

UNIVERSITÄT ULM

Institut für Angewandte Physiologie
Direktor:
Prof. Dr. Dr. h.c. F. Lehmann-Horn

Klinik für Neurologie
Ärztlicher Direktor:
Prof. Dr. A.C. Ludolph

Mechanismen hereditärer neonataler Anfälle:

**Funktionelle Charakterisierung einer neuen *KCNQ2* Mutation
und
hippokampaler Neurone von *KCNQ2* Knock-Out Mäusen.**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Georgios Naros
geboren in Kiel

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Lerche

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Dietl

Tag der Promotion: 09.12.2011

meiner Familie gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Spannungsabhängige Kaliumströme in hippokampalen Neuronen	2
1.1.1 M-Strom (I_M)	6
1.1.2 M-Strom als Hauptträger der mAHPs	7
1.2 Ionenkanäle	9
1.2.1 Kationenkanäle	10
1.2.2 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (K_V): Nomenklatur und Struktur ..	12
1.2.3 Ontogenese der Ionenkanäle	13
1.2.4 Die KCNQ/ K_V7 Kaliumkanalfamilie	15
1.3 Benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe (BFNS)	16
1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit	18
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Substanzen	19
2.2 Molekularbiologische Methoden	21
2.3 CHO Zellen als Expressionssystem für Ionenkanäle	23
2.4 KCNQ2 Knock-Out Maus	25
2.5 Immunofluoreszenz	29
2.6 Elektrophysiologie	30
2.6.1 Patch-Clamp Technik	31
2.6.2 Aufbau des Messstandes	33
2.6.3 Korrektur von Offset, Leckströmen und kapazitiven Artefakten	35
2.6.4 Durchführung der Patch-Clamp Experimente	39
2.6.5 Protokolle und Datenauswertung	42
2.6.6 Pipetten- und Badlösungen	51
2.7 Statistik	51
3 ERGEBNISSE	52
3.1 Funktionelle Charakterisierung von N258S	52
3.1.1 Vorversuche in Xenopus Oozyten	52
3.1.2 Funktionelle Expression der N258S Mutation in CHO Zellen	53
3.1.3 Einzelkanalanalyse der N258S Mutation	58
3.1.4 Oberflächenexpression	61
3.1.5 Wiederherstellung des N258S Stromes	64

3.2 Elektrophysiologische Charakterisierung hippocampaler Neurone	68
von KCNQ2 Knock-Out Mäusen	68
3.2.1 Morphologie der Neurone in vitro	70
3.2.2 Allgemeine biophysikalische Parameter der Neurone in vitro	71
3.2.3 Parameter der Aktionspotentiale	72
3.2.4 Unterschiede zwischen [+/+] und [+/-] Neuronen	73
3.2.4.1 Entwicklung des M-Stroms und der mAHP	73
3.2.4.2 Entwicklung der Feuerungsraten	77
3.2.4.3 Unterschiede in der Aktionspotentialadaptation	79
3.2.4.4 Entwicklung anderer Natrium- und Kaliumströme	80
3.2.4.5 H-Strom	82
3.2.5 Unterschiede zwischen [+/-] und [-/-] Neuronen	84
 4 DISKUSSION	87
4.1 Die N258S Mutation	87
4.1.1 Pathophysiologischer Mechanismus der N258S Mutation	88
4.1.2 Der dominant-negative Effekt der N258S Mutation	90
4.2 Die elektrophysiologische Charakterisierung kultivierter fetaler	92
hippocampaler Neurone von KCNQ2 Knock-Out Mäusen	92
4.2.1 Primäre Zellkulturen als Untersuchungsobjekt	
elektrophysiologischer Studien	93
4.2.2 Wachstum und Differenzierung der Neurone in vitro	94
4.2.3 Veränderungen der Membranstromamplituden in vitro	95
4.2.4 Der H-Strom als möglicher Kompensationsmechanismus	98
4.2.5 Das „Gleichgewicht“ der Ionenkanäle	101
 5 ZUSAMMENFASSUNG	103
 LITERATURVERZEICHNIS	105
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	122
DANKSAGUNGEN	123
LEBENS LAUF	124

Abkürzungsverzeichnis

AP	Aktionspotential
4-AP	4-Aminopyridin
cAMP	cyclic aminomonophosphate
BFNS	benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CHO	Chinese hamster ovary cells
C_m	Kapazität einer Zelle
C_p	Kapazität einer Patch-Clamp Pipette
DNA	deoxyribonucleic acid
DIV	days in vitro
EDTA	ethylenediamine tetra-acetic acid
EEG	Elektroenzephalogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GABA	γ -amino Buttersäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfon-Säure
HCN	hyperpolarization-activated cyclic nucleotid-gated
k	Steigungsfaktor der Boltzmann-Funktion
kb	Kilobasen
KCNQ1-5	Gene der spannungsgesteuerten Kaliumionenkanäle
KcsA	bakterieller Kaliumkanal
Kir1-Kir7	einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle
K/O	Knock-Out
K _v 7.1-K _v 7.5	spannungsabhängige Kaliumkanal
mAHP	mittlere Nachhyperpolarisation (<i>engl.</i> medium afterhyperpolarization)
M-Current	Kaliumstrom, der durch muskarinische Acetylcholin Rezeptoren blockiert werden kann
MT	Mutante
n.s.	statistisch nicht signifikant
PCR	Polymerasenkettenreaktion
P-loop	Porenschleife von Ionenkanälen
rpm	rounds per minute

R_L	Leckwiderstand
R_m	Widerstand der Zellmembran
R_p	Widerstand einer Patch-Clamp Pipette
R_s	Serienwiderstand
RTG	Retigabin
R_x	Widerstand der Membranöffnung
S1-S6	Transmembrandomänen in der α -Untereinheit von spannungsgesteuerten Ionenkanälen
SDS	sodium dodecyl (lauryl) sulfate
TEA	Tetraethylammonium
V	Spannung (<i>engl.</i> Voltage)
$V_{1/2}$	Spannung der halb-maximalen Aktivierung
WT	Wildtyp
XE991	10,10-bis(4-Pyridinylmethyl)-9(10H)-Anthracenon
ZNS	zentrales Nervensystem
ZD7288	4-Ethylphenylamino-1,2-dimethyl-6-methylaminopyrimidinium
[+/+]	Wildtyp Mäuse
[+/-]	heterozygote KCNQ2 Knock-Out Maus
[-/-]	homozygote KCNQ2 Knock-Out Maus

1 EINLEITUNG

Ein Meilenstein in der Erforschung der Exzitabilität von biologischen Membranen waren die bahnbrechenden Versuche von Hodgkin und Huxley (1952), die an Tintenfischaxonen mit Hilfe zweier intrazellulärer Mikroelektroden („Voltage-Clamp“ Technik) die ersten Beobachtungen zur molekularen Grundlage der Aktionspotentialgenerierung lieferten.

Ohne die Existenz von Ionenkanälen beweisen zu können, entwickelten Hodgkin und Huxley 1952 ein Modell, das Fortleitung und Erregung durch Natrium- und Kaliummembranströme erklären und vorhersagen konnte. Nach diesem Modell wird durch rasche Spannungsänderung in depolarisierender Richtung der Natriumstrom aktiviert, der den Aufstrich des Aktionspotentials verursacht, während die Repolarisation durch die Inaktivierung des Natriumstroms sowie durch die verzögerte Aktivierung des Kaliumstroms erklärt wird. Für diese Erkenntnisse wurden sie 1964 gemeinsam mit John Eccles, der die synaptischen Vorgänge erforschte, mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Gut zwei Jahrzehnte später gelang es Neher und Sakmann (1976) erstmals Ströme durch einzelne Ionenkanäle von wenigen pico Ampère Größe aufzulösen, wofür sie 1991 ebenfalls den Nobelpreis erhielten. Sie klemmten nicht mehr, wie in der klassischen Elektrophysiologie, das Potential einer ganzen Zelle, sondern nur das eines ca. $1 \mu\text{m}^2$ kleinen Membranflecks (*engl.* patch), der durch die aufgesetzte Glaselektrode elektronisch isoliert wurde. Im Jahre 1981 konnte die Patch-Clamp Technik von Hamill et al. (1981) noch entscheidend verbessert werden und vom Froschmuskel auf andere Gewebe erweitert werden.

In den folgenden Jahren nahm die Anzahl der veröffentlichten Arbeiten über Membranströme in verschiedenen Geweben schnell zu. Mit dem Einzug der Molekularbiologie in Kombination mit der Patch-Clamp Technik wurde es möglich, Kanalgene zu klonieren und Aminosäuresequenzen zu bestimmen, so dass die Identifizierung unterschiedlicher Ionenkanalfamilien und krankheitsauslösender Mutationen in den jeweiligen Ionenkanälen beschleunigt wurde. Mutationen in Ionenkanälen könne eine Vielzahl verschiedenster Erkrankungen wie z.B.

Myopathien, Diabetes, Herzrhythmusstörungen, Mukoviszidose oder Epilepsien auslösen. Erkrankungen, die infolge von Ionenkanalmutationen mit einer Über- oder Untererregbarkeit von Gewebe einhergehen, werden als Kanalkrankheiten (*engl.* Channelopathies) bezeichnet und sind meist erblich bedingt (Lehmann-Horn et Jurkat-Rott, 1999; Cannon, 2006).

Mittlerweile ist die Patch-Clamp Technik Goldstandard für die elektrophysiologische Charakterisierung von Membranströmen und Einzelkanaleigenschaften und eine der wichtigsten Methoden in der Muskel- und Neurophysiologie.

1.1 Spannungsabhängige Kaliumströme in hippokampalen Neuronen

Die Grundlagen für die elektrische Aktivität von Nervenzellen wurden zunächst für ein Tintenfischaxon beschrieben. Hodgkin und Huxley (1952) gingen dabei von lediglich zwei unterschiedlichen Ionenströmen (Leitfähigkeiten) aus: ein schneller einwärts gerichteter Natriumstrom und ein verzögerter (*engl.* delayed) auswärts gerichteter Kaliumstrom. In den folgenden Jahren wurde jedoch eine Vielzahl von unterschiedlichen Strömen in Neuronen entdeckt, die auf unterschiedliche Ionenkanäle zurückzuführen sind. Gemäß der komplexeren Anforderungen und Funktionen ist anzunehmen, dass neuronale Zellkörper und Dendriten mit einem breiteren Spektrum an Ionenkanälen besetzt sind als Axone. Mit der Weiterentwicklung der Patch-Clamp Technik (Neher et Sakmann, 1976; Hamill et al., 1981) erschlossen sich immer kleinere Zellen der Erforschung. Dabei haben sich v.a. hippokampale Neurone aufgrund des guten Überlebens *in vitro* und der einfachen Zugänglichkeit der Zellkörper in gut sichtbaren Regionen als hervorragende Forschungsobjekte herausgestellt. Neben den Experimenten an Gewebeschnitten (*engl.* slices) (Madison et al., 1987; Numann et al., 1988; Storm, 1988a, b; Gustafsson et al., 1982) wurden auch kultivierte Neurone von un- oder neugeborenen (Dreyfus et al., 1979; Peacock, 1979; Segal, 1983; Segal et Barker, 1984) oder ausgewachsenen Tieren (Numann et al., 1987; Gray et Johnston, 1985; Kay et Wong, 1986) untersucht.

Aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaften und ihrer Sensitivität gegenüber den Kanalblockern Tetraethylammonium (TEA) und 4-Aminopyridin (4-AP) sind in hippokampalen Pyramidenzellen im Wesentlichen sechs spannungsabhängige Kaliumströme beschrieben worden (I_A , I_D , I_K , I_M , I_C , I_{AHP}), wobei I_C , I_{AHP} durch den Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Kalziumkanäle aktiviert werden. Des Weiteren ist ein durch Hyperpolarisation aktivierter, einwärts gerichteter Ionenstrom (I_Q) entdeckt worden (Abb. 2; Storm, 1990). Das Zusammenspiel dieser Kanäle scheint die Exzitabilität von hippokampalen Neuronen zu regulieren. Insbesondere den Kaliumströmen I_A , I_D , I_K , I_M muss eine besondere Rolle zukommen, da sie auch in anderen Pyramidenzellen beschrieben worden sind (Zhou et Hablitz, 1996; Locke et Nerbonne, 1997; Bekkers, 2000a, b; Korngreen et Sakmann, 2000).

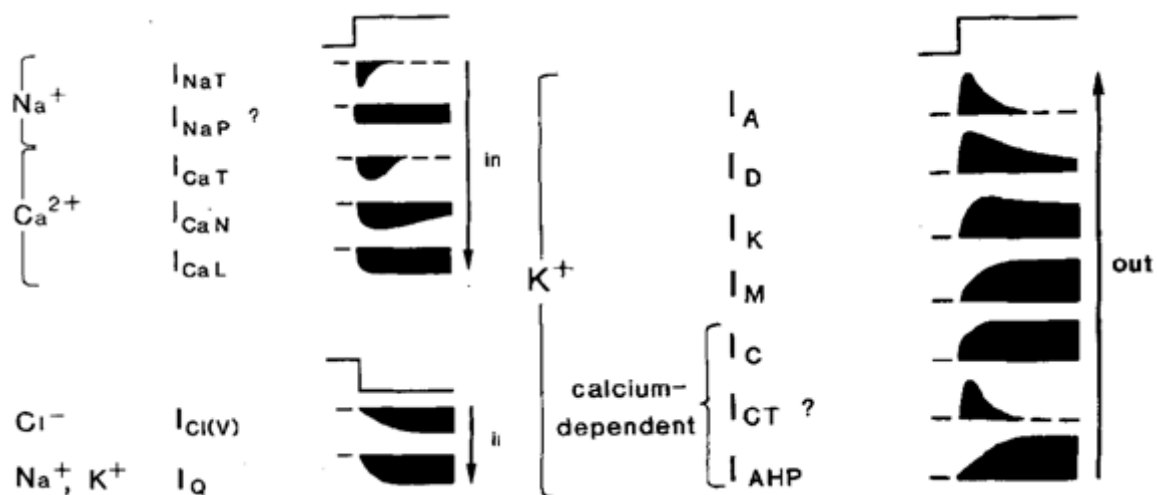


Abb. 1 Membranströme in hippokampalen Neuronen (modifiziert nach Storm, 1989; 1990)

I_A ist ein schneller transienter Kaliumstrom, der bei Depolarisation über -60 mV innerhalb von ca. 10 ms aktiviert. Die Inaktivierung folgt einer einfachen Exponentialfunktion mit einer Zeitkonstanten von 15-50 ms (Storm, 1990). Als Blocker haben sich 4-AP (Segal et Barker, 1984; Numann et al., 1987; Storm, 1988a) und Dendrotoxin (DTX) (Dolly et al., 1984; Halliwell et al., 1986) herausgestellt. Allerdings ist I_A von einem weiteren transienten Kaliumstrom (I_D) u.U. schwer unterscheidbar (Storm, 1988a). Der A-Strom ist sowohl an der Repolarisation von Aktionspotentialen als auch an der AHP (siehe Kap. 1.1.2) und damit an der Regulation der Feuerungsrate beteiligt (Storm, 1987; Bekkers, 2000a, b; Kang et al., 2000). So führt ein akuter Verlust des A-Stroms zu einer

Hyperexzitabilität von hippokampalen und kortikalen Pyramidenzellen (Kim et al. 2005; Yuan et al. 2005). Neuere Untersuchungen legen nahe, dass $K_v1.4$ (Heinemann et al., 1996) und K_v4 Kaliumkanäle (siehe Kap. 1.3.2) einen Hauptteil des A-Stromes vermitteln (Serodio et Rudy, 1998; Kim et al., 2005; Yuan et al., 2005).

I_D wurde als Verzögerungsstrom (*engl.* delay current) benannt, da er in Gewebeschnitten von Rattenhippocampi für die Verzögerung der AP-Antwort verantwortlich gemacht wird (Storm, 1988a). I_D aktiviert bei Depolarisation über -70 mV innerhalb von ca. 20 ms. Die Inaktivierung erfolgt über einige Sekunden (Storm, 1990). Als Blocker haben sich 4-AP (Storm, 1988a; Grissmer et al. 1994) und DTX (Metz et al., 2007) etabliert. Aufgrund der langsamen Regenerierung aus der Inaktivierung (5 s bei -90 mV), wird dem I_D Strom eine besondere Rolle bei der zeitlichen Integration von depolarisierenden Reizen über mehrere Sekunden zugesprochen. Des Weiteren wird eine Beteiligung an der Repolarisation von APs angenommen (Storm, 1988a). Die zugrunde liegenden Kanäle gehören zur K_v1 Familie (siehe Kap. 1.3.2) (Metz et al., 2007).

Als I_K wird ein verzögerter Kaliumstrom (*engl.* „delayed rectifier current“) bezeichnet, der langsam (über 80 - 180 ms) bei Depolarisation über -40 mV aktiviert, d.h. im Gegensatz zu den anderen Kaliumkanälen nicht im sub-schweligen Bereich (Storm, 1990). Die Inaktivierung folgt einer einfachen Exponentialfunktion mit einer Zeitkonstanten über mehrere Sekunden (3-5 s) (Segal et Barker, 1984; Numann et al., 1987; Storm, 1988a, b). TEA ist bekannt den I_K Strom zu blocken. Eine Beteiligung an der Repolarisation der Aktionspotentiale wird angenommen (Storm, 1990). Ein Beitrag zur Nachhyperpolarisation nach Aktionspotentialen ist noch unklar. Neuere Untersuchungen legen nahe, dass $K_v2.1$ Kanäle (siehe Kap. 1.3.2) den Hauptteil des I_K -Stromes vermitteln (Murakoshi et Trimmer, 1999; Du et al. 2000). Aufgrund seiner Bedeutung für die vorliegende Arbeit wird der I_M Strom im folgenden Kapitel näher erläutert.

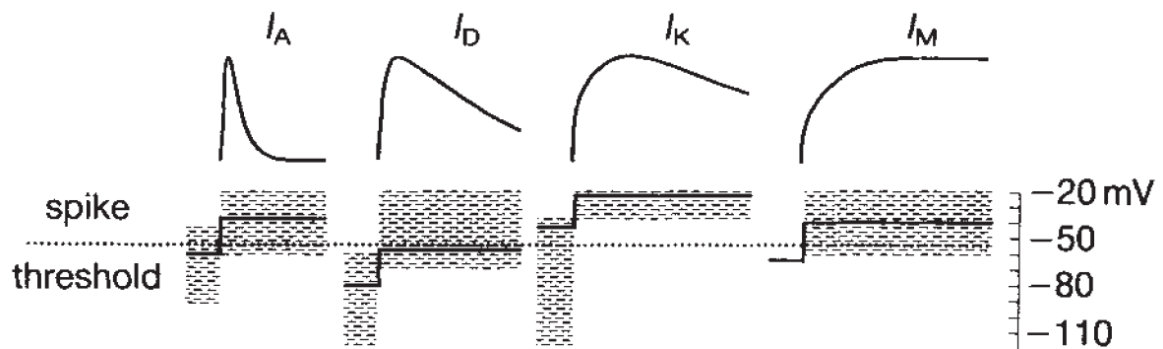


Abb. 2 spannungsabhängige Kaliumströme in hippocampalen Neuronen
(modifiziert nach Strom, 1989; 1990)

Des Weiteren wurde ein durch Hyperpolarisation aktivierter, einwärts gerichteter Ionenstrom beschrieben (Halliwell et Adams, 1982; Maccaferri et al., 1993), welcher in der Literatur als I_f (*engl.* funny current; Brown et al., 1979), I_Q (*engl.* queer current; Halliwell et Adams, 1982) oder I_H (*engl.* hyperpolarization-activated) bezeichnet wird. Er zeichnet sich durch einige ungewöhnliche Eigenschaften aus, die ihn von anderen Strömen unterscheiden. I_H aktiviert bei Hyperpolarisation jenseits von -60 mV (Robinson et Siegelbaum, 2003) und hat nur eine unspezifische Selektivität für Natrium-, Kalium- und Kalziumionen, so dass das Umkehrpotential bei ca. -35 mV liegt (Santoro et Tibbs, 1999). Die Aktivierungskurve des Stroms kann durch Transmitter und Hormone über sekundäre Botenstoffe (*engl.* second messenger) beeinflusst werden. So führt cAMP zu einer Aktivierung dieser Kanäle bei positiveren Potentialen (DiFrancesco, 1993; Pape, 1996). Als selektive Blocker haben sich Zatebradin (Pape, 1994), ZD7288 (Gasparini et DiFrancesco, 1997) und Ivabrandin (Bois et al., 1996) gezeigt. Der I_H Strom ist zunächst im Herzen (Noma et Irisawa, 1976), wo er als „Schrittmacherstrom“ fungiert (DiFrancesco, 1993), entdeckt worden und scheint eine ähnliche Funktion auch im ZNS zu haben (McCormick et Pape, 1990; Pape, 1996). Allerdings beeinflusst der H-Strom auch das Ruhepotential und den Membranwiderstand einer Zelle und die Übertragung an Synapsen (Robinson et Siegelbaum, 2003). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass der H-Strom an der mAHP (siehe Kap.1.2.2) beteiligt ist (Gu et al., 2005). Dementsprechend ist eine Störung des H-Stromes auch mit pathologischer neuronaler Hyperexzitabilität verbunden (Di Pasquale et al., 1997; Chen et al., 2001). Inzwischen konnten HCN-Kanäle als molekulares Korrelat des H-Stromes identifiziert werden (*engl.* hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated) (Santoro et Tibbs, 1999).

1.1.1 M-Strom (I_M)

Im Jahre 1980 entdeckten Brown und Adams zunächst in sympathischen Neuronen von Amphibien (Brown und Adams, 1980) und Ratten (Constanti und Brown, 1981) einen spannungsabhängigen langsam aktivierenden und nicht inaktivierenden, auswärts gerichteten Kaliumstrom, der sich durch muskarinerge (M1) Azetylcholinrezeptoragonisten inhibieren ließ. Sie nannten ihn deshalb „M-Strom“ (I_M) (Brown et Adams, 1980). 1982 wurde der M-Strom auch in hippokampalen Gewebeschnitten (Halliwell et Adams, 1982; Storm, 1989; Gu et al., 2005) und in kultivierten Neuronen (Gähwiler and Brown, 1985; Shah et al., 2002; Shahidullah et al., 2005) nachgewiesen. Er unterschied sich von den konventionellen „delayed rectifier“ Strömen durch ein negatives Schwellenpotential von ca. -60 mV, in der sigmoidalen Aktivierungskurve, dem Fehlen einer zeitabhängigen Inaktivierung und der langsamen Aktivierung (Brown et Adams, 1980). Als Blocker stellten sich TEA und 4-AP dar (Halliwell et Adams, 1982; Storm, 1989). In den Folgejahren wurden weitere Eigenschaften wie z.B. die selektive Blockierung durch Linopirdin (Aiken et al., 1995) und XE991 (Zaczek et al., 1998), die weite Verbreitung im zentralen und peripheren Nervensystem oder die Regulation durch eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren und sekundären Botenstoffen (Marrion, 1997) beschrieben, jedoch blieb die zugrunde liegende Kanalfamilie bis Ende der 90er Jahre unbekannt (Brown et Yu, 2000).

Erst 1998 gelang es Wang et al. (1998) anhand der kinetischen Eigenschaften, des Expressionsprofils sowie der Sensitivität der M-Kanäle gegenüber verschiedenen Substanzen heteromere $K_{V7.2}/K_{V7.3}$ Kanäle als einen wesentlichen Teil des morphologischen Korrelats des M-Stroms zu bestimmen. Nach weiteren Untersuchungen hat sich gezeigt, dass auch andere Kanäle der K_V7 Familie (siehe Kap. 1.3.4) die oben genannten Eigenschaften teilen und somit auch die heteromeren $K_{V7.4}/K_{V7.3}$ und $K_{V7.5}/K_{V7.3}$ Kanäle Anteil an der Generierung des M-Stroms haben könnten (Lerche et al., 2000; Schroeder et al., 2000; Selyanko et al., 2000; Shah et al., 2002). Des Weiteren wird diskutiert, ob Kanäle der HERG-Familie ebenfalls zur Diversität der M-Kanäle beitragen (Selyanko et al., 1999; Meves et al., 1999).

I_M spielt aufgrund seiner Aktivierung bei Potentialen im Subschwellenbereich eines Aktionspotentials vieler ZNS Neurone eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der neuronalen Exzitabilität (Brown et Adams, 1980; Halliwell et Adams, 1982; Storm, 1988; Jentsch, 2000). So konnte gezeigt werden, dass eine Funktionseinschränkung bzw. Blockade des M-Stroms die Aktionspotentialfrequenz erhöht, während eine Aktivierung die Feuerungsrate verringert (Delmas et Brown, 2005). In hippokampalen CA1 Pyramidenzellen konnte gezeigt werden, dass I_M an der Adaptation der Feuerungsfrequenz (Madison et Nicoll, 1984; Yue et Yaari, 2004; Gu et al., 2005; Peters et al., 2005), der mittleren Nachhyperpolarisation (Storm, 1989; Gu et al., 2005; Peters et al., 2005) und der Nachdepolarisation (Yue et Yaari, 2004) beteiligt ist (siehe Kap. 1.2.2). Des Weiteren ist bekannt, dass Mutationen in $K_{V7.2}$ oder $K_{V7.3}$ Kanälen, die eine Veränderung der Amplitude oder der Kinetik des M-Stroms bedingen, einen bestimmten Typ der Epilepsie (benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe) verursachen können (Jentsch, 2000).

1.1.2 M-Strom als Hauptträger der mAHPs

Das Feuerungsverhalten wird in vielen Neuronen durch Nachpotentiale reguliert, die einzelnen Aktionspotentialen oder Salven von Aktionspotentialen folgen. Ein Einwärtsstrom am Ende von Aktionspotentialen generiert eine Nachdepolarisation (*engl.* afterdepolarisation, ADP), die als positive Rückkopplung zuwerten ist. Eine durch einen Auswärtsstrom verursachte Nachhyperpolarisation (*engl.* afterhyperpolarisation, AHP) vermittelt somit eine negative Rückkopplung zur Begrenzung der Erregbarkeit eines Neurons.

Ein häufig beobachtetes Muster in hippokampalen Pyramidenzellen ist eine Abfolge von drei AHPs (Strom, 1987): (1) eine schnelle, nur 1-5 ms andauernde AHP (fAHP) nach Aktionspotentialen, welche als direkte Fortsetzung der AP Repolarisation betrachtet werden muss; (2) eine mittlere AHP (mAHP), die typischerweise 20-50 ms andauert und für die frühe Frequenzanpassung während einer Reihe von APs verantwortlich ist; und (3) einer langsamen, zwischen einer halben und mehreren Sekunden anhaltende AHP (sAHP), welche für die späte Frequenzanpassung verantwortlich ist. Zwischen der fAHP und der mAHP tritt

häufig ein ADP auf (Storm, 1987; Yue et Yaari, 2004). Ähnliche Sequenzen wurden auch in vielen anderen Neuronen des ZNS beobachtet wie z.B. in Pyramidenzellen verschiedener Kortexschichten des Säugtiergehirns (Schwindt et al., 1988), der Amygdala (Pape et Driesang, 1998), in bulbären und spinalen Motoneuronen (Takahashi, 1990; Viana et al., 1993) und in Neuronen des Striatums (Pineda et al., 1992). Es wird angenommen, dass M-Kanalaktivität für die Kontrolle der neuronalen Exzitabilität und für die frühe Aktionspotentialfrequenzadaptation verantwortlich ist (Brown et Adams, 1980; Madison et Nicoll, 1984; Storm, 1989) und der Hauptträger der mAHPs während und nach repetitiver neuronaler Aktivität ist (Storm, 1989; Gu et al., 2005). Jedoch wird die Beteiligung anderer Kanalarten an der mAHP noch kontrovers diskutiert, insbesondere die Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle vom SK-Typ (Stocker et al., 1999; Stackman et al., 2002). Zuletzt konnten Gu et al. (2005) keine Beteiligung von Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanälen vom SK-Typ zeigen, jedoch die Bedeutung von HCN/H-Kanälen für die mAHP unterstreichen.

Das Ausmaß der mAHP kommt dabei durch die Integration von einwärts gerichteten persistierenden Natriumströmen (Azouz et al., 1996; Su et al., 2001) und den o.g. langsam aktivierenden, auswärts gerichteten Strömen (Gu et al., 2005) zustande (Yue et Yaari, 2004). So entsteht, je nachdem ob die Natrium- oder Kaliumströme überwiegen, eine mAHP oder eine ADP. Dieses Gleichgewicht kann durch spezifische Kanalblocker (Storm, 1989) oder durch die Veränderung des Ausgangspotentials beeinflusst werden (Gu et al., 2005). Bei Applikation von $\text{K}_v7.2$ Blockern wie Muskarin (Halliwell et Adams, 1982) oder XE991 (Yue et Yaari, 2004) verschwindet durch die Blockade der Kaliumströme die mAHP und eine ADP erscheint (Yue et Yaari, 2004; Gu et al., 2005). Dieses Phänomen beobachtet man nur, wenn die Experimente bei einem Haltepotential von -60 mV stattfinden, wo ein Teil der $\text{K}_v7.2$ Kanäle aktiviert sind. Bei einem Haltepotential von -80 mV, wo die $\text{K}_v7.2$ Kanäle größtenteils geschlossen sind, hat eine XE991 Applikation keinen Effekt auf die mAHP Größe. Daraus wird geschlossen, dass die mAHP bei -60 mV v.a. durch den M-Strom vermittelt wird, während bei -80 mV wohl der H-Strom einen großen Einfluss erhält (Gu et al., 2005). Ferner scheint es, dass bei adulten hippokampalen Neuronen persistierende Natriumströme überwiegen, sodass man dort eine ADP beobachtet (Yue et Yaari, 2004).

1.2 Ionenkanäle

Jede Zelle ist von einer Membran bestehend aus Lipiden und Proteinen umgeben, die sie von ihrer Umgebung abgrenzt. Nach dem „fluid-mosaic“-Modell (Singer und Nicolson, 1972) verhindert eine Lipiddoppelschicht mit ihren hydrophoben Eigenschaften die Vermischung der wässrigen Lösungen außerhalb und innerhalb der Zelle. Während lipidlösliche, unpolare Substanzen durch die Lipiddoppelschicht diffundieren können, ist sie jedoch für geladene und polare Teilchen praktisch impermeabel. Sie stellt somit einen elektrischen Isolator dar. Für die o.g. elektrischen Eigenschaften von Zellmembranen sind Ionenkanäle notwendig.

Ionenkanäle sind integrale, porenbildende Membranproteine, welche einen hydrophilen Kanal durch die Lipiddoppelschicht formen. Sie fungieren somit als elektrische Leiter und ermöglichen einen passiven, von einem Konzentrationsgefälle angetriebenen Ionenfluss. Die Aktivierung des Ionenkanals wird durch verschiedene Stimuli hervorgerufen. Manche Ionenkanäle werden durch extrazelluläre Liganden aktiviert (ligandengesteuerte Ionenkanäle), wie z.B. der nikotinische Azetylcholinrezeptor. Ionenkanäle werden aber auch von zytoplasmatischer Seite durch intrazelluläre Botenstoffe wie cGMP, cAMP und Ca^{2+} reguliert. Eine weitere große Gruppe bilden diejenigen Ionenkanäle, deren Öffnung durch das Membranpotential bestimmt wird (spannungsgesteuerte Ionenkanäle). Hierzu gehören auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kaliumkanäle der K_v7 Familie.

Spannungsabhängige Ionenkanäle sind effektive elektrische Leiter mit Transportraten bis zu 10^8 Ionen/s. Der Transport erfolgt passiv ohne Energieverbrauch entlang eines elektrochemischen Gradienten, der sich aus dem Konzentrationsgradienten (chemische Triebkraft) und der Potentialdifferenz (elektrische Triebkraft) zusammensetzt. Die Pore vermittelt dabei entweder eine unspezifische Selektivität für Kationen und/oder Anionen oder eine spezifische Selektivität für bestimmte Ionen. Neben der Selektivität bildet das sog. Kanalschaltverhalten (*engl.* gating) ein Unterscheidungsmerkmal der Ionenkanäle.

Es gibt drei Hauptkonformationszustände, in denen sich spannungsgesteuerte Ionenkanäle befinden können (geschlossen aktivierbar, offen aktiviert, inaktiviert und für Aktivierung refraktär). Durch Depolarisation verschiebt sich das Gleichgewicht dieser Zustände in Richtung des geöffneten Zustands. Während die geöffneten und geschlossenen Konformationen gemeinsame Merkmale aller spannungsgesteuerten Kanäle sind, werden inaktivierte Zustände nur von bestimmten Kanälen durchlaufen. Den hier untersuchten K_v7 Kaliumkanälen fehlt ein inaktiver Zustand. Der Strom, der in einem bestimmten Zeitraum durch einen Ionenkanal fließt, wird bestimmt durch die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, d.h. den Anteil der Zeit, in dem der Kanal geöffnet ist und den Durchtritt von Ionen erlaubt, und der Einzelkanalleitfähigkeit.

Ionenkanäle sind ubiquitär in jeder Zelle des Organismus vorhanden und haben neben ihrer Bedeutung für das Ruhemembranpotential und Aktionspotential in Neuronen unterschiedlichste Aufgaben. Sie sind u.a. beteiligt an der Regulierung des Wasser-Elektrolythaushalts einer Zelle, im Pankreas an der Regulierung der Insulinfreisetzung, in der Niere für die Kontrolle des Säure-Basen-Haushalts, im Herzmuskel für die Funktionalität des Reizleitungssystems. Im Gehirn mit seiner immensen Anzahl an Neuronen und Synapsen sind sie natürlich für die Informationsverarbeitung und -weiterleitung von außerordentlicher Bedeutung. Daraus ist ersichtlich, dass Mutationen in Ionenkanälen eine Vielzahl von Geweben betreffen können. So umschließt die Gruppe der Kanalkrankheiten u.a. Myopathien, Diabetes, Herzrhythmusstörungen, Mukoviszidose oder Epilepsien (Lehmann-Horn et Jurkat-Rott, 1999; Lerche et al., 2005). Mutationen in den hier untersuchten Kaliumkanälen führen zu einer besonderen Art der Neugeborenenepilepsie, bekannt als benigne familiäre neonatale Anfälle (BFNS).

1.2.1 Kationenkanäle

Kationenkanäle bestehen aus vier symmetrisch angeordneten Untereinheiten (Tetramere), die in der Symmetrieachse eine Pore ausbilden. Jede Untereinheit besteht aus hydrophoben, α -helikalen Abschnitten, die die Doppellipidschicht durchspannen, und hydrophilen Abschnitten, einschließlich der N- und C-terminalen Enden, welche intra- und/oder extrazellulär zu liegen

kommen. Die Anzahl der Transmembraneinheiten kann sehr unterschiedlich sein, wobei die evolutionär ältesten Formen wohl die Untereinheiten mit zwei oder sechs Transmembransegmenten sind.

Kationenkanäle bilden so eine große Superfamilie, die nach der Zahl der Transmembranbereiche (TM) und der Porenregion (P) in verschiedene Strukturklassen unterteilt ist. Die einfachste Untereinheit, die 2TM-Untereinheit, aus der z.B. Einwärtsgleichrichterkaliumkanäle (K_{ir}), epitheliale Natriumkanäle (eNaC) oder die Protonen-aktivierten Kanäle (ASIC) aufgebaut sind, besteht aus zwei Transmembraneinheiten und einer sie verbindenden Poren-Schleife oder P-Domäne, die eine wichtige Rolle beim Aufbau der Pore und des Selektivitätsfilters spielt. N- und C-Terminus liegen dabei intrazellulär. Dieses Modell wurde durch die erste Kristallstruktur bestätigt, die den prokaryontischen Kaliumkanal KcsA aus *Streptomyces lividans* (Doyle et al., 1998; MacKinnon et al., 1998) zeigte und für die MacKinnon 2003 den Nobelpreis erhielt.

Die häufigste Erweiterung ist die 6TM-Untereinheit aus sechs Transmembransegmenten, 6TM/1P-Kanälen. Sie bildet die Grundlage für die sehr große Gruppe der spannungsabhängigen Natrium-, Kalzium- und Kaliumkanäle. Spannungsgesteuerte Kationenkanäle sind aus einer tetramerischen α -Untereinheit bestehend aus vier homologen Domänen zu je sechs Transmembransegmenten (S1-S6) und fakultativ aus zusätzlichen kleineren β -Untereinheiten aufgebaut. Während die 6TM-Untereinheiten bei Kaliumkanälen einzeln biosynthetisiert werden und sich posttranslational zu Tetrameren zusammen finden, sind bei Natrium- und Kalziumkanälen 4 Untereinheiten verkettet in einem einzelnen Gen kodiert. Während die α -Untereinheit den Hauptteil des Kanals mit Spannungssensor, Selektivitätsfilter und Pore bildet, kommen den kleineren β -Untereinheiten modifizierende Eigenschaften in Bezug auf Stromkinetik, Stromamplitude oder Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu (Lehmann-Horn und Jurkat-Rott, 1999; Catterall, 2000).

