

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann-

Analyse der RNA Editierung an der Q/R-Stelle der Glutamat-
Rezeptoruntereinheiten GluR 2, GluR 5 und GluR 6
im chronisch epileptischen Hirngewebe
des Menschen

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Günter Kortenbruck
aus Vreden

Juli 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. U. Mußhoff

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. H. Hohage

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2003

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann-
Referent: Prof. Dr. rer. nat. U. Mußhoff
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. H. Hohage

ZUSAMMENFASSUNG

Analyse der RNA Editierung an der Q/R-Stelle der Glutamat-Rezeptoruntereinheiten
GluR 2, GluR 5 und GluR 6 im chronisch epileptischen Gewebe des Menschen
Kortenbruck, Günter

Bei der Entstehung und Ausbreitung von epileptischer Aktivität im Nervengewebe spielen inhibitorische und exzitatorische synaptische Prozesse eine entscheidende Rolle. Die Auslösung von epileptischer Aktivität ist dabei nicht nur von der Balance der jeweiligen inhibitorisch wirkenden GABA- und der exzitatorisch wirkenden Glutamat-Rezeptoren abhängig, sondern auch von der Zusammensetzung und dem Aufbau der Rezeptoren, den Rezeptorsubtypen sowie den spezifischen Modifikationen dieser Subtypen, die sich durch Splice- und Editierungsvarianten ergeben.

Bei den Glutamat-Rezeptoruntereinheiten GluR 2, GluR 5 und GluR 6 führt die Editierung an den Q/R-Stellen, an denen Glutamin (Q) zu Arginin (R) editiert wird, zu verminderter Ca^{2+} -Leitfähigkeit und geringerer Leitfähigkeit der Kanäle. Im Tiermodell führt eine reduzierte Editierung zu epileptischer Aktivität.

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Q/R-Editierungsgrad der Rezeptoruntereinheiten GluR 2, GluR 5 und GluR 6 im Hippocampus und temporalen Neocortex von chronisch epileptischem Hirngewebe des Menschen bestimmt und mit der Editierung aus Kontrollgewebe (Autopsieproben) verglichen. Dazu wurde mit Hilfe der RT-PCR sowie spezifischer Restriktionsenzyme die Aminosäurecodierung an der Q/R-Position der jeweiligen m-RNA ermittelt und der editierte Anteil in Relation zur Gesamtmenge gesetzt.

Es zeigte sich für die Untereinheit GluR 2 keine Änderung im chronisch epileptischen Gewebe gegenüber der Kontrollgruppe. Dagegen fanden sich gleichsinnige Veränderungen für die Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 mit Abnahmen der Q/R-Editierung im Hippocampus und signifikanten Zunahmen im temporalem Neocortex. Die Veränderungen dürften im Zusammenhang mit RNA-abhängigen Adenosindeaminasen (ADAR) stehen, dessen Subtyp ADAR 1 für die Q/R-Editierung der Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 verantwortlich ist. Während die Abnahme im Hippocampus einen neurotoxisch wirksamen verstärkten Ca^{2+} -Einstrom bewirken kann, läßt sich die Zunahme im temporalen Neocortex als kompensatorischer Mechanismus interpretieren. Die Abnahme der Editierung scheint dabei mit der Erkrankungsdauer der Patienten zu korrelieren.

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Epilepsie: Ätiologie und Epidemiologie.....	1
1.2 Tierexperimentelle Untersuchungen zur Entstehung epileptischer Aktivität.....	2
1.3 Funktionale Bedeutung und molekularer Aufbau der Glutamatrezeptoren.....	3
1.4 Posttranskriptionale Modifikation der Glutamatrezeptoren: RNA-Editierung	6
1.5 Bedeutung der Q/R-Editierung für die Epileptogenese	9
1.6 Ziel der Arbeit.....	10

2. Methodik

2.1 Untersuchungskollektiv	11
2.2 RNA-Gewinnung durch Extraktion.....	12
2.2.1 RNA-Extraktion nach Cathala.....	13
2.2.2 RNA-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi	14
2.3 DNase-Behandlung und quantitative RNA-Bestimmung.....	15
2.3.1 DNase-Behandlung	16
2.3.2 Quantitative RNA-Bestimmung	17
2.4 cDNA-Synthese (RT-Reaktion).....	18
2.5 Primersynthese.....	19
2.5.1 Primer für die Untereinheit GluR 2.....	22
2.5.2 Primer für die Untereinheit GluR 5	22
2.5.3 Primer für die Untereinheit GluR 6.....	23
2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	24
2.7 Enzymrestriktion.....	26
2.7.1 Restriktionsendonucleasen für die Analyse der Q/R-Editierung	27
2.7.2 Restriktionsendonucleasen für die Spezifitätskontrolle	29
2.7.3 Durchführung der Restriktionsanalyse.....	30
2.8 Nachweis der PCR-Produkte mit Hilfe der Gelelektrophorese	33
2.8.1 Herstellung von Agarosegelen zum Nachweis der PCR-Produkte	34
2.9 Darstellung und densitometrische Auswertung von Agarosegelen.....	35

2.9.1 Densitometrische Auswertung von Agarosegelen	35
2.9.1.1 Festlegung der Grundlinie im Densitogramm von Agarosegelen.....	37
2.9.1.2 Festlegung der Peakgrenzen im Densitogramm von Agarosegelen.....	37
2.10 Versuchsdurchführung und statistische Testverfahren	39
2.10.1 Versuchsablauf	39
2.10.2 Statistische Testverfahren.....	40
3. Auswertung	
3.1 Nachweis der spezifischen PCR-Produkte	41
3.1.1 Nachweis der Spezifität für die Untereinheit GluR 2.....	41
3.1.2 Nachweis der Spezifität für die Untereinheit GluR 5.....	42
3.1.3 Nachweis der Spezifität für die Untereinheit GluR 6.....	43
3.2 Das Untersuchungskollektiv	43
3.2.1 Kontrollkollektiv	44
3.2.2 Patientenkollektiv	44
3.3 Ergebnisse.....	48
3.3.1 AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR 2.....	48
3.3.1.1 Hippocampus	48
3.3.1.2 Temporaler Neocortex	53
3.3.1.3 Zusammenfassung.....	56
3.3.2 Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 5.....	57
3.3.2.1 Hippocampus	57
3.3.2.2 Temporaler Neocortex	61
3.3.2.3 Zusammenfassung.....	63
3.3.3 Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 6.....	64
3.3.3.1 Hippocampus	64
3.3.3.2 Temporaler Neocortex	67
3.3.3.3 Zusammenfassung.....	70
3.4 Statistische Testung	71
3.5 Zusammenhänge der Q/R-Editierungsgraden mit den Patientendaten.....	75

3.5.1 Kainat-Rezeptoruntereinheiten im Hippocampus	76
3.5.1.1 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Patientenanzahlshäufigkeit	77
3.5.1.2 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Patientenalter	77
3.5.1.3 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Erkrankungsdauer der Patienten.....	77
3.5.1.4 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Erkrankungszeitpunkt der Patienten....	78
3.5.2 Kainat-Rezeptoruntereinheiten im temporalen Neocortex.....	79
3.5.2.1 Kainat-Rezeptoruntereinheiten Patientenanzahlshäufigkeit	79
3.5.2.2 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Patientenalter	80
3.5.2.3 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Erkrankungsdauer der Patienten.....	80
3.5.2.4 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Erkrankungszeitpunkt der Patienten....	81
3.5.3 Zusammenfassung	81
3.6 Zusammenfassung der ermittelten Meßwerte.....	82
4. Diskussion	
4.1 Untersuchungsergebnis	88
4.2 Meßverfahren.....	88
4.3 Untersuchungskollektive	89
4.3.1 Patientenkollektiv	89
4.3.2 Kontrollkollektiv	91
4.4 Editierungsgrade und patientenspezifische Daten	94
4.4.1 Hippocampus.....	94
4.4.2 Temporaler Neocortex.....	96
4.5 Q/R-Editierung und Epileptogenese	99
4.5.1 AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR 2 und Epileptogenese	99
4.5.2 Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 5 und Epileptogenese	100
4.5.3 Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 6 und Epileptogenese	101
4.6 Zusammenfassung und Ausblick.....	102
Literaturverzeichnis.....	105
Danksagung.....	120
Lebenslauf	121
Anhang	123

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Übersicht der Glutamat-Rezeptorsubtypen mit ihren jeweiligen Untereinheiten und einer schematisierten Zeichnung der Kanalstruktur..... 5

Abb. 1.2: Übersicht der Editierungsstellen der jeweiligen Rezeptorsubtypen AMPA und Kainat und ihrer transmembranösen Region I bis IV..... 7

Abb. 2.1: Schematische Darstellung zweier PCR-Synthese-Zyklen mit Lokalisation der Primer an die ursprüngliche cDNA und Verweis auf die PCR-Synthese Schritte Denaturierung, Annealing und Polymerisation innerhalb dieser Reihenfolge..... 20

Abb. 2.2: Charakterisierung der Primer für die Glutamatrezeptor-Untereinheit GluR 2..... 22

Abb. 2.3: Charakterisierung der Primer für die Glutamatrezeptor-Untereinheit GluR 5..... 23

Abb. 2.4: Charakterisierung der Primer für die Glutamatrezeptor-Untereinheit GluR 6..... 23

Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Temperaturverlaufs während eines PCR-Synthese-Zyklus mit den PCR-Schritten Denaturierung, Annealing und Polymerisation..... 26

Abb. 2.6: Ausschnitt aus der cDNA-Sequenz der Rezeptor-Untereinheiten GluR 2, GluR 5 und GluR 6 im Fall der Nichteditierung bzw. Editierung mit Untertreichung der Q/R-Position 27

Abb. 2.7: Erkennungssequenz für Bbv I..... 28

Abb. 2.8: Erkennungssequenz für Aci I..... 28

Abb. 2.9: Erkennungssequenzen für Fnu 4H I, Hinf I und Acc I 29

Abb. 2.10: Densitogramm mit zugehöriger Spur im Agarosegel zur Darstellung der Ermittlung der Peakgrenzen A_i bis C_i ($i = 1,2$) und Bestimmung der Flächenintegrale I_1 bis I_3 zur Meßwerterfassung, vergleiche auch Gleichungen 2.2 bis 2.10 38

Abb. 3.1: Nachweis der Spezifität der Primer für die AMPA-Untereinheit GluR 2 mit den Restriktionsendonucleasen Hinf I und Fnu 4H I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 21 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. 41

Abb. 3.2: Nachweis der Spezifität der Primer für die Kainat-Untereinheit GluR 5 mit den Restriktionsendonucleasen Hinf I und Fnu 4H I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 21 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. 42

Abb. 3.3: Nachweis der Spezifität der Primer für die Kainat-Untereinheit GluR 6 mit der Restriktionsendonuclease Acc I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 21 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. 43

Abb. 3.4: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die AMPA-Untereinheit GluR 2 für das Kontrollkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall A7 im Hippocampus (vgl. Tab. 3.1), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. 49

Abb. 3.5: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die AMPA-Untereinheit GluR 2 für das Patientenkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 11 im Hippocampus (vgl. Tab. 3.2), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. 49

Abb. 3.6: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die AMPA-Untereinheit GluR 2 mit den Restriktionsendonucleasen Bbv I und Aci I im Vergleich in getrennten Ansätzen. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 3 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. 51

Abb. 3.7: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die AMPA-Untereinheit GluR 2 mit den Restriktionsendonucleasen Bbv I und Aci I im Vergleich, getrennte (Aci) und gemeinsame (Aci+Bbv) Ansätze. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 7 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. 52

Abb. 3.8: Übersicht der ermittelten Q/R-Editierungsgrade für die AMPA-Untereinheit GluR 2 im Hippocampus mit der Restriktionsendonuclease Aci I (vgl. Tab. 3.11), angegeben in Prozent. A zeigt die bestimmten Mittelwerte für das Kontroll- bzw. Patientenkollektiv, B stellt den für jedes Kollektiv berechneten Gesamtmittelwert dar (vgl. Tab. 3.4). 53

Abb. 3.9: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die AMPA-Untereinheit GluR 2 für das Kontrollkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall A7 im Neocortex (vgl. Tab. 3.1), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. 54

Abb. 3.10: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die AMPA-Untereinheit GluR 2 für das Patientenkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 3 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. 54

Abb. 3.11: Übersicht der ermittelten Q/R-Editierungsgrade für die AMPA-Untereinheit GluR 2 im Neocortex mit der Restriktionsendonuclease Aci I (vgl. Tab. 3.12), angegeben in Prozent. A zeigt die bestimmten Mittelwerte für das Kontroll- bzw. Patientenkollektiv, B stellt den für jedes Kollektiv berechneten Gesamtmittelwert dar (vgl. Tab. 3.4). 55

Abb. 3.12: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 5 für das Kontrollkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall A6 im Hippocampus (vgl. Tab. 3.1), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. 58

Abb. 3.13: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 5 für das Patientenkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 14 im Hippocampus (vgl. Tab. 3.2), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren..... 58

Abb. 3.14: Übersicht der ermittelten Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 5 im Hippocampus mit der Restriktionsendonuclease Bbv I (vgl. Tab. 3.13), angegeben in Prozent. A zeigt die bestimmten Mittelwerte für das Kontroll- bzw. Patientenkollektiv, B stellt den für jedes Kollektiv berechneten Gesamtmittelwert dar (vgl. Tab. 3.4). 59

Abb. 3.15: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 5 mit den Restriktionsendonucleasen Bbv I und Aci I im Vergleich in getrennten Ansätzen. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 3 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. 60

Abb. 3.16: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 5 für das Kontrollkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall A8 im Neocortex (vgl. Tab. 3.1), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren..... 62

Abb. 3.17: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 5 für das Patientenkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 17 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren..... 62

Abb. 3.18: Übersicht der ermittelten Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 5 im Neocortex mit der Restriktionsendonuclease Bbv I (vgl. Tab. 3.14), angegeben in Prozent. A zeigt die bestimmten Mittelwerte für das Kontroll- bzw. Patientenkollektiv, B stellt den für jedes Kollektiv berechneten Gesamtmittelwert dar (vgl. Tab. 3.4). Der Stern bedeutet eine signifikante Differenz in den Q/R-Editierungsgraden. 59

Abb. 3.19: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 6 für das Kontrollkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall A2 im Hippocampus (vgl. Tab. 3.1), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren..... 65

Abb. 3.20: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 6 für das Patientenkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 12 im Hippocampus (vgl. Tab. 3.2), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren..... 66

Abb. 3.21: Übersicht der ermittelten Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 6 im Hippocampus mit der Restriktionsendonuclease Bbv I (vgl. Tab. 3.15), angegeben in Prozent. A zeigt die bestimmten Mittelwerte für das Kontroll- bzw. Patientenkollektiv, B stellt den für jedes Kollektiv berechneten Gesamtmittelwert dar (vgl. Tab. 3.4). 67

Abb. 3.22: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 6 für das Kontrollkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall A8 im Neocortex (vgl. Tab. 3.1), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. 68

Abb. 3.23: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 6 für das Patientenkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 7 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. 69

Abb. 3.24: Übersicht der ermittelten Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 6 im Neocortex mit der Restriktionsendonuclease Bbv I (vgl. Tab. 3.16), angegeben in Prozent. A zeigt die bestimmten Mittelwerte für das Kontroll- bzw. Patientenkollektiv, B stellt den für jedes Kollektiv berechneten Gesamtmittelwert dar (vgl. Tab. 3.4). Der Stern bedeutet eine signifikante Differenz in den Q/R-Editierungsgraden. 70

Abb. 3.25: Patientenspezifische Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 6 im Hippocampus aufgetragen gegenüber der Erkrankungsdauer der Patienten, sowie zugehöriges Splines. Für die Erkrankungsdauer ist ein Spline mit exponentiellen Abfall 2. Grades (exp 2. Grades) dargestellt..... 78

Abb. 4.1: Patientenspezifische Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 5 (GluR 5) im Hippocampus aufgetragen gegenüber der Erkrankungsdauer der Patienten (Erkrankungsdauer)..... 95

Abb. 4.2: Patientenspezifische Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 6 (GluR 6) im Hippocampus aufgetragen gegenüber der Erkrankungsdauer der Patienten (Erkrankungsdauer), sowie zugehörige Splines. Für die Erkrankungsdauer ist ein Spline mit exponentiellen Abfall 2. Grades (exp 2. Grades) dargestellt..... 96

Abb. 4.3: Patientenspezifische Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 5 (GluR 5) im Neocortex aufgetragen gegenüber der Erkrankungsdauer der Patienten (Erkrankungsdauer), sowie zugehörige Splines. Dargestellt sind jeweils lineare Splines für die Q/R-Editierungsgrade (linear GluR 5) und die Erkrankungsdauer (linear Dauer) 97

Abb. 4.4: Patientenspezifische Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 6 (GluR 6) im Neocortex aufgetragen gegenüber der Erkrankungsdauer der Patienten (Erkrankungsdauer), sowie zugehörige Splines. Dargestellt sind für die Q/R-Editierungsgrade ein linearer Spline (linear GluR 6), für die Erkrankungsdauer ein Polynom 3. Grades (poly 3. Grades)..... 98

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Zusammensetzung und Konzentration von Pufferlösungen für die RNA-Extraktion nach Cathala.....	13
Tab. 2.2:	Zusammensetzung und Konzentration von Pufferlösungen für die RNA-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi.....	15
Tab. 2.3:	Zusammensetzung der Pufferlösungen für die DNase-Behandlung	16
Tab. 2.4:	Aufstellung über die Zusammensetzung der Pufferlösung und der Konzentrationen der verschiedenen Reaktionsbeimengungen bei der PCR.....	25
Tab. 2.5:	Basenpaarlänge der amplifizierten DNA-Stränge und der Bbv I-Schnittprodukte bei Vorliegen einer Nichteditierung.....	28
Tab. 2.6:	Basenpaarlänge der amplifizierten DNA-Stränge und der Aci I-Schnittprodukte bei Vorliegen einer Editierung.....	29
Tab. 2.7:	Basenpaarlänge der amplifizierten DNA-Stränge der jeweiligen spezifischen Restriktionsendonucleasen und ihrer Schnittprodukte.....	30
Tab. 2.8:	Eigenschaften und Konzentrationen der Restriktionsendonucleasen sowie der verwendeten Puffersysteme.....	31
Tab. 2.9:	Zusammensetzung der bei der Enzymrestriktion eingesetzten Puffersysteme.....	31
Tab. 3.1:	Aufstellung wichtiger Daten des Kontrollkollektives.....	45
Tab. 3.2:	Aufstellung wichtiger Daten des Patientenkollektives.....	46/47
Tab. 3.3:	Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptoruntereinheit GluR 2 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Bbv I.....	56
Tab. 3.4:	Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptoruntereinheit GluR 2 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Aci I. Dargestellt sind neben der Anzahl der gemessenen Personen, der Mittelwert und Median in Prozent sowie die Standardabweichung (Standardabw.) des Mittelwertes.....	56

Tab. 3.5: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptoruntereinheit GluR 5 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Bbv I.	64
Tab. 3.6: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptoruntereinheit GluR 6 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Bbv I.	71
Tab. 3.7: Zusammenfassung statistischer Merkmale aus den Messungen der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe unter Anwendung des t-Testes.	72
Tab. 3.8: Änderung der Prüfgröße p des studentischen t-Testes bei Änderung des Kontrollkollektives für die ermittelten Q/R-Editierungsgrade der Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe des Kontrollkollektives (s. Tab. 3.7).	73
Tab. 3.9: Änderung der Prüfgröße p des studentischen t-Testes bei Änderung des Kontrollkollektives für die ermittelten Q/R-Editierungsgrade der Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe bei Variation des Untersuchungskollektives zur Angleichung des Altersdurchschnitt beider Kollektive.	74
Tab. 3.10: Korrelationskoeffizienten r und zugehörige Prüfgrößen p zwischen ermittelten Q/R-Editierungsgrade der Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe des Patientenkollektives und spezifischen Patientendaten.	76
Tab. 3.11: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptor-Untereinheit GluR 2 im hippocampalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Aci I.	82
Tab. 3.12: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptor-Untereinheit GluR 2 im temporalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Aci I.	83

Tab. 3.13: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptor-Untereinheit GluR 5 im hippocampalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Bbv I.....	84
Tab. 3.14: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptor-Untereinheit GluR 5 im temporalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Bbv I.....	85
Tab. 3.15: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptor-Untereinheit GluR 6 im hippocampalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Bbv I.....	86
Tab. 3.14: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptor-Untereinheit GluR 6 im temporalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Bbv I.....	87

Abkürzungsverzeichnis

Acc I:	Enzym von <i>Actinobacter calcoaceticus</i>
Aci I:	Enzym von <i>Arthrobacter citreus</i>
ACPD:	trans-DL-1-Amino-Cyclopentyl-1,3-Dicarbonsäure
AHS:	Ammonshornsklerose
AMPA:	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat
Bbv I:	Enzym von <i>Bacillus brevis</i>
bp:	basepaar / Basenpaare
BSA:	Bovine Serum Albumin
cDNA:	complementäre Desoxyribonucleinsäure
CCD:	charge coupled device
CCT:	craniale Computertomographie
CPS:	complex partial seizure / komplex fokaler Anfall
CS:	clonic seizure / klonischer Anfall
CT:	Computertomographie
DAG:	Diacylglycerol
DCM:	dilatative Cardiomyopathie
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
dNTP:	Desoxynucleosidtriphosphat
ds-DNA:	doppelsträngige Desoxyribonucleinsäure
DTT:	Dithiotreitol
ECS:	intronic editing complementary site
EDTA:	Ethyldiamin Tetraacetat
EEG:	Elektroenzephalogramm
EPSP:	exzitatorisches postsynaptisches Potential
Fnu 4H I:	Enzym von <i>Fusobacterium nucleatum</i> 4H
fron.:	frontal
GABA:	γ -Aminobuttersäure
GMS:	generalic myoclonic seizure / generalisierter myoklonischer Anfall
GTCS:	generalic tonic clonic seizure / generalisierter tonisch-klonischer Anfall
HC:	Hippocampus
Hinf I:	Enzym von <i>Haemophilus influenzae</i> Rf

hn-RNA:	heterogene nucleäre Ribonucleinsäure
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
IP ₃ :	Inositoltrisphosphat
KA:	Kainat
lat.:	lateral
LTD:	long term depression / Langzeitdepression
LTP:	long term potentiation / Langzeitpotentierung
m:	männlich
mes.:	mesial = medial
m-RNA:	messenger Ribonucleinsäure
MMLV:	Moloney Murine Leukämie Virus, FPL Cpure
MRT:	Magnetresonanz Tomographie
NC:	Neocortex
NMDA:	N-Methyl-D-Aspartat
NTP:	Nucleosidtriphosphat
OD:	optische Dichte
Orig:	Original
PCR:	polymerase chain reaction / Polymerasekettenreaktion
PDS:	paroxysmal depolarisation shift
PET:	Positronen Emissionen Tomographie
Quis:	Quisqualat
RNA:	Ribonucleinsäure
RT:	Reverse Transkriptase
SDS:	sodium dodecyl sulfate / Natriumdodecylsulfat
SGTCS:	secondary generalized tonic-clonic seizure / sekundär generalisierter tonisch-klonischer Anfall
t-ACPD :	trans-DL-1-Amino-Cyclopenty-1,3-Dicarbonensäure
TAE:	Puffer aus Trizmabase, Natriumacetat, EDTA, pH mit Essigsäure gepuffert
TCS:	tonic-clonic seizure / tonisch-klonischer Anfall
temp.:	temporal
TL:	Temporallappen = temporaler Neocortex
Tris:	Trizmabase
Tris-HCl:	Trizmabase-HCl

TS:	tonic seizure / tonischer Anfall
w:	weiblich
ZNS:	Zentralnervensystem
zyst.:	zystisch

1. Einleitung

1.1 Epilepsie: Ätiologie und Epidemiologie

Bei Epilepsien handelt es sich um eine Gruppe von Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Es kommt aufgrund einer Störung der Hirnfunktion zu repetitiven, stereotypen und zumeist temporären Verhaltensänderungen, die als epileptische Anfälle bezeichnet werden [SPECKMANN, 1986]. Die Bandbreite von Symptomen epileptischer Anfälle reicht von sensorischen, vegetativen und psychischen Erscheinungen bis hin zu abnormer Muskelaktivität. Wegen der motorischen Komponente werden diese Anfälle auch als Krampfanfälle oder Konvulsionen bezeichnet.

Im Vergleich zu anderen neurologischen Erkrankungen haben Epilepsien eine hohe Prävalenz und Inzidenz (Inzidenzrate = Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr: 0,024 % bis 0,053 %) [FORSGREN et al., 1996; HAUSER et al., 1993; OLAFSSON et al., 1996]. Circa 0,3 bis 4 % der Weltbevölkerung sind von der Erkrankung Epilepsie betroffen. In den Industrieländern variiert die Prävalenz zwischen 0,4 und 0,8 % [HAUSER und HESDORFFER 1990], unter Einbeziehung von Kindern, die jünger als das 15. Lebensjahr sind, zwischen 0,3 und 1,1 % [BAUMANN et al., 1978; DOERFER und WÄSSER, 1987; ROSS et al., 1980, TARSITANI et al., 1988]. Dabei werden allerdings nur 2/3 der Erkrankten in den Industrieländern tatsächlich erfaßt [JANZ et al., 1985]. In den Entwicklungsländern schwankt die Inzidenz zwischen Werte von 0,077 % [RWIZA et al., 1992] und 0,114 % [LAVADOS et al., 1992]. Die Prävalenz liegt hier, bei einheitlichem WHO-Protokoll, zwischen 1,4 % und 5,7 % [GRACIA et al., 1990; PRADILLA-ARDILA et al., 1991], jedoch mit deutlich geringeren Werten in Indien und China [LAI et al., 1990]. Trotz der ungleichen Inzidenzstudien muß aber mit einer höheren Rate in den Entwicklungsländern ausgegangen werden [HAUSER, 1997]. Das Risiko an Epilepsie zu erkranken beträgt bis zum 80. Lebensjahr ca. 1,3 % [JUUL-JENSEN et al., 1983] bis 4 % [HAUSER et al., 1993], aber etwa 5 % der Bevölkerung haben im Laufe ihres Lebens einen einmaligen epileptischen Anfall [HAUSER et al., 1993; PRINCE, 1978,].

Trotz Fortschritte in der pharmakologischen Therapie von Epilepsien gelingt eine befriedigende Unterdrückung epileptischer Anfälle nur bei 70 bis 80 % der Patienten [ELGER, 1988; JANZ et al., 1985; JANZ, 1989; REYNOLDS et al., 1983; RODIN, 1968]. Bei 15 bis 20 % aller Epilepsiekranken ist eine Wirkung antikonvulsiver Medikamente überhaupt nicht nachweisbar [FRÖSCHER, 1992]. Die medikamentöse Behandlungsprognose ist dabei

stark vom Anfallstyp abhängig. So zeigen z.B. komplex-fokale Anfälle eine pharmakologische Therapieresistenz von bis zu 70 %, während bei primär generalisierten Anfällen, wie Absencen oder tonisch-klonische Anfälle beim Aufwachen, oft eine medikamentenbedingte Anfallsfreiheit zu erzielen ist. Existiert eine pharmakologische Therapieresistenz, so ist zu klären, ob der Erkrankte einem neurochirurgischen Eingriff zugeführt werden kann. Bei einer solchen Behandlung ist vorab ein fortschreitender hirnologischer Prozeß als Ursache epileptischer Anfälle auszuschließen.

1.2 Tierexperimentelle Untersuchungen zur Entstehung epileptischer Aktivität

Für das Verständnis über die Ursachen von Epilepsien und für die Entwicklung besserer Therapien sind eine Vielzahl von Tiermodellen entwickelt worden. Der experimentellen Epilepsieforschung stehen damit unterschiedliche Modelle für partielle und generalisierte sowie für chronische und akute Anfallsformen zur Verfügung. An ihnen wurden die Mechanismen der Entstehung und Ausbreitung von epileptischen Aktivitäten im Neuronenzellverband intensiv untersucht. Sehr häufig wird dabei das sogenannte Kindling-Modell eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein Modell für komplex-partielle Anfälle [GODDARD, 1983], das den psychomotorischen Anfällen beim Menschen ähnlich ist [FISHER, 1989]. Bei dem elektrischen Kindling-Verfahren werden durch implantierte Reizelektroden die Amygdala oder hippocampale Strukturen periodischen, initial subconvulsiven, elektrischen Stimulationen ausgesetzt. Nach wiederholten Reizen über mehrere Tage oder Wochen kommt es zur Ausbildung reizinduzierter oder spontan [PINEL, 1981; WADA et al., 1974] auftretender epileptischer Anfälle [GODDARD et al., 1969]. Die Prädisposition für Anfälle bleibt danach, auch ohne weitere Reizung, über längere Zeiträume, die zwischen Wochen und Monaten umfassen können, erhalten.

Die durch den epileptogenen Reiz ausgelösten Nervenzellentladungen zeigen ein charakteristisches Erregungsmuster, welches unabhängig vom tierexperimentellen Modell ist. Dieses läßt sich durch seine stereotype Form der Potentiale und seiner synchronen Aktivität beschreiben [GOLDENSOHN und PURPURA, 1963; MATSUMOTO, 1964; MATSUMOTO und AJMONE-MARSAN, 1964]. Aufgrund der besonderen Form der Membranpotentialänderungen werden diese auch als paroxysmale Depolarisationen (paroxysmal depolarisation shift, PDS) bezeichnet. In neurophysiologischen Untersuchungen an resezierten menschlichen Hirngewebe konnten diese epilepsiespezifischen

Potentialmuster ebenfalls nachgewiesen werden [AVOLI und OLIVER, 1989; HWA et al., 1992; PRINCE und WONG, 1981; SCHWARZKROIN und HAGLUND, 1986].

In den tierexperimentellen Untersuchungen zeigte sich, daß insbesondere die synaptische Aktivität für die Entstehung und Ausbreitung paroxysmaler Depolarisationen eine entscheidende Rolle spielt. Die bedeutendsten Transmitter synaptischer Aktivität im ZNS sind die inhibitorisch wirkende γ -Aminobuttersäure (GABA) und das exzitatorisch wirkende Glutamat. Man nahm zunächst an, daß epileptische Aktivität innerhalb eines Nervenzellverbandes alleinig aus einer gestörten Balance in der Menge der exzitatorischen und inhibitorischen Botenstoffe erklärt werden kann [DICHTER und SPENCER, 1979; HEINEMANN et al., 1977; KAMPHUIS et al., 1991; MAC DONALD und BARKER, 1979; SCHWARTZKROIN und PRINCE, 1980], die mit Herabsetzung neuronaler Hemmprozesse und mit einer außergewöhnlichen Erregungssteigerung einher geht. Durch die molekularbiologischen Erkenntnisse über Aufbau und Struktur der GABA- und Glutamatrezeptoren weiß man heute, daß die Balance-Theorie modifiziert werden muß. Demnach ist nicht nur die Anzahl der jeweiligen Rezeptoren entscheidend, sondern auch der Rezeptoraufbau, die Art der Rezeptorsubtypen und die spezifischen Modifikationen dieser Subtypen, die sich durch Splice- und Editierungsvarianten ergeben, tragen maßgeblich zum Erregungsniveau im Nervenzellverband bei.

1.3 Funktionale Bedeutung und molekularer Aufbau der Glutamatrezeptoren

Glutamat, das als häufigste von den Aminosäuren im ZNS vorhanden ist, kann, als Neurotransmitter freigesetzt, fast alle Neuronentypen im ZNS erregen. Das in den synaptischen Spalt freigesetzte Glutamat erzeugt nach Bindung an spezifische ligandenregulierte Ionenkanäle der postsynaptischen Membran eine Depolarisation, die als exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) bezeichnet wird. Glutamat hat zudem Bedeutung bei Prozessen der Synaptogenese und der synaptischen Plastizität, die sich z.B. in Gestalt der Langzeitpotenzierung (long term potentiation, LTP) bzw. -depression (long term depression, LTD) ausdrückt [KULLMANN et al., 2000]. Bei bestimmten pathophysiologischen Erregungszuständen kann übermäßig freigesetztes Glutamat neurotoxische Wirkungen an den Nervenzellen hervorrufen, die bis zum Zelluntergang führen können [BRUNO et al., 1993; CASTILLO und BABSON, 1998; CHOI und ROTHMANN, 1987].

Die Einteilung der Glutamatrezeptoren erfolgte zunächst nur nach pharmakologischen Gesichtspunkten. Diese Einteilung nach spezifischen Agonisten wurde im weiteren durch molekularbiologische Methoden modifiziert und zeigt vier Subtypen: 1. N-Methyl-D-Aspartat (NMDA), 2. Kainat (KA), 3. α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolpropionat (AMPA) und 4. trans-DL-1-Amino-Cyclopentyl-1,3-Dicarbonsäure (t-ACPD) (alt: Quisqualat (QUIS)). Für alle Rezeptortypen konnten bislang verschiedene, als Untereinheiten bezeichnete, Proteinstrukturen nachgewiesen werden, die jeweils über vier transmembranöse Regionen verfügen (vgl. Abbildung 1.1).

Die weitere Unterteilung der Glutamatrezeptoren geschieht in die ionotropen NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren sowie in den metabotropen ACPD-Rezeptor. Bei den ionotropen Ionenkanälen sind der Rezeptor und der Ionenkanal direkt miteinander gekoppelt und können daher auch als Rezeptorkanal bezeichnet werden. Sie sind charakterisiert durch einen transmembranösen Proteinkomplex, der nach Bindung eines Liganden an spezifischer Erkennungsstelle des Komplexes eine Konformationsänderung vollzieht und somit den Durchtritt bestimmter Ionen erlaubt. Die Folge ist eine schnelle postsynaptische Membrandepolarisation. Der metabotrope ACPD-Rezeptor ist mit einem G-Protein gekoppelt und kann zur Freisetzung der second messenger Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) führen. Damit wird eine verzögerte langanhaltende Zellreaktion vermittelt. Bisher liegen zahlreiche Untersuchungen über die Glutamatrezeptoren sowie ihre Verteilung und mögliche Funktion im ZNS vor [DINGLELINE et al., 1999; HENNEBERRY, 1992; HOLLMANN und HEINEMANN, 1994; MELDRUM, 1984; MICHAELIS, 1998; NICOLL et al., 1990; SEEBURG, 1996, sowie in SOMMER und SEEBURG, 1992].

Die schnelle postsynaptische Membrandepolarisation der ionotropen Ionenkanäle wird durch einen intrazellulär gerichteten Na^+ -Einstrom und einen geringeren extrazellulär gerichteten K^+ -Ausstrom herbeigeführt. Der NMDA-Rezeptor weist darüber hinaus eine intrazellulär gerichtete Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen auf [BURNASHEV et al., 1992a; DINGLELINE et al., 1992; HUME et al., 1991]. Außerdem besitzt dieser Rezeptortyp die Eigenschaft, daß die Kanalöffnung und damit die Ionenleitfähigkeit von der Membranspannung der Nervenzelle abhängig ist. Beim Ruhemembranpotential der Nervenzelle (ca. -80 mV) ist der Kanal durch Mg^{2+} -Ionen blockiert. Dieser Mg^{2+} -Block wird bei starker Depolarisation der postsynaptischen Membran der Nervenzelle, z.B. auf

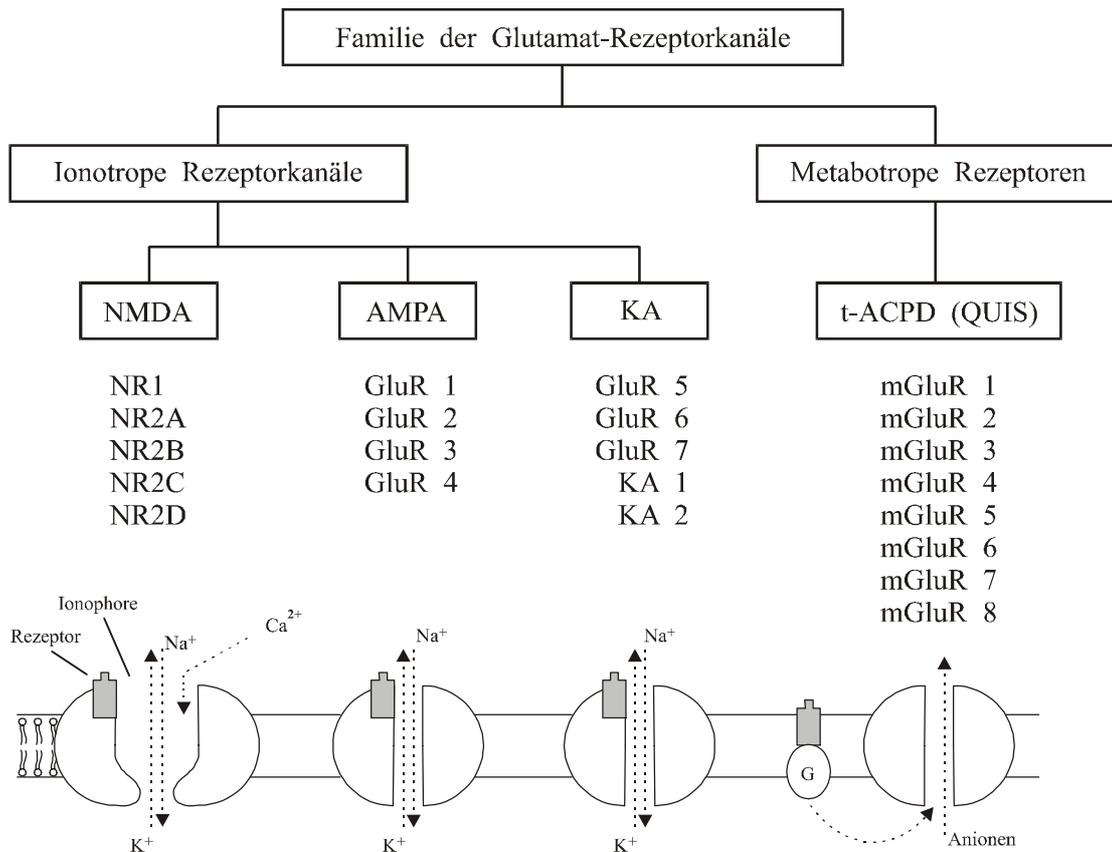


Abbildung 1.1: Übersicht der Glutamat-Rezeptorsubtypen mit ihren jeweiligen Untereinheiten und einer schematisierten Zeichnung der Kanalstruktur.

Potentialdifferenzen von -30 bis -40 mV aufgehoben und der rezeptorgekoppelte Ionenkanal aktiviert. Die AMPA-Rezeptoren vermitteln damit die schnelle exzitatorische Signalkomponente des EPSP's, während NMDA-Rezeptoren erst bei ausreichender Depolarisation aktiviert werden und damit die späte Komponente des EPSP's bestimmen. Die Bedeutung der Kainat-Rezeptoren bei der synaptischen Erregung wird noch uneinheitlich diskutiert. Es gibt Hinweise dafür, daß diese Rezeptoren außerhalb des subsynaptischen Spaltes lokalisiert sind und erst bei einer massiven Glutamatfreisetzung im synaptischen Spalt und anschließendem „spill over“ aktiviert werden [LERMA et al., 1997]. Andere Untersuchungen im Hippocampus zeigen nicht nur eine postsynaptische, sondern auch eine präsynaptische Lokalisation von Kainat-Rezeptoren [CHITTAJALLU et al., 1999; FRERKING und NICOLL, 2000], die inhibitorisch an hippocampalen CA3/CA1-Synapsen [FRERKING et al., 2001] und Moosfaser-Synapsen [SCHMITZ et al., 2000] wirken. Hier soll maßgeblich die Kainat-Untereinheit GluR 6 beteiligt sein [CONTRACTOR et al., 2001].

Die Eigenschaften der NMDA-, AMPA- und Kainat-Kanäle werden weitgehend von den am Kanalaufbau beteiligten Untereinheiten bestimmt. An verschiedenen Expressionssystemen wurde gezeigt, daß die Kanäle sowohl aus nur einer Untereinheit als auch aus einer Kombination verschiedener Untereinheiten des jeweiligen Rezeptortyps aufgebaut sein können. In diesen „in vitro“-Expressionssystemen zeigte sich weiterhin, daß nicht alle Kombinationen eine funktionale Kanalstruktur bilden [EGEJERG et al., 1991; HERB et al., 1992; HOLLMANN et al., 1991; HUME et al., 1991; KUTSUWADA et al., 1992; LAURIE und SEEBURG, 1994; MEGURO et al., 1992; SCHIFFER et al., 1997; VERDOORN et al., 1991]. Die Zusammensetzung der Untereinheiten bestimmen wesentliche Eigenschaften der Rezeptoren, wie z.B. die Ca^{2+} -Leitfähigkeit, die Strom-Spannungs-Kennlinie und die Gesamtleitfähigkeit des Rezeptorkanals.

1.4 Posttranskriptionale Modifikation der Glutamaterezeptoren: RNA-Editierung

Die Eigenschaften der Rezeptorkanäle werden aber nicht nur durch die Kombinatorik der Untereinheiten bestimmt. Eine weitere Möglichkeit der funktionellen Beeinflussung ergibt sich durch posttranskriptionale und posttranslationale Prozesse der messenger-RNA (m-RNA) bzw. der Aminosäurekette. Wesentliche posttranskriptionale Prozesse stellen das „alternative Splicing“ und die RNA-Editierung dar. Während beim „alternativen Splicing“ verschiedene Exon-Bereiche eines Primärtranskriptes miteinander kombiniert werden, ist die RNA-Editierung dadurch charakterisiert, daß es während der Decodierung der genomischen DNA in die m-RNA zu einer Basenveränderung des Primärtranskriptes kommt, mit der Folge einer veränderten Aminosäurezusammensetzung des funktionalen Rezeptors.

Für die AMPA- und Kainat-Rezeptoruntereinheiten sind dabei unterschiedliche Editierungsvorgänge bekannt. Von besonderer Bedeutung ist dabei ein Editierungsschritt einiger AMPA- und Kainat-Rezeptoruntereinheiten, der zu einer Aminosäureänderung in der transmembranösen Region II (TM Region II) der Proteinstruktur der jeweiligen Untereinheit führt. Die in der genomischen DNA codierte Aminosäure Glutamin (Q) im Bereich des Exons 11 wird auf Ebene der messenger-RNA in die Aminosäure Arginin (R) umcodiert. Durch Bindung einer Adenosindeaminase an das Primärtranskript (hier die heterogene nucleäre RNA, hn-RNA) im Kern kommt es zur Bildung von Inosin aus

Adenin [RUETER et al., 1995]¹. Nachfolgend wird Inosin als Guanin interpretiert, das Triplet -CAG- für Glutamin (Q) wird zu -CGG- für Arginin (R). Dieser Vorgang wird daher auch als Q/R-Editierung bezeichnet. Ein solcher Editierungsschritt konnte bisher für die AMPA-Untereinheit GluR 2, sowie für die Kainat-Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 nachgewiesen werden.

Diese Q/R-Editierung hat wesentliche funktionelle Bedeutung für den Rezeptor: 1. Eine verminderte Ca²⁺-Leitfähigkeit [HUME et al., 1991; VERDOORN et al., 1991; EGEBJERG und

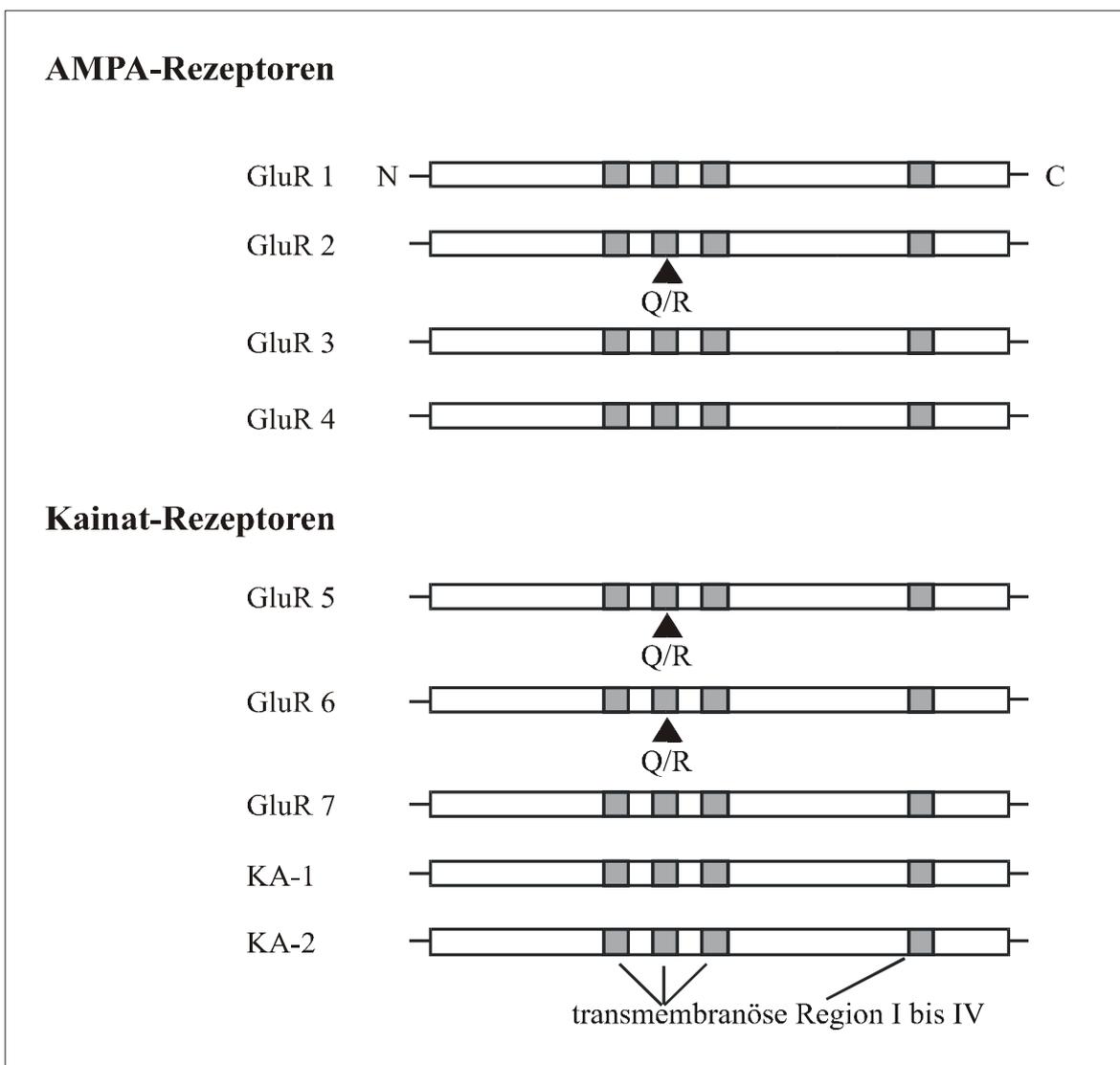


Abbildung 1.2: Übersicht der Q/R-Editierungsstellen (Q/R ▲) der jeweiligen Rezeptor-subtypen AMPA und Kainat und ihrer transmembranösen Regionen I bis IV. Schematisch dargestellt ist die Aminosäuresequenz mit Angabe der N- und C-terminalen Enden

¹: Für diesen Editierungsvorgang ist eine komplementäre Editierungsstelle im Intron 11 (intronic editing complementary site, ECS) erforderlich.

