.
- Richardson, M.P., Koeppe, M.J., Brooks, D.J., Fish, D.R., Duncan, J.S. Benzodiazepine receptors in focal epilepsy with cortical dysgenesis: an 11C-flumazenil PET study. *Ann Neurol*. 40 (1996) 188-198
- Roberts, E., Frankel, S. Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid in brain. *J Biol Chem*. 187 (1950) 55-63.
- Roberts, E. Formation and utilization of gamma-aminobutyric acid in brain. *Progress in neurobiology*. in Korey, S. Hoeber-Harper, New York, 1956, 1. Auflage, 11-25.
- Roepstorff, A., Lambert, J.D. Comparison of the effect of GABA uptake blockers, tiagabine and nipecotic acid, on inhibitory synaptic efficacy in hippocampal CA1 neurones. *Neurosci Lett*. 146 (1992) 131-134.
- Roper, S.N., King, M.A., Abraham, L.A., Boillot, M.A. Disinhibited in vitro neocortical slices containing experimentally induced cortical dysplasia demonstrate hyperexcitability. *Epilepsy Res*. 26 (1997) 443-449.
- Roper, S.N., Yachnis, A.T. Cortical dysgenesis and epilepsy. *Neuroscientist*. 8 (2002) 356-371.

- Ross, M.E., Allen, K.M., Srivastava, A.K., Featherstone, T., Gleeson, J.G. Linkage and physical mapping of X-linked lissencephaly/SBH (XLIS): A gene causing migration defects in human brain. *Hum Mol Genet.* 6 (1997) 555-562.
- Rudolph, U., Crestani, F., Möhler, H. GABA_A receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci.* 22 (2001) 188-194.
- Ryvlin, P., Bouvard, S., Le Bars, D., De Lamerie, G., Gregoire, M.C., Kahane, P., Froment, J.C., Mauguiere, F. Clinical utility of flumazenil-PET versus 18F-fluorodeoxyglucose-PET and MRI in refractory partial epilepsy: a prospective study in 100 patients. *Brain.* 121 (1998) 2067-2081.
- Sadzot, B., Debets, R.M., Delfiore, G., Van Huffelen, C.W., Vand Veelen, A.C., Degueldre, C., Moonen, G., Franck, G. ¹¹C-Flumazenil positron emission tomography: an in vivo marker of neuronal loss in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 35 (1995) 28.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. „Molecular cloning: a laboratory manual“. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989) 2. ed.: 5.68-5.72, 11.28, B13.
- Sarnat, H.B. Cerebral dysplasias as expressions of altered maturational processes. *Can J Neurol Sci.* 18
- Sarnat, H.B. Cerebral dysgenesis: Embryology and clinical expression. Oxford University Press. New York. (1992).
- Savic, I., Roland, P., Sedvall, G., Persson, A., Pauli, S., Widen, L. In vivo demonstration of reduced benzodiazepine receptor binding in human epileptic foci. *Lancet.* 2 (1988) 863-866.
- Savic, I., Thorell, J.O., Roland, P. ¹¹C-Flumazenil positron emission tomography visualizes frontal epileptogenic regions. *Epilepsia.* 36 (1995) 1225-1232.
- Schlechter, P.J., Tranjer, Y., Jung, M.J., Bohlen, P. Audiogenic seizure protection by elevated brain GABA concentration in mice: effects of γ -acetylenic GABA and γ -vinyl GABA, two irreversible GABA-T inhibitors. *Eur J Pharmacol.* 45 (1977) 319-328.
- Shin, C., Pedersen, H.B., McNamara, J.O. γ -aminobutyric acid and benzodiazepine receptors in the kindling model of epilepsy: A quantitative radiohistochemical study. *J Neurosci.* 5 (1985) 2696-2701.
- Sidman, R. L., Rakic, P. Neuronal migration with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res.* 62 (1973) 1-35.
- Sieghart, W. Structure and pharmacology of γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Pharmacol Rev.* 47 (1995) 181-234.
- Sieghart, W. Unraveling the function of GABA_A receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci.* 21 (2000) 411-413.
- Smith, G.B., Olsen, R.W. Functional domains of GABA_A receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 16 (1995) 162-168.
- Speckmann, E.J., Straub, H., Kohling, R. Contribution of calcium ions to the generation of epileptic activity and antiepileptic calcium antagonism. *Neuropsychobiology.* 27 (1993) 122-126.
- Spreafico, R., Battaglia, G., Arcelli, P., Andermann, F., Dubeau, F., Palmini, A., Olivier, A., Villemure, J.G., Tampierei, D., Avanzini, G., Avoli, M. Cortical dysplasia. An immunocytochemical study of three patients. *Neurology* 50 (1998a) 27-36.
- Spreafico, R., Pasquier, B., Minotti, L., Garbelli, R., Kahane, P., Grand, S., Benabid, A.L., Tassi, L., Avanzini, G., Battaglia, G., Mussari, C. Immunocytochemical investigation on dysplastic human tissue from epileptic patients. *Epilepsy Res.* 32 (1998b) 34-48.
- Spreafico, R., Tassi, L., Colombo, N., Brammerio, M., Galli, C., Garbelli, R., Ferrario, A., Lo Russo, G., Munari, C. Inhibitory circuits in human dysplastic tissue. *Epilepsia.* 41 (2000) 168-173.
- Stayer, C., Meinck, H.M. Stiff-man syndrome: an overview. *Neurologia.* 13 (1998) 83-88.