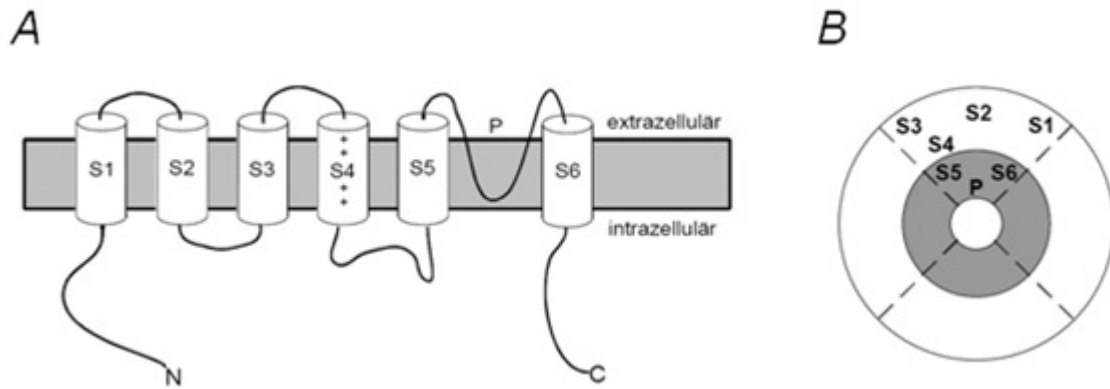


Abb. 3 Topologiemodell von α -Untereinheiten der K_V Kanäle.

A Topologisches Modell der α -Untereinheiten von K_V Kanal. Zu sehen sind die Transmembransegmente S1-S6, die P-Domäne und der Spannungssensor S4. **B** Schematische Darstellung der Kaliumkanalpore, die aus vier P Domänen gebildet wird.

1.2.2 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (K_V): Nomenklatur und Struktur

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle K_V werden aufgrund ihrer Sequenzhomologien in 12 Subgruppen unterteilt (K_{V1} - K_{V12}) (Gutman et al., 2005). Gleichzeitig entwickelte sich aus der HUGO Gen-Nomenklatur und dem Humangenomprojekt eine weitere Nomenklatur der Kanalgene, bestehend aus *KCN** als Bezeichnung für einen Kaliumkanal und einem weiteren Buchstaben für die entsprechende Familie: *KCNA-D* für K_{V1} - K_{V4} , *KCNF* (K_{V5}), *KCNG* (K_{V6}), *KCNQ* (K_{V7}), *KCNV* (K_{V8}), *KCNS* (K_{V9}) und *KCNH* (K_{V10-12}). Der Subtyp wird durch eine Zahl angegeben (z.B. $K_{V7.2}$ =*KCNQ2*; $K_{V7.3}$ =*KCNQ3*). Die Diversität wird durch die Fähigkeit der Zusammenlagerung zu Heteromeren von Mitgliedern einer Subfamilie und verschiedene „splicing“-Varianten der Untereinheiten weiter erhöht (Singh et al., 1998; Tinel et al., 1998; Lee et al., 2000; Smith et al., 2001).

Die α -Untereinheiten spannungsgesteuerter Kaliumkanäle bilden eine zentrale Pore, die von jeweils homologen Abschnitten der symmetrisch angeordneten P-loops begrenzt wird (MacKinnon, 1991; MacKinnon et al., 1993). Die Pore ist für Alkalimetallionen permeabel, wobei die Selektivität von Kalium gegenüber Natrium um den Faktor 1000 größer ist (MacKinnon et al., 1997). Die Selektivität wird durch eine in Kaliumkanälen konservierte Signatursequenz (GYG) gewährleistet, die innerhalb der P-Region liegt (Heginbotham et al., 1992 und 1994). Die beiden hydrophoben Transmembransegmente S5 und S6 bilden mit der Porenregion, die von der extrazellulären Seite in die Membran eintaucht, die

sogenannte Kernregion (Jan et al., 1994). Das vierte Transmembransegment S4 enthält innerhalb der α -Helix basische, positiv geladene Aminosäuren, die in regelmäßigen Abständen angeordnet sind ((R/K-X-X) n). Diese hochkonservierte Struktur dient als Spannungssensor und induziert die Kanalöffnung bei Depolarisation der Membran über einen für den Kanal kritischen Wert (Papazian et al., 1991; Larsson et al., 1996).

Die porenbildenden α -Untereinheiten stehen mit akzessorischen β -Untereinheiten in Wechselwirkung, was zu einer weiteren Diversität der Kanäle führt und wesentlichen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften haben kann (Rettig et al., 1994). Die akzessorischen β -Untereinheiten der K_v7 Kanäle heißen KCNE und besitzen eine Transmembrandomäne (Schroeder et al., 2000).

1.2.3 Ontogenese der Ionenkanäle

Wie bei allen Proteinen, die für den Transport an die Zellmembran bestimmt sind, spielen das raue Endoplasmatische Retikulum (ER) und der Golgi Apparat eine zentrale Rolle in der Biosynthese und dem weiteren Transport. Carol Deutsch (2002) bezeichnet den Vorgang von der Biosynthese (Translation) eines Ionenkanalproteins bis zur Oberflächenexpression des funktionellen Moleküls in der Plasmamembran als Ontogenese, die prinzipiell aus zwei Schritten besteht: der Biogenese und dem Transport (*engl.* trafficking). Als Biogenese bezeichnet man alle Vorgänge im ER, während Trafficking sich auf die Transportvorgänge vom und zum ER und anderen Zellkompartimenten bezieht.

1.2.3.1 Biogenese

Bei der Biosynthese wird, nachdem sich die ersten 15-30 Aminosäuren des neuen Proteins am Ribosomen angelagert haben, erkannt, dass ein Protein für den Export an die Membran vorgesehen ist. Ist eine hydrophobe Signalsequenz vorhanden, wird sich das Ribosom an das raue ER (*engl.* targeting) anlagern und mit Hilfe des sog. Translocons, welches eine Pore durch die Membran des ER bildet, dem neuen Protein den Durchtritt ins ER ermöglichen (*engl.* translocation). Während der Translokation werden auch die Veränderungen am neuen Protein,

z.B. Entfernung der Signalsequenz oder Glykosylierung, und die Integration der Transmembraneinheiten in die hydrophobe Lipiddoppelschicht vorgenommen. Die Oligomerisierung, Proteinfaltung und die Interaktion mit akzessorischen β -Unterheiten finden bei Ionenkanalproteinen ebenfalls im ER statt und werden durch die Enzyme und Chaperone des ERs unterstützt (Hille, 2001). Voraussetzungen einer Oligomerisierung sind die gleichzeitige Anwesenheit der Untereinheiten im ER und eine spezifische Erkennungssequenz. (Deutsch, 2002). Die Zusammenlagerung (*engl.* assembly) der Untereinheiten wird bei den meisten Kaliumkanälen vom N-Terminus (Li et al., 1992; Papazia, 1999) übernommen. Neben den ether-a-go-go Kanälen (Ludwig et al., 1997) ist bei den K_v7 Kanälen vor kurzem die Bedeutung des C-Terminus für die Tetramerisierung entdeckt worden (Maljevic et al., 2003; Schwake et al. 2003). Weitere Modifikationen können im Golgi Apparat vorgenommen werden, bevor die Vesikel das reife Kanalprotein an die Zellmembran transportieren.

1.2.3.2 Trafficking

Die richtige Expression eines Kanals ist nicht nur durch die Biogenese eines funktionellen Kanalproteins, sondern auch durch eine korrekte Zielfindung (*engl.* targeting), die richtige Lokalisation, die Anzahl der Kanäle und den Umsatz des Proteins an der Zellmembran bestimmt. Eines der Schlüsselmomente für die erfolgreiche Oberflächenexpression eines Kanalproteins ist der Transport vom ER zum Golgi Apparat. Eine Vielzahl von Studien zeigen, dass der Export einerseits durch eine interne Qualitätskontrolle der korrekten Oligomerisierung als auch durch verschiedene Kennsequenzen der synthetisierten Proteine (Zerangue et al., 1999; Schwappach et al., 2000) reguliert wird, wie z.B. dem Exportsignal FCYENE (Ma et al., 2001). Beim Auftreten einer fehlerhaften Proteinfaltung oder Zusammenlagerung der Untereinheiten, wird das Protein zurückgehalten, abgebaut und über den sog. Vorgang der retro-Translokation (Tsai et al., 2002) zurück in das Zytoplasma gebracht, wo die letztendliche Proteolyse in den Proteasomen erfolgt. Schließlich kann der Umsatz des Kanalproteins die Anzahl und Verteilung der Kanäle auf der Zellmembran beeinflussen (Deutsch, 2002).

1.2.4 Die KCNQ/ K_V7 Kaliumkanalfamilie

Zur Familie der K_V7 Ionenkanäle (Gutman et al., 2005) gehören bisher fünf Mitglieder (K_V7.1-K_V7.5). Sie werden zu den spannungsgesteuerten Ionenkanälen gezählt. Jeder Kanal ist aus vier Untereinheiten zusammengesetzt, wobei einerseits Homomere, andererseits durch Kombination von K_V7.3 mit K_V7.2, K_V7.4 oder K_V7.5 Untereinheiten in Analogie zu anderen K_V Kanälen Heterotetramere gebildet werden. Als gemeinsames Charakteristikum der Mitglieder der KCNQ Familie ist der C-Terminus im Vergleich zu anderen Kaliumkanälen elongiert und dient unter anderem der Interaktion zwischen K_V7.2 und K_V7.3 Untereinheiten (Maljevic et al., 2003; Schwake et al. 2003) und der Bindung eines modulatorischen Ca²⁺-Calmodulin-Komplexes an ein IQ Motiv (Isoleucin- und Gluaminreiche Domäne im C-Terminus) (Gamper et Shapiro, 2003).

K_V7.1 wird im Herzmuskel (Wang et al. 1996), in Lunge, Nieren, Leber, Innenohr sowie im Gastrointestinal-Trakt (Bleich und Warth, 2000) gefunden. Dementsprechend führen Mutationen der K_V7.1 Untereinheit zum sog. „Long-QT Syndrom“, einer Störung der kardialen Aktionspotentiale, welche zum plötzlichen Bewusstseinsverlust und Tod nach ventrikulärer Arrhythmie, insbesondere vom Typ der „torsade de pointes“ (Wang et al., 1996), führen kann. Diese Störung kann zusammen mit einer hereditären Taubheit, Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom (Schmitt et al., 2000), oder ohne Taubheit, Romano-Ward-Syndrom (Wang et al., 1996), auftreten. K_V7.4 wird hauptsächlich in den äußeren Haarzellen des Innenohrs und in den Haarzellen des Vestibularapparats exprimiert (Kubisch et al. 1999; Kharkovets et al., 2000), in denen der Funktionsverlust von K_V7.4 vermutlich zu einer Störung des Kaliumkreislaufs führt. Dies hat eine Erhöhung der intrazellulären Kaliumkonzentration zur Folge, was im Verlauf von Jahren die Zellen degenerieren lassen und zu Taubheit führen könnte (Kubisch et al., 1999; Kharkovets et al., 2000). K_V7.5 wird im Skelettmuskel und ZNS (Lerche et al., 2000; Schröder et al., 2000) exprimiert, wobei keine krankheitsauslösenden Mutationen bisher bekannt sind. Sowohl K_V7.2 und K_V7.3 können homomere, funktionelle Kanäle bilden, wobei der von K_V7.3 vermittelte Strom in *Xenopus* Oozyten viel kleiner ist als der K_V7.2 Strom (Yang et al., 1998). Diese Kanäle vermitteln Kaliumströme, die bei depolarisierenden Spannungen langsam

aktivieren und nach Repolarisation nur langsam deaktivieren (Biervert et al., 1998; Schroeder et al., 1998). Jedoch können $K_v7.2$ und $K_v7.3$ auch funktionelle, heteromere Kanäle bilden (Schroeder et al., 1998; Cooper et al., 2000). Bei Koexpression von $K_v7.2$ und $K_v7.3$ Kanälen zeigt sich ein großer Anstieg der Kaliumstromamplitude (Yang et al., 1998), wobei das Schaltverhalten, die Aktivierung und die Sensitivität gegenüber Inhibitoren nur leicht verändert sind (Wang et al., 1998; Hadley et al., 2000).

Anhand der kinetischen Eigenschaften, des Expressionsprofils sowie der Sensitivität der M-Kanäle gegenüber verschiedenen Substanzen gelang es Wang et al. (1998) heteromere $K_v7.2/K_v7.3$ Kanäle als morphologisches Korrelat des M-Stroms zu bestimmen. Inzwischen sind über 30 Mutationen in den $K_v7.2$ und $K_v7.3$ Untereinheiten identifiziert worden (Maljevic et al., 2008), die mit einer Form von vererbbarer Epilepsie bei Neugeborenen assoziiert sind (benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe, BFNS).

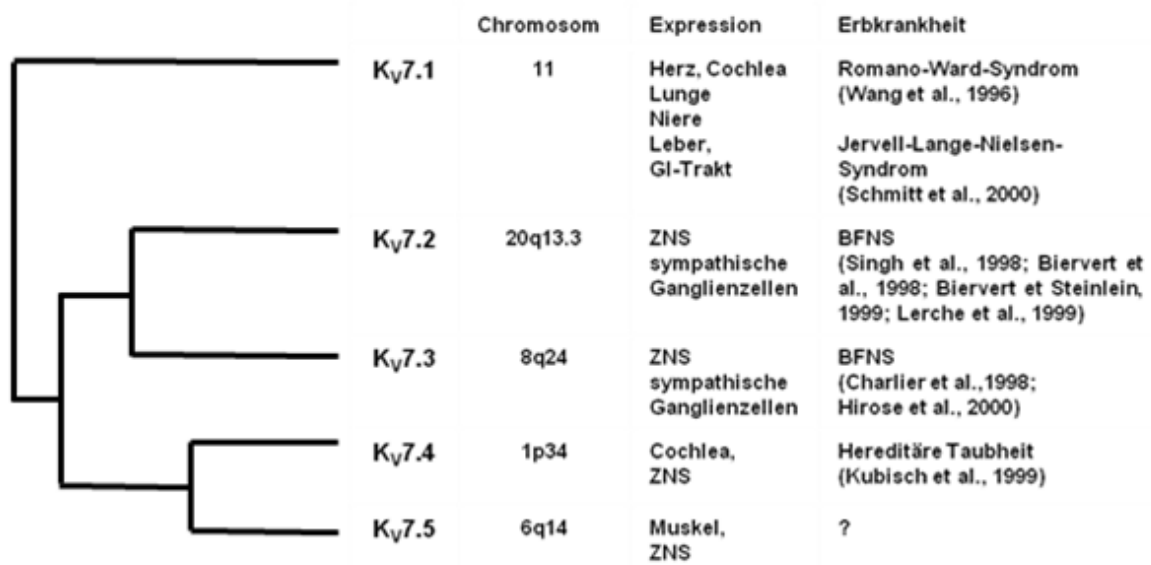


Abb. 4 Die KCNQ/ K_v7 Kaliumkanalfamilie.

Das Dentogramm zeigt den Grad der Sequenzübereinstimmung und die assoziierten Erbkrankheiten. BFNS: benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe

1.3 Benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe (BFNS)

Die autosomal-dominant vererbten benignen familiären Neugeborenenkrämpfe (Inzidenz ca. 1:100000) gehören zu den idiopathischen

fokalen Epilepsien. Sie treten in den ersten Lebenstagen in Form unprovoked Anfälle mit unterschiedlicher Semiologie und häufig in Clustern auf, und sie sistieren spontan nach einigen Wochen bis Monaten. Die Prognose ist gut, jedoch kann es in 15 % der Fälle später im Leben zu einem erneuten Auftreten von Anfällen kommen. Die Entwicklung der Kinder, das interiktale EEG und die neurologische Untersuchung fallen meist normal aus. In den vergangenen Jahren konnten mehrere Mutationen im Gen des $K_v7.2$ (Biervert et al., 1998; Singh et al., 1998; Biervert et Steinlein, 1999; Lerche et al., 1999) und des $K_v7.3$ Kanals (Charlier et al. 1998; Hirose et al., 2000) als Ursache für dieses seltene epileptische Syndrom identifiziert werden (Abb. 5 gibt einen Überblick über die meisten derzeit bekannten Mutationen). Mittlerweile sind über 30 BFNS Mutationen in fast allen Bereichen des $K_v7.2$ Kanals entdeckt worden (Maljevic et al., 2008). Bei diesen handelt es sich um Missense-, Nonsense-, Insertions- und Spleiss-Stellen-Mutationen, die alle zu einer Reduktion des resultierenden Kaliumstroms führen. Während Mutationen der P-Schleife die Leitfähigkeit des Kanals beeinflussen, verhindern Mutationen des C-Terminus die Formierung von Heteromeren oder den Transport an die Zellmembran, so dass die resultierende Reduktion des Kaliumstroms auf eine verminderte Dichte funktioneller Kanälen in der Membran zurückzuführen ist (Schwake et al., 2000). Bisher wurden nur zwei Mutationen in der S4-Domäne entdeckt, welche zu einer starken Verlangsamung der Aktivierung führen (Dedek et al., 2001; Wuttke et al., 2007).

Experimente zeigen, dass eine etwa 25%ige Reduktion des Kaliumstroms verglichen mit dem $K_v7.2/K_v7.3$ Wildtyp ausreichend ist, um die neuronale Erregbarkeit im Neugeborenenalter auf epilepsiegefährdetes Niveau zu erhöhen (Schroeder et al., 1998). So könnte eine Haploinsuffizienz die Ursache für die dominante Vererbung sein (Schroeder et al., 1998; Jentsch, 2000). Dementsprechend wird angenommen, dass dominant-negative $K_v7.2$ Mutationen mit einem erweiterten Phänotyp einhergehen müssen (Jentsch, 2000). Tatsächlich ist eine dominant-negative Mutation im S4 Segment des $K_v7.2$ Kanals entdeckt worden, welche bei den Betroffenen mit BFNS und persistierende Myokymien (Syn.: *engl.* Peripheral Nerve Hyperexcitability, PNH) assoziiert ist (Dedek et al., 2001).

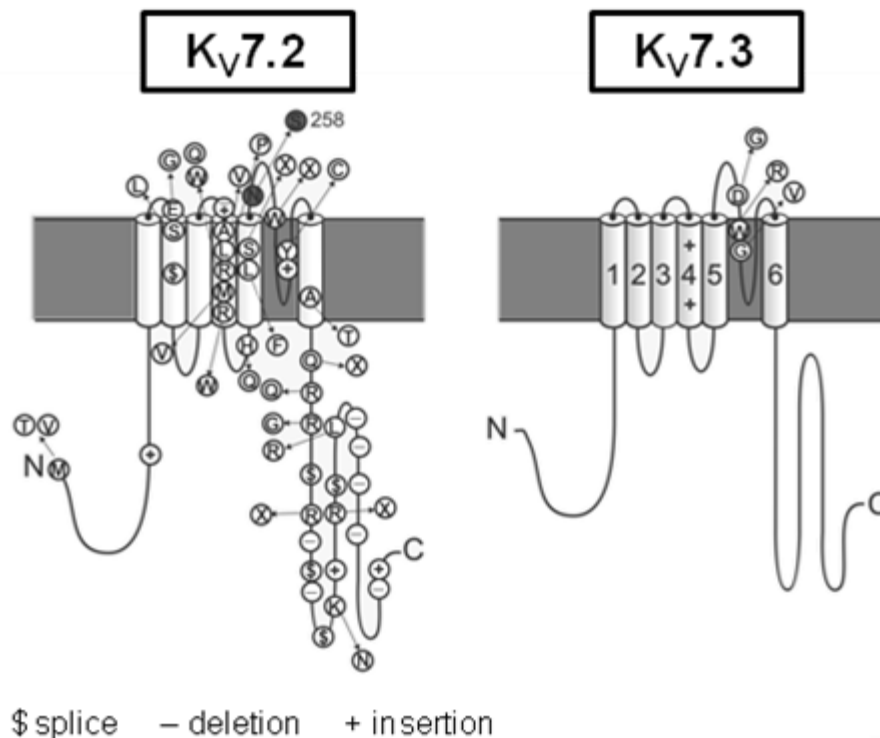


Abb. 5 BFNS Mutationen der K_V7.2 und K_V7.3 Untereinheiten

Benigne familiäre Neugeborenenkonvulsionen (BFNS) auslösende Mutationen in den K_V7.2/K_V7.3 Untereinheiten.

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist einerseits die funktionelle Analyse der N258S Mutation der K_V7.2 Untereinheit, welche bei drei Mitgliedern einer türkischen Familie zu BFNS führte (Yalcin et al., 2007). Der Aminosäureaustausch liegt in einer bisher nicht durch Mutationen betroffenen Region des K_V7.2 Kanals zwischen der S5 Domäne und der Porenregion, dem extrazellulären L5-H5-Linker. Dadurch erwarten wir neue Erkenntnisse über einen bisher wenig beachteten Teil des Kanalproteins. Andererseits soll die elektrophysiologische Charakterisierung von hippokampalen Neuronen von neugeborenen heterozygoten KCNQ2 Knock-Out Mäusen Hinweise liefern, warum diese Knock-Out Mäuse einen so unauffälligen Phänotyp ohne bisher beobachtete Anfälle haben und ob postnatale Veränderungen des neuronalen Feuerungsverhaltens für das fehlende Auftreten von Anfällen verantwortlich gemacht werden können. Zudem soll durch die elektrophysiologische Charakterisierung der hetero- und homozygote KCNQ2 Knock-Out Mäuse ein neuronales Expressionssystem für die Analyse von K_V7.2 Mutationen etabliert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Substanzen

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Zur Herstellung von Lösungen wurden sofern nicht anders angegeben Chemikalien der Herstellerfirmen Roth (Karlsruhe, Germany), Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Diesenhofen, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), USB (Ohio, USA), Biorad (Hercules, USA), Riedel de Haen (Seelzen, Deutschland) verwendet. DNA modifizierende Enzyme wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), New England Biolabs (Beverly, MA, USA) und Pharmacia (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bezogen. Oligonukleotide wurden von Thermohyaid (Ulm, Deutschland) hergestellt.

2.1.2 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

<u>DNA Ladepuffer:</u>	30% (v/v) Saccharose, 50 mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau, 0.1% SDS
<u>DMEM:</u>	Invitrogen™, Karlsruhe, Germany
<u>DMEM+ :</u>	5 ml fetales Kälberserum 500µl Glutamin 500µl Penicillin / Streptomycin auf 50 ml mit DMEM (Invitrogen™, Karlsruhe, Germany)
<u>DPBS (+ CaCl₂/MgCl₂):</u>	Invitrogen™, Karlsruhe, Germany
<u>DPBS (- CaCl₂/MgCl₂):</u>	Invitrogen™, Karlsruhe, Germany
<u>HAM's F-12:</u>	Biochrom AG, Berlin, Germany (w/o Glutamin)
<u>HBSS (- Ca²⁺/Mg²⁺):</u>	Invitrogen™, Karlsruhe, Germany
<u>Kulturmedium (CHO):</u>	HAM's F-12 (Biochrom AG, Berlin, Germany) + 10% fetales Kälberserum, FCS (Biochrom AG)

<u>Lysispuffer:</u>	5 ml	1 M Tris-HCL (pH 7,5)
	10 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
	2 ml	5 M NaCl
	0,5 ml	1 M DDT
	50 µl	1 M Spermidin
	20 ml	10% SDS
	62,45 ml	H ₂ O
<u>Neurobasal+:</u>	1 ml	Vitamin B27
	250 µl	Glutamin
	500 µl	Penicillin/Streptomycin
	auf 50 ml	mit Neurobasal (w/o Glutamine) (Invitrogen™)
<u>RTG Stock-Lösung:</u>	1 mmol	Retigabin (RTG)
	10 µl	Dimethylsulfid (DMSO)
<u>500 µM RTG Lösung:</u>	5 µl	RTG Stock-Lösung
	auf 2 ml	mit HAM's F-12
	Die DMSO Konzentration lag bei 2,5%.	
<u>TBE:</u>	5 mM	Tris-Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8.0
<u>Trypsin Lösung:</u>	Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%, in PBS, w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	
	Biochrom AG, Berlin, Germany	

2.1.3 Vektoren

Für die Experimente in CHO Zellen wurde der pcDNA3.1hygro Expressionsvektor (Invitrogen™, Karlsruhe, Germany) verwendet. Der pcDNA3.1hygro Vektor ist ein Standardvektor für Expressionen in Säugetierzellen. Das eingeführte Gen steht unter der Kontrolle eines CMV Promotors. Des Weiteren besitzt der Vektor einen T3 und T7 Promoter, ein lacZ Gen, ein Ampicillin- und ein Neomycin Resistenzgen. Abhängig von der Orientierung des Polylinkers werden eine (+) und eine (-) Form angeboten (pcDNA3.1+ oder pcDNA3.1-). Letztlich liefert die Einführung eines Hygromycin Resistenzgens ein Werkzeug zur Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien (pcDNA3.1hygro).

2.1.4 cDNAs der verwendeten Kanäle

Wir verwendeten humane Klone von KCNQ2 und KCNQ3 (von Prof. Dr. Thomas Jentsch zur Verfügung gestellt). Die GenBank™ Zugangsnummern für die Sequenzen der genannten Klone lauten wie folgt: hKCNQ2, NM004518; hKCNQ3,

NM004519. Die N258S Mutation wurde von Frau Prof. Dr. Ortrud K. Steinlein zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Fusionsproteine

Für die Untersuchung von heteromeren Kanälen wurden Fusionsproteine zwischen K_V7.2 oder N258S und der K_V7.3 Untereinheit konstruiert. Hierzu wurde mit Hilfe der PCR Technik das C-terminale Stop-Codon der K_V7.3 Untereinheit entfernt und über eine zusätzlich eingefügte Sequenz mit dem N-terminalen Ende der K_V7.2 oder N258S Untereinheit verknüpft. Die Zusatzsequenz bestand hauptsächlich aus einem Poly-A-Anteil und einer zusätzlichen FCYENE Sequenz (Ma et al., 2001).

2.2 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden zum größten Teil von Frau Dr. Snezana Maljevic und Jeannette Liebrich durchgeführt

2.2.1 DNA Isolation

Zur Genotypisierung der Knock-Out Mäuseföten wurden bei der Präparation der Hippokampi die dazugehörigen Fötusschwänze entsprechend beschriftet eingefroren (vgl. Kap. 2.4.4). Zu den Eppendorfgefäßen mit den aufgetauten Mäuseschwänzen wurden 500 µl des Lysispuffers und 10 µl Proteinase K gegeben und über Nacht bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 12000 rpm. Der Überstand wurde in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und 350 µl 100%iges Isopropanol dazugegeben. Durch vorsichtiges Kippen erfolgte die Vermischung, sodass die DNA ausfiel. Nach 15 min Zentrifugation bei 12000 rpm wurde das entstandene Pellet mit 350 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach weiteren 5 min Zentrifugation bei 12000 rpm wurde das Pellet luftgetrocknet und anschließend in 50µl destilliertem Wasser gelöst.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Genotypisierung wurden 1 µl der gelösten DNA zum PCR-Ansatz vervollständigt (siehe unten) und die Reaktion in einer PCR-Maschine (T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Germany) durchgeführt. Die benötigten Primer wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) zur Verfügung gestellt: KCNQ2-Neo-F (5'-GGGCCAGCTCATTCCTCCCACTCAT-3'), KCNQ2-GS-R (5'-GGTGATAAGAAGGAAGTCCAGAAG-3'), KCNQ2-GS-F (5'-ATCGTG ACTATCGTGGTATTCGGTG-3'). Nach einem 3 minütigem Denaturierungsschritt bei 94°C folgten 35 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Primerannealing bei 60°C und 30 s Extension bei 72°C. Nach Ablauf der Zyklen erfolgte ein Extensionsschritt für 3 min bei 72°C. Für die Größenaufftrennung der DNA-Fragmente wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet.

PCR- Ansatz

1 µl	gelöste DNA (siehe Kap. 2.2.1)
2 µl	Primer 1 (10 pmol): KCNQ2-Neo-F
2 µl	Primer 2 (10 pmol): KCNQ2-GS-R
2 µl	Primer 3 (10 pmol): KCNQ2-GS-F
1,5 µl	MgCl
1,5 µl	10x Taq Polymerase Puffer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
0,5 µl	dNTP's (100 mM)
0,2 µl	Taq Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
14,3 µl	dest. H ₂ O

2.2.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

Mit der Agarosegelelektrophorese erfolgte das Auftrennen von DNA Fragmenten nach ihrer Anzahl an Basenpaaren. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose (2 %) in TBE Puffer (siehe Kap. 2.1.2) kurz in der Mikrowelle aufgekocht. Um die DNA Banden nach Durchführung der Elektrophorese im UV Licht sichtbar machen zu können, fügten wir nach Abkühlen des Gels auf 60°C 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hinzu. Anschließend wurde das Gel in eine horizontale Kammer (Peglab, Erlangen, Deutschland) gegossen. Ein Kamm hielt dabei die zum Laden der DNA benötigten Taschen frei und wurde nach Aushärten des Gels vorsichtig entfernt. Um sicherzustellen, dass die DNA beim Laden in die Geltaschen einsinkt, wurde jede Probe mit 1/5 des Gesamtvolumens Ladepuffer (siehe Kap. 2.1.2) vermischt. Die Größe der DNA Fragmente konnte anhand eines zeitgleich mit den Proben aufgetragenen kb Markers abgeschätzt werden. Die angelegte Spannung lag zwischen 100-140 mV. Das zu Beginn beigemischte Ethidiumbromid

interkalierte bei der Wanderung der Fragmente durch das Gel in die DNA und ermöglichte somit eine Sichtbarmachung sowie Fotodokumentation (Transluminator ImageMaster VDS, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) der DNA Banden im UV Licht.

2.3 CHO Zellen als Expressionssystem für Ionenkanäle

Chinesische Hamsterovarien Zellen (CHO-K1) sind eines der Standardexpressionssysteme für die elektrophysiologische Untersuchung von Ionenkanälen. Ihr Vorteil besteht insbesondere im nur geringen Gehalt an endogenen Kaliumkanälen, wodurch sie für die Untersuchung von $K_v7.2$ besonders geeignet sind (Gamper et al., 2005).

2.3.1 Zellkultur

Die Zellen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter 5% CO_2 bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit in 50 ml Zellkulturflaschen (*engl.* flask) (Nunc™, Roskilde, Denmark) gehalten. Die Zellen wurden mindestens alle 3 Tage auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Zum Aufteilen (*engl.* splitting) des Zellrasens wurden die Zellen mit PBS gespült, um inhibierende Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Trypsinaktivität zu verhindern. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen für ca. 1 min mit auf 37°C vorgewärmter Trypsin (0,05%)/EDTA(0,02%)-Lösung (Biochrom AG, Berlin, Germany) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin verworfen und die Reaktion durch 5 ml serumhaltiges HAM's F-12 Medium (Biochrom AG, Berlin, Germany) gestoppt. Die Zellen wurden durch mehrfaches Aufsaugen mit der Pipette vereinzelt und in der gewünschten Verdünnung ausgesät. Nach spätestens 50 Passagen wurden die Zellen verworfen.

2.3.2 Transfektion von CHO Zellen

Für die Transfektion wurden die CHO Zellen nach Trypsinierung und Verdünnung auf 35-mm Kulturschalen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) verteilt und mit serumhaltigem HAM's F-12 Medium (Biochrom AG, Berlin, Germany) 24 Stunden inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden

die Schalen bei 50-80% konfluiertem Zellrasen zur Transfektion ausgesucht. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe von *Lipofectamine* (Invitrogen™, Karlsruhe, Germany), hierzu lagen die zu transfizierenden cDNA Konstrukte im pcDNA3.1hygro Expressionsvektor vor.

Für die Transfektion wurden parallel Mischungen aus 125 µl serumfreiem HAM's F-12 Medium mit 2 µg Kanal und 1 µg CD8 cDNA und 125 µl serumfreiem HAM's F-12 Medium mit 10 µl *Lipofectamine*-Reagenz angesetzt. Bei Experimenten zum dominant-negativen Effekt wurde insgesamt 4 µg Kanal cDNA und 15 µl *Lipofectamine*-Reagenz verwendet. Die Lösungen wurden vorsichtig miteinander vermischt und 30 bis 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurde bei einer ausgewählten 35-mm Schale das Medium verworfen und mit 1 ml serumhaltigem Medium bedeckt. Die *Lipofectamine*-Mischung wurde hinzugegeben und die Zellen dann 7-10 Stunden oder über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz gegen komplettes Medium ausgetauscht und die Zellen wurden zur maximalen Proteinexpression weitere 38 bis 41 Stunden inkubiert.

Am Tag der Messung wurden 35 mm Schalen mit 10% Poly-D-Lysin für 5 min auf Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 Mal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 2 ml serumhaltigem Medium gefüllt. Die transfizierten Schalen wurden mit PBS gewaschen und nach dem Absaugen des PBS für ca. 30 bis 40 s mit auf 37°C vorgewärmten Trypsin/EDTA (Biochrom AG, Berlin, Germany) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin verworfen und die Reaktion durch 2 ml serumhaltiges Medium gestoppt. Die Zellen wurden durch mehrfaches Aufsaugen mit der Pipette vereinzelt und in der gewünschten Verdünnung auf die mit Poly-D-Lysin behandelten Schalen ausgesät. Nach weiteren 2-4 Stunden Inkubation unter Standardbedingungen folgten die elektrophysiologischen Untersuchungen. Die Visualisierung der transfizierten Zellen erfolgte mittels 1 minütiger Inkubation mit Dynabeads (Dyna®l®, Invitrogen™, Karlsruhe, Germany).

2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellkulturzellen

Am Tag der Einfrierungsprozedur wurden die am Vortag gesplitteten Zellen mit Hilfe von Trypsin und PBS nach der oben beschriebenen Weise gelöst. Die Zellen von insgesamt drei Kulturflaschen wurden mit insgesamt 10 ml kaltem serumhaltigem Medium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (*engl.* falcon) gegeben. Diese Suspension wurde in der Zentrifuge sedimentiert (10 min, 3000 rpm), der Überstand abgesaugt und der Zelniederschlag in Gefriermedium gegeben (DMEM mit 10% DMSO). Nach Überführung von 1 ml dieser Suspension in Einfrierröhrchen wurden die Zellen zunächst in einer mit Trockeneis gefüllten Styroporbox bei -80°C ü.N. eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstofftank genommen und schnellstmöglich in 5 ml kaltes Medium überführt. Diese Zellkulturflasche wurde für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen nach der üblichen Weise behandelt. Nach 6-10 Passagen konnten die Zellen für elektrophysiologische Experimente verwendet werden.

2.4 KCNQ2 Knock-Out Maus

2.4.1 Mäusestamm

Die Mäuse mit der Deletion des KCNQ2-Gens tragen den Stammmamen B6.129P2-Kcnq2^{tm1Dgen}/J und wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) bezogen. Diese Knock-Out Mäuse wurden entwickelt und charakterisiert durch Deltage, Inc. (San Mateo, USA). Dabei wurde ein bakterielles lacZ Gen (Lac0-SA-IRES-lacZ-Neo555G/Kan) in das KCNQ2 Gen inseriert, so dass der endogene Genpromoter die Expression von beta-Galaktosidase reguliert. RT-PCR Untersuchungen zeigen hohe Gentranskription in Gehirn, Rückenmark, Hypophyse, Nebenniere, sowie in geringem Grade in Augen, Lymphknoten, Gallenblase, Magen, Dünndarm, Caecum, Hoden, Nebenhoden, Prostata, Ovarien und weißem Fettgewebe. Eine Expression der beta-Galaktosidase konnte in keinem dieser Gewebe festgestellt werden. Heterozygote Tiere zeigen eine

erhöhte Anfälligkeit für mit Metrazol induzierte epileptische Anfälle als WT Mäuse. Homozygote Knock-Out Mäuse sind letal. Die Daten über den Phänotyp und die Genexpression in diesen Mäusen wurden bei MGI eingereicht und sind frei abrufbar. Insgesamt zeigt dieser Mäusestamm vergleichbare Eigenschaften mit den K/O Mäusen von Watanabe et al. (2000).

2.4.2 Haltung und Fütterung

Die Haltung und Fütterung der Mäuse erfolgte artgerecht gemäß den Tierschutz-Richtlinien der Universität Ulm und dem deutschen Tierschutz-Gesetz durch das Tierforschungszentrum der Universität Ulm.

2.4.3 Hippokampuspräparation

Präparation der Föten aus dem Uterus

Die gravide Maus wurde nach der Tötung mit CO₂ auf dem Rücken liegend mit 70% Ethanol desinfiziert. Mit einer chirurgischen Pinzette und einer Schere wurde der Bauch median von der Symphyse bis zum Processus xyphoideus eröffnet. Mit einer anatomischen Pinzette und einer frischen, kleineren Schere wurde das Peritoneum eröffnet und der Uterus entnommen. Er wurde in eine sterile Gewebekulturschale gelegt. Durchschnittlich zeigte eine gravide Maus 8 Föten. Die [+/+], [+/-] und [-/-] Föten waren makroskopisch nicht voneinander unterscheidbar.

Präparation des Hippokampus der Mäuseföten

Die Föten wurden aus dem Uterus freigelegt und einzeln präpariert. Nach der Decapitation und Entfernung der Schädelkalotte wurde das Gehirn aus dem Schädel herausgelöst und in eine beschriftete Gewebekulturschale mit 4°C kaltem HBSS eingebracht. Gleichzeitig wurde die zum Embryo gehörende Schwanzspitze mit einem Scherenschlag abgetrennt und in einem entsprechend beschrifteten Eppendorfgefäß zur späteren Genotypisierung des Embryos eingefroren.