HEINEMANN, 1993; WASHBURN et al., 1997], 2. eine geringere Leitfähigkeit des einzelnen Kanals [SWANSON et al., 1996] und 3. eine veränderte Strom-Spannungs-Kennlinie [vgl. DINGLEDINE et al., 1999]. Die übrigen AMPA-Untereinheiten GluR 1, GluR 3 und GluR 4 sowie die Kainat-Untereinheiten GluR 7, KA 1 und KA 2 zeigen „in vivo“ keine Q/R-Editierung. Die genomische Codierung bleibt hier erhalten. Für die NMDA-Rezeptoruntereinheiten ist bisher kein Editierungsschritt bekannt [DINGLEDINE et al., 1999]. Für die vergleichbare Position in der TM Region II liegt hier stets eine Codierung für Asparagin (N) vor.

Es existieren sowohl homomere als auch heteromere AMPA-Kanäle aus den vier Untereinheiten. Dabei zeigt sich, daß Kanäle an denen die editierte Untereinheit GluR 2 beteiligt ist, keine Leitfähigkeit für zweifach geladene Kationen, insbesondere Ca^{2+} -Ionen, besitzen [HOLLMANN et al., 1991]. Außerdem besitzen diese Kanäle eine quasi lineare Strom-Spannungs-Kennlinie. Dies zeigen auch Untersuchungen an Oozyten bzw. an mutierten transfizierten Zellen, an denen die beschriebene Q/R-Editierung experimentell verändert worden war [BRUSA et al., 1995, FELDMEYER et al., 1999; HIGUCHI et al., 2000]. Homomere Kanäle aus den Untereinheiten GluR 1, GluR 3 oder GluR 4 mit Arginin in der TM Region II zeigen danach nur noch eine geringe Ca^{2+} -Leitfähigkeit, während Kanäle, die aus der nicht editierten Version von GluR 2 aufgebaut sind, über eine ausgeprägte Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen verfügen [CURUTCHET et al., 1992; HUME et al., 1991; VERDOORN et al., 1991]. Entsprechende Parallelen zeigt das Strom-Spannungsverhalten. Vergleichbare Eigenschaften zeigt auch die Kainat-Untereinheit GluR 6 [BURNASHEV et al., 1996]. Aber sowohl die nicht editierte, wie die editierte Form der Untereinheit GluR 6, verfügt über eine Ca^{2+} -Leitfähigkeit. Die editierte Form mit Arginin (R) in der TM Region II besitzt jedoch eine um den Faktor drei reduzierte Ca^{2+} -Leitfähigkeit [DINGLEDINE et al., 1992; EGEBJERG und HEINEMANN, 1993]. Auch die Q/R-Editierung von GluR 5 ist von funktioneller Bedeutung. Hier beeinflußt die nicht editierte Form mit Glutamin (Q) die Formation von Kainat-Kanälen, während die editierte GluR 5-Untereinheit mit Arginin (R) diese nicht verändert. Die Kainat-Untereinheiten GluR 5 bis GluR 7 und KA 1 bzw. KA 2 bilden dabei sowohl homomere als auch heteromere Kanäle. Anscheinend sind jedoch nur Kainat-Kanäle mit den Untereinheiten GluR 5 oder GluR 6 funktional [EGEBJERG et al., 1991; HERB et al., 1992; LOMELI et al., 1992; SAKIMURA et al., 1992, SCHIFFER et al., 1997].

Allgemeine ontogenetische Untersuchungen zum Q/R-Editierungsgrad erfolgten unter anderem bei Mäusen [BERNARD und KHRESCHRATISKY, 1994] und Ratten [BERNARD et al., 1999; CARLSON et al., 2000; PASCHEN und DJURICIC, 1994, 1995; PASCHEN et al., 1995, 1997]. Doch zeigen die von Paschen und Djuricic sowie Bernard gewonnenen Ergebnisse zum Q/R-Editierungsgrad für GluR 5 bei adulten Ratten ein differenziertes Verhalten. Während Bernard postembryonal je nach Hirnregion eine Zunahme der Q/R-Editierung für GluR 5 von 15 bis 25 % auf 50 % ermittelte, zeigen die Untersuchungen von Paschen ein konstantes Verhalten mit Q/R-Editierungsgraden von adulten Ratten ab dem vierten Tag nach der Geburt [PASCHEN et al., 1995]. Bei der embryonalen Entwicklung fand sich in den Untersuchungen eine Zunahme der Q/R-Editierung von ca. 15 % auf 55 % für GluR 5, während für GluR 6 im embryonalen Verlauf Q/R-Editierungsgrade bis 90 % festgestellt werden konnten, die sich auch postembryonal nicht wesentlich reduzierten [BERNARD et al., 1999; PASCHEN et al., 1997].

Im humanen adultem Gewebe vom Hippocampus, temporalem Cortex und Kleinhirn ist die AMPA-Untereinheit GluR 2 zu fast 100 % editiert. Sie zeigt aber hiervon Abweichungen in den Stammganglien und in fetalem Gewebe [NUTT und KAMBOJ, 1994a]. Die beiden Kainat-Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 zeigen dagegen eine variable Editierung in den jeweiligen Hirnregionen [NUTT und KAMBOJ, 1994b].

1.5 Bedeutung der Q/R-Editierung für die Epileptogenese

In Experimenten an transfizierten Mäusen konnte gezeigt werden, daß die Q/R-Editierung für neuropathologische Prozesse, die im Zusammenhang mit Epilepsien stehen, von Bedeutung sind. Dabei führten genetische Manipulationen an dem zur Deaminierung erforderlichen ECS (vgl. S. 6) im Gen für GluR 2 [BRUSA et al., 1995; FELDMEYER et al., 1999] als auch die Hemmung des für GluR 2 spezifischen Q/R-Editierungsenzyms ADAR2² [HIGUCHI et al., 2000], unter anderem zu epileptischen Anfällen und zu einem vermehrten neuronalen Zelluntergang [BRUSA et al., 1995, FELDMEYER et al., 1999; HIGUCHI et al., 2000]. Für diese neuronale Dysfunktion, die auch den frühen Tod der Tiere zur Folge hat [BRUSA et al., 1995, HIGUCHI et al., 2000], wird ein erhöhter Ca²⁺-Einstrom angenommen, der aus einer vermehrten Ca²⁺-Leitfähigkeit der GluR 2 beinhaltenden

²: ADAR2: adenosine deaminase RNA-dependent, auch als DRADA (double-stranded RNA-specific adenosine deaminase) bezeichnet

AMPA-Rezeptoren resultiert. Vergleichbare Untersuchungen an transfizierten Mäusen zeigten im Hinblick auf die Kainat-Untereinheit GluR 5 keine auffälligen Verhaltensänderungen [SAILER et al., 1999], während die genetische Manipulation des für die Kainat-Untereinheit GluR 6 erforderlichen ECS zu Lerndefiziten und zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber epileptogenen Stimuli (hier: Kainat-Applikation) führte [VISSEL et al., 2001].

Untersuchungen zur Änderung des Editierungsgrades beim Kindling-Modell zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Während Bernard und Mitarbeiter bei Ratten transiente Zuwächse im Editierungsgrad für GluR 5 und Abnahmen für GluR 6 im Editierungsgrad feststellten [BERNARD et al., 1999], konnten Kamphuis und Mitarbeiter keine Änderung des Q/R-Editierungsgrades für GluR 5 und GluR 6 nachweisen [KAMPHUIS et al., 1995b].

1.6 Ziel der Arbeit

Die bisherigen tierexperimentellen Untersuchungen zu den unterschiedlichen Modellen zeigen Zusammenhänge zwischen dem Q/R-Editierungsgrad und dem Auftreten epileptischer Anfälle [BRUSA et al., 1995; FELDMEYER et al., 1999; HIGUCHI et al., 2000; SAILER et al., 1999; VISSEL et al., 2001] sowie veränderte Q/R-Editierungsgrade nach Anfallsprovokation [BERNARD et al., 1999]. Daher sind weitergehende Untersuchungen im Hinblick auf Änderungen des Q/R-Editierungsgrades im Hirngewebe von Epilepsiepatienten von Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Q/R-Editierungsgrad im Hirngewebe von Epilepsiepatienten zu bestimmen. Dazu werden bei einem ausgesuchten Patientenkollektiv der Q/R-Editierungsgrad für die AMPA-Untereinheit GluR 2, sowie für die beiden Kainat-Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 im hippocampalen und neocorticalen Temporallappen analysiert. Das Gewebe stammt aus epilepsiechirurgischen Eingriffen von Patienten mit einer pharmakoresistenten Temporallappenepilepsie. Die gewonnenen Daten werden mit einem Kontrollkollektiv, das sich aus postmortalen Resektionspräparaten von Verstorbenen ohne Epilepsie resultiert, verglichen. Außerdem sollen die ermittelten Werte der Q/R-Editierung mit patientenbezogenen Daten, wie z.B. Erkrankungsdauer oder Alter, korreliert werden, um mögliche Ursachen eines geänderten Q/R-Editierungsgrades aufzuzeigen.

2. Methodik

2.1 Untersuchungskollektive

Die molekularbiologische Untersuchung epileptischen Hirngewebes wurde an Operationsresektaten von Epilepsiepatienten, die im Rahmen einer chirurgischen Therapie zur Verfügung gestellt werden konnten, durchgeführt. Die chirurgischen Eingriffe erfolgten im Epilepsiezentrum Bethel in Kooperation mit der Klinik für Neurochirurgie der Krankenanstalten Gilead Bethel. Die zuständige Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster hatte dabei keine Bedenken gegen diese Untersuchung. Die Patienten wurden hinsichtlich der wissenschaftlichen Untersuchungen aufgeklärt und um ihr Einverständnis gebeten. Allen Patienten ist gemeinsam, daß

- eine Therapieresistenz gegenüber konventionellen und neuen Antiepileptika vorliegt,
- die Erkrankung und die damit verbundenen Anfälle zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Lebensqualität führt, und
- eine resezierbare fokale epileptogene Zone, z.B. per Video-EEG, MR, PET, etc. nachweisbar ist.

Neuropathologisch zeigten die Befunde von Patienten mit sogenanntem Temporallappensyndrom häufig eine Ammonshornsklerose bzw. mesiale Sklerose oder auch eine globale Temporallappensklerose. Der neuropathologische Befund von Patienten mit einer Epilepsie im Bereich der Hippocampusformation ist im allgemeinen gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Hippocampussklerose. Darüber hinaus fanden sich bei einigen Patienten auch morphologische Veränderungen wie niedrigmaligne Neoplasien oder embryofetale Fehlbildungen, z.B. Atrophien. Für die Entstehung der Sklerosen ist dann auch die Kombination der verschiedenen Läsionen im Hinblick auf eine duale Pathologie zu berücksichtigen.

Der Einfluß der verschiedenen pharmakologischen Therapien von Barbituraten über Na⁺-Kanal-Hemmern bis zu Modulatoren von Neurotransmittern sind ebenfalls im Zusammenhang mit den morphologischen und funktionellen Veränderungen zu berücksichtigen [BUCKLAND et al., 1996]. Auch Erkrankungszeitpunkt und -dauer sind zu diesem Aspekt zu hinterfragen.

Da für die Kontrolluntersuchungen keine Gewebeproben gesunder Probanden zur Verfügung stehen, erfolgten diese Untersuchungen anhand von Resektionspräparaten von Verstorbenen. Bei diesen Patienten war weder die Todesursache durch eine neurologische Erkrankung bedingt, noch besaßen sie eine neurologische Erkrankung in ihrer Anamnese. Das Hirngewebe wurde von dem Institut für Neuropathologie der Westfälischen Wilhelms-Universität bereit gestellt und innerhalb eines postmortalen Intervalls von weniger als 16 Stunden entnommen und bei -70°C tiefgefroren.

Das dieses postmortale Gewebe als Kontrollgewebe für molekularbiologische Untersuchungen zur Genexpression herangezogen werden kann wurde bereits von verschiedenen Autoren gezeigt. So wurde festgestellt, daß auch noch intakte und biologisch aktive m-RNA im Gewebe nachweisbar ist, wenn dieses erst 36 Stunden nach Todeseintritt eingefroren wurde [BARTON et al., 1993]. Harrison und Mitarbeiter wiesen im Jahr 1995 nach, daß eine deutliche Abnahme des RNA-Gehaltes erst 96 Stunden nach dem Tod eintritt [HARRISON et al., 1995]. Weitere Untersuchungen an postmortalem Hirngewebe zeigten, daß die Stabilität und die Zusammensetzung der RNA kaum oder nur in geringem Maße durch das postmortale Intervall beeinflusst werden [GILBERT et al., 1981; JOHNSON et al., 1986; PERRET et al., 1988]. Speziell die AMPA-Rezeptorsubtypen sind stabil bis 18 Stunden nach Todeseintritt [WANG et al., 2000]. Insgesamt lassen diese Untersuchungen den Schluß zu, daß die in Autopsien gewonnenen Gewebeproben und die darin enthaltene RNA als Kontrolle zur Analyse der Genexpression in pathologisch verändertem Hirngewebe grundsätzlich herangezogen werden kann.

Autolytische Prozesse, die innerhalb dieses postmortalen Intervalls nicht gänzlich auszuschließen sind, beeinflussen die zu untersuchenden Strukturen jedoch in gleicher Weise. So kommt es bei den AMPA-Rezeptorsubtypen zu einer gleichmäßigen Reduktion der ermittelbaren Intensitäten in allen Hirnarealen [WANG et al., 2000]. Dies betrifft damit sowohl die editierten (R) als auch die nicht editierten (Q) Proteinstrukturen in gleicher Weise, so daß davon ausgegangen werden kann, daß der jeweilige Editierungsgrad korrekt bestimmt wurde.

2.2 RNA Gewinnung durch Extraktion

Das Patientengewebe wurde im tiefgekühlten Zustand zum Institut für Neurophysiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität gebracht und hier zunächst bei -70°C gelagert.

Für die Gewinnung der RNA wurden die Methoden nach Cathala [CATHALA et al., 1983] oder nach Chomczynski und Sacchi [CHOMCZYNSKI und SACCHI, 1987] in modifizierter Form angewendet. Routinemäßig erfolgte die Extraktion nach der Methode von Cathala, insbesondere dann wenn es sich um größere Gewebemengen handelte. Die Extraktion von Chomczynski und Sacchi (C & S) eignet sich wiederum hervorragend aus geringen Gewebemengen intakte RNA zu gewinnen. So erlaubt die Extraktion nach C & S aus ca. 10^6 Zellen oder etwa drei Milligramm Gewebe RNA zu isolieren [CHOMCZYNSKI und SACCHI, 1987]. In den vorliegenden Untersuchungen zeigten sich zwischen den beiden Extraktionsmethoden jedoch keine Unterschiede, die zu einem Fehler in den Auswertungen hätten führen können.

2.2.1 RNA-Extraktion nach Cathala

Für die Durchführung werden ein sogenannter Lysis-Puffer, zur Zellauflösung während der Homogenisation, 4 M Lithiumchlorid zur Präzipitation der Nucleinsäuren, Phenol und mit Isoamylalkohol versetztes Chloroform zur Denaturierung der Proteine, sowie ein sogenannter Lösungspuffer, zum Lösen der RNA, benötigt. Die genauen Zusammensetzungen und Konzentrationen sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Lysis-Puffer	EDTA ¹ , 10 mM	Tris-HCl ² pH = 7,5, 50 mM	Guanidinthiozyanat 5 M	β-Mercaptoethanol 8 % (v/v)
Phenol	EDTA, 1 mM	Tris-HCl pH = 7,5, 50 mM		
Chloroform	Supplementiert mit Isoamylalkohol im Verhältnis 24 : 1			
Lösungspuffer	EDTA, 1 mM	Tris-HCl pH = 7,5, 10 mM	Natriumdodecylsulfat (SDS ³) 0,1 %	

Tabelle 2.1: Zusammensetzung und Konzentrationen von Pufferlösungen für die RNA-Extraktion nach Cathala.

Die Durchführung der Extraktion erfolgte bei 4° C in einer Kühlkammer. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen wurden Glasgefäße bei 180° C über mindestens vier Stunden sterilisiert, das Lithiumchlorid und der Lösungspuffer wurden autoklaviert.

¹ : EDTA: Ethyldiamin Tetraacetat

² : Tris-HCl: Trizmabase-HCl

³ : SDS: sodium dodecyl sulfate

Bei der Extraktion einer Ausgangsmenge von ca. 1 g Hirngewebe wurde 11 ml Lysispuffer hinzugefügt und für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit im Ultrathurrax homogenisiert. Nachfolgend wurde die siebenfache Menge an 4 M Lithiumchlorid pro Homogenisationsvolumen hinzugegeben und für mindestens 15 Stunden bei 4° C gefällt. Für die Pelletierung wurde die Zentrifuge „Sorvall RC-28S“ von Du Pont mit dem Schwingkolbenrotor HB 4 und einer Umdrehungszahl von 10^4 min^{-1} verwendet. Nach Zentrifugation über 90 Minuten bei 4° C bestand das Pellet aus RNA, geringen Mengen an DNA sowie denaturierten Proteinen, während der Überstand überwiegend DNA, Proteine und kleine RNA-Moleküle enthielt. Dieser wurde dekantiert und verworfen. Der erneute Waschvorgang mit Lithiumchlorid, wie von Cathala publiziert, fand hier keine Anwendung, da er für die anschließenden Untersuchungen keinen Qualitätsverlust darstellte. Das Pellet wurde nun in 20 ml Lösungspuffer resuspendiert. Dies geschah durch mischen für 20 Sekunden alle zehn Minuten über einen Zeitraum von 45 Minuten. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 20 ml Phenol (vgl. Tabelle 2.1) und Chloroform-Isoamylalkohol. Nach Zugabe jedes Reagenz wurde die Lösung für zehn Minuten gemischt. Nach erneuter Zentrifugation für zehn Minuten bei 10^4 min^{-1} unter 4° C konnte eine Phasentrennung erreicht werden. Die obere wäßrige Phase mit der RNA wurde abpipettiert und nochmals mit 20 ml Chloroform-Isoamylalkohol versetzt. Unter Zugabe von 0,1 Vol. % 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. % Ethanol erfolgte eine nochmalige Präzipitation bei einer Temperatur von -20° C über Nacht. Die RNA konnte nun durch Pelletierung gewonnen werden. Der Überstand wurde dekantiert. Das an der Luft getrocknete Pellet konnte in Aqua bidest. gelöst und nach DNase-Behandlung, Konzentrationsbestimmung und Portionierung bei einer Temperatur von -70° C gelagert werden.

2.2.2 RNA-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi

Die Extraktion nach C & S erfolgte dann, wenn die zur Verfügung stehenden Gewebemengen gering waren. Für die Proteindenaturierung wurde eine Denaturierungslösung, im weiteren Lösung D genannt, verwendet (vgl. Tabelle 2.2).

Zunächst erfolgte eine manuelle Homogenisation des Gewebes. Dazu wurde ca. 100 mg des tiefgefrorenen Gewebes abgewogen und mit 1 ml der Lösung D versetzt. Dem Homogenisat wurde nun 0,1 ml 2 M Natriumacetat (pH = 4), 1 ml Phenol und 1 ml

Chloroform-Isoamylalkohol hinzugegeben. Nach jeder Zugabe wurde die Suspension gemischt. Die Gesamtlösung wurde nun für 15 Minuten auf Eistemperatur gehalten, anschließend erfolgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 10^4 min^{-1} Umdrehungen unter 4° C . Für die Zentrifugation wurde hier ebenfalls die „Sorvall RC-28S“-Zentrifuge von Du Pont mit Schwingkolbenrotor HB4 verwendet. Die obere wäßrige Phase mit der RNA wurde abpipettiert und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die Interphase und die phenolhaltige Phase mit der DNA und den denaturierten Proteinen wurde verworfen. Die wäßrige Phase wurde mit 1 ml von 1 Vol. % Isopropanol versetzt und eine Präzipitation für mindestens eine Stunde bei -20° C durchgeführt. Die Pelletierung der RNA erfolgte erneut durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 10^4 min^{-1} Umdrehungen unter 4° C im HB4-Rotor. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,3 ml der Lösung D aufgelöst. Eine weitere Fällung für mindestens eine Stunde bei -20° C wurde nach Zugabe von 0,1 Vol. % 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. % Ethanol durchgeführt. Eine Pelletierung der RNA erfolgte wie oben. Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit Aqua bidest. versetzt und nach DNase-Behandlung, Konzentrationsbestimmung und Portionierung bei einer Temperatur von -70° C gelagert.

Lösung D	Sarcosyl 0,5 %	Natriumcitrat pH = 7, 25 mM	Guanidinthiozyanat 4 M	β -Mercaptoethanol 0,1 M
Chloroform	Supplementiert mit Isoamylalkohol im Verhältnis 24 : 1			

Tabelle 2.2: Zusammensetzung und Konzentrationen der Pufferlösungen für die RNA-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi.

2.3 DNase-Behandlung und quantitative RNA-Bestimmung

Nach erfolgter Extraktion wurde das gewonnene RNA-Pellet in Aqua bidest. gelöst und eine DNase-Behandlung durchgeführt. Diese diente dazu Kontaminationen durch genomische DNA zu beseitigen. Da in den Untersuchungen die Genexpression der Glutamatrezeptor-Untereinheiten analysiert werden sollte, war es notwendig, hierzu die m-RNA zu isolieren. Die m-RNA stellt die Untersuchungsgröße dar, die nach Übersetzung in eine cDNA und spezifischer Amplifikation mit Hilfe der PCR⁴, Rückschlüsse auf die Genexpression zuläßt. Verbliebene Reste genomischer DNA in der Lösung hätten

Ansatzstellen für die spezifischen Primer darstellen können und hinsichtlich der Genexpression falsch positive Aussagen geliefert. Zudem erhält man verlässlichere Angaben bei der quantitativen RNA-Bestimmung mittels UV-Absorption.

2.3.1 DNase-Behandlung

Für die DNase-Behandlung wurde die RQ1 RNase-freie DNase von Promega in einem geeigneten Puffer verwendet. Die DNase-Aktivität kann nach Beendigung der Behandlung durch Salzkonzentrationen von mehr als 100 mM reduziert oder durch Wärmebehandlung bei 65° C bis 100° C inaktiviert werden. Für die Durchführung wurden neben der DNase ein DNase-Puffer, Phenol, Chloroform-Isoamylalkohol, Natriumacetat sowie Ethanol verwendet. Die Zusammensetzung der einzelnen Substanzen ist der Tabelle 2.3 zu entnehmen.

DNase-Puffer	NaCl, 10 mM	Tris-HCl pH = 7,5, 50 mM	MgCl ₂ 6 mM	CaCl ₂ 10 mM
Phenol	EDTA, 1 mM	Tris-HCl pH = 7,5, 50 mM		
Chloroform	Supplementiert mit Isoamylalkohol im Verhältnis 1 : 1			
Natriumacetat	3 M			
Ethanol	99,8 %			

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Pufferlösungen für die DNase-Behandlung.

Das Pellet aus der RNA-Extraktion wurde zunächst in 50 µl Aqua bidest. resuspendiert und danach mit 498 µl DNase-Puffer sowie mit 2 µl DNase, in einer Konzentration von 0,2 mM, versetzt. Die Lösung wurde über 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Unter Vermischung wurden anschließend nacheinander 1 Vol. % Phenol und 1 Vol. % Chloroform-Isoamylalkohol hinzu gegeben. Durch Zentrifugation in einer Biofuge von Haerues, die über zwei Minuten bei Raumtemperatur und 10⁴ min⁻¹ Umdrehungen in dem Festwinkelrotor HFA 17.1 durchgeführt wurde, erfolgte eine Phasentrennung. Die obere wäßrige Phase mit der RNA wurde abpipettiert und erneut mit 1 Vol. % Chloroform-

⁴: PCR: polymerase chain reaction

Isoamylalkohol versetzt. Nach erneuter Zentrifugation über fünf Minuten bei Raumtemperatur und 10^4 min^{-1} Umdrehungen wurde der Überstand abpipettiert und eine Präzipitation bei -20° C über mindestens 12 Stunden eingeleitet. Dazu wurden 0,1 Vol. % 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. % Ethanol dazu gegeben. Nach Zentrifugation wurde die RNA durch Pelletierung gewonnen. Dieses Pellet wurde in Aqua bidest. resuspendiert und nach Konzentrationsbestimmung mit einem RNA-Gehalt zu je $2,5 \mu\text{g}$ portioniert und bei -70° C gelagert.

2.3.2 Quantitative RNA-Bestimmung

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Nucleinsäuren beruht auf den physikalischen Prozeß der Absorption von UV-Licht [OGUR und ROSEN, 1950]. Grundlage der Photometrie ist, daß bei Durchtritt eines Lichtstrahls durch eine Lösung ein definierter Anteil absorbiert oder durch Reflexion bzw. Streuung abgelenkt wird. Das Maß der Extinktion, d.h. die Schwächung des eingestrahltten Lichtes, wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben. Durch apparative Optimierung und Minimierung der Streueffekte kann die Extinktion als hinreichendes Maß der absorbierten Energie herangezogen werden und kann somit als direkte Größe für die Menge von Nucleinsäuren in der Lösung dienen. Die Extinktionskoeffizienten ϵ sind für die einzelnen Nucleotide spezifisch und hängen von den Bedingungen in der Lösung, wie pH-Wert oder Ionenstärke, ab. Die einzelnen Nucleotide besitzen bei Wellenlängen zwischen 253 nm und 271 nm Absorptionsmaxima A_{max} , so daß die ermittelte Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ eine gute Approximation für die in der Lösung befindlichen Nucleinsäureketten darstellt. Man erhält bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ eine Absorption von $A_{260} = 1$, wenn folgende Konzentrationen von Nucleinsäureketten vorliegen:

doppelsträngige DNA $50 \text{ ng} / \mu\text{l}$,
einzelsträngige DNA $33 \text{ ng} / \mu\text{l}$ und
einzelsträngige RNA $40 \text{ ng} / \mu\text{l}$.

Eine Absorption von $A_\lambda = 1$ definiert weiterhin, bei konstanter Wellenlänge und einer Küvettschichtdicke von $d = 10 \text{ mm}$, eine optische Dichte OD_λ von ebenfalls eins. Durch Messung der Absorption läßt sich gemäß Gleichung 2.1 nun direkt die Konzentration der gesuchten Nucleinsäureketten bestimmen.

$$c_{\text{Nucleinsäureketten}} = A_\lambda \cdot d \cdot \epsilon_\lambda \quad (2.1)$$

Durch eine zweite Absorptionsmessung der Proben bei $\lambda = 280$ nm kann eine Aussage über die Reinheit der gemessenen Lösung, bzw. ihre Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol, getroffen werden. Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum A_{\max} bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm, während die Absorption durch Nucleinsäureketten hier deutlich vermindert ist. Durch Bildung des Quotienten A_{260} / A_{280} erhält man einen Wert, der mit dem Reinheitsgrad an Nucleinsäureketten korreliert. Bei reinen Lösungen an DNA oder RNA liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0. Liegt dieser Quotient unterhalb von 1,6 kann von größeren Verunreinigungen ausgegangen werden.

Für die quantitative RNA-Bestimmung wurde das Photometer Ultrospec 2000 von Pharmacia Biotech verwendet. Quarzküvetten wurden mit 1 μ l aus der gewonnenen RNA-Extraktionslösung und 299 μ l Aqua bidest. gefüllt. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm. Die ermittelten Extinktionswerte wurden um den zuvor bestimmten Leerwert korrigiert. Anhand der Konzentrationsbestimmung erfolgte eine Portionierung der Proben zu je 2,5 μ g RNA.

2.4 cDNA-Synthese (RT-Reaktion⁵)

Für die weiteren molekularbiologischen Untersuchungen wurde die aus den Gewebeproben gewonnene m-RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in eine cDNA (complementary DNA) überführt. Dieser Schritt war für die weitere Analyse mittels PCR und den Einsatz von DNA-Polymerasen erforderlich. Die cDNA-Synthese wurde nach dem "randomly primed" Verfahren durchgeführt. Dabei werden Oligonucleotidfragmente als Primer benutzt. Die Primer bestehen aus möglichst verschiedenen Sequenzen und besitzen somit die Fähigkeit an vielen Stellen der RNA gleichzeitig zu binden und damit ein Primer-RNA-Hybrid zu bilden. Die Reverse Transkriptase kann dann ein RNA-DNA-Hybrid herstellen und den cDNA-Strang in Richtung des 5'-Endes synthetisieren. Dieser hybridisierte RNA-cDNA-Strang kann nun als Matrize (Template) für die nachfolgende PCR dienen.

In der vorliegenden Untersuchung wurde für die cDNA-Synthese der "First-Strand cDNA Synthesis Kit" von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Dazu wurden zunächst 2,5 μ g der aus den Gewebeproben gewonnenen m-RNA in 20 μ l RNase freiem Wasser für zehn Minuten bei 65° C erhitzt, um RNA-Sekundärstrukturen zu lösen. Das schnelle

⁵ : Reverse Transkriptase Reaktion

Abkühlen in Eiswasser stabilisierte den Zustand der denaturierten RNA-Stränge. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 11 µl eines Puffers (45 mM Tris, pH = 8,3; 86 mM KCl; 9 mM MgCl₂; 80 µg / ml BSA⁶; je 1,8 mM dNTP), dem "Bulk First Strand Mix", mit einer geklonten Reversen Transkriptase des Moloney Murine Leukämie Virus (MMLV, FPL Cpure™), 1µl 15 mM DTT⁷ und 1µl randomisierter Hexanucleotide, dem pd(N)₆-Primer, versetzt. In der Primerlösung existierte eine Nucleotidkonzentration von 0,2 M (0,2 µg / µl). Die Suspension wurde bei 37° C für 60 Minuten inkubiert und anschließend bei -20° C gelagert.

2.5 Primersynthese

Mit Hilfe der PCR können spezifische Sequenzen der zu untersuchenden DNA amplifiziert werden. Dazu sind neben der DNA-Matrize sogenannte Primer erforderlich, die als Startermolekül für die DNA-Polymerase dienen. Bei den Primern handelt es sich um Oligonucleotide, deren Sequenz komplementär zur Sequenz der bekannten DNA-Matrize ist. Um innerhalb der DNA-Vorlage ein bestimmtes Fragment amplifizieren zu können ist sowohl ein sogenannter 3'-Primer als auch ein sogenannter 5'-Primer erforderlich. Diese werden nachfolgend auch mit den Bezeichnungen up- und low-Primer geführt. Da die Synthese des neuen komplementären DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung erfolgt, kann die Sequenz des 5'-Primers direkt aus der DNA-Nucleotidsequenz abgelesen werden. Der 5'-Primer dient dann als Ausgangspunkt der vorwärts vollziehenden Synthese (vgl. Abbildung 2.1). Für die Zusammensetzung des 3'-Primers ist hingegen die Sequenz der 5'-3'-DNA-Vorlage umzudrehen und gleichzeitig sind die komplementären Basen einzusetzen. Der 3'-Primer dient somit als Startmolekül für den komplementären Strang einer doppelsträngigen DNA. Die 5'- und 3'-Primer können daher auch als oberer und unterer Primer bezeichnet werden.

⁶ : BSA: Bovine Serum Albumin

⁷ : DTT: Dithiotreitol

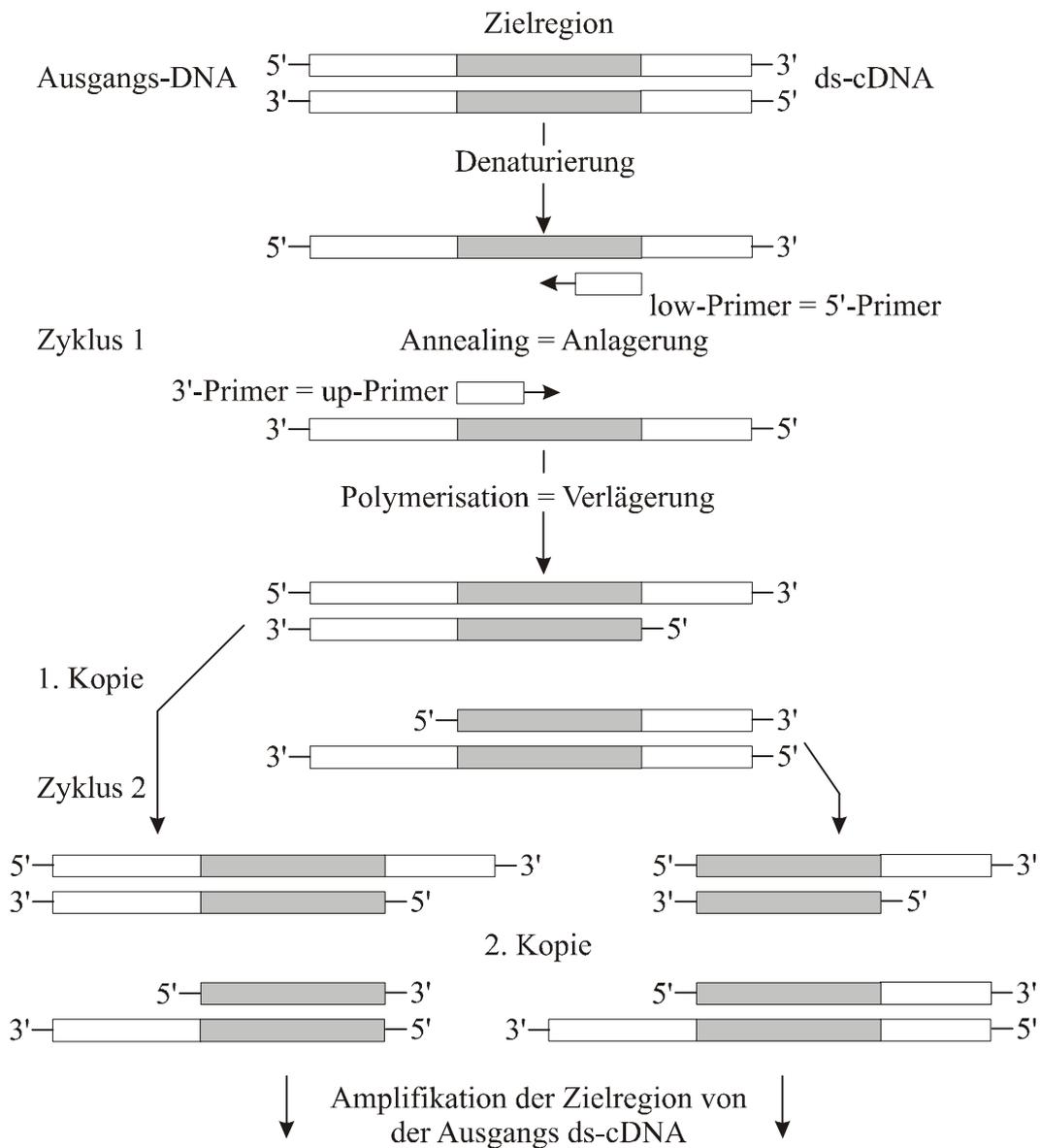


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung zweier PCR-Synthese-Zyklen mit Lokalisation der Primer an die ursprüngliche cDNA und Verweis auf die PCR-Schritte Denaturierung, Annealing und Polymerisation (vgl. Kapitel 2.6 und Abbildung 2.5) innerhalb dieser Reihenfolge.

Für das Design der Primer sind bestimmte Bedingungen zu berücksichtigen. Dazu gehört z.B. die Länge der Primer, die optimal zwischen 20 und 30 Basenpaaren liegt. Zu kurze Primer besitzen unter Umständen keine ausreichende Spezifität, längere Primer über 30 Basenpaare haben keine höhere Spezifität. Dagegen hat die Länge der Primer direkt Einfluß auf ihre Schmelztemperatur T_m , die in der Regel zwischen 55°C und 68°C liegen sollte [SCHEINERT, 1994; NEWTON und GRAHAM, 1994]. Auch ist bei der Primerherstellung darauf zu achten, daß die Schmelztemperaturen T_m des oberen und unteren Primers ähnlich

sein sollten. Die Sequenz der Primer ist so zu wählen, daß die Paare weder inter- noch intramolekular komplementär sind, um die Bildung von Sekundärstrukturen oder Di- bzw. Polymeren zu verhindern. Auch Palindrome und lange Abschnitte von Purinen und Pyrimidinen sind zu vermeiden. Der Anteil an den Basen Guanin und Cytosin (G/C-Anteil) der Primer sollte in der Regel zwischen 45 und 60 % liegen [SCHEINERT, 1994; NEWTON und GRAHAM, 1994].

Für die Analyse der Q/R-Editierung der Glutamatrezeptor-Untereinheiten GluR 2, GluR 5 und GluR 6 am Menschen, wurden humanspezifische Primer hergestellt. Dies geschah in Anlehnung an den von Paschen benutzten Primern bei seinen vergleichbaren Untersuchungen an der Ratte [PASCHEN et al., 1994 und 1996]. Soweit möglich wurden obige Kriterien, wie G/C-Anteil oder gleiche Schmelztemperaturen T_m , für die Primer berücksichtigt. Außerdem wurde darauf geachtet, daß beide Primer die zu untersuchende Position der Q/R-Editierung nicht nur einschlossen, sondern daß diese Position möglichst im mittleren Teil des amplifizierten Stückes lag. Dadurch sollte verhindert werden, daß nach der enzymatischen Behandlung Schnittprodukte entstehen, die wegen ihrer Länge unterhalb der elektrophoretischen Nachweisgrenze gelegen hätten. Die Primer sollten idealerweise an zwei Exone binden, die auf genomischer Seite durch ein Intron getrennt sind. Bei korrekter Fragmentlänge ist dann gewährleistet, daß in dem amplifizierten Strang keine Intronsequenz enthalten ist und damit keine genomische DNA vervielfältigt wurde. Zusätzlich wurde gewährleistet, daß die Restriktionsendonuclease, welche diese Q/R-Position erkennt, eine solche Erkennungsstelle in dem vervielfältigten DNA-Strang maximal nur einmal findet. Für die Primersynthese wurde die jeweilige cDNA Sequenz aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information zugrunde gelegt. Die Herstellung der Primer erfolgte durch MWG Biotech. Die Primer wurden HPLC⁸-gereinigt und im lyophilisierten Zustand geliefert. Durch Zugabe von Aqua bidest. erfolgte die Resuspension der Primer derart, daß sie in einer Konzentration von 0,1 mM vorlagen. Dies bildete die sogenannte Stammlösung. Für die PCR wurden durch Verdünnung Gebrauchslösungen der Primer, mit einer Konzentration von 0,025 mM, hergestellt. Stamm- und Gebrauchslösungen wurden bei -20° C gelagert. Für die einzelnen Untersuchungen wurden folgende Primerpaare eingesetzt:

⁸ HPLC: High Performance Liquid Chromatography

2.5.1 Primer für die AMPA-Untereinheit GluR 2

Für die Synthese spezifischer Primer für die AMPA-Untereinheit GluR 2 ist die Kenntnis seiner Nucleotidsequenz in Form einer klonierten cDNA erforderlich. Diese, mit der Assoziationsnummer L 20814, wurde 1994 erstmalig von Sun und Mitarbeitern kloniert [SUN et al., 1994]. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Primer benutzt, die zur Amplifizierung eines 231 Basenpaar (bp) langen Teilstücks der cDNA führt. Der vorwärts gerichtete Primer up-GluR 2 bindet an Nucleotide der Positionen 1692 bis 1712, während der rückwärts gerichtete Primer low-GluR 2 zwischen den Positionen 1902 und 1922 bindet. Die Primer besitzen die folgenden Charakteristika:

up-GluR 2:	Sequenz:	5'–agcagatttagcccctacgag–3'
	Länge:	21 Basenpaare
	Schmelztemperatur T_m :	59,8° C
	G/C-Anteil:	52,4 %
low-GluR 2:	Sequenz:	5'–taagttagccgtgtaggagga–3'
	Länge:	21 Basenpaare
	Schmelztemperatur T_m :	59,8° C
	G/C-Anteil:	52,4 %.

Abbildung 2.2: Charakteristika der Primer für die Glutamatrezeptor-Untereinheit GluR 2

2.5.2 Primer für die Kainat-Untereinheit GluR 5

Zur Synthese der Primer für die Kainat-Untereinheit GluR 5 wurde die Nucleotidsequenz mit der Assoziationsnummer L 19058 herangezogen. Diese wurde 1993 erstmalig von Gregor et al. kloniert [GREGOR et al., 1993]. Die Primer ermöglichten die Vervielfältigung eines 232 Basenpaar langen Teilstücks der cDNA. In diesem Fall bindet der vorwärts gerichtete Primer up-GluR 5 an Nucleotide in dem Bereich von Position 1778 bis 1799 und der rückwärts gerichtete Primer low-GluR 5 von 1989 bis 2009 einschließlich. Die Primer besitzen folgende Sequenzen und Eigenschaften:

up-GluR 5:	Sequenz:	5'-ctttgtgattgcaaggtttaca-3'
	Länge:	22 Basenpaare
	Schmelztemperatur T_m :	54,7° C
	G/C-Anteil:	36,4 %.
low-GluR 5:	Sequenz:	5'-caggttgccgtgtaggatga-3'
	Länge:	21 Basenpaare
	Schmelztemperatur T_m :	61,8° C
	G/C-Anteil:	57,1 %.

Abbildung 2.3: Charakteristika der Primer für die Glutamatrezeptor-Untereinheit GluR 5

2.5.3 Primer für die Kainat-Untereinheit GluR 6

Die Primer für die Kainat-Untereinheit GluR 6 haben eine Amplifizierung eines 271 Basenpaar langen Teilstücks der cDNA zur Folge. Die zugehörige cDNA, mit der Assoziationsnummer U 16126, wurde 1994 von Hoo und Mitarbeitern kloniert [HOO et al., 1994]. Der vorwärts gerichtete Primer up-GluR 6 hybridisiert an die Nucleotide im Bereich zwischen den Positionen 1792 und 1812, der rückwärts gerichtete Primer low-GluR 6 von Position 2042 bis 2062. Beide Primer besitzen die folgenden Sequenzen und Charakteristika:

up-GluR 6:	Sequenz:	5'-gactcagacgtggtggaaaac-3'
	Länge:	21 Basenpaare
	Schmelztemperatur T_m :	59,8° C
	G/C-Anteil:	52,4 %.
low-GluR 6:	Sequenz:	5'-cgtcctctactgctccatatt-3'
	Länge:	21 Basenpaare
	Schmelztemperatur T_m :	55,9° C
	G/C-Anteil:	42,9 %.

Abbildung 2.4: Charakteristika der Primer für die Glutamatrezeptor-Untereinheit GluR 6

2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine in vitro-Technik, mit der man DNA-Sequenzen, die von bekannten Oligonucleotiden eingefasst werden, amplifizieren kann. Je nach Optimierung des Verfahrens erhält man eine Vermehrung der DNA um einen Faktor von 10^5 bis 10^{10} . Durchschnittlich ist mit einer Vermehrung um einen Faktor von 10^8 zu rechnen. An den bekannten DNA-Bereichen können entsprechend komplementäre Primer hybridisieren. Diese dienen dann als Startmolekül für eine DNA-Polymerase. Nach der ersten Entwicklung durch Mullis [SAIKI et al., 1985] wurde dieses Verfahren entscheidend verbessert durch den Einsatz hitzestabiler DNA-Polymerasen [SAIKI et al., 1988]. Dies ließ auch den Einsatz von PCR-Geräten zu, die die notwendigen Temperaturwechsel für die einzelnen Zyklen automatisch veränderten. Ein Zyklus besteht dabei aus drei Temperaturschritten mit den folgenden Prozessen:

- Denaturierung,
- Anlagerung der Primer (annealing) und
- Verlängerung der Primer (Polymerisation).

