

Dr. med. Dirk Czesnik

Abteilung Klinische Neurophysiologie

Zentrum Neurologie

Universitätsmedizin Göttingen

Robert-Koch-Straße 38

37073 Göttingen

Erfahrungsbericht zum Projekt

Untersuchung der Regulierung axonaler Exzitabilität in peripheren sensorischen und motorischen Axonen mittels der „Threshold tracking“ - Methode

gefördert durch das

Stipendium für junge Wissenschaftler der DGKN

Hintergrund

Die axonale Exzitabilität eines Neurons hängt von verschiedenen Parametern ab. Passive biophysikalische Eigenschaften eines Axons wie sein Durchmesser und auch das spezifische Repertoire zahlreicher Ionenkanäle, - pumpen und - austauscher führen zu einer für einen Axontyp charakteristischen Exzitabilität (Krishnan et al., 2009). Im Gesunden sind human- wie auch tierexperimentell die meisten genannten Parameter gut untersucht. Gegenstand der aktuellen Forschung ist (i) die Charakterisierung der axonalen Exzitabilität unter pathologischen Bedingungen, (ii) die Untersuchung regulierender Mechanismen: dazu gehören zum einen die Erforschung der Bedeutung extrinsischer Faktoren (wie bspw. pH, Temperatur, spezifische Pharmaka) aber auch intrinsischer Faktoren wie bspw. verschiedene intrazelluläre Kaskaden und (iii) die subzelluläre Lokalisation und elektrophysiologische Charakterisierung der Subtypen von Ionenkanälen, - pumpen und - austauschern.

Methodisch stehen zur Beantwortung o.g. Fragen zum einen *in-vitro* Methoden wie die patch-clamp Methode oder Imaging-Methoden mit zellulärer Auflösung zur Verfügung. Diese Methoden werden vorrangig tierexperimentell genutzt und können nur bedingt an humanem Material durchgeführt werden.

Die „Threshold tracking“ Methode hingegen ermöglicht eine indirekte Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen axonaler Exzitabilität. Mit Hilfe des Trond - Protokoll ist es möglich, *in-vivo* Untersuchungen an humanen peripheren Nerven durchzuführen und dabei verschiedene Exzitabilitätsparameter (Bostock et al., 1998) zu messen.

Ein wesentliches Prinzip der Methode ist, das Reaktionsverhalten eines peripheren Nervens auf einen Teststimulus in Abhängigkeit eines vor, während oder nach dem Teststimulus applizierten konditionierenden Pulses zu beschreiben. Als Observable dient bei motorischen Nervenfasern das motorische Summenaktionspotential abgeleitet vom Muskel und bei sensorischen Fasern das sensorische Summenaktionspotential. Entscheidend dabei ist, dass die Antwort auf den Teststimulus eine definierte schwellennahe Größe hat. Verändert nun ein konditionierender Puls die Reaktion auf den Teststimulus, wird dieser in seiner Stärke computerkontrolliert angepasst, bis die definierte Größe wieder erreicht wird. Der konditionierende Puls variiert je nach Protokoll in Länge, Amplitude (unterschwellig oder überschwellig) und im Intervall zum Teststimulus. In Zusammenschau aller abgeleiteter Parameter lässt sich indirekt eine Aussage über involvierte Ionenkanäle, - austauscher und pumpen treffen (Bostock et al., 1998, Krishnan et al., 2009).

Symptome zahlreicher neurologischer Erkrankungen sind mit einer veränderten peripheren axonalen Exzitabilität verbunden (Krishnan et al., 2009). Hierzu gehören einerseits Neuropathien unterschiedlicher Genese (metabolisch (Krishnan et al., 2008, Lin et al., 2008), toxisch (Krishnan et al., 2005, Kiernan et al., 2005) oder demyelinisierend) und Erkrankungen des Rückenmarks (Lin et al., 2007). Andererseits zeigen aber auch neurologische Erkrankungen, deren klinisches Bild durch zentralnervöse Symptome gekennzeichnet ist, eine veränderte periphere axonale Exzitabilität. Hierzu gehören verschieden Kanalkrankheiten, wie bspw. die episodische Ataxie vom Typ 1 (Tomlinson et al., 2011) und vom Typ 2 (Krishnan et al., 2008), oder auch bestimmte generalisierte Epilepsien (Kiernan et al., 2005).

Die Untersuchung der für die axonale Exzitabilität verantwortlichen Mechanismen mit Hilfe der „Threshold tracking“ Methode bietet somit die Erforschung pathophysiologischer Zusammenhänge am Menschen *in-vivo* und somit auch die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

Ziel und Ablauf des Projekts

Ziel des beantragten Projekts war zum einen, die Modulation peripherer axonaler Exzitabilität durch verschiedene extrinsische Faktoren am Menschen *in-vivo* zu untersuchen. Hierzu wurde zunächst die Durchführung der Methode des „Threshold trackings“ mit dem Standardprotokoll im Selbstversuch erlernt. Ich erlernte außerdem sowohl die Ableitung der Exzitabilität motorischer und sensorischer Fasern, wie auch die Datenauswertung mittels QtracS (Bostock et al., 1998).