Nach Entfernung der weichen Meningen und der beiden Bulbi olfactorii werden die beiden Hemisphären vorsichtig vom Corpus callosum ausgehend vom

restlichen Gehirn entfernt, so dass sich der Hippocampus in den abgetrennten Hemisphären als dunkles Band im Hirngewebe darstellt (Abb. 6). Dieser wird vorsichtig mit einer gebogenen scharfen Pinzette an einem Stück herausgetrennt. Bis zur Aufarbeitung in der Zellkultur wird er auf Eis in HBSS Lösung gelagert.

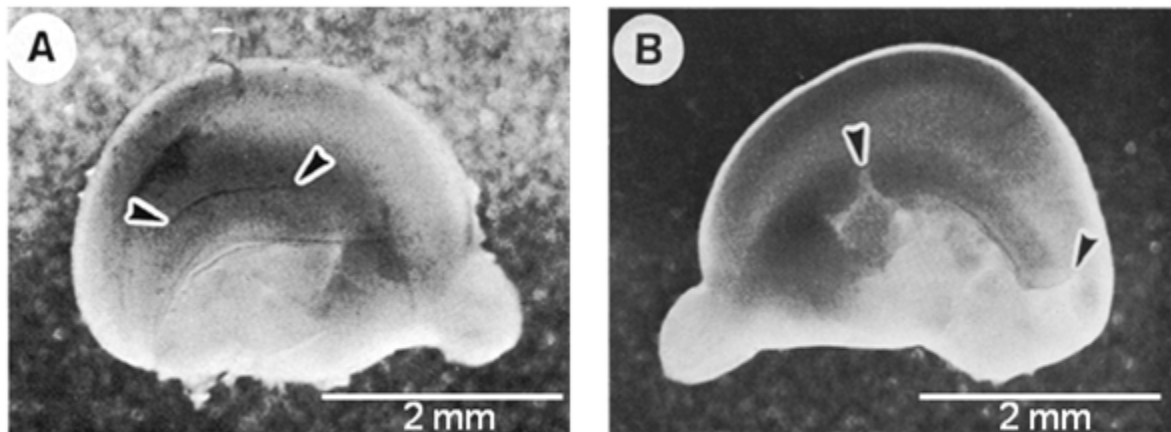


Abb. 6 Lokalisation des embryonalen Hippokampus (aus Peacock et al., 1979)

Die mediale Oberfläche der linken und rechten Hemisphäre eines Mäusefötus. **A** Bei vorhandenen Meningen zeigen typische Blutgefäße die Lage der hippokampalen Fissur (Pfeile) **B** Nach Entfernung der Meningen zeigt sich der Hippokampus als dunkles Band im Hirngewebe.

Vorbereitung der Kulturgefäße

Als Kulturgefäße wurden sterile 24-well Zellkulturplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) verwendet. In jedes Well, eine sog. Vertiefung in der Platte, wurden Glasplättchen mit einem Durchmesser von 13 mm unter den sterilen Bedingungen einer Zellkulturwerkbank hineingelegt. Die Glasplättchen wurden zuvor zweimal mit ca. 20 ml vergälltem 99,9% Ethanol, einmalig mit 20 ml Bidest in einem Erlenmeyer-Kolben gewaschen und anschließend ausgebacken.

Als Beschichtung wurde pro Well 500 µl Poly-L-Lysin (steril filtriert) aufgebracht, im Zellkultur-Inkubator für eine Stunde inkubiert und anschließend mit autoklaviertem Bidest dreimalig ausgewaschen. Mit 500 µl HBSS (Invitrogen™, Karlsruhe, Germany) in den Wells verblieben die Platten bis zu ihrer Verwendung am nächsten Tag im Inkubator der Zellkultur bei 37°C.

Ansetzen der Zellkultur

Um nicht erwünschte Gewebereste zu entfernen wurden das präparierte Hippokampusgewebe dreimalig mit 10 ml angewärmtes HBSS vorsichtig gewaschen. Nachdem die Gewebestücke beim letzten Waschgang auf den Boden

des 50 ml Zentrifugenröhrchen gesunken waren, wurde der Überstand bis auf ein Restvolumen von 1,8 ml abgenommen. Zu den nun gewaschenen Gewebestücken wurden 200 µl 2,5%ige Trypsinlösung zugegeben und bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Trypsin löst die Zellverbände auf, ohne dabei die einzelnen Zellen zu zerstören. Anschließend wurde fünfmalig mit HBSS gewaschen, indem ca. 8 ml zugesetzt und wieder vorsichtig abgenommen wurden. Beim letzten Waschgang wurde das HBSS auf 1,6 ml abgenommen und 400 µl DNase-Lösung zugesetzt (Endkonzentration 0,001 %). DNase zerstört freigewordene DNA aus den Zellen. Durch langsames Auf- und Abziehen lösten sich die Zellverbände ganz auf. Dies wurde solange wiederholt bis keine Zellverbände mehr erkennbar waren. Anschließend wurde ca. 18 Mal mit angewärmtem DMEM nachgespült. Das HBSS in den Wells der vorbereiteten Kulturschalen wurde durch 500 µl DMEM+ pro Well ersetzt und die bestückten Platten in den Inkubator (37°C, Luftfeuchtigkeit 95 %, CO₂-Sättigung 5 %) gestellt.

Pflege der neuronalen Kulturen

Nach ca. 24 Stunden sollte das Medium gewechselt werden. Die aufgebrachten Zellen haben sich nach dieser Zeit auf den beschichteten Glasplättchen angeheftet, die beschädigten Zellen sind untergegangen und die ersten Abbauprodukte der neuronalen Kultur sind in das Medium abgegeben worden. Die DMEM+ Lösung wurde entnommen und durch 600 µl angewärmte Neurobasal+ Lösung ersetzt. Das Nährmedium wurde je nach Bedarf alle 5-7 Tage gewechselt.

2.4.4 Genotypisierung

Die Genotypisierung (vgl. Kap. 2.2) erfolgte mit Hilfe der bei der Präparation eingefrorenen Mäusefötenschwänze, sodass für alle Neurone eine eindeutige Zuordnung zum Genotyp des Ursprungsfötus möglich war. Die benötigten Primer wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) zur Verfügung gestellt.

2.5 Immunofluoreszenz

2.5.1 Färben von K_v7.2 transfizierten CHO Zellen

Für die Experimente bzgl. der Oberflächenexpression wurden die CHO Zellen nach der oben beschriebenen Art und Weise vorbereitet und transfiziert. 7-10 Stunden vor der Färbung wurden die transfizierten Zellen auf mit Poly-D-Lysin beschichtete Glasplättchen übertragen und anschließend für 20 min mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach ausgiebigem Auswaschen mit PBS wurden die Zellen geblockt und durch 30minütige Inkubation mit 3%igem Ziegsen Serum und 0,2% Triton X-100 (in PBS) permeabilisiert. Es folgte ein 5minütiger Waschschrift in PBS. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (rabbit anti-KCNQ2, 1:200, Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel) über Nacht bei 4°C. Nach ausgiebigem Auswaschen mit PBS folgte eine 1stündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper, AlexaFluor488-coupled goat anti-rabbit (1:500, Invitrogen™, Karlsruhe, Germany), bei Raumtemperatur. Schließlich wurden die Zellkerne mit DAPI für 2 min gegengefärbt. Die Glasplättchen wurden mit Hilfe von ProLong Antifade (Invitrogen™, Karlsruhe, Germany) versiegelt und haltbar gemacht. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit einem Konfokalmikroskop.

2.5.2 Grundzüge der Konfokalmikroskopie

Das Konfokalmikroskop (*engl.* CLSM, confocal laser scanning microscope) ist ein Lichtmikroskop, welches optisch mikroskopische Schnitte in dreidimensionalen Strukturen (Gewebe) erzeugen kann. Durch Datenverarbeitung in einem Computer können diese Schnitte zu einer räumlichen Darstellung zusammengefügt werden. Wird am Lichtmikroskop normalerweise durch Überlagerung der lichtoptisch scharf eingestellten Ebene durch anliegende Ebenen die Auflösung herabgesetzt (verwaschen), so ermöglicht das Konfokalmikroskop die Darstellung nur einer Schnittebene. Dabei wird das Licht auf einen Punkt in dieser Ebene fokussiert und durch Verschieben des Punktes eine ganzheitliche Darstellung der Ebene ermöglicht. Licht außerhalb der gewünschten Ebene wird durch eine Lochblende (Pinhole) unterdrückt. Damit

reduziert sich die Unschärfe. Durch diese Technik lassen sich hochauflösende dreidimensionale Bilder generieren (Auflösung bis 200 nm Objektgröße). Durch Verwendung verschiedener Laser und Blenden können vor allem Fluoreszenzmehrfachmarkierungen mit höchster Genauigkeit dargestellt werden. Aus den gewonnenen Datensätzen lassen sich die jeweils gewünschten Informationen herausfiltern. Die Lichtfrequenzen können durch Masken (ähnlich wie Filter bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie) auf die gewünschten Spektren reduziert werden.

2.5.3 Durchführung der Immunfluoreszenzaufnahmen

Alle Experimente wurden mit einem an ein Eclipse T300 inverses Mikroskop (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) angebrachtes Radiance 2000 Konfokalmikroskop (Bio- Rad Cell Science Division, Hemel Hempstead, United Kingdom) durchgeführt. Dieses System war bestückt mit drei Lasern, Argon-Ion (Wellenlänge: 488 nm und 514 nm), Ne-He (543 nm) und Red diode (639 nm), und 3 Photomultipliern. Bilder wurden 24-48 Stunden nach Transfektion angefertigt. Die Aufnahmen und die Analyse erfolgte mit Hilfe der Lasersharp 2000 Software (Biorad). Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden zum größten Teil von Frau Dr. Snezana Maljevic durchgeführt.

2.6 Elektrophysiologie

In der vorliegenden Arbeit wurde zur elektrophysiologischen Charakterisierung der $K_{V7.2}$ Mutation und der KCNQ Knock-Out Neurone die von Neher und Sakmann im Jahre 1976 zur Messung von Ionenkanälen entwickelte Patch-Clamp Technik verwendet. Neher und Sakmann entwickelten die Patch-Clamp-Technik, um einzelne Ionenkanäle in biologischen Membranen zu untersuchen, jedoch haben sich seit der Einführung der Patch-Clamp-Technik zahlreiche andere Anwendungsmöglichkeiten ergeben, so dass die Patch-Clamp-Technik heute die wohl meistverwendete Messmethode in der Elektrophysiologie ist.

2.6.1 Patch-Clamp Technik

Bei Patch-Clamp Experimenten wird mit Hilfe eines Mikromanipulators und ständiger, mikroskopischer Sichtkontrolle eine Glaspipette vorsichtig auf die zu messende Zelle aufgesetzt. Um einen hohen Abdichtwiderstand (*engl.* seal) zwischen Pipette und Zellmembran zu erhalten wird ein Membranfleck (*engl.* patch) vorsichtig an die Pipettenöffnung gesaugt und es kommt zu einem direkten Kontakt zwischen Glas- und Membranoberfläche. Das Membranstück unter der Pipette wird damit elektrisch effektiv von der Umgebung und ihrem Hintergrundrauschen isoliert, wobei die Widerstände zwischen Pipetteninnerem und Badlösung im Bereich mehrerer Gigaohm liegen können, sog. Gigaseal. Nach der Bildung des Gigaseals ist die Verbindung zwischen Membran und Messpipette so fest, dass verschiedene Manipulationen möglich sind (Abb. 7). So können nicht nur Kanalöffnungen gemessen werden, indem man die Pipette auf die Zellmembran aufsetzt (Cell-attached-Konfiguration, siehe Kap. 2.6.4.1), sondern es lässt sich durch einen kurzen Saugimpuls das Membranstück unter der Pipette durchbrechen (Whole-Cell-Konfiguration, siehe Kap. 2.6.4.2). Dabei erhält man einen offenen Zugang zum Zytoplasma und es resultiert eine Konfiguration, bei der man die Ströme durch die gesamte Zellmembran messen kann. Durch Zurückziehen der Pipette kann man das Membranstück aus der Zellmembran herausreißen und die im Membranfleck vorhandenen Kanäle zellfrei messen. Durch unterschiedliche Manipulationen lassen sich diese Membranstücke so anordnen, dass entweder die ursprüngliche zytoplasmatische Seite der Zellmembran zur Badlösung weist (Inside-out-Konfiguration) oder die extrazelluläre Oberfläche (Outside-out-Konfiguration).

Bei der Patch-Clamp Technik handelt es sich um ein spezielles Voltage-Clamp- oder Spannungsklemmverfahren, d.h. es wird das Membranpotential festgelegt und der dabei durch die Membran fließende Strom gemessen. Bei Patch-Clamp Experimenten ermöglicht ein Schaltkreis, der sog. Strom-Spannungs-Wandler, eine Spannungsmessung und Strominjektion mit nur einer Elektrode. Bei Abweichung zwischen Pipettenpotential und Kommandopotential vermittelt der Strom-Spannungs-Wandler -des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verstärkers- über einen Rückkopplungswiderstandes einen Kompensationsstrom bis die Differenz aufgehoben ist (Abb. 8). Dieser

Kompensationsstrom ist genauso groß wie der Strom, der durch die Membran fließt und lässt Schlüsse auf die Leitfähigkeit der Membran zu.

Für die elektrophysiologische Charakterisierung des Feuerungsverhaltens von Neuronen muss man nach Durchbrechung der Membran zur Whole-Cell-Konfiguration in die sog. Current-Clamp- oder Stromklemmenanordnung umschalten, in der man den Strom durch die Membran fest vorgeben kann und die resultierenden Potentialschwankungen registriert. Einzelheiten der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konfigurationen werden in den entsprechenden Kapiteln besprochen.

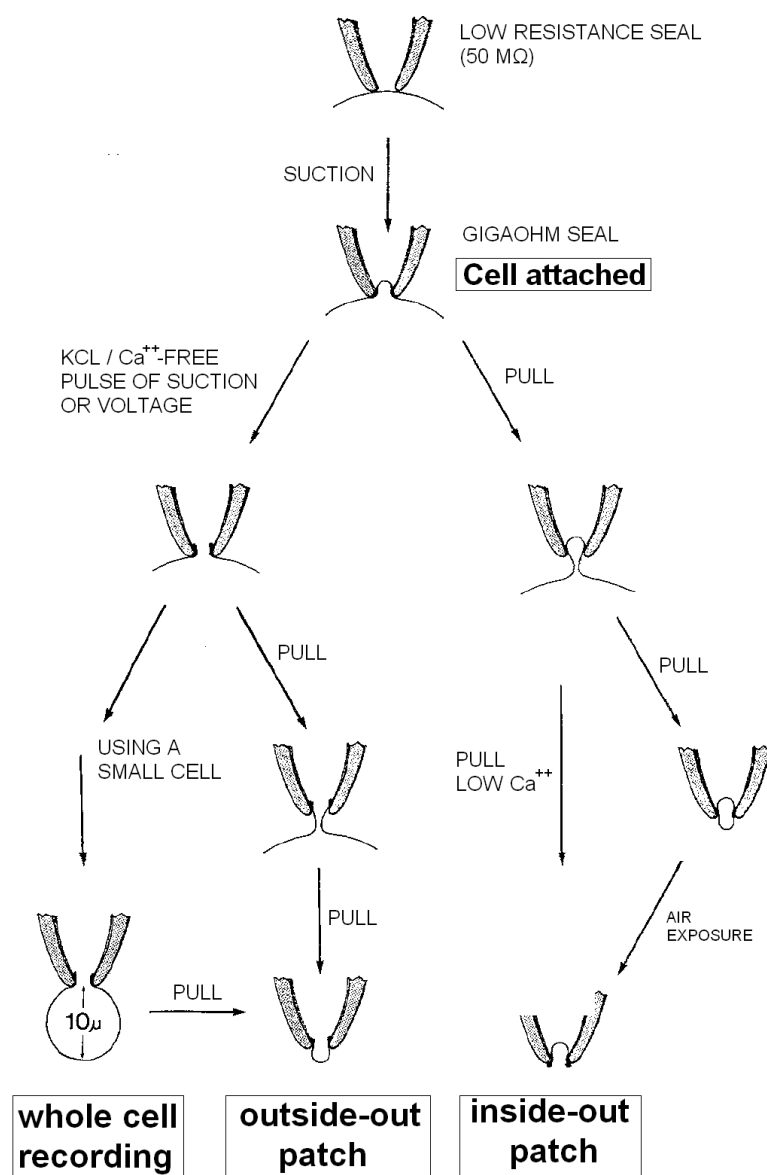


Abb. 7 Schema der unterschiedlichen Messkonfigurationen der Patch-Clamp-Technik und ihre Herstellung. (nach Hamill et al., 1981)

Vorzeichenkonventionen

Ein Strom positiver Ionen in die Zelle hinein ist ein Einwärtsstrom und wird definitionsgemäß mit negativem Vorzeichen belegt, ein Strom positiver Ionen aus der Zelle heraus ist ein Auswärtsstrom und wird definitionsgemäß mit einem positivem Vorzeichen belegt.

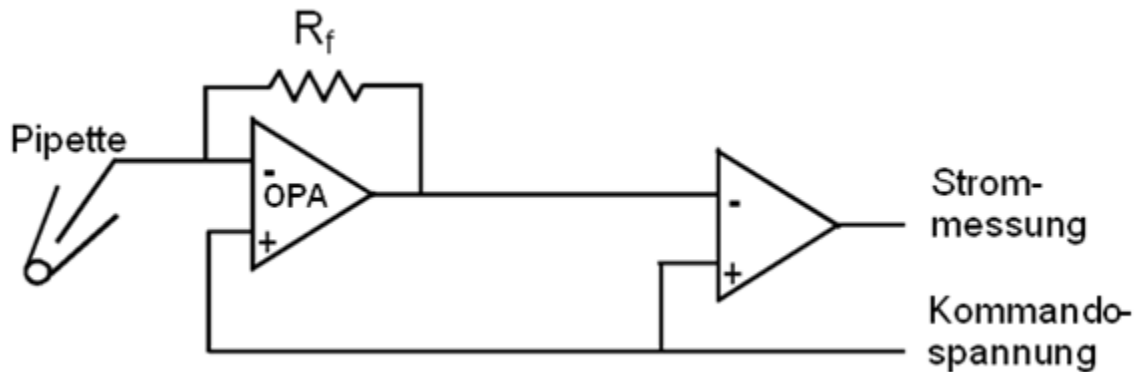


Abb. 8 Schema des Axoclamp 200B

Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers (modifiziert nach Numberger et Draguhn, 1996). OPA: Operationsverstärker, R_f : Rückkopplungswiderstand. Kommt es zu einer Abweichung zwischen Pipettenpotential und Kommandospannung, dann entsteht am Ausgang des OPA eine Spannung, die proportional zu dieser Differenz ist. Diese Spannung führt über den R_f zu einem Kompensationsstrom, der solange fließt bis das Potential der Pipette dem Kommandopotential entspricht.

2.6.2 Aufbau des Messstandes

Der Messstand war auf einem schwingungsgedämpften Tisch mit Luftdruckfederung aufgebaut, da selbst die geringsten Bewegungen zwischen Präparat und Pipette die hochempfindlichen Patch-Clamp-Messungen stören können. Zur Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses war die gesamte Messanordnung durch einen Faraday-Käfig umgeben, welcher zur mechanischen Entkopplung des Käfigs vom eigentlichen Messtisch auf eigenen Beinen stand. Die Annäherung an die Zellen erfolgte unter einem Axiovert S100TV Mikroskop (Carl-Zeiss, Jena), einem inversen Mikroskop. Da das Objektiv nach oben gerichtet ist, bleibt oberhalb des Präparates ausreichend Platz für die Messpipette und die anderen Aufbauten. Der Raum über dem Präparat wird nur durch die Beleuchtungseinrichtung mit dem Kondensator begrenzt, allerdings trägt die Nähe des Kondensators zur Messpipette zum Rauschen bei. Für Einzelkanalmessungen wurde ein hydraulischer Mikromanipulator (Narishige, Tokio, Japan) verwendet, um das elektrische Rauschen zu reduzieren. Für die restlichen Messungen kam

ein elektrischer, motorgetriebener Mikromanipulator (SM-5, Luigs&Neumann, Ratingen, Germany) zum Einsatz. Der Patch-Clamp-Verstärker Axopatch 200B (Axon Instruments, Union City, USA) besteht aus zwei Komponenten: dem Vorverstärker (*engl.* headstage), und einem nachgeschalteten Hauptverstärker (*engl.* amplifier). Im Vorverstärker ist der Strom-Spannungs-Wandler untergebracht (vgl. Abb. 8). Der Hauptverstärker dient der Signalfilterung und -verstärkung und ist die Bedienungsfläche für die Steuerung des Vorverstärkers. Der Hauptverstärker ist über einen AD/DA (Analog-Digital/Digital-Analog)-Wandler (Digidata 1320A, Axon Instruments, Union City, USA), welcher das analoge Signal des Verstärkers in digitale Zeichen umkodiert, mit einem Computer (Intel Pentium III) verbunden. Die Datenerfassung und Stimulation erfolgte über die Clampex (pClamp8.2, Axon Instruments, Union City, USA) Software (vgl. Abb. 9).

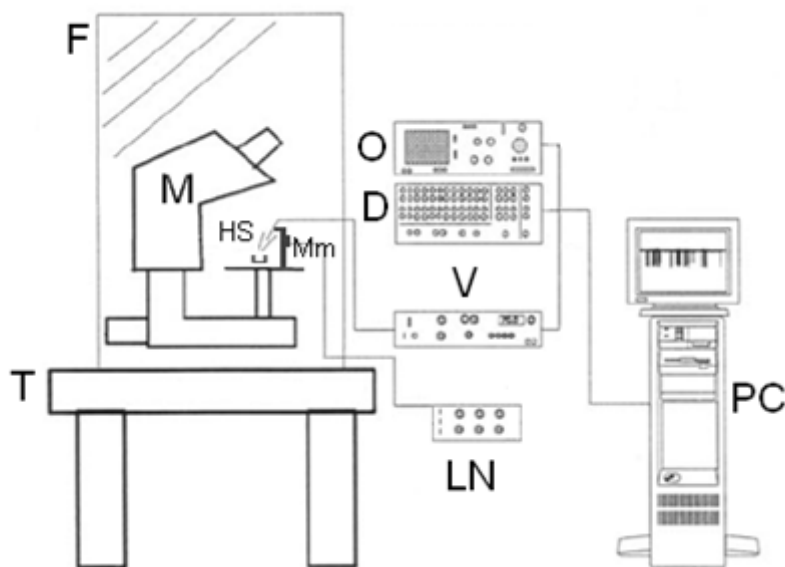


Abb. 9 Aufbau des Patch-Clamp Messplatzes (nach Schuhmann, 1995).

F: Faraday-Käfig, **T:** schwingungsgedämpfter Tisch, **M:** Mikroskop, **HS:** Headstage, **Mm:** Mikromanipulator, **O:** Oszilloskop, **D:** AD/DA-Wandler, **V:** Verstärker, **LN:** Steuergerät des Mikromanipulators, **PC:** Computer

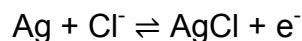
2.6.3 Korrektur von Offset, Leckströmen und kapazitiven Artefakten

Aus dem elektrischen Ersatzbild des Patch-Clamp Experiments (vgl. Abb. 10) werden Fehlerquellen sichtbar. Die Zellmembran einer kugelförmigen Zelle kann man elektrisch durch ihren Widerstand (R_m) und eine parallel angeordnete Kapazität (C_m) darstellen. Die Pipette ist im Whole-Cell-Modus mit dem Zellinneren leitend verbunden, wobei zwischen Silberdraht und Zellsoma ein Widerstand liegt. Dieser setzt sich aus dem Serienwiderstand R_s , und dem Pipettenwiderstand (R_{pip}) zusammen, welcher durch das Ansaugen von Membranbestandteilen oder Organellen im Mündungsbereich der Pipette deutlich erhöht wird.

Der sog. Spannungsfehler entsteht dadurch, dass beim Anlegen einer Kommandospannung am Serienwiderstand eine Spannung abfällt. Des Weiteren führt ein hoher Serienwiderstand zu einer Verlangsamung der Umpolung. Je geringer der Widerstand der Pipette, desto niedriger der Serienwiderstand. Eine Reduktion des Serienwiderstands wird v.a. durch eine Reduktion des Pipettenwiderstands erreicht. Dabei hängt der Widerstand nicht nur von der Spitzenöffnung sondern auch von der Form der Flanken ab. Der Flankenwiderstand ist umso größer, je länger die Pipettenspitze ist. Für Ganzzellaufleitungen wurden Pipetten mit einem Widerstand 1-2 M Ω verwendet, für Einzelkanalaufleitungen mit einem Widerstand 8-12 M Ω . Schließlich bietet der Axopatch 200B Verstärker einen Schaltkreis, mit dem man manuell den Spannungsfehler kompensieren kann, indem man zur Kommandospannung noch einen zusätzlichen Anteil addiert, der proportional zum gerade injizierten Strom ist und somit einen Teil des erwarteten Spannungsverlustes ausgleicht.

Leckströme sind Ströme, die zwischen Pipette und Membran in die Badlösung „fließen“. Ein Leckstrom erzeugt systematisch überhöhte Werte für den notwendigen Kompensationsstrom der Spannungsklemme und erhöht zudem das Rauschen. Die Erhöhung des Leckwiderstandes (Abb. 10) wird durch die Verbesserung der Seals mit möglichst hochohmigen Widerständen erreicht, insbesondere bei Einzelkanalaufleitungen erhält man brauchbare Messungen erst ab Seals über 100-1000 M Ω .

Unter Offsetpotentialen versteht man Spannungen, die nicht vom biologischen Präparat oder vom Kommandopotential herrühren, sondern an Übergängen innerhalb der Messkette-Pipettenlösung-Badlösung-Erdung entstehen und somit Abweichungen zwischen dem angezeigten und dem tatsächlichen Potential erzeugen. Wichtige Quellen für Offsetpotentiale sind Polarisierungen an den Silber/Silberchlorid-Elektroden und Übergangspotentiale zwischen Bad- und Pipettenlösung (sog. liquid junction potential). Letzterer wurde in den vorliegenden Experimenten nach Eintauchen der Messpipette in die Badlösung manuell am Hauptverstärker durch einen speziellen Schaltkreis eliminiert, sodass zwischen Pipette und Bad kein Strom floss. Um Offsetpotentiale zu vermeiden wurden die Silberdrähte, die als Elektroden den Vorverstärker mit der Pipettenlösung und den Erdungsleiter mit der Badlösung verbinden, regelmäßig chloriert. Dazu wurden die Silberdrähte über Nacht in konzentrierte Chlorbleiche (Danklorix, Colgate Palmolive GmbH, Hamburg, Germany) eingetaucht, so dass sich nach folgender Gleichung ein feiner, matt dunkelgrauer Silberchlorid Überzug auf dem Draht bildete:



Insbesondere für die Einzelkanalmessungen wurden nur frisch chlorierte Elektroden verwendet, die vor den Experimenten mit Ethanol gewaschen und mit Druckluft getrocknet worden sind.

Bei jeder Änderung der Kommandospannung kommt es zunächst zu einem Umladeprozess der Pipettenkapazität (C_{pip}) und der Zellkapazität (C_{m}) (vgl. Abb. 10). Dies führt bei rechteckförmigen Sprüngen der Kommandospannung zu kapazitiven Artefakten, die sich als rasch ansteigende und exponentiell abfallende Ströme zeigen und zur Verlangsamung der Umladung führen. Eine Beschichtung (*engl.* coating) der Pipette mit einer hydrophoben Substanz führt zu einer Vergrößerung der Wandstärke der Pipettenspitze und senkt somit die Pipettenkapazität und das kapazitive Rauschen. Des Weiteren wird durch die hydrophobe Beschichtung verhindert, dass sich ein Wasserfilm am Schaft der Pipette hochzieht, der ebenfalls das kapazitive Rauschen erhöhen würde. Gleichzeitig haben dickwandige Kapillare durch eine bessere elektrische Isolation ein geringeres Hintergrundrauschen. Die Beschichtung der Pipetten mit Sylgard (Dow Corning, Wiesbaden, Deutschland) wurde in der vorliegenden Arbeit nur für

die Einzelkanalmessungen durchgeführt. Schließlich bietet der Axonpatch 200B Verstärker verschiedene Schaltkreise zur Kompensation der kapazitiven Artefakte durch die Zell- und Pipettenkapazität. Nach Einbringen der Pipette erfolgte die Offsetkompensation und Kompensation der Pipettenkapazität durch die Verstärkerfunktionen der schnellen und langsamen Kompensation. Nach Herstellung der Ganzzellkonfiguration erfolgte eine 90%ige Serienwiderstands- und Zellkapazitätskompensation.

Da eine gänzliche Elimination der kapazitiven Artefakte und Leckströme nicht gelingt, wurde von Armstrong und Bezanilla (1974) das sog. -P/n-Pulsprogramm eingeführt („leak subtraction“): Dabei werden vor dem Haupt-Pulsprotokoll „P“ n mit dem Faktor $-1/n$ skalierte Kopien dieses Protokolls ausgeführt. Die Ströme, die während dieser Präpulse registriert werden, beruhen nur auf Kapazitäten und Leckströmen, da bei den hyperpolarisierenden Präpuls keine Kanäle aktiviert werden. Die Ströme während der Präpulse werden addiert und die Summe von dem während des Haupt-Pulsprotokolls registrierten Stromes abgezogen. Eine solche Leaksustraktion wurde bei allen Ganzzellableitungen in CHO Zellen verwendet.

Das elektrische Hintergrundsrauschen einer Zelle wird hauptsächlich durch die vielen Kanäle auf der gesamten Oberfläche der Zelle hervorgerufen. Bei der Einstellung eines Gigaseals wird der Membranfleck unter der Messpipette elektrisch von seiner Umgebung isoliert, sodass ein hochohmiger Seal v.a. bei Einzelkanalmessungen eine besondere Rolle spielt. Aber auch das Rauschen durch die elektronischen Komponenten des Verstärkers und muss berücksichtigt werden. Die wesentliche Quelle des Rauschens im niederfrequenten Bereich ist das sog. Netzbrummen, also Einstreuungen des elektromagnetischen Wechselfeldes, das vom öffentlichen Spannungsnetz erzeugt wird und sich durch die metallischen Komponenten und stromführenden Kabel in den Messaufbau überträgt (Frequenz 50 Hz). Der Faradaykäfig richtet sich v.a. gegen dieses niederfrequente Rauschen. Deshalb befanden sich während Einzelkanalmessungen nur der luftgelagerte Messtisch mit dem Mikroskop und dem Mikromanipulator im Faradaykäfig. Alle Teile waren elektrisch leitend miteinander verbunden und wurden über den Erdungseingang des Verstärkers

geerdet, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Erdungsschleifen entstehen. Hochfrequentes Rauschen entsteht durch zahlreiche, komplexe Vorgänge an den Messpipetten oder im Vorverstärker an sich und spielt v.a. bei Einzelkanalmessungen eine wichtige Rolle. Das Rauschen im Vorverstärker entsteht v.a. am Rückkopplungswiderstand R_f . Da das Rauschen eines Widerstandes invers mit der Größe des Widerstandes abnimmt, verwendet der Axopatch 200B Verstärker bei Messungen im „Cell-attached“ Modus einen „unendlich“ hohen R_f in Form eines Kondensators als Rückkopplungselement (Axon Instruments, 1999). Zur weiteren Rauschreduktion wurde für die Einzelkanalmessungen ein kurzer Pipettenhalter verwendet, der an jedem Versuchstag mit Methanol gründlich gewaschen und mit Druckluft getrocknet wurde. Die Pipetten wurden gekürzt und mit Sylgard beschichtet. Der Pipettenwiderstand lag zwischen 8 und 12 M Ω . Des Weiteren wurde die Eintauchtiefe durch Reduktion der Badlösung in den Kulturschalen auf das Nötigste verringert. Brauchbare Einzelkanalmessungen wurden v.a. bei Seals über 10 G Ω beobachtet. Um das hochfrequente Rauschen der Signale weiter abzusenken, wurde der im Hauptverstärker integrierte Tiefpassfilter (*engl.* low pass) verwendet.

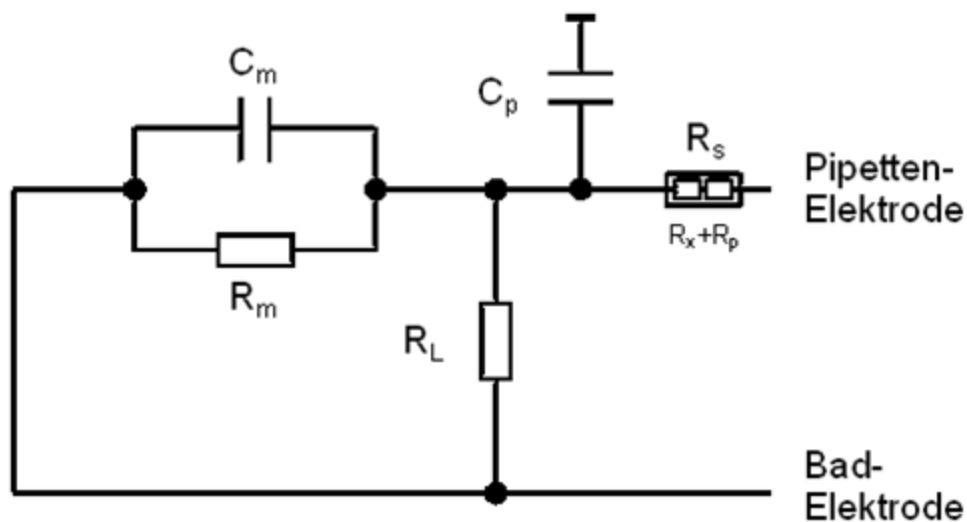


Abb. 10 Vereinfachtes elektrisches Ersatzbild des Patch-Clamp Experiments

R_s : Serienwiderstand aus Pipettenwiderstand (R_p) und Membranöffnung (R_x), C_p : Kapazität der Pipette, R_L : Leckwiderstand, C_m : Kapazität der Zelle (bestimmt durch die Größe der Zelle), R_m : Widerstand der Zellmembran (bestimmt durch die Anzahl der geöffneten Kanälen)

2.6.4 Durchführung der Patch-Clamp Experimente

Die zu untersuchenden Zellen wurden wie unter Kap. 2.3 beschrieben vorbereitet. Für unsere Patchpipetten verwendeten wir ausschließlich Borsilikat-
Glaskapillaren (1,05x1, 50x100 mm mit Filament) (Science Products, Hofheim, Germany). Zum Ziehen der Pipetten verwendeten wir ein Pipettenziehgerät oder Puller (DMZ-Universal Puller, Zeitz-Instrumente GmbH, München, Germany). Eine Pipette wurde in zwei Arbeitsgängen gezogen. Durch die Parameter Hitze, Zugkraft und -geschwindigkeit beim Pipettenziehgerät kann die Form und der Öffnungsdurchmesser variiert werden (Bedeutung siehe Kap. 2.6.3).

Die elektrophysiologischen Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Kulturschale mit den zu untersuchenden Zellen wurde in der dafür vorgesehenen Vertiefung in der Mitte des Objektisches platziert. Nach Einbringen der Pipette in die Badlösung erfolgte in der „Voltage-Clamp“ Konfiguration die Offsetkorrektur. Unter mikroskopischer Sichtkontrolle wurde mit Hilfe einer Spritze Unterdruck appliziert und die „Cell-attached“ Konfiguration erreicht. Jetzt wurden die kapazitiven Artefakte der Pipette, des Pipettenhalter und des Membranflecks kompensiert, die als sehr schnelle Transienten am Anfang und Ende der Testspannungspulse erschienen. Durch einen kurzfristigen Unterdruckpuls wurde die Ganzzellkonfiguration erreicht und es folgte eine 70-90%ige Serienwiderstands- und Zellkapazitätskompensation.

2.6.4.1 Einzelkanalmessungen („Cell-attached“) an CHO Zellen

Nach der Bildung eines Gigaseals befindet sich das Präparat in der Cell-attached-Konfiguration, in welcher die Einzelkanalmessungen in der vorliegenden Arbeit durchgeführt worden sind. Aus den unter Kap. 2.6.3 genannten Gründen wurden für diese Messungen ausschließlich gekürzte, mit Sylgard beschichtete Pipetten mit einem Widerstand zwischen 10 und 12 M Ω verwendet. Die Pipetten wurden nach dem Ziehen zur Verbesserung der Abdichtungseigenschaften erneut erhitzt. Bei dem sog. Hitzepolieren (*engl.* fire polishing) wird unter mikroskopischer Sichtkontrolle die Pipettenspitze sehr nah an ein Glühfilament herangeführt wird, so dass die Ränder der Pipettenspitze rundgeschmolzen werden.

Die Eintauchtiefe der Pipette wurde so gering wie möglich gehalten. Ferner wurden kürzere Pipettenhalter verwendet, die an jedem Versuchstag mit Methanol gründlich gewaschen und mit Druckluft getrocknet wurden. Der Kondensor des Mikroskops wurde separat geerdet und schließlich die Beleuchtungsanlage zu den Messungen von der Stromversorgung getrennt. Außerdem wurde ein hydraulischer Mikromanipulator verwendet. Die Signale wurden mit einer Sampling Rate von 5 kHz aufgenommen und mit 1 kHz tiefpass-gefiltert.