Zu Beginn erfolgt eine Denaturierung der DNA-Matrize, um eine Anlagerung der Oligonucleotide zu ermöglichen. Dazu wird die Probe mit den vier dNTP's, den Oligonucleotidprimern, der DNA-Polymerase und geeignetem Reaktionspuffer, auf Temperaturen zwischen 93°C bis 100°C erhitzt. Anschließend erfolgt bei Temperaturen zwischen 37°C und 70°C eine Hybridisierung der Primer an die einsträngige DNA. Die genaue Hybridisierungstemperatur T_m ist unter anderem durch die Spezifität der Primer gegeben [NEWTON und GRAHAM, 1994; GASSEN, 1991]. Danach erfolgt die Synthese des neuen DNA-Stranges durch Einbau komplementärer Desoxynucleosidtriphosphate mit Hilfe der DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 72°C . Diese Temperatur ist optimal für die am häufigsten und zuerst verwendete hitzestabile DNA-Polymerase, die Taq-Polymerase [NEWTON und GRAHAM, 1994; SAIKI et al., 1988]. Ein solcher Zyklus wird dann zwischen 25 und 35 mal wiederholt. Eine weitere Steigerung der Zyklenzahl führt häufig jedoch zu mehr Artefakten als zu einer Vermehrung der DNA. Mit zunehmender Zyklenzahl nimmt die Aktivität der Taq-Polymerase ab, ihre Halbwertszeit der Hitzebeständigkeit beträgt bei 95°C etwa 40 Minuten. Außerdem steigt die Gesamtzahl der Polymerisationsfehler, da diese sich auch in den nachfolgenden Amplifikationsschritten manifestieren. Darüber hinaus tritt eine Sättigung in der Vervielfältigung der DNA ein, da mit steigender

Zyklenzahl die Konzentration der Taq-Polymerase relativ zu der Konzentration der DNA abnimmt. Weitere Einflüsse bezüglich einer optimalen PCR sind gegeben durch die Konzentrationen von Enzym, dNTP's, Magnesium bzw. anderen Ionen, Primern und DNA, sowie vom pH-Wert des Reaktionspuffers.

Bei den vorliegenden Untersuchungen zur Q/R-Editierung im humanen Hirngewebe wurde für die PCR die gentechnisch hergestellte AmpliTaq[®] von Perkin Elmer verwendet. AmpliTaq[®] ist in seinem Verhalten und Aufbau identisch mit der Taq-Polymerase, jedoch chemisch leichter zu isolieren. Bei optimierten Bedingungen wurde das Enzym in einer Konzentration von 0,05 U / μ l dem Ansatz zugegeben. Als Reaktionslösung wurde der mitgelieferte zehnfach konzentrierte standardisierte Puffer (vgl. Tabelle 2.4) der AmpliTaq[®] eingesetzt. Die spezifischen Primer wurden in einer Konzentration von je 0,5 μ M zugegeben. Die dNTP's, geliefert als Nucleotid Mix von Boehringer Mannheim, wurden der Reaktionslösung in einer Konzentration von 0,2 mM, bei einem pH-Wert von 8,3, zugesetzt. Der komplette Reaktionsansatz wurde dann für 35 Zyklen dem folgenden Temperaturprofil unterzogen (vgl. Abbildung 2.5): 94° C für drei Minuten, Zugabe von AmpliTaq[®], 94° C für eine Minute, 60° C für eine Minute, 72° C für eine Minute. Die dreiminütige Denaturierung vor Zugabe des Enzyms erfolgt, um die Effektivität und Spezifität der PCR zu erhöhen [CHOU et al., 1992]. Dieses wird auch als

	Pufferbestandteile	Konzentration	50 μ l Reaktionsansatz
PCR-Puffer	Tris-HCl, pH = 8,3	10 mM	0,5 mol
	KCl	50 mM	2,5 mol
	MgCl ₂	1,5 mM	0,075 mol
	Gelantine (w/v)	0,01 ‰	0,5 ng
AmpliTa [®]		0,05 Units / μ l	2,5 Units
Primer		0,5 μ M	0,5 pmol
dNTP		0,2 mM	10 mmol

Tabelle 2.4: Aufstellung über die Zusammensetzung der Pufferlösung und der Konzentrationen der verschiedenen Reaktionsbeimengungen bei der PCR.

„hot start“ bezeichnet. Nach 35 Zyklen erfolgte nochmals für 15 Minuten eine Erwärmung auf 72° C, wodurch eine vollständige Polymerisation der amplifizierten DNA-Stränge erreicht werden soll. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß auf 4° C abgekühlt (vgl. Abbildung 2.5). Der gesamte Prozeß erfolgte mit dem Trio Thermoblock von Biometra, der mit beheizbaren Deckeln ausgestattet war, so daß auf ein Überschichten mit Mineralöl verzichtet werden konnte.

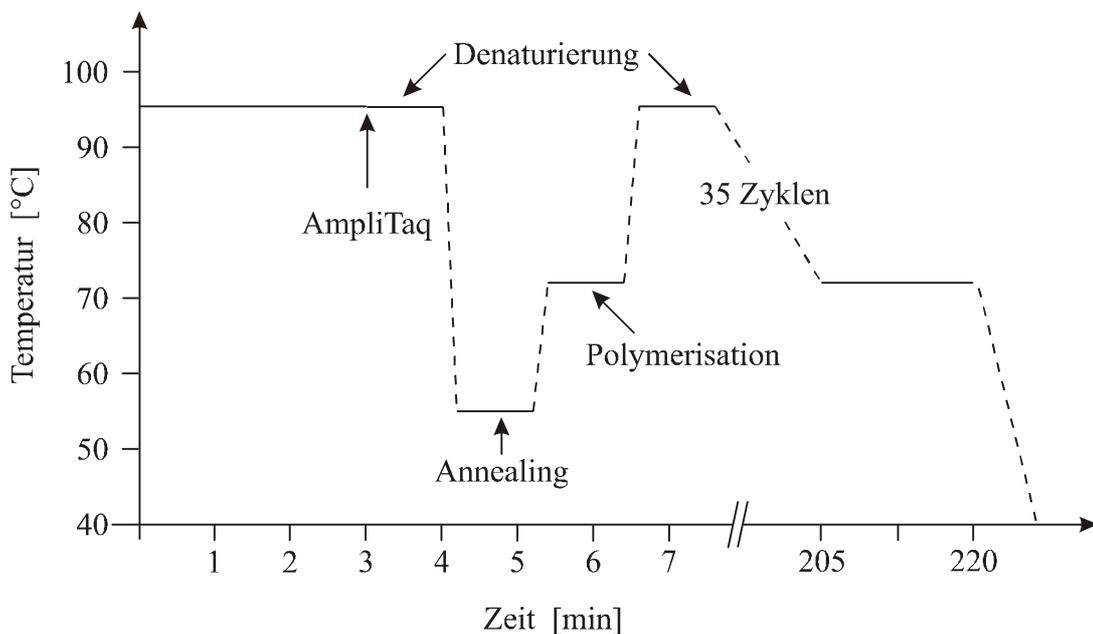


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Temperaturverlaufs während eines PCR-Synthese-Zyklus mit den PCR-Schritten Denaturierung, Annealing und Polymerisation (vgl. Kapitel 2.5 und Abbildung 2.1).

2.7 Enzymrestriktion

Für die weitere Analyse von amplifizierter DNA können Restriktionsendonucleasen eingesetzt werden. Diese sind in der Lage einzel- oder doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen zu hydrolysieren und dadurch für das amplifizierte DNA-Stück spezifische Schnittprodukte hervorrufen. Voraussetzung dafür ist, daß das Enzym innerhalb der DNA-Sequenz eine Erkennungsstelle findet. Die Erkennungsstelle kann aus vier bis acht Basen bestehen und ist für jedes Enzym spezifisch. Die Durchtrennung der DNA kann sowohl orthograd als auch überlappend sein. Die Restriktionsendonucleasen können die DNA-Sequenz entweder innerhalb der Erkennungsstelle oder dahinter durchschneiden.

Für den Einsatz der Restriktionsendonucleasen gelten folgende Bedingungen: Sie sollten entweder als Nachweis für den Grad der Editierung dienen oder den Nachweis des spezifischen Amplikons erbringen (Spezifitätskontrolle). Für den Grad der Editierung müssen die Enzyme die Q/R-Editierungsstelle innerhalb des amplifizierten DNA-Stranges erkennen und dürfen keine weitere Erkennungssequenz im Amplikon besitzen. Mit Hilfe des Anteils der Schnittprodukte gegenüber der unveränderten DNA kann eine Aussage darüber getroffen werden, wie hoch der Anteil der Editierung bzw. Nichteditierung im Amplikon war.

Der Nachweis des spezifischen Amplikons erfolgte mit Endonucleasen, die innerhalb der amplifizierten DNA nur eine einzige Erkennungssequenz besitzen. Der amplifizierte DNA-Strang wird in zwei DNA-Stränge bekannter Länge durchtrennt. Die spezifischen DNA-Fragmente lassen sich im Agarosegel mit Hilfe der Elektrophorese trennen und nachweisen.

2.7.1 Restriktionsendonucleasen für die Analyse der Q/R-Editierung

Bei der Q/R-Editierung kommt es zu einem Basenwechsel von Adenin zu Guanin an der Position 1719 der AMPA-Untereinheit GluR 2 und an den Positionen 1906 und 1968 der Kainat-Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 der transmembranösen Region II. Das bedeutet, daß in der Sequenz Adenin im Fall der Nichteditierung und Guanin im Fall der Editierung erkannt werden muß (vgl. Abb. 2.6).

Sequenz bei Nichteditierung: CATGCAGCAAG

Sequenz bei Editierung: CATGCGGCAAG

Abbildung 2.6: Ausschnitt aus der cDNA-Sequenz der Rezeptor-Untereinheiten GluR 2, GluR 5 und GluR 6 im Fall der Nichteditierung bzw. Editierung mit Unterstreichung der Q/R-Position

Lag die ursprüngliche m-RNA im nichteditierten Zustand vor, also mit der cDNA-Sequenz von -CAG-, dann erfolgte die Analyse durch die Restriktionsendonuclease Bbv I. Dieses Enzym, vom *Bacillus brevis*, besitzt eine fünfstellige Erkennungssequenz und schneidet überlappend acht Basenpaare in 3'-Richtung hinter der Erkennungsstelle. In 5'-Richtung erfolgt die Durchtrennung 12 Basenpaare hinter der Erkennungssequenz:

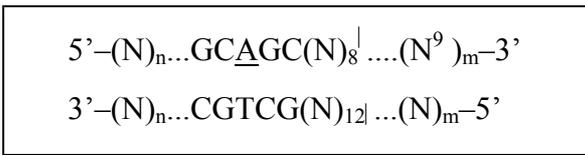


Abbildung 2.7:
Erkennungssequenz für Bbv I

Das bedeutet, daß Bbv I die nichteditierte Base Adenin, in Abbildung 2.7 unterstrichen, als Bestandteil der Erkennungsstelle findet und dadurch der ursprüngliche DNA-Strang in zwei Teilstränge geschnitten wird. Diese Teilstränge besitzen in Abhängigkeit von der amplifizierten Rezeptoruntereinheit folgende Längen (vgl. Tabelle 2.5):

Rezeptoruntereinheit	amplifizierte DNA in Basenpaare (bp)	Länge der Bbv I Schnittprodukte in Basenpaare (bp)	
GluR 2	231	138	93
GluR 5	232	139	93
GluR 6	271	81	190

Tabelle 2.5: Basenpaarlänge der amplifizierten DNA-Stränge und der Bbv I-Schnittprodukte bei Vorliegen einer Nichteditierung

Bei Verwendung des Enzyms Aci I, vom *Arthrobacter citreus*, wird der amplifizierte DNA-Strang dann durchtrennt, wenn in den spezifischen Editierungspositionen, ein Basenwechsel stattgefunden hat. Die entsprechende Base Guanin (unterstrichen in Abbildung 2.8) stellt sich nun in der Erkennungssequenz von Aci I dar. Die Länge der so erzeugten Teilstränge kann Tabelle 2.6 entnommen werden.

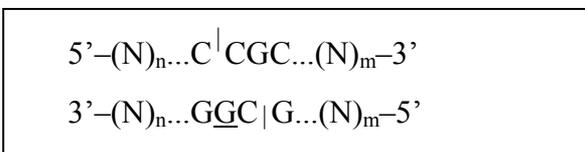


Abbildung 2.8:
Erkennungssequenz für Aci I

Für die Untereinheit GluR 6 besitzt die Endonuclease Aci I eine zweite Erkennungssequenz in der amplifizierten DNA. Dadurch kommt es, je nach Editierung, zu zwei oder vier Spaltprodukte und sicherlich zur kompletten Hydrolyse des ursprünglichen DNA-Stranges.

⁹: N steht als Synonym für eine beliebige Base; n und m stehen für eine beliebige Anzahl von Basen

Rezeptoruntereinheit	amplifizierte DNA in Basenpaare (bp)	Länge der Aci I Schnittprodukte in Basenpaare (bp)			
GluR 2	231	126		105	
GluR 5	232	127		105	
GluR 6	271	176	107	95	69

Tabelle 2.6: Basenpaarlänge der amplifizierten DNA-Stränge und der Aci I-Schnittprodukte bei Vorliegen einer Editierung

Die vergleichbare Länge der so erzielten Teilprodukte hat zur Folge, daß eine sichere Trennung der entsprechenden Signale elektrophoretisch nicht mehr gewährleistet war. Durch die Unterschreitung des Auflösungsvermögens konnte für GluR 6 hinsichtlich des Grades der Editierung mit Hilfe von Aci I keine sinnvolle Aussage gewonnen werden.

2.7.2 Restriktionsendonucleasen für die Spezifitätskontrolle

Zur Spezifitätskontrolle der amplifizierten DNA-Stränge wurden für die einzelnen Rezeptoruntereinheiten folgende Restriktionsendonucleasen verwendet. Fnu 4H I, aus *Fusobacterium nucleatum* 4H, und Hinf I, vom *Haemophilus influenzae* Rf, zum Nachweis von der Untereinheit GluR 2. Für die Untereinheit GluR 5 konnte ebenfalls das Enzym Hinf I benutzt werden, während die Rezeptoruntereinheit GluR 6 durch das Enzym Acc I, des *Actinobacter calcoaceticus*, bestätigt wurde. Die jeweiligen Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonucleasen sind in der Abbildung 2.9 dargestellt:

Fnu 4H I	$5'-(N)_n...GC^I NGC...(N)_m-3'$ $3'-(N)_n...GCN GC...(N)_m-5'$,
Hinf I	$5'-(N)_n...G^I ANTC...(N)_m-3'$ $3'-(N)_n...CTNA G...(N)_m-5'$,
Acc I	$5'-(N)_n...GT^I ATAC...(N)_m-3'$ $3'-(N)_n...CATA TG...(N)_m-5'$ oder $5'-(N)_n...GT^I CGAC...(N)_m-3'$ $3'-(N)_n...CAGC TG...(N)_m-5'$

Abbildung 2.9: Erkennungssequenzen für Fnu 4H I, Hinf I und Acc I

Die dadurch erzielten Hydrolyseprodukte sind in der Tabelle 2.7 mit ihren jeweiligen Basenpaarlängen aufgeführt.

Rezeptoruntereinheit	Restriktionsendonuclease	amplifizierte DNA in Basenpaare (bp)	Länge der Schnittprodukte in Basenpaare (bp)	
GluR 2	Fnu 4H I	231	127	104
	Hinf I	231	67	164
GluR 5	Fnu 4H I	232	128	104
	Hinf I	232	59	173
GluR 6	Acc I	271	160	111

Tabelle 2.7: Basenpaarlängen der amplifizierten DNA-Stränge, der jeweiligen spezifischen Restriktionsendonucleasen und ihrer Schnittprodukte

2.7.3 Durchführung der Restriktionsanalyse

Der Nachweis der Editierung bzw. Nichteditierung, wie auch die Kontrolle der Spezifität der amplifizierten DNA, wurde mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen durchgeführt. Dazu wurde direkt im Anschluß an die PCR von der Reaktionslösung 22 µl abgenommen und in ein separates steriles Eppendorfgefäß überführt. Unter nachfolgender Zugabe von 10 Vol. % Natriumacetat, in einer Konzentration von 2 M, und einer Menge von 250 Vol. % Ethanol erfolgte eine Präzipitation der Nucleinsäuren bei -40° C über mindestens acht Stunden. Danach wurde das DNA-Pellet durch Zentrifugation in einer Biofuge von Haereus für zehn Minuten bei 10⁴ min⁻¹ Umdrehungen in einem Festwinkelrotor und Raumtemperatur gewonnen. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet bei Raumtemperatur ausreichend getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 18 µl Aqua bidest. resuspendiert. Je nach zugesetzter Endonuclease wurde die Reaktionslösung mit 2 µl eines zugehörigen, zehnfach konzentrierten Puffers komplettiert und die Lösung über einen Zeitraum von 16 Stunden bei einer Temperatur von 37° C inkubiert. Die Menge bzw. Konzentration des beigemengten Enzyms betrug etwa zwei bis fünf Units pro Reaktionsvolumen, abhängig vom entsprechendem Enzym. Einzelheiten sind der Tabelle 2.8 zu entnehmen. Sämtliche Enzyme wurden mit zugehörigen Puffern von New England Biolabs

Restriktionsendonuclease	Enzymmenge für 1 µg DNA [Units]	Konzentration im Aufbewahrungspuffer [Units / µl]	eingesetzte Enzymmenge [Units]	Puffertyp
Bbv I	1,0	0,1	2	2
Aci I	1,0	0,1-0,15	2-2,5	3
Fnu 4H I	0,25	0,075-0,15	1,5-2,5	4
Hinf I	0,13	0,25	5	2
Acc I	0,13	0,25	5	4

Tabelle 2.8: Eigenschaften und Konzentrationen der Restriktionsendonucleasen sowie der verwendeten Puffersysteme

Restriktionsendonucleasen	Bbv I, Hinf I	Aci I	Fnu 4H I, Acc I
Puffertyp	2	3	4
Natriumchlorid	50 mM	100 mM	-
Tris-HCl	10 mM	50 mM	-
Magnesiumchlorid	10 mM	10 mM	-
Kaliumacetat	-	-	50 mM
Tris-Acetat	-	-	20 mM
Magnesiumacetat	-	-	10 mM
DTT	1 mM	1 mM	1 mM
pH-Wert, $\vartheta = 25^{\circ} \text{C}$	7,9	7,9	7,9

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der bei der Enzymrestriktion eingesetzten Puffersysteme

Inc. geliefert (vgl. Tabelle 2.9). Im Anschluß an die Behandlung mit Restriktionsendonucleasen wurden die einzelnen DNA-Fragmente mit Hilfe der Elektrophorese in einem Agarosegel getrennt. Durch Behandlung mit Ethidiumbromid und Anregung dieses planaren Aromaten mit UV-Licht konnten die DNA-Produkte visualisiert werden. Per CCD¹⁰-Kamera wurden die Gele digitalisiert und anhand der Intensitätsstärke der einzelnen Banden konnten Rückschlüsse auf den Grad der Editierung gezogen werden.

Die in Tabelle 2.8 aufgeführten Enzymkonzentrationen wurden mit Hilfe einer Konzentrationsreihe anhand mehrerer Versuche verschiedener Proben ermittelt. Bei der Spezifitätsanalyse war es nur erforderlich eine ausreichend hohe Enzymkonzentration in dem Restriktionsansatz zu gewährleisten ohne artifizielle Schnittprodukte zu erzeugen. Diese können auftreten, wenn z. B. eine zu hohe Glycerolkonzentration in dem Restriktionsansatz vorhanden ist, die im allgemeinen kleiner 5 Vol. % liegen sollte [ZIEGLER, 1999]. Glycerol, als Bestandteil des Lagerungspuffers der Enzyme, gelangt dann in hohen Konzentrationen in den Restriktionsansatz, wenn das entsprechende Enzym nur in einer geringen Konzentration im Lagerungspuffer vorliegt. Dies war bei den Endonucleasen zur Spezifitätsanalyse, Fnu 4H I, Hinf I und Aci I, nicht der Fall, so daß hier die Menge der Enzyme ausreichend hoch gewählt werden konnte (vgl. Kapitel 3.1). Im Gegensatz zur Spezifitätsanalyse bestand bei der Restriktionsanalyse zur Bestimmung des Editierungsgrades eine größere Bedeutung für eine optimierte Enzymkonzentration in den Restriktionsansätzen. Die Hauptursache lag in der unzureichenden Konzentration der Restriktionsendonucleasen Bbv I und Aci I in ihren zugehörigen Lagerungspuffern. Dies führte dazu, daß die Konzentration der Enzyme in den Restriktionsansätzen nicht zu hoch gewählt werden durfte um die Glycerolkonzentration niedrig zu halten. Auf der anderen Seite mußte gewährleistet sein, daß eine genügende Aktivität der Endonucleasen über eine ausreichende Zeit zur Verfügung stand, um die gesamte DNA-Menge, die geschnitten werden kann, auch zu restringieren. Anhaltspunkte konnten den Arbeiten von Cha [CHA et al., 1994], Lai [LAI et al., 1997] und Paschen [PASCHEN et al., 1995] entnommen werden. Weitere Informationen lieferte der Hersteller New England Biolabs Inc..

Es wurden daraufhin die Restriktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl mit steigender Enzymmengen versehen: Ansatz 1: 2 Units, Ansatz 2: 4 Units und Ansatz 3: 8 Units. Vier unterschiedliche Gewebeproben wurden mehrfach untersucht und mit Hilfe der

¹⁰ :CCD: charge coupled device

Densitometrie ausgewertet. Dabei zeigten sich in den Ergebnissen keine wesentlichen Differenzen, die über das Maß der Meßgenauigkeit des Verfahrens hinausgingen. Die Enzymmenge des Restriktionsansatzes mit einem Volumen von 20 µl wurde für Bbv I somit auf 2 Units, die für Aci I auf 2 bis 3 Units festgelegt.

2.8 Nachweis der PCR-Produkte mit Hilfe der Gelelektrophorese

Die am häufigsten verwendete Methode um DNA-Fragmente zu trennen, zu identifizieren oder zu reinigen ist die Elektrophorese mit Agarosegelen [MANIATIS et al., 1982]. Die Wanderungsrate der DNA-Fragmente ist dabei von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Neben der Molekülgröße und der Konformation der DNA bestimmen auch die Strom- bzw. Feldstärke, sowie die Umgebungstemperatur die Migrationsrate. Mit steigender Molekülgröße nimmt die Laufweite der DNA im Gel ab. Mit zunehmender Feldstärke steigt zwar die Wanderungsrate der DNA, jedoch nimmt gleichzeitig die Trennfähigkeit ab. Daher sollte die Feldstärke nicht oberhalb von 5 V / cm liegen sollte [MANIATIS et al., 1982]. Die Temperaturabhängigkeit ist für Agarosegele von geringerer Bedeutung, da über einen Bereich zwischen 4° C und 30° C kaum eine Änderung der Mobilität von DNA-Fragmenten eintritt. Von besonderer Bedeutung ist hingegen die Konzentration der Agarose im Gel. Mit steigender Konzentration der Agarose nimmt die Molekülgröße der DNA, die getrennt werden kann, ab. Bei einer zweiprozentigen Agarosekonzentration liegt z. B. die Trennfähigkeit des Gels in einem Bereich zwischen 3000 und 100 Basenpaaren. Zur direkten Darstellung der DNA-Banden in Agarosegelen nutzt man die Fluoreszenz von Ethidiumbromid. Als planares aromatisches Kation interkaliert Ethidiumbromid zwischen den anionischen Basen der DNA [CANTOR et al., 1980; SOBELL et al., 1978] in einem stöchiometrischen Verhältnis von etwa vier bis fünf Basenpaaren [MEYER-ALMES et al., 1993; BRESLOFF et al., 1975]. Nach Anregung durch UV-Licht bei 302 nm oder 366 nm emittiert Ethidiumbromid monochromatisches Licht bei einer Wellenlänge von 590 nm. Diese Emission kann dann mittels photographischer Methoden oder mit computer-gestützten Videosystemen erfaßt werden. Selbst geringe Mengen von 1 ng DNA lassen sich so noch nachweisen [SHARP et al., 1973]. Bei so geringen Mengen ist es allerdings sinnvoll, die Hintergrundfluoreszenz im Gel zu minimieren, indem man ungebundenes Ethidiumbromid durch waschen des Gels in 1 mM Magnesiumsulfatlösung entfernt.

2.8.1 Herstellung von Agarosegelen zum Nachweis der PCR-Produkte

Bei der Herstellung der Agarosegele wurde Agarose von Sigma¹¹ für Routineanwendungen in einer Konzentration von 2,5 % verwendet. Die Agarose wurde mit 30 ml eines TAE¹²-Puffers (40 mM Trizmabase, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH = 7,2 mit Essigsäure) versetzt und mit Hilfe eines Mikrowellengerätes gleichmäßig erhitzt. Vor dem Eingießen in das präparierte Gelbecken wurden 1 Vol % Ethidiumbromid, in einer Konzentration von 1 mg / ml, hinzugegeben. Die Zugabe von Ethidiumbromid direkt in das Gel reduziert zwar die Mobilität der ds-DNA um 15 %, doch betrifft dies bei gleicher Anwendung die gesamte Versuchsreihe [MANIATIS et al., 1982]. Das flüssige Gel kristallisierte dann über einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten aus, bevor es in der Gelkammer mit TAE-Puffer benetzt werden konnte. Die Gele besaßen im Durchschnitt eine Dicke von 4 mm, die Vertiefungen (Slots) für die DNA-Proben besaßen ein Volumen von $5 \times 1 \times 3 \text{ mm}^3$ ($15 \text{ mm}^3 = 15 \text{ } \mu\text{l}$). Die DNA-Proben wurden dann mit jeweils 3 μl eines Ladungspuffers versetzt. Dieser Ladungspuffer besteht aus in Aqua bidest. gelöster Sucrose (40 % w/v), der mit 0,25 Vol. % Bromphenolblau angefärbt ist. Der Ladungspuffer wird bei 4° C gelagert. Zusätzlich zu den DNA-Proben wurden 1 μl eines 100 Basenpaar DNA-Standards¹³ in jedes Gel hinzugegeben. Damit konnten die DNA-Banden eindeutig zugewiesen und darüber hinaus im Densitogramm eine basenpaarabhängige Skalierung ermittelt werden. Nach Einfüllen der DNA-Proben und des DNA-Standards wurden die Gele über einen Zeitraum von 110 Minuten einem elektrischen Feld von 2,67 V / cm ausgesetzt. Im Anschluß an die elektrophoretische Trennung wurden die Gele mit Hilfe einer CCD-Kamera unter UV-Bestrahlung direkt digital aufgezeichnet. Dies erfolgte mit dem Transilluminator TI 3 und dem Dokumentationssystem BioDok IITM von Biometra[®]. Die so erzeugten Daten wurden auf einem PC gespeichert und mittels einer zugehörigen Software densitometrisch (ScanPack, von Biometra[®]) ausgewertet. Da das Signal-Rausch-Verhältnis ausreichend groß war, war eine nachfolgende Behandlung mit Magnesiumsulfat zum Entfernen des Ethidiumbromids nicht notwendig.

¹¹ : Agarose A9539 von Sigma-Aldrich mit einer Geling-Temperatur von 36° C

¹² : TAE: Puffer aus Trizmabase, Natriumacetat, EDTA und Essigsäure für pH = 7,2

¹³ : DNA-Standard: 100 Base-Pair Ladder von Amersham Pharmacia Biotech, Konzentration 1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ in TE-Puffer mit pH = 7,5

2.9 Darstellung und densitometrische Auswertung von Agarosegelen

Densitometrische Auswerteverfahren besitzen gegenüber der alleinigen photographischen Dokumentation den Vorteil, daß durch die Herstellung von Eichgeraden eine feinere Abstufung der Ergebnisse ermöglicht wird. Gerade bei vergleichbaren Intensitäten der DNA-Banden ist eine rein visuelle Auswertung in der Regel unzureichend, um Unterschiede noch exakt festzustellen. Abhilfe gegenüber einer rein photographischen Dokumentation bietet das computergestützte Einlesen der Filmnegative und die weitere Aufarbeitung mit Hilfe geeigneter Software. Darüber hinaus kann so die Fluoreszenz von gefärbten DNA-Banden mit Ethidiumbromid quantitativ bestimmt werden [SUTHERLAND et al., 1984]. Nachteil dieser Methode ist allerdings das nichtlineare Antwortverhalten des photographischen Films hinsichtlich des auftreffenden Lichtes. Somit ist die optische Dichte des Films nicht direkt proportional zur Menge der DNA im Gel [FREEMAN et al., 1990]. Densitometrische Videosysteme besitzen diesen Nachteil nicht. Durch das lineare Verhalten der CCD-Kameras kann die Menge der DNA direkt aus dem Integral der Fluoreszenz der ethidiumgefärbten DNA ermittelt werden [SUTHERLAND et al., 1987]. Weitere Vorteile sind z. B. ein hoher Signal-Rausch-Abstand oder ein großer Dynamikbereich [AIKENS et al., 1989].

2.9.1 Densitometrische Auswertung von Agarosegelen

Bei der Untersuchungen zur Q/R-Editierung wurden in Abhängigkeit vom Grad der Editierung zum Teil mehrere DNA-Banden in einer Spur des Geles ermittelt. Diese DNA-Fragmente besaßen eine definierte Länge und konnten somit im Densitogramm exakt zugewiesen werden. Die Erstellung und Auswertung der Densitogramme erfolgte mit der zum Dokumentationssystem zugehörigen Software Scanpack 3.0. Der jeweilige Grad der Editierung bzw. Nichteditierung konnte dann, je nach eingesetzter Restriktionsendonuclease, aus dem Verhältnis der Flächenintegrale der zu den DNA-Banden zugehörigen Fluoreszenz I ermittelt werden. Dabei wurde das Verhältnis der Summe der Fluoreszenzen der Schnittprodukte (I_2 und I_3) zur Gesamtfluoreszenz (I_1 , I_2 und I_3) bestimmt (vgl. auch Abbildung 2.10). Dieses Verhältnis entspricht dem Quotienten aus dem durch die Endonuclease geschnittenen Teil der DNA zur eingesetzten Gesamt-DNA. Es gilt:

$$I_1 \approx l_1 \cdot (x - y) \cdot I_0 \quad (2.2)$$

$$I_2 \approx l_2 \cdot y \cdot I_0 \quad (2.3)$$

$$I_3 \approx l_3 \cdot y \cdot I_0 \quad (2.4)$$

$$l_1 = l_2 + l_3 \quad (2.5)$$

mit: l_i : Länge des DNA-Fragmentes, z. B. Anzahl an Basenpaaren (bp), $i = 1,2,3$

x : Menge der ungeschnittenen DNA

y : Menge der geschnittenen DNA

I_0 : Grundemission je interkaliertem Ethidiumbromidmolekül

Gesucht ist das Verhältnis der geschnittenen zur gesamten DNA, also y / x :

$$\frac{I_2 + I_3}{I_1 + I_2 + I_3} = \frac{(l_2 + l_3) \cdot y \cdot I_0}{(l_1 \cdot (x - y) + l_2 \cdot y + l_3 \cdot y) \cdot I_0} = \frac{(l_2 + l_3) \cdot y}{l_1 \cdot x + (l_2 + l_3 - l_1) \cdot y} \quad (2.6)$$

mit Gleichung 2.5 folgt:

$$\frac{I_2 + I_3}{I_1 + I_2 + I_3} = \frac{l_1 \cdot y}{l_1 \cdot x} = \frac{y}{x} \quad (2.7)$$

In bestimmten Fällen, wenn das zweite, kleinere DNA-Schnittprodukt eine zu geringe Intensität aufwies oder durch die Extinktion der in der Lauffront befindlichen Nucleotide beeinträchtigt war, wurde dieses Flächenintegral mit Hilfe eines Korrekturfaktors k aus dem Flächenintegral des größeren Schnittproduktes ermittelt. Eine solche Bestimmung des Editierungs- bzw. Nichteditierungsgrades ist durchaus gerechtfertigt, da erstens eine ausreichende Zahl von Messungen die Existenz eines konstanten Verhältnisses der Flächenintegrale (der Schnittprodukte) bestätigt (vgl. Abbildungen 3.23 und 3.24, Kapitel 3.3.3.2), und zweitens dies direkt aus der Länge der Schnittprodukte gemäß den Gleichungen 2.3 und 2.4, berechnet werden kann. Es gilt dann:

$$I_3 = k \cdot I_2 \Leftrightarrow l_3 \cdot y \cdot I_0 = k \cdot l_2 \cdot y \cdot I_0 \Leftrightarrow l_3 = k \cdot l_2 \quad (2.8-2.9)$$

$$\Leftrightarrow k = \frac{l_3}{l_2} \quad (2.10)$$

Dies ist auch mit den von Sutherland beschriebenen Ergebnissen konform [SUTHERLAND et al., 1987]. Glazer beschrieb ebenfalls eine solche Gesetzmäßigkeit für das im Verhalten vergleichbare Ethidiumhomodimer [GLAZER et al., 1990].

Da die Bestimmung des Editierungsgrades innerhalb einer Spur eines Geles erfolgte, war eine Korrektur der Werte durch mögliche Intensitätsinhomogenitäten durch die Aufnahmetechnik, wie durch Shubsda bei der photographischen Densitometrie beschrieben [SHUBSDA et al., 1997], nicht erforderlich. Auch unvermeidbare Auswirkungen in den Densitogrammen durch Unterschiede in den verschiedenen Gelen, wie durch Sundfors beschrieben [SUNDFORS et al., 1996], trugen nicht zu weiteren Fehlern bei, da die Bestimmung des Editierungsgrades jeweils mit Daten aus einem Gel erfolgte. Einzig die Festlegung der Peakgrenzen und der Basislinie nahm Einfluß auf die ermittelten Werte. Die Festlegung einer Grundlinie war zur Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz erforderlich. Die Bestimmung der Grundlinie und die Festlegung der Peakgrenzen erfolgte bei den verschiedenen Agarosegelen nach gleichen Kriterien.

2.9.1.1 Festlegung der Grundlinie im Densitogramm von Agarosegelen

Die Bestimmung der Grundlinie erfolgte für jede Spur individuell gemäß den folgenden Kriterien (vgl. Abbildung 2.10):

- Bestimmung des Untergrundes in einer nicht mit DNA beschickten Parallelspur bei gleicher Position im Gel,
- Ermittlung der Homogenität des Untergrundes über den interessierten Bereich und in einer DNA-freien Parallelspur.
- Berücksichtigung möglicher Artefakte, die den Untergrund beeinflussen.

Die Basislinie stellte sich dann im allgemeinen als eine Gerade dar, ihre Neigung relativ zur Laufrichtung der DNA wurde jedem Gel individuell angepaßt. Im Regelfall existierte keine Neigung der Basislinie, d. h. es erfolgte eine konstante Hintergrundsunterdrückung über die gesamte Laufrichtung.

2.9.1.2 Festlegung der Peakgrenzen im Densitogramm von Agarosegelen

Die Festlegung der Peakgrenzen erfolgte mit Hilfe eines Zeigers/Cursors (A in Abbildung 2.10), dessen Position sowohl in der Abbildung des Gels als auch im Densitogramm angezeigt wurde. Die Grenzfindung erfolgte anhand der Zeiger/Cursorposition an der Abbildung des nativen Gels. Hiermit konnte ein eindeutiger Beginn der DNA-Bande bestimmt werden, d. h. die optischen Grenzen der DNA-Bande wurden als dessen Beginn und Ende festgelegt (A₁ und A₂; B₁ und B₂; C₁ und C₂ in Abbildung 2.10). Somit wurde

die Breite der einzelnen Intensitätspeaks enger gefaßt, als wenn dies anhand des Densitogramms erfolgt wäre. Der Grund ist in der Sensitivität des Dokumentationssystems zu suchen. Diese Sensitivität ist so empfindlich, daß auch noch geringste Unterschiede des Gels im Densitogramm zu erkennen waren. Jedoch können kleine Artefakte oder Inhomogenitäten des Gels unter Umständen im Randbereich eines Peaks gelegen sein und so eine eindeutige Festlegung der Peakgrenzen schwieriger werden lassen. Damit ist eine eindeutige Zuweisung der Peakgrenzen nicht immer sicher gewährleistet. Vergleichsberechnungen an verschiedenen optimalen Gelen, ohne Artefakte und mit idealer Hintergrundfluoreszenz zeigten jedoch, daß die ermittelten Editierungs- bzw.

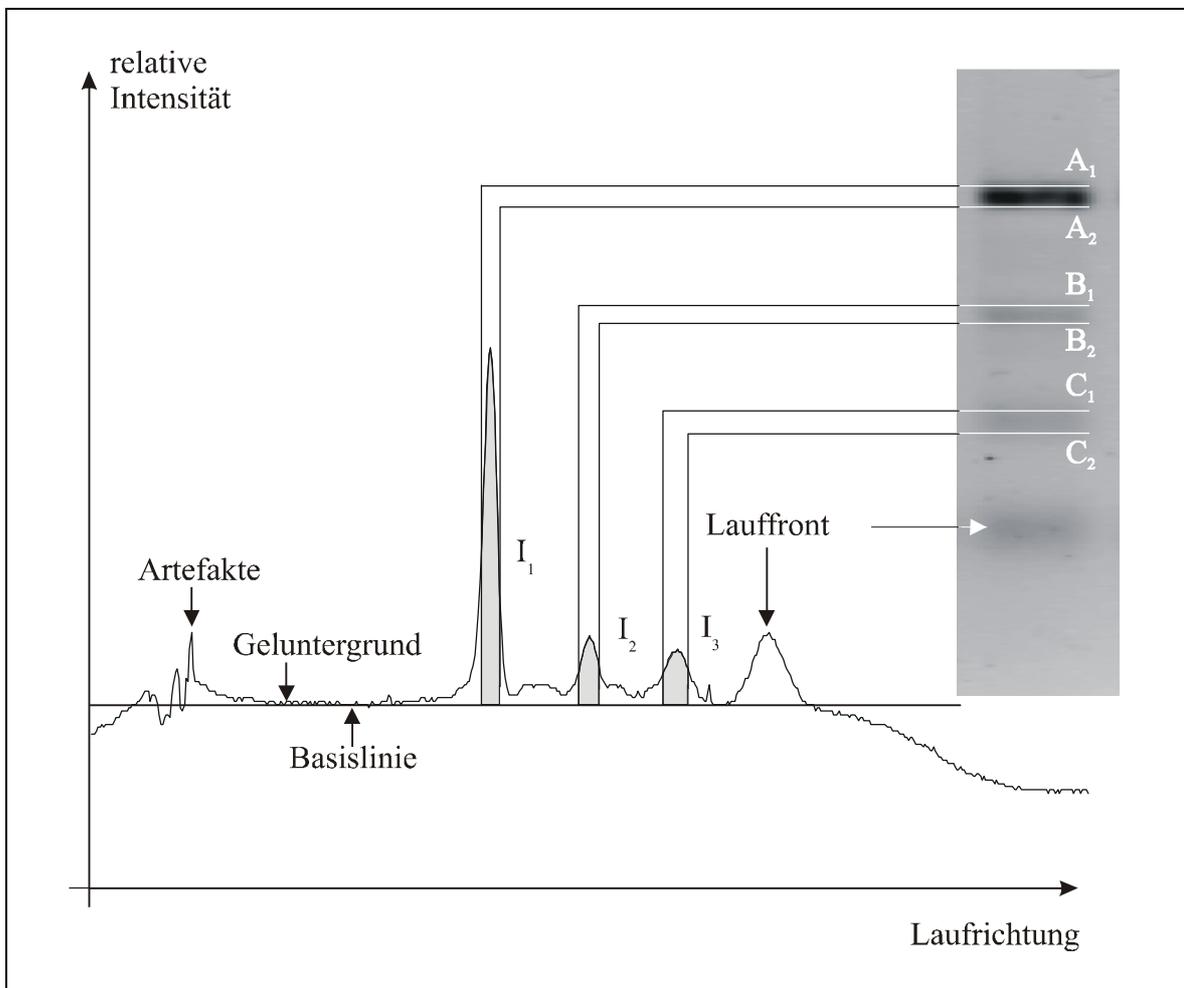


Abbildung 2.10: Densitogramms mit zugehöriger Spur im Agarosegel zur Darstellung der Ermittlung der Peakgrenzen A_i bis C_i , ($i = 1,2$) und Bestimmung der Flächenintegrale I_1 bis I_3 zur Meßwerterfassung, vergleiche auch Gleichungen 2.2 bis 2.10.

Nichteditierungsgrade, nicht voneinander abwichen, wenn einerseits die Peakgrenzen anhand des Bildes festgelegt und andererseits im Densitogramm bestimmt wurden.

2.10 Versuchsdurchführung und statistisches Testverfahren

2.10.1 Versuchsablauf

Die Untersuchungen zur Bestimmung der Q/R-Editierung wurden an epilepsiechirurgischen Geweberesektaten aus dem Hippocampus und Temporallappen vorgenommen. Soweit Hirngewebe aus beiden Arealen von einem Patienten zur Verfügung stand, wurden sowohl Hippocampus als auch Temporallappen parallel analysiert. Die Untersuchungen erfolgten für die einzelnen Rezeptoruntereinheiten zeitlich versetzt, d. h. zuerst wurden die Analysen hinsichtlich der AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR 2 durchgeführt, danach die der beiden Kainat-Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6. Jedes Resektat wurde mindestens in zwei verschiedenen PCR-Ansätzen und Agarosegelen analysiert. Soweit dies möglich war, wurde die aus einer PCR gewonnene DNA zusätzlich in zwei unterschiedliche Gelen aufgetragen. Damit sollten nicht beeinflussbaren Varianzen durch die Versuchsdurchführung minimiert werden. Außerdem wurde jedes Gel mit mindestens drei verschiedenen Belichtungszeiten digital erfaßt. Zwei dieser Aufnahmen dienten zur densitometrischen Auswertung mit optimalen Belichtungszeiten. Zu lange Belichtungszeiten hätten bei zu starker Fluoreszenz einen Sättigungseffekt zur Folge, zu geringe Belichtungszeiten führten zu Unsicherheiten bei zu geringen DNA-Mengen in den Schnittprodukten. Außerdem erfaßt man so mögliche Einflüsse durch die Aufnahmetechnik. Eine dritte Aufnahme diente einzig zur Erfassung des Gels für eine bildliche Darstellung. Durch lange Belichtungszeiten, die erforderlich waren um Informationsverluste bei drucktechnischen Maßnahmen zu kompensieren, waren diese Aufnahmen, bedingt durch Sättigungseffekte und Signalübersteuerungen, für die Auswertung ungeeignet. Die ermittelten Editierungsgrade wurden dann mit Hilfe einer geeigneten Software zur statistischen Analyse (SigmaStat[®], SigmaPlot[®]) bearbeitet und statistischen Testverfahren unterzogen.

2.10.2 Statistisches Testverfahren

Grundsätzlich ist das Ziel statistischer Testverfahren aufgestellte Vermutungen über Parameter von Verteilungen oder der gesamten Verteilungsfunktion an Hand von Stichproben anzunehmen oder zu verwerfen. Mitentscheidend ist dabei der Umfang und die Auswahl der Stichprobe. Das bedeutet, daß solche Testverfahren auf diese Untersuchung nicht anwendbar sind, da es sich hier um eine Einzelfallstudie handelt. Sie kann durch die Art der Untersuchung die Kriterien epidemiologischer Studien von sich aus nicht erfüllen. Trotzdem sollen hier eine Testung bei Kenntnis der besonderen Umstände vorgenommen werden.

Bei der Untersuchung handelt es sich um den Vergleich zweier Grundgesamtheiten, die voneinander unabhängig sind. Bei normalverteilten Stichproben bedeutet dies eine Untersuchung mit dem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben. Existiert keine Normalverteilung, so erfolgt eine Testung nach dem U-Test (Mann-Whitney-Wilcoxon-Test). Die Normalverteilung wird nach den Kriterien von Kolmogorov-Smirnov überprüft. Außerdem erfolgte eine Korrelationsanalyse der Meßwerte mit den patientenbezogenen Daten Alter, Erkrankungszeitpunkt, Erkrankungsdauer und Anfallshäufigkeit. Bei binormal verteilten Meßwerten erfolgte dies mit der parametrischen Produktmoment Korrelation, ansonsten fand der Spearman'sche Rang-Korrelationskoeffizient Anwendung.

3. Auswertung

3.1 Nachweis der spezifischen PCR-Produkte

Vor Beginn der molekularbiologischen Untersuchungen zur Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades war die Frage zu klären, ob das amplifizierte PCR-Produkt das zu untersuchende PCR-Produkt repräsentiert. Der Nachweis der Spezifität erfolgte mit untereinheitenspezifischen Endonucleasen (vgl. Kapitel 2.7.2). Getestet wurden für jede der untersuchten Glutamat-Untereinheiten jeweils vier Proben, die willkürlich aus der Kontroll- oder Patientengruppe entnommen wurden. Nachfolgend ist für jede Untereinheit exemplarisch ein Versuch aufgezeigt.