- Tassi, L., Pasquier, B., Minotti, L., Garbelli, R., Kahane, P., Benabid, A.L., Battaglia, G., Munari, C., Spreafico, R. Cortical dysplasia: Electroclinical, imaging, and neuropathologic study of 13 Patients. *Epilepsia* 42 (2001) 1112-1123.
- Tassi, L., Colombo, N., Garbelli, R., Francione, S., Lo Russo, G., Mai, R., Cardinale, F., Cossu, M., Ferrario, A., Galli, C., Bramerio, M., Citterio, A., Spreafico, R. Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. *Brain* 125 (2002) 1719-1732.
- Taylor, D.C., Falconer, M.A., Bruton, C.J., Corsellis, J.A.N. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 34 (1971) 369-387.
- Tiihonen, J., Kuikka, J., Rasanen, P., Lepola, U., Koponen, H., Liuska, A., Lehmusvaara, A., Vainio, P., Kononen, M., Bergstrom, K., Yu, M., Kinnunen, I., Akerman, K., Karhu, J. Cerebral benzodiazepine binding and distribution in generalized anxiety disorder: a fractal analysis. *Mol Psychiatry*. 6 (1997) 463-471.
- Twyman, R.E., Rogers, C.J., MacDonald, R.L. Differential regulation of γ -aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. *Ann Neurol*. 25 (1989) 213-220.
- Uchida, I., Kamatchi, G., Burt, D., Yang, J. Etomidate potentiation of GABA_A receptor gated current depends on the subunit composition. *Neurosci Lett*. 185 (1995) 203-206.
- Vianello M., Tavolato B., Giometto B. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies and neurological disorders. *Neurol Sci*. 23 (2002) 145-151.
- Volk, D.W., Austin, M.C., Pierri, J.N., Sampson, A.R., Lewis, D.A. Decreased glutamic acid decarboxylase67 messenger RNA expression in a subset of prefrontal cortical GABA neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 57 (2000) 237-245.
- Wafford KA, Burnett DM, Leidenheimer NJ, Burt DR, Wang JB, Kofuji P, Dunwiddie TV, Harris RA, Sikela JM. Ethanol sensitivity of the GABA_A receptor expressed in *Xenopus* oocytes requires 8 amino acids contained in the gamma 2L subunit. *Neuron*. 7 (1991) 27-33.
- Wagstaff, J., Knoll, J.H.M., Fleming, J., Kirkness, E.F., Martin-Gallardo, A., Greenberg, F., Graham Jr., J.M., Menninger, J., Ward, D., Venter, J.C., Lalande, M. Localization of the gene encoding the GABA_A receptor β 3 subunit to the Angelman/Prader-Willi region of the human chromosome 15. *Am J Hum Genet*. 49 (1991) 330-337.
- Walker, E., McNicol, A. In situ hybridization demonstrates the stability of mRNA in post-mortem rat tissues. *J Pathol*. 168 (1992) 67-73.
- Wallace, R., Marini, C., Petrou, S., Harkin, L.A., Bowser, D.N., Panchal, R.G., Williams, D.A., Sutherland, G.R., Mulley, J.C., Scheffer, I.E., Bercovic, S.F. Mutant GABA_A receptor γ 2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nat Genet*. 28 (2001) 49-53.
- White, J.H., Wise, A., Main, M.J., Green, A., Fraser, N.J., Disney, G.H., Barnes, A.A., Emson, P., Foord, S.M., Marshall, F.H. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA_B receptor. *Nature*. 396 (1998) 679-682.
- White, H.S. Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of established and newer antiepileptic drugs. *Epilepsia* 40 (1999) 2-10.
- Whiting, P.J., Wafford, K.A. Poster. *Trends Pharmacol Sci*. (2002)
- Wingrove, P.B., Safo, P., Wheat, L., Thompson, S.A., Wafford, K.A., Whiting, P.J. Mechanism of α -subunit selectivity of benzodiazepine pharmacology at γ -aminobutyric acid type A receptors. *Eur J Neurosci*. 437 (2002) 31-39.
- Wisden, W., Laurie, D.J., Monyer, H., Seeburg, P.H. The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain: I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci*. 12 (1992) 1040-1062.