Die Membran unter der Pipette bleibt bei dieser Messanordnung intakt, so dass sich alle Proteine auf der intrazellulären Seite der Membran in ihrer natürlichen Umgebung befinden und alle Second-Messenger Systeme sowie die intrazellulären Ionenkonzentrationen unbeeinflusst bleiben. Nur unterhalb der Pipette wird das extrazelluläre Potential vom Verstärker kontrolliert. Das resultierende Membranpotential ist dort gleich dem Ruhepotential der Zelle abzüglich des Pipettenpotentials:

$$\Delta U = U_{\text{Mem}} - U_{\text{Kom}}$$

Dabei ist U_{Mem} das Membranpotential, das durch die verwendeten Lösungen (siehe Kap. 2.6.6) auf ca. 0 mV eingestellt wurde, und U_{Kom} die angelegte Kommandospannung.

2.6.4.2 Ganzzellmessungen („Whole-Cell“) an CHO Zellen

Nach der Bildung der „Cell-Attached“ Konfiguration wurde durch einen kurzfristen Unterdruckpuls die Ganzzellkonfiguration („Whole-Cell“ Modus) erreicht, in welcher die Charakterisierung der Kanaleigenschaften in CHO Zellen erfolgte. Nach Durchbrechen der Membran wurde den CHO Zellen bei einem Haltepotential von -80 mV ausreichend Zeit zum Austausch zwischen dem intrazellulären Milieu und der Pipettenlösung mit anschließender 70-90%ige Kompensation des Serienwiderstand und der Zellkapazität. Die am Hauptverstärker manuell eingestellten Werte für den Serienwiderstand und Zellkapazität wurden für jede Messung kontrolliert und notiert. Für die Ganzzelleableitungen wurden ausschließlich unbeschichtete Pipetten mit einem Widerstand von 1-2 M Ω verwendet. Die Signale wurden mit 1-2 kHz tiefpass-gefiltert und bei einer Sampling Rate von 4-5 kHz aufgenommen. Die verwendeten Pulsprotokolle wurden durch eine Lecksubtraktion ergänzt (siehe Kap. 2.6.3).

2.6.4.3 Ganzzellmessungen („Whole-cell“) an Neuronen

Zur Bestimmung des M-Stroms wurden Ganzzellaufnahmen in hippocampalen Neuronen von KCNQ Knock-out Mausembryos durchgeführt. Die Herstellung der Ganzzellkonfiguration erfolgte entsprechend der Experimente in CHO Zellen. Es wurden ausschließlich unbeschichtete Pipetten mit einem Widerstand zwischen 1 und 2 MΩ verwendet. Die Signale wurden bei einer Sampling Rate von 5 kHz aufgenommen und mit 1 kHz Tiefpass-gefiltert. Die verwendeten Pulsprotokolle waren ohne Leaksabstraktion.

Die Kompensation der Zellkapazität und des Serienwiderstandes gestaltet sich an verzweigten Zellen wie den hier gemessenen Neuronen als schwierig und unzureichend. Dieses Phänomen ist als das sog. „Space-Clamp-Problem“ bekannt. Zur Abschätzung der Zellkapazität wurde das sog. „Time Domain“ Verfahren (Sakmann et Neher, 1995) verwendet, welches als „Membranetest“-Option in der Clampfit Software (pClamp 8.2) verfügbar ist. In der Cell-attached Konfiguration wurden zunächst die transienten kapazitiven Ströme der Pipette und des Pipettenhalters gut kompensiert. Nach Durchbrechen der Membran wurde ein mittlerer Frequenzbereich für den Tiefpass-Filter gewählt und die „Membranetest“-Option aufgerufen. In diesem Protokoll wird die Stromantwort auf einen rechteckförmigen Spannungspuls gemessen. Man erhält einen fast senkrecht ansteigenden kapazitiven Ladestrom, welcher dann exponentiell abfällt bis nur noch der Haltestrom (I_{Offset}) übrig bleibt. Aus der Zeitkonstante τ des exponentiellen Rückganges können die Zellkapazität (C_m), Serienwiderstand (R_a) und Membranwiderstand (R_m) berechnet werden:

$$\tau = R_p C_m \quad (1)$$

$$R_p = \frac{R_a R_m}{(R_a + R_m)} \quad (2)$$

Die Parameter I_{Offset} , τ , C_m , R_a und R_m wurden für jede Messung notiert. Schließlich wurde der so ermittelte Wert der Zellkapazität für die manuelle Kompensation der Zellkapazität und des Serienwiderstandes am Hauptverstärker verwendet. Der manuell ermittelte Serienwiderstand wurde für alle Messungen notiert.

2.6.4.4 Stromklemmmessungen („Current-Clamp“) an Neuronen

Nach Durchlaufen des M-Strom Protokolls wurde mit der Verstärkeroption „I=0“, d.h. der Strom durch die Zellmembran wurde auf 0 A geklemmt und das dazugehörige Potential, das Ruhemembranpotential, gemessen und für jedes Neuron notiert. Anschließend wurde am Hauptverstärker in den „Current-Clamp“ Modus umgeschaltet. Vor jedem Pulsprotokoll wurde das Ruhepotential -je nach Protokoll- manuell am Hauptverstärker auf -70 mV oder -60 mV gebracht und das Pulsprotokoll gestartet.

Im Gegensatz zu den meisten Patch-Clamp Verstärkern besitzt der in dieser Arbeit verwendete Axopatch 200B Verstärker Schaltungen zur Serienwiderstandkompensation im Current-Clamp Modus. Allerdings ist dadurch die Umschaltgeschwindigkeit des Verstärkers verlangsamt, wodurch bei bestimmten Kombinationen an Pipettenwiderständen und Zellkapazitäten der Verstärker der schnellen Anstiegszeit eines Aktionspotentials nicht folgen kann und die Aktionspotentiale verzerrt werden.

2.6.5 Protokolle und Datenauswertung

2.6.5.1 Ganzzellableitungen an CHO Zellen

Leitfähigkeits-Spannungs-Kurven

Die CHO Zellen wurden auf ein Potential von -80 mV geklemmt und anschließend in 10 mV Schritten für 2 Sekunden bis zu einem maximalen Potential von +60 mV depolarisiert. Es schloss sich jeweils ein 500 ms langer hyperpolarisierender Puls auf -120 mV an, um die sog. Tail-Ströme zu messen, deren Amplitude lediglich von der Anzahl der geöffneten Kanäle abhängt, um damit Leitfähigkeits-Spannungs-Kurven erzeugen zu können. Die Kurven wurden jeweils zur minimalen Amplitude der Tail-Ströme normalisiert, und es wurde die nachfolgend aufgeführte doppelte Boltzmann Funktion an die Daten angepasst:

$$I/I_{\min}(V) = A_1 / \{1 + \exp[(V_1 - V)/k_1]\} + A_2 / \{1 + \exp[(V_2 - V)/k_2]\},$$

wobei $I/I_{\min}$ der normalisierten Tail-Stromamplitude, V_1 und V_2 den Potentialen bei halbmaximaler Aktivierung, k_1 und k_2 Steigungsfaktoren sowie A_1 und A_2 den maximalen Amplituden der zwei Boltzmann Funktionen entsprechen.

Stromdichte

Zum Vergleich der Stromdichte zwischen den unterschiedlichen Expressionen (*engl.* current density) wurde die durchschnittliche Stromamplitude in den letzten 100 ms am Ende des 2-sekündigem Depolarisationspulses auf +20 mV gemessen und durch die Zellkapazität, die am Hauptverstärker abgelesen wurde, dividiert.

Bestimmung der Zeitkonstanten der Aktivierung und Deaktivierung

Zur Bestimmung der Zeitkonstanten für die Aktivierung wurden Exponentialfunktionen zweiter Ordnung an den ansteigenden Teil der Ströme bei verschiedenen Potentialen angepasst. Um die Zeitkonstanten der Deaktivierung zu bestimmen, zeichneten wir nach einem 2 s Depolarisationspuls auf +50 mV Tail-Ströme für Potentiale zwischen -30 und -140 mV auf. An den abfallenden Anteil der Ströme wurden Exponentialfunktionen erster Ordnung angepasst.

Die Gleichung der verwendeten Exponentialfunktion erster Ordnung lautet:

$$A(t) = A_0 + A_1 \cdot \exp(-t/\tau),$$

und die Gleichung der verwendeten Exponentialfunktion zweiter Ordnung lautet:

$$A(t) = A_0 + A_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + A_2 \cdot \exp(-t/\tau_2),$$

wobei A der Stromamplitude zum Zeitpunkt t , A_0 der persistierenden Stromamplitude im Gleichgewicht, A_1 sowie A_2 den Amplituden der Transienten, t der Zeit und τ , τ_1 , τ_2 den Zeitkonstanten der Exponentialfunktionen entsprechen.

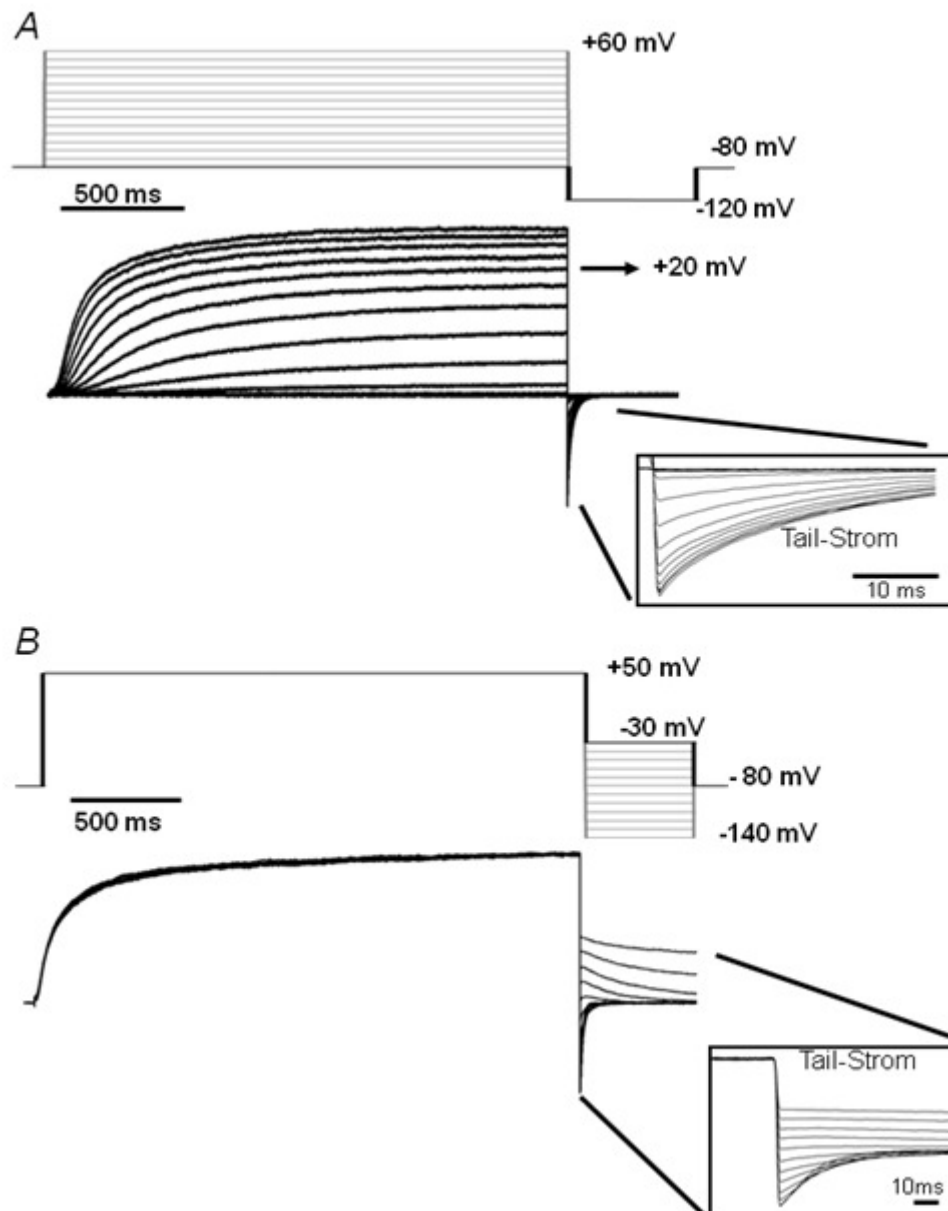


Abb. 11 Protokolle und Datenauswertung der Ganzzellableitungen in CHO Zellen

A zeigt das Aktivierungsprotokoll. Ruhepotential bei -80 mV geklemmt mit 2-sekündigen Depolarisierungspulse in 10 mV Schritten bis zu einem maximalen Potential von +60 mV, anschließend ein 500 ms langer hyperpolarisierender Puls auf -120 mV, um die sog. Tail-Ströme zu messen. **B** zeigt das Deaktivierungsprotokoll. Ruhepotential bei -80 mV geklemmt mit einem konstanten, 2,5 s langen Depolarisationspuls auf +50 mV mit anschließendem 500 ms langen Hyperpolarisierungspulsen in 10 V Schritten von -30 mV bis -140 mV, um Tail-Ströme zu messen.

2.6.5.2 Einzelkanalmessungen in CHO Zellen

Da der Strom, der in einem bestimmten Zeitraum durch einen Ionenkanal fließt, durch die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals und der Einzelkanalstromamplitude bestimmt wird (vgl. Kap. 1.3), lag der Fokus unserer Einzelkanalexperimente auf der Bestimmung dieser Parameter. Dazu wurden

nach manueller Eingabe der gewünschten Kommandospannung in der Clampex Software (pClamp 8.0, Axon Instruments, Union City, USA) sog. „gap-free“ Protokolle verwendet, bei denen alle Ereignisse ohne Unterbrechung und Veränderung aufgenommen werden. Die Zellen wurden vom Ruhepotential bei -80 mV mit 15 s andauernden Protokollen in 20 mV Schritten auf +60 mV depolarisiert.

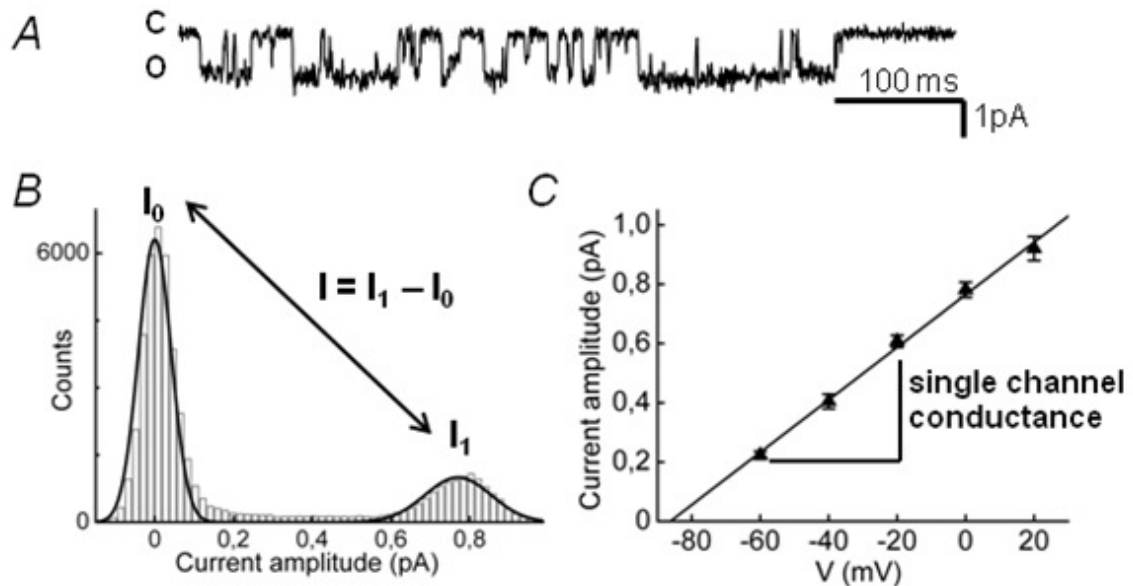


Abb. 12 Auswertung der Einzelkanalmessungen in CHO Zellen

Repräsentative „gap-free“ Aufnahmen in der Cell-attached Konfiguration (**A**) und entsprechendes „Alle-Punkte-Histogramm“ (*engl.* all-point histogram) (**B**). Die Differenz zwischen der Grundlinien (I_0)- und der Öffnungsamplitude (I_1) des Kanals ergibt die Einzellkanalamplitude (I). Die Flächen unterhalb der Gauß-Kurven liefern die Offenwahrscheinlichkeit (P_O , „open propability“) des Kanal. Das Auftragen der Amplituden in Abhängigkeit von der angelegten Spannung ergibt die Strom-Spannungs-Kurve (**C**). Die Steigung dieser Kurve liefert die Leitfähigkeit des Kanals („slope conductance“).

Die aufgezeichneten Daten wurden mit Hilfe von Fetchan 6.0 (Axon Instruments, Union City, USA) und pSTAT (Axon Instruments, Union City, USA) analysiert. Bei jeder gemessenen Spannung wurde ohne weiteres Bearbeiten des Datenmaterials ein sog. „Alle-Punkte-Histogramm“ („all-point histogram“) erstellt, wobei alle Messpunkte gesammelt, in Größenklassen eingeteilt und die Häufigkeit der Ereignisse in jedem Intervall bestimmt werden. Durch statistische Schwankungen und Rauschen ergeben sich Normalverteilungen im Bereich der Grundlinie und um die Öffnungsamplitude. Im Falle mehrerer Kanäle in einem Patch erhält man durch Überlagerung der Öffnungen mehrere Öffnungsamplituden, die sich um ein ganzes Vielfaches voneinander unterscheiden. Die mittlere Amplitude zu jedem Zustand erhält man durch die Anpassung einer Gauß-Funktion. Die Differenzen dieser Werte zur Grundlinie ergeben die mittlere Öffnungsamplitude des Kanals (Abb. 12). Durch Auftragen

der Einzelkanalamplituden bei verschiedenen Haltepotentialen in Abhängigkeit vom Potential erhält man die Strom-Spannungs-Kurve (*engl.* I-V curve) des Kanals, an die eine lineare Funktion angepasst wurde. Die Steigung der Kurve entspricht der Leitfähigkeit (*engl.* slope conductance) des Kanals (Abb. 12). Auf die Anwesenheit lediglich eines Kanals wurde aus dem Fehlen von Überlagerungen bei positiven Spannungen geschlossen. Bei Überlagerungen wurde durch die Anzahl der unterschiedlichen Zustände auf die Mindestanzahl an aktiven Kanälen geschlossen. Die Flächen unterhalb der Gauß-Kurven sind proportional zur Zeit, welche der Kanal in diesem Zustand verbrachte, und lassen somit auf die Offenwahrscheinlichkeit (P_O , *engl.* open probability) des Kanal schließen. Mit Hilfe der pSTAT Software konnte der jeweilige Anteil der Fläche im Bereich der Öffnungsamplitude zur Summe der Flächen im Bereich der Grundlinie und Öffnungsamplitude ermittelt werden, welcher der Offenwahrscheinlichkeit entspricht. Im Falle mehrerer aktiver Kanäle konnte die Offenwahrscheinlichkeit mit Hilfe der folgenden Formel berechnet werden:

$$NP_O = \left(\sum_{j=1}^N t_{j,j} \right) / T$$

Dabei entspricht t_j der auf dem Niveau $j = 0, 1, 2 \dots N$ verbrachten Zeit; T ist die gesamte Dauer der Aufnahme und N ist die Mindestanzahl an aktiven Kanälen. t_j/T wurde mit Hilfe des Verhältnisses der jeweiligen Flächen unterhalb der Gauß-Kurve zur Gesamtfläche der Gauß-Kurven über dem Geschlossen- und Offenzuständen der Kanäle bestimmt.

2.6.5.3 Ganzzellaufzeichnungen in Neurone

M-Strom

Die Neurone wurden in der „Whole-Cell“ Konfiguration nach dem „klassischem“ M-Stromprotokoll (Adams und Brown, 1980) vom Haltepotential bei -70 mV mit einem 1s dauernden Puls auf -20 mV depolarisiert. Es folgt ein 600 ms langer Puls auf -40 mV. Nach Schweitzer et al. (1993) repräsentiert die Differenz zwischen dem Strom am Anfang und am Ende dieses Pulses die Amplitude des M-Stroms (Abb. 13). Gleichzeitig beobachtet man bei der Depolarisation einen schnellen Einwärtsstrom, der als Natriumstrom gewertet wird (vgl. Kap. 1.2)

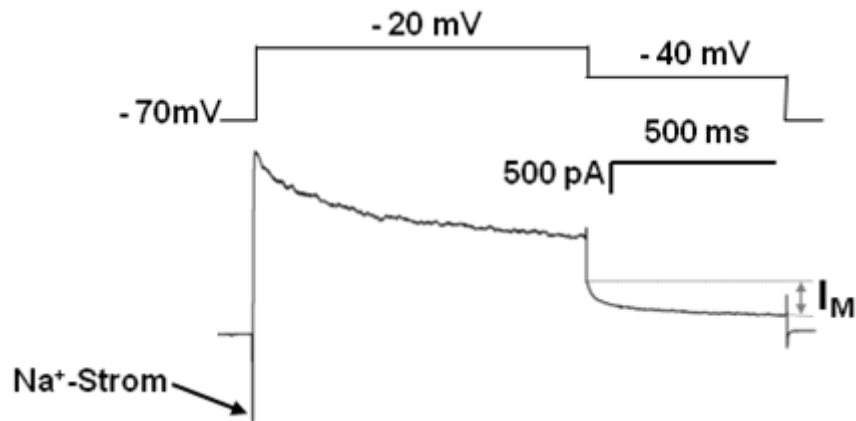


Abb. 13 Auswertung der M-Stromamplitude

Das Haltepotential bei -70 mV wurde manuell eingestellt und die Neurone mit einem 1 s dauernden Puls auf -20 mV depolarisiert. Es folgt ein 600 ms langer Puls auf -40 mV. Die Differenz zwischen dem Strom am Anfang und am Ende dieses Pulses repräsentiert die Amplitude des M-Stroms (I_M).

Analyse der Aktionspotentiale

Nach Umschalten auf den Current-Clamp Modus wurden die Neurone manuell auf einem Ruhepotential von -60 mV eingestellt. Anschließend wurden durch 2 ms lange, depolarisierende Strompulse einzelne Aktionspotentiale ausgelöst. Die Aktionspotentiale wurden daraufhin in Hinblick auf die maximale Aktionspotentialhöhe, der Dauer der Depolarisation und Hyperpolarisation zwischen 10 und 90% der maximalen Aktionspotentialhöhe und der Aktionspotentialbreite bei halbmaximaler Depolarisation mit Hilfe der Clampfit Software ausgewertet.

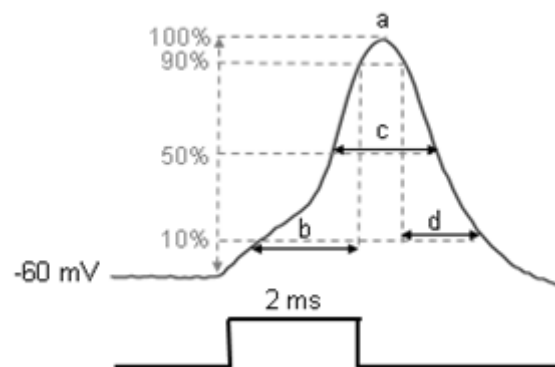


Abb. 14 Analyse der Aktionspotentiale

Haltepotential wurde manuell auf -60 mV eingestellt und einzelne Aktionspotentiale durch 2 ms andauernde depolarisierende Strompulse ausgelöst. **a** Maximale Aktionspotentialhöhe (*engl.* spike peak), **b** Dauer der Depolarisation (spike rise time), **c** Aktionspotentialbreite bei 50% der maximalen Aktionspotentialhöhe, **d** Dauer der Depolarisation zwischen 10 und 90% der maximalen Aktionspotentialhöhe.

Bestimmung der Aktionspotentialfrequenz und des Eingangswiderstandes

Nach Umschalten auf den Current-Clamp Modus wurden die Neurone manuell auf einem Ruhepotential von -80 mV eingestellt. Anschließend wurden 500 ms lange Strompulse in 0,025 nA Schritten zwischen -0,1 und +0,3 nA injiziert, um Aktionspotentialfolgen auszulösen. Die Anzahl der ausgelösten Aktionspotentiale wurde manuell ausgezählt. Die Spannungen der letzten 100 ms der hyperpolarisierende Strompulse zwischen -0,1 und -0,025 nA wurden zur Bestimmung des Eingangswiderstandes verwendet ($R_{\text{input}} = \Delta V / \Delta I$).

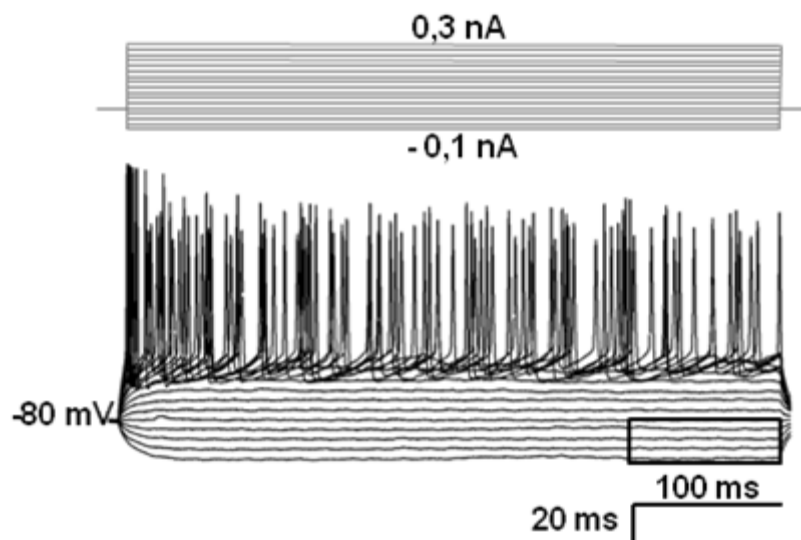


Abb. 15 Bestimmung der Aktionspotentialfrequenz

Von einem Haltepotential von -80 mV ausgehend wurden die Neurone in 0,025 nA Schritten von -0,1 bis +0,3 nA Strompulse injiziert und die ausgelösten Aktionspotentiale gemessen. Die Spannungen der letzten 100 ms der hyperpolarisierenden Strompulse zwischen -0,1 und -0,025 nA wurden zur Bestimmung des Eingangswiderstandes verwendet.

Bestimmung der mAHP

Nach Umschalten auf den Current-Clamp Modus wurden die Neurone manuell auf einem Ruhepotential von -60 mV eingestellt. Anschließend wurden durch 2 ms lange, depolarisierende Strompulse einzelne Aktionspotentiale ausgelöst. Den so ausgelösten Aktionspotentialen folgte meistens eine fAHP und eine zwischen 20 und 50 ms andauernde mAHP, gefolgt von einer unterschiedlich langer sAHP. Allerdings war die fAHP nicht immer eindeutig von der mAHP zu unterscheiden. Die Höhe der mAHP wurde durch Mittelung eines 5-10 ms Intervalls nach Ablauf der 5 ms andauernden fAHP (Abb. 16A). Eine weitere Möglichkeit der mAHP Bestimmung ist das Auswerten von AP-Salven. Am Ende solcher AP-Salven folgt eine kumulative mAHP, die von der Anzahl der ausgelösten APs abhängt. Eine fAHP fehlt nach solchem Meßprotokoll (Lancaster

et Nicoll, 1987; Storm, 1989) (Abb. 17). Erfolgte die Auslösung eines Aktionspotentials bei einem Ruhepotential von -80 mV beobachtete man eine ADP (Abb. 16B). Die Größe der ADP wurde mit Hilfe der Clampfit Software als Fläche unterhalb der Spannungskurve bestimmt.

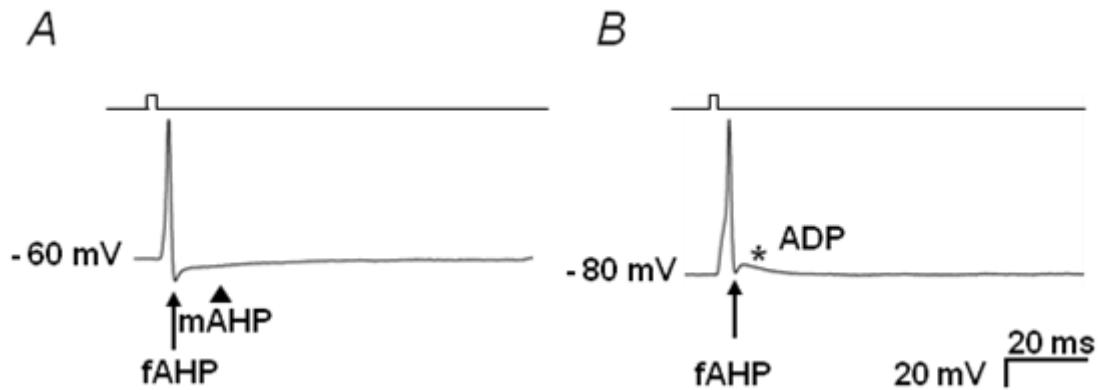


Abb. 16 Bestimmung der mAHP (▲) bzw. ADP (*) nach einzelnen Aktionspotentialen

Bestimmung der Aktionspotentialadaptation

Nach Umschalten auf den Current-Clamp Modus wurden die Neurone manuell auf einem Ruhepotential von -60 mV eingestellt. Die Aktionspotentialadaptation zeigt sich in einer Zunahme des Intervalls zwischen den Aktionspotentialen (*engl.* interspike interval, ISI). Zur Bestimmung der ISI wurden 200 ms andauernde Strompulse so gewählt, dass genau 8 Aktionspotentiale ausgelöst wurden. Anschließend wurden die Intervale zwischen den AP-Maximals mit Hilfe der Clampfit Software bestimmt (Abb. 17).

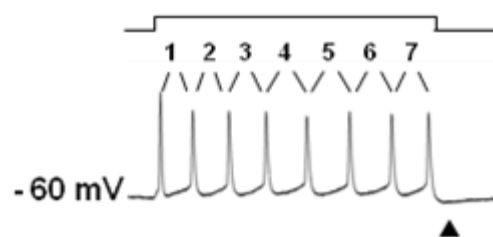


Abb. 17 Bestimmung der Aktionspotentialadaptation

Von einem Ruhepotential von -60 mV ausgehend wurden 200 ms lange, depolarisierende Strompulse so gewählt, dass genau 8 Aktionspotentiale ausgelöst wurden. Am Ende solcher AP-Salven beobachtet man eine mAHP (▲).

Bestimmung der transienten Kaliumströme

Zur Bestimmung der transienten Kaliumströme (vgl. Kap. 1.2) wurden die Neurone auf ein Ruhepotential bei -70 mV geklemmt und mit 2-sekündigen Depolarisierungspulse in 10 mV Schritten bis zu einem maximalen Potential von +90 mV depolarisiert, anschließend folgte ein 500 ms langer hyperpolarisierender Puls auf -120 mV. An die Stromspur nach der Depolarisation auf +30 mV wurde eine Exponentialfunktion dritter Ordnung angepasst. Dabei entsprechen die unterschiedlichen Komponenten den Strömen I_A , I_D und I_K (Nerbonne et al., 2008). Als einfaches Maß für die Größe der transienten Kaliumströme wurde die Differenz zwischen der Stromamplitude zu Beginn und gegen Ende der Depolarisation bestimmt (I_{tK}).

Die Gleichung verwendeter Exponentialfunktion dritter Ordnung lautet:

$$A(t) = A_0 + A_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + A_2 \cdot \exp(-t/\tau_2) + A_3 \cdot \exp(-t/\tau_3),$$

wobei A der Stromamplitude zum Zeitpunkt t , A_0 der persistierenden Stromamplitude im Gleichgewicht, A_1 , A_2 sowie A_3 den Amplituden der Transienten, t der Zeit und τ , τ_1 , τ_2 , τ_3 den Zeitkonstanten der Exponentialfunktionen entsprechen.

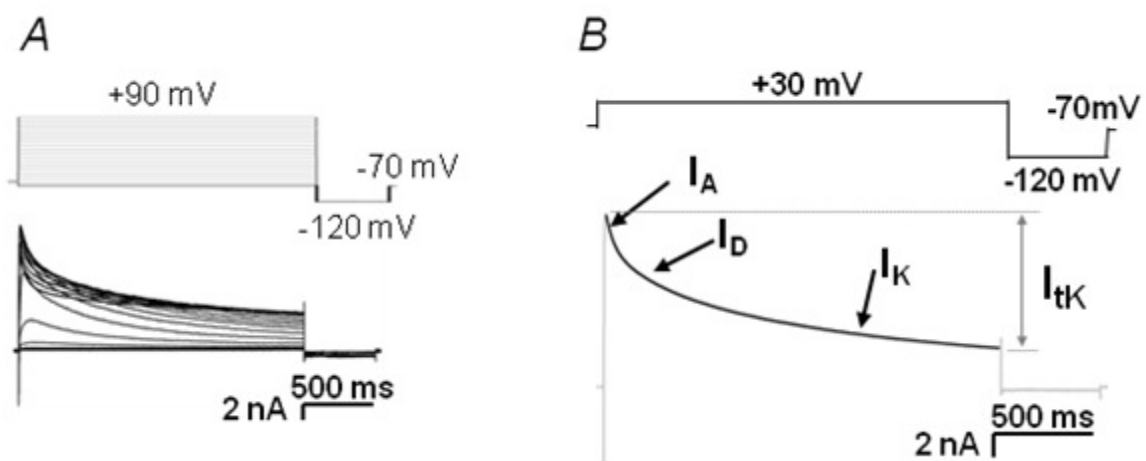


Abb. 18 Bestimmung der transienten Kaliumströme

A zeigt das Aktivierungsprotokoll. Ruhepotential bei -70 mV geklemmt mit 2-sekündigen Depolarisierungspulse in 10 mV Schritten bis zu einem maximalen Potential von +90 mV, anschließend ein 500 ms langer hyperpolarisierender Puls auf -120 mV. **B** zeigt vergrößert den Durchlauf mit der Depolarisation auf +30 mV. An die Stromkurve angepasst ist eine Exponentialfunktion 3. Ordnung. I_A : A-Current, I_D : D-Current, I_K : delayed rectifier current, I_{tK} : Summe der transienten Kaliumströme.

2.6.6 Pipetten- und Badlösungen

CHO Zellen

Whole-Cell Konfiguration (Peretz et al., 2001)

Badlösung: 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂,
11 mM Glukose, 5,5 mM HEPES (pH 7,4 mit NaOH angepasst)

Pipettenlösung: 130 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM K₂ATP, 5 mM EGTA,
10 mM HEPES (pH 7,4 mit KOH angepasst)

Die Pipettenlösung wurde aufgrund des Zerfalls von K₂ATP bei Kühlschranktemperatur an jedem Messtag neu angesetzt.

Cell-Attached Konfiguration (Li et al., 2005)

Badlösung: 175 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM HEPES,
(pH 7,4 mit KOH angepasst)

Pipettenlösung: 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES,
(pH 7,4 mit NaOH angepasst)

Dabei wird angenommen, dass sich das Ruhepotential der Zellen auf ca. 0 mV einstellt (Li et al., 2005).

Neuronen (Shahidullah et al., 2005)

Badlösung: 120 mM NaCl, 3 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂,
11mM Glukose, 5mM HEPES, 23 mM NaHCO₃ (pH 7,4)

Pipettenlösung: 160 mM K-Acetat, 3 mM MgCl₂, 20 HEPES (pH 7,4)

2.7 Statistik

Zur Signifikanztestung wurde der Student T-Test angewandt. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Nicht signifikant Werte wurden durch „n.s.“ markiert. Alle Ergebnisse wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean = S.E.M.) angegeben. S.E.M. wurde wie folgt berechnet:

$$SEM = \sqrt{((\sum x_i^2) - n(\bar{x}^2)) / (n-1)} / (\sqrt{n}), \text{ wobei}$$

SEM = **S**tandard **E**rror of the **M**ean

x_i = Einzelwerte

n = Anzahl der Einzelwerte

$\bar{x}$ = Mittelwert

3 ERGEBNISSE

3.1 Funktionelle Charakterisierung von N258S

3.1.1 Vorversuche in *Xenopus* Oozyten

Mittlerweile sind BFNS Mutationen in fast allen Bereichen des $K_V7.2$ Kanalproteins entdeckt worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der ersten *missense* Mutation zwischen dem S5 Segment und der Porenregion. Die initiale Untersuchung der Mutation erfolgte von Maljevic (2004) in *Xenopus* Oozyten, eines der Standardexpressionssysteme (Miledi et al., 1983) für die elektrophysiologische Untersuchung von Ionenkanälen. Ihr Vorteil besteht in der Einfachheit der Handhabung sowie in dem nur geringen Gehalt endogener Kanäle, jedoch sind die biologischen Gegebenheiten weit von der natürlichen Expressionsumgebung entfernt. Bei diesen Experimenten zeigten homomere N258S Kanäle im Vergleich zu homomeren Wildtypkanälen kaum messbare makroskopische Ströme. Im Western Blot war kein Unterschied in der Proteinbiosynthese zu sehen. Die Koexpression mit $K_V7.3$ führte jedoch zu einer 5- bis 10-fachen Erhöhung der $K_V7.3$ Stromamplitude, was als Hinweis für die Bildung eines funktionellen, heteromeren Kanal gedeutet werden kann. Im Vergleich zur Koexpression $K_V7.2+K_V7.3$ waren diese Ströme um 80% reduziert (Abb. 19). Des Weiteren zeigte die Mutation in der Koexpression mit $K_V7.2$ einen dominant-negativen Effekt auf die Wildtypströme.