3.1.1 Nachweis der Spezifität für die Untereinheit GluR 2

Für die AMPA-Untereinheit GluR 2 erfolgte der Spezifitätsnachweis mit den Restriktionsendonucleasen Hinf I und Fnu 4H I. Das 231 Basenpaar lange PCR-Produkt wurde in 67

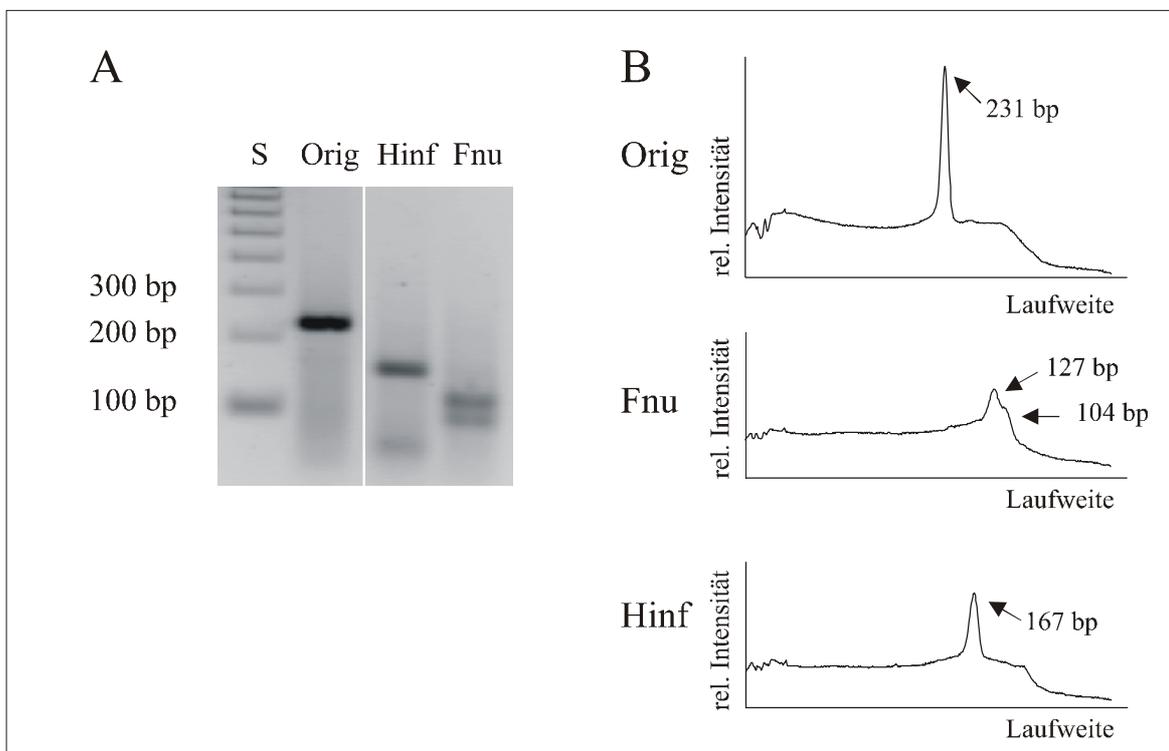


Abbildung 3.1: Nachweis der Spezifität der Primer für die AMPA-Untereinheit GluR 2 mit den Restriktionsendonucleasen Hinf I und Fnu 4H I. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 21 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), Orig = keine Inkubation mit einem Restriktionsenzym (Original-DNA), Hinf = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Hinf I, Fnu = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Fnu 4H I.

und 164 bzw. 127 und 104 lange Teilstränge restringiert. Das ursprüngliche PCR-Produkt wurde dabei vollständig in seine Teilstränge restringiert (vgl. Abbildung 3.1 A und B).

3.1.2 Nachweis der Spezifität für die Untereinheit GluR 5

Die Spezifität für die Kainat-Untereinheit GluR 5 konnte mit der Restriktionsendonuclease Hinf I gezeigt werden. Diese restringiert das 232 Basenpaar lange PCR-Produkt in zwei 59 und 173 Basenpaar lange Teilprodukte. Diese sind in Abbildung 3.2 A wiedergegeben. Auch hier findet sich im Agarosegel kein Nachweis des ursprünglichen, ungeschnittenen PCR-Produktes (vgl. auch Densitogramme in Abb. 3.2 B).

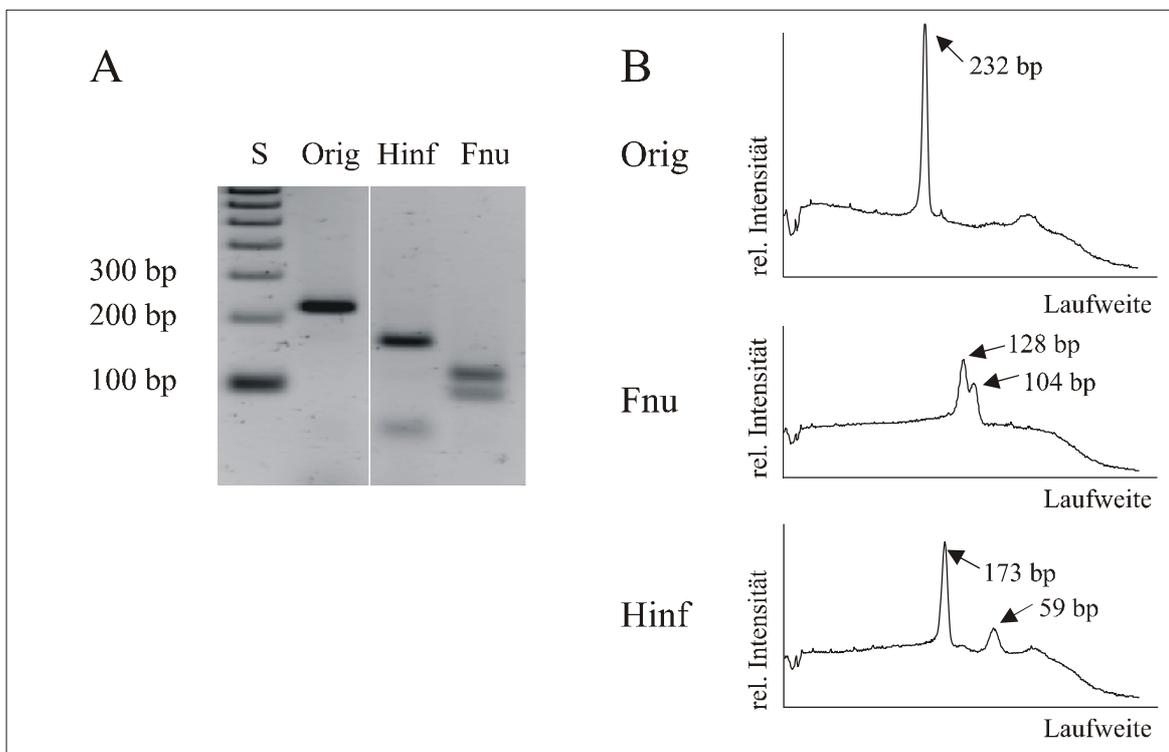


Abbildung 3.2: Nachweis der Spezifität der Primer für die Kainat-Untereinheit GluR 5 mit den Restriktionsendonucleasen Hinf I und Fnu 4H I. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 21 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), Orig = keine Inkubation mit einem Restriktionsenzym (Original-DNA), Hinf = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Hinf I, Fnu = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Fnu 4H I.

3.1.3 Nachweis der Spezifität für die Untereinheit GluR 6

Für die Kainat-Untereinheit GluR 6 wurde zum Nachweis der Spezifität des PCR-Produktes die Restriktionsendonuclease Acc I verwendet. Das 271 Basenpaar lange PCR-Produkt wurde durch Acc I in zwei Teilstränge von 160 und 111 Basenpaaren vollständig geschnitten. Der Nachweis kann aus der Abbildung 3.3 entnommen werden

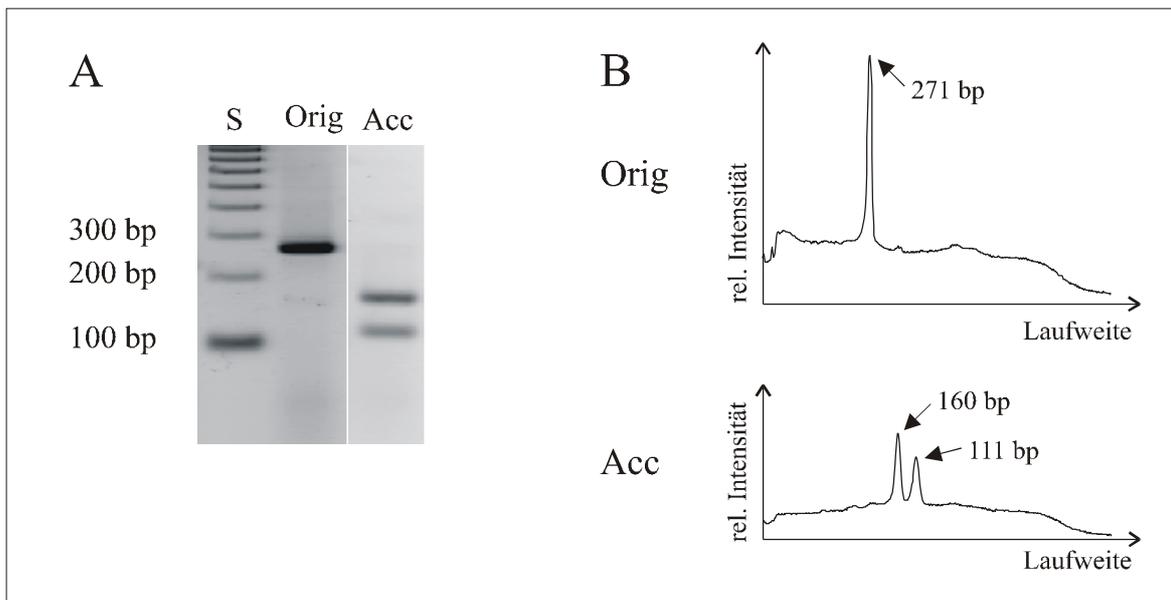


Abbildung 3.3: Nachweis der Spezifität der Primer für die Kainat-Untereinheit GluR 6 mit der Restriktionsendonuclease Acc I. A zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 21 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), B die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), Orig = keine Inkubation mit einem Restriktionsenzym (Original-DNA), Acc = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Acc I.

3.2 Das Untersuchungskollektiv

Das untersuchte Kollektiv setzt sich zusammen aus verstorbenen Patienten der Medizinischen Einrichtungen der Universität Münster, die nach ihrem Tod einer pathologischen Untersuchung zugeführt wurden und im weiteren dem Kontrollkollektiv angehören (vgl. Kap. 2.1), und Patienten, die sich einem epilepsiechirurgischen Eingriff unterzogen haben. Diese Patienten mit einer pharmakoresistenten Epilepsie sind dem Patientenkollektiv zugeordnet.

3.2.1 Kontrollkollektiv

Für das Kontrollkollektiv wurde humanes Hirngewebe vom Pathologischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität zur Verfügung gestellt. Dieses stammt von Patienten, die weder an einer hirngeweblichen Ursache verstorben waren noch eine solche Erkrankung zu ihren Lebzeiten besaßen. Zur Bildung des Kontrollkollektives konnte dieses Gewebe heran gezogen werden (vgl. Kap. 2.1). Es handelt sich um sieben männliche und vier weibliche Personen, im Alter zwischen 22 und 72 Jahren. Das postmortale Intervall betrug zwischen sieben und 18 Stunden. Nachfolgend sind in Tabelle 3.1 die zur Verfügung gestellten Daten dieser Personen zusammengefaßt.

3.2.2 Patientenkollektiv

Bei dem Patientenkollektiv handelt es sich, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, um Personen, die sich aufgrund ihrer pharmakoresistenten Epilepsie einem neurochirurgischen Eingriff unterzogen haben. Vor dem Eingriff wurden mit einem standardisierten Fragebogen Daten zu der Erkrankung und der Person erhoben. Diese Daten lagen für diese Arbeit jedoch nur für 22 der untersuchten 24 Geweben vollständig vor. Von einem Patienten waren keine Daten mehr eruierbar. Bei den 23 Patienten handelt es sich um zehn männliche und 13 weibliche Personen im Alter zwischen 2 7/12 und 58 Jahren. Vier Patienten sind zum Operationszeitpunkt jünger als zehn Jahre, weitere sieben Patienten jünger als 20 Jahre. Die Krankheitsdauer lag zwischen 2 7/12 und 40 Jahren bei unterschiedlichster pharmakologischer Therapie. Fast alle Patienten wiesen in der Morphologie eine Hippocampus- bzw. Temporallappensklerose auf. Die einzelnen Daten sind in Tabelle 3.2 zusammengefaßt.

Legende zu den Tabellen 3.1 und 3.2 auf den Seiten 45 bis 47:

Tabelle 3.1: *Aufstellung wichtiger Daten des Kontrollkollektives. Dargestellt sind die laufende Untersuchungsnummer A_i ($i = 1$ bis 11), das Alter und Geschlecht, das postmortale Intervall, die Todesursache und das zur Verfügung stehende Gewebe.*

Tabelle 3.2: *Übersicht der verschiedenen Parameter des untersuchten Patientenkollektives. Dargestellt sind die laufende Untersuchungsnummer (Pat-Nr.), die fortlaufende Resektatsnummer (Res.-Nr.), das Gewebe (HC = Hippocampus, NC = temporaler Neocortex), das Geschlecht (m = männlich, w = weiblich), das Patientenalter, die Anfallsformen (CPS = komplex-fokaler Anfall, GTCS = generalisierter tonisch-klonischer Anfall, PSM = psychomotorischer Anfall, SGTC = sekundär generalisierter tonisch-klonischer Anfall, TS = tonischer Anfall), die Anfallshäufigkeit, die Krankheitsdauer in Jahren, eine (+) bzw. keine (-) nachgewiesene Ammonshornsklerose (AHS) sowie die pathologische Befunde in der Histologie und der Bildgebung (fron. = frontal, temp. = temporal, lat. = lateral, mes. = mesial, zyst. = zystisch, Hypometabol. = Hypometabolismus).*

Nr.	Alter [Jahren]	Geschlecht	postmortales Intervall [Std.]	Todesursache	Gewebe
A1	59	männlich	8	Herzinfarkt	Hippocampus
A2	69	weiblich	10	Mammacarcinom	Hippocampus
A3	58	männlich	16	Herzinfarkt	temporaler Neocortex
A4	57	männlich	7	DCM ¹	temporaler Neocortex
A5	62	weiblich	15	Herzinfarkt	Hippocampus
A6	55	weiblich	16	Herzinfarkt	Hippocampus / temporaler Neocortex
A7	57	weiblich	12	Mammacarcinom	Hippocampus / temporaler Neocortex
A8	53	männlich	8	Lungenembolie	Hippocampus / temporaler Neocortex
A9	72	männlich	12	Endokarditis	temporaler Neocortex
A10	22	männlich	16	Lungenembolie	Hippocampus / temporaler Neocortex
A11	32	männlich	18	akute Pankreatitis	Hippocampus / temporaler Neocortex

Tabelle 3.1: Aufstellung wichtiger Daten des Kontrollkollektives

¹: DCM: Dilatative Kardiomyopathie

Pat.-Nr.	Res.-Nr.	Gewebe	Geschl.	Alter [Jahren]	Anfallsform	Anfallsfrequenz	Krankheitsdauer [Jahren]	Pathologie	AHS	MRT / CT	PET
1	39	HC	m	19			6		-		
2	50	HC	m	58	PSR, GTCS	1/Woche	7	mes. und lat. globale Sklerose	+	temp. und hippocampale Atrophie	
3	62	NC	m	7	CPS Absence	60/Monat	5	fokale Dysplasie Gangliozytom	+	Dysplasie	lat. Hypometabolismus
4	64	NC	w	18	CPS, SGTCs Absence	6/Monat	8	Astrozytose	+	mes. Atrophie	mes. und lat. Hypometabol.
5	67	NC	m	25	CPS, Aura	12/Monat	11	(Faser)gliose Astrozytose	+	mes. Atrophie	
6	70	HC	w	17	CPS, SGCTS Aura	10/Monat	13	Astrozytose Gliose	+	mes. Atrophie	mes. und lat. Hypometabol.
7	74	HC, NC	w	40	CS, Aura	5-10/Monat	26	Astrozytose globale Sklerose	+	mes./temp. Atrophie, Sklerose	
8	75	NC	m	35	PSM, GMS	2-10/Monat	31	H-& globale TL Sklerose re		hippocampale Atrophie	mes. und lat. Hypometabol.
9	78	NC	w	39	CPS	8-10/Monat Menstruation	37	Fasergliose, Astrozytose, H-Sklerose	+		
10	79	NC	w	19	CPS	6/Monat	19	fokale Dysplasie Gangliogliom	-	mes. Atrophie	
11	86	HC	w	12	TS, GTCS	165/Monat 4-12/Monat	5	Astrozytose (Faser)Gliose	+	mes. und lat. Atrophie	lat. Hypometabolismus
12	87	HC	w	17	PSM, TCS Aura	15-20/Monat	14	Astrozytose (TL) diffuse Fasergliose	-	hippocampale und fron. Atrophie	

Tabelle 3.2: Übersicht der verschiedenen Parameter des untersuchten Patientenkollektives

Pat.-Nr.	Res.-Nr.	Gewebe	Geschl.	Alter [Jahren]	Anfallsform	Anfallsfrequenz	Krankheitsdauer [Jahren]	Pathologie	AHS	MRT / CT	PET
13	89	HC	w	37	CPS, Aura	6/Monat	4	Gliose (schwer)	+	mes. Atrophie	
14	90	HC	w	32	CPS, Aura	20/Monat	27	Gliose (schwer)	+	mes. Atrophie	
15	91	HC, NC	w	46	SGTCS, Aura PSM	5-10/Monat	40	Fasergliose, globale temp. Sklerose	+		mes. und lat. Hypometabol.
16	92	HC, NC	w	25	GTCS (1x) PSM	3-4/Woche Menstruation	6	Astrozytose Fasergliose	-		mes. und lat. Hypometabol.
17	96	HC, NC	m	6	CPS, TS Aura	75/Monat	5	fokale Dysplasie	+	Dysplasie	
18	98	HC, NC	m	39	CPS	8/Monat	36	Gliose	+	mes. Atrophie	
19	101	HC, NC	w	7	CPS, Aura	1/Monat	5	fokale Dysplasie Gliom	-	zyst. Läsion Harmatom	
20	102	NC	w	36		6-7/Monat	19	Hippocampus- sklerose	+	hippocampale Atrophie	
21	104	NC	m	2,4		20-40/Tag	2,4		-		
22	118	NC	m	40					-		
23	119	NC	m	16		2-3/Tag	10		-		

Tabelle 3.2: Übersicht der verschiedenen Parameter des untersuchten Patientenkollektives

3.3 Ergebnisse

Die Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades bei den Glutamat-Rezeptoruntereinheiten GluR 2, GluR 5 und GluR 6 erfolgte über die Ermittlung des Grades der Nichteditierung mit Hilfe der Endonuclease Bbv I. Bei ergänzenden Untersuchungen, insbesondere bei der AMPA-Untereinheit GluR 2, wurde der Editierungsgrad direkt mit Hilfe der Endonuclease Aci I ermittelt. Die nachfolgend aufgeführten Daten stellen jeweils eine Gesamtmittelung der gemessenen Werte dar. Dies gilt, soweit nicht anders angegeben, unabhängig von dem zugrunde liegenden Verfahrensweg. Die jeweiligen personen- bzw. patientenbezogenen Q/R-Editierungsgrade sind am Ende dieses Kapitels aufgeführt.

3.3.1 AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR 2

3.3.1.1 Hippocampus

Die Q/R-Editierung für die Untereinheit GluR 2 zeigte zwischen dem Kontroll- und Patientenkollektiv keine Unterschiede. Die Untersuchungen wurden beim Kontrollkollektiv anhand von sechs Geweben (A1, A2, A5-A8) durchgeführt. Darunter befanden sich zwei männliche (A1, A8) und vier weibliche Personen mit einem Alterszeitraum von 53 bis 69 Jahren. In der Analyse mit der Endonuclease Bbv I konnte in diesem Kollektiv kein Schnittprodukt festgestellt werden, d.h. es existiert demnach eine nahezu 100 %ige Editierung. Abbildung 3.4 zeigt exemplarisch das Gel (vgl. Abb. 3.4 A) und die zugehörigen Densitogramme (vgl. Abb. 3.4 B) mit den DNA-Proben der Person A7 für die Untersuchungen am Kontrollkollektiv. Es wird deutlich, insbesondere im Densitogramm, daß kein Schnittprodukt feststellbar ist.

Aus dem Patientenkollektiv wurden 13 Gewebe mit der Restriktionsendonuclease Bbv I analysiert (Nr.: 1, 2, 6, 7, 11-19). In der untersuchten Gruppe waren vier männliche (Nr.: 1, 2, 17, 18) und neun weibliche (Nr.: 6, 7, 11-16, 19) Personen. Das Alter lag zwischen sechs und 58 Jahren. Die Editierung beläuft sich bei allen untersuchten Patienten auf ca. 100 %. Analog zu dem Kontrollkollektiv konnten bei der Restriktionsanalyse der Patienten-DNA keine Schnittprodukte festgestellt werden. Dies zeigt auch Abbildung 3.5, die ein Gel (Abb. 3.5 A) und die entsprechenden Densitogramme (Abb. 3.5 B) des Patienten Nr.11 darstellt. Sie steht stellvertretend für die Untersuchungen am Patientenkollektiv. Von den 13 Patienten des Kollektives zählten zwei (Nr.: 17, 19) zu der

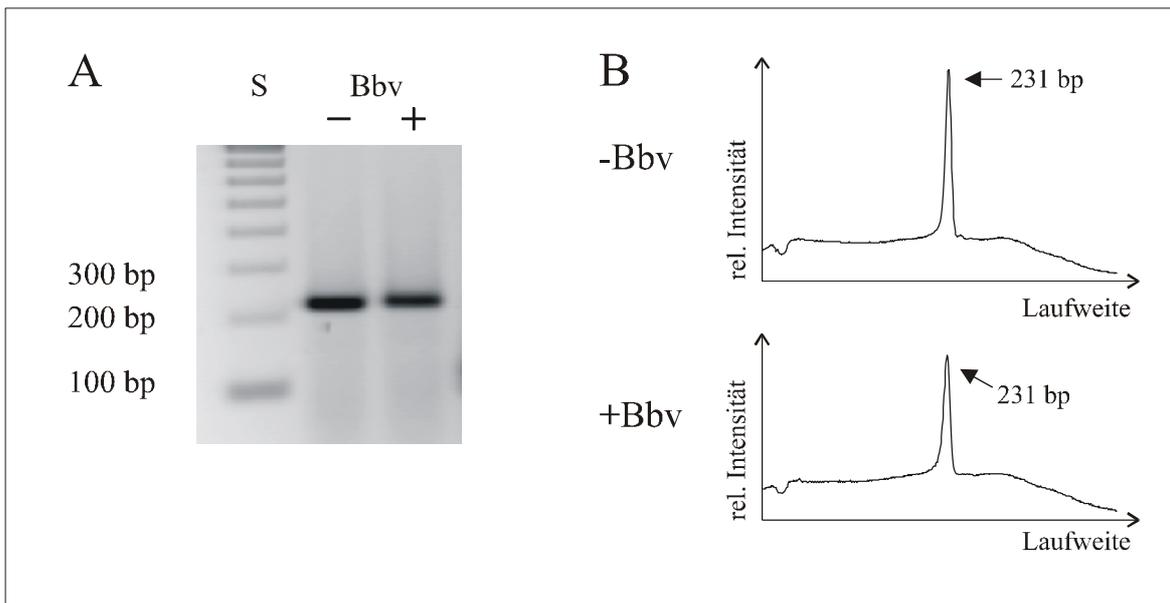


Abbildung 3.4: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die AMPA-Untereinheit GluR 2 für das Kontrollkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall A 7 im Hippocampus (vgl. Tab. 3.1), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), +Bbv = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I.

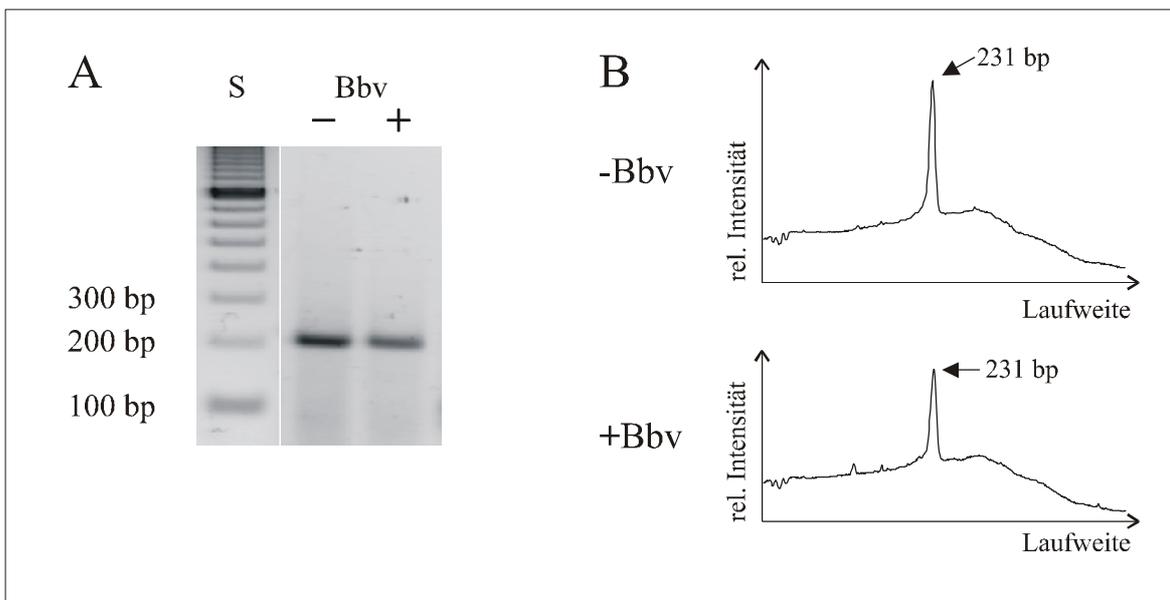


Abbildung 3.5: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die AMPA-Untereinheit GluR 2 für das Patientenkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 11 im Hippocampus (vgl. Tab. 3.2), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), +Bbv = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I.

Gruppe von Kindern (< 10 Jahre), weitere vier (Nr.: 1, 6, 11, 12) Patienten waren Jugendliche (< 20 Jahre) und die übrigen sieben (Nr.: 2, 7, 13-16, 18) zählten zu den Erwachsenen (> 20 Jahre). Davon waren zwei Patienten (Nr.: 2, 15) älter als 40 Jahre. Der Erkrankungszeitpunkt lag zwischen dem ersten und 51. Lebensjahr. Die nahezu 100 %ige Editierung zeigt sich jedoch bei allen Patienten unabhängig vom Alter, der Erkrankungsdauer oder dem Erkrankungszeitpunkt.

Jedoch geben Intensitätsunterschiede zwischen der mit dem Enzym Bbv I behandelten DNA und der Kontroll-DNA Anlaß zu der Vermutung, daß ein geringer Anteil der ursprünglichen DNA durch die Endonuclease restringiert wurde. Verlässliche Aussagen können jedoch nur dann gewonnen werden, wenn gleiche DNA-Mengen auf das Gel aufgetragen wurden und die Grundlinien in den beiden zu untersuchenden Spuren gleich sind. Alternativ kann eine Analyse mit der Restriktionsendonuclease Aci I erfolgen.

Die nahezu 100 %ige Q/R-Editierung für die Rezeptoruntereinheit GluR 2 konnte in der Parallelanalyse mit der Restriktionsendonuclease Aci I nicht verifiziert werden. Hier zeigten die Ergebnisse im Durchschnitt einen Editierungsgrad von 95 % für das Kontroll- und Patientenkollektiv. In Abbildung 3.6 wird deutlich, daß nach Inkubation mit Aci I ein minimaler Anteil des ursprünglichen PCR-Produktes nicht restringiert wurde. Dieser Anteil liegt in beiden Kollektiven im Durchschnitt bei fünf Prozent. Die parallele Spur (vgl. Abb.3.6 A) zeigt zusätzlich eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym Bbv I. Man erkennt kein Vorliegen eines Schnittproduktes. Diese Differenz beruht darauf, daß der geringe Anteil von fünf Prozent bei einer Analyse mit dem Enzym Bbv I nochmals geteilt würde. Nach Gleichung 2.3 und 2.4 (vgl. Kapitel 2.9.1) ist die Fluoreszenz der DNA-Banden von der Länge der DNA-Produkte abhängig. Es reduziert sich also die jeweilige Fluoreszenz bei Auftrennung in zwei Teilstränge. Die verbliebene Restfluoreszenz ist dann gegenüber der Hintergrundfluoreszenz des Geles nicht mehr auflösbar. Verschiedene Analysen bestätigten, daß bei gleichzeitiger Inkubation mit den Endonucleasen Bbv I und Aci I der ursprüngliche 231 Basenpaar lange DNA-Strang vollständig restringiert wurde (vgl. Abbildung 3.7). Insbesondere im Densitogramm (vgl. Abb. 3.7 B) zeigt sich eine Signalreduktion des ursprünglich 231 Basenpaar langen DNA-Stranges nach Inkubation mit beiden Endonucleasen gegenüber der alleinigen Inkubation mit Aci I. Eine Übersicht der personenspezifischen Q/R-Editierungsgrade sind noch einmal in Abbildung 3.8 A in einem Histogramm zusammengefaßt. Die Tabelle 3.4 (Kapitel 3.3.1.3) führt dann die

Gesamtmittelwerte der Q/R-Editierungsgrade für das hippocampale Gewebe beider Kollektive auf, die zugehörige graphische Darstellung zeigt Abbildung 3.8 B. Eine ausführliche Aufstellung der Meßwerte befindet sich am Ende dieses Kapitels in der Tabelle 3.11.

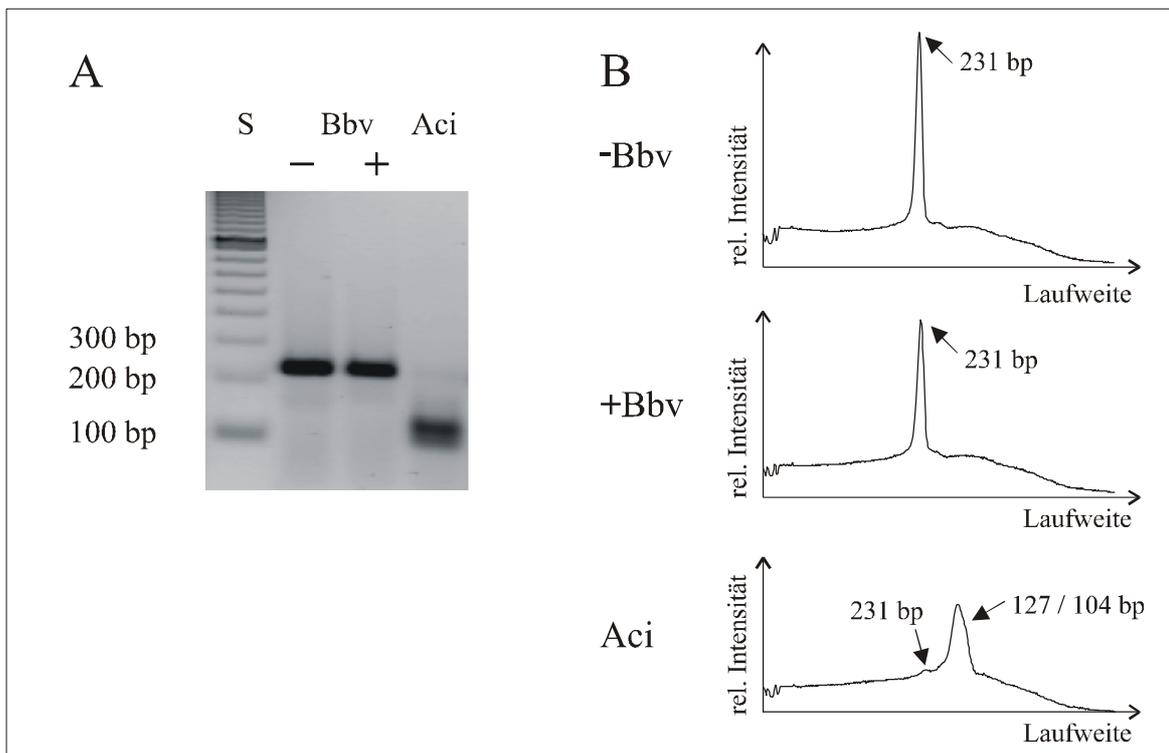


Abbildung 3.6: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die AMPA-Untereinheit GluR 2 mit den Restriktionsendonucleasen Bbv I und Aci I im Vergleich in getrennten Ansätzen. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 3 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), +Bbv = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I, Aci = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Aci I. Im Restriktionsansatz mit Aci I bleiben ca. 5 % der DNA im Bereich von 231 bp nicht restringiert. Im Vergleichsansatz mit Bbv I sind dagegen keine Schnittprodukte bei 139 bp und 92 bp nachweisbar, da sich diese unterhalb der Nachweisgrenze befinden.

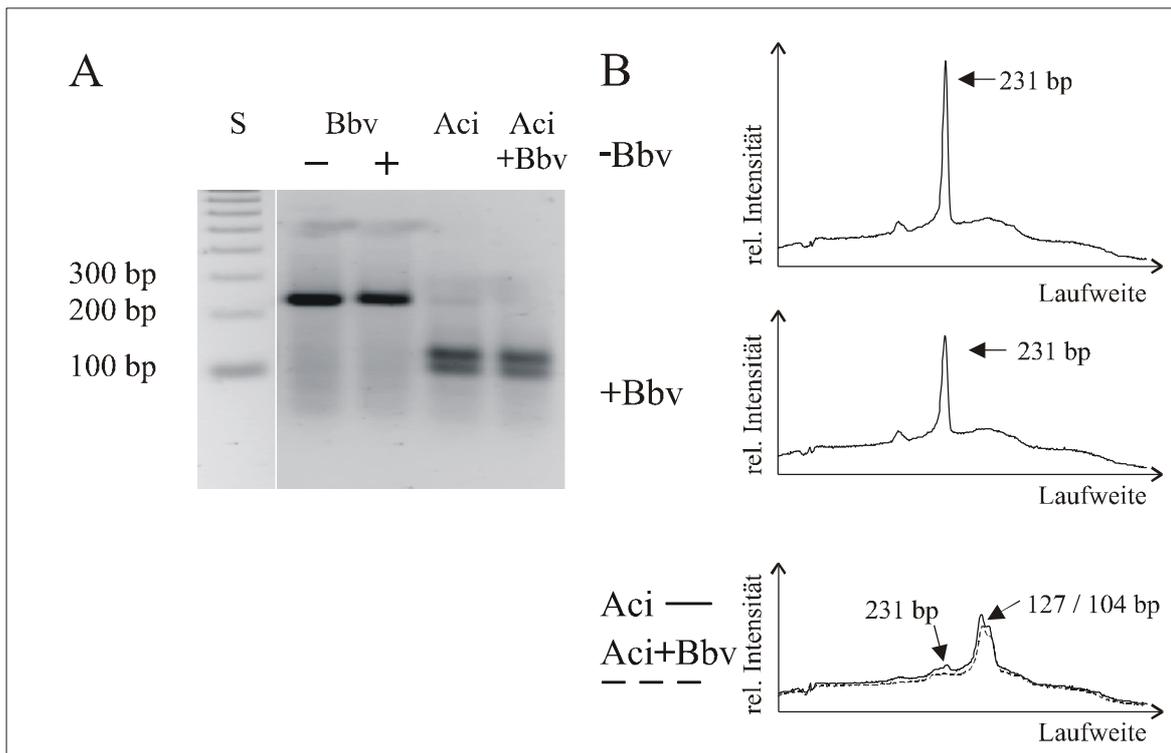


Abbildung 3.7: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die AMPA-Untereinheit GluR 2 mit den Restriktionsendonucleasen Bbv I und Aci I im Vergleich, getrennte (Aci) und gemeinsame (Aci+Bbv) Ansätze. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 7 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), +Bbv = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I, Aci = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Aci I (normale Linie). Im Restriktionsansatz mit Aci I bleiben ca. 5 % der DNA im Bereich von 231 bp nicht restringiert. Im gemeinsamen Ansatz (Aci+Bbv, gestrichelte Linie) ist kein Signal mehr nachweisbar. Das Restsignal im Bereich von 231 bp wurde durch Bbv I restringiert. Im Vergleichsansatz mit Bbv I sind dagegen keine Schnittprodukte im Bereich von 139 bp und 92 bp mehr nachweisbar, da sich diese unterhalb der Nachweisgrenze befinden.

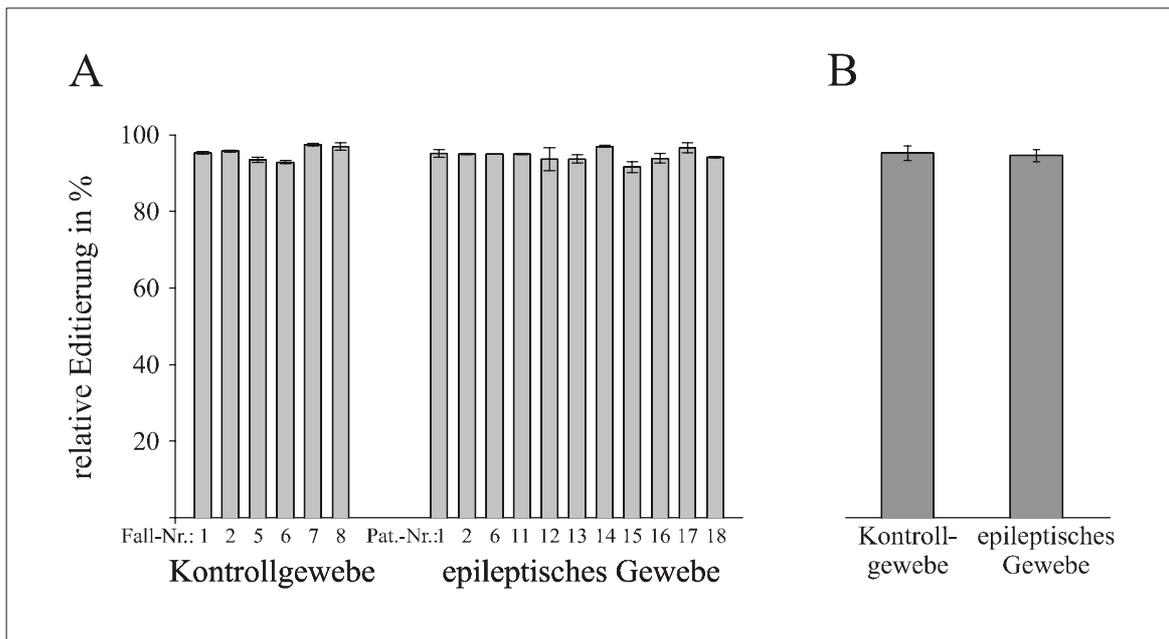


Abbildung 3.8: Übersicht der ermittelten Q/R-Editierungsgrade für die AMPA-Untereinheit GluR 2 im Hippocampus mit der Restriktionsendonuclease Aci I (vgl. Tab. 3.11), angegeben in Prozent. **A** zeigt die bestimmten Mittelwerte für das Kontroll- bzw. für das Patientenkollektiv, **B** stellt den für jedes Kollektiv berechneten Gesamtmittelwert dar. Das Histogramm zeigt in der Ordinate die relative Editierung der jeweiligen Person mit den entsprechenden Standardabweichungen, auf der Abszisse sind die jeweiligen Personen aufgetragen (vgl. Tab. 3.1 und 3.2).

3.3.1.2 Temporaler Neocortex

Für die Analysen zur AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR 2 am Temporallappen wurden nach den Ergebnissen am Hippocampus mit der Restriktionsendonuclease Bbv I sechs Gewebe aus dem Kontrollkollektiv und sieben Gewebe aus dem Patientenkollektiv ausgewählt. Es ergaben sich zwischen dem Kontroll- und Patientenkollektiv, wie am Hippocampus, keine Unterschiede in der Q/R-Editierung. Nach der Restriktionsanalyse mit dem Enzym Bbv I zeigten sich keine DNA-Schnittprodukte (vgl. Abbildung 3.9), welches eine 100 %ige Editierung bedeutet. Diese Aussage stützt sich beim Kontrollkollektiv auf die Gewebe (A3, A4, A6-A9). Dabei handelt es sich um vier männliche (A3, A4, A8, A9) und zwei weibliche (A6, A7) Personen im Alter von 53 bis 58 Jahren.

Aus dem Patientenkollektiv wurden dafür zehn (Nr.: 3, 4, 7, 8, 10, 19, 21, 22, 23, 24) Q/R-Editierungsdaten erhoben. Von einem Patienten (Nr. 24) waren keine personenbezogenen Daten mehr eruiert. Bei den übrigen sechs Patienten handelt es sich um fünf männliche

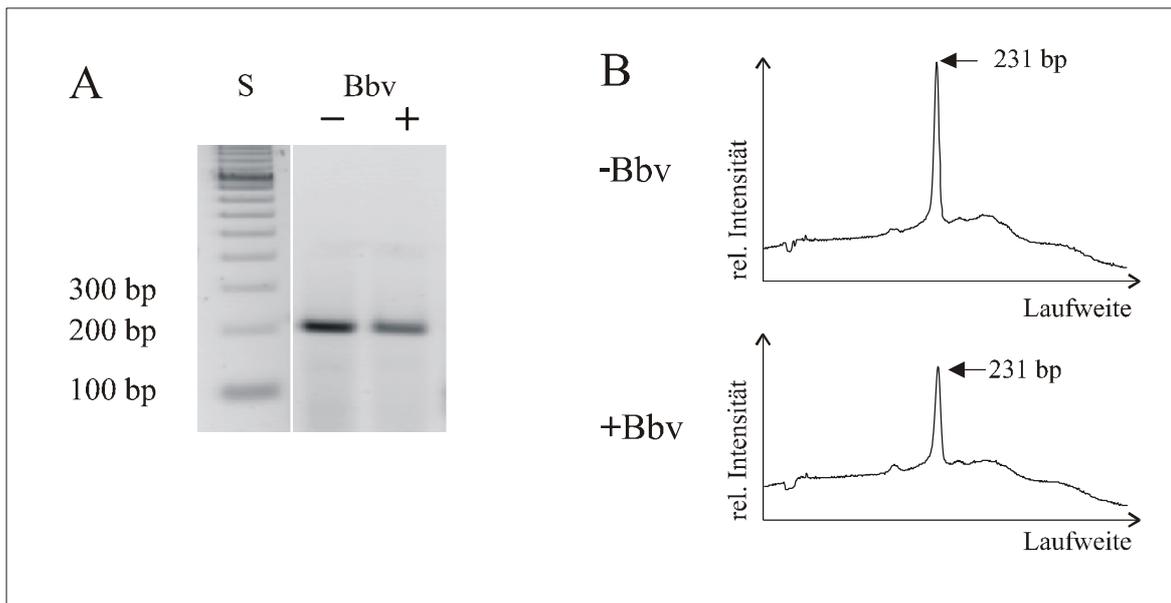


Abbildung 3.9: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die AMPA-Untereinheit GluR 2 für das Kontrollkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall A 7 im Neocortex (vgl. Tab. 3.1), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), +Bbv = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I.

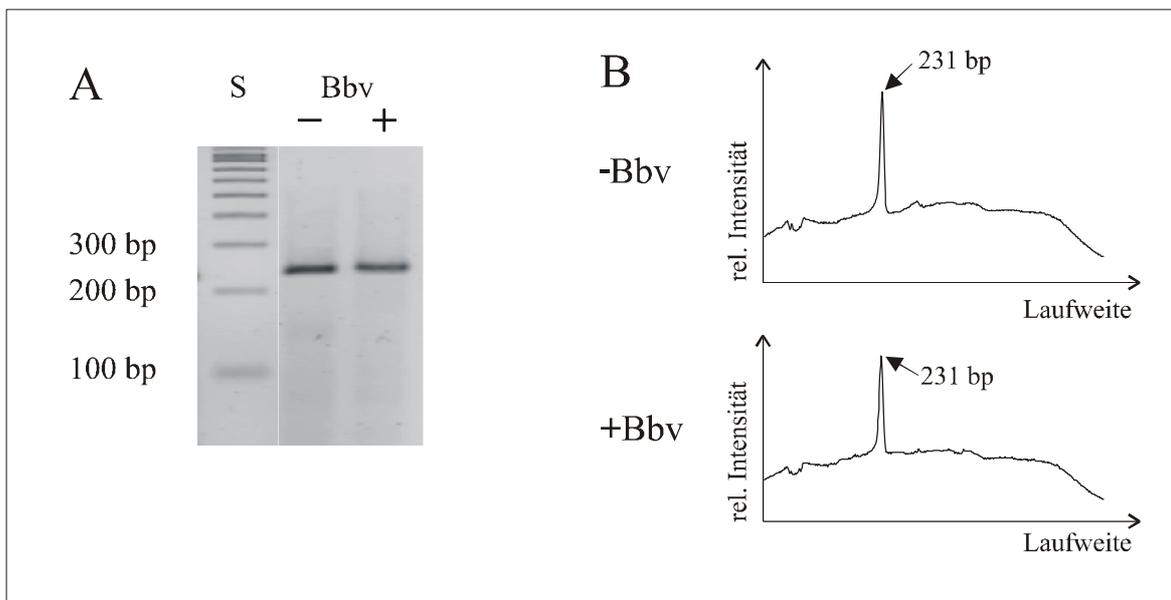


Abbildung 3.10: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die AMPA-Untereinheit GluR 2 für das Patientenkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 3 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), +Bbv = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I.