Im Weiteren erlernte ich, ein für die spezifische Fragestellung geeigneteres Stimulationsprotokoll zu entwickeln. Nach entsprechenden Vorversuchen im Selbstversuch und an Mitarbeitern der Abteilung und positiver Begutachtung durch die lokale Ethikkommission konnten letztlich Probanden zur Durchführung der Studie rekrutiert werden. Insgesamt wurden 6 Probanden rekrutiert und 92 Messungen durchgeführt. Die endgültige Auswertung der Daten ist bei Einreichung des Berichts noch nicht erfolgt. Über die Ergebnisse wird nachberichtet. Es ist geplant, die Ergebnisse in einer international anerkannten englischsprachigen Fachzeitschrift zu veröffentlichen.

Ein weiteres Ziel des beantragten Projekts war, die subzelluläre Lokalisation verschiedener Ionenkanäle in humanem Gewebe zu untersuchen. Hierzu wurden immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten des Rückenmarks von insgesamt 6 Donoren durchgeführt. Es

wurden dabei 4 unterschiedliche Antikörper getestet und die Immunreaktivität sowohl in Motoneuronen als auch in DRG-Neuronen beschrieben. Insgesamt wurden 44 Färbungen durchgeführt. Über die Ergebnisse wird ebenfalls nachberichtet. Es wird die Beteiligung an einer Veröffentlichung angestrebt.

Das Stipendium DGKN ermöglichte mir einen 3-monatigen Forschungsaufenthalt an der *University of Sydney*. Ich arbeitete im Zeitraum vom 21.03.2011 bis zum 20.06.2011 in den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. David Burke (University of Sydney, Medical School, Exzitabilitätsstudien) und Prof. Dr. Michael Buckland (University of Sydney, Department of Neuropathology, Immunistochemische Studien). Herr Prof. Burke hat die Methode des „Threshold trackings“ maßgeblich mitentwickelt.

Fazit und Perspektiven

Innerhalb des ca. 3monatigen Aufenthaltes hatte ich Gelegenheit, die selbständige Durchführung der Methode „Threshold tracking“ peripherer Axone zu erlernen und das Erlernte anhand einer eigenen Studie zu vertiefen. Hierdurch war es möglich, die notwendige Routine für die zukünftige eigenständige Anwendung zu gewinnen. Dadurch dass außerdem eine Veröffentlichung und die Beteiligung an einer zweiten Veröffentlichung in international anerkannten Fachzeitschriften angestrebt werden, ziehe ich für mich persönlich insgesamt ein sehr positives Fazit aus dem Forschungsaufenthalt.

Perspektivisch ist eine zeitnahe Etablierung der erlernten Methoden in der Abteilung für Klinische Neurophysiologie der Universitätsmedizin Göttingen geplant. Hierdurch wird mir eine wissenschaftliche Fokussierung auf die periphere klinische Neurophysiologie ermöglicht.

Ich möchte mich insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Walter Paulus bedanken, der das Forschungsprojekt mit angeregt hatte und mir das Einflechten des Aufenthaltes in meine klinische Ausbildung ermöglichte. Außerdem möchte ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. David Burke, Prof. Dr. Michael Buckland und James (Tim) Howells für die überaus freundliche Aufnahme, Betreuung und Zusammenarbeit im Labor bedanken. Ich möchte mich auch bei den Verantwortlichen der DGKN für die Zuteilung des Stipendiums bedanken.

Literatur

Krishnan AV, Lin CS, Park SB, Kiernan MC. (2009) Axonal ion channels from bench to bedside: a translational neuroscience perspective. *Prog Neurobiol* 89:288-313.

Bostock H, Cikurel K, Burke D. (1998) Threshold tracking techniques in the study of human peripheral nerve. *Muscle Nerve* 21:137-58.

Krishnan AV, Lin CS, Kiernan MC. (2008) Activity-dependent excitability changes suggest Na⁺/K⁺ pump dysfunction in diabetic neuropathy. *Brain* 131:1209-16.

Lin CS, Krishnan AV, Lee MJ, Zagami AS, You HL, Yang CC, Bostock H, Kiernan MC. (2008) Nerve function and dysfunction in acute intermittent porphyria. *Brain* 131:2510-9.

Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander M, Kiernan MC. (2005) Oxaliplatin-induced neurotoxicity and the development of neuropathy. *Muscle Nerve* 32:51-60.

Kiernan MC, Isbister GK, Lin CS, Burke D, Bostock H. (2005) Acute tetrodotoxin-induced neurotoxicity after ingestion of puffer fish. *Ann Neurol* 57:339-48.

Lin CS, Macefield VG, Elam M, Wallin BG, Engel S, Kiernan MC. (2007) Axonal changes in spinal cord injured patients distal to the site of injury. *Brain* 130:985-94.

Tomlinson SE, Tan SV, Kullmann DM, Griggs RC, Burke D, Hanna MG, Bostock H. (2010) Nerve excitability studies characterize Kv1.1 fast potassium channel dysfunction in patients with episodic ataxia type 1. *Brain* 133:3530-40.

Krishnan AV, Bostock H, Ip J, Hayes M, Watson S, Kiernan MC. (2008) Axonal function in a family with episodic ataxia type 2 due to a novel mutation. *J Neurol*. 255:750-5.

Kiernan MC, Krishnan AV, Lin CS, Burke D, Berkovic SF. (2005) Mutation in the Na⁺ channel subunit SCN1B produces paradoxical changes in peripheral nerve excitability. *Brain* 128:1841-6.