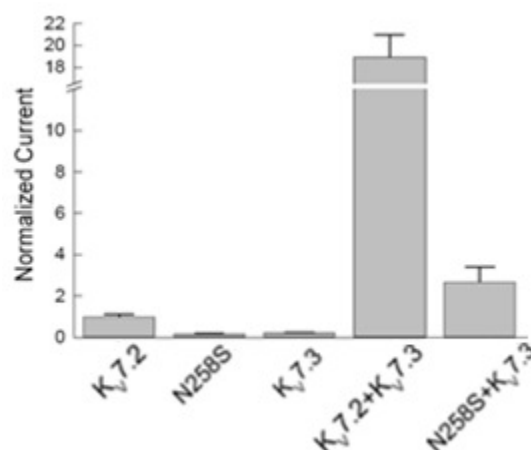


Abb. 19 N258S Expression in *Xenopus* Oozyten

Die initiale Untersuchung der N258S Mutation in *Xenopus* Oozyten. Die Stromamplituden wurden bei +40 mV gemessen und auf die durchschnittliche Stromamplitude von WT $K_V7.2$ normiert. Während $K_V7.3$ und N258S nur sehr kleine Ströme produzieren, kommt es nach der Koexpression von $K_V7.2$ und N258S mit $K_V7.3$ ($K_V7.2+K_V7.3$, N258S+ $K_V7.3$) zu einer Vervielfachung der Stromamplituden. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt.

3.1.2 Funktionelle Expression der N258S Mutation in CHO Zellen

Um die Ergebnisse aus *Xenopus* Oozyten in Säugerzellen zu verifizieren und für weiterführende Experimente wurden WT $K_v7.2$ und N258S Untereinheiten in CHO Zellen exprimiert. Zur elektrophysiologischen Charakterisierung wurden die resultierenden Kaliumströme mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik in der „Whole-Cell“ Konfiguration gemessen. Die transfizierten CHO Zellen wurden bei einem Ruhemembranpotential von -80 mV gehalten und in 10 mV Schritten auf +60 mV depolarisiert. Im Anschluss an diese 2s langen Depolarisationspulse folgte ein konstanter 500 ms andauernder, hyperpolarisierender Puls auf -120 mV, um sog. Tail-Ströme aufzuzeichnen konnte. Makroskopisch zeigte sich für homomere $K_v7.2$ und N258S Kanäle ein K_v7 typischer (Yang et al., 1998), langsam aktivierender, nicht inaktivierender, auswärts gerichteter Kaliumstrom (Abb. 20A). Im Gegensatz zum WT waren N258S Ströme bei gleichen Transfektionsbedingungen nur unregelmäßig exprimiert und aufgrund der geringen Amplitude kaum messbar. Es ist bekannt, dass die Koexpression der $K_v7.2$ und $K_v7.3$ Untereinheiten zu einer Vervielfachung der Stromamplitude im Vergleich zu homomeren $K_v7.2$ Kanälen führt (Yang et al., 1998). In unserem Versuchsaufbau führte die Koexpression $K_v7.2+K_v7.3$ zu einem 3-fachen Stromamplitudenanstieg (Abb. 20C,E und Tabelle 1), vergleichbar mit den Ergebnissen von Selyanko et al. (2000). Erstaunlicherweise konnte die Koexpression N258S+ $K_v7.3$ einen makroskopischen Kaliumstrom wiederherstellen (Abb. 20D) und zeigte im Vergleich zur homomeren N258S Expression einen 17-fachen Anstieg der Stromamplitude. Diese Ströme waren im Vergleich zu den WT Heterotetrameren, jedoch um ca. 50% reduziert (Abb. 20E und Tabelle 1).

Leitfähigkeits-Spannungskurven wurden durch Auftragen der normalisierten Tail-Stromamplituden gegen das Membranpotential erstellt und eine doppelte Boltzmannfunktion an die Datenpunkte angepasst (siehe Kap. 2.6.5.1). Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Spannungsabhängigkeit zwischen homomeren N258S und homomeren $K_v7.2$ Kanälen (Abb. 20E und Tabelle 1). Die Koexpressionen mit $K_v7.3$ führten in beiden Fällen zu einer leichten Linksverschiebung der Leitfähigkeits-Spannungskurve (vgl. Selyanko et al., 2000). Es waren jedoch keine Unterschiede zwischen den Koexpressionen $K_v7.2+K_v7.3$ und N258S+ $K_v7.3$ feststellbar.

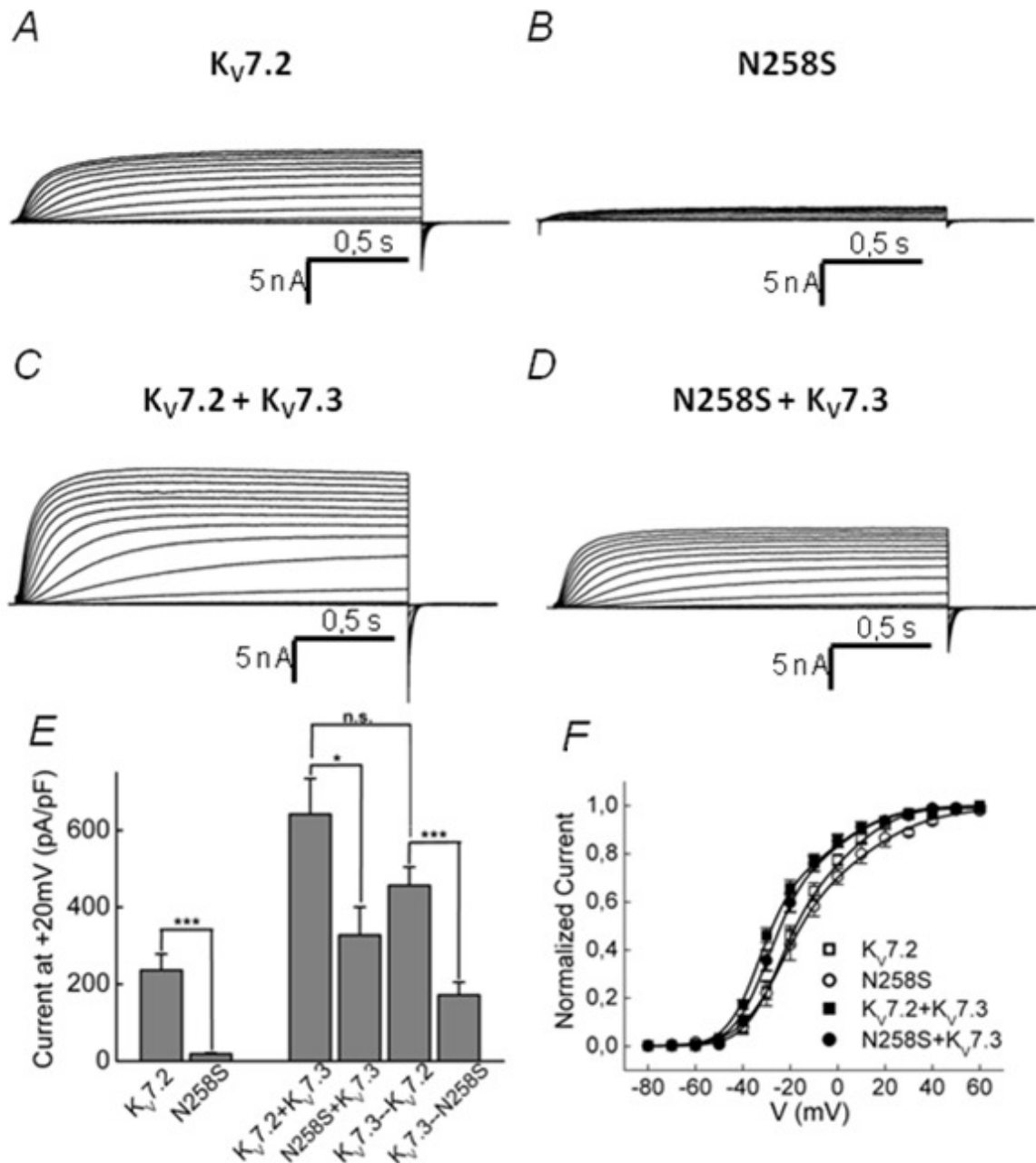


Abb. 20 Funktionelle Expression von N258S in CHO Zellen

Typische Stromkurven für WT $K_v7.2$ (**A**), N258S (**B**) und für die Koexpressionen $K_v7.2+K_v7.3$ (**C**) und $N258S+K_v7.3$ (**D**). **E** Die Stromamplituden wurden bei +20 mV gemessen und auf die Zellkapazität normiert. Hierbei fällt eine Vervielfachung der Stromamplituden von $K_v7.2$ und N258S nach Koexpression mit $K_v7.3$ oder der Expression in entsprechenden Fusionsproteinen $K_v7.3-K_v7.2$ und $K_v7.3-N258S$ auf (vgl. Tabelle 1). **F** Die Leitfähigkeits-Spannungskurven zeigen eine leichte Linksverschiebung der Koexpression mit $K_v7.3$. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, n.s. nicht signifikant. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt.

Von Mutationen in der S4 Domäne ist bekannt, dass die Reduktion des Kaliumstroms durch die starke Verlangsamung der Aktivierung bedingt ist. Zur Bestimmung der Zeitkonstanten der Aktivierung ($\tau_{act\ fast}$, $\tau_{act\ slow}$) wurde eine Exponentialfunktion zweiter Ordnung an den Zeitverlauf der Aktivierung angepasst (siehe Kap. 2.6.5.1). Hierbei zeigte sich eine Verlangsamung der N258S+K_V7.3 Koexpression im Vergleich zu K_V7.2 und K_V7.2+K_V7.3 (Abb. 21A und Tabelle 1). Die Zeitkonstante der Deaktivierung (τ_{deact}) wurde durch die Anpassung einer Exponentialfunktion erster Ordnung an die Tail-Ströme bestimmt, die nach einer 2s dauernden Depolarisation bei unterschiedlichen Potentialen aufgezeichnet wurden (siehe Kap. 2.6.5.1). Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Koexpressionen und homomeren K_V7.2 Kanälen (Abb. 21B und Tabelle 1). Leider konnten für homomere N258S Kanäle aufgrund der geringen Stromamplitude die Parameter der Aktivierung und Deaktivierung nicht verlässlich bestimmt werden.

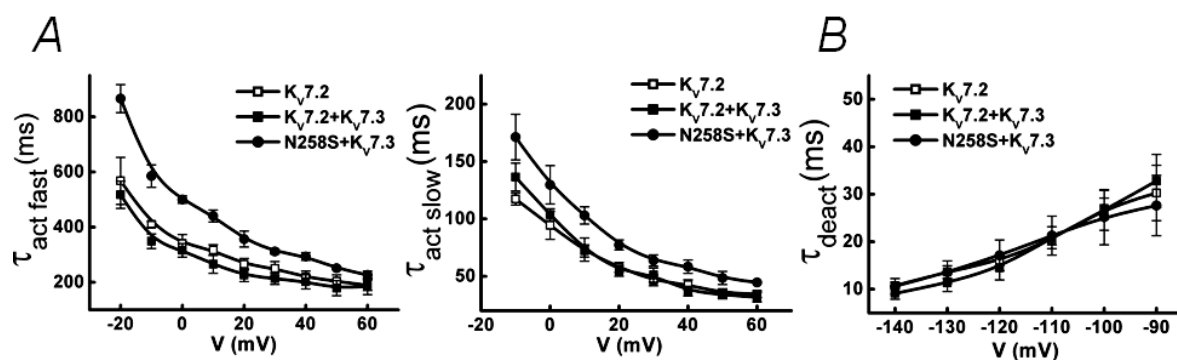


Abb. 21 Parameter der Aktivierung und Deaktivierung

A Die Zeitkonstanten der Aktivierung ($\tau_{act\ fast}$, $\tau_{act\ slow}$) wurden gemäß Kap. 2.6.5.1 ermittelt. Die schnellere Zeitkonstante ($\tau_{act\ fast}$) hatte stets eine relative Amplitude zwischen 40% und 60%. Es zeigte sich eine signifikante Verlangsamung der N258S+K_V7.3 Koexpression im Vergleich zu K_V7.2 und K_V7.2+K_V7.3 (vg. Tabelle 1). **B** Die Zeitkonstante der Deaktivierung (τ_{deact}) wurde durch die Anpassung einer Exponentialfunktion erster Ordnung an die Tail-Ströme nach einer 2s dauernden Depolarisation auf +50 mV bestimmt. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Koexpressionen und K_V7.2 (siehe Tabelle 1). Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt.

Des Weiteren zeigte die N258S Mutante einen dominant-negativen Effekt auf K_V7.2 Kanäle. Für die Untersuchung des dominant-negativen Effektes wurde die übliche K_V7.2 cDNA Menge im Verhältnis 1:1 mit N258S cDNA kotransfiziert. Bei einer Dysfunktion der N258S Untereinheiten ohne Interaktion mit dem WT würde man bei diesem Versuchsprotokoll keine wesentliche Veränderung der Stromamplitude erwarten. Allerdings führte die Koexpression K_V7.2+N258S zu

einer Reduktion des $K_V7.2$ vermittelten Stroms auf ca. 42%, was als dominant-negativer Effekt zu werten ist und mit den Ergebnissen aus *Xenopus* Oozyten übereinstimmt (Abb. 22 und Tabelle 1). Von dominant-negativen Mutationen spricht man, wenn das mutierte Genprodukt das WT Allel in seiner Funktion hemmt. In diesem Fall bedeutet dies eine Stromreduktion jenseits des Niveaus einer Haploinsuffizienz.

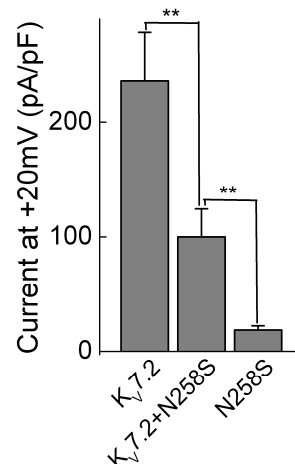


Abb. 22 Dominant-negativer Effekt der N258S Mutation auf Wildtypströme

Die Stromamplituden wurden bei +20 mV gemessen und auf die Zellkapazität normiert. Die Koexpression $K_V7.2+N258S$ führt zu einer Reduktion des $K_V7.2$ vermittelten Stroms auf ca. 42% (vgl. Tabelle 1). Dafür wurde die gleiche $K_V7.2$ cDNA zusätzlich mit der gleichen von N258S cDNA kotransfiziert, sodass eine Amplitudenreduktion als dominant-negativer Effekt zu werten ist. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet: ** $P < 0.01$.

Da die genaue Stöchiometrie heteromerer Kanäle in Koexpressionsexperimenten in Säugerzellen ungewiss ist, entschieden wir uns zusätzlich für die Expression von Fusionsproteinen zwischen $K_V7.3$ und $K_V7.2$ oder N258S, wobei der C-Terminus der $K_V7.3$ Untereinheit mit den N-Termini von WT $K_V7.2$ ($K_V7.3--K_V7.2$) oder N258S ($K_V7.3--N258S$) verknüpft wurde (vgl. Kap. 2.1.5). Bei der homomeren Expression dieser Dimere zeigten sich makroskopisch den Koexpressionen vergleichbare Ströme (Abb. 23A,B). Auch hier ergab sich eine Vervielfachung der heteromeren Stromamplituden im Vergleich zu homomeren $K_V7.2$ oder N258S Kanälen. Jedoch offenbart die insgesamt geringere Stromdichte eine reduzierte Expression der Fusionsproteine (Abb. 20C und Tabelle 1). Im Gegensatz zu den Koexpressionen ergaben die Leitfähigkeits-Spannungskurven der Dimere keine Linksverschiebung, jedoch zeigten die Zeitkonstanten der Aktivierung und Deaktivierung eine leichte Verlangsamung der Aktivierung (Abb. 23C,D und Tabelle 1).

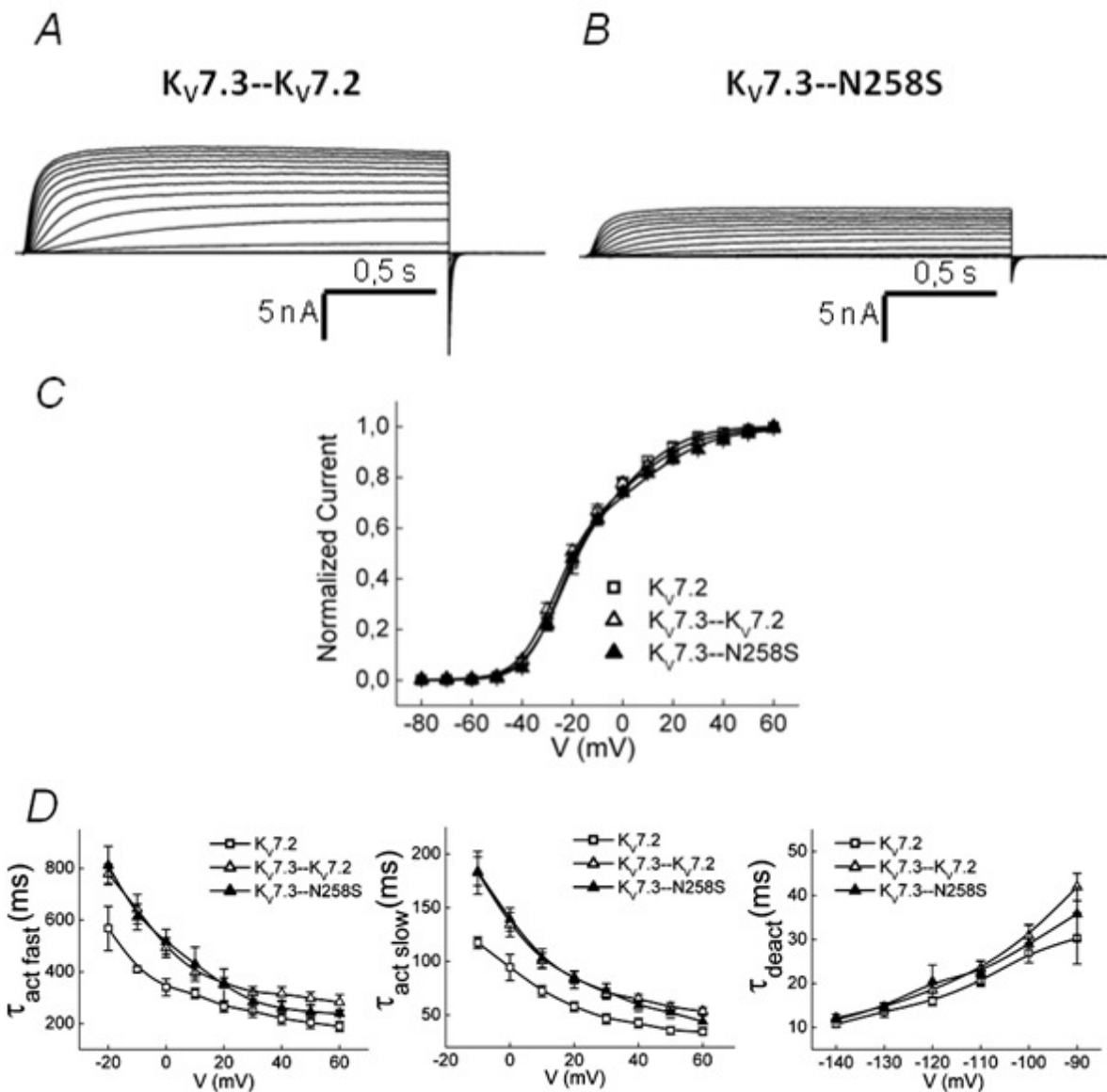


Abb. 23 Expression der Fusionsproteine in CHO Zellen

Typische Stromkurven für $K_v7.3-K_v7.2$ (**A**) und $K_v7.3-N258S$ (**B**). **C** Leitfähigkeits-Spannungskurven wurden durch Auftragen der normalisierten Tail Stromamplituden gegen das Membranpotential (V) erstellt und eine doppelte Boltzmannfunktion (siehe Kap. 2.6.5.1) an die Datenpunkte angepasst. Dabei zeigt sich im Gegensatz zu den entsprechenden Koexpressionen keine Linksverschiebung der Leitfähigkeits-Spannungskurven im Vergleich zu $K_v7.2$. **D** Die Zeitkonstanten der Aktivierung ($\tau_{act fast}$, $\tau_{act slow}$) wurde gemäß Kap. 2.6.5.1 ermittelt. Die schnellere Zeitkonstante ($\tau_{act fast}$) hatte dabei stets eine relative Amplitude zwischen 40% und 60%. Hierbei zeigte sich eine signifikante Verlangsamung der Fusionsproteine im Vergleich zu $K_v7.2$ (vgl. Tabelle 1), jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Fusionsproteinen. Die Zeitkonstanten der Deaktivierung (τ_{deact}) zeigten keinen signifikanter Unterschied zwischen den Fusionsproteinen und $K_v7.2$ (vgl. Tabelle 1). Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt.

Zusammenfassend bestätigten unsere Experimente in CHO Zellen die Ergebnisse aus *Xenopus* Oozyten. Die N258S Mutation stellte sich als eine Untereinheit dar, die im homomeren Zustand in CHO Zellen nur unregelmäßig exprimiert und kaum messbare Kaliumströme produziert. Darüberhinaus übt sie bei Koexpression mit der WT $K_v7.2$ Untereinheit einen dominant-negativen Effekt auf die WT Ströme aus. Allerdings bildet N258S in Kombination mit $K_v7.3$ funktionelle, heteromere Kanäle mit ähnlichen Eigenschaften wie die WT Heterotetramere. Die „Whole-Cell“ Analyse konnte jedoch keine Erklärung für die geringe Stromamplitude des homomeren N258S Kanals liefern und die festgestellte Verlangsamung der Aktivierung der Koexpression von N258S mit $K_v7.3$ im Vergleich zur $K_v7.2 + K_v7.3$ ist keine ausreichende Erklärung für die starke Amplitudenreduktion. Aufgrund der Nähe zur Porenregion wurden zunächst Einzelkanalmessungen durchgeführt.

3.1.3 Einzelkanalanalyse der N258S Mutation

Der Strom, der durch die Kanäle der Zellmembran bei einer bestimmten angelegten Spannung in einem bestimmten Zeitraum fließt, wird durch drei Faktoren bestimmt: durch die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle, die Einzelkanalamplitude bzw. -leitfähigkeit und durch die Anzahl der Kanäle in der Membran (siehe Kap. 1.3). Aufgrund der Nähe der N258S Mutation zu den porenbildenden Abschnitten des Kanalproteins lag eine Beeinträchtigung der Offenwahrscheinlichkeit oder Einzelkanalleitfähigkeit nahe, so dass wir Einzelkanalmessungen durchführten.

Nach Herstellung der „Cell-Attached“ Konfiguration wurde die Zellmembran für 15 s von -80 mV in 20 mV Schritten auf bis +60 mV depolarisiert. In Abb. 24a sind repräsentative Ableitungen für die Fusionsproteine dargestellt. Zur Bestimmung der Amplitudengröße wurden Amplitudenhistogramme der Einzelkanäle erstellt (Abb. 24b). Durch die Zuordnung der Amplitude zum entsprechenden Membranpotential kann die Einzelkanalfähigkeit bestimmt werden. Für die Koexpressionen $K_v7.2 + K_v7.3$ und N258S+ $K_v7.3$ als auch für die Fusionsproteine $K_v7.3 - K_v7.2$ und $K_v7.3 - N258S$ wurden ähnliche Leitfähigkeiten gemessen (Abb. 24c und Tabelle 1). Mit Hilfe der Fläche unter den Maxima der

Amplitudenhistogramme kann, wie unter Kap. 2.6.5.2 beschrieben, die Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals bestimmt werden. Dabei zeigten sich sowohl für $K_V7.3$ -- $K_V7.2$ als auch für $K_V7.3$ --N258S vergleichbare Werte (vgl. Tabelle 1). Die Einzelkanalleitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit für $K_V7.2$ (vgl. Tabelle 1) waren vergleichbar mit den Ergebnissen in der Literatur (Selyanko et al., 2001; Li et al., 2004a, b). N258S konnte wegen der offensichtlich geringen Expression nicht gemessen werden.

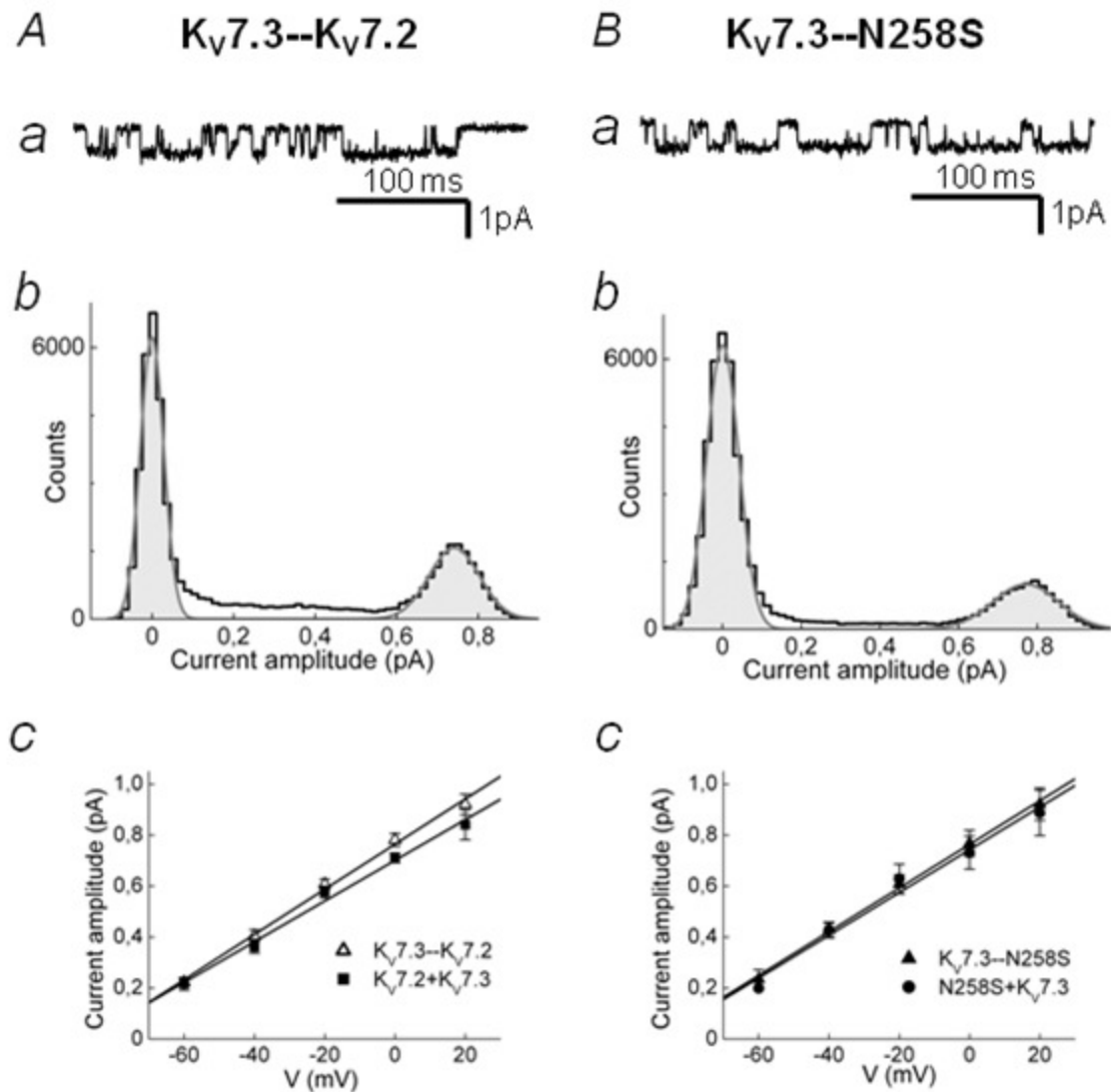


Abb. 24 Einzelkanalanalyse in CHO Zellen

a Typische Einzelkanalspuren der Fusionsproteine $K_V7.3$ -- $K_V7.2$ (**A**) und $K_V7.3$ --N258S (**B**) aufgenommen bei 0 mV. Die Aufnahmen wurden bei 1kHz gefiltert. **b** Amplitudenhistogramme der Einzelkanalspuren in **a**. An die Amplitudenhistogramme wurde die Summe zweier Gauß-Kurven angepasst. Die Offenwahrscheinlichkeit bei 0 mV wurde errechnet aus dem Verhältnis der Flächen unter den Gauß Kurven und lag für $K_V7.3$ -- $K_V7.2$ bei $0,56 \pm 0,07$ ($n=8$) und für $K_V7.3$ --N258S bei $0,49 \pm 0,08$ ($n=7$). **c** Aus den durchschnittlichen Einzelkanalamplituden und den entsprechenden Spannungen errechnen sich die Leitfähigkeiten für $K_V7.3$ -- $K_V7.2$ ($8,9 \pm 0,3$ pS, $n=8$), $K_V7.2+K_V7.3$ ($8,0 \pm 0,4$ pS, $n=5$), $K_V7.3$ --N258S ($8,6 \pm 0,2$ pS, $n=7$) und N258S+ $K_V7.3$ ($8,4 \pm 0,7$ pS, $n=4$) (vgl. Tabelle 1). Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt,

Aufgrund fehlender Unterschiede in der Einzelkanalleitfähigkeiten und der Offenwahrscheinlichkeit zwischen den Koexpressionen und den Fusionsproteinen lag eine unterschiedliche Oberflächenexpression im Sinne eines Trafficking-Defektes als Ursache der Reduktion der makroskopischen Stromamplitude nahe. Von einem Trafficking-Defekt spricht man, wenn der Transport des synthetisierten Kanalproteins vom Endoplasmatischen Retikulum an die Zellmembran gestört ist. Die Ursachen einer solchen Störung sind mannigfaltig und beinhalten gestörte Tetramerisierung (*engl.* assembly), beeinträchtigte Zielfindung (*engl.* targeting) oder veränderten Umsatz (*engl.* turnover) (Deutsch, 2002). So könnte die Oberflächenexpression der N258S Kanäle durch die Mutation gestört sein, während eine Koexpression mit K_v7.3 zu einer Zunahme der Expression der mutierten Untereinheit in heteromeren Kanälen führt. Allerdings muss die Oberflächenexpression dieser N258S/K_v7.3 Kanäle im Vergleich zu WT Heterotetrameren reduziert zu sein.

Tabelle 1 Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchung der N258S Mutation

	Current Density		G-V Parameter					Time Course Parameter				Single Channel Parameter		
	I (pA/pF)	n	V _{1/2} (mV)	k ₁	V _{2/2} (mV)	k ₂	n	$\tau_{act\ fast}^1$ (ms)	$\tau_{act\ slow}^1$ (ms)	τ_{deact}^2 (ms)	n	C (pS)	P _o	n
K_V7.2	236,6 ± 41,8	12	-25,3 ± 1,7	-6,2 ± 0,3	3,3 ± 2,7	-11,3 ± 1,2	9	340,4 ± 33,0	94,4 ± 12,2	20,4 ± 1,1	6	7,3 ± 0,3	0,36 ± 0,09	5
N258S	18,7 ± 3,6	11	-24,2 ± 3,5	-6,2 ± 0,6	15,3 ± 7,5	-12,7 ± 2,5	6							
K_V7.2 + K_V7.3	641,8 ± 92,9	14	-33,4 ± 0,7	-5,5 ± 0,3	-2,5 ± 3,7	-12,4 ± 1,6	8	315,7 ± 24,2	103,7 ± 5,1	340,4 ± 33,0	6	8,0 ± 0,4	0,38 ± 0,14	5
N258S+ K_V7.3	327,6 ± 73,0	12	-29,3 ± 1,1	-6,3 ± 0,3	0,9 ± 3,4	-10,9 ± 1,9	5	500,0 ± 13,8	129,7 ± 16,7	21,3 ± 4,1	5	8,4 ± 0,7	0,52 ± 0,02	4
K_V7.3 -- K_V7.2	456,7 ± 47,7	7	-27,9 ± 1,2	-5,8 ± 0,3	3,4 ± 2,5	-14,3 ± 1,0	7	493,4 ± 37,7	134,2 ± 11,2	23,4 ± 1,8	7	8,9 ± 0,3	0,56 ± 0,07	8
K_V7.3 -- N258S	172,1 ± 33,4	12	-26,0 ± 1,1	-5,3 ± 0,4	8,1 ± 3,7	-13,5 ± 1,0	9	516,3 ± 48,0	139,2 ± 10,8	22,5 ± 2,6	5	8,6 ± 0,2	0,49 ± 0,08	7
K_V7.2 (29°C)	164,0 ± 25,1	8	-34,5 ± 1,4	-6,6 ± 0,5	1,4 ± 4,6	-13,0 ± 0,8	5							
K_V7.2 (XE991)	187,7 ± 70,3	4	-31,4 ± 1,6	-6,3 ± 0,1	5,2 ± 12,1	-16,0 ± 2,8	3							
K_V7.2 (RTG)	209,7 ± 67,8	7	-29,8 ± 2,6	-5,7 ± 0,7	8,6 ± 5,1	-16,1 ± 1,5	5							
N258S (29°C)	75,0 ± 13,7	11	-26,3 ± 2,0	-7,0 ± 0,4	5,1 ± 3,4	-7,9 ± 1,5	6							
N258S (XE991)	18,6 ± 2,2	3												
N258S (RTG)	70,5 ± 14,3	10	-28,6 ± 1,9	-5,0 ± 0,9	-1,9 ± 4,8	-10,6 ± 1,6	7							

¹ at 0 mV, ² at -110 mV

3.1.4 Oberflächenexpression

Um eine Zunahme der Anzahl an N258S Untereinheiten nach Heterotetramerisierung mit K_v7.3 an der Zelloberfläche nachzuweisen, wurde ein extrazelluläres HA-Epitop in K_v7.2 und N258S zwischen den Transmembranbereichen S1 und S2 eingefügt (vgl. Schwake et al., 2000). Die Anwesenheit der jeweiligen Untereinheit an der Oberfläche der *Xenopus* Oozyten wurde durch Inkubation der Oozyten in einer Lösung mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop quantifiziert. Dem folgte eine Inkubation mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper. Anschließend wurden hochauflösende Aufnahmen mit Hilfe der Konfokalmikroskopie durchgeführt. Abb. 25A zeigt beispielhafte Aufnahmen, die eine reduzierte Oberflächenexpression der N258S Untereinheit zeigen. In CHO Zellen war der Nachweis nicht eindeutig. Transfizierte CHO Zellen wurden zunächst mit einem Anti-K_v7.2 Antikörper und anschließend mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper inkubiert. In den anschließenden konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigten sich jedoch keine überzeugenden Unterschiede zwischen der K_v7.2 und N258S Expression, da für beide Kanäle keine Anfärbung der Zellmembran nachgewiesen werden konnte (nicht dargestellt). Dies führten wir auf eine insgesamt geringe Membranexpression der Untereinheiten zurück. Bei Koexpression mit K_v7.3 färbte sich die Zellmembran für beide Klone an (Abb. 25B), was eine Erhöhung der Oberflächenexpression anzeigt, die die vergrößerte Stromamplitude unter diesen Bedingungen erklären kann.

Zusammenfassend konnte eine Retention der N258S Untereinheit im Endoplasmatischen Retikulum nicht eindeutig gezeigt werden. Es kann lediglich auf eine verstärkte Oberflächenexpression nach Koexpression von N258S mit K_v7.3 geschlossen werden, welche mit der elektrophysiologisch nachgewiesenen Zunahme der Stromamplitude übereinstimmt. Eine stärkere Oberflächenexpression von WT K_v7.2 Untereinheiten nach Koexpression wurde schon früher durch Schwake et al. (2000) nachgewiesen. Die Immunofluoreszenz ist keine quantitative Methode, sodass sie lediglich die starke Vergrößerung der Amplitude bei K_v7.3 Koexpression durch erhöhte Membranexpression offenbaren kann. Für die qualitative Untersuchung ist die Elektrophysiologie besser geeignet.