(Nr.: 3, 8, 21 - 23) und vier weibliche (Nr.: 4, 7, 10, 19) Personen im Alter zwischen 27/12 und 40 Jahren. Darunter befanden sich drei Kinder (Nr.: 3, 19, 21), drei Jugendliche bis 20 Jahren (Nr.: 4, 10, 23) und drei Erwachsene oberhalb des 35. Lebensjahres (Nr.: 7, 8, 22). Auch hier zeigt sich eine nahezu 100%ige Editierung, die unabhängig von den patientenspezifischen Eigenschaften festgestellt werden konnte. Abbildung 3.10 A stellt noch einmal ein entsprechendes Gel aus dieser Versuchsreihe dar.

In Analogie zu den Untersuchungen der AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR 2 am Hippocampus wurden am Temporallappen ebenfalls Analysen mit der Restriktionsendonuclease Aci I durchgeführt. Auch hier bestätigte sich das bisherige Ergebnis, daß zwischen dem Kontroll- und dem Patientenkollektiv kein Unterschied in den Q/R-Editierungsgraden festzustellen ist. Ebenso konnte gezeigt werden, daß die Editierung nicht vollständig ist, sondern sich lediglich auf ca. 97% bezieht (vgl. Kapitel 3.3.1.1). Die mit der Endonuclease Aci I ermittelten Q/R-Editierungsgrade sind in Abbildung 3.11 A als Histogramm personenabhängig dargestellt. Die Mittelwerte der Kollektive sind in Abbildungsteil B dargestellt. Alle detaillierten Meßwerte sind in der Tabelle 3.12 am Kapitelende aufgelistet.

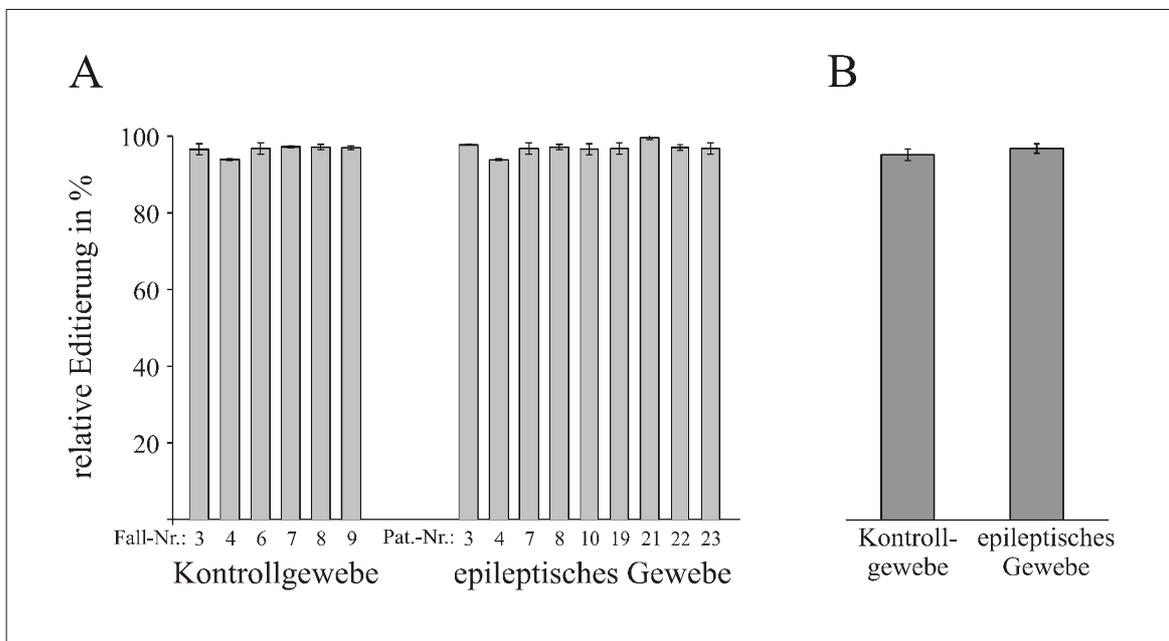


Abbildung 3.11: Übersicht der ermittelten Q/R-Editierungsgrade für die AMPA-Untereinheit GluR 2 im Neocortex mit der Restriktionsendonuclease Aci I (vgl. Tab. 3.12), angegeben in Prozent. **A** zeigt die bestimmten Mittelwerte für das Kontroll- bzw. für das Patientenkollektiv, **B** stellt den für jedes Kollektiv berechneten Gesamtmittelwert dar. Das Histogramm zeigt in der Ordinate die relative Editierung der jeweiligen Person mit den entsprechenden Standardabweichungen, auf der Abszisse sind die jeweiligen Personen aufgetragen (vgl. Tab. 3.1 und 3.2).

3.3.1.3 Zusammenfassung

Für die AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR 2 konnte zwischen dem Kontroll- und Patientenkollektiv kein Unterschied in den Q/R-Editierungsgraden festgestellt werden. Dies gilt sowohl für den Hippocampus als auch für das temporale neocorticale Gewebe. Die Auswertungen zeigen einen Editierungsgrad von ca. 100 % in der Analyse mit der Endonuclease Bbv I (vgl. Tabelle 3.3).

Gewebe	Anzahl der Geweben	Editierungsgrad [%]
Kontrollkollektiv		
Hippocampus	6	100
Temporallappen	5	100
Patientenkollektiv		
Hippocampus	13	100
Temporallappen	9	100

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptoruntereinheit GluR 2 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Bbv I.

Gewebe	Meßwertanzahl n	Mittelwert \bar{x} [%]	Median \tilde{x} [%]	Standardabw.[1]
Kontrollkollektiv				
Hippocampus	6	95	95	1,66
Temporallappen	6	97	97	1,96
Patientenkollektiv				
Hippocampus	13	95	95	1,42
Temporallappen	9	98	98	1,10

Tabelle 3.4 : Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptoruntereinheit GluR 2 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Aci I. Dargestellt sind neben der Anzahl der gemessenen Personen, der Mittelwert und Median in Prozent sowie die Standardabweichung (Standardabw.) des Mittelwertes.

Diese komplette Editierung wurde unter der Analyse mit der Restriktionsendonuclease Aci I nicht verifiziert. Hier zeigt sich ein Editierungsanteil von ungefähr 95 % bis 97 %. Dies gilt jedoch wieder für beide Kollektive (vgl. Tabelle 3.4), so daß sich in der Gesamtaussage kein Widerspruch ergibt.

3.3.2 Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 5

3.3.2.1 Hippocampus

Für die Untersuchung des Q/R-Editierungsgrades bei der Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 5 wurden für den Hippocampus acht Gewebe (A1, A2, A5-A8, A10, A11) aus dem Kontrollkollektiv untersucht. Davon waren vier Personen männlichen Geschlechtes (A1, A8, A10, A11) und vier Personen weiblichen Geschlechts. Das Alter lag zwischen 22 und 69 Jahren. Der Q/R-Editierungsgrad liegt zwischen 46 % und 78 %, der Durchschnitt \bar{x} bei 61 % und der Median \tilde{x} bei 60 %. Zwischen dem Editierungsgrad und den personenbezogenen Daten, wie Alter, Geschlecht, postmortales Intervall usw., lassen sich hinsichtlich dieser Werte keine Korrelationen erkennen. Die Bestimmung des Editierungsgrades erfolgte mittels densitometrischer Auswertung (vgl. Kapitel 2.9, Abb. 2.10) und ist in Abbildung 3.12 beispielhaft für den Anteil der Rezeptoruntereinheit GluR 5 im hippocampalen Gewebe des Kontrollkollektives gezeigt. Die einzelnen Daten der Personen sind in Tabelle 3.13 am Kapitelende zusammengefaßt.

Aus dem Patientenkollektiv wurden 11 Gewebe (Nr.: 1, 2, 6, 11-16, 18, 19) untersucht. Diese stammen von acht weiblichen (Nr.: 6, 11-16, 19) und drei männlichen Patienten, im Alter zwischen sieben und 58 Jahren. Der Operationszeitraum erstreckt sich von September 1996 bis Februar 1998. Der Q/R-Editierungsgrad liegt zwischen 37,5 % und 66 %, unabhängig von Alter und Geschlecht der Patienten. Der Durchschnitt \bar{x} beträgt 54 % und der Median \tilde{x} liegt bei 53 % (vgl. Abb. 3.14 B). Abbildung 3.13 zeigt die Bestimmung des Editierungsgrades aus dem zugehörigen Gel (vgl. Abb. 3.13 A) exemplarisch für den Patienten Nr. 14. Alle erfaßten Meßdaten sind für die einzelnen Patienten in Tabelle 3.13 am Ende des Kapitels aufgeführt.

Die drei männlichen Patienten (Nr.: 1, 2, 18) zeigen sowohl minimale wie auch maximale Werte in der Editierung. Unter den 11 Patienten befanden sich ein Kind (Nr. 19), vier Jugendliche (Nr.: 1, 6, 11, 12) bis zu einem Alter von 20 Jahren und sechs Erwachsene (Nr.: 2, 13-16, 18). Zwei Erwachsene (Nr.: 2, 15) waren älter als 40 Jahre. Drei der vier Ju-

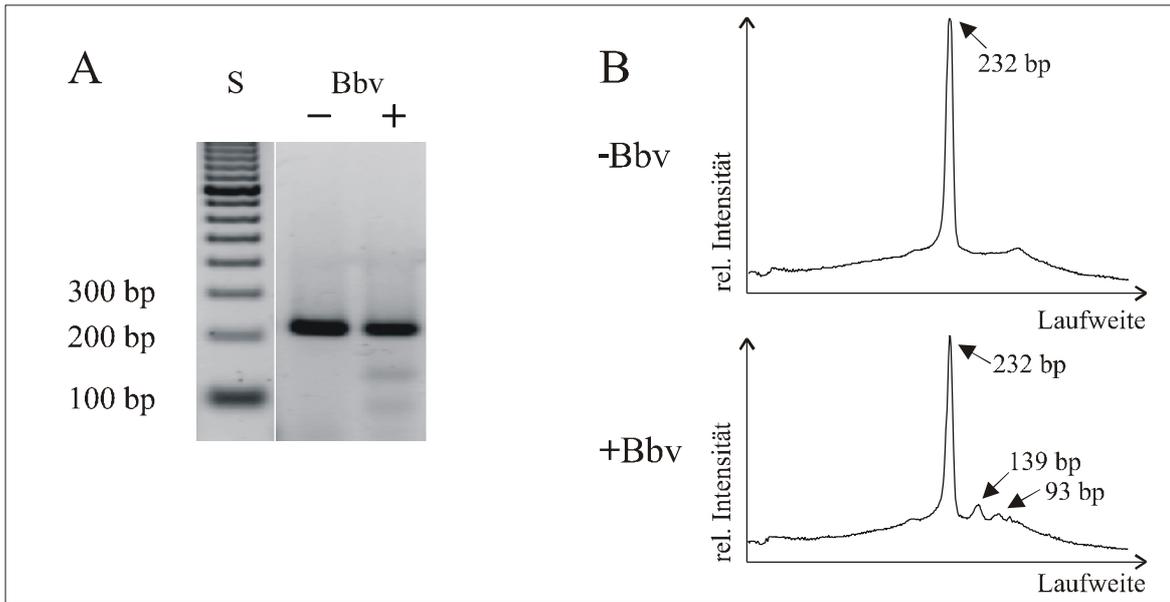


Abbildung 3.12: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 5 für das Kontrollkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall A 6 im Hippocampus (vgl. Tab. 3.1), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), +Bbv = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I.

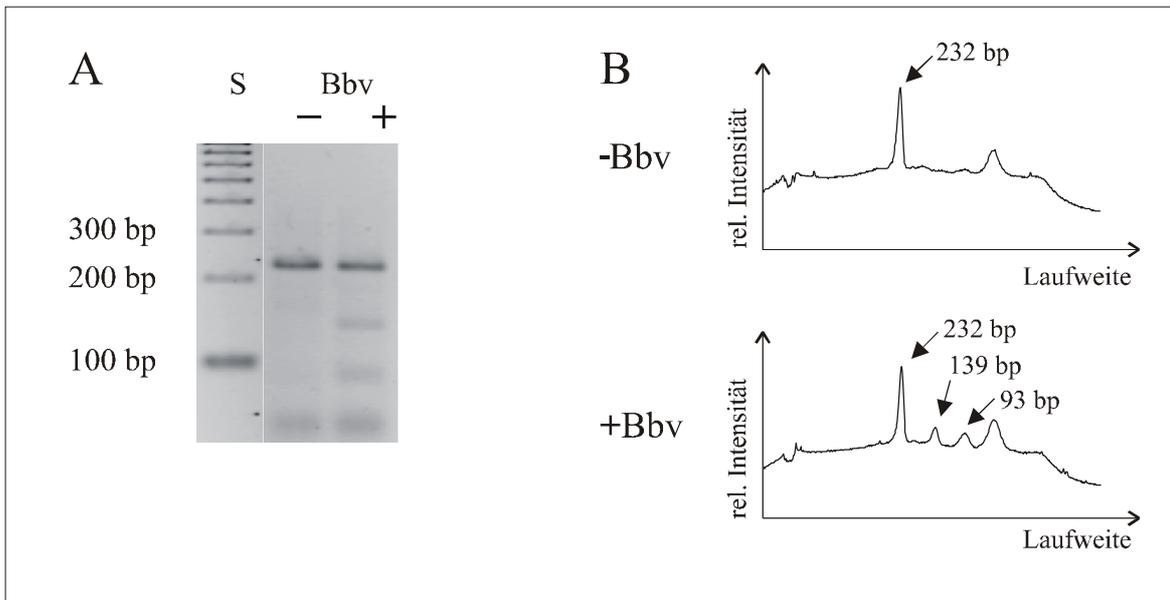


Abbildung 3.13: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 5 für das Patientenkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 14 im Hippocampus (vgl. Tab. 3.2), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), +Bbv = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I.

gendlichen weisen einen hohen Editierungsgrad von 65 % auf. Fünf von sechs Erwachsenen zeigen eine Q/R-Editierung, die zwischen 50 % und 55 % liegt. Jeweils ein Patient aus der Gruppe der 10 bis 20jährigen (Nr. 12) und aus der Gruppe der 20 bis 40jährigen (Nr. 18) weisen eine um 14 % niedrigere Q/R-Editierung auf als der Durchschnitt der übrigen Patienten in diesen Altersstufen. Gleichzeitig zeigt sich bei diesen Patienten, genauso wie bei dem einzigen Kind (Nr. 19), ein mit dem dritten Lebensjahr sehr früher Erkrankungszeitpunkt. Für das Kind in diesem Kollektiv konnte eine Editierung von 44 % ermittelt werden.

Der Erkrankungszeitpunkt der Patienten lag zwischen dem zweiten und 51. Lebensjahr. Für 64 % dieses Kollektives beginnt die Erkrankung vor dem achten Lebensjahr (Nr.: 6, 11, 12, 14, 15, 18, 19), bei zwei Patienten (Nr.: 1, 6) vor dem 20. Lebensjahr, und für weitere zwei Patienten (Nr.: 2, 13) jenseits des 30. Lebensjahres. Die Editierungen weisen für die größte Gruppe, mit Erkrankungsbeginn vor dem achten Lebensjahr, Werte zwischen 37,5 % und 66 % auf.

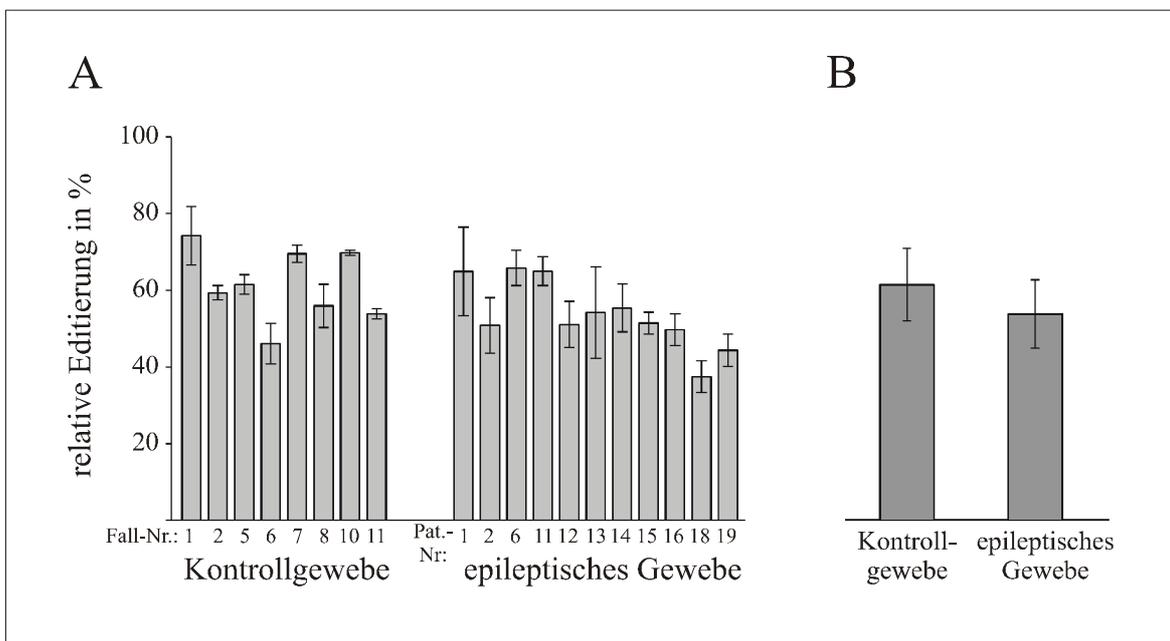


Abbildung 3.14: Übersicht der ermittelten Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 5 im Hippocampus mit der Restriktionsendonuclease Bbv I (vgl. Tab. 3.13), angegeben in Prozent. **A** zeigt die bestimmten Mittelwerte für das Kontroll- bzw. für das Patientenkollektiv, **B** stellt den für jedes Kollektiv berechneten Gesamtmittelwert dar. Das Histogramm zeigt in der Ordinate die relative Editierung der jeweiligen Person mit den entsprechenden Standardabweichungen, auf der Abszisse sind die jeweiligen Personen aufgetragen (vgl. Tab. 3.1 und 3.2).

Alle ermittelten Editierungsgrade im Hippocampus für die Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 5 sind nochmals in Abbildung 3.14 zusammengefasst. Im Histogramm sind neben den Editierungsgraden auch die Standardabweichungen für die jeweiligen Personen aus dem Kontroll- bzw. Patientenkollektiv aufgeführt. Die errechneten Mittelwerte der entsprechenden Kollektive sind als separates Histogramm abgebildet (vgl. Abb. 3.14 B). Alle detaillierten Angaben zu den Messungen sind in Tabelle 3.13 am Kapitelende aufgeführt.

Vergleichsanalysen mit der Restriktionsendonuclease Aci I bestätigten die ermittelten Editierungsgrade für die einzelnen Patienten. Diese Untersuchungen wurden zunächst im direkten Vergleich zu den Analysen mit der Endonuclease Bbv I gemacht. Im weiteren wurden die Gewebe des Kontroll- und Patientenkollektives mindestens einmal einer Analyse mit dem Enzym Aci I analysiert. Abbildung 3.15 zeigt für den Patienten Nr. 3 ein Gel (vgl. Abb. 3.15 A) sowie die zugehörigen Densitogramme (vgl. Abb. 3.15 B) einer kombinierten Analyse mit Hilfe der Enzyme Bbv I und Aci I.

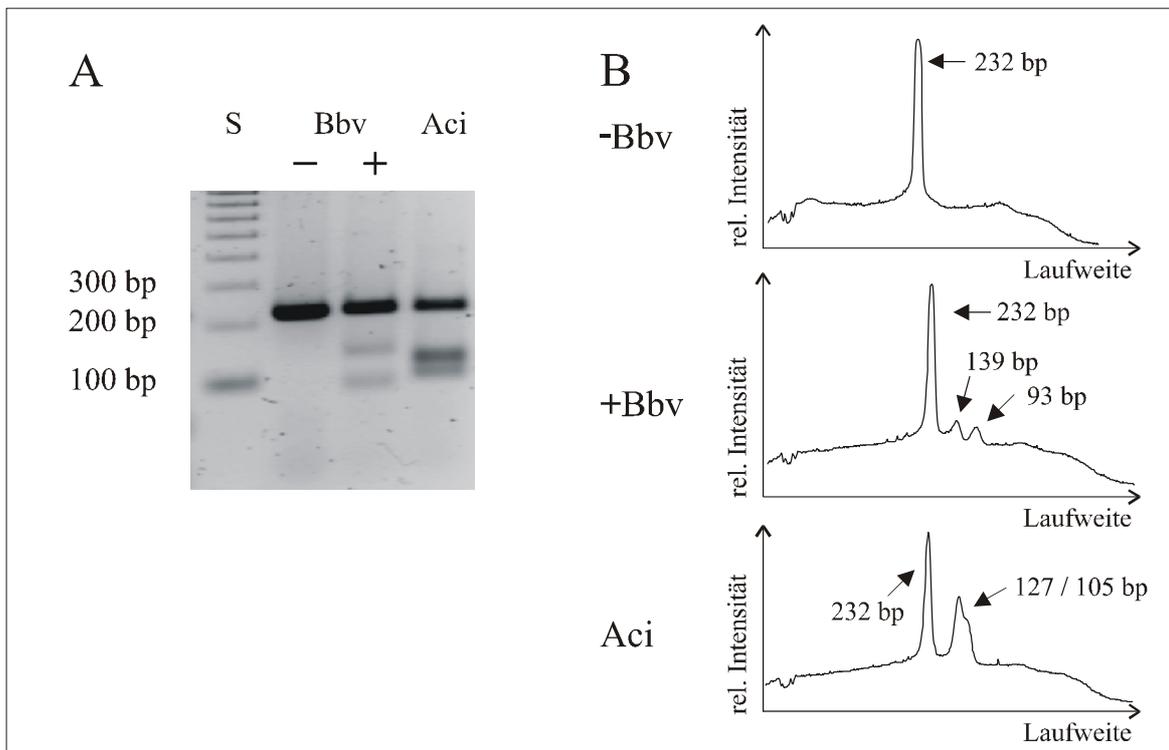


Abbildung 3.15: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 5 mit den Restriktionsendonucleasen Bbv I und Aci I im Vergleich in getrennten Ansätzen. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 3 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), Aci = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Aci I.

3.3.2.2 Temporaler Neocortex

Die Untersuchungen am temporalen Neocortex wurden anhand von acht Geweben des Kontroll- und 13 Geweben des Patientenkollektives durchgeführt. Die Altersspanne des Kontrollkollektives reichte von 22 bis 72 Jahren. Sechs Personen (A3, A4, A8-A11) waren männlichen, zwei Personen (A6, A7) weiblichen Geschlechts. Der Q/R-Editierungsgrad reicht von 38 % bis 61 %, der Mittelwert \bar{x} liegt bei 53 %, der Median \tilde{x} bei 56 % (vgl. Abbildung 3.18). Drei (A4, A6, A10) der acht Personen zeigen eine Editierung von ca. 40 %, die übrigen fünf (A3, A7, A8, A9, A11) weisen Werte von ca. 59 % auf. Auffallend ist, daß bei den Messungen zu den Personen A7 und A8 die Standardabweichungen recht groß sind. Mehrfache unabhängige Kontrollbestimmungen bestätigten die jeweiligen Meßergebnisse. Abbildung 3.16 stellt exemplarisch ein Ergebnis der Untersuchungen für die Person A8 dar, stellvertretend für alle Analysen der Q/R-Editierung der Rezeptoruntereinheit GluR 5 am temporalen Neocortex des Kontrollkollektives. Die übrigen jeweiligen Q/R-Editierungsgrade sind am Kapitelende in Tabelle 3.14 aufgeführt.

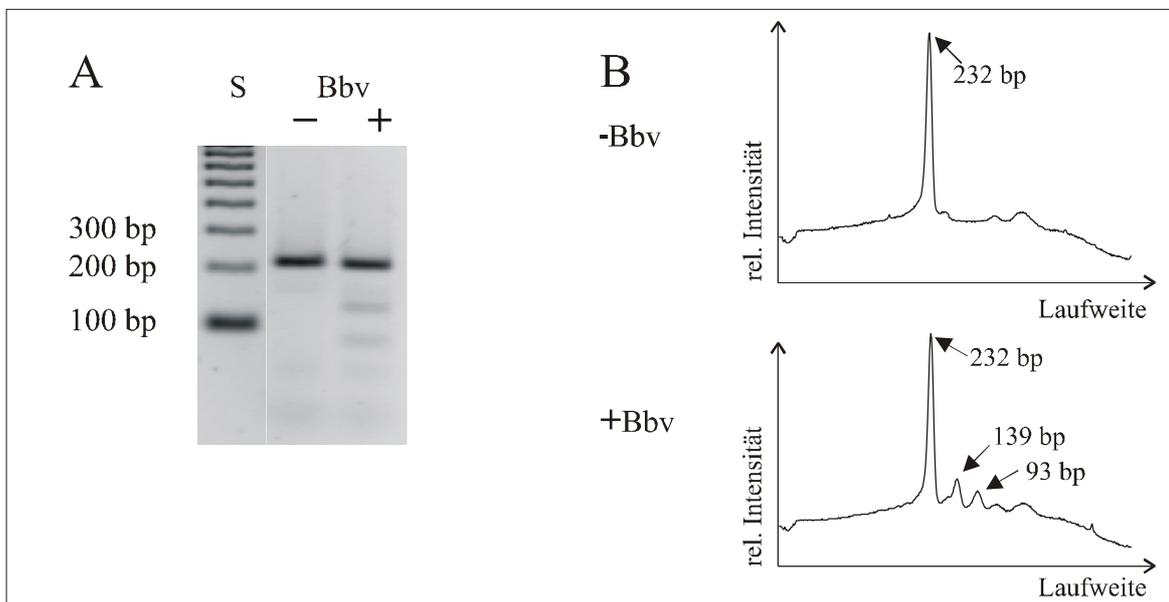


Abbildung 3.16: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 5 für das Kontrollkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall A 8 im Neocortex (vgl. Tab. 3.1), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), +Bbv = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I.

Aus dem Patientenkollektiv wurden für die Untersuchungen am temporalen Neocortex 13 Gewebe (Nr.: 3, 5, 7-9, 15-18, 20-23) ausgesucht. Es handelt sich um acht männliche (Nr.: 3, 5, 8, 17, 18, 21-23) und fünf weibliche (Nr.: 7, 9, 15, 16, 20) Patienten im Alter zwischen 2 7/12 und 46 Jahren. Die Q/R-Editierung umfaßt einen Bereich von 49 % bis 75 %. Der mittlere Wert \bar{x} beträgt 63 %, der Median \tilde{x} 62 % (vgl. Abbildung 3.18). Von den 13 untersuchten Patienten gehören drei (Nr.: 3, 17, 21) zur Gruppe der Kinder (< 10 Jahre), ein Patient (Nr. 23) gehört zu den Jugendlichen (< 20 Jahre) und neun Patienten sind Erwachsene im Alter zwischen 25 und 46 Jahren (Nr.: 5, 7-9, 15, 16, 18, 20, 22). Die Patienten vor dem 20. Lebensjahr zeigen Q/R-Editierungsgrade, die oberhalb des Mittelwertes liegen, bis zu maximal 72 %. Bei drei Patienten (Nr.: 9, 15, 20) konnte ein Editierungsgrad von nur ca. 50 % nachgewiesen werden. All diese Patienten zeichnen sich durch ein höheres Lebensalter (> 36 Jahre) aus. Allerdings zeigen gleich viele Patienten (Nr. 8, 18, 22) im Alter zwischen 35 und 40 Jahren hohe Q/R-Editierungsgrade von 60 % bis 70 %.

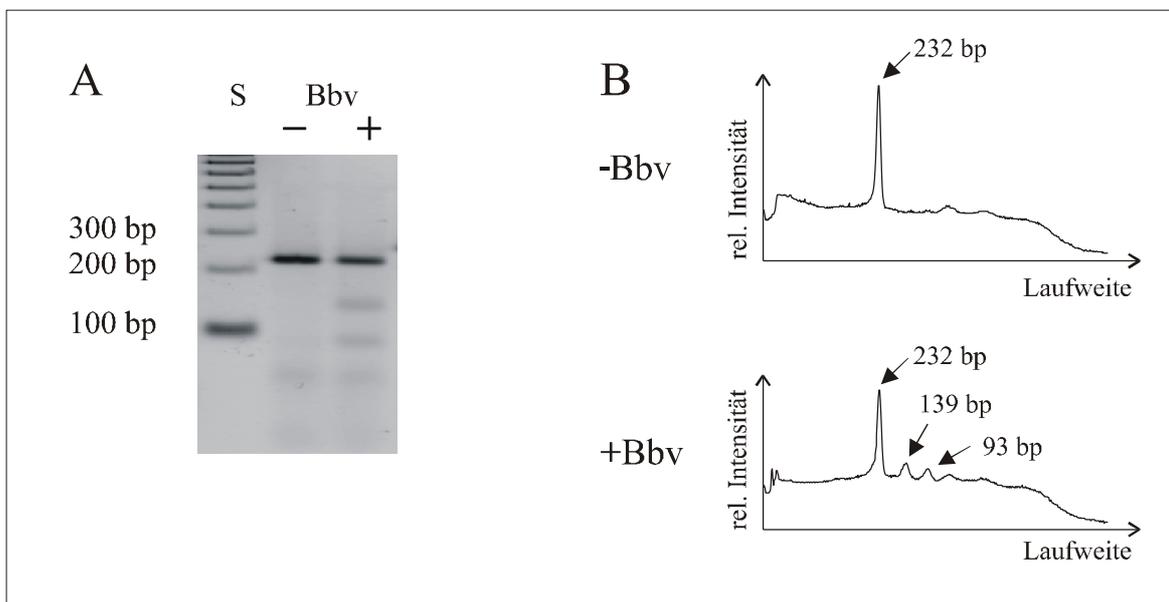


Abbildung 3.17: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 5 für das Patientenkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 17 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), +Bbv = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I.

Der Erkrankungsbeginn liegt in diesem Kollektiv vor dem 20. Lebensjahr, davon bei acht Patienten (Nr.: 3, 8, 9, 15, 17, 18, 21, 23) vor dem siebten Lebensjahr. Stellvertretend für die Untersuchungen am Patientenkollektiv ist in Abbildung 3.17 ein Gel (vgl. Abb. 3.17 A) mit den zugehörigen Densitogrammen (vgl. Abb. 3.17 B) von dem Patienten 17 dargestellt. Die übrigen patientenbezogenen Q/R-Editierungsgrade sind in Tabelle 3.14 zusammengefaßt.

Die Daten der Q/R-Editierung sind in Abbildung 3.18 nochmals dargestellt. Im Histogramm sind die relativen Editierungsgrade (Ordinate) und die Standardabweichungen der jeweiligen Personen beider Kollektive aufgeführt. Die Mittelwerte über die untersuchten Kollektive sind als eigenes Histogramm abgebildet (vgl. Abb. 18 B).

3.3.2.3 Zusammenfassung

Zusammengefaßt stellen sich die Ergebnisse der Editierung für die Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 5 wie folgt dar (vgl. Tabelle 3.5): Im Hippocampus reduziert sich die

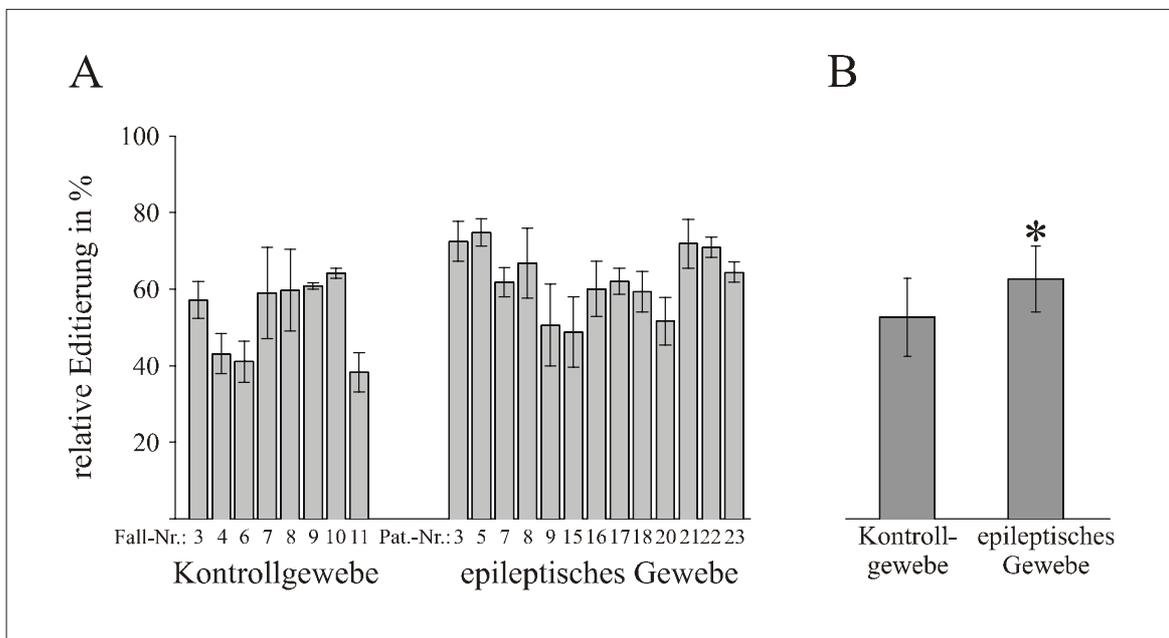


Abbildung 3.18: Übersicht der ermittelten Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Unter-einheit GluR 5 im Neocortex mit der Restriktionsendonuclease Bbv I (vgl. Tab. 3.14), angegeben in Prozent. **A** zeigt die bestimmten Mittelwerte für das Kontroll- bzw. für das Patientenkollektiv, **B** stellt den für jedes Kollektiv berechneten Gesamtmittelwert dar. Der Stern bedeutet eine signifikante Differenz in den Q/R-Editierungsgraden. Das Histogramm zeigt in der Ordinate die relative Editierung der jeweiligen Person mit den entsprechenden Standardabweichungen, auf der Abszisse sind die jeweiligen Personen aufgetragen (vgl. Tab. 3.1 und 3.2).

Editierung von 61 % auf 54 %. Dies entspricht einem Rückgang auf 89 % gegenüber dem Kontrollkollektiv (100 %). Im Gegensatz dazu nimmt der Q/R-Editierungsgrad im Patientenkollektiv für den Temporallappen von 53 % auf 63 % zu. Dies bedeutet ein Anstieg auf 119 % relativ zum Kontrollkollektiv. Detaillierte Angaben aller untersuchten Personen befinden sich in den Tabellen 3.13 und 3.14 am Ende des Kapitels.

Gewebe	Meßwertanzahl n	Mittelwert \bar{x} [%]	Median \tilde{x} [%]
Kontrollkollektiv			
Hippocampus	8	61	60
Temporallappen	8	53	57
Patientenkollektiv			
Hippocampus	11	54	53
Temporallappen	13	63	62

Table 3.5.: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptoruntereinheit GluR 5 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Bbv I.

3.3.3 Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 6

3.3.3.1 Hippocampus

Die Untersuchungen des Q/R-Editierungsgrades bei der Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 6 wurden für den Hippocampus anhand von acht Geweben (A1, A2, A5-A8, A10, A11) des Kontrollkollektives durchgeführt. Jeweils vier Personen des Kollektives waren männlichen Geschlechts (A1, A8, A10, A11) und weiblichen Geschlechts. Das Alter lag zwischen 22 und 69 Jahren. Der Q/R-Editierungsgrad beträgt ca. 37 % bis 83 %. Mittelwert \bar{x} und Median \tilde{x} berechnen sich zu $\bar{x} = 64$ % bzw. $\tilde{x} = 65$ % (vgl. Abbildung 3.21). Auffallend sind die niedrigen Q/R-Editierungsgrade der Personen A8 und A11 mit ca. 40 %. Die übrigen Meßwerte liegen im Mittel bei 74 %. Auffallend ist auch die relativ große Standardabweichung der Person A6. Das Alter oder das Geschlecht zeigen jedoch keine Korrelation zu den ermittelten Q/R-Editierungen. In Abbildung 3.19 ist exemplarisch

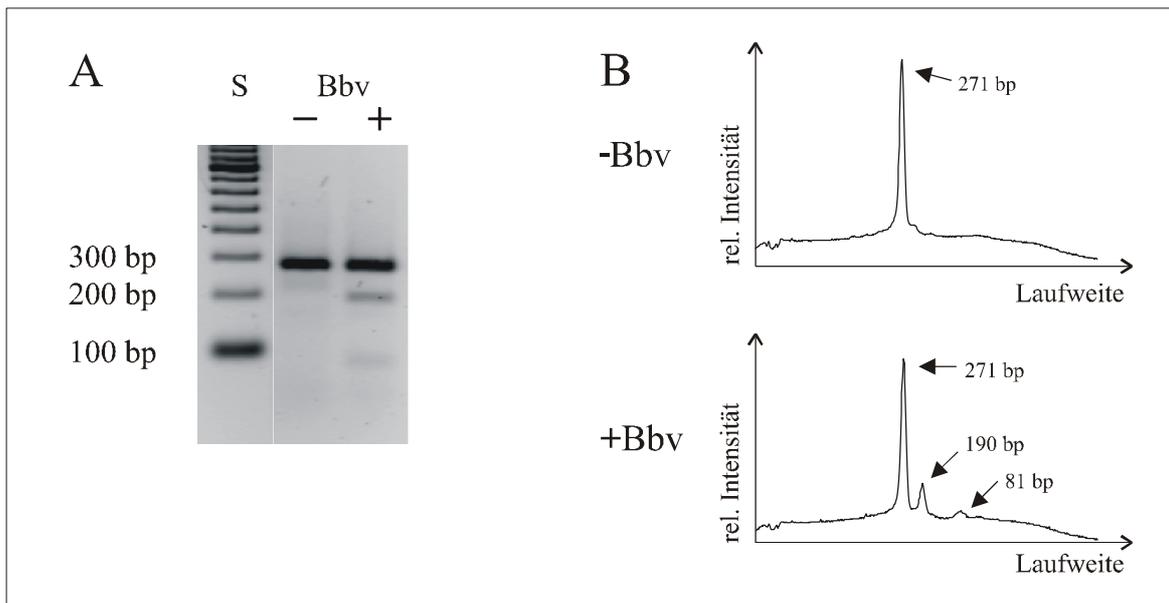


Abbildung 3.19: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 6 für das Kontrollkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall A 2 im Hippocampus (vgl. Tab. 3.1), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), +Bbv = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I.

die Bestimmung des Editierungsgrades für die Person A2 mit Hilfe der densitometrischen Auswertung dargestellt. Die übrigen Daten sind in Tabelle 3.15 am Kapitelende aufgeführt.

Aus dem Patientenkollektiv wurden elf Gewebe (Nr.: 1, 2, 6, 11-16, 18, 19) untersucht. Diese stammen von acht weiblichen (Nr.: 6, 11-16, 19) und drei männlichen Patienten. Der Editierungsgrad liegt zwischen 41 % und 80 %, der Mittelwert \bar{x} beträgt 60 %, der Median \tilde{x} 59 %. Der Operationszeitraum erstreckt sich von September 1996 bis Februar 1998. Das Alter der Patienten lag zwischen 7 und 58 Jahren. Von den zehn untersuchten Geweben stammen fünf (Nr.: 1, 6, 11, 12, 19) von Patienten, die jünger als 20 Jahre waren. Die übrigen sechs sind von Erwachsenen oberhalb des 20. Lebensjahres. Vier Erwachsene (Nr.: 13, 14, 16, 18) waren zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, zwei weitere (Nr.: 2, 15) waren älter als 40 Jahre. Der Editierungsgrad der jugendlichen Patienten (< 20 Jahre) liegt oberhalb des Mittelwertes von 61 % und zwar zwischen 62,5 % und 80 %. Der älteste Patient (Nr. 2) mit 58 Jahren zeigt ebenfalls einen Editierungsgrad von 79 %. Der Q/R-Editierungsgrad der übrigen fünf Erwachsenen liegt zwischen 41 % und 55 %, also unterhalb der Q/R-Editierung des Kontrollkollektives. Bei zwei Patienten (Nr.: 15, 18)

zeigt sich ein Editierungsgrad von 41 %. Diese Patienten weisen einen langen Erkrankungszeitraum von mehr als 36 Jahren auf. Bei einer weiteren Patientin (Nr. 14) mit einer langen Erkrankungszeit von 27 Jahren konnte eine Q/R-Editierung von 50 % festgestellt werden. Diese liegt ebenso unterhalb des Mittelwertes des Patientenkollektives. Auch die Patienten (Nr.: 13, 16) weisen geringe Q/R-Editierungsgrade auf, ohne jedoch über einen langen Erkrankungszeitraum zu verfügen. Insbesondere besitzen sie einen relativ späten Erkrankungszeitpunkt. Auffällig ist auch die monotone Abnahme der Q/R-Editierung bei fortlaufender Patientenaufzählung. Eine Ausnahme bildet das Ergebnis der Patientin (Nr. 16), die einen relativ hohen Q/R-Editierungsgrad aufweist. Diese Monotonie steht aber in keinem Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der jeweiligen Messungen, da die Gewebe mehrfach und zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht worden sind. Ein Ergebnis dieser Analysen ist in Abbildung 3.20 wiedergegeben. Sie stellt ein Gel (vgl. Abb. 3.20 A) mit den DNA-Proben des Patienten Nr.: 12 sowie den entsprechenden Densitogrammen (vgl. Abb. 3.20 B) dar. Die weiteren Q/R-Editierungsgrade sind in Tabelle 3.15 aufgeführt.

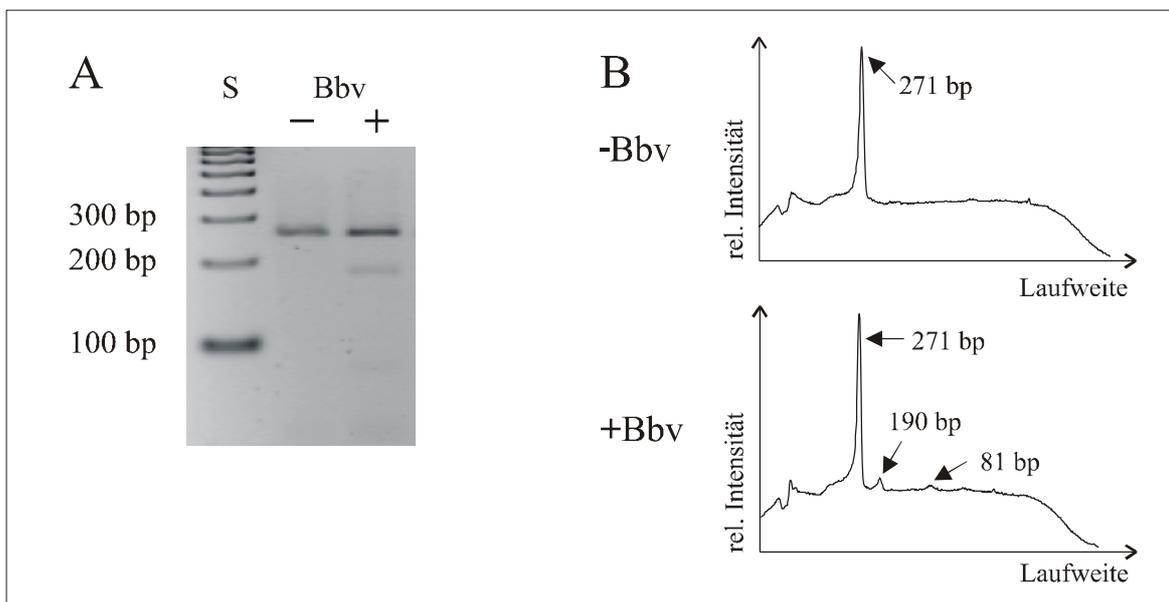


Abbildung 3.20: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 6 für das Patientenkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 12 im Hippocampus (vgl. Tab. 3.2), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), +Bbv = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I.