- Wisden, W., Morris, B.J. In situ hybridization with synthetic oligonucleotide probes. In situ hybridization protocols for the brain. Wisden, W., Morris, B.J. (Ed.), Academic Press, London, 1994, 9-34.
- Wojcik, W.J., Neff, N.H. Gamma-aminobutyric acid B receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in brain and in the cerebellum these receptors may be associated with granule cells. *Mol Pharmacol.* 25 (1984) 24-28.
- Wolf, H.K., Birkholz, T., Wellmer, J., Blumcke, I., Pietsch, T., Wiestler, O.D., Neurochemical profile of glioneuronal lesions from patients with pharmacoresistant epilepsies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 54 (1995) 689-697.
- Wolf, H.K., Roos, D., Blümcke, I., Pietsch, T., Wiestler, O.D. Perilesional neurochemical changes in focal epilepsies. *Acta Neuropathol.* 91 (1996) 376-384.
- Wong, G., Sei, Y., Skolnick, P. Stable expression of type I γ -aminobutyric acid_A/benzodiazepine receptors in a transfected cell line. *Mol Pharmacol.* 42 (1992) 996-1003.
- Xiang, Z., Huguenard, J.R., Price, D.A. Synaptic inhibition of pyramidal cells evoked by different interneuronal subtypes in layer V of rat visual cortex. *J Neurophysiol.* 88 (2002) 740-750.
- Yamanouchi, H., Zhang, W., Jay, V., Becker, L.E. Enhanced expression of microtubule-associated protein 2 in large neurons of cortical dysplasia. *Ann Neurol.* 39 (1996) 57-61.
- Yamanouchi, H., Jay, V., Otsubo, H., Kaga, M., Becker, L.E., Takashima, S. Early forms of microtubule-associated protein are strongly expressed in cortical dysplasia. *Acta Neuropathol.* 95 (1998) 466-470.
- Ying, Z., Babb, T.L., Comair, Y.G., Bingaman, W., Bushey, M., Touhalisky, K. Induced expression of NMDAR2 proteins and differential expression of NMDAR1 splice variants in dysplastic neurons of human epileptic neocortex. *J Neuropathol Exp Neurol.* 57 (1998) 47-62.
- Ying, Z., Babb, T.L., Mikuni, N., Najm, I., Drazba, J., Bingaman, W. Selective coexpression of NMDAR2A/B and NMDAR1 subunits proteins in dysplastic neurons of human epileptic cortex. *Exp Neurol.* 159 (1999) 409-418.
- Yurkewicz, L., Valentino, K.L., Floeter, M.K., Fleshman, J.W., Jones, E.G. Effects of cytotoxic deletions of somatic sensory cortex in fetal rats. *Somatosens Res.* 1 (1984) 303-327.
- Zeuzula, J., Slany, A., Sieghart, W. Interaction of allosteric ligands with GABA_A receptors containing one, two, or three different subunits. *Eur J Pharmacol.* 301 (1996) 207-214.
- Zhu, W.J., Roper, S.N. Reduced inhibition in an animal model of cortical dysplasia. *J Neurosci.* 20 (2000) 8925-8931.
- Zilles, K., Qü, M.S., Schleicher, A., Luhmann, H.J. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: quantitative receptor autoradiography of ionotropic glutamate, GABA_A and GABA_B receptors. *Eur J Neurosci.* 10 (1998) 3095-3106.
- Zilles, K., Qü, M.S., Köhling, R., Speckmann, E.J. Ionotropic glutamate and GABA receptors in human epileptic neocortical tissue: quantitative in vitro receptor autoradiography. *Neuroscience.* 94 (1999) 1051-1061.

Danksagung

Herrn PD Dr. A. Berthele möchte ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung während der Anfertigung der Dissertation danken.

Für die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Klinik durchführen zu können möchte ich Herrn Prof. Dr. B. Conrad und Herrn Prof. Dr. B. Hemmer danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. T. Töle, Herrn Dr. S. Arnold, Herrn Prof. Dr. S. Noachtar, Herrn Prof. Dr. P. Winkler und Herrn Prof. Dr. S. Weis ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Für seine umfassende Unterstützung möchte ich Herrn Dr. S. Platzer besonders danken.

Frau Nathmann danke ich für die technische Hilfe im Labor.

Sowohl für sein Lektorat als auch für seine wissenschaftliche Hilfe gebührt Herrn Dr. M. Clara ein außerordentlicher Dank.

Meinen Eltern möchte ich für die Ermöglichung des Studiums und somit die Durchführung dieser Doktorarbeit danken.