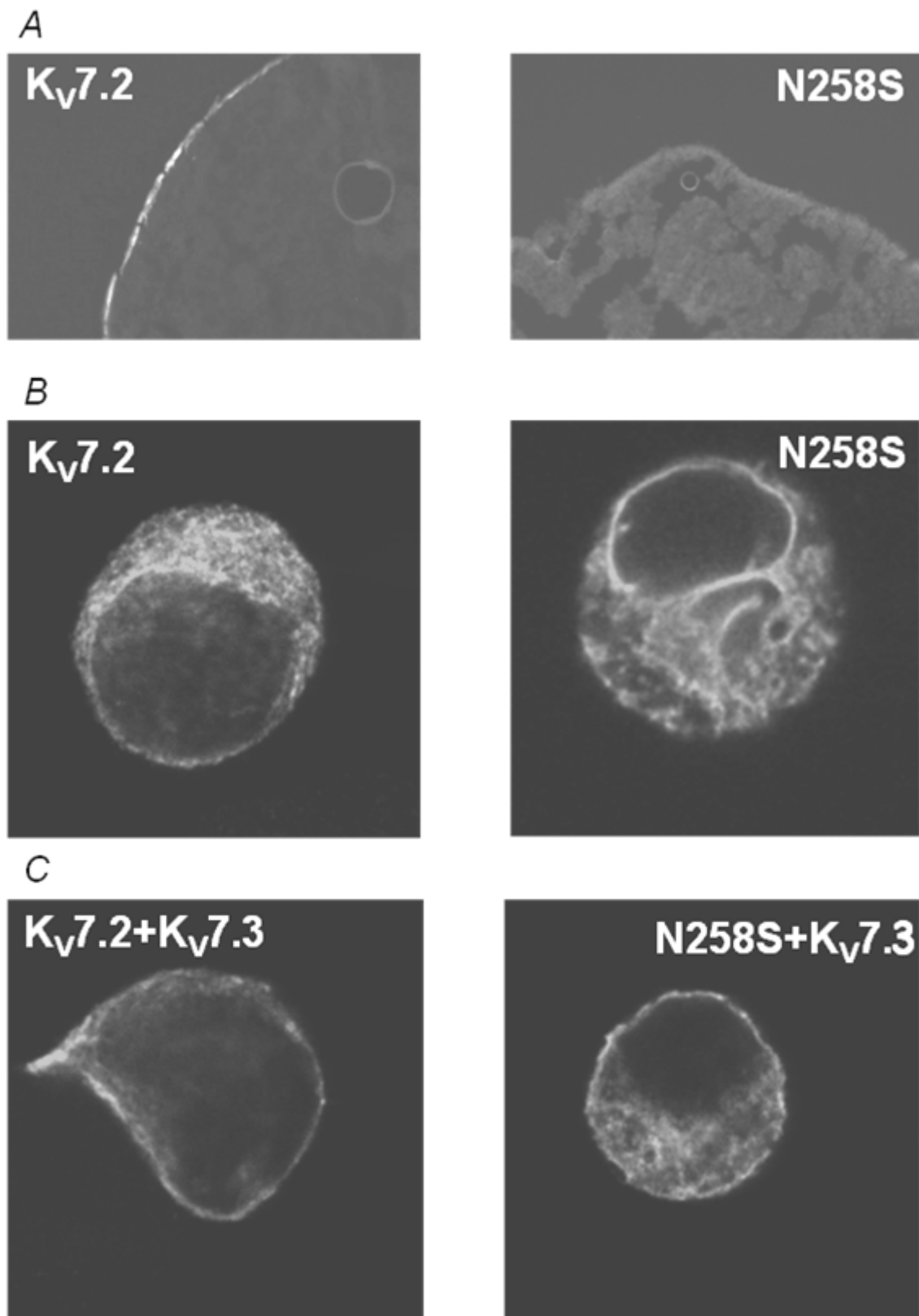


Abb. 25 Immunofluoreszenz

A Expression von HA-epitopmarkierten K_v7.2 und N258S Untereinheiten in Xenopus Oozyten. Der Nachweis erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop und einem fluoreszierenden Zweitantikörper. Diese Aufnahme suggeriert eine reduzierte Oberflächenexpression von N258S **B** Expression der K_v7.2 und N258S Untereinheit in CHO Zellen. Mit einem Anti-K_v7.2 Antikörper und fluoreszierenden Zweitantikörper konnte kein eindeutiger Nachweis der Wildtypuntereinheit in der Membran erfolgen. **C** Verstärkte Anfärbung der Zellmembran nach Koexpression der K_v7.2 und N258S Untereinheiten in CHO Zellen mit K_v7.3.

3.1.5 Wiederherstellung des N258S Stromes

Mutationen in Kaliumkanälen, die zu einem Trafficking-Defekt führen, sind für hERG Kanäle bekannt und gut untersucht wurden (Zhou et al., 1999; Gong et al. 2004; Gong et al. 2006). Für solche Mutationen ist bekannt, dass die Oberflächenexpression des mutierten Kanals durch Erniedrigung der Inkubationstemperatur oder bestimmte Chemikalien verbessert werden kann. Solche sog. „Rescue“ Phänomene sind allerdings nie zuvor bei einer BFNS Mutation des $K_v7.2$ Kanals gezeigt worden. Es wird davon ausgegangen, dass eine Erniedrigung der Inkubationstemperatur die Faltungszwischenstufen des Proteins stabilisiert, wohingegen Kanalblocker, die in der Nähe der inneren Porenöffnung, einer Interaktionsstelle aller vier Untereinheiten des Kanals, binden, die Integrität der Tetramere stabilisieren könnten (Gong et al., 2006; Robertson et al., 2006).

3.1.5.1 Verbesserung der Expression der N258S Mutation durch Erniedrigung der Inkubationstemperatur

Tatsächlich konnten wir die Expression der Mutation durch Erniedrigung der Inkubationstemperatur verbessern. Nach der üblichen Aufbereitung wurden die CHO Zellen nach Transfektion für 24h bei 37°C inkubiert, um eine ausreichende Proteinbiosynthese zu gewährleisten. Anschließend wurden die transfizierten Zellen für 24h bei 29°C inkubiert. Es folgte die übliche Vorbereitung der Zellen für die anschließenden elektrophysiologischen Untersuchungen mit Hilfe der „Whole-Cell“ Patch-Clamp Technik. Nach Durchlaufen des gewohnten Aktivierungsprotokolls zeigte sich für den WT ein K_v7 typischer Strom. Die homomere N258S Expression lieferte nach Inkubation bei 29°C - im Gegensatz zur gleichen Transfektion und Inkubation bei 37°C - regelmäßig messbare Ströme. Dabei zeigte sich ein ca. 5-facher Amplitudenanstieg im Vergleich zur Inkubation bei 37°C. Die Amplitude der Expression von homomeren WT $K_v7.2$ Kanälen ergab hingegen eine nicht signifikante Reduktion (Abb. 26).

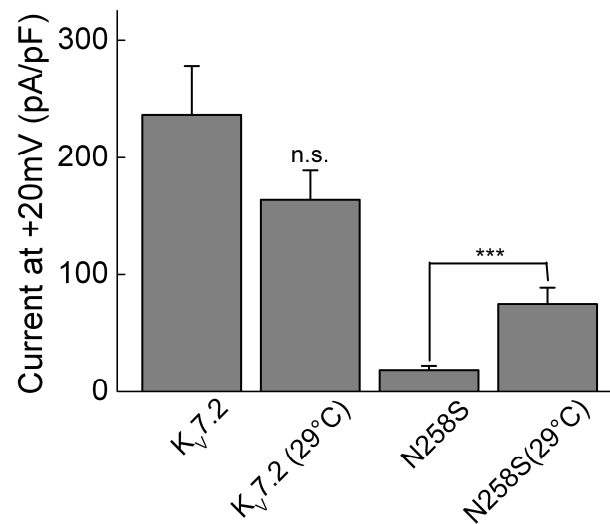


Abb. 26 „Temperature Rescue“

Nach der üblichen Aufbereitung und Transfektion wurden die CHO Zellen für 24h bei 37°C und anschließend für 24h auf 29°C inkubiert. Die Stromamplituden wurden am Ende eines 2s langen Pulses auf +20 mV gemessen und auf die Zellkapazität normiert. Dabei zeigte sich ein 5-facher Anstieg der N258S Amplitude. Für K_v7.2 ergab sich eine leichte, nicht signifikante Reduktion der Stromamplitude (vgl. Tabelle 1). Die Daten sind als Mittelwert ± S.E.M. dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet: ***P<0.001, n.s. *nicht signifikant*.

3.1.5.2 Stromamplituden der N258S Mutante nach Inkubation mit Retigabin und XE991

Zur Auslösung des sog. „Pharmacological Rescue“ Phänomens werden in der Literatur meist Kanalblocker verwendet, die in der Nähe der inneren Porenöffnung binden. Nach der gewohnten Aufbereitung wurden die CHO Zellen nach Transfektion für 24h mit dem gewohnten Serum inkubiert, um eine ausreichende Proteinbiosynthese zu gewährleisten. Anschließend wurden die transfizierten Zellen für 24h mit Medium inkubiert, welches die zu testende Substanz enthielt. Es folgte ein 1-stündiges Auswaschen der Substanz und die übliche Vorbereitung der Zellen für die anschließenden elektrophysiologischen Untersuchungen mit Hilfe der „Whole-Cell“ Patch-Clamp Technik. Analog zu Veröffentlichungen bei hERG Kanälen entschieden wir uns für den spezifischen K_v7 Kanalblocker XE991. So wurden transfizierte CHO Zellen für 24h mit 100 µM XE991 inkubiert. Für K_v7.2 ergab das übliche Aktivierungsprotokoll einen makroskopisch unveränderten Strom. Für N258S konnte keine Vergrößerung der Stromamplitude nachgewiesen werden (Abb. 27A). Da für das Linopirdin Analogon XE991 angenommen wird, dass es extrazellulär bindet (Costa et Brown, 1997; Lamas et al., 1997), beschlossen wir, die Experimente mit dem spezifischen K_v7 Kanalöffner Retigabin zu wiederholen, welches in der Nähe der inneren

Porenöffnung binden soll (Schenzer et al., 2005; Wuttke et al., 2005). Nach gleicher Vorbereitung zeigte das gewohnte Aktivierungsprotokoll regelmäßig Ströme für N258S. Dabei wies N258S nach 24-stündiger Inkubation mit 500 μ M Retigabin einen ca. 5-fachen Amplitudenanstieg im Vergleich zur Inkubation ohne Retigabin auf, wobei die WT $K_v7.2$ Amplitude nach der Inkubation mit Retigabin unverändert war (Abb. 27B). Da es sich bei Retigabin um einen Kanalöffner handelt, sollte ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt auf eine verstärkte Öffnung der vorhandenen Kanäle zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass eine Retigabin Applikation zu einer starken Linksverschiebung der Leitfähigkeits-Spannungskurve von $K_v7.2$ führt (Wuttke et al., 2005). Die Analyse der Leitfähigkeits-Spannungskurven ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den N258S Strömen mit und ohne 24-stündige Inkubation mit Retigabin (vgl. Tabelle 1). Im Gegensatz dazu führte eine unmittelbare Applikation von Retigabin kurz vor der elektrophysiologischen Untersuchung von nach üblicher Weise vorbereiteten CHO Zellen zu einer starken Linksverschiebung der Leitfähigkeits-Spannungskurven von N258S (Abb. 27C und Tabelle 1). Dies muss als Hinweis gewertet werden, dass durch das 1-stündige Auswaschen das Retigabin entfernt werden kann und die Erhöhung der Stromamplitude nach 24-stündiger Inkubation mit Retigabin nicht auf eine verstärkte Öffnung der vorhandenen Kanäle sondern auf eine erhöhte Anzahl an Kanälen in der Membran zurückzuführen ist.

Zusammenfassend konnte der Verdacht eines Trafficking-Defektes mit diesen elektrophysiologischen Methoden bestätigt werden. Zum ersten Mal wurde ein „Pharmacological“ und „Temperature Rescue“ für eine BFNS Mutation der $K_v7.2$ Untereinheit gezeigt. Die Stromamplitude der N258S Mutation verfünffachte sich nach 24stündiger Inkubation der transfizierten Zellen bei 29°C und bei Inkubation mit 500 μ M Retigabin. Eine Behandlung mit XE991 blieb hingegen ohne Effekt. Nach den Untersuchungen an hERG Mutationen mit gestörtem „Trafficking“ (Zhou et al., 1999; Gong et al. 2004; Gong et al. 2006), den Ergebnissen unserer Immunofluoreszenzexperimente und den Rescue Phänomenen müssen wir von einem gestörten Transport der N258S Mutation vom ER an die Membranoberfläche als Pathomechanismus für die Reduktion des Kaliumstromes und der dadurch resultierenden Anfälle ausgehen.

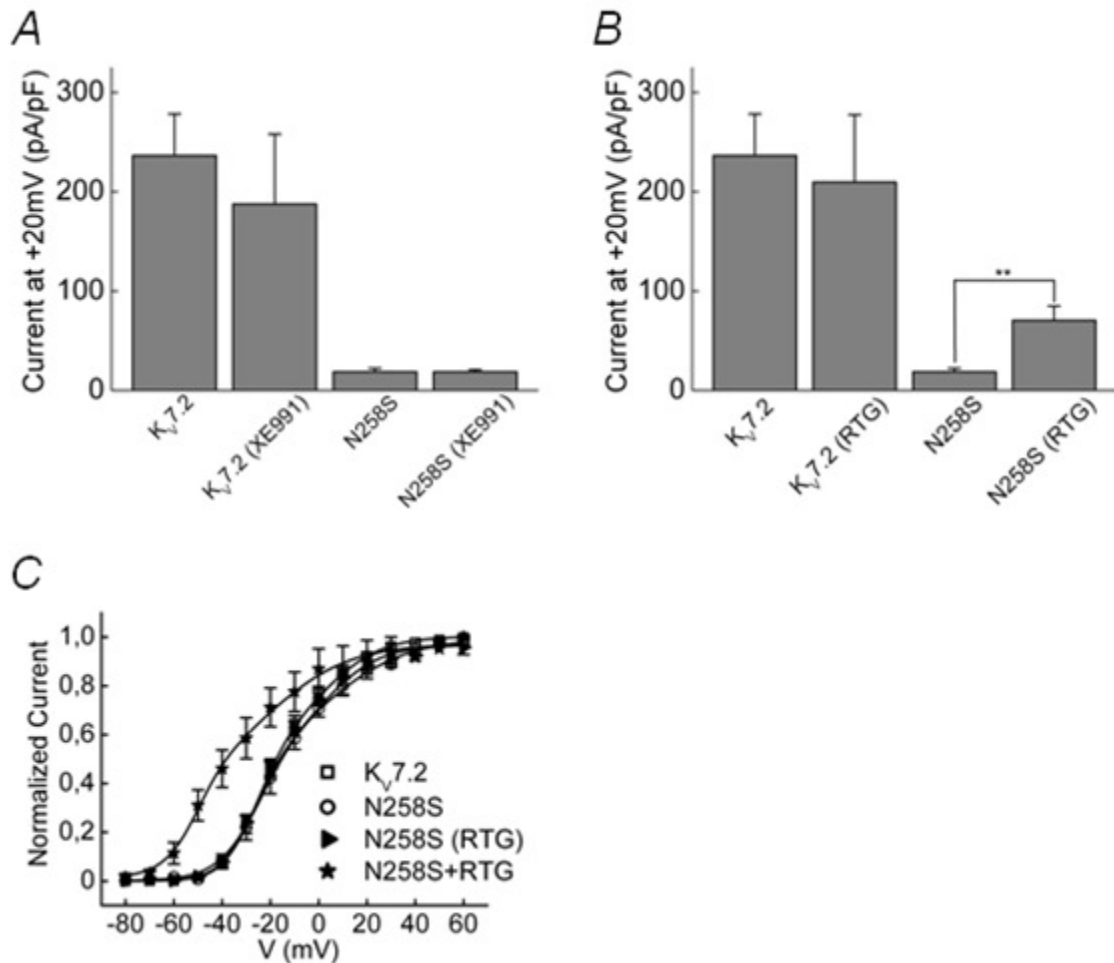


Abb. 27 „Pharmacological Rescue“

A CHO Zellen wurden mit K_v7.2 oder N258S transfiziert und 24h vor elektrophysiologischer Untersuchung mit 100 μ M XE991 inkubiert [K_v7.2(XE991), N258S(XE991)]. Dargestellt werden die auf die Zellkapazität normierten Stromamplituden bei +20 mV. Dabei zeigte sich im Vergleich zur gewohnten Inkubation keine signifikante Änderung der Stromamplituden (vgl. Tabelle 1). **B** Eine Inkubation der transfizierten Zellen mit 500 μ M Retigabin 24h vor der Messung [K_v7.2(RTG), N258S(RTG)] zeigte einen 5-fachen Anstieg der Amplitude für N258S(RTG), wobei sich für K_v7.2(RTG) keine signifikante Änderung der Stromamplitude zeigte (vgl. Tabelle 1). **C** Des Weiteren wurde die unmittelbare Applikation von 10 μ M Retigabin auf nach gewohnter Weise vorbereiteten Zellen getestet (N258S+RTG). Leitfähigkeits-Spannungskurven wurden für die Experimente nach 24-stündiger Inkubation mit 500 μ M Retigabin [N258S(RTG)] und nach unmittelbarer Applikation von 10 μ M Retigabin (N258S+RTG) erstellt. Die beobachtete starke Linksverschiebung der Leitfähigkeits-Spannungskurven bei unmittelbarer Retigabin Applikation muss als Hinweis gewertet werden, dass die Erhöhung der Stromamplitude nach 24-stündiger Inkubation mit Retigabin nicht auf eine verstärkte Öffnung der vorhandenen Kanäle sondern auf eine erhöhte Anzahl an Kanälen in der Membran zurückzuführen ist. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet: ** $P < 0.01$.

3.2 Elektrophysiologische Charakterisierung hippokampaler Neurone von KCNQ2 Knock-Out Mäusen

Nach fast 10 Jahren Erforschung der BFNS assoziierten $K_v7.2$ und $K_v7.3$ Mutationen sind zwei zentrale Fragen immer noch ungeklärt. So ist zum einen immer noch unklar, welcher Mechanismus zur Begrenzung der Anfälle auf die Neugeborenenperiode führt (Burgess et al., 2005). Lediglich 15 % der Betroffenen zeigen epileptische Anfälle zu einem späteren Zeitpunkt. Des Weiteren ist man lange davon ausgegangen, dass eine Reduktion des M-Stroms jenseits der Haploinsuffizienz zu einem erweiterten Phänotyp führen müsse (Jentsch, 2000). Tatsächlich sind neben der in dieser Arbeit charakterisierten $K_v7.2$ Mutation lediglich drei weitere dominant-negative Mutationen in der Literatur zu finden (Dedek et al., 2001; Singh et al., 2003; Wuttke et al., 2007), wobei lediglich die R207W Mutation BFNS Anfälle mit einem erweiterten Phänotyp im Sinne von persistierenden PNH Symptomen beschrieben ist (Dedek et al., 2001). Daraus folgt die zweite Frage, welche Auswirkung ein vollständiger Verlust der $K_v7.2$ Untereinheit auf die neuronale Funktion hat.

Um diese Fragen neu zu beleuchten und um ein neues Expressionssystem für $K_v7.2$ Mutationen zu erschließen, haben wir hippokampale Neurone von hetero- und homozygoten KCNQ2 Knock-Out Mäuseföten untersucht. Das heterozygote Muttertier wurde am 18. Schwangerschaftstag getötet und die Hippokampi der Föten unter mikroskopischer Sichtkontrolle präpariert. Die so gewonnenen Neurone wurden in Kulturschalen inkubiert und in regelmäßigen Abständen zwischen dem 7. und 17. Inkubationstag (*engl.* days in vitro, DIV) elektrophysiologisch charakterisiert (siehe Kap. 2.6.5.3). Während $[+/-]$ Neurone eine Haploinsuffizienz repräsentieren, kommt es in $[-/-]$ Neuronen zu einem vollständigem Funktionsverlust, ähnlich einer ausgeprägten dominant-negativen $K_v7.2$ Mutation. Unser Hauptaugenmerk galt dabei der Entwicklung des M-Stroms und des Feuerungsverhaltens der Neurone bei Depolarisation.

Da in einer primären Zellkultur aus fötalem hippocampalem Hirngewebe von einer gewissen neuronalen Heterogenität ausgegangen werden muss, wurden in der vorliegenden Arbeit einige Kriterien für die Auswahl der Neurone zugrunde gelegt. Gemessen wurden Neurone, die ein pyramidaloides Aussehen aufwiesen (Banker et Cowan, 1979; Peacock et al., 1979; Kriegstein et Dichter, 1983). Bipolare oder fusiforme und sternförmige Neurone wurden ausgeschlossen, da eine Assoziation mit Interneuronen naheliegt, welche andere biophysikalische Eigenschaften als Pyramidenzellen aufweisen (Freund et Buzsaki, 1996). In die Auswertung eingeschlossen wurden Neurone, bei denen sowohl die Spannungs- als auch die Stromklemmversuche durchgeführt wurden und die ein repetitives Feuerungsverhalten zeigten. Dagegen wurden Neurone ausgeschlossen, die ein Ruhemembranpotential über -50 mV bzw. einen Haltestrom größer als 100 pA benötigten, da ein großer Leckstrom v.a. die Auswertung des Feuerungsverhaltens stark verfälscht. Insgesamt wurden 216 Neurone gemessen. Für alle Messtage enthalten die Ergebnisse Daten von mindestens zwei verschiedenen Föten, von mindestens zwei verschiedenen Muttertieren (Tabelle 2).

Tabelle 2 Zusammensetzung der Ergebnisse in Bezug auf Anzahl der Föten unterschiedlicher Muttertiere (MT)

	[+/+] MT/Föten	[+/-] MT/Föten	[-/-] MT/Föten
DIV 7	2/2	2/4	
DIV 9/8	2/2	1/3	1/2
DIV 11/10	3/4	4/5	1/2
DIV 13/12	3/3	3/4	2/3
DIV 15/14	1/2	2/3	1/2
DIV 17	2/2	2/3	

3.2.1 Morphologie der Neurone in vitro

Direkt nach der Präparation hatten die Neurone eine kleine, sphärische Form. Doch schon in kürzester Zeit entwickelten sich Ausläufer und schon ab dem dritten bis vierten Tag in Kultur (*engl.* days in vitro, DIV) bekamen die Zellen ihre typische Form. Gemäß der Literatur konnten wir auch in unseren Kulturen zwischen pyramidaloiden, fusiformen, bipolaren und multipolaren/sternförmigen Neuronen (Banker et Cowan, 1979; Peacock et al., 1979; Kriegstein et Dichter, 1983; Yang et al., 1993) unterscheiden. Im Laufe der ersten Woche nahm die Größe der Somata als auch die Länge der Ausläufer zu. Aufgrund der Membransituation waren zu diesem Zeitpunkt elektrophysiologische Experimente nur schlecht möglich. Da die Gliazellen initial durch das verwendete Medium (siehe Kap. 2.1.2) gehemmt wurden, setzte das gliale Wachstum nach einigen Tagen verzögert ein. Zwischen DIV 11 und DIV 15 entstand jedoch ein fast geschlossener Gliarasen in den Kulturschalen, der einen flachen, matten, epitheloiden oder fibrozellulären Eindruck machte. Auf ihm waren die Somata der Neurone als helle und erhabene Zellkörper sichtbar. Mit Zunahme des neuronalen Wachstums lagerten sich Ausläufer der Neurone zusammen. Ab DIV 17 hatte das gliale Wachstum ein solches Ausmaß angenommen, dass z.T. die Unterscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen schwieriger wurde. In einigen Kulturschalen entwickelten sich die Neurone aus der sphärischen Form aus unbekannten Gründen nicht weiter; diese wurden aus den elektrophysiologischen Experimenten ausgeschlossen. Ab DIV 15 verschlechterten sich die Kulturen zunehmend, so dass ab DIV 19 keine elektrophysiologischen Messungen an Neuronen gelungen sind. Insgesamt zeigten die Kulturen eine morphologische Entwicklung, wie sie schon von anderen Gruppen zuvor beschrieben worden ist (Banker et Cowan, 1979; Peacock et al., 1979; Kriegstein et Dichter, 1983). In unseren Zellkulturen war kein offensichtlicher morphologischer Unterschied zwischen $[+/+]$, $[+/-]$ und $[-/-]$ Neuronen feststellbar. Insbesondere $[-/-]$ Neurone schienen eine äquivalente Entwicklung zu durchlaufen, obwohl homozygote KCNQ2 Knock-Out Mäuse letal sind. So konnten auch Watanabe et al. (2000) keine strukturellen Besonderheiten des neuronalen Gewebes feststellen.

3.2.2 Allgemeine biophysikalische Parameter der Neurone in vitro

Die Kapazität einer Zelle ist abhängig von der Oberfläche und damit von der Größe einer Zelle und kann somit als Parameter des Zellwachstums dienen. Die Bestimmung und Kompensation der Kapazität einer verzweigten Zelle gestaltet sich jedoch stets problematisch (vgl. Sakmann et Neher, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde die Zellkapazität mit Hilfe der „membrane test“-Option der Clampfit Software (pClamp 8.2) bestimmt (vgl. Kap. 2.6.5.3). Dabei zeigte sich für alle drei Neuronenfamilien eine Zunahme der Zellkapazität im Verlauf, vereinbar mit der visuell beobachteten Größenprogredienz und Ausbildung der Axone, Dendriten und Zellverbindungen in der Kulturschale. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Neuronenfamilien (Abb. 28A) festgestellt werden. Als Hinweis für die Anzahl von exprimierten Ionenkanälen an der Membranoberfläche dient der Eingangswiderstand, welcher durch hyperpolarisierende Strompulse bestimmt wurde (vgl. Kap. 2.6.5.3). Dabei stellte sich im Verlauf eine Abnahme des Eingangswiderstands aller Neuronenfamilien dar, was auf eine Zunahme der exprimierten Kanäle deutet, vereinbar mit einer weiteren Ausdifferenzierung der Neurone in vitro. Auch hier zeigte keine der Neuronenfamilien eine besondere Abweichung (Abb. 28B). Schließlich wurde das Ruhepotential der Neurone miteinander verglichen. Das Ruhepotential wurde nach Herstellung der Ganzzellkonfiguration und Umschalten in den „Current-Clamp“-Modus direkt am Verstärker abgelesen. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Neuronengruppen (Abb. 28C). Zusammenfassend konnten keine Unterschiede in der Entwicklung der Zellkapazität, des Eingangswiderstands oder Ruhepotentials zwischen $[+/-]$, $[+/-]$ und $[-/-]$ Neuronen festgestellt werden. Hervorzuheben ist, dass $[-/-]$ Neurone eine vergleichbare Entwicklung zeigen, was bedeutet, dass ein vollständiges Fehlen der $K_{v7.2}$ Untereinheit zu keiner gravierenden Entwicklungsstörung der Neurone führt, obwohl homozygote KCNQ2 Knock-Out Mäuse auf Grund von Lungenatelektasen letal sind (Watanabe et al., 2000).

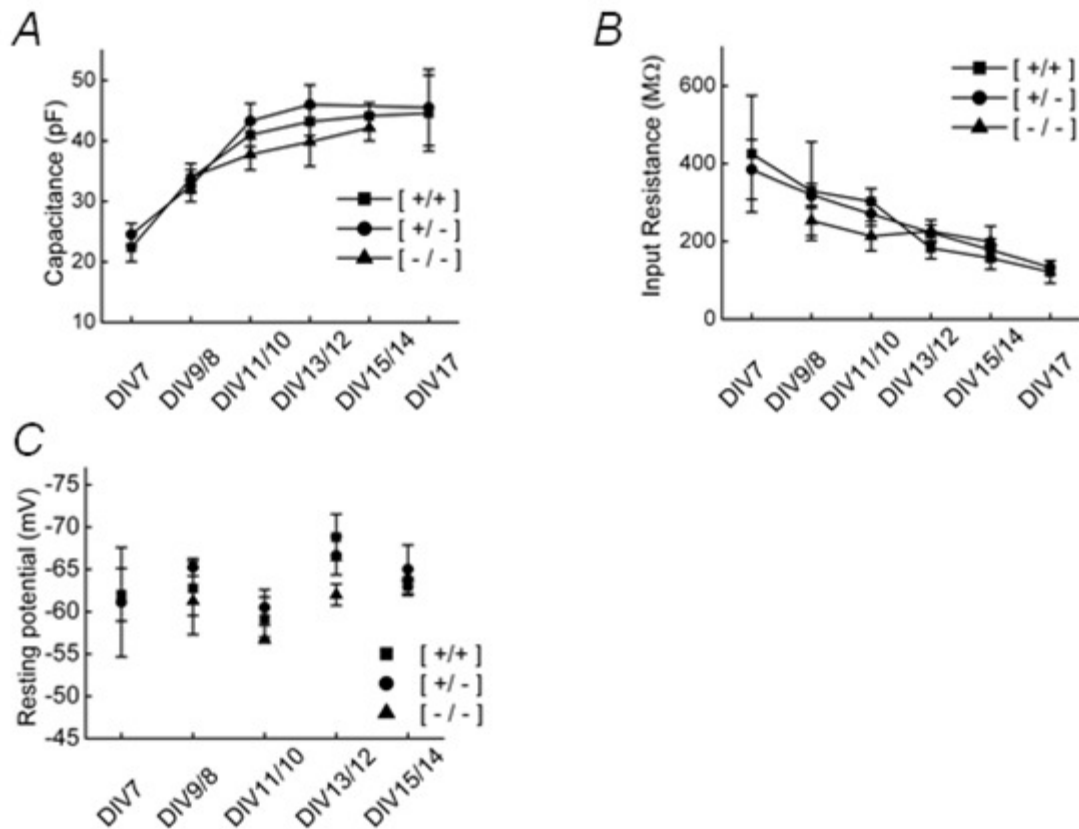


Abb. 28 Entwicklung des Eingangswiderstand, der Kapazität und des Ruhepotentials

A Die Zellkapazität der [+/+] (n=5-10), [+/-] (n=6-10) und [-/-] (n=5-8) Neurone wurde mit Hilfe der Clampex Software bestimmt, ohne dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Neuronenfamilien feststellbar war. **B** Der Eingangswiderstand wurde durch hyperpolarisierende Strompulse bestimmt. Dabei zeigte sich keine Abweichung in der Entwicklung der Neuronenfamilien (n=4-11). **C** zeigt das Ruhepotential der gemessene Neurone. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den [+/+] (n=5), [+/-] (n=8) und [-/-] (n=6) Neuronen festgestellt werden kann. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt.

3.2.3 Parameter der Aktionspotentiale

Nach Umschalten auf den Current-Clamp Modus wurde der injizierte Strom so eingestellt, dass das Ruhemembranpotential ca. -60 mV betrug. Durch kurze depolarisierende Strompulse wurden einzelne Aktionspotentiale ausgelöst und im Hinblick auf die maximale Aktionspotentialhöhe (*engl.* overshoot), der Dauer der De- und Hyperpolarisation und der Aktionspotentialbreite bei halbmaximaler Depolarisation ausgewertet (siehe Kap. 2.6.5.3). Während die Aktionspotentialhöhe im Verlauf der Entwicklung zunahm, zeigte sich eine leichte Verkürzung der Depolarisationszeit, eine Reduktion der Aktionspotentialbreite und eine Beschleunigung der Repolarisation. Hierbei waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Neuronenfamilien feststellbar (Tabelle 23), so dass ein Verlust der $K_v7.2$ Untereinheit und einer damit wohl verbundenen Reduktion des M-Stroms die Form des Aktionspotentials nicht beeinflusst.

Tabelle 3 Entwicklung der Aktionspotentiale

Von einem Ruhepotential von -60 mV ausgehend wurden durch kurze depolarisierende Strompulse einzelne Aktionspotentiale ausgelöst. Die Aktionspotentiale wurden daraufhin in Hinblick auf die maximale Aktionspotentialhöhe (spike peak), der Dauer der Depolarisation (spike rise time) und der Hyperpolarisation (spike decay time) und der Aktionspotentialbreite auf halbmaximaler Depolarisation (spike half width) ausgewertet.

		[+/+]	[+/-]	[-/-]
DIV 7	Spike peak (mV)	43,0 ± 8,1 (n=4)	38,3 ± 9,3 (n=4)	
	Spike rise time (ms)	0,42 ± 0,03 (n=4)	0,38 ± 0,03 (n=5)	
	Spike half width (ms)	0,95 ± 0,06 (n=4)	0,82 ± 0,03 (n=5)	
	Spike decay time (ms)	0,53 ± 0,09 (n=4)	0,45 ± 0,02 (n=5)	
DIV 9/ DIV 8	Spike peak (mV)	38,1 ± 8,1 (n=4)	42,6 ± 3,2 (n=3)	50,1 ± 7,7 (n=4)
	Spike rise time (ms)	0,38 ± 0,03 (n=4)	0,36 ± 0,03 (n=4)	0,36 ± 0,01 (n=4)
	Spike half width (ms)	0,87 ± 0,08 (n=4)	0,86 ± 0,07 (n=4)	0,91 ± 0,03 (n=4)
	Spike decay time (ms)	0,54 ± 0,07 (n=4)	0,52 ± 0,06 (n=4)	0,55 ± 0,04 (n=4)
DIV11/ DIV10	Spike peak (mV)	42,5 ± 5,7 (n=5)	40,7 ± 9,5 (n=4)	46,3 ± 5,5 (n=5)
	Spike rise time (ms)	0,32 ± 0,02 (n=5)	0,29 ± 0,01 (n=4)	0,33 ± 0,03 (n=5)
	Spike half width (ms)	0,75 ± 0,07 (n=5)	0,65 ± 0,06 (n=4)	0,90 ± 0,08 (n=5)
	Spike decay time (ms)	0,43 ± 0,06 (n=5)	0,35 ± 0,03 (n=4)	0,48 ± 0,04 (n=5)
DIV13/ DIV12	Spike peak (mV)	43,0 ± 4,7 (n=5)	42,0 ± 3,5 (n=4)	40,7 ± 7,3 (n=4)
	Spike rise time (ms)	0,29 ± 0,02 (n=7)	0,28 ± 0,02 (n=5)	0,31 ± 0,02 (n=5)
	Spike half width (ms)	0,68 ± 0,05 (n=7)	0,64 ± 0,04 (n=5)	0,69 ± 0,03 (n=5)
	Spike decay time (ms)	0,39 ± 0,03 (n=7)	0,36 ± 0,03 (n=5)	0,39 ± 0,01 (n=5)
DIV15/ DIV14	Spike peak (mV)	47,9 ± 5,1 (n=3)	45,2 ± 5,3 (n=4)	46,4 ± 6,7 (n=3)
	Spike rise time (ms)	0,28 ± 0,08 (n=5)	0,30 ± 0,02 (n=4)	0,32 ± 0,09 (n=3)
	Spike half width (ms)	0,69 ± 0,08 (n=5)	0,69 ± 0,01 (n=4)	0,63 ± 0,11 (n=2)
	Spike decay time (ms)	0,44 ± 0,07 (n=5)	0,38 ± 0,01 (n=4)	0,47 ± 0,15 (n=2)

3.2.4 Unterschiede zwischen [+/+] und [+/-] Neuronen

3.2.4.1 Entwicklung des M-Stroms und der mAHP

Da heteromere $K_{V7.2}/K_{V7.3}$ Kanäle Hauptträger des M-Stroms sind, sollte eine Haploinsuffizienz der $K_{V7.2}$ Untereinheit eine Reduktion des M-Stroms zur Folge haben. Zur Bestimmung des M-Stroms wurden die Neurone nach dem „klassischen“ M-Stromprotokoll (Adams und Brown, 1980) vom Haltepotential bei -70 mV mit einem 1 s dauernden Puls auf -20 mV depolarisiert, gefolgt von einem 600 ms langen Puls auf -40 mV. Hierbei beobachtet man die M-typische Stromkonfiguration, die durch die Deaktivierung der M-Kanäle entsteht (Shah et al., 2002; Passmore et al., 2003; Shahidullah et al. 2005). Trägt man die Stromamplitude zu Beginn (*engl.* instantaneous, inst) und den um den Leckstrom korrigierten (*engl.* leak-subtracted) Strom zum Schluss (*engl.* steady state, stst) des repolarisierenden zweiten Pulses als Strom-Spannung-Beziehung gegenüber der angelegten Spannung auf (vgl. Kap. 2.6.5.3), erhält man das M-typische

Verhältnis, das schon von Adams et al. (1982) beschrieben worden ist. Der Schnittpunkt zwischen der "stst"- und der "inst"-Kurve gibt das Umkehrpotential der Kanäle wieder und liegt für beide Neuronenfamilien unter diesen Bedingungen bei ca. -70 mV. Das Schwellenpotential liegt bei ca. -60 mV. Ähnliche Werte werden auch von Shahidullah et al. (2005) und Passmore et al. (2003) angegeben. Die Differenz zwischen dem Strom am Anfang und am Ende dieses Pulses liefert ein Maß für den M-Strom (vgl. Schweitzer et al., 1993). Tatsächlich zeigten [+/-] Neurone im Vergleich zu [+/+] Neuronen ab DIV 9 tendenziell geringere M-Stromamplituden, jedoch war der Unterschied bis auf DIV 11 statistisch nicht signifikant (Abb. 29). Gründe dafür sind in der geringen Anzahl der gemessenen Neurone und in der etwas unsicheren Bestimmung der Zellkapazität zu suchen. An DIV 7 und DIV 9 war kein Unterschied in den M-Stromamplituden feststellbar, was darauf hindeutet, dass die M-Kanäle noch nicht exprimiert bzw. andere Untereinheiten als $K_{v7.2}$ exprimiert werden.

Zusätzlich wurde die mAHP als ein M-Strom abhängiger Parameter bestimmt. Nach Umschalten auf den Current-Clamp Modus wurde der injizierte Strom so eingestellt, dass das Ruhemembranpotential ca. -60 mV betrug. Anschließend wurden durch kurze depolarisierende Strompulse einzelne Aktionspotentiale ausgelöst. Den so ausgelösten Aktionspotentialen folgte meistens eine fAHP und eine zwischen 20 und 50 ms andauernde mAHP, gefolgt von einer unterschiedlich langer sAHP (vgl. Abb. 30A). Allerdings war die fAHP nicht immer eindeutig von der mAHP zu unterscheiden (vgl. Abb. 30B).

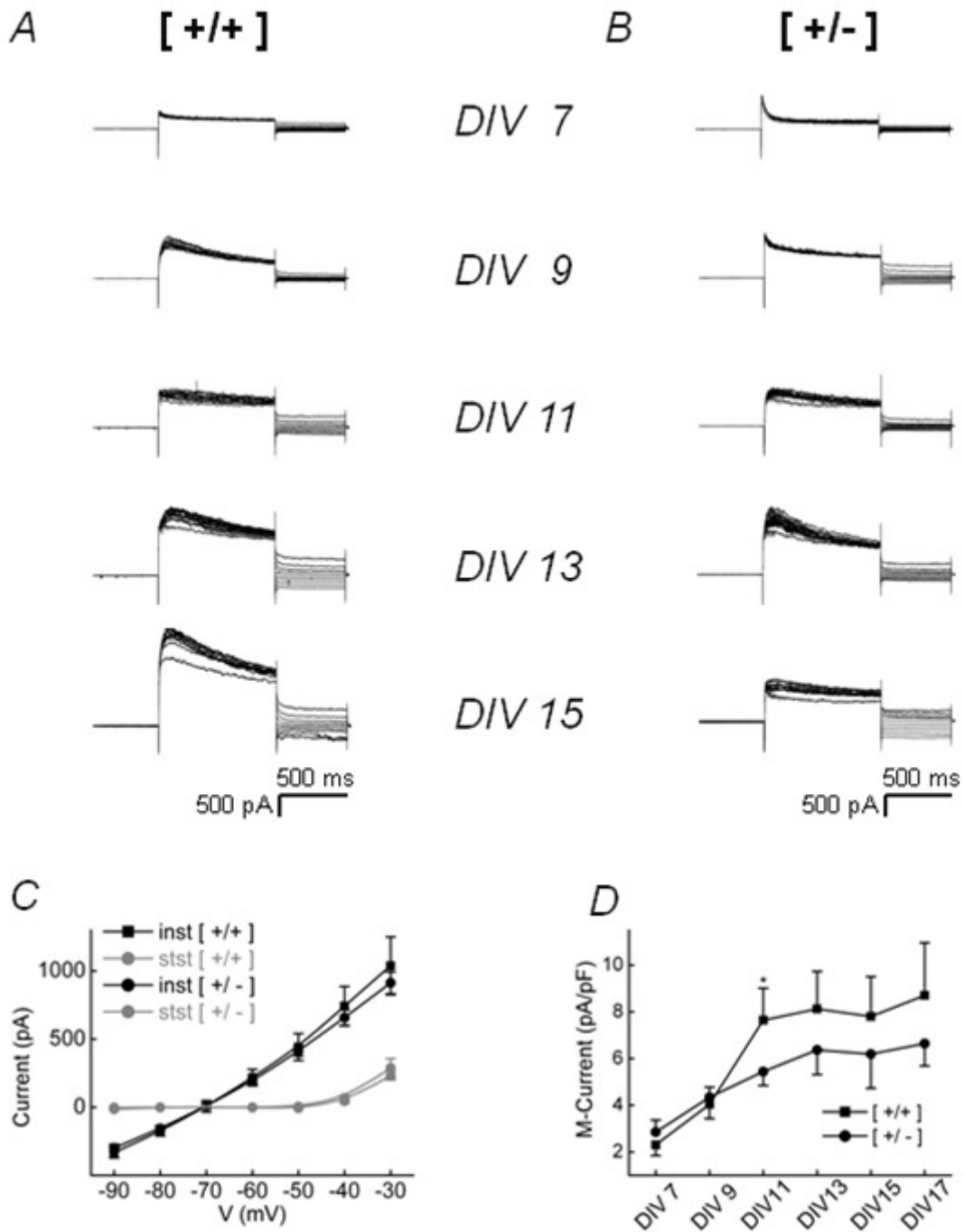


Abb. 29 Entwicklung des M-Stroms

Die Neurone wurden nach dem „klassischen“ M-Stromprotokoll (Adams und Brown, 1980) vom Haltepotential bei -70 mV mit einem 1 s dauernden Puls auf -20 mV depolarisiert. Es folgt ein 600 ms langer Puls zwischen -30 und -120 mV. Zu Beginn der Depolarisation zeigte sich meist ein großer, schnell inaktivierender Auswärtsstrom (A-Strom), der M-Strom wird repräsentiert als Differenz zwischen dem Strom am Anfang und am Ende des zweiten Pulses (vgl. Schweitzer et al., 1993). Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet: $*P < 0.05$.

Die Höhe der mAHP wurde durch Mittelung eines 5 - 10 ms Intervalls nach Ablauf der 5 ms andauernden fAHP bestimmt (vgl. Kap. 2.6.5.3). Tatsächlich zeigte sich eine signifikant geringere mAHP der $[+/-]$ Neurone im Vergleich zu den $[+/+]$ Neurone (Abb. 30C) an DIV 11 und DIV 13. Vor DIV 11 war kein Unterschied zwischen den beiden Neuronenfamilien feststellbar. Die große mAHP an DIV 7 könnte unter Berücksichtigung der geringen M-Stromamplitude, die an DIV 7 gemessen wurde, dadurch zustande kommen, dass der persistierende Natriumstrom (Azouz et al., 1996; Su et al., 2001), welcher als Gegenspieler der M-Kanäle eine ADP hervorrufen, noch nicht ausgebildet ist (vgl. auch Kap. 3.2.4.4).

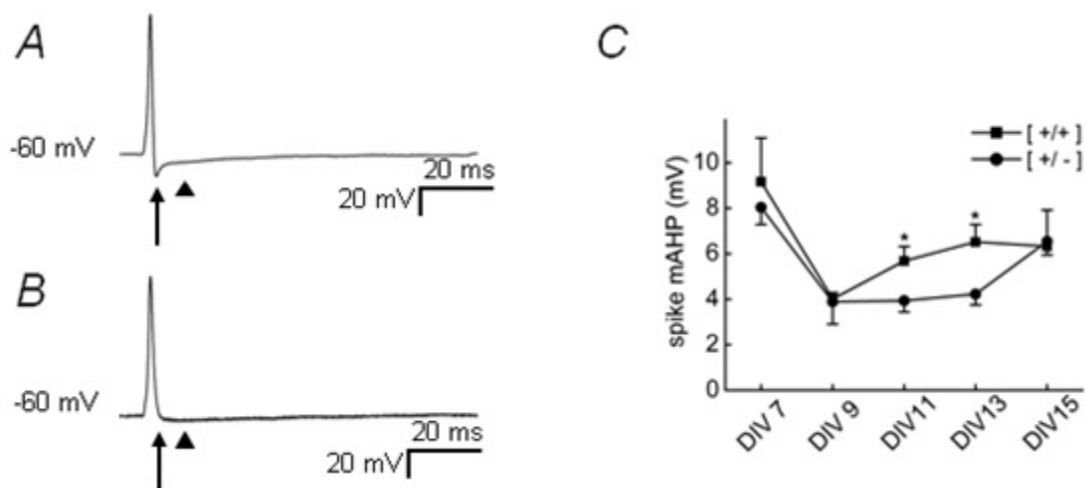


Abb. 30 Entwicklung der mAHP

Von einem Ruhepotential von -60 mV ausgehend wurden durch kurze depolarisierende Strompulse einzelne Aktionspotentiale ausgelöst, beispielhafte Aktionspotentiale für $[+/+]$ (A) und $[+/-]$ (B) Neurone. Die fAHP war nicht immer eindeutig von der mAHP zu unterscheiden. Die Höhe der mAHP wurde durch Mittelung eines 5-10 ms Intervalls nach Ablauf der 5 ms andauernden fAHP bestimmt. C $[+/-]$ Neurone zeigten im Vergleich zu den $[+/+]$ Neuronen an DIV 11 ($n=5-6$) und DIV 13 ($n=5-7$) signifikant geringere mAHP. Vor DIV 11 und nach DIV 13 war kein Unterschied zwischen den beiden Neuronenfamilien feststellbar. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet: $*P<0.05$.

3.2.4.2 Entwicklung der Feuerungsraten

Da ein Unterschied in der M-Stromamplitude und der mAHP festgestellt wurde, stellte sich die Frage nach der Auswirkung auf das Feuerungsverhalten. Nach Umschalten auf den Current-Clamp Modus wurde der injizierte Strom so eingestellt, dass das Ruhemembranpotential ca. -80 mV betrug. Anschließend wurden 500 ms andauernde, depolarisierende Strompulse in 0,025 nA Schritten appliziert und die Anzahl der Aktionspotentiale gezählt. Vergleicht man nun die Anzahl der Aktionspotentiale, die durch Injektion von 0,15 nA hervorgerufen werden, beobachtet man im Verlauf eine Reduktion der Aktionspotentialfrequenz für [+/+] und [+/-] Neurone, wobei jedoch die [+/-] Neurone an DIV 11 und DIV 13 eine signifikant höhere AP-Frequenz bei gleichem injizierten Strom aufwiesen. Nach DIV 15 war kein Unterschied feststellbar (Abb. 31B). Die AP-Frequenz an DIV 7 war nicht zuverlässig bestimmbar, da schon eine geringe Strominjektion AP-Folgen mit abnehmender Amplitude hervorrief, welche nach einigen Aktionspotentialen sistierten. Dieses Phänomen wurde auf ein unreifes Natriumkanalsystem zurückgeführt (vgl. auch Kap. 3.2.4.4). Des Weiteren zeigten [+/+] und [+/-] Neurone an den Tagen DIV 11 (Abb. 31C) und DIV 13 (Abb. 31D) unterschiedliche Antwortverhalten auf die depolarisierenden Strompulse. Neben der höheren maximalen Feuerungsrate zeigten [+/-] Neurone eine Linksverschiebung der „Aktionspotentialantwortkurve“, d.h. der Anzahl an APs auf unterschiedliche depolarisierende Strompulse, was einer höheren neuronalen Erregbarkeit entspricht. Dieses unterschiedliche Antwortverhalten war ab dem Tag DIV 15 nicht mehr feststellbar (Abb. 31E).

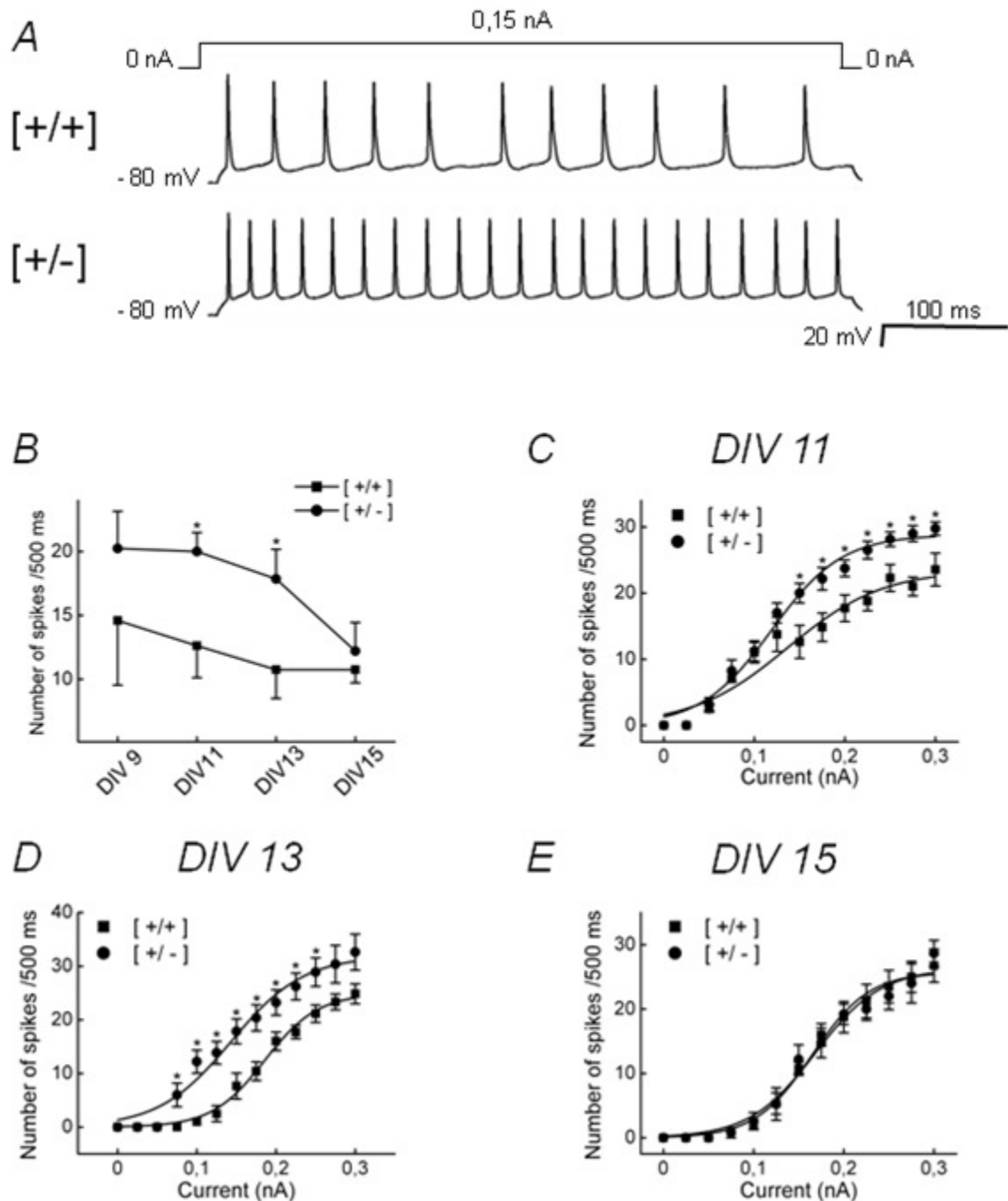


Abb. 31 Entwicklung der Feuerungsrate

Das Haltepotential der Neurone wurde manuell auf -80 mV eingestellt und 500 ms andauernde, depolarisierende Strompulse in 0,025 nA Schritten appliziert. **A** zeigt repräsentative Aufnahmen von +0,15 nA für $+/+$ und $+/-$ Neurone. **B** Die Anzahl der Aktionspotentiale bei +0,15 nA wurden ausgezählt und für verschiedene Tage verglichen. Zwischen DIV 9 und DIV 15 beobachtet man im Verlauf eine Reduktion der Aktionspotentialfrequenz für $+/+$ und $+/-$ Neurone, wobei die $+/-$ Neurone an DIV 11 ($n=7-8$) und DIV 13 ($n=7-9$) eine signifikant höhere AP-Frequenz zeigten. Nach DIV 15 war kein Unterschied feststellbar. Neben der höheren maximalen Feuerungsrate zeigten $+/-$ Neurone eine Linksverschiebung der Aktionspotentialantwortkurve auf depolarisierende Strompulse für die Tage DIV 11 (**C**, $n=7-8$) und DIV 13 (**D**, $n=7-9$), was einer höheren neuronalen Erregbarkeit entspricht. Dieses unterschiedliche Antwortverhalten war ab dem Tag DIV 15 nicht mehr feststellbar (**E**). Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet: $*P<0.05$.

3.2.4.3 Unterschiede in der Aktionspotentialadaptation

Den Eigenschaften des M-Stroms entsprechend wird angenommen, dass die mAHP für die AP-Adaptation verantwortlich ist, d.h. die maximale Feuerungsrate eines konstant feuernenden Neurons limitiert. Diese Adaptation zeigt sich in einer Zunahme des Intervalls zwischen den Aktionspotentialen (*engl.* interspike interval, ISI) (Gu et al., 2005). Zur Bestimmung der ISI wurden 200 ms andauernde Strompulse so gewählt, so dass genau 8 Aktionspotentiale ausgelöst wurden (Abb. 32A). Anschließend wurden die Intervalle zwischen den APs bestimmt. Tatsächlich zeigten $[+/-]$ Neurone neben signifikant längeren ISIs eine stärkere Zunahme der ISI von AP zu AP, was als Adaptation zu deuten ist. Des Weiteren beobachtet man am Ende solcher AP-Salven eine kumulative mAHP, die von der Anzahl der ausgelösten APs abhängt. Eine fAHP fehlt nach solchem Messprotokoll (Lancaster et Nicoll, 1987; Storm, 1989). Auch ein Vergleich dieser mAHP liefert eine signifikante Reduktion der mAHP bei $[+/-]$ Neuronen (Abb. 32B).

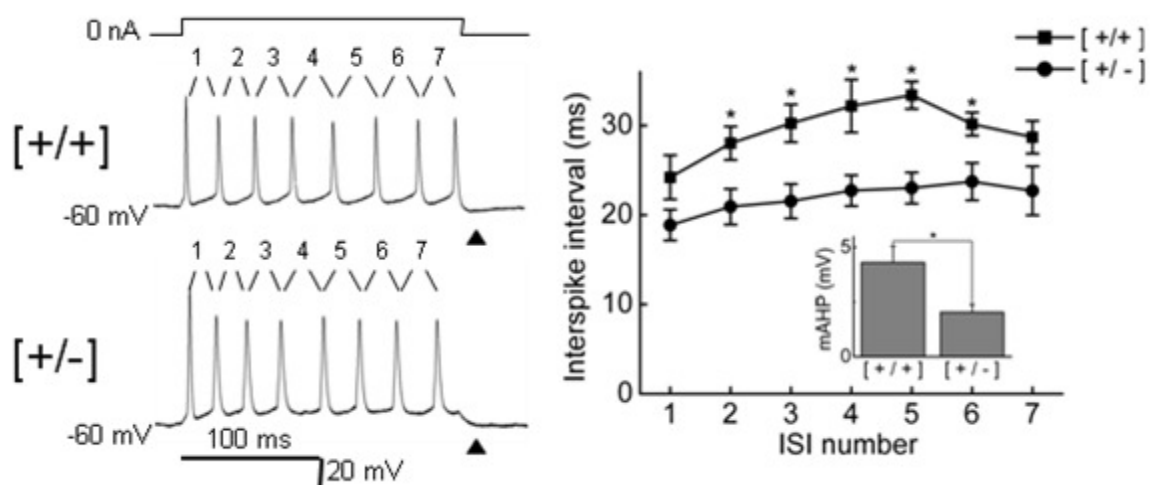


Abb. 32 Unterschiede in der Adaptation (DIV 13)

Zur Bestimmung der ISI wurden am Tag DIV 13 200 ms andauernde Strompulse so gewählt, dass genau 8 Aktionspotentiale ausgelöst wurden (A). Anschließend wurden die Intervalle zwischen den AP-Maximals bestimmt. $[+/+]$ Neurone zeigten neben signifikant längeren ISIs eine stärkere Zunahme der ISI von AP zu AP ($n=5-6$), was als Adaptation zu deuten ist (B). Am Ende solcher AP-Salven beobachtet man eine mAHP ($\blacktriangle$). Ein Vergleich dieser mAHP liefert eine signifikante Reduktion der mAHP bei $[+/-]$ Neuronen ($n=5-6$). Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet: $*P < 0.05$.

3.2.4.4 Entwicklung anderer Natrium- und Kaliumströme

Die Auswertung der AP-Form zeigte eine Zunahme der Aktionspotentialhöhe, eine leichte Verkürzung der Depolarisationszeit, eine Reduktion der Aktionspotentialbreite und eine Beschleunigung der Repolarisation im Verlauf der Entwicklung, was als Hinweis auf eine Entwicklung des Natriumkanalsystems *in vitro* gewertet werden kann. Um dies zu bestätigen wurden der als Natriumstrom gedeutete, schnelle, einwärts gerichtete Strom ausgewertet (Bahrey et al., 2002), der im Rahmen des „klassischen M-Stromprotokolls“ (siehe Kap. 2.6.5.3) bei der Depolarisation vom Haltepotential bei -70 mV auf -20 mV auftritt (Abb. 33A). Dabei zeigt sich eine kontinuierlich Zunahme der Stromamplitude zwischen DIV 7 und DIV 13, ohne dass signifikante Unterschiede zwischen [+/+] und [+/-] Neuronen festgestellt wurden (Abb. 33C). Da der persistierende Natriumstrom der Gegenspieler des M-Stroms bei der Ausbildung der mAHP in hippocampalen Pyramidenzellen ist (Yue et al., 2004), hätte eine veränderte Entwicklung dieses Stroms in [+/+] und [+/-] Neuronen die späte Angleichung der mAHP erklären können. Durch diese Ergebnisse wird dies jedoch eher unwahrscheinlich. Allerdings kann die Zunahme des vermeintlichen Natriumstroms die Zunahme der AP-Amplitude und die Verkürzung der AP-Aufstrichszeit erklären (vgl. Abb. 14).

Wie unter Kap. 1.2 beschrieben, wurden in hippocampalen Neuronen weitere Kaliumströme beschrieben, die sich nach Depolarisation als transiente Auswärtströme zeigen (Storm, 1990; Nerbonne et al., 2008). Eine elegante und einfache Möglichkeit ist die Unterscheidung der Ströme entsprechend ihrer Deaktivierungszeitkonstanten (siehe Kap. 2.6.5.3). Hierzu wurden die Neurone von einem Haltepotential von -80 mV ausgehend mit einem 2s andauernden Puls auf +30 mV depolarisiert. Es zeigte sich ein Auswärtstrom mit schneller und langsam abfallender Komponenten. Es lies sich meist eine Exponentialfunktion dritter Ordnung an den Strom anpassen. Die schnelle Komponente ($\tau_{\text{decay}} \sim 30$ ms) wird dem A-Strom (I_A) zugeschrieben (Kang et al., 2000; Yuan et al., 2005; Nerbonne et al., 2008). Die mittlere Zeitkonstante ($\tau_{\text{decay}} \sim 200$ ms) wird als Komponente des D-Stroms (I_D) betrachtet (Storm, 1987 und 1990; Locke et al., 1997; Yuan et al., 2005; Nerbonne et al., 2008). Schließlich gilt die langsamste Komponente ($\tau_{\text{decay}} \sim 1$ s) als I_K vermittelt (Nerbonne et al., 2008). Für

DIV 13 ergaben sich für $[+/+]$ Neurone $42,6 \pm 12,3$ ms, $144,8 \pm 9,6$ ms und $1293,3 \pm 144,3$ (n=4) und für $[+/-]$ Neurone $32,5 \pm 5,5$ ms, $163,5 \pm 24,1$ ms und $1087,4 \pm 207,4$ (n=6), so dass angenommen werden kann, dass es sich hierbei um die Ströme I_A , I_D und I_K handelt. Allerdings war die Unterscheidung zwischen I_A und I_D z.T. sehr schwierig, so dass zur einfacheren Analyse die Differenz zwischen initialer Stromamplitude und Stromniveau am Ende des depolarisierenden Pulses auf +30 mV als Maß für den gesamten transienten Kaliumstrom genommen wurde (Abb. 33C). Hierbei zeigte sich im Verlauf eine geringe Entwicklung der Gesamtamplitude der transienten Kaliumströme und v.a. kein signifikanter Unterschied zwischen $[+/+]$ und $[+/-]$ Neuronen (vgl. Bahrey et Moody et al., 2002), womit eine Hochregulation dieser Kanäle als Kompensationsmechanismus des $K_v7.2$ Ausfalls eher unwahrscheinlich ist (Abb. 33D).

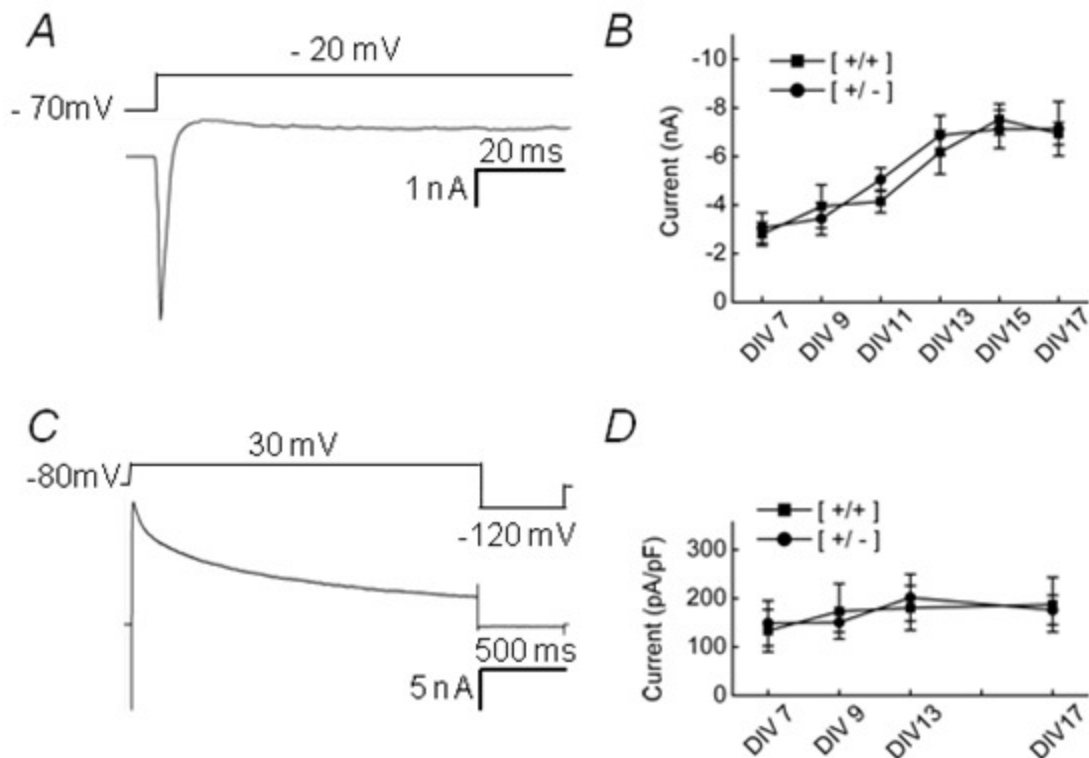


Abb. 33 I_{Na} und I_{tK}

A zeigt das gleiche Neuron wie in Abb. 29A (DIV 11) mit anderer Zeitskalierung. Man beachte den schnellen, einwärts gerichteten Strom. **B** Im Verlauf zeigt sich eine Zunahme der Stromamplitude dieses Stroms. **C** Die Depolarisation auf +30 mV produziert einen transienten Kaliumstrom, an den eine Exponentialfunktion dritten Grades angepasst werden kann (I_A , I_D , I_K). **D** Die Differenz zwischen initialer Amplitude und finalem Stromniveau zeigt im Verlauf keine Veränderung. Es konnten keine signifikante Unterschiede zwischen $[+/+]$ und $[+/-]$ Neuronen festgestellt werden. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt.

3.2.4.5 H-Strom

Es wird schon lange diskutiert, dass auch HCN/H-Kanäle an der mAHP v.a. bei hyperpolarisierten Haltepotentialen beteiligt sein könnten (Storm, 1989; Williamson et al., 1990; Maccaferri et al., 1993; Gu et al., 2005). So konnte gezeigt werden, dass die mAHP bei -80 mV nicht auf M-Kanäle zurückzuführen ist und dass der selektive H-Kanalblocker ZD7288 lediglich bei einem Haltepotential von -80 mV, jedoch nicht bei -60 mV, einen Effekt auf die mAHP hat (Gu et al., 2005).

Nach manueller Einstellung des Ruhepotentials auf -80 mV wurden durch kurze depolarisierende Strompulse einzelne Aktionspotentiale ausgelöst. Während die Neurone bei einem Haltepotential von -60 mV eine mAHP zeigten (

Abb. 30), folgte den Aktionspotentialen bei -80 mV eine ADP. Dieser Wechsel zeigte sich bei allen untersuchten Neuronen (Abb. 34A). Dabei konnte bei Neuronen, die bei -60 mV eine ausgeprägte fAHP zeigten, ebenfalls eine fAHP bei -80 mV beobachtet werden (Abb. 34B). Bei Neuronen ohne ausgeprägte fAHP geht die Repolarisationsphase der Aktionspotentiale in eine ADP über (Abb. 34A). Zur Quantifizierung wurde mit Hilfe der Clampfit Software die Fläche unterhalb der ADP bestimmt (vgl. Kap. 2.6.5.3). Unerwarteterweise zeigten die $[+/-]$ Neurone im Vergleich zu $[+/-]$ Neuronen eine zunehmend geringere ADP, was mit einer niedrigeren Exzitabilität einhergeht (Abb. 34C). Allerdings würde eine Reduktion des M-Stroms eine Zunahme der ADP erwarten lassen. Davon ausgehend, dass die mAHP/ADP bei diesem Membranpotential v.a. auf H-Kanäle zurückzuführen ist, könnte die Abnahme der ADP auf eine Hochregulierung der H-Kanäle hindeuten. Tatsächlich konnten an DIV 13 in ca. 40 % aller gemessenen $[+/-]$ Neurone eine Senkung der M-Kanaldeaktivierungskurve bei stark negativen Potentialen beobachtet werden (Abb. 34D), welche durch die Aktivierung von H-Kanälen zustande kommt (Schweitzer et al., 1993). Allerdings fiel die H-Strom typische Absackung (*engl.* „sag“) in den Current-Clamp Experimenten (Gu et al., 2005) sehr klein aus, so dass keine genaue Aussage über die Hochregulation des H-Stroms gemacht werden kann. Hierzu sind weitere Experimente erforderlich.

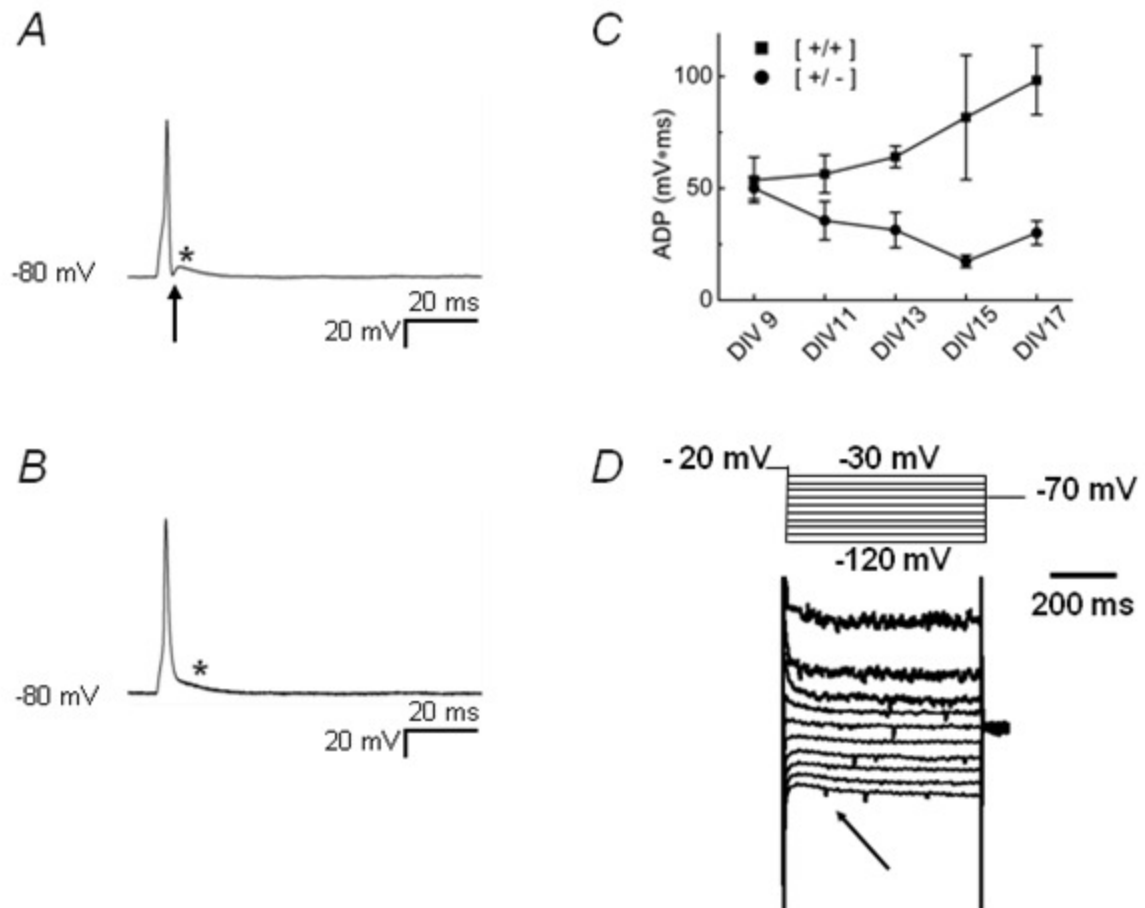


Abb. 34 H-Strom

Bei einem Ruhepotential von -80 mV wurden einzelne Aktionspotentiale für [+/+] (**A**) und [+/-] (**B**) Neurone ausgelöst (gezeigt werden die gleiche Neurone wie in (Abb. 30). Aus der mAHP bei -60 mV wurde eine ADP (*), die fAHP (†) blieb unverändert. Die Fläche der ADP wurde mit Hilfe der Clampfit Software berechnet. **C** Unerwarteterweise zeigten [+/-] Neurone im Gegensatz zu [+/+] Neurone eine zunehmende Abnahme der ADP im Verlauf. **D** Tatsächlich konnte an DIV 13 in ca. 40% aller gemessenen [+/-] Neurone eine Senkung der M-Kanaldeaktivierungskurve bei stark negativen Potentialen beobachtet werden (†). Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede in der Exzitabilität zwischen [+/+] und [+/-] Neuronen äußerst gering ausfallen. Diese Befunde passen zur Beobachtung, dass heterozygote Knock-Out Mäuse -außer einer erhöhten Anfälligkeit für pharmakologisch induzierte epileptische Anfälle- einen unauffälligen Phänotyp aufweisen. [+/+] und [+/-] Neurone zeigen eine ähnliche morphologische Entwicklung und auch die Basisparameter Kapazität, Eingangswiderstand, Ruhepotential und Form der Aktionspotentiale stimmen in den ersten zwei Wochen in Kultur überein. Auch die Entwicklung der Natrium- und der transienten Kaliumströmen durchläuft eine äquivalente Entwicklung in beiden Neuronengruppen. Tatsächlich zeigten [+/-] Neurone eine reduzierte M-Stromamplitude, doch lediglich an den Tagen DIV 11 und DIV 13 konnte ein

signifikanter Unterschied der mAHP Amplitude festgestellt werden. Dies spiegelt sich in einer erhöhten neuronalen Erregbarkeit der $[+/-]$ Neurone an diesen Tagen wieder, die sich in einer erhöhten Feuerungsrate mit reduzierten ISIs und linksverschobener AP-Antwortkurve nach depolarisierenden Strompulsen äußerte. Als Beispiel einer vollständigen Haploinsuffizienz war dieses Verhalten der $[+/-]$ Neurone zu erwarten (Jentsch, 2000). Ab DIV 15 waren die Unterschiede zwischen den beiden Neuronenfamilien jedoch aufgehoben. Zusammen mit den überraschenden Ergebnissen bzgl. der ADP Entwicklung bei -80 mV könnte dies ein Hinweis dafür sein, warum BFNS Anfälle auf die Perinatalperiode limitiert sind.

3.2.5 Unterschiede zwischen $[+/-]$ und $[-/-]$ Neuronen

Schon lange wird angenommen, dass eine Reduktion der $K_v7.2$ Expression jenseits der Haploinsuffizienz im Sinne einer dominant-negativen Mutation potentiell zu einem erweiterten Phänotyp führt (Jentsch, 2000). Neuronen von homozygote $KCNQ2$ Knock-Out $[-/-]$ Mäusen entsprechen einer Situation bei totaler dominant-negativer Wirkung einer $K_v7.2$ Mutation. So interessierte uns, ob $[-/-]$ Neurone durch den kompletten Verlust der $K_v7.2$ Untereinheit andere elektrophysiologische Eigenschaften entwickeln als $[+/-]$ Neurone, die eine Haploinsuffizienz aufweisen.

Die ersten Beobachtungen bzgl. der Entwicklung der Morphologie und der Basisparameter Zellkapazität, Eingangswiderstand und AP-Parameter zeigten eine vergleichbare Entwicklung der $[-/-]$ Neurone im Vergleich zu $[+/+]$ und $[+/-]$ Neurone. Erwartungsgemäß sollte eine komplette Ausschaltung der $K_v7.2$ Untereinheit zu einer weiteren Reduktion des M-Stroms im Vergleich zu $[+/-]$ Neuronen und zu einer weiteren Zunahme der neuronalen Erregbarkeit führen. Tatsächlich konnte eine Reduktion der M-Stromamplitude nachgewiesen werden, die allerdings lediglich für den Tag DIV 10 statistisch signifikant war. Im Gegensatz zu den $[+/+]$ und $[+/-]$ Neuronen zeigten $[-/-]$ Neurone jedoch keine progrediente Zunahme des M-Stroms (Abb. 35C). Dementsprechend zeigte die Analyse der mAHP eine signifikante Reduktion der mAHP Amplitude an den Tagen DIV 10 und DIV 12 im Vergleich zu $[+/-]$ Neuronen. Auch hier fehlte die Zunahme der Amplitude im Laufe der zweiten Woche in Kultur (Abb. 35D).