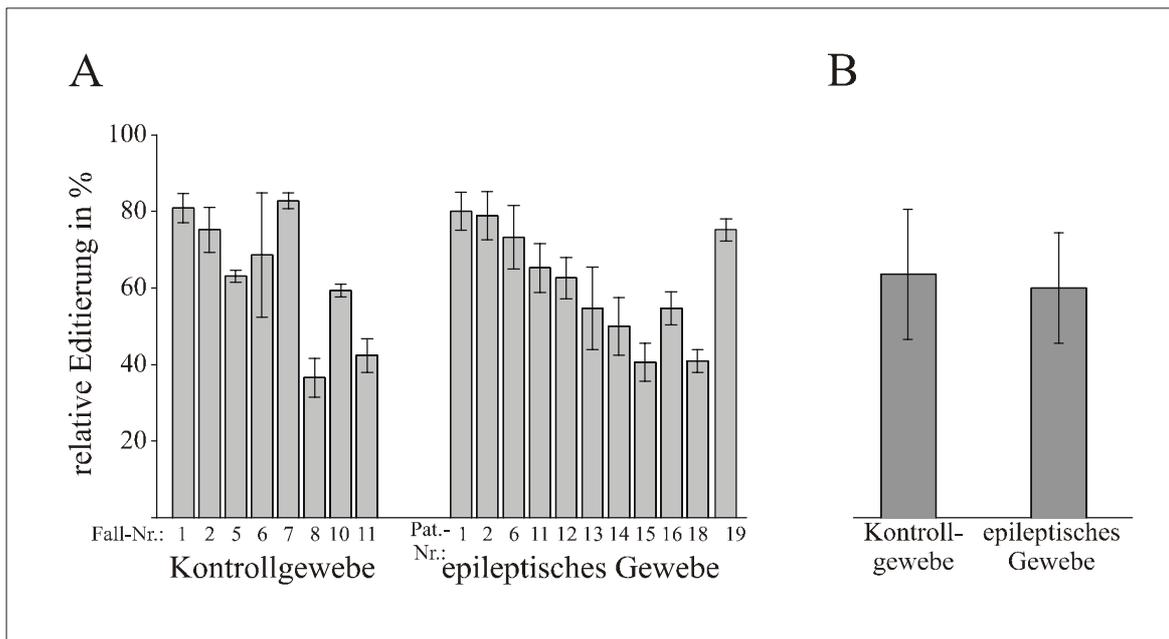


Abbildung 3.21: Übersicht der ermittelten Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 6 im Hippocampus mit der Restriktionsendonuclease Bbv I (vgl. Tab. 3.15), angegeben in Prozent. A zeigt die bestimmten Mittelwerte für das Kontroll- bzw. für das Patientenkollektiv, B stellt den für jedes Kollektiv berechneten Gesamtmittelwert dar. Das Histogramm zeigt in der Ordinate die relative Editierung der jeweiligen Person mit den entsprechenden Standardabweichungen, auf der Abszisse sind die jeweiligen Personen aufgetragen (vgl. Tab. 3.1 und 3.2).

Alle ermittelten Q/R-Editierungsgrade des Kontroll- und Patientenkollektives, sowie die zugehörigen Standardabweichungen, sind nochmals in Abbildung 3.21 in Form eines Histogramms aufgeführt. Die jeweiligen Gesamtmittelwerte der beiden Kollektive sind als weiteres Histogramm eingezeichnet und verdeutlichen die Abweichungen innerhalb des Kollektives, sowie auch gegeneinander.

Eine Analyse mit der Restriktionsendonuclease Aci I wurde für die Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 6 am Hippocampus nur einmal zur Versuchskontrolle durchgeführt. Eine Auswertung war aufgrund der Kombination der erhaltenden Schnittprodukte nicht möglich (vgl. Kapitel 2.7.1). Daher sind diese Ergebnisse hier nicht dokumentiert.

3.3.3.2 Temporaler Neocortex

Zur Analyse des Q/R-Editierungsgrades der Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 6 im Temporallappen wurden sieben Gewebe des Kontroll- und 13 Gewebe aus dem Patientenkollektiv heran gezogen. Zu den sieben Personen aus dem Kontrollkollektiv

gehörten fünf männliche (A3, A4, A8, A10, A11) und zwei weibliche (A6, A7) mit einer Altersspanne von 22 bis 58 Jahren. Der Editierungsgrad liegt zwischen 49 % und 77 %, der Mittelwert \bar{x} beträgt 62 %, der Median \tilde{x} 63 % (vgl. Abbildung 3.24). Die Standardabweichungen des untersuchten Kollektives zeigen Werte von ± 10 %. Drei der fünf Gewebe fallen durch relativ hohe (A7) bzw. niedrige (A6, A10) Q/R-Editierungsgrade auf. Dieses Verhalten bezüglich der Editierung zeigen diese drei Personen auch im Hippocampus sowie für die Rezeptoruntereinheit GluR 5. Die detaillierten Meßergebnisse dieser Untersuchung des Kontrollkollektives sind in Tabelle 3.16 wiedergegeben. Die Abbildung 3.22 zeigt das Gel (vgl. Abb. 3.22 A) und die Densitogramme (vgl. Abb. 3.22 B) für die Person A8 aus dieser Meßreihe.

Die Daten der epilepsiechirurgischen Patienten wurden anhand von 13 Geweben (Nr.: 3, 5, 7-9, 15-18, 20-23) des Patientenkollektives gewonnen. Die jeweiligen Q/R-Editierungsgrade der Patienten finden sich in Tabelle 3.16 am Ende des Kapitels, die Abbildung 3.23 zeigt das Gel mit den DNA-Proben des Patienten Nr.: 7. Die Patientengruppe wurde von

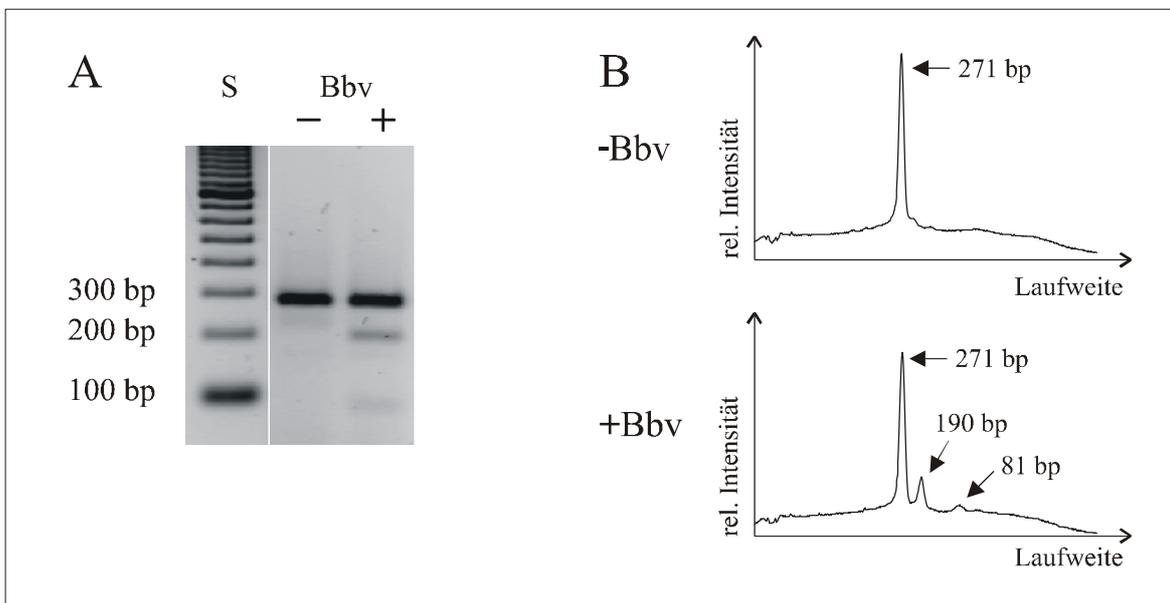


Abbildung 3.22: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 6 für das Kontrollkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall A 8 im Neocortex (vgl. Tab. 3.1), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), +Bbv = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I.

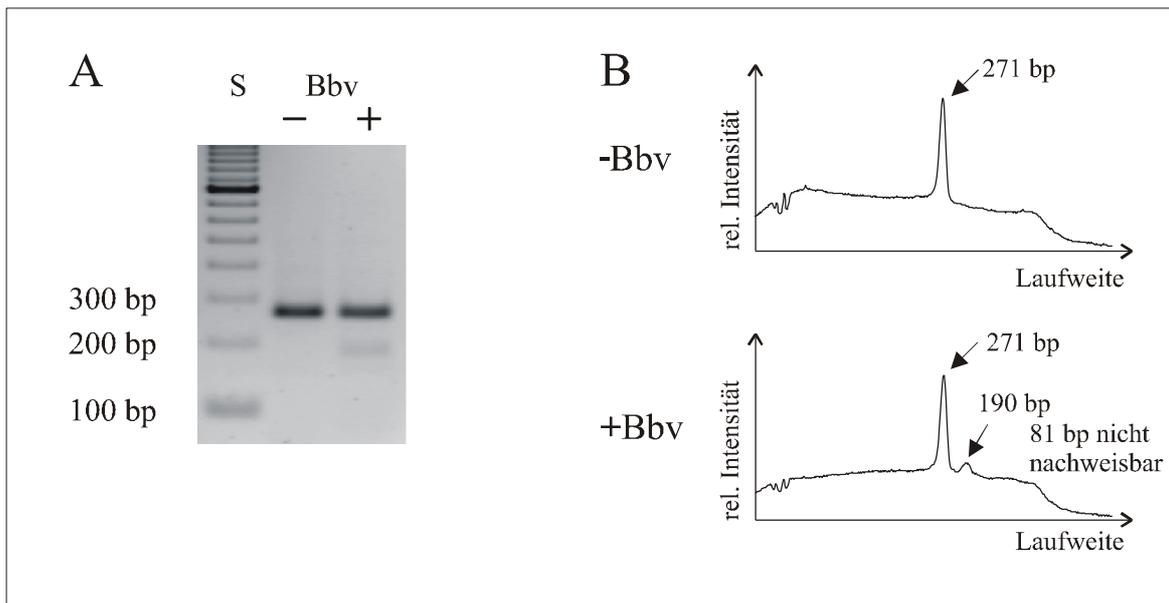


Abbildung 3.23: Bestimmung des Q/R-Editierungsgrades für die Kainat-Untereinheit GluR 6 für das Patientenkollektiv mit der Restriktionsendonuclease Bbv I. **A** zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese für den Fall 7 im Neocortex (vgl. Tab. 3.2), **B** die zugehörigen Densitogramme der jeweiligen Spuren. S = 100 Basenpaar-Standard (bp = Basenpaare), -Bbv = keine Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I (Original-DNA), +Bbv = Inkubation mit dem Restriktionsenzym Bbv I.

acht männlichen (3, 5, 8, 17, 18, 21-23) und fünf weiblichen (Nr.: 7, 9, 15, 16, 20) Personen im Alter von 2 7/12 bis 46 Jahren gestellt. Die ermittelten Editierungsgrade liegen zwischen 65 % und 84 %, der Mittelwert bei $\bar{x} = 75$ % bzw. der Median bei $\tilde{x} = 74$ % (vgl. Abbildung 3.24). Drei der untersuchten 13 Patienten sind jünger als zehn Jahre (Nr.: 3, 17, 21). Davon zeigen zwei der drei hohe Q/R-Editierungsgrade von mehr als 83 %. Das dritte Kind (Nr. 17) weist dagegen einen Editierungsanteil von nur 70 % auf. Ein weiterer Patient (Nr. 23) gehörte der Gruppe der 10 bis 20 jährigen an, die übrigen neun Patienten haben das 20. Lebensjahr überschritten (25 - 46 Jahre). Der Erkrankungszeitpunkt lag bei allen Patienten vor dem 20. Lebensjahr und variiert zwischen dem Zeitpunkt der Geburt (Nr. 21) und dem 19. Lebensjahr (Nr. 16). Die Editierungsanteile der Patienten und die zugehörigen personenbezogenen Daten, wie z. B. das Alter oder die Erkrankungsdauer zeigen ansonsten eine große Variabilität. Auffällig ist gegenüber den bisherigen Ergebnissen jedoch das gleichförmige Verhalten der Editierungsgrade im Temporallappen bei dieser Kainat-Rezeptoruntereinheit. Dies wird in Abbildung 3.24 verdeutlicht, die die mittleren Editierungsgrade der untersuchten Personen aus dem Kontroll- und Patientenkollektiv als

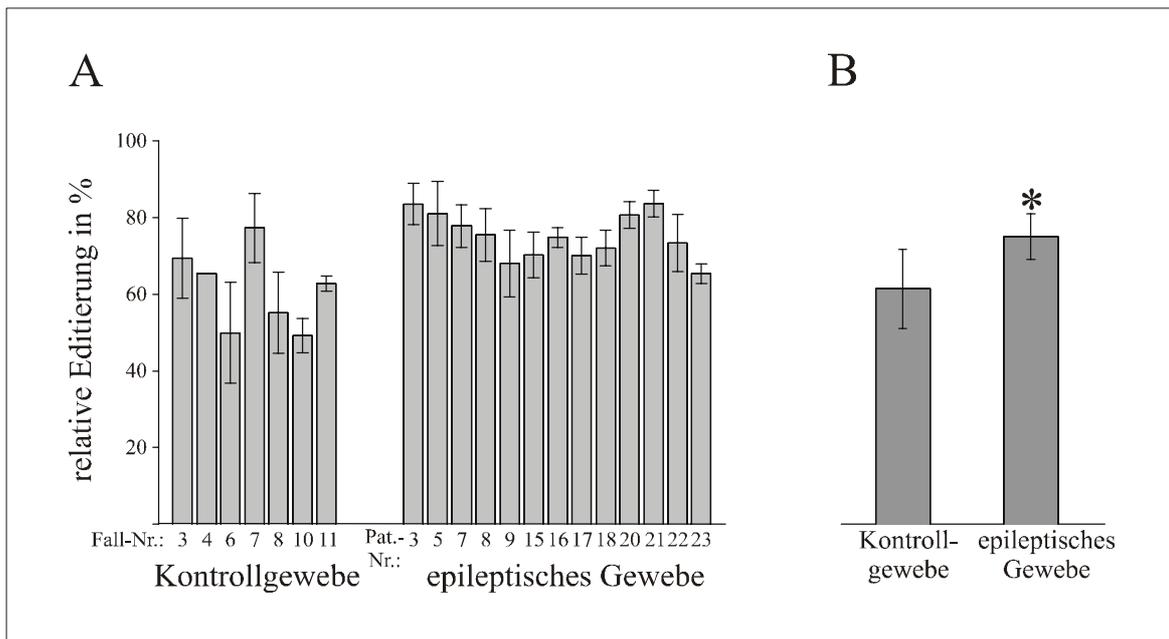


Abbildung 3.24: Übersicht der ermittelten Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 6 im Neocortex mit der Restriktionsendonuclease Bbv I (vgl. Tab. 3.16), angegeben in Prozent. A zeigt die bestimmten Mittelwerte für das Kontroll- bzw. für das Patientenkollektiv, B stellt den für jedes Kollektiv berechneten Gesamtmittelwert dar. Der Stern bedeutet eine signifikante Differenz der Q/R-Editierungsgrade. Das Histogramm zeigt in der Ordinate die relative Editierung der jeweiligen Person mit den entsprechenden Standardabweichungen, auf der Abszisse sind die jeweiligen Personen aufgetragen (vgl. Tab. 3.1 und 3.2).

Histogramm darstellt. Die Gesamtmittelwerte der einzelnen Kollektive sind erneut als eigenes Histogramm gezeigt (vgl. Abb. 3.24 B).

3.3.2.3 Zusammenfassung

Für die Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 6 lassen sich die bisherigen Ergebnisse für den Hippocampus und den Temporallappen wie folgt zusammenfassen. Analog zu dem Verhalten der Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 5 kommt es im Hippocampus im Mittel zu einem Rückgang der Q/R-Editierung. Die Editierung fällt von 64 % im Kontrollkollektiv auf 60 % im Patientenkollektiv. Dies entspricht einer relativen Abnahme auf 94 %. Im Gegensatz dazu steigt der Q/R-Editierungsgrad im Temporallappen im Mittel von 61 % auf 75 % an. Gegenüber dem Kontrollkollektiv (100 %) entspricht dies einem relativen Wert von 123 % (vgl. Tabelle 3.6). Damit zeigen die Kainat-Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 im Hippocampus und Temporallappen jeweils ein analoges Verhalten.

Gewebe	Meßwertanzahl n	Mittelwert \bar{x} [%]	Median \tilde{x} [%]
Kontrollkollektiv			
Hippocampus	8	64	65
Temporallappen	7	61	63
Patientenkollektiv			
Hippocampus	11	60	60
Temporallappen	13	75	74

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptoruntereinheit GluR 6 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Bbv I.

3.4 Statistische Testung

Vor Anwendung der statistischen Testverfahren war zu klären, ob die Meßwerte für die jeweiligen Personen normalverteilt sind (vgl. Kapitel 2.10.2). Die Normalverteilung wurde nach den Kriterien von Kolmogorov-Smirnov überprüft. Sie konnte für mehr als 94 % der Meßreihen der Patienten beider Kollektive gezeigt werden. Daher wurde das Merkmal der Q/R-Editierung mit dem t-Test für unverbundene Stichproben getestet. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit geeigneter Software (SigmaStat®).

Getestet wurden die erhobenen Meßwerte für die Stichproben aus den Untersuchungen der Kainat-Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 im Hippocampus und temporalem Neocortex. Unter den obigen Kriterien konnte für die Q/R-Editierungsgrade des Hippocampus keine Signifikanz festgestellt werden (vgl. Tabelle 3.7). Für den temporalen Neocortex ist eine signifikante Änderung der Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Rezeptoruntereinheiten GluR 5 ($p < 0,03$) und GluR 6 ($p < 0,001$) ermittelt worden.

Dieses Ergebnis ist unter spezifischen Gesichtspunkten weiter zu analysieren. Dazu gehört einmal der geringe Stichprobenumfang des Kontrollkollektives, der zu Anfälligkeiten dieser Testverfahren führt und das nicht vorhandene „Altersmatching“ der beiden Kollektive.

Gewebe	Stichprobe n	Mittelwert \bar{x} [%]	Std. Abw. s [%]	Prüfgröße p
	Kontrolle/Patient	Kontrolle/Patient	Kontrolle/Patient	t-Test
Rezeptoruntereinheit GluR 5				
Hippocampus	8 / 11	61,1 / 53,7	9,9 / 8,9	0,089
Temporallappen	8 / 13	53,5 / 62,7	8,9 / 8,6	0,029
Rezeptoruntereinheit GluR 6				
Hippocampus	8 / 11	63,6 / 60,0	17,0 / 14,4	0,636
Temporallappen	7 / 13	61,4 / 75,1	10,9 / 5,9	0,001

Tabelle 3.7: Zusammenfassung statistischer Merkmale aus den Messungen der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe unter Anwendung des t-Testes. Aufgeführt sind jeweils die Größen Stichprobenumfang n , Mittelwert \bar{x} , Standardabweichung s (Std. Abw.) und Prüfgröße p des t-Testes für das Kontroll- und Patientenkollektiv (Kontrolle/Patient)

Dieses Ergebnis ist unter spezifischen Gesichtspunkten weiter zu analysieren. Dazu gehört einmal der geringe Stichprobenumfang des Kontrollkollektives, der zu Anfälligkeiten dieser Testverfahren führt und das nicht vorhandene „Altersmatching“ der beiden Kollektive.

Extreme Abweichungen im Kontrollkollektiv, wie es die Person A6 für die Untereinheit GluR 5 zeigt sowie bei den Personen A8 und A11 für die Untereinheit GluR 6, führen zur Nichtsignifikanz der Ergebnisse im Hippocampus. Werden diese Extremwerte aus der statistischen Betrachtung heraus gelassen, so ergeben sich wesentlich stabilere Testwerte. Die mehrfache Überprüfung dieser Q/R-Editierungsgrade bestätigte jedoch den berechneten Mittelwert. Die ermittelten Editierungsgrade sind daher als korrekt erfaßt anzunehmen. Allerdings hätten diese maximalen bzw. minimalen Meßwerte bei einem größeren Stichprobenumfang des Kontrollkollektives eine geringere Gewichtung. Um dies zu verdeutlichen erfolgte trotzdem ein t-Test bei der geänderten Stichprobe des Kontrollkollektives. In Tabelle 3.8 sind die bisherigen und neuen Prüfgrößen des t-Testes, p und p' , sowie die aus der Testung heraus genommenen Personen mit ihren Editierungs-

Gewebe	Prüfgröße p	Mittelwert \bar{x} [%]	Person / Q/R-	neue	
Kontrollkollektiv	t-Test	alt / neu	Editierungsgrad [%]	Prüfgröße p'	
Rezeptoruntereinheit GluR 5					
Hippocampus	0,089	61,1 / 63,2	A6	46,2	0,039
Temporallappen	0,029	53,5	-	-	0,029
Rezeptoruntereinheit GluR 6					
Hippocampus	0,636	63,6 / 71,7	A8 / A11	36,6 / 42,4	0,0103
Temporallappen	0,001	61,4 / 58,7	A7	77,3	0,0001

Table 3.8: Änderung der Prüfgröße p des studentischen t -Testes bei Änderung des Kontrollkollektives für die ermittelten Q/R-Editierungsgrade der Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe des Kontrollkollektives (vgl. Tab. 3.7).

graden aufgeführt. Zusätzlich ist noch einmal der mittlere Q/R-Editierungsgrad für die beiden Berechnungen angegeben.

Während der Mittelwert des Q/R-Editierungsgrades des Kontrollkollektives der Rezeptoruntereinheit GluR 5 im Hippocampus sich nur gering verändert, zeigt sich der Einfluß dieser Manipulation auf die Mittelwertbildung für die Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 6, wo es zu deutlichen Änderungen kommt. Für die Rezeptoruntereinheit GluR 5 am temporären Neocortex wurde keine Neuberechnung vorgenommen. Hier zeigte sich im Kontrollkollektiv kein Meßwert, der gegenüber dem Mittelwert extrem abwich (vgl. Abbildung 3.18). Daher bleibt auch die Prüfgröße unverändert. Es bleibt anzumerken, daß diese Maßnahme nur den extremen Einfluß einzelner Meßwerte in Relation zu den sonst gleichförmigen Werten auf die Signifikanz und den Mittelwert verdeutlichen soll. Dies ist bei Reduktion des Untersuchungsergebnis auf Größen, wie Signifikanz und Mittelwert, zu berücksichtigen.

Das Problem des Altersmismatch der beiden Kollektive und der Einfluß auf das Gesamtergebnis läßt sich wie folgt berücksichtigen. Dazu wurden aus den jeweiligen Kollektiven die Personen heraus gesucht, die den Altersdurchschnitt von einer gemeinsamen Mitte abweichen lassen. Dies betrifft aus dem Kontrollkollektiv die älteren Personen, aus dem Patientenkollektiv besonders die jüngeren Personen. Ziel war es, den Altersdurchschnitt

der jeweiligen Kollektive anzugleichen und gleichzeitig einen maximalen Stichprobenumfang zu gewährleisten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst. Als Fazit aus diesen Berechnungen lassen sich folgende Aussagen feststellen:

Altersmismatch	Kontrollkollektiv autoptisches Hirngewebe			Patientenkollektiv epileptisches Hirngewebe	
	Alter [Jahren]	Q/R-Edi- tierung [%]	geänderte Prüfgröße p	Q/R-Edi- tierung [%]	Alter [Jahren]
Hippocampus: KA-Untereinheit GluR 5					
Normwert	51,1	61,1	0,089	53,7	28,1
ohne Personen: A2, 1,6,11,12,19	48,6	61,3	0,033	49,9	39,5
Hippocampus: KA-Untereinheit GluR 6					
Normwert	51,1	63,6	0,64	61,4	28,1
ohne Personen: A2, 1,6,11,12,19	48,6	62,0	0,25	53,2	39,5
Temporaler Neocortex: KA-Untereinheit GluR 5					
Normwert	50,75	52,9	0,029	62,7	27,4
ohne Personen: A9, 3, 17, 21, 23	47,7	51,8	0,098	60,5	36,1
Temporaler Neocortex: KA-Untereinheit GluR 6					
Normwert	47,7	61,4	0,001	75,11	27,4
ohne Personen: 3, 17, 21, 23	47,7	61,4	0,003	74,86	36,1

Tabelle 3.9: Änderung der Prüfgröße p des studentischen t-Testes für die ermittelten Q/R-Editierungsgrade der Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe bei Variation des Untersuchungskollektives zur Angleichung des Altersdurchschnitt beider Kollektive.

1. Die Altersangleichung führt zu geringen Veränderungen der Signifikanzen in den jeweiligen Gruppen, wobei die Gesamtzahl der signifikanten Gruppen konstant bleibt. 2. Die Kernaussage, die Abnahme der Q/R-Editierung für die Kainat-Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 im hippocampalen und die Zunahme der Q/R-Editierung für die Kainat-Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 im corticalen epileptischen Gewebe, bleibt erhalten. Somit stellt das mismatch „Alter“ in den untersuchten Kollektiven nicht das gewonnene Untersuchungsergebnis in Frage.

3.5 Zusammenhänge der Q/R-Editierungsgrade mit den Patientendaten

Neben der Durchführung statistischer Testverfahren ist die Feststellung von Zusammenhängen zwischen den Q/R-Editierungsgraden für die Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 untereinander und im Zusammenhang mit den zur Verfügung stehenden Patientenmerkmalen bedeutsam. Eine Analyse zwischen den untersuchten Geweben vom Hippocampus und Temporallappen jeweils eines Patienten war nicht möglich, da der Stichprobenumfang von Geweben aus beiden Hirnarealen zu gering war. Daher wurden die Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 jeweils für den Hippocampus und den Temporallappen getrennt untersucht.

Die Korrelationsanalyse erfolgte unter rechnergestützter Hilfe mit geeigneter Software (SigmaStat[®]). Sowohl für die Meßwerte (vgl. Kapitel 3.4) als auch für die patientenbezogenen Daten konnte eine Normalverteilung zu Grunde gelegt werden. Daher erfolgte die Korrelationsbestimmung gemäß der Produktmoment Korrelation nach Pearson. Eine Übersicht der Ergebnisse bietet Tabelle 3.10, in der, neben den Korrelationskoeffizienten, auch der zugehörige Wert der Prüfgröße p für die Wahrscheinlichkeit dieser Korrelation angegeben wird. Einzelne Besonderheiten der jeweiligen Analysen werden in der Diskussion behandelt.

Inhalt: Korrelationskoeffizient r Prüfgröße p	Untereinheit GluR 6	Patienten- alter	Erkrank- ungsdauer	krankheits- freie Zeit	Anfalls- frequenz
Hippocampus					
KA-Untereinheit GluR 5	0,43 0,185	-0,34 0,311	-0,39 0,230	-0,0037 0,991	0,59 0,096
KA-Untereinheit GluR 6		-0,34 0,310	-0,74 0,009	0,29 0,383	-0,23 0,561
Temporaler Neocortex					
KA-Untereinheit GluR 5	0,44 0,136	-0,55 0,053	-0,62 0,033	-0,20 0,536	0,51 0,094
KA-Untereinheit GluR 6		-0,30 0,313	-0,42 0,15	0,22 0,489	0,10 0,754

Tabelle 3.10: Korrelationskoeffizienten r und zugehörige Prüfgrößen p zwischen ermittelten Q/R-Editierungsgraden der Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 im hippocampalen und temporalen Hirngewebe des Patientenkollektives und spezifischen Patientendaten.

3.5.1 Kainat-Rezeptoruntereinheiten im Hippocampus

Die Kainatuntereinheiten GluR 5 und GluR 6 zeigen in ihren Q/R-Editierungsgraden im Patientenkollektiv eine Korrelation von $r = 0,43$ ($p < 0,195$). Diese Korrelation erhöht sich noch auf einen Wert von $r = 0,52$ ($p < 0,120$), wenn der Patient Nr. 2 aus dieser Betrachtung ausgeschlossen wird. Dieser Patient fällt im Patientenkollektiv besonders durch sein hohes Alter und einen sehr späten Krankheitsbeginn auf. Eine Neoplasie oder eine andersartige tumoröse Erkrankung lag aber nicht vor.

Im Vergleich dazu besitzt das Kontrollkollektiv eine Korrelation von $r = 0,53$, steigt aber unter Nichtbetrachtung der Person A8, die in der Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 6 eine sehr geringe Editierung aufweist, auf einen Wert von $r = 0,70$.

3.5.1.1 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Patientenanzahlhäufigkeit

Die Korrelation zwischen der Anfallshäufigkeit der Patienten pro Monat und der Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 5 ist nur mäßig ($r = 0,59$) ausgeprägt. Auch die Prüfgröße zeigt einen nicht signifikanten Wert. Die Korrelation wurde für neun von elf möglichen Patienten getestet. Wesentlich ungünstigere Ergebnisse weist die Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 6 auf. Hier kann man davon ausgehen, daß für die getesteten Stichproben keine lineare Korrelation vorliegt.

Unter bestimmten Voraussetzungen (z.B. Extremwerte bei der Anfallshäufigkeit nicht berücksichtigen) lassen sich mit Hilfe gezielter Maßnahmen zwar höhergradige Korrelationen zwischen dem Q/R-Editierungsgrad und der Anfallshäufigkeit der Patienten feststellen, doch im wesentlichen kann ein möglicher Zusammenhang nur für die Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 5 angenommen werden.

3.5.1.2 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Patientenalter

Die Rezeptoruntereinheit GluR 5 zeigt zu dem Alter der Patienten bei elf getesteten Werten einen negativen Korrelationskoeffizienten ($r = -0,34$). Sowohl die Korrelation, als auch die Prüfgröße p ($p < 0,31$) weisen nicht auf einen Zusammenhang zwischen den beiden Parametern hin. Für die Rezeptoruntereinheit GluR 6 zeigen sich ähnliche Werte ($r = -0,39$; $p < 0,31$). Hier sei aber bereits vorweg erwähnt, daß der Korrelationskoeffizient und die Prüfgröße p sehr ansteigen ($r = -0,84$; $p < 0,0021$), wenn der Patient Nr. 2, der durch ein hohes Alter und spätes Erkrankungsalter auffällt, aus der Berechnung ausgeschlossen wird. In diesem Zusammenhang sei auf die Berechnungen zwischen den Q/R-Editierungsgraden und der Erkrankungsdauer hingewiesen (vgl. Kap. 3.5.1.3).

3.5.1.3 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Erkrankungsdauer der Patienten

Für die Rezeptoruntereinheit GluR 5 konnte ein Korrelationskoeffizient von $r = -0,39$ ($p = 0,23$) zur Krankheitsdauer der Patienten festgestellt werden. Dieser Wert ließ sich jedoch durch Ausschluß einzelner Patienten aus der Analyse nicht wesentlich verändern und kann daher nicht weiter diskutiert werden.

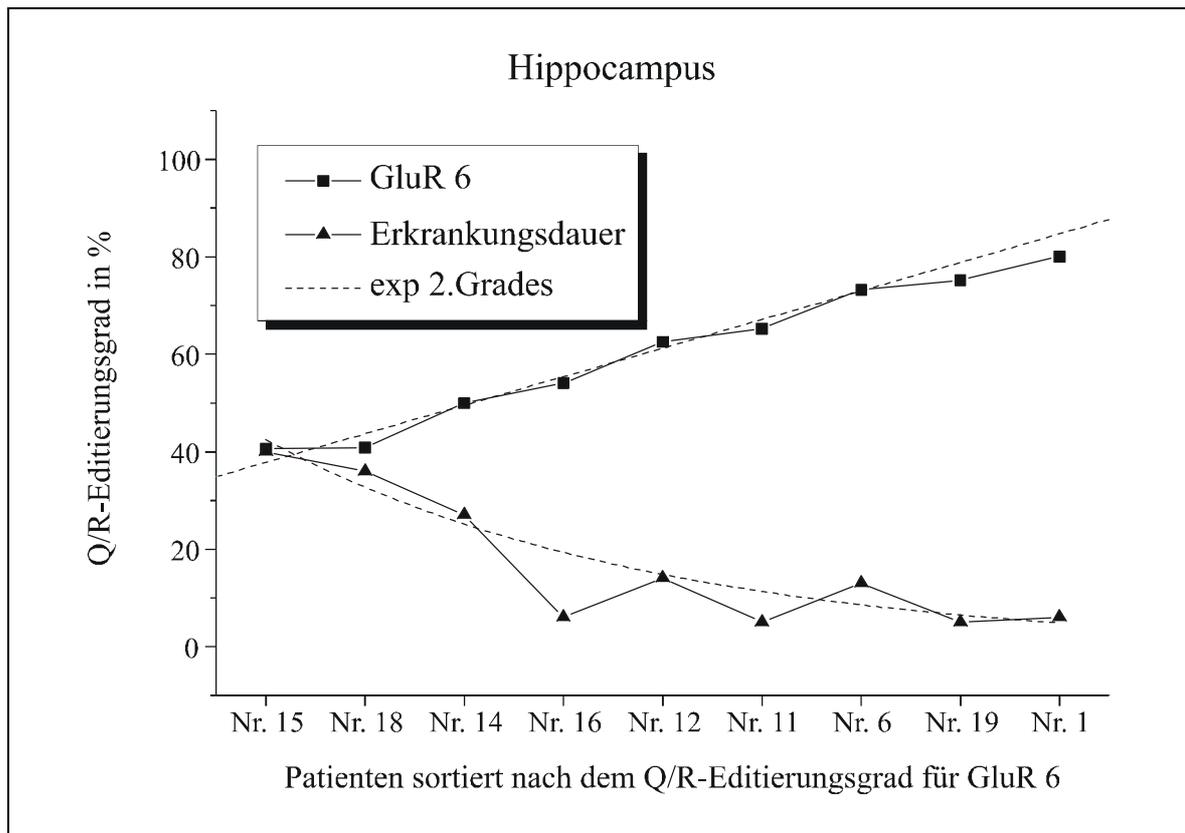


Abbildung 3.25: Patientenspezifische Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 6 (GluR 6) im Hippocampus aufgetragen gegenüber der Erkrankungsdauer der Patienten (Erkrankungsdauer), sowie zugehörige Splines. Für die Erkrankungsdauer ist ein Spline mit exponentiellen Abfall 2. Grades (exp 2. Grades) dargestellt.

Wesentlich überzeugendere Werte zeigen sich bei der Rezeptoruntereinheit GluR 6. Hier wird unter Berücksichtigung aller Patienten (elf) ein Korrelationskoeffizient von $r = -0,74$ erzielt, der aber zusätzlich eine Signifikanz ($p = 0,009$) aufweist. Betrachtet man die Editierungsgrade für die Rezeptoruntereinheit GluR 6 und die Erkrankungsdauer genauer und stellt diese graphisch dar, so läßt sich ein möglicher funktioneller Zusammenhang vermuten (vgl. Abbildung 3.25) Tatsächlich läßt sich für die Werte der Erkrankungsdauer, bei Ordnung nach ansteigenden Q/R-Editierungsgraden, ein exponentieller Fit angeben. In diesem Fall handelt es sich um eine exponentielle Funktion 2. Grades. Dies stellt nur einen möglichen funktionellen Zusammenhang dar, zeigt aber, daß für die Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 6 die Erkrankungsdauer eine maßgebliche Größe zur Beeinflussung des Q/R-Editierungsgrades ist.

3.5.1.4 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Erkrankungszeitpunkt der Patienten

Für beide der untersuchten Kainat-Rezeptoruntereinheiten konnte kein wesentlicher Zusammenhang zwischen den Editierungsgraden und dem Erkrankungszeitpunkt festgestellt werden. Die Korrelationskoeffizienten sind nur gering ausgeprägt ($r = 0,004$; $p < 0,99$ für die Untereinheit GluR 5; $r = 0,29$; $p < 0,38$ für die Untereinheit GluR 6). Grundsätzlich ist sicher von einem Einfluß auszugehen, jedoch in dieser Untersuchung nicht verifizierbar.

Bei Betrachtung der Editierungsgrade verschiedener Patienten gleicher Altersklassen und relativ gleichen Erkrankungszeiträumen fallen Patienten mit sehr frühem Erkrankungszeitpunkt (≤ 3 . Lebensjahr) durch sehr niedrige Werte in der Editierung auf. Dazu vergleiche man die Patienten Nr. 6, 11 und 12, sowie die Patienten Nr. 15 und 18.

3.5.2 Kainat-Rezeptoruntereinheiten im temporalen Neocortex

Die beiden Kainat-Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 zeigen im temporalen Neocortex eine recht gleichförmige Editierung (vgl. Abbildungen 3.18 und 3.24). Die Korrelation besitzt einen Wert von $r = 0,44$ ($p < 0,13$). Dieser kann allerdings durch Ausschluß der Patientin Nr. 20, die in der Untereinheit GluR 5 eine relativ niedrige Editierung aufweist, auf einen Wert von $r = 0,80$ gesteigert werden. Allerdings weist diese Patientin keine erkennbaren besonderen Merkmale auf.

Das Kontrollkollektiv zeigt bei Berücksichtigung aller Personen einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,48$. Diese Korrelation steigt auf $r = 0,84$ an, wenn die Person A8 unberücksichtigt bleibt. Diese Person fiel durch einen relativ höheren Q/R-Editierungsgrad in der Untereinheit GluR 5 gegenüber GluR 6 auf. Ein besonderer Grund ist aber nicht eruierbar.

3.5.2.1 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Patientenanzahlhäufigkeit

Die Editierungsgrade der Kainat-Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 zeigen zur Anfallshäufigkeit der Patienten keinen erkennbaren Zusammenhang. Für die Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 zeigen sich mäßige Korrelationskoeffizienten ohne Signifikanz. Dies liegt in der relativ gleichförmigen Editierung der beiden Rezeptoruntereinheiten. Auffällig ist jedoch, daß die zu der Gruppe der Kinder und Jugendlichen gehörenden Patienten (Nr.: 3, 17, 21, 23) sehr hohe Häufigkeiten der Anfälle pro Monat zeigen.

3.5.2.2 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Patientenalter

Ebenso wie die Anfallshäufigkeit der Patienten zeigt auch das Patientenalter keine hohe Korrelation zu den Q/R-Editierungsgraden der Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6. Auffällig ist jedoch, daß für die Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 5 die Kriterien der Signifikanz erfüllt werden ($r = -0,55$; $p < 0,05$). Zwar lassen sich grundsätzlich höhere Q/R-Editierungsgrade bei Kindern und Jugendlichen feststellen, doch hat dies auf die Korrelation keinen besonderen Einfluß. Durch Ausschluß einzelner Patienten lassen sich für die Kainat-Untereinheit GluR 5 keine wesentlichen Änderungen erzielen. Die Bewertung der Ergebnisse für die Untereinheit GluR 5 bleibt offen, doch es könnte ein Zusammenhang mit der Erkrankungsdauer der Patienten existieren (vgl. dazu Kapitel 3.5.2.3). Für die Untereinheit GluR 6 lassen sich zwar gezielt höhere Werte finden ($r = 0,8$, $p = 0,0057$ ohne Nr. 16, 17 und 23), jedoch ist kein negativ linearer Einfluß durch das Patientenalter auf den Grad der Editierung im Temporallappen anzunehmen (vgl. dazu Kapitel 3.5.2.1), sondern eher im Zusammenhang mit der Erkrankungsdauer zu suchen.

3.5.2.3 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Erkrankungsdauer der Patienten

Zwischen der Erkrankungsdauer der Patienten und dem Editierungsgrad der Rezeptoruntereinheit GluR 5 zeigt sich eine mäßige lineare Korrelation, allerdings existiert eine Signifikanz für einen Zusammenhang. Der Koeffizient beläuft sich auf $r = -0,62$ ($p < 0,033$) über alle untersuchten Patienten. Dieser Wert steigt sogar auf $r = -0,78$ ($p < 0,0084$), wenn zwei Patientinnen (Nr.: 16, 20) aus der Analyse ausgeschlossen werden. Bei beiden Patienten fällt ein relativ niedriger Editierungsgrad im Vergleich zu den übrigen Patienten der gleichen Altersgruppe auf. Möglich ist, daß der späte Erkrankungszeitpunkt nach der Pubertät (19. bzw. 17. Lebensjahr) zu einem geringeren Q/R-Editierungsgrad im Temporallappen führt. Allerdings ist dies widersprüchlich zu der Aussage des Korrelationskoeffizienten.

Für die Untereinheit GluR 6 zeigen sich zunächst nur mäßige statistische Werte ($r = -0,42$; $p < 0,15$). Bei differenzierter Betrachtung und Ausschluß bestimmter Patienten verbessern sich die statistischen Werte. So belaufen sie sich auf $r = -0,61$ ($p < 0,046$) bei Ausschluß des Patienten Nr. 23 bzw. auf $r = -0,83$ ($p < 0,0029$), wenn Patient Nr. 17 ebenfalls nicht berücksichtigt wird. Beide Patienten gehören einer Gruppe mit relativ kurzer Erkrankungsdauer und niedrigem Q/R-Editierungsgrad an. Die Kriterien bestimmte

Patienten aus der Betrachtung auszuschließen sind jedoch nicht exakt. Diese Kriterien und die Auswirkungen eines Ausschlusses auf die Untersuchungsergebnisse sind aber diskussionswürdig (vgl. Kapitel 4.4.2).

Fazit ist, daß sich negative Korrelationskoeffizienten zwischen den Q/R-Editierungsgraden und der Erkrankungsdauer im temporalen Neocortex finden lassen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen im Hippocampus ist die Aussagekraft hier geringer und es lassen sich aus den Meßwerten nur mit Einschränkungen Splines berechnen. Eine entsprechende Bewertung bleibt daher der Diskussion vorbehalten.

3.5.2.4 Kainat-Rezeptoruntereinheiten und Erkrankungszeitpunkt der Patienten

Ebenso wie im Hippocampus gibt es auch für den Temporallappen keinen besonderen Zusammenhang zwischen dem Erkrankungszeitpunkt der Patienten und dem Editierungsgrad der Kainat-Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6. Die errechneten Korrelationskoeffizienten r und Prüfgrößen p für die Untereinheit GluR 5 und GluR 6 sind Tabelle 3.10 zu entnehmen.

3.5.3 Zusammenfassung

Es zeigen sich bei der Betrachtung aller ermittelten Meßergebnisse negativ signifikante lineare Korrelationen zwischen dem Editierungsgrad und der Erkrankungsdauer der Patienten. Dies konnte hier nachgewiesen werden für die Kainat-Untereinheit GluR 6 im Hippocampus und für die Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 5 im temporalen Neocortex (vgl. Tabelle 3.10).

Außerdem lassen sich für die jeweiligen Patienten stochastisch lineare positive Korrelationen zwischen den Kainat-Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 im Hippocampus finden. Die Signifikanzschwelle von 5 % wird um ca. einen Prozentpunkt überschritten. Alle übrigen patientenbezogenen Daten und gemessenen Editierungsgrade zeigen eine unzureichende Korrelation ($|r| \leq 0,55$). Auch eine Signifikanz der Korrelationen ist nicht vorhanden.

3.6 Zusammenfassung der ermittelten Meßwerte

Fall	Meßwertanzahl n	Mittelwert \bar{x} [%]	Median \tilde{x} [%]	Varianz [1]
Kontrollkollektiv				
A1	4	95,3	95,3	0,06
A2	4	95,7	95,7	0,04
A5	4	93,5	93,5	0,20
A6	5	92,9	92,7	0,11
A7	4	97,5	97,5	0,67
A8	4	96,9	96,9	0,49
Patientenkollektiv				
01	3	95,1	94,7	0,75
02	4	94,9	94,9	0,01
06	4	94,9	94,9	0,0
11	4	95,0	95,0	0,02
12	4	93,6	93,6	4,41
13	4	93,7	93,7	0,64
14	4	97,0	97,0	0,04
15	4	91,6	91,6	1,0
16	4	93,9	93,9	0,72
17	4	96,7	96,7	0,90
18	4	94,2	94,2	0,02

Tabelle 3.11: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptor-Untereinheit GluR 2 im hippocampalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Aci I

Fall	Meßwertanzahl n	Mittelwert \bar{x} [%]	Median \tilde{x} [%]	Varianz [1]
Kontrollkollektiv				
A3	4	96,5	96,8	1,6
A4	4	93,9	93,9	0,02
A6	4	96,7	96,9	1,5
A7	4	97,2	97,2	0,04
A8	4	97,2	97,2	0,2
A9	4	97,0	97,0	0,1
Patientenkollektiv				
03	4	97,7	97,7	0,01
04	4	94,0	94,0	0,03
07	4	96,8	96,9	1,6
08	4	97,1	97,1	0,25
10	4	96,9	97,0	1,5
19	4	97,1	96,9	1,4
21	4	99,6	99,6	0,2
22	4	97,0	97,0	0,3
23	4	96,5	96,7	1,2

Tabelle 3.12: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptor-Untereinheit GluR 2 im temporalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Aci I

Fall	Meßwertanzahl n	Mittelwert \bar{x} [%]	Median \tilde{x} [%]	Varianz [1]
Kontrollkollektiv				
A1	4	74,3	77	43,9
A2	5	59,4	58,6	2,7
A5	6	61,5	62,0	5,4
A6	9	46,3	47,2	22,0
A7	4	69,5	69,5	3,8
A8	4	55,9	58,0	23,8
A10	4	96,8	69,8	0,20
A11	4	53,9	53,9	0,90
Patientenkollektiv				
01	7	64,9	66,9	114,5
02	5	50,8	46,8	42,1
06	9	65,8	65,1	18,9
11	6	64,6	66,6	10,2
12	4	51,1	51,0	27,0
13	10	53,3	55,4	105,3
14	5	55,4	57,8	31,4
15	4	51,4	52,7	6,1
16	3	49,7	49,8	11,2
18	5	37,5	39,8	13,6
19	5	44,4	45,7	14,2

Table 3.13: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptor-Untereinheit GluR 5 im hippocampalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Bbv I

Fall	Meßwertanzahl n	Mittelwert \bar{x} [%]	Median \tilde{x} [%]	Varianz [1]
Kontrollkollektiv				
A3	6	57,2	56,6	19,4
A4	3	43,2	40,3	18,6
A6	4	41,1	41,7	22,1
A7	7	59,0	62,2	121,2
A8	7	59,7	61,9	97,7
A9	4	60,9	60,9	0,3
A10	4	64,1	64,1	0,8
A11	4	38,25	38,3	13,3
Patientenkollektiv				
03	10	72,5	73,3	24,8
05	6	74,8	74,4	10,7
07	8	61,8	61,3	12,5
08	4	66,9	68,0	62,2
09	5	50,6	46,8	91,5
15	6	48,9	50,4	70,3
16	4	60,1	59,9	38,9
17	6	62,1	62,0	9,5
18	4	59,4	58,3	20,7
20	6	47,7	48,2	32,6
21	9	71,8	72,6	36,1
22	3	70,9	69,5	4,5
23	4	64,0	64,2	3,8

Tabelle 3.14: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptor-Untereinheit GluR 5 im temporalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Bbv I

Fall	Meßwertanzahl n	Mittelwert \bar{x} [%]	Median \tilde{x} [%]	Varianz [1]
Kontrollkollektiv				
A1	4	80,8	82,1	10,8
A2	4	75,2	75,1	26,2
A5	4	63,1	63,8	1,8
A6	6	68,8	67,2	218,6
A7	5	82,7	84,1	3,4
A8	6	36,6	38,4	21,7
A10	4	59,4	59,4	1,3
A11	4	42,4	42,4	9,6
Patientenkollektiv				
01	7	80,0	81,8	21,3
02	7	78,8	82,3	33,4
06	7	73,3	76,0	58,4
11	7	65,3	60,0	72,5
12	4	62,6	62,2	21,7
13	5	54,7	57	91,9
14	6	50,0	53,2	47,5
15	4	40,6	41,7	18,3
16	9	54,1	52,8	14,5
18	3	40,9	40,5	5,9
19	4	75,2	75,2	4,6

Tabelle 3.15: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptor-Untereinheit GluR 6 im hippocampalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Bbv I

Fall	Meßwertanzahl n	Mittelwert \bar{x} [%]	Median \tilde{x} [%]	Varianz [1]
Kontrollkollektiv				
A3	6	69,4	65,8	91,0
A4	3	65,5	65,5	0,04
A6	6	50,0	46,4	145,1
A7	6	77,3	77,1	68,0
A8	8	55,4	51,7	98,1
A10	4	49,2	49,2	10,2
A11	4	62,8	62,8	1,7
Patientenkollektiv				
03	6	83,6	82,5	24,0
05	6	81,1	85,7	57,5
07	6	77,8	77	26,1
08	7	75,5	73,8	40,1
09	6	68,0	66,1	63,0
15	6	70,3	69,9	28,8
16	4	74,9	75,8	4,9
17	4	70,1	71,0	16,8
18	4	72,1	72,8	16,2
20	4	80,8	79,3	9,1
21	6	83,7	82,8	9,9
22	4	73,4	71,7	40,8
23	4	65,4	65,2	4,8

Tabelle 3.16: Zusammenfassung der Q/R-Editierungsgrade für die Rezeptor-Untereinheit GluR 6 im temporalen Hirngewebe des Kontroll- und Patientenkollektives nach Analyse mit dem Enzym Bbv I

4. Diskussion

4.1 Untersuchungsergebnis

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Q/R-Editierungsgrad der AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR 2 und der Kainat-Rezeptoruntereinheiten GluR 5 und GluR 6 im Gewebe des Hippocampus und des temporalen Neocortex von epilepsiechirurgischen behandelten Patienten bestimmt. Dieses Ergebnis wurde mit entsprechendem Gewebe von humanen postmortalen Resektaten verglichen.

Für die AMPA-Untereinheit GluR 2 konnte keine Änderung gegenüber der Kontrollgruppe für beide Gewebe festgestellt werden. Sowohl im Hippocampus, als auch im temporalen Cortex fand sich ein Editierungsgrad von nahezu 100 %. Für die Kainat-Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 zeigte die Untersuchung eine Abnahme der Q/R-Editierung im Hippocampus sowie eine Zunahme der Q/R-Editierung im temporalen Neocortex von Epilepsiepatienten. Die Ergebnisse für die Kainatuntereinheiten zeigen im hippocampalen Gewebe keine Signifikanz unter Berücksichtigung des gesamten Stichprobenumfangs, da die einzelnen Meßergebnisse eine zu hohe Variabilität aufweisen. Eine Differenzierung der Patienten in zwei Gruppen mit und ohne Ammonshornsklerose zeigte keinen Unterschied im Hippocampus. Für den temporalen Cortex finden sich für die gesamte Stichprobe signifikante Änderungen mit einer relativen Zunahme von 19 % für die Kainat-Untereinheit GluR 5 und 23 % für die Kainat-Untereinheit GluR 6.

4.2 Meßverfahren

Durch die eingesetzte Spezifitätskontrolle, mit spezifischen Restriktionsendonucleasen für jedes Amplifikationsprodukt, konnte gezeigt werden, daß die analysierten Schnittprodukte den gesuchten PCR-Produkten entsprachen. Damit können Fehlbestimmungen aufgrund von falschen Amplifikationsprodukten ausgeschlossen werden (vgl. Kapitel 2.7). Weiterhin kann aus mehreren Gründen eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden: Erstens erfolgte routinemäßig eine DNase-Behandlung der eingesetzten m-RNA. Zweitens liegt das zu untersuchende Amplifikationsprodukt im Bereich einer Exon / Intron-Grenze. Kontaminationen mit amplifizierter genomischer DNA hätten Schnittprodukte mit einer Länge im Kilobasenbereich zur Folge und könnten damit sofort in der Gelelektrophorese identifiziert werden.

Es kann davon ausgegangen werden, daß die ermittelten Ergebnisse den tatsächlichen Q/R-Editierungsgraden entsprechen. Auffällig ist die zum Teil erhebliche Variabilität zwischen einzelnen Gewebeproben. Dabei kann weitgehend ausgeschlossen werden, daß das Meßverfahren einen systematischen Fehler verursacht hat, da jede Gewebeprobe mehrfach untersucht wurde (mindestens dreifach) und die einzelnen Ergebnisse eine hohe Reproduktivität aufwiesen. Darüber hinaus wurde jede Probe in verschiedenen Agarosegelen elektrophoretisch analysiert und mehrfach mit Hilfe einer linearen CCD-Technik im Densitogramm vermessen (vgl. Kapitel 2.8). Durch ausreichend hohe Konzentrationen bei den verwendeten Restriktionsendonucleasen und durch eine genügende Inkubationszeit kann weiterhin davon ausgegangen werden, daß die gesamte DNA pro Reaktionsvolumen restringiert wurde.

Allerdings bleibt unklar, wie die Q/R-Editierung der einzelnen Neurone ist, da in dieser Untersuchung das komplette Gewebe oder Teile davon analysiert wurden. Damit kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Änderungen der Q/R-Editierung die Folge einer gleichmäßigen Veränderung aller Zellen oder durch eine Änderung einzelner Zellstrukturen bedingt sein könnte. Darüber hinaus erfaßt das Meßverfahren keine Veränderungen der Q/R-Editierung der Kainat-Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 infolge einer Proliferation bzw. Hypertrophie oder einem Untergang von Gliazellen, die mit einer geänderten Expressierung von Kainat-Rezeptoren und veränderter Q/R-Editierung [BERNARD et al., 1999; PARNEAU et al., 1994] einher gehen könnte. Zur Klärung sind weitere elektrophysiologische Untersuchungen und Einzelzell-Experimente erforderlich.

Es ist daher anzunehmen, daß die Variabilität des Q/R-Editierungsgrades durch die spezifischen Gewebeeigenschaften, die im Zusammenhang mit der Epilepsie der Patienten stehen, bedingt ist. Dies steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Zilles und Mitarbeitern, die bereits eine größere Variation von Rezeptordichten für GABA_A-, NMDA- und Kainatrezeptoren für Patienten mit fokaler Temporallappenepilepsie zeigen konnten [ZILLES et al., 1999].

4.3 Untersuchungskollektive

4.3.1 Patientenkollektiv

Die Rahmenbedingungen, die für das Patientenkollektiv gelten, wurden bereits in Kapitel 2.1 vorgestellt. Trotz eines ausgiebigen Studienprotokolls zur Erfassung patientenspezifi-

scher Daten gibt es mögliche Einflüsse auf das Untersuchungsergebnis, die nicht eruiert werden können. Dazu gehören die Wirkungen und Wechselwirkungen der Antikonvulsiva sowie das Intervall zwischen letztem epileptischen Anfall und dem Zeitpunkt der Operation.

Einfluß von Antikonvulsiva

Allen Patienten war eine pharmakoresistente Epilepsie, die ihre Ursache in einem begrenzten, resizierbaren Focus hatte, gemeinsam. Bereits in Kapitel 2.1 wurde auf den Einfluß des jahrelangen Gebrauches von Antikonvulsiva im Rahmen der Epilepsiebehandlung im Zusammenhang mit dieser Studie hingewiesen. Nicht nur Rückstände von Antiepileptika, wie z.B. Carbamazepin oder Phenytoin, konnten im Hirngewebe von Patienten nachgewiesen werden [RAMBECK et al., 2002; SCHNABEL et al., 1994], auch morphologische und funktionelle Veränderungen fanden sich im untersuchten Gewebe aufgrund jahrelangen Medikamentengebrauchs [BUCKLAND et al., 1996]. Dabei ist bei allen Patienten die große Anzahl der verschiedenen Antikonvulsiva gemeinsam. Teilweise sind einzelne Faktoren, wie temporäre Medikamenteneinnahmen bei jahrzehntelanger Erkrankung, jedoch nicht mehr eruiert und bleiben so der Untersuchung vorenthalten. Letztlich kann eine Beeinflussung des Q/R-Editierungsgrades durch Pharmaka nicht ausgeschlossen werden. Dabei ist sowohl eine Förderung als auch eine Behinderung des Editierungsgrades durch Medikamente prinzipiell denkbar. Durch die große Anzahl der verschiedenen Medikamente, die unterschiedliche Dauer der jeweiligen Einnahme und die multiplen Wechselwirkungen bei Mehrfachtherapien untereinander sowie mit der Epilepsie, kann ein gerichteter systematischer Fehler in dieser Stichprobe nicht erfaßt werden. Außerdem treffen diese Bedingungen auf alle Patienten des Kollektives zu. In dieser Untersuchung konnte entsprechend auch kein Zusammenhang zwischen eingenommener Medikamente und dem Q/R-Editierungsgrad festgestellt werden.

Präoperatives Intervall

Ein weiterer Faktor, der das Meßergebnis beeinflussen könnte, stellt der zeitliche Abstand zwischen dem letzten epileptischen Anfall und dem chirurgischen Eingriff dar. Diese Vermutung wird gestützt durch experimentelle Daten bei Ratten, die eine rapide Abnahme des Q/R-Editierungsgrades nach dem letzten Anfall zeigten [BERNARD et al., 1999]. Da zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit keine genauen Daten vorliegen muß der mögliche Fehler unberücksichtigt bleiben.

4.3.2 Kontrollkollektiv

Postmortales Intervall (PMI)

Als Kontrollkollektiv wurde postmortales Gewebe aus Resektaten von Verstorbenen herangezogen, da vergleichbares Gewebe gesunder Probanden nicht zur Verfügung steht. Das Gewebe des Kontrollkollektives wurde nach dem Todeseintritt in einem zeitlichen Intervall von sieben bis 18 Stunden entnommen und umgehend tiefgefroren. Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß solches postmortales Gewebe bei einem PMI von bis zu 96 Stunden noch aktive m-RNA enthält [BARTON et al., 1993; GILBERT et al., 1981; HARRISON et al., 1995; JOHNSON et al., 1986; PERRET et al., 1988]. Gezielte Untersuchungen der Glutamatrezeptorsubtypen zeigen eine Stabilität der AMPA-Untereinheiten von bis zu 18 Stunden [WANG et al., 2000]. Autolytische Prozesse, die innerhalb dieses postmortalen Intervalls nicht auszuschließen sind, beeinflussen die hier untersuchten Transkripte jedoch in gleicher Weise, so daß bei der Frage nach dem Grad der Editierung ein systematischer Fehler ausgeschlossen werden kann [WANG et al., 2000] (vgl. Kapitel 2.1). So finden sich vergleichbare Q/R-Editierungsgrade sowohl bei der Kontrolle A 4, mit einem PMI von sieben Stunden, als auch bei der Kontrolle A 11, mit einem PMI von 18 Stunden.

Altersverteilung

Ein wesentlicher Diskussionspunkt ist die unterschiedliche Alterszusammensetzung von Kontroll- und Patientenkollektiv. Im Hippocampus findet sich für das Kontrollkollektiv ein Altersdurchschnitt von 51,1 Jahren, dem im Patientenkollektiv ein Altersdurchschnitt von 28,1 Jahren gegenüber steht. Für den temporalen Neocortex zeigen sich Altersdurchschnitte von 47,7 Jahren für das Kontrollkollektiv zu 27,4 Jahren für das Patientenkollektiv. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, daß die gemessenen Differenzen der Q/R-Editierungsgrade nicht mit dem Alter der Kollektive korrelieren. Zum einen unterscheiden sich die Q/R-Editierungsgrade der jüngeren Personen im Kontrollkollektiv nicht von den älteren Personen. Und zum anderen zeigt die gezielte Veränderungen des Stichprobenumfanges des Patientenkollektives hin zu einer Angleichung der Altersdurchschnitte, daß sich die Kernaussagen dieser Untersuchung nicht ändern (vgl. Kapitel 3.4). Es kann daher davon ausgegangen werden, daß trotz des Altersunterschiedes in den beiden Kollektiven, keine Auswirkung auf das Studienergebnis besteht.

Darüber hinaus sind die vorliegenden Ergebnisse im nichtepileptischen Gewebe im wesentlichen konsistent mit früheren Untersuchungen über AMPA- und Kainatrezeptoren beim Menschen sowie im Tiermodell. Ausführliche Untersuchungen zu ontogenetischen Veränderungen von AMPA- und Kainatrezeptordichten in verschiedenen Hirnregionen beim Menschen erfolgten durch Johnson und Mitarbeiter. Dabei zeigten sich für den temporalen Neocortex und Hippocampus, keine wesentlichen Änderungen in den Rezeptordichten nach dem 10. Lebensjahr. Sie blieben bis weit über das 80. Lebensjahr stabil [JOHNSON et al., 1996]. Nur in den ersten Lebensjahren war eine Reduktion der Rezeptordichten nachweisbar. Auch bisherige Untersuchungen zur Q/R-Editierung beim Menschen zeigen für die einzelnen Untereinheiten Ergebnisse, die mit den hier vorliegenden Messungen vergleichbar sind.

So findet sich für die AMPA-Untereinheit GluR 2 ein Q/R-Editierungsgrad von nahezu 100 % sowohl im temporalen Neocortex [AKBARIAN et al., 1996; NUTT und KAMBOJ, 1994a; PASCHEN et al., 1994] als auch im Hippocampus [NUTT und KAMBOJ, 1994a].

Für die Kainat-Untereinheiten GluR 5 findet sich in den bisherigen Untersuchungen, je nach Rezeptortyp und Hirnregion, zum Teil größere Unterschiede im Grad der Q/R-Editierung [SEEBURG, 1996]. Die bisher einzige Untersuchung an humanen Gewebe für die Untereinheit GluR 5 zeigt, daß bereits mit dem 2. Lebensjahr Q/R-Editierungsgrade vorliegen, die mit denen im adultem Gewebe vergleichbar sind [NUTT und KAMBOJ, 1994b]. Diese liegen je nach Hirnregion zwischen 90 und 100 %. Nur im fetalen Gewebe und im Kleinhirn finden sich deutlich niedrigere Q/R-Editierungsgrade von ca. 70 %. Die reduzierten Q/R-Editierungsgrade in fetalem Gewebe sind übereinstimmend mit solchen Q/R-Editierungsgraden, die im Verlauf der frühen Ontogenese bei Ratten auftreten [BERNARD et al., 1999; BERNARD und KHRESTCHATISKY, 1994; PASCHEN et al. 1995, 1997]. Hier zeigen sich Q/R-Editierungsgrade von ca. 50 bis 60 % im adulten Gewebe mit deutlich geringerer Editierung von ca. 20 % im embryonalen Gewebe. Darüber hinaus fanden Bernard und Mitarbeiter [BERNARD et al., 1999] postembryonal eine nichtlineare Zunahme der Q/R-Editierung für die Kainat-Untereinheit GluR 5 von 15 bis 25 % auf 55 % je nach Hirnregion. Zum Teil zeigte sich aber auch eine transiente Reduktion der Q/R-Editierung, die eventuell spezifisch für die Ratte sein kann. Diese Zunahme konnten Paschen und Mitarbeiter [PASCHEN et al. 1995] jedoch nicht zeigen.

In der hier vorliegenden Untersuchung zeigen sich für das Kontrollkollektiv Q/R-Editierungsgrade, die je nach Gewebe und Person zwischen 40 und 75 % variieren. Diese Werte sind vergleichbar mit denen von Bernard [BERNARD et al., 1999], Paschen [PASCHEN et al. 1995] und Mitarbeitern, sind aber abweichend zu den Untersuchungen von Nutt und Kamboj. Die Unterschiede zur letztgenannten Arbeit liegen möglicherweise in personenspezifischen Daten. Insgesamt ergibt sich, daß die vorliegenden Variationen der Q/R-Editierungsgrade bei der hier untersuchten Patientengruppe mit großer Wahrscheinlichkeit nicht durch ontogenetische Faktoren beeinflusst wird.

Auch für die Kainat-Untereinheit GluR 6 ergeben sich je nach Hirnregion zum Teil größere Unterschiede im Grad der Q/R-Editierung [SEEBURG, 1996]. Für den Hippocampus finden sich Q/R-Editierungsgrade von durchschnittlich 70 %, die vergleichbar mit den Ergebnissen von Nutt und Kamboj [NUTT und KAMBOJ, 1994b] sind. Allerdings fand sich in dieser Arbeit im temporalen Neocortex nur die nicht editierte Variante der Kainat-Untereinheit GluR 6. Die von Paschen und Mitarbeitern [PASCHEN et al., 1994] ermittelten Daten liegen mit ca. 90 % dagegen deutlich höher als die vorliegenden. Eine mögliche Ursache kann die unterschiedliche Gewebeexpression der Kainat-Untereinheit GluR 6 sein. Während Paschen und Mitarbeiter den frontalen Cortex untersuchte, erfolgten die hier vorliegenden Messungen am temporalen Neocortex. Relativ hohe Werte im Frontalhirn konnten Bernard und Mitarbeiter auch für Ratten zeigen [BERNARD et al., 1999]. Ontogenetische Untersuchungen an Ratten zeigen weiterhin, daß bereits in der embryonalen Phase hohe Q/R-Editierungsgrade von ca. 80 % im Hippocampus und im temporalen Neocortex vorliegen und diese sich nur gering von denen adulter Tiere unterscheiden [BERNARD et al., 1999; PASCHEN et al., 1997].

Insgesamt sind die vorliegenden Ergebnisse zum Kontrollkollektiv mit den Untersuchungen der Literatur weitgehend übereinstimmend. Variationen der Q/R-Editierungsgrade im Rahmen der Ontogenese zeigen sich im embryonalen und fetalen Gewebe. Bereits im 2. Lebensjahr werden beim Menschen Q/R-Editierungsgrade erreicht, die mit denen von Erwachsenen identisch sind. Unterschiede finden sich eher hinsichtlich der verschiedenen Hirnregionen bzw. -strukturen oder im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen. Daher kann trotz des unterschiedlichen Altersdurchschnittes von Kontroll- und Patientenkollektiv von einem vernachlässigbaren Einfluß hinsichtlich der Gesamtaussage ausgegangen werden.

4.4 Editierungsgrade und patientenspezifische Daten

Bereits in Kapitel 3.5 wurde auf mögliche Zusammenhänge zwischen den Q/R-Editierungsgraden mit patientenspezifischen Daten hingewiesen. Dabei zeigte sich, daß trotz des inhomogenen Patientenkollektives und des untersuchungsbedingten geringen Stichprobenumfanges, ein Einfluß der Editierung durch die epileptische Erkrankung vorliegen kann. Am deutlichsten zeigt sich dies im Hippocampus für die Kainat-Untereinheit GluR 6. Aber auch für den temporalen Neocortex lassen sich solche Zusammenhänge aufzeigen. Hierbei zeigt sich, daß mit zunehmender Erkrankungsdauer der Epilepsie der Q/R-Editierungsgrad abnimmt.

4.4.1 Hippocampus

Für die Untereinheit GluR 5 läßt sich, wie aus Abbildung 4.1 erkennbar wird, keine mögliche Abhängigkeit zwischen den Q/R-Editierungsgraden und der Erkrankungsdauer der Patienten verifizieren.

Möglich ist, daß die größere Variabilität der Editierung der Kainat-Untereinheit GluR 5 während der Ontogenese, die bei Ratten gezeigt werden konnte [BERNARD et al., 1999; PASCHEN et al., 1995, 1997], hierfür verantwortlich sein könnte. Im Gegensatz zur Kainat-Untereinheit GluR 6, die bereits in der embryonalen Phase der ontogenetischen Entwicklung hohe Q/R-Editierungsgrade aufweist [PASCHEN et al., 1994], ist für die Kainat-Untereinheit GluR 5 ein Anstieg von durchschnittlich 20 % auf 50 % nachweisbar. Auch postnatal konnte ein Anstieg der Q/R-Editierung der Untereinheit GluR 5 bei Ratten festgestellt werden [BERNARD et al., 1999], während die Untereinheit GluR 6 auch nach der Geburt weiterhin relativ gleichförmig hohe Q/R-Editierungsgrade aufweist [BERNARD et al., 1999; PASCHEN et al., 1994, 1997].

Ein Zuwachs des Q/R-Editierungsgrades der Kainat-Untereinheit GluR 5 konnte im Verlauf der Embryogenese ebenfalls beim Menschen gezeigt werden, während die Untereinheit GluR 6 auch hier stabil hohe Werte aufweist [NUTT und KAMBOJ, 1994b]. Ein früher Erkrankungsbeginn in diesem Zeitraum, mit der Folge einer Abnahme der Editierung, könnte, aufgrund der größeren Variabilität der Q/R-Editierungsgrade der Untereinheit GluR 5, zu größeren Schwankungen in den Meßergebnissen führen. In der vorliegenden Untersuchung fällt auf, daß die Q/R-Editierung besonders dann gering ist,

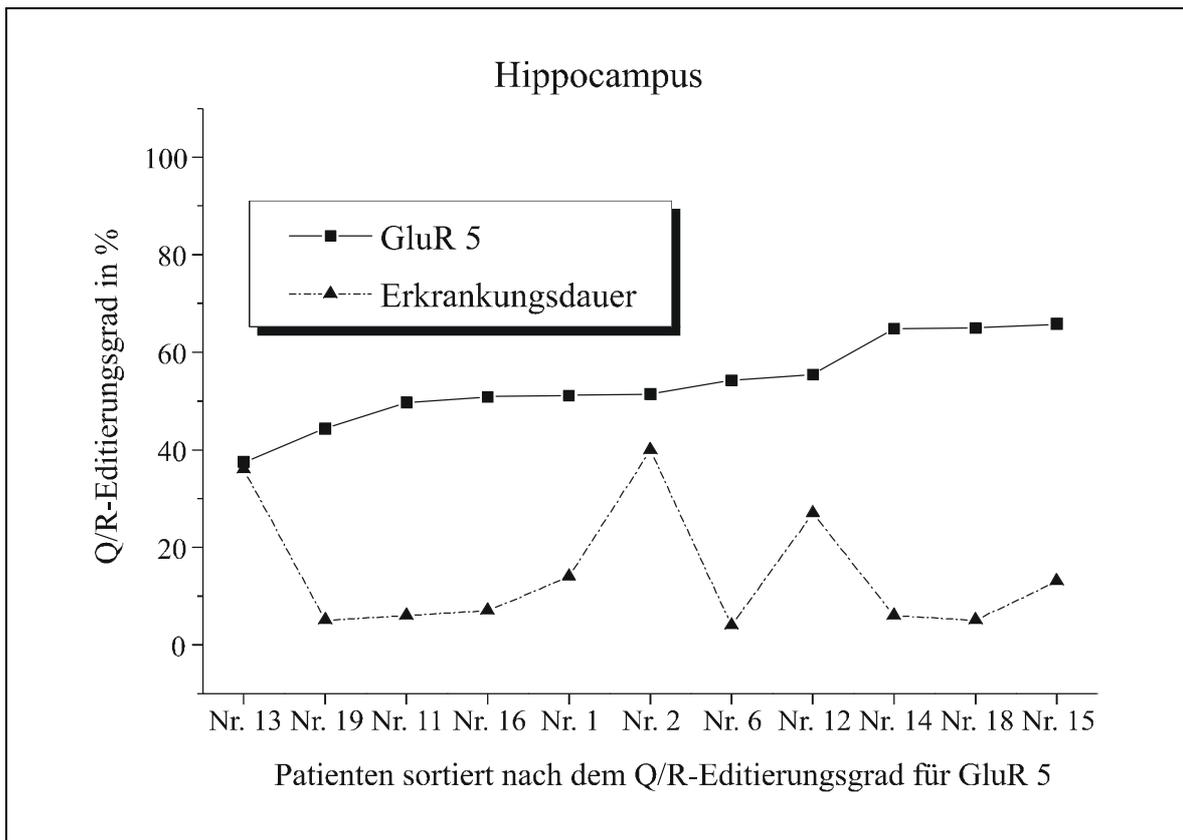


Abbildung 4.1: Patientenspezifische Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 5 (GluR 5) im Hippocampus aufgetragen gegenüber der Erkrankungsdauer der Patienten (Erkrankungsdauer).

wenn die Erkrankung sehr früh einsetzt (2. bis 3. Lebensjahr) und über einen relativ langen Zeitraum besteht (vgl. Fall-Nr. 18, 19).

Dagegen findet sich im Hippocampus für die Kainat-Untereinheit GluR 6 eine deutliche Abhängigkeit, die sich auch in den statistischen Daten (vgl. Kapitel 3.5.1.3) niederschlägt. Hier lässt sich bei linearer Zunahme des Editierungsgrades für die Erkrankungsdauer ein exponentieller Abfall 2. Grades zuordnen (vgl. Abbildung 4.2).

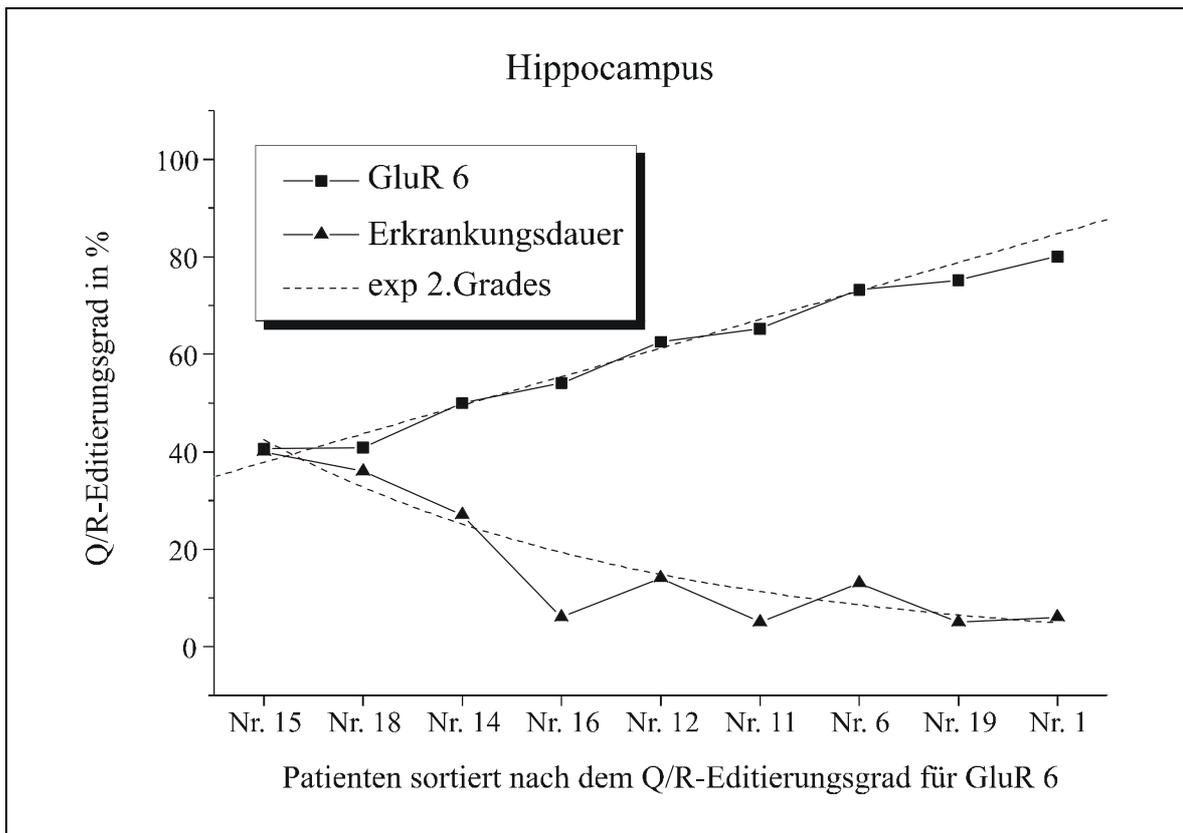


Abbildung 4.2: Patientenspezifische Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 6 (GluR 6) im Hippocampus aufgetragen gegenüber der Erkrankungsdauer der Patienten (Erkrankungsdauer), sowie zugehörige Splines. Für die Erkrankungsdauer ist ein Spline mit exponentiellen Abfall 2. Grades (exp 2. Grades) dargestellt.

4.4.2 Temporaler Neocortex

Vergleichbare Ergebnisse konnten, wenn auch weniger deutlich, für den temporalen Neocortex gefunden werden. Die statistischen Daten (vgl. Kapitel 3.5 und 3.5.2.3) zeigen eine gering ausgeprägte Korrelation und Signifikanz zwischen der Q/R-Editierung und der Erkrankungsdauer der Patienten im Vergleich zur Kainat-Untereinheit GluR 6 im Hippocampus. Dennoch lassen sich auch hier Zusammenhänge darstellen, die einen Abfall der Q/R-Editierung mit zunehmender Erkrankungsdauer der Epilepsie zeigen.

Für die Kainat-Untereinheit GluR 5 findet sich mit linearem Anstieg der Q/R-Editierung am wahrscheinlichsten ein linearer Abfall in der Erkrankungsdauer (vgl. Abbildung 4.3). Dies jedoch nur, wenn die Patientinnen Nr. 16 und Nr. 20 aus der Betrachtung ausgeschlossen werden. Diese Patientinnen weisen im Vergleich zu den übrigen Patienten der gleichen Altersgruppe einen relativ niedrigen Editierungsgrad auf. Die Werte für Kor-

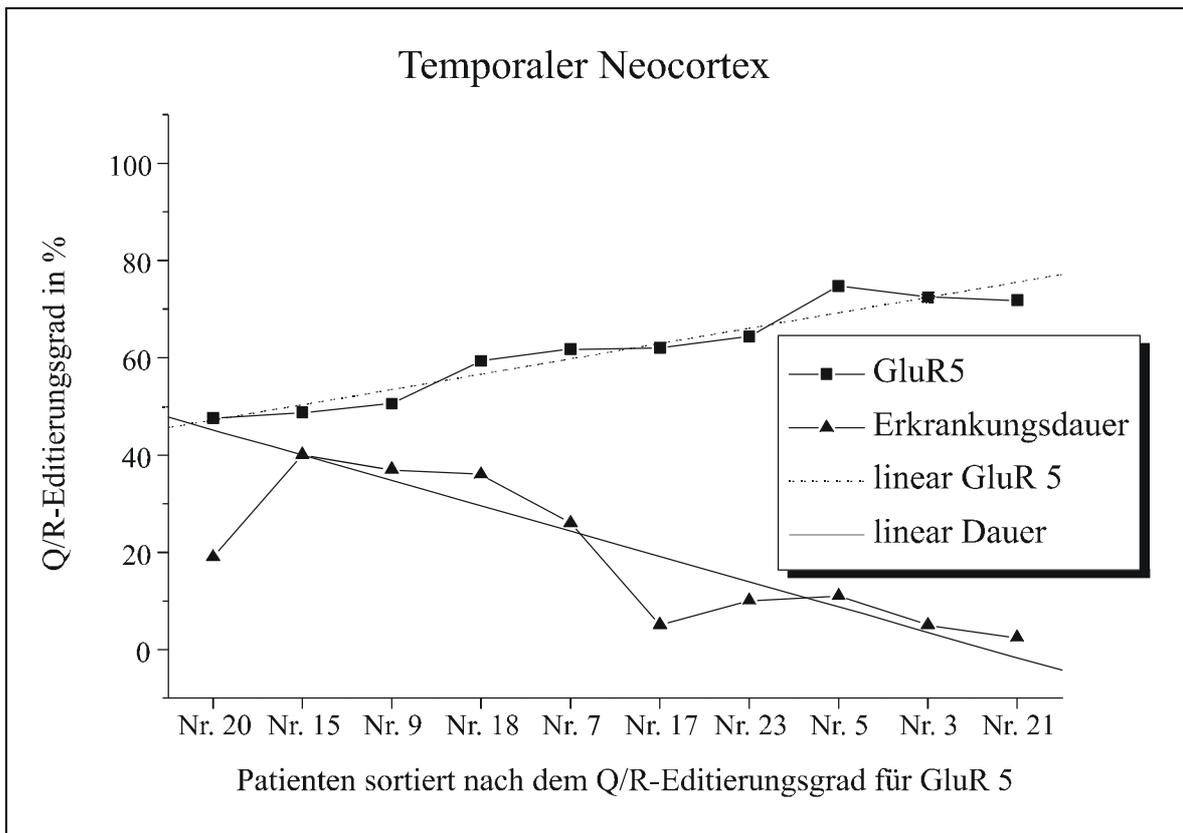


Abbildung 4.3: Patientenspezifische Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 5 (GluR 5) im Neocortex aufgetragen gegenüber der Erkrankungsdauer der Patienten (Erkrankungsdauer), sowie zugehörige Splines. Dargestellt sind jeweils lineare Splines für die Q/R-Editierungsgrade (linear GluR 5) und die Erkrankungsdauer (linear Dauer).

relation und Signifikanz steigen in diesem Fall sogar von $r = -0,62$ und $p = 0,033$ auf $r = -0,78$ und $p < 0,0084$.

In Analogie zu der ontogenetischen Entwicklung der Q/R-Editierungsgrade im Hippocampus liegt auch hier die Vermutung nahe, daß die größere Variabilität in der Ontogenese für die Kainat-Untereinheit GluR 5 [BERNARD et al., 1999] zu einer größeren Streuung der Meßergebnisse bezüglich der Erkrankungsdauer führen können.

Für die Untereinheit GluR 6 findet sich für den temporalen Neocortex dagegen ein wesentlich deutlicherer Zusammenhang. Dies allerdings nur dann, wenn bestimmte Patienten unberücksichtigt bleiben. Hierbei handelt es sich erneut um Patientin Nr. 16, mit einem relativ geringen Q/R-Editierungsgrad bei kurzer Erkrankungsdauer. Man kann dann dem linearen Anstieg der Q/R-Editierung einen Abfall in der Erkrankungsdauer gemäß einem Polynom 3. Grades zuordnen (vgl. Abbildung 4.4). Allerdings zeigt Abbildung 4.4

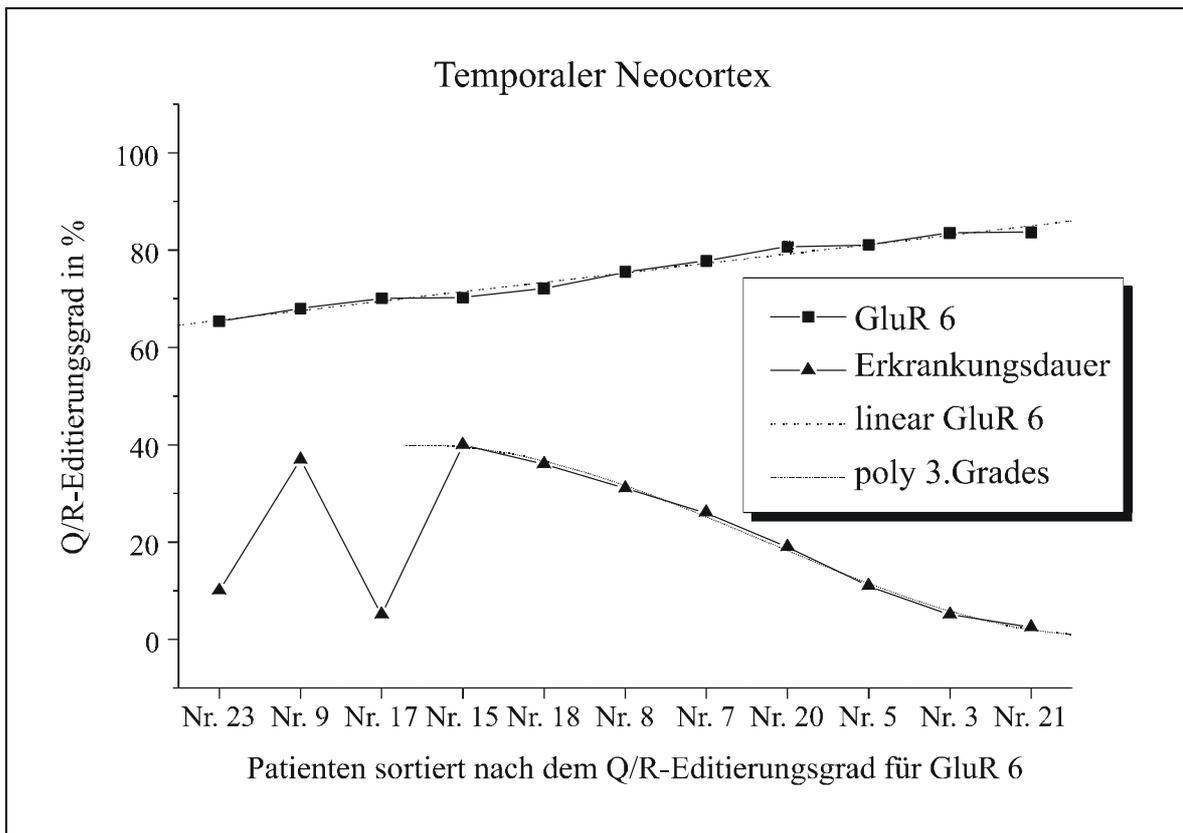


Abbildung 4.4: Patientenspezifische Q/R-Editierungsgrade für die Kainat-Untereinheit GluR 6 (GluR 6) im Neocortex aufgetragen gegenüber der Erkrankungsdauer der Patienten (Erkrankungsdauer), sowie zugehörige Splines. Dargestellt sind für die Q/R-Editierungsgrade ein linearer Spline (linear GluR 6), für die Erkrankungsdauer ein Polynom 3. Grades (poly 3. Grades).

auch, daß zwei weitere Patienten (Nr. 17 und 23) ebenfalls nicht diesem Polynom zugeordnet werden können. Diese gehören, wie Patientin Nr. 16, zu einer Gruppe von Patienten mit einer relativ kurzen Erkrankungsdauer. Außerdem weisen beide Patienten eine im Vergleich sehr hohe Anfallshäufigkeit auf. Der Ausschluß der Patienten Nr. 17 und Nr. 23 läßt dementsprechend die Werte für Korrelation und Signifikanz von $r = -0,42$ und $p = 0,177$ auf $r = -0,83$ und $p < 0,0029$ ansteigen. Doch auch die Patienten Nr. 3 und Nr. 21 zeigen diese patientenspezifischen Daten mit einem allerdings höherem Q/R-Editierungsgrad. Für diese beiden findet man jedoch auch einen extrem frühen Erkrankungszeitpunkt. Es bleibt daher zu diskutieren, wie weit hier die spezifische Pathologie der Epilepsie im jeweiligen Erkrankungsalter berücksichtigt werden muß. Aufgrund des zu geringen Stichprobenumfangs kann eine erkrankungsspezifische Auswertung nicht erfolgen.

Insgesamt zeigt sich unter der Voraussetzung, daß bestimmte Patienten aus der Betrachtung bzw. Analyse ausgeschlossen werden, auch für den temporalen Neocortex, daß wahrscheinlich ein Zusammenhang zwischen der Erkrankungsdauer und den jeweiligen Q/R-Editierungsgraden der Kainat-Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 existiert.

4.5 Q/R-Editierung und Epileptogenese

Die Bedeutung und der Zusammenhang der Q/R-Editierung der Glutamatrezeptoren für die Epileptogenese wurde bereits in unterschiedlichen tierexperimentellen Studien dargestellt [PELLEGINI-GIAMPIETRO et al., 1997; SEEBURG, 1996; SPRENGEL et al., 1998]. Weitere Hinweise ergaben sich durch Experimente an transfizierten Tieren, bei denen das zugehörige Gen zur Q/R-Editierung oder die für die Q/R-Editierung erforderlichen Enzyme geblockt wurden.

4.5.1 AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR 2 und die Epileptogenese

Bei Untersuchungen mit transfizierten Mäusen mit einem inkompetenten Q/R-Gen kam es kurz nach der Geburt der Tiere zur Ausbildung von epileptischen Anfällen. Diese Tiere erreichten nicht das adulte Stadium, sie verstarben in der Regel drei Wochen postnatal [BRUSA et al., 1995]. Die Autoren führen dies auf eine verstärkte Ca^{2+} -Leitfähigkeit der Rezeptorkanäle zurück. Eine weitere Schlußfolgerung der Autoren ist, daß der Beginn und die Ausprägung der epileptischen Anfälle vom Anteil der Q/R-Editierung der AMPA-Rezeptoren abhängt. Vergleichbare Ergebnisse erzielte man auch bei Hemmung des spezifischen Q/R-Editierungsenzyms ADAR 2 [HIGUCHI et al., 2000]. Letztendlich kam es aber auch bei diesen Tieren stets zu letalen Verläufen.

Doch nicht jede Reduktion der Q/R-Editierung der AMPA-Untereinheit GluR 2 führt zwangsläufig zu einem frühen Zelluntergang. Untersuchungen von Feldmeyer und Mitarbeitern zeigten, daß Änderungen im Gens der AMPA-Untereinheit GluR 2 eine unterschiedliche Expression der Untereinheit GluR 2 sowie eine variable Reduktion der Q/R-Editierung zur Folge hatten. Bei allen Tieren kam es zu einer erhöhten Ca^{2+} -Leitfähigkeit. Der vermehrte Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen führte zu einer vom NMDA-Rezeptor abhängigen LTP, zeigte jedoch keine Zytotoxizität mit letalem Verlauf [FELDMEYER et al., 1999]. Die bei den Tieren auftretenden epileptischen Anfälle

korrelierten in ihrem Ausmaß zwar mit der Zunahme der Rezeptorleitfähigkeit, waren jedoch unabhängig von der Reduktion der Q/R-Editierung.

Die bislang einzige Veröffentlichung über Q/R-Editierungsgrade bei Patienten mit Temporallappen-Epilepsie stammt von Grigorenko und Mitarbeitern [GRIGORENKO et al., 1998]. In dieser Untersuchung wurden die Q/R-Editierungsgrade der Untereinheiten GluR 2 und GluR 6 im Hippocampus analysiert. Für die AMPA-Untereinheit GluR 2 ermittelten sie eine nahezu vollständige Q/R-Editierung im Hippocampus. Einzig bei zwei jungen Personen fanden sich Hinweise einer fehlenden Q/R-Editierung. Die Autoren deuten dies eher als eine Folge der chronischen epileptischen Aktivität und weniger als eine Störung in der ontogenetischen Entwicklung. In der vorliegenden Studie stimmen die Ergebnisse beim Menschen weitgehend mit denen bisheriger Studien von Grigorenko und Mitarbeitern [GRIGORENKO et al., 1998] überein. Es fand sich für die AMPA-Untereinheit GluR 2 eine fast 100 %ige Q/R-Editierung im Hippocampus und im temporalen Neocortex. Im Widerspruch zu den Untersuchungen von Grigorenko zeigen die vorliegenden Ergebnisse aber auch für junge Patienten im Alter von zwei bis sieben Jahren (Nr. 3, 17, 19, 21) eine vollständige Q/R-Editierung und bestätigen damit nicht das von Grigorenko gefundene Meßergebnis.

Insgesamt zeigen die frühere [GRIGORENKO et al., 1998] und die vorliegende Untersuchung beim Menschen, daß die Q/R-Editierung der Untereinheit GluR 2 bei den chronisch erkrankten Epilepsiepatienten nicht verändert ist. Dieses Ergebnis wird weiterhin bestätigt durch eine Untersuchung an „gekindelten“ Tieren, bei denen auch nach einem längeren Erkrankungszeitraum (> vier Wochen) keine Änderungen der Q/R-Editierung der AMPA-Untereinheit GluR 2 festgestellt werden konnte [KAMPHUIS et al., 1995b]. Eine Änderung der Q/R-Editierung der AMPA-Untereinheit GluR 2 ist auch insofern auszuschließen, da „geringe“ Änderungen im Q/R-Editierungsgrad bereits zu einem letalen Prozeß führen können, wie dies tierexperimentelle Untersuchungen zeigten [BRUSA et al., 1995; HIGUCHI et al., 2000; SEEBURG et al., 2001]. Andererseits scheinen gezielte Änderungen im entsprechenden Gen der AMPA-Untereinheit GluR 2 zu epileptischen Anfällen zu führen und unabhängig von der Q/R-Editierung der Untereinheit GluR 2 [FELDMEYER et al., 1999] zu sein. Ein weiterer Zusammenhang ist wohl eher mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen z. B. der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) [TAKUMA et al., 1999] gegeben.