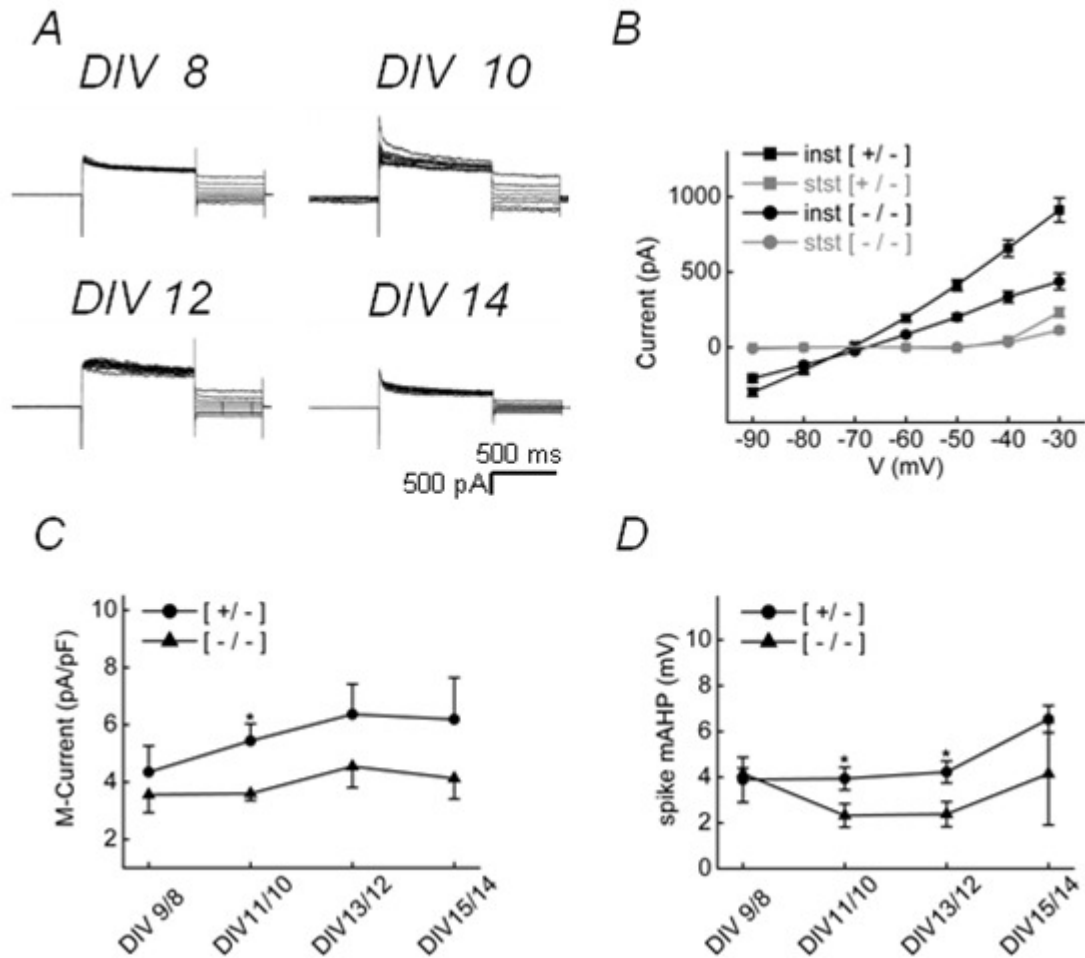


Abb. 35 M-Strom bei $[-/-]$ Neuronen

A zeigt beispielhafte Ströme von $[-/-]$ Neuronen nach M-Stromprotokoll. **B** Strom-Spannungs-Beziehungen der Stromamplitude zu Beginn (*inst*, instantaneous) und der Leckstrom korrigierte (leak-subtracted) Strom gegen Ende (*stst*, steady-state) des repolarisierenden zweiten Pulses. Der Schnittpunkt dieser Kurven entspricht dem Umkehrpotential des M-Stroms. Die Fläche zwischen den Kurven ist ein Maß für den M-Strom. **C** Bei -40 mV zeigen $[-/-]$ Neurone ($n=3-7$) ab DIV 8 geringere M-Stromamplituden als $[+/-]$ Neurone ($n=5-9$). **D** Die mAHP am Ende von einzelnen APs war für die Tage DIV 10 ($n=5-7$) und DIV 12 ($n=5-6$) für $[-/-]$ im Vergleich zu $[+/-]$ signifikant reduziert. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ S.E.M. dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit (*) gekennzeichnet: $*P<0.05$.

Durch die weitere Reduktion des M-Stroms und der mAHP erwartet man eine Zunahme der neuronalen Exzitabilität. Allerdings zeigte der Vergleich der AP-Frequenzen, welche sich bei Injektion von +0,15 nA einstellen, keinen Unterschied zwischen $[+/-]$ und $[-/-]$ Neuronen (Abb. 35A). Auch die AP-Antwortkurven auf depolarisierende Strompulse für die Tage DIV 10, DIV 12 und DIV 14 ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen $[+/-]$ und $[-/-]$ Neuronen (Abb. 36B-D).

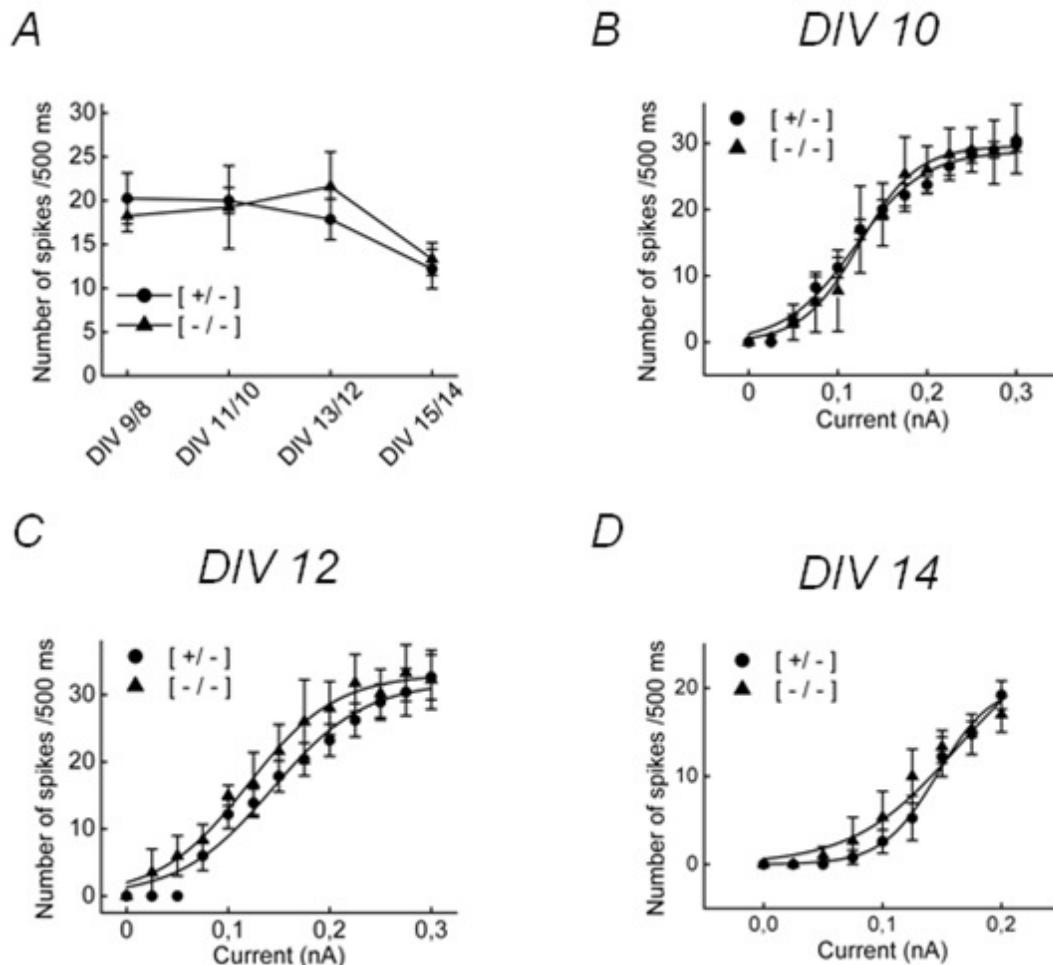


Abb. 36 Feuerungsverhalten von [-/-] Neuronen

Sowohl die Aktionspotentialfrequenz bei +0,15 nA (**A**) als auch die AP-Antwortkurve auf depolarisierende Strompulse an den Tagen DIV 10 (**B**), DIV 12 (**C**) und DIV 14 (**D**) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen [-/-] (n=4-5) und [+/-] (n=7-9) Neuronen, so dass nicht von einer erhöhten neuronalen Erregbarkeit ausgegangen werden kann.

Zusammenfassend zeigen [-/-] Neurone eine den [+/-] und [+/+] Neurone entsprechende morphologische Entwicklung und auch die Basisparameter Kapazität, Eingangswiderstand, Ruhepotential und Form der Aktionspotentiale stimmen in den ersten zwei Wochen in Kultur weitestgehend überein. Das ist insofern interessant, da bekannt ist, dass homozygote KCNQ2 Knock-Out Mäuse letal sind (Watanabe et al., 2000). Dennoch sind [-/-] Neurone ein interessantes Untersuchungsobjekt, um die Effekte einer möglichen $K_{v7.2}$ Mutation mit vollständiger dominant-negativer Wirkung zu untersuchen. Tatsächlich zeigen [-/-] Neurone im Vergleich zu [+/-] Neuronen eine weitere Reduktion des M-Stroms und der mAHP. Allerdings scheint dies unerwarteterweise nicht zu einer Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit zu führen. So ist das Feuerungsverhalten der Neurone beider Mäuselinien im Hinblick auf die absolute Anzahl an APs als auch im Antwortverhalten auf depolarisierende Pulse vergleichbar.

4 DISKUSSION

4.1 Die N258S Mutation

Mutationen der $K_v7.2$ und $K_v7.3$ Kaliumkanäle führen zu einer idiopathischen Epilepsieform des Neugeborenenalters (benigne familiäre neonatale Konvulsionen, BFNS) (Bievert et al., 1998). Mittlerweile sind über 30 BFNS Mutation in fast allen Bereichen des $K_v7.2$ Kanals entdeckt worden (Maljevic et al., 2008). Bei diesen handelt es sich um Missense-, Nonsense-, Insertions- und Spleiss-Stellen-Mutationen, die alle zu einer Reduktion des resultierenden Kaliumstroms führen. N258S ist nun die erste missense Mutation des $K_v7.2$ Kanals zwischen der S5 Domäne und der Porenregion. Diese Mutation ist bei drei Mitgliedern einer türkischen Familie mit BFNS typischen Anfällen am dritten Lebenstag entdeckt worden (Yalcin et al., 2007). Die Bedeutung der Aminosäurenposition 258 wird durch die Konservierung in humanen $K_v7.4$, $K_v7.5$, in $K_v7.2$ von Ratten und in $K_v7.2$ und $K_v7.5$ Untereinheiten in Mäusen unterstrichen (Abb. 37). Aufgrund der Nähe zur porenbildenden Proteinregion lag zunächst eine Beeinträchtigung der Kanalleitfähigkeit oder dem Kanalschaltverhalten nahe.

Sequenz	Gen	Spezies
SFLVYLAEKGEN N DHFDTYADALWWGLITLT	KCNQ2	Homo sapiens
SFLVYLAEKDAN S DFSSYADSLWW	KCNQ4	Homo sapiens
SFLVYLAEKGEN N DHFDTYADALWWGLITLT	KvEBN1	Homo sapiens
SFLVYLVEKDAN K EFSTYADALWWGTITLT	KCNQ5	Homo sapiens
SFLVYLAEKGEN N DHFDTYADAL	KCNQ2	Rattus norvegicus
SFLVYLAEKGEN N DHFDTYADALWWGLITLT	KCNQ2	Mus musculus
SFLVYLVEKDAN K EFSTYADALWWGTITLT	KCNQ5	Mus musculus
SFLVYLCEKNT N DKYQTFADALWWGVITL	kqt-1	C. elegans

Abb. 37 Konservierung der Aminosäurenposition 258 (aus Yalcin et al., 2007).

4.1.1 Pathophysiologischer Mechanismus der N258S Mutation

Unsere Experimente lassen nun den Schluss zu, dass der Pathomechanismus, wodurch die N258S Mutante zu BFNS führt, eine Störung des post-translationalen Transports des Proteins (*engl.* trafficking defekt) ist. Homomere N258S Kanäle führen in beiden untersuchten Expressionssystemen, CHO Zellen und Xenopus Oozyten, zu sehr kleinen Kaliumströmen. Im Gegensatz dazu führt eine Koexpression mit der K_v7.3 Untereinheit oder eine Expression in Fusionsproteinen zu einem Kaliumstrom, der ein ähnliches Verhalten zu den entsprechenden WT Strömen zeigt (Wang et al., 1998; Selyanko et al., 2000) und auch ähnliche Einzelkanaleigenschaften mit den entsprechenden WT Kanälen hat (Selyanko et al., 2001; Li et al., 2004a, b), jedoch eine auf die Hälfte reduzierte Amplitude aufweist.

Des Weiteren konnte der N258S vermittelte Kaliumstrom durch eine Erniedrigung der Inkubationstemperatur (*engl.* temperature rescue) und durch Inkubation mit dem K_v7.2 Kanalöffner Retigabin (*engl.* pharmacological rescue) partiell wiederhergestellt werden. Die Phänomene des „temperature rescue“ und „pharmacological rescue“ sind bekannt und gut untersucht für Mutationen der hERG Kaliumkanalfamilie, die mit den K_v7.2 Kanälen eng verwandt sind (Zhou et al., 1999; Gong et al. 2004; Gong et al. 2005), aber sie sind bisher nicht für Mutationen des K_v7.2 Kanals gezeigt worden. Es wird angenommen, dass eine reduzierte Inkubationstemperatur Zwischenstufen der post-translationalen Proteinfaltung und Kanalblocker, welche in der Nähe der intrazellulären Porenöffnung binden, wo die vier Untereinheiten eines funktionellen Kanals interagieren, die oligomere Proteinintegrität stabilisieren können (Robertson et January, 2006).

In Anlehnung an diese Beobachtungen zeigte die N258S Mutation, als bisher vierte K_v7.2 Mutation (Dedek et al., 2001; Singh et al., 2003; Wuttke et al., 2007) einen dominant-negativen Effekt auf den WT Strom. Demzufolge könnte die N258S Mutation eine Störung der post-translationalen Proteinfaltung auslösen. Die falsch gefalteten homomere N258S Kanäle haben demnach Schwierigkeiten ihren Weg an die Membranoberfläche zu finden. Gleichzeitig scheint der Einbau

der N258S Untereinheit in heteromeren Kanäle mit funktionellen $K_v7.2$ WT Untereinheiten dazu zu führen, dass auch die WT Untereinheiten zum Teil im ER zurückgehalten werden.

Die richtige Konformation wird wahrscheinlich durch eine Assoziation mit $K_v7.3$ Untereinheiten zu etwa 50% wiederhergestellt, was sowohl bei Koexpression als auch bei Expression in Fusionsproteinen durch einen entsprechenden Anstieg der Stromamplitude suggeriert wird. Des Weiteren könnte die Konformationskorrektur durch eine Reduktion der Inkubationstemperatur oder bei Inkubation mit dem $K_v7.2$ Kanalöffner Retigabin, jedoch nicht mit dem $K_v7.2$ Kanalblocker XE991, ausgelöst werden. Im Gegensatz zu Retigabin, welches in der Nähe der intrazellulären Porenöffnung bindet (Schenzer et al., 2005; Wuttke et al., 2005), soll das Linopirdin-Analogon XE991 extrazellulär binden (Costa et Brown, 1997; Lamas et al., 1997). Allerdings sind weitere Studien notwendig, um den genauen biochemischen und strukturellen Mechanismus zu identifizieren.

Bei der Ontogenese von Ionenkanälen scheint der Vorgang der Glykosylierung, der im Endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi Apparat stattfindet, eine wichtige Rolle sowohl bei der Proteinfaltung und -stabilität als auch beim Transport und dem Umsatz des Kanals an der Zellmembran zu spielen (Lennarz, 1983). In einer Vielzahl von spannungsabhängigen Kaliumkanälen ist eine Glykosylierung beschrieben worden. So haben $K_v1.1$, $K_v1.2$ und $K_v1.4$ Untereinheiten eine Glykosylierungsstelle in der extrazellulären Schleife zwischen den Domänen S1 und S2 (Shin et Trimmer, 1999). Für $K_v1.4$ konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der N-Glykosylierung die Proteinstabilität beeinflusst und über eine verstärkte Retention der Untereinheiten zu einer reduzierten Oberflächenexpression führt (Watanabe et al., 2004). HCN Kanäle, welche eine ähnliche Struktur wie K_v7 Kanäle aufweisen, haben eine Glykosylierungsstelle in der extrazellulären Schleife zwischen S5 und der Porenregion (Much et al., 2003). Das Fehlen der Glykosylierung führte dazu, dass die Oberflächenexpression der HCN Untereinheit unterbunden wurde. Die Oberflächenexpression war auch bei der N380Q Mutation des HCN2 Kanals gestört, die die potentielle Glykosylierungsstelle zwischen S5 und der Porenregion betrifft. Interessanterweise konnte die Oberflächenexpression der N380Q Mutation des

HCN2 Kanals durch eine Koexpression in Heteromeren mit der WT HCN2 Untereinheit teilweise wiederhergestellt werden (Much et al., 2003). Diese auffälligen Parallelen zur N258S Mutation suggerieren, dass der Wegfall einer Glykosylierungsstelle dem Verhalten der N258S Mutation zugrunde liegen könnte.

4.1.2 Der dominant-negative Effekt der N258S Mutation

Da eine relativ kleine Änderung des $K_{V7.2}$ vermittelten Kaliumstroms anscheinend ausreichend ist, um epileptische Anfälle in der Neugeborenenperiode auszulösen (Schroeder et al., 1998), wird angenommen, dass dominant-negative Mutationen einen erweiterten Phänotyp aufweisen könnten (Jentsch, 2000). Tatsächlich sind homozygote KCNQ2 Knock-Out Mäuse letal, jedoch versterben die neugeborenen Mäuse an pulmonalen Atelektasen. Neuronale Strukturveränderungen konnten keine festgestellt werden (Watanabe et al., 2000).

Bisher sind drei dominant-negative Mutationen der $K_{V7.2}$ Untereinheit beschrieben worden. Dabei betreffen zwei dieser Mutationen die gleiche Arginingruppe an Position 207 innerhalb des S4 Segments, welcher als Spannungssensor der K_V7 Kanäle dient (Dedek et al., 2001; Wuttke et al., 2007). Die funktionelle Expression dieser mutierten Untereinheiten zeigte für beide Kanäle eine starke Rechtsverschiebung der Leitfähigkeits-Spannungskurve mit auffälliger Verlangsamung der Aktivierungsparameter im Vergleich zu WT Kanälen. Bei der Koexpression dieser mutierten Untereinheiten mit WT Untereinheiten zeigte sich eine >70%ige Reduktion der Stromamplitude im Subschwellenbereich (Dedek et al., 2001; Wuttke et al., 2007), was als dominant-negativer Effekt bezeichnet wird. Interessanterweise zeigen Patienten mit den dominant-negativen R207W Mutationen (Dedek et al., 2001) neben den typischen BFNS Anfälle auch PNH (Syn. *engl.* Peripheral Nerve Hyperexcitability). PNH ist klinisch charakterisiert durch spontane, wellenförmige Bewegung der distalen Skelettmuskulatur, Faszikulationen und Krämpfe als Zeichen einer Hyperexzitabilität der peripheren Motoneurone (Hart et al., 2002). Eine häufige Ursache sind Autoimmunantikörper gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle (autoimmune PNH) (Hart et al., 2002). Der einzige Betroffene der zweiten dominant-negativen Mutation an Position 207 der $K_{V7.2}$ Untereinheit (R207Q) zeigt lediglich Symptome einer PNH jedoch keine Anfälle (Wuttke et al., 2007). Die

dritte dominant-negative Mutation ist gekennzeichnet durch eine Insertion von fünf Basenpaaren am Ende des C-Terminus, fünf Aminosäuren vor dem WT Stopkodon (Singh et al., 2003). Bemerkenswerterweise zeigen Betroffene dieser Mutation lediglich BFNS Symptome ohne PNH. Im Gegensatz dazu zeigten die Mitglieder der N258S Familie typische kurze epileptische Anfälle in den ersten Tagen nach der Geburt, jedoch ohne persistierende Anfälle oder PNH zu einem späteren Zeitpunkt oder andere klinische Auffälligkeiten (Yalcin et al., 2007). Unsere Experimente suggerieren einen instabilen Zustand des mutierten Kanalproteins, welcher durch geringe Unterstützung z.B. durch Expression mit K_v7.3 oder durch Reduktion der Inkubationstemperatur in die korrekte Konformation überführt werden kann. So könnte die geringe Auswirkung der N258S Mutation in vivo -trotz dominant-negativen Effekt- auf eine post-translationale Prozessierung oder Unterstützung durch Chaperone zurückzuführen sein, welche die korrekte Faltung des Proteins ermöglichen. Die Beobachtung, dass die Differenz der Stromamplituden zwischen den WT und N258S Koexpressionen mit K_v7.3 in *Xenopus* Oozyten größer ist als in CHO Zellen, könnte darauf hinweisen, dass in Säugetierzellen ähnliche Prozesse vorhanden sind.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Phänotypen dominant-negativer K_v7.2 Mutationen könnte eine Kompensation durch andere Kanäle sein. So ist für A-Strom Knock-out Mäuse bekannt, dass ein kompletter Verlust des A-Stromes durch Hochregulation anderer Kanäle kompensiert werden kann (Nerbonne et al., 2008). Diese Möglichkeit wird jedoch im Zusammenhang mit den Experimenten an KCNQ2 Knock-Out Mäusen näher erläutert werden. Des Weiteren könnte eine unterschiedliche genetischer Umgebung eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Phänotypen sein.

4.2 Die elektrophysiologische Charakterisierung kultivierter fetaler hippocampaler Neurone von KCNQ2 Knock-Out Mäusen

Trotz intensiver Erforschung der BFNS-assoziierten $K_{V7.2}$ und $K_{V7.3}$ Mutationen ist immer noch ungeklärt, warum es zum spontanen Sistieren der Anfälle nach den ersten Wochen bis Monaten der Neonatalperiode kommt. Obwohl es bisher keine konkreten Hinweise auf den zugrundeliegenden Mechanismus gibt, werden einige Möglichkeiten diskutiert (Burgess, 2005; Maljevic et al., 2008). Einerseits könnte eine Veränderung des Expressionsmuster der $K_{V7.2}$ und $K_{V7.3}$ Kanäle die Ursache für den transienten Phänotyp bei BFNS sein. So nimmt die Expression von heteromeren $K_{V7.2}/K_{V7.3}$ Kanälen innerhalb der ersten drei postnatalen Wochen in Mäusegehirnen stark zu (Geiger et al. 2006; Weber et al. 2006; Maljevic et al. 2007). Davon ausgehend, dass eine Mindestmenge an M-Kanälen für die regulatorische Wirkung auf die neuronale Erregbarkeit notwendig ist, könnte in der Neonatalperiode schon eine geringe Reduktion des M-Stroms, welcher sich zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung auf einem sehr niedrigen Niveau befindet, ausreichen, um Anfälle bei Neugeborenen auszulösen. Andererseits könnte eine Hochregulation von anderen Kaliumkanälen, insbesondere alternativer K_{V7} Untereinheiten oder Spleissvarianten, eine Kompensation bewirken. Eine weitere These basiert auf der Beobachtung, dass GABA als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter des reifen Gehirns in der frühen neuronalen Entwicklung exzitatorisch wirkt (Rivera et al., 1999). So könnte die Bedeutung des M-Stroms bei der Regulation der neuronalen Exzitabilität im Rahmen der physiologischen Reifung des Gehirns zu Gunsten des inhibitorischen System um GABA abnehmen (Okada et al., 2003).

Wir versuchten durch die Untersuchung von kultivierten hippocampalen Neuronen fötaler heterozygoter KCNQ2 Knock-Out Mäuse [+/-], mögliche Unterschiede in der Entwicklung der elektrophysiologischen Eigenschaften im Sinne eines Kompensationsmechanismus zu entdecken. So ist bekannt, dass [+/-] Mäuse zwar eine reduzierte $K_{V7.2}$ Expression zeigen, jedoch außer einer erhöhten Anfälligkeit auf pharmakologisch induzierte epileptische Aktivität einen normalen Phänotyp aufweisen (Watanabe et al., 2000).

Peters et al. (2005) konnten an der ersten konditionellen KCNQ2 Knock-Out Maus zeigen, dass M-Kanal-defiziente Mäuse ausgeprägte elektrophysiologische Veränderungen ihrer hippocampalen CA1 Neurone mit erhöhter Exzitabilität, beeinträchtigter AP-Frequenzadaptation, reduzierter mAHP und reduzierter intrinsischer unterschwelliger theta Resonanz zeigen. Je nach Zeitpunkt der dominant-negativen Expression zeigten die Mäuse epileptische Anfälle, Hyperaktivität, kognitive Defizite und/oder Veränderungen der Hirnstruktur, v.a. hippocampal.

Davon ausgehend, dass eine Haploinsuffizienz der $K_v7.2$ Mutationen der BFNS zugrunde liegt, stellt sich zudem die Frage, ob eine weitere Reduktion des M-Stroms jenseits der Haploinsuffizienz z.B. durch eine dominant-negative Mutation einen erweiterten Phänotyp erwarten lässt (Jentsch, 2000), wie man aus den Ergebnissen von Watanabe et al. (2000) und Peters et al. (2005) schließen könnte. Neben der in dieser Arbeit charakterisierten $K_v7.2$ Mutation sind drei weitere dominant-negative Mutationen in der Literatur zu finden (Dedek et al., 2001; Wuttke et al., 2007; Singh et al., 2003), wobei lediglich bei den R207W/Q Mutationen ein weiterer Phänotyp im Sinne von einer permanenten Übererregbarkeit peripherer Nerven (PNH) entsteht (Dedek et al., 2001; Wuttke et al. 2007). Die dritte Mutation geht mit einem klassischen BFNS Phänotyp einher (Singh et al., 2003), und auch die Betroffenen der in der vorliegenden Arbeit charakterisierten dominant-negativen N258S Mutation der $K_v7.2$ Untereinheit zeigen lediglich typische BFNS Anfälle in der Perinatalperiode (Yalcin et al., 2007).

4.2.1 Primäre Zellkulturen als Untersuchungsobjekt elektrophysiologischer Studien

Primäre Zellkulturen sind eine weitverbreitete Methode für elektrophysiologische Studien. So hat die Untersuchung von Kaliumströmen in kultivierten hippocampalen Neuronen eine lange Tradition (Ficker et Heinemann, 1992; Segal et Barker, 1984; Spigelman et al. 1992) und auch der M-Strom wurde schon in primären Zellkulturen (Gahwiler and Brown, 1985; Shah et al., 2002; Shahidullah et al., 2005) analysiert. Für die Mitglieder der K_v Kanalfamilie ist gezeigt worden, dass das gesamte Expressionsverhalten während der neuronalen

Entwicklung in vitro ein gutes Bild der Situation in situ wiedergibt, obwohl sich das genaue subzelluläre Expressionsmuster unterscheidet (Maletic-Savatic et al. 1998; Grosse et al. 2000).

Wenn fötale hippocampale Neurone gewonnen und in Zellkultur gehalten werden, durchlaufen sie eine ähnliche Entwicklung bezüglich ihrer Morphologie (Banker et Cowan, 1977 und 1979; Bartlett et Banker, 1984; Peacock et al., 1979) und der Synaptogenese (Bartlett et Banker, 1984). Es konnte auch gezeigt werden, dass Neurone in Zellkultur, trotz einer Heterogenität im Entwicklungsstand nach der Präparation, durch das bevorzugte Wachstum einer Entwicklungsstufe einen äußerst homogenen Differenzierungszustand erreichen (Banker et Cowan, 1977). Bezüglich der elektrophysiologischen Eigenschaften zeigen Neurone einer primären Zellkultur eine ausgesprochene Homogenität (Segal, 1983; Buchhalter et Dichter, 1992; Yang et al., 1993; Wann et al., 1999), was sie zu einem hervorragenden Untersuchungsobjekt macht.

4.2.2 Wachstum und Differenzierung der Neurone in vitro

In unseren Zellkulturen entwickelten sich die kultivierten Neurone in kürzester Zeit zu pyramidaloiden, fusiformen, bipolaren und multipolaren, sternförmigen Neuronen. Ein vergleichbares Verhalten von hippocampalen Neuronen in Kultur ist schon von vielen Gruppen zuvor beschrieben worden (Banker et Cowan, 1979; Peacock et al., 1979; Kriegstein et Dichter, 1983). In unseren Kulturen war morphologisch kein offensichtlicher Unterschied zwischen [+/+], [+/-] und [-/-] Neuronen feststellbar. Als elektrophysiologisches Korrelat der beobachteten Größenprogredienz konnte eine Verdopplung der Zellkapazität im Verlauf der zwei letzten Wochen in Kultur registriert werden. Als Hinweis für die Zunahme der exprimierten Ionenkanäle in der Membran fiel gleichzeitig der Eingangswiderstand auf ca. 30% des Ausgangswertes an DIV 7 (siehe auch Spigelman et al., 1992; Yang et al., 1993). Insbesondere [-/-] Neurone scheinen eine äquivalente Entwicklung zu durchlaufen, obwohl homozygote KCNQ2 Knock-Out Mäuse am ersten Lebenstag versterben (Watanabe et al., 2000).

4.2.3 Veränderungen der Membranstromamplituden in vitro

Neben der morphologischen Differenzierung durchlaufen primäre Zellkulturen nach Präparation auch Veränderungen ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften (Spigelman et al., 1992; Yang et al., 1993; Bahrey et Moody et al., 2002). Im Rahmen der postnatalen Veränderung der Ionenkanalzusammensetzung verändern sich die Amplituden der verschiedenen Na^+ - und K^+ -Membranströme (Bahrey et Moody et al., 2002). Für [+/+] und [+/-] Neurone konnten wir zeigen, dass während die Gesamtamplitude der transienten Kaliumströme in unserer Zellkultur annähernd konstant bleibt, der Natriumstrom eine ca. Verdreifachung der Amplitude im Verlauf der zweiten Woche nach Präparation erlebt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Mauslinien festgestellt werden. Im Einklang mit dieser Zunahme des Natriumstroms zeigte sich einen Anstieg der Aktionspotentialhöhe und eine Verkürzung der Depolarisationszeit. Gleichzeitig beobachteten wir lediglich eine geringe Beschleunigung der Repolarisation, welche im Zusammenhang mit der geringen Entwicklung der transienten Kaliumströme zu sehen ist.

Bezüglich der Beurteilung der Aktionspotentialparameter ist anzumerken, dass der in dieser Arbeit verwendete Axopatch 200B Verstärker im Gegensatz zu den meisten Patch-Clamp Verstärkern Schaltungen zur Serienwiderstandkompensation im Current-Clamp Modus besitzt. Allerdings ist dadurch die Umschaltgeschwindigkeit des Verstärkers verlangsamt, wodurch bei bestimmten Kombinationen an Pipettenwiderständen und Zellkapazitäten der Verstärker der schnellen Anstiegszeit eines Aktionspotentials nicht folgen kann und die Aktionspotentiale verzerrt werden. Daraus folgt, dass die von uns gemessene Absolutwerte der Aktionspotentialparameter unter Umständen fehlerbehaftet sein könnten. Nichtsdestotrotz konnten keine signifikante Unterschiede zwischen den drei Neuronengruppen festgestellt werden.

Insgesamt stehen unsere Ergebnisse im Einklang mit den Daten von Bahrey et Moody et al. (2002). An zerebralen Hirnschnitten von Mäusen konnten sie zeigen, dass in der frühen postnatalen Phase insbesondere die einwärts gerichteten Natriumströme zunahmen, während die auswärts gerichteten

Kaliumströme beinahe unverändert blieben. Gleichzeitig wurden die Aktionspotentiale größer und von kürzerer Dauer. Eine ähnliche Entwicklung der AP-Parameter ist auch von Spigelman et al. (1992) beschrieben worden.

Den größten und steilsten Anstieg erfährt der M-Strom mit einer Vervierfachung bis zu DIV 11 bei [+/+] Neuronen, was die Bedeutung des M-Stroms in der frühen postnatalen Phase unterstreicht. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von immunhistologischen Untersuchungen überein, die zeigen, dass die Expression von heteromeren $K_v7.2/K_v7.3$ Kanälen innerhalb der ersten drei postnatalen Wochen in Mäusegehirnen stark zunimmt (Geiger et al. 2006; Weber et al. 2006; Maljevic et al. 2007). [+/-] Neurone zeigen zwar eine reduzierte M-Stromamplitude, aber auch hier war ein verzögerter Anstieg des M-Stroms beobachtbar. Die reduzierte M-Stromamplitude in [+/-] Neurone spiegelt sich auch in der reduzierten mAHP bei -60 mV an den Tagen DIV 11 und DIV 13 und den verlängerten Intervallen zwischen den APs wider (ISI, *engl.* interspike intervals). So ist bekannt, dass eine Blockierung der K_v7 -Kanäle zu einer Reduktion der mAHP, einer Verlängerung der ISIs und zur Zunahme der Feuerungsfrequenz führt (Gu et al., 2005).

Mit dem Anstieg des M-Stroms ging ein Abfall der AP-Frequenz in der zweiten Woche nach Präparation einher, welche sich schließlich im Vergleich zu DIV 9 fast halbiert. Auch bei [+/-] Neuronen beobachtet man –allerdings mit einer Verzögerung von 2 Tagen– den Abfall der AP-Frequenz, so dass sich für DIV 11 und DIV 13 im Vergleich zu [+/+] Neuronen signifikant höhere AP-Frequenzen ergeben.

Letztlich konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede in der Exzitabilität zwischen [+/+] und [+/-] Neuronen äußerst gering ausfallen. Diese Befunde passen in die Beobachtung, dass heterozygote Knock-Out Mäuse –außer einer erhöhten Anfälligkeit für pharmakologisch induzierte epileptische Anfälle– einen unauffälligen Phänotyp aufweisen (Watanabe et al., 2000). Die erhöhte neuronale Erregbarkeit der [+/-] Neurone äußert sich in einer erhöhten Feuerungsrate und einer linksverschobener AP-Antwortkurve nach depolarisierenden Strompulsen, v.a. an den Tagen DIV 11 und DIV 13, an denen auch eine signifikant reduzierte

AHP gemessen werden konnte. Die Angleichung des neuronalen Antwortverhaltens nach dem 15. Tag in Kultur würde die Limitierung der BFNS Anfälle auf die neonatale Periode widerspiegeln.

[-/-] Neurone zeigen eine den [+/+] und [+/-] Neurone entsprechende morphologische Entwicklung und auch die Basisparameter Kapazität, Eingangswiderstand, Ruhepotential und Form der Aktionspotentiale stimmen in den ersten zwei Wochen in Kultur weitestgehend überein. Messungen an [-/-] Neuronen zeigten im Vergleich zu [+/-] Neuronen eine weitere Reduktion der M-Ströme. Ein vergleichbarer Anstieg der Amplitude blieb in den ersten zwei Wochen in Kultur aus. Auch die mAHP bei -60 mV als Parameter des M-Strom war im Vergleich zu [+/-] Neuronen reduziert. Allerdings scheint dies nicht zu einer Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit zu führen. So ist das Feuerungsverhalten beider Neuronenfamilien im Hinblick auf die absolute Anzahl an APs sowie auch im Antwortverhalten auf depolarisierende Pulse vergleichbar.

Dies bedeutet, dass eine Reduktion des M-Stroms jenseits des Niveaus einer Haploinsuffizienz nicht notwendigerweise mit einer verstärkten neuronalen Hyperexzitabilität einhergehen muss. So ist durch eine dominant-negative $K_v7.2$ Mutation nicht unbedingt ein erweiterter Phänotyp im ZNS zu erwarten, was sich in den bisher gefundenen dominant-negativen Mutationen und den damit verbundenen BFNS Phänotypen widerspiegelt (Dedek et al., 2001; Singh et al., 2003; Yalcin et al., 2007; Wuttke et al., 2007). Allerdings haben die Mutationen R207Q/W offenbar andere Auswirkungen in peripheren Nerven (PNH-Phänotyp nur bei diesen beiden Mutationen). Eine weitere Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit könnte ab einem gewissen Niveau durch andere Mechanismen und andere Ionenkanäle begrenzt werden. So wird die AP-Frequenz auch durch die fAHP und die sAHP im Sinne einer negativen Feedback-Schleife beeinflusst. Ferner kann ein fehlender M-Strom durch eine Hochregulation anderer Kaliumkanäle (siehe Nerbonne et al., 2008) oder des H-Stroms (s.u.) kompensiert werden.

4.2.4 Der H-Strom als möglicher Kompensationsmechanismus

Bei Angleichung des neuronalen Antwortverhaltens verschwand auch der Unterschied der mAHP-Amplitude, obwohl weiterhin ein Unterschied in der M-Stromamplitude feststellbar war. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens könnte eine Hochregulation anderer Kanaluntereinheiten oder Kanalfamilien sein. So konnte Nerbonne et al. (2008) an Neuronen homozygoter Knock-Out Mäuse zeigen, dass ein kompletter Verlust der $K_v4.2$ Untereinheit, welche als Hauptträger des A-Stroms betrachtet wird (Serodio et Rudy, 1998; Kim et al., 2005; Yuan et al., 2005), nicht zu einer Erhöhung der neuronalen Exzitabilität führt, obwohl bekannt ist, dass eine transiente Blockierung des A-Stroms zu einer Hyperexzitabilität führt (Kim et al., 2005; Yuan et al., 2005). Dabei