4.5.2 Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 5 und die Epileptogenese

Bislang existierte keine Studie, die die Q/R-Editierung der Kainat-Untereinheit GluR 5 im chronisch epileptischen Hirngewebe des Menschen im Zusammenhang mit der Epilepsie analysierte. Die einzige Veröffentlichung mit einer Blockierung der Q/R-Editierung Kainat-Untereinheit GluR 5 an transfizierten Mäusen zeigte keine auffälligen Verhaltensänderungen und Hinweise als Möglichkeit für eine epileptogene Ursache [SAILER et al., 1999]. Auch im Kindling-Modell an Ratten konnte keine Änderung der Q/R-Editierung nachgewiesen werden [KAMPHUIS et al., 1995b]. Die hier vorliegenden Meßergebnisse zeigen eine Abnahme der Q/R-Editierung im Hippocampus und eine signifikante Zunahme im temporalen Neocortex von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie gegenüber. Weiterhin gibt es Hinweise für eine Abnahme der Q/R-Editierung im temporalen Neocortex mit zunehmender Erkrankungsdauer der Patienten. Die Bedeutung dieses Ergebnisses ist dabei nicht isoliert zu betrachten, sondern in Kombination mit den Meßergebnissen für die Kainat-Untereinheit GluR 6, für die ein gleichartiges Verhalten festgestellt werden konnte.

4.5.3 Kainat-Rezeptoruntereinheit GluR 6 und die Epileptogenese

Die vermehrte Ca^{2+} -Leitfähigkeit der Kainat-Rezeptorkanäle bei fehlender Q/R-Editierung der Kainat-Untereinheit GluR 6 ließ die Hypothese zu, daß eine veränderte Q/R-Editierung einen Einfluß oder eine Ursache für die Entstehung neuronaler Dysfunktionen, wie z. B. Epilepsien, besitzt. Im Tiermodell konnte im Hippocampus bei gekindelten Ratten 24 Stunden nach dem epileptischen Anfall keine Änderung festgestellt werden [KAMPHUIS et al., 1995b], dagegen war nach Tagen bzw. Wochen eine geringe Abnahme der Q/R-Editierung der Untereinheit GluR 6 nachweisbar [BERNARD et al., 1999]. Einen ersten direkten Nachweis fand man mit Hilfe transfizierte Mäuse, bei denen die genetische Manipulation des für die Kainat-Untereinheit GluR 6 erforderlichen ECS^1 zu Lerndefiziten und zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber epileptogenen Stimuli (hier: Kainat-Applikation) führte [VISSEL et al., 2001]. Die ersten Untersuchungen bei Menschen mit einer epileptischen Erkrankung zeigten einen erhöhten Anteil der Q/R-Editierung im Hippocampus bei Patienten mit einer Ammonshorn-Sklerose (AHS) [GRIGORENKO et al., 1998]. Patienten ohne AHS wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Veränderung

auf. Im Gegensatz dazu zeigen die vorliegenden Untersuchungen im Hippocampus sogar eine Abnahme der Q/R-Editierung für die Kainat-Untereinheit GluR 6. Dabei findet sich kein Unterschied zwischen den Patienten mit und ohne einer AHS. Im temporalen Neocortex konnte eine signifikante Zunahme der Q/R-Editierung nachgewiesen werden. Eine Ursache für die differierenden Ergebnisse zu der Arbeit von Grigorenko könnten unterschiedlich analysierte hippocampale Strukturen sein, die in den Operationsresektaten durch die Hippocampussklerose nicht mehr sicher zuzuordnen sind. Diese Strukturen weisen allerdings eine unterschiedliche Q/R-Editierung auf [MACKLER und EBERWINE, 1993; SEEBURG, 1996]. Auch verschiedene Details der Patientenkollektive, wie z. B. die Operationsverfahren und die medikamentöse Therapie der Patienten, könnten für die differierenden Ergebnisse verantwortlich sein.

4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung deuten darauf hin, daß eine Dysfunktion der Q/R-Editierung der Glutamatrezeptorkanäle eine wesentliche Bedeutung im Zusammenhang mit der Epilepsie besitzt. Sie steht damit in Übereinstimmung mit verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen [PELLEGINI-GIAMPIETRO et al., 1997; SEEBURG, 1996; SEEBURG et al. 1998; SPRENGEL et al., 1998]. Von den drei untersuchten Untereinheiten GluR 2, GluR 5 und GluR 6 zeigt die Q/R-Editierung der AMPA-Untereinheit GluR 2 keine Änderung im chronisch epileptischen Gewebe beim Menschen. Dagegen existieren gleichsinnige Veränderungen der Q/R-Editierung der Kainat-Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 mit einem Abfall der Q/R-Editierung im Hippocampus und einer Zunahme im temporalen Neocortex. Ob diese Änderungen ursächlich zur Entstehung und Chronifizierung der Epilepsie beitragen oder eine Folge der epileptischen Erkrankung ist kann nicht näher analysiert werden. Aus den tierexperimentellen und Funktionsuntersuchungen der Kainatrezeptoren läßt sich allgemein schließen, daß eine Reduktion der Q/R-Editierung im Hippocampus aufgrund der damit einhergehenden Erhöhung der Ca^{2+} -Leitfähigkeit eher eine neurotoxische Wirkung auf die Neurone ausübt. Damit übereinstimmend zeigen fast alle der untersuchten Patienten eine Sklerose des Hippocampus auf. Dagegen deutet die Zunahme der Q/R-Editierung im temporalen Neocortex, die mit einer Reduktion der Ca^{2+} -Leitfähigkeit der Kainat-Rezeptorkanäle

¹ : intronic editing complementary site, vgl. S. 6 Kapitel 1.4

einhergehen dürfte, auf einen kompensatorischen Mechanismus hin, um die erhöhte epileptische Aktivität der Zellen und den damit einhergehend verstärkten Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen zu reduzieren. Auch die Abnahme der Q/R-Editierung der Kainat-Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 mit zunehmender Dauer der Epilepsie würde dann für einen allgemeinen Zelluntergang mit Störung der Regulation der Q/R-Editierung sprechen. Eine Besonderheit ist, daß für beide Kainat-Untereinheiten eine gleichsinnige Änderung nachgewiesen werden konnte. So zeigen neun von elf Patienten im Hippocampus und zehn von 13 Patienten im temporalen Neocortex eine gleichartige Veränderung der Q/R-Editierung im Sinne einer Zu- oder Abnahme. Aufgrund dieser Tatsache kann angenommen werden, daß beide Kainat-Untereinheiten einer gemeinsamen Regulation unterliegen. Von Interesse ist hier eine neuere Untersuchung, die die R/G-Editierung der AMPA-Untereinheit GluR 2 im zum Teil gleichen Patientenkollektiv analysierte. Hier zeigt sich tendentiell eine gleichsinnige Änderung der R/G-Editierung wie für die beiden Kainat-Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 [VOLLMAR et al., 2002].

In diesem Zusammenhang sind die spezifischen RNA-abhängigen Adenosindeaminasen von Bedeutung, von denen bisher drei Subtypen (ADRA 1 bis ADRA 3) bekannt sind. Sie induzieren die Deaminierung von Adenin zu Inosin an der doppelsträngigen RNA und führen damit zu einem Aminosäurenwechsel von DNA zur RNA [RUETER et al., 1995; MELCHER et al., 1996] mit der Folge der Editierung. Während für ADAR 3 die Bedeutung noch unklar ist, sind ADAR 1 und ADAR 2 u. a. verantwortlich für die Q/R- und die R/G-Editierung von Glutamat-Rezeptorsubtypen [MAAS et al., 1997]. Dabei existiert für die einzelnen Deaminasen sowohl eine spezifische als auch eine überlappende Funktionalität hinsichtlich der Rezeptorsubtypen. Während ADAR 1 sich sowohl für die R/G-Editierung der AMPA-Untereinheit GluR 2 als auch für die Q/R-Editierung der Kainat-Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 verantwortlich zeichnet, ist ADAR 2 spezifisch für die Q/R-Editierung der AMPA-Untereinheit GluR 2 [LAI et al., 1997, MAAS et al., 1997]. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Untersuchung scheint es daher möglich, daß bei Patienten mit einer Epilepsie die Funktion der Deaminase ADAR 1 verändert ist und damit eine herausragende Rolle spielt. Dabei könnte eine Funktionsminderung von ADAR 1 im Hippocampus zu einer Reduktion der Q/R-Editierung der Kainat-Untereinheiten GluR 5 und GluR 6 führen, mit der Folge einer Verstärkung der epileptischen Anfälle durch einen vermehrten Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen. Dagegen wäre im temporalen Neocortex die Wirkung von

ADAR 1 kompensatorisch verstärkt, weswegen die Q/R-Editierung zunimmt. ADAR 2 scheint dagegen eine geringere Bedeutung zu haben.

Es wäre von großem Interesse für nachfolgende Untersuchungen daher die Q/R-Editierung in einzelnen Neuronen unter Berücksichtigung der Gewebezusammensetzung zu ermitteln. Weiterhin wäre der Aspekt zu berücksichtigen, daß nicht einzelne Kompensationsmechanismen innerhalb einer Glutamat-Untereinheit im Zusammenhang mit der Epilepsie bestehen, sondern daß ein mehrseitiger Regulationsprozeß existieren könnte. Damit wäre es interessant mehr über die gewebetypische Verteilung und die Aktivität der RNA-abhängigen Deaminasen im Zusammenhang mit der Q/R-Editierung bei chronisch erkrankten Epilepsiepatienten zu erfahren. Weiterhin wären die Identifikation und die Modulation der Regulationsmechanismen zur Steuerung der Deaminasen von großem Interesse.

Literaturverzeichnis

Aikens, 1989:

Aikens, R.S., Agard, D.A., Sedat, J.W. (1989) *Methods Cell Biol.* **29**, 291-313.

Akbarian, 1995:

Akbarian, S., Smith, M.A., Jones, E.G. (1985) Editing for an AMPA receptor subunit RNA in prefrontal cortex and striatum in Alzheimer's disease, Huntington's disease and schizophrenia. *Brain Res.* **699**, 297-304.

Avoli und Oliver, 1989:

Avoli, M., Olivier, A. (1989) Electrophysiological properties and synaptic responses in the deep layers of human epileptogenic neocortex in vitro. *J. Neurophysiol.* **61**, 589-606.

Babb, 1998:

Babb, T.L., Ying, Z., Hadam, J., Penrod, C. (1998) Glutamate receptor mechanisms in human epileptic dysplastic cortex. *Epilepsy Res.* **32**, 23-33.

Baumann, 1978:

Baumann, R., Marx, M., Leonidakis, M. (1978) Epilepsy in rural Kentucky: prevalence in a population of school age children. *Epilepsia* **19**, 75-80.

Barton, 1993:

Barton, A.J.L., Pearson, R.C.A., Najlerahim, A., Harrison, P.J. (1993) Pre- and postmortem influences on brain RNA. *J. Neurochem.* **61**, 1-11.

Ben-Ari, 1985:

Ben-Ari, Y. (1985) Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **14**, 375-403.

Bernard, 1999:

Bernard, A., Ferhat, L., Dessi, F., Charton, G., Represa, A., Ben-Ari, Y., Khrestchatisky, M. (1999) Q/R editing of the rat GluR5 and GluR6 kainate receptors in vivo and in vitro: evidence for independent development, pathological and cellular regulation. *European J. of Neuroscience.* **11**, 604-616.

Bernard und Khrestchatisky, 1994:

Bernard, A., Khrestchatisky, M. (1994) Assessing the extent of RNA editing in the TM II regions of GluR5 and GluR6 kainate receptors during development. *J. Neurochem.* **62**, 2057-2060.

Bresloff, 1975:

Bresloff, J.L., Crothers D.M. (1975) DNA-ehidium reaction kinetics: Demonstration of direct ligand transfer between DNA binding sites. *J. Mol. Biol.* **95**, 103-123.

Bruno, 1993:

Bruno, V., Scapagnini, U., Canonico, P.L. (1993) Excitatory amino acids and neurotoxicity. *Funct. Neurol.* **8** 4, 279-292.

Brusa, 1995:

Brusa, R., Zimmermann, F., Koh, D.-S., Feldmeyer, D., Gass, P., Seeburg, P.H., Sprengel, R. (1995) Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. *Science* **270**, 1677-1680.

Buckland, 1996:

Buckland, P.R., Spurlock, G., Mc Guffin, P. (1996) Amphetamine and vigabatrin down regulate aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA levels. *Mol. Brain Res.* **35**, 69-76.

Burnashev, 1992a:

Burnashev, N., Khodorova, A., Jonas, P. (1992) Calcium-permeable AMPA-kainate receptors in fusiform cerebellar glia cells. *Science* **256**, 1566-1570.

Burnashev, 1992b:

Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P.H., Sakmann, B. (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* **8**, 189-198.

Burnashev, 1996:

Burnashev, N., Villarroel, A., Sakmann, B. (1996) Dimensions and ion selectivity of recombinant AMPA and kainate receptor channels and their dependence on Q/R site residues. *J. Physiol. London* **496**, 403-418.

Cantor, 1980:

Cantor, C.R., Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry, Part III, Chapter 23* pp. 1183-1267, Freeman, San Francisco.

Castillo und Babson, 1998:

Castillo, M.R., Babson, J.R. (1998) Ca(2+)-dependent mechanisms of cell injury in cultured cortical neurons. *Neuroscience* **86** 4, 1133-1144.

Carlson, 2000:

Carlson, N.G., Howard, J., Gahring, L.C., Rogers, S.W. (2000) RNA editing (Q/R site) and flip/flop splicing of AMPA receptor transcripts in young and old brains. *Neurobiol. Aging* **4**, 599-606.

Cathala, 1983:

Cathala, G., Savouret, J.-F., Mendez, B., West, B.L., Karin, M., Martial, J.A., Baxter, J.D. (1983) A method for isolation of intact translationally active ribonucleic acid. *DNA* **2**, 329-335.

Cha, 1994:

Cha, J.-H.J., Kinsman, S.L., Johnston, M.V. (1994) RNA editing of human glutamate receptor subunit. *Mol. Brain Res.* **22**, 323-328.

Chittajallu, 1999:

Chittajallu, R., Braithwaite, S.P., Clarke, V.R., Henley, J.M. (1999) Kainate receptors: Subunits, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 26-35.

Choi und Rothman, 1987:

Choi, D.W., Rothman, S.M. (1987) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann. Rev. Neurosci.* **13**, 171-182.

Chomczynski, 1987:

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.

Chou, 1992:

Chou, Q., Russell, M., Birch, D.E., Raymond, J., Bloch, W. (1992) *Nucl. Acids Res.* **19**, 4008.

Comb, 1987:

Comb, M., Hyman, S.E., Goodman, H.M. (1987) Mechanism of trans-synaptic regulation of gene expression *Trends Neurosci.* **10**, 473-478.

Contractor, 1992:

Contractor, A., Swanson, G., Heinemann, S.F. (2001) Kainate receptors are involved in short- and long term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* **29**, 209-216.

Curutchet, 1992:

Curutchet, P., Bochet, P., Decarvalho, L.P., et al. (1992) In the GluR1 glutamate receptor subunit a glutamine to histidine point mutation suppresses inward rectification but not calcium permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 1089-1093.

Dichter und Spencer, 1979:

Dichter, M., Spencer, W.A. (1979) Penicillin-induced interictal discharges from the cat hippocampus. II. Mechanisms underlying origin and restriction. *J. Neurophysiol.* **32**, 663-687.

Dingledine, 1992:

Dingledine, R., Hume, R.I., Heinemann, S.F. (1992) Structural determinants of barium permeation and rectification in non-NMDA glutamate receptor channels. *J. Neurosci.* **12**, 4080-4087

Dingledine, 1999:

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **51**, No. 1.

Doerfer und Wässer, 1987:

Doerfer, J., Wässer, S. (1987) An epidemiologic study of febrile seizures and epilepsy in children. *Epilepsy Res.* **1**, 149-151.

Dragunow, 1989:

Dragunow, R.W., Currie, R.W., Faull, R.L.M., et al. (1989) Immediate-early genes, kindling and long-term potentiation. *Neurosci.Behaviour Res.* **31**, 301-313.

Egebjerg, 1991:

Egebjerg, J., Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I., Heinemann, S. (1991) Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature* **351**, 745-748.

Egebjerg und Heinemann, 1993:

Egebjerg, J., Heinemann, S.F. (1993) Ca²⁺ permeability of unedited and edited versions of kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 755-759.

Elger, 1988:

Elger, C.E. (1988) Stand der Epilepsiechirurgie In: *Epilepsie 87* (Hrsg.: E.-J. Speckmann und D.G. Palm). Einhorn-Verlag, Reinbek. pp 100-115.

Feldmeyer, 1999:

Feldmeyer, D., Kask, K., Brusa, R., Kornau, H.C., Kolhekar, R., Rozov, A., Burnashev, N., Jensen, V., Hvalby, O., Sprengel, R., Seeburg, P.H. (1999) Neurological dysfunctions in mice different levels of the Q/R site-unedited AMPAR subunit GluR-B. *Nat. Neurosci.* **21**, 57-64.

Fisher, 1989:

Fisher, R.S. (1989) Animal models of the epilepsies. *Brain Res. Rev.* **14**, 245-278.

Forsgren, 1996:

Forsgren, L., Bucht, G., Eriksson, S., Bergmark, L. (1996) Incidence and clinical characterization of seizures in newly referred adults. *Epilepsia* **37**, 224-229.

Freeman, 1990:

Freeman, S.E., Larcom, L.L., Thompson, B.D. (1990) Electrophoretic separation of nucleic acids: Evaluation by video and photographic densitometry. *Electrophoresis* **11**, 425-431.

Frerking, 2001

Frerking, M., Schmitz, D., Zhou, Q., Johansen, J., Nicoll, R.A. (2000) Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3→CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *J. o. Neuroscience* **21**(9), 342-351.

Frerking und Nicoll, 2000:

Frerking, M. Nicoll, R.A. (2000) Synaptic kainate receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 342-351.

Fröscher, 1992: vgl. Madeja#

Fröscher, W. (1992) Medikamentöse Therapie der Epilepsien - Regelbehandlung und Vorgehen bei Problemfällen. In: *Epileptische Anfälle, Entstehung und Therapie* (Hrsg.: J. Walden, O.W. Witte und E.-J. Speckmann). Springer-Verlag, Berlin pp 69-83.

Gassen, 1994:

Gassen, H.G., Sachse, G.E., Schulte, A. (1994) PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Gilbert, 1981:

Gilbert, J.M., Brown, B.A., Stocchi, P., Bird, E.D., Marotta, C.A. (1981) The preparation of biologically active messenger RNA from human postmortem brain tissue. *J. Neurochem.* **36**, 976-984.

Glazer, 1990:

Glazer, A.N., Peck, K., Mathies, R.A. (1990) A stable double-stranded DNA-ethidium homodimer complex: Application to picogram fluorescence detection of DNA in agarose gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry* Vol. **87**, pp. 3851-3855.

Goddard, 1969:

Goddard, G.V., Mc Intyre, D.C., Leech, C.K. (1969) A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.* **25**, 295-330.

Goddard, 1983:

Goddard, G.V. (1983) The kindling model of epilepsy. *Trends Neurosci.* **6**, 275-279.

Goldensohn und Purpura, 1963:

Goldensohn, E.S., Purpura, D.P. (1963) Intracellular potentials of cortical neurons during focal epileptogenic discharges. *Science* **139**, 840-842.

Gracia, 1990:

Gracia, F.J., Loo, S., Castillo, L., et al. (1990) Epidemiology of epilepsy in Guaymí Indians from Bocas del Toro province, Republic of Panama. *Epilepsia* **31**, 718-723.

Gregor, 1993:

Gregor, P., O'Hara, B.F., Yang, X., Uhl, G.R. (1993) Expression and novel subunit isoforms of glutamate receptor genes GluR5 and GluR6. *Neuroreport* **4** (12), 1343-1346.

Grigorenko, 1998:

Grigorenko, E.V., Bell, W.L., Glazier, S., Pons, T., Deadwyler, S. (1999) Editing status at the Q/R site of the GluR2 and GluR6 glutamate receptor subunits in the surgically excised hippocampus of patients with refractory epilepsy. *NeuroReport* **9**, 2219-2224.

Harrison, 1995:

Harrison, P.J., Heath, P.R., Eastwood, S.L., Burnet, P.W.J., Mc Donald, B., Pearson, R.C.A. (1995) The relative importance of premortem acidosis and postmortem interval for human brain gene expression studies: selective mRNA vulnerability and comparison with their encoded proteins. *Neurosci. Lett.* **200**, 151-154.

Hauser und Hesdorffer, 1990:

Hauser, A., Hesdorffer, D.H. (1990) *Epilepsy: Frequency, Causes and Consequences*. New York: Demos Press

Hauser, 1993:

Hauser, W., Annegers, J.F., Kurland, L.T. (1993) The incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota, 1935-1984. *Epilepsia* **34**, 453-468.

Hauser, 1997:

Hauser, W., (1997) *Incidence and Prevalence in Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. by Engel, J. and Pedley, T.A.: Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Heinemann, 1977:

Heinemann, U., Lux, H.D., Gutnik, M.J. (1977) Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp. Brain Res.* **27**, 237-243.

Henneberry, 1992:

Henneberry, R.C. (1992) Cloning of the genes for excitatory amino acid receptors. *Bioessays* **14**, 465-471.

Herb, 1992:

Herb, A., Burnashev, N., Werner, P., Sakamnn, B., Wisden, W., Seeburg, P.H. (1992) The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* **4**, 775-785.

Higuchi, 2000:

Higuchi, M., Maas, S., Single, F.N., Hartner, J., Rozov, A., Burnashev, N., Feldmeyer, D., Sprengel, R., Seeburg, P.H. (2000) Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* **406**, 78-81.

Hollmann, 1991:

Hollmann, M., Hartley, M., Heinemann, S.F. (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* **252**, 851-853.

Hollmann und Heinemann, 1994:

Hollmann, M., Heinemann, S.F. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 31-108.

Hoo, 1994:

Hoo, K.H., Nutt, S.L., Fletcher, E.J., Elliott, C.E., Korczak, B., Deverill, R.M., Rampersad, V., Fantaske, R.P., Kamboj, R.K. (1994) Functional expression and pharmacological characterization of the human EAA4 (GluR6) glutamate receptor: a kainate selective channel subunit. *Recept. Channels* **2** (4), 327-337.

Hume, 1991:

Hume, R.I., Dingledine, R., Heinemann, S.F. (1991) Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* **253**, 8-1031.

Hwa, 1992:

Hwa, G.G.C., Avoli, M., Oliver, A., Villemure, J.G. (1992) Bicullin-induced epileptogenesis in the human neocortex maintained in vitro. *Exp. Brain Res.* **83**, 329-339.

Janz, 1985:

Janz, D. (1985) Epilepsy: Seizures and Syndromes. In: *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol. 74, Antiepileptic Drugs (Hrsg.: H.-H. Frey und D. Janz). Springer-Verlag, Berlin pp 3-34.

Janz, 1989:

Janz, D. (1989) How does one assess the severity of epilepsy? In: Trimble, M.R.: *Chronic epilepsy. Ist prognosis and management*, John Wiley and Sons, 21-36.

Johnson, 1986:

Johnson, S.A., Morgan, D.G., Finch, C.E. (1986) Extensive postmortem stability of RNA from rat and human brain. *J. Neurosci. Res.* **16**, 267-280.

Juul-Jensen, 1983:

Juul-Jensen, P., Foldspang, A. (1983) natural history of epileptic seizures. *Epilepsia* **24**, 297-312.

Kamphuis, 1991:

Kamphuis, W., Gorter, J.A., Lopes da Silva, F. (1991) A long-lasting decrease in the inhibitory effect of GABA on glutamate responses of hippocampal pyramidal neurons induced by kindling epileptogenesis. *Neurosci.* **41**, 425-431.

Kamphuis, 1995a:

Kamphuis, W., Hendriksen, H., Diegenbach, P.C., Lopes da Silva, F.H. (1995) N-Methyl-D-Aspartate and Kainate receptor gene expression in hippocampal pyramidal and granular neurons in the kindling model of epileptogenesis. *Neurosci.* **67**, 551-559.

Kamphuis, 1995b:

Kamphuis, W., Lopes da Silva, F.H. (1995) Editing status at the Q/R site of glutamate receptor-A, -B, -5 and -6 subunit mRNA in the hippocampal kindling model of epilepsy. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **1**, 35-42.

Kullmann, 2000:

Kullmann, D.M., Asztely, F., Walker, M.C. (2000) The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cell. Mol. Life. Sci.* **57**, 1551-1561.

Kutsuwada, 1992:

Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E. Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M., Mishina, M. (1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* **358**, 36-41.

Lai, 1990:

Lai, C.-W., Huang, X., Lai, Y.-H.C., Zhang, Z., Lui, G., Yang, M.-Z. (1990) survey of public awareness, understanding, and attitudes toward epilepsy in Henan Province, China. *Epilepsia* **31**, 182-187.

Lai, 1997:

Lai, F., Chen, C.-X., Lee, V., Nishikura, K. (1997) Dramatic increase of the RNA Editing for glutamate receptor subunits during terminal differentiation of clonal human neurons. *J. o. Neurochem.* **69**, 43-52.

Laurie und Seeburg, 1994:

Laurie, D.J., Seeburg, P.H. (1994) Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain MNDAR1 mRNA. *J. Neurosci.* **13**, 3180-3184.

Lavados, 1992:

Lavados, J., Germain, I., Morales, A., et al. (1992) A descriptive study of epilepsy in the district of El Salvador, Chile, 1984-1988. *Acta. Neurol. Scand.* **91**, 718-729.

Lerma, 1997:

Lerma, J., Morales, M., Vicente, M.A. Herreras, O. (1997) Glutamate receptors of the kainate type and synaptic transmission. *Trends Neurosci.* **20**, 9-12.

Lomeli, 1992:

Lomeli, H., Wisden, W., Köhler, M., Keinänen, K., Sommer, B., Seeburg, P.H. (1992) High-affinity kainate and domoate receptors in rat brain. *FEBS Lett.* **307**, 139-143.

Maniatis, 1982:

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Mac Donald und Barker, 1979:

Mac Donald, R.L., Barker, J.L. (1979) Enhancement of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons: A common mode of anticonvulsant action. *Brain Res.* **167**, 323-336.

Mackler und Eberwine, 1993:

Mackler, S.S. und Eberwine, J.H. (1993) Diversity of glutamate receptor subunit mRNA expression within living hippocampal CA1 neurons *Mol. Pharmacol.* **44**, 308-315.

Mathern, 1998:

Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Leite, J.P., Kornblum, H.I., Mendoza, D., Lozada, A., Bertram, E.H. (1998) Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res.* **32**, 154-171.

Matsumoto, 1964:

Matsumoto, H. (1964) Intracellular events during the activation of cortical epileptiform discharges. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **17**, 294-307.

Matsumaoto und Ajmone-Marsan, 1964a:

Matsumaoto, H., Ajmone-Marsan, C. (1964) Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: Interictal manifestations. *Exp. Neurol.* **9**, 286-304.

Matsumaoto und Ajmone-Marsan, 1964b:

Matsumaoto, H., Ajmone-Marsan, C. (1964) Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: Interictal manifestations. *Exp. Neurol.* **9**, 305-326.

Meguro, 1992:

Meguro, H., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Kutsuwada, T., Yamazaki, M., Kumanishi, T., Arakawa, M., Sakimura, K., Mishina, M. (1992) Functional characterization of heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* **357**, 70-74.

Meldrum, 1984:

Meldrum, B.S., (1984) Amino acid neurotransmitters and new approaches to anticonvulsant drug action. *Epilepsia* **25**, 140-149.

Meyer-Almes, 1993:

Meyer-Almes, F.J., Porschke, D. (1993) Mechanism of intercalation into the DNA double helix by ethidium. *Biochemistry* **32**, 4246-4253.

Michaelis, 1998:

Michaelis, E.K. (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobio.* **54**, 369-415.

Morgan, 1987:

Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L., et al. (1987) Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizures. *Science* **237**, 192-197.

Mulle, 1998:

Mulle, C., Sailer, A., Perez-Otano, I., Dickinson-Anson, H., Castillo, P.E., Bureau, I., Maron, C., Gage, F.H., Mann, J.R., Bettler, B., et al. (1998) Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* **392**, 601-605.

Nadler, 1981:

Nadler, J.V. (1981) Minireview. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci.* **29**, 2031-2042.

Nakajima, 1989:

Nakajima, T., Daval, J.-L., Gleiter, C.H., et al. (1989) c-fos mRNA expression following electrical-induced seizures and acute nociceptive stress in mouse brain. *Epilepsy Res.* **4**, 156-159.

Newton, 1994:

Newton, C.R., Graham, A. (1994) PCR 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 41-45.

Nicoll, 1990:

Nicoll, R.A., Malenka, R.C., Kauer, J.A. (1990) Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* **70**, 513-565.

Nutt und Kamboj, 1994a:

Nutt, S.L., Kamboj, R.K. (1994) Differential RNA editing efficiency of AMPA receptor subunit GluR-2 in human brain. *Neuroreport* **5**, 1679-1683.

Nutt und Kamboj, 1994b:

Nutt, S.L., Kamboj, R.K. (1994) RNA editing of human kainate receptor subunits. *Neuroreport* **5**, 2625-2629.

Ogur und Rosen, 1950:

Ogur, M. and Rosen, G. (1950) The Nucleic Acids of Plant Tissues. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Bioch.* **25**, 262-276

Olafsson, 1996:

Olafsson, E., Hauser, W.A., Ludvigsson, P., Gudmundsson, G. (1996) Incidence and prevalence of epilepsy in rural iceland. *Epilepsia* **37**, 951-955.

Paschen, 1994:

Paschen, W., Hedreen, J.C., Ross, C.A. (1994) RNA editing of the glutamate receptor subunit GluR2 and GluR6 in human brain tissue. *J. Neurochem.* **63**, 1596-1602.

Paschen und Djuricic, 1994:

Paschen, W., Djuricic, B. (1994) Extent of RNA editing of glutamate receptor subunit GluR5 in different brain regions of the rat. *Cellular and Molecular Neurobio.* **14**, No. 3, 259-269.

Paschen und Djuricic, 1995:

Paschen, W., Djuricic, B. (1995) Regional difference in the extent of RNA editing of the glutamate receptor subunit GluR2 and GluR6 in rat brain. *J. of Neurosci. Methods* **56**, 21-29.

Paschen, 1995:

Paschen, W., Schmitt, J., Dux, E., Djuricic, B. (1995). Temporal analysis of the upregulation of GluR 5 mRNA editing with age: regional evaluation. *Dev. Brain Res.* **86**, 359-363

Paschen, 1996:

Paschen, W., Schmitt, J., Uto, A. (1996) RNA editing of glutamate receptor subunits GluR2, GluR5 and GluR6 in transient cerebral ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **16**, 548-556.

Paschen, 1997:

Paschen, W., Schmitt, J., Gissel, C., Dux, E. (1997) Development changes of RNA editing of glutamate receptor subunits GluR5 and GluR6: in vivo versus in vitro. *Development Brain Research* **98**, 271-280.

Patneau, 1994:

Patneau, D., Wirght, P., Winters, C., Mayer, M., Gallo, V. (1994) Glial cells of the oligodendrocyte lineage express both kainate and AMPA preferring subtypes of glutamate receptor. *Neuron* **12**, 257-371.

Perret, 1988:

Perret, C.W., Marchbanks, R.M., Whatley, S.A. (1988) Characterisation of messenger RNA extracted postmortem from the brains of schizophrenic, depressed and control subject. *J. of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* **51**, 325-331.

Pinel, 1981:

Pinel, J.P.J. (1981) Spontaneous kindled motor seizures in rats. In: *Wada Kindling 2*. New York: Raven Press, 179-192.

Pradilla-Ardila, 1991:

Pradilla-Ardila, G., Pardo, C.A., Mendez, L.E., Zafra, C.I., Restrepo, J.A., Blanco, S. (1991) Estudio neuroepidemiologico en la comunidad rural del Hato-Santander. *Medicas UIS* **5**, 181-187.

Prince, 1978:

Prince, D.A. (1978) Neurophysiology of epilepsy. *Annu. Rev. Neurosci.* **1**, 395-415.

Prince und Wong, 1981:

Prince, D.A., Wong, R.K.S. (1981) human epileptic neurons studied in vitro. *Brain Res.* **210**, 323-333.

Rembeck, 2002:

Rembeck, B., Jürgens, U.H., Straub, H., Pannek, H.W., Behne, F., Kuhlmann, D., Speckmann, E.-J. (2002) Concentrations of antiepileptic drugs in the extracellular space of focal neocortical areas, cerebrospinal fluid and in blood serum of epileptic patients (epilepsy surgery; microdialysis). in *European Journal of Physiology* **443**, 190.

Reynolds, 1983:

Reynolds, E.H., Elwes, R.D.C., Shorvon, S.D. (1983) Why does epilepsy become intractable? Prevention of chronic epilepsy. *Lancet* **2**, 952-954.

Rodin, 1968:

Rodin, E.A., (1968) The prognosis of patients with epilepsy. C.C. Thomas, Springfield - Illinois, 179-262.

Ross, 1980:

Ross, E., Peckham, C., Butler, N. (1980) Epilepsy in childhood: findings from the National Child Development Study. *Brit. med. J.* **280**, 200-210.

Rueter, 1995:

Rueter, S.M., Burns, C.M., Coode, S.A., Mookherjee, P., Emeson, R.B. (1995) Glutamate receptor RNA editing in vitro by enzymatic conversion of adenosin to inosine. *Science* **267**, 1491-1494.

Rwiza, 1992:

Rwiza, H.T., Kilonzo, G.P., Haule, J., Matuja, W.B., et al. (1992) Prevalence and incidence of epilepsy in Ulanga, arural Tanzanian district: a community-based study. *Epilepsia* **33**, 1051-1056.

Saiki, 1985:

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Ehrlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Saiki, 1988:

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T. Ehrlich, H.A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.

Sailer, 1999:

Sailer, A., Swanson, G.T., Perez-Otano, I., O'Leary, L., Malkmus, S.A., Dyck, R.H., Dickinson-Anson, H., Schiffer, H.H., Maron, C., Yaksh, T.L., et al. (1999) Generation and analysis of GluR5(Q636R) kainate receptor mutant mice. *J. Neurosci.* **19**, 8757-8764.

Sakimura, 1992:

Sakimura, K., Morita, T., Kushiya, E., Mishina, M. (1992) Primary structure and expression of the gamma 2 subunit of the glutamate receptor channel selctive for kainate. *Neuron* **8**, 267-274.

Scheinert, 1997:

Scheinert, P. (1997) Primerdesign und Wahl stringenter Reaktionbedingungen. *BioTec Labortechnik* **4**, 52-55.

Schiffer, 1997:

Schiffer, H.H., Swanson, G.T., Heinemann, S.F. (1997) Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variants, GluR7b, are functional kainate receptor subunits with a low sensitivity to glutamate. *Neuron* **5**, 1141-1146.

Schmitz, 2000:

Schmitz, D., Frerking, M., Nicoll, R.A. (1986) Synaptic Activation of presynaptic kainate receptors on hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* **27**, 327-338.

Schwarzkröin und Haglund, 1986:

Schwarzkröin, P.A., Haglund, M.M. (1986) Spontaneous rhythmic synchronous activity in epileptic human and normal monkey temporal lobe. *Epilepsia* **27**, 523-533.

Schwartzkröin und Prince, 1980:

Schwartzkröin, P.A., Prince, D.A. (1980) Changes in excitatory and inhibitory synaptic potentials leading to epileptogenic activity. *Brain Res.* **183**, 61-67.

Seeburg 1996:

Seeburg, P.H. (1996) The role of RNA editing in controlling glutamate receptor channel properties. *J. Neurochem.* **66**, 1-5.

Seeburg 1998:

Seeburg, P.H., Higuchi, M., Sprengel, R. (1998) RNA editing of brain glutamate receptor channels: mechanism and physiology. *Brain Res. Brain. Res. Rev.* **26**, 217-229.

Seeburg, 2001:

Seeburg, P.H., Single, F., Kuner, T., Higuchi, M., Sprengel, R. (2001) Genetic manipulation of key determinants of ion flow in glutamate receptor channels in the mouse. *Brain Res.* **907**, 233-243.

Sharp, 1973:

Sharp, P.A., Sugden, B. Sambrook, J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose. *Biochemistry* **12**, 3055.

Shubsda, 1997:

Shubsda, M.F., Goodisman, J., Dabrowiak, J.C., (1997) Quantitation of ethidium-stained closed circular DNA in agarose gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* **34**, 73-79.

Sobell, 1978:

Sobell, H.M., Reddy, S., Bhandary, K.K., Jain, S.C., Sakore, T.D., Seshardi, T.P. (1978) cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **42**, 87-102.

Sommer und Seeburg, 1992:

Sommer, B., Seeburg, P.H., (1992) Glutamate receptor channels: Novel properties and new clones *Trend in Pharmacol. Sci.* **13**, 291-296.

Speckmann, 1986:

Speckmann, E.-J. (1986) *Experimentelle Epilepsieforschung.* Wissenschaftl. Buchgesellschaft, Darmstadt

Sun, 1994:

Sun, W., Ferrer-Montiel, A.V., Motal, M. (1994) Primary structure and functional expression of the AMPA / kainate receptor subunit 2 from human brain. *Neuroreport* **5** (4), 441-444.

Sundfors, 1996

Sundfors, C., Collan, Y., (1996) Basics of quantitative polymerase chain reaction: 2. Electrophoresis and quantitation of polymerase chain reaction products. *Electrophoresis* **17**, 44-48.

Sutherland, 1984:

Sutherland, J.C., Monteleone, D.C., Trunk, J., Ciarrocchi, G. (1984) *Anal. Biochem.* **139**, 390-399.

Sutherland, 1987:

Sutherland, J.C., Lin, B., Monteleone, D.C., Mugavero, J., Sutherland, B.M., Trunk, J. (1987) Electronic imaging system for direct and rapid quantification of fluorescence from electrophoretic gels: Application to ethidium bromide-stained DNA. *Analytical Biochemistry* **163**, 446-457.

Swanson, 1996:

Swanson, G.T., Feldmeyer, D., Kaneda, M., Cull-Candy, S.G. (1996) Effect of RNA editing and subunit coassembly on single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J. Physiol. (Lond)* **492**, 129-142.

Takuma, 1999:

Takuma, H., Kwak, S., Yoshizawa, T., Kanazawa, I. (1999) Reduction of GluR2 Editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **46**, 806-815.

Tarsitani, 1988:

Tarsitani, G., Cantalamessa, C.L., Greco, R., et al. (1988) Prevalence of epilepsy in school children of Rome. *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.* **39**, 109-113

Verdoorn, 1991:

Verdoorn, T.A., Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P.H., Sakmann, B. (1991) Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* **252**, 1715-1718.

Vissel, 2001:

Vissel, B., Royle, G.A., Christie, B.R., Schiffer, H.H., Ghetti, A., Tritto, T., Perez-Otano, I., Radcliffe, R.A., Seamans, J., Sejnowski, T., Wehner, J.M., Collins, A.C., O'Gorman, S., Heinemann, S.F. (2001) The role of RNA editing of kainate receptors in synaptic plasticity and seizures. *Neuron* **29**, 217-227.

Wada, 1974:

Wada, J.A., Sato, M., Corcoran, M.E. (1974) Persistent seizure susceptibility and recurrent spontaneous seizure in kindled cats. *Epilepsia* **15**, 465-478.

Washburn, 1997:

Washburn, M.S., Numberger, M., Zhang, S., Dingledine, R. (1997) Differential dependence on GluR2 expression of three characteristic features of AMPA receptors. *J. Neurosci.* **17**, 9393-9406.

Wang, 2000:

Wang, Y., TesFaye, E., Yasuda, R.P., Mash, D.C., Armstrong, D.M., Wolfe, B.B. (2000) Effects of post-mortem delay on subunits of ionotropic glutamate receptors in human brain. *Molecular Brain Res.* **80**, 123-131.

Ziegler

Fernmündliche Auskunft des Technologieservices von New England Biolabs Inc. 1999

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. U. Mußhoff für die langjährige Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit. Er hat durch seine Hilfsbereitschaft und seine Anregungen sowie durch stetige Diskussionsbereitschaft sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders die sehr gute Arbeitsatmosphäre wird mir in Erinnerung bleiben.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann für die freundliche Unterstützung und gegebenen Arbeitsmöglichkeiten im Physiologischen Institut, Abteilung Neurophysiologie, sowie für seine Anregungen und Diskussionsbereitschaft, insbesondere in den Vortragsreihen des Institutes.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Physiologie, Abteilung Neurophysiologie, für die Unterstützung und die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre. Auch den Mitarbeitern der elektronischen und feinmechanischen Werkstätten gilt mein Dank.

Hervorheben möchte ich Dr. rer. nat. E. Berger und A. Zirpins für die Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Gespräche. I. Winkelhues und T. Westhoff möchte ich für ihre Unterstützung bei Problemen mit Anwendungsprogrammen und technischen Anlagen danken.

Für die kritischen Diskussionen und konstruktiven Ratschläge möchte ich mich auch bei C. Fischer bedanken. Sie widmete mir oft ihre Aufmerksamkeit und war stets eine gute ZuhörerIn.

Zuletzt möchte ich mich bei all meinen Freunden und meinen Eltern bedanken, die durch ihre Unterstützung nicht nur zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, sondern mir auch erst dieses Vorhaben ermöglichten.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Günter
Nachname: Kortenbruck
Geburtsdatum: 12. 06. 1967
Geburtsort: Vreden
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1973 - 1977 St. Norbert Grundschule Vreden
1977 - 1983 Städt. Realschule der Stadt Stadtlohn
1983 - 1986 Gymnasium Georgianum Vreden, Abitur

Wehrdienst

07/1986 - 09/1987 Grundwehrdienst Freiherr v. Stein Kaserne Coesfeld

Berufliche Bildung

09/1987 - 06/1991 Studium der Elektrotechnik, Fachrichtung Nachrichtentechnik, Fachhochschule Münster Abteilung Steinfurt
Diplomarbeit im Bereich der Halbleitertechnik
Abschluß: Diplom-Ingenieur

10/1991 - 03/1996 Studium der Physik an der Westf. Wilhelms-Universität Münster
Diplomarbeit im Bereich der Oberflächenphysik
Abschluß: Diplom Physiker

10/1995 - 12/2001 Studium der Humanmedizin an der Westf. Wilhelms-Universität Münster
Abschluß: Staatsexamen in Humanmedizin

seit 08/1997 Anfertigung der Promotionsarbeit am Physiologischen Institut der Westf. Wilhelms-Universität Münster
Thema der einzureichenden Dissertation:
Bestimmung der Q/R-Editierung von Glutamat-Rezeptor-subtypen in epilepsiechirurgischen Hirngewebe

Wissenschaftliche Tätigkeiten

- | | |
|-------------------|--|
| 07/1987 - 09/1987 | Grundpraktikum der Elektrotechnik, Hecking Vreden |
| 10/1990 - 09/1991 | Tutor am Fachbereich Physikalische Technik der Fachhochschule Münster |
| 10/1994 - 09/1995 | Tutor am Fachbereich Physik der Westf. Wilhelms-Universität Münster |
| 11/1997 - 12/1999 | Wissenschaftliche Hilfskraft am Physiologischen Institut der Westf. Wilhelms-Universität Münster |

Medizinische Tätigkeiten

- | | |
|-------------------|--|
| 07/1997 - 08/1997 | Medizinische Abteilung IV, St. Franziskus Hospital Münster |
| 02/1999 - 03/1999 | Beijing Traditional Chinese Medical University attached Hu Guo Si Hospital |
| 07/1999 - 08/1999 | Med. Poliklinik D der Westf. Wilhelms-Universität Münster |
| 08/1999 - 09/1999 | Abteilung für Anästhesie, St. Franziskus Hospital Münster |
| 10/2000 - 09/2001 | Praktisches Jahr an der Westf. Wilhelms-Universität Münster, Wahlfach Neurologie |
| 04/2002 | Internistische Abteilung Josephs Hospital Warendorf, AiP |

Kongresse

- | | |
|---------|--|
| 03/1998 | Joint Congress of the German Physiological Society (77th Meeting) and the Scandinavian Physiological Society (56th Meeting), Hamburg, 8.-12.3.1998 |
| 07/1998 | Forum of European Neuroscience, Berlin, 27.06-01.07.1998 |
| 11/1998 | 28th Annual Meeting of the Society of Neuroscience, Los Angeles, 07.-12.11.1998 |
| 03/1999 | 78th Annual Meeting of the German Physiological Society, Bonn, 14.-17.03.1999 |
| 06/2000 | Forum of European Neuroscience, Brighton, 24.-28.06.2000 |
| 03/2002 | Joint Congress of the German Physiological Society (81th Meeting), the Physiological Society and the Scandinavian Physiological Society, Tübingen, 15.-19.3.2002 |

Publikationen

- | | |
|---------|--|
| 10/1995 | SIMS X. Ed. by A. Benninghoven, B. Hagenhoff, H. W. Werner John Wiley & Sons Chichester 1997, p. 943 - 946 |
| 06/2001 | Neurobiology of Disease 8: 459-468 (2001) |
| 03/2002 | Klinische Neurophysiologie 33: 178-187 |

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, daß ich die Dissertation mit dem Titel:

Analyse der RNA Editierung an der Q/R-Stelle der Glutamat-Rezeptor-
untereinheiten GluR 2, GluR 5 und GluR 6 im chronisch epileptischen
Hirngewebe des Menschen

im Institut für Physiologie des Universitätsklinikums Münster unter Anleitung von:

Prof. Dr. rer. nat. U. Mußhoff

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt
und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder auslän-
dischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung
eines akademischen Grades, vorgelegt, habe.

Münster, den 20. Dezember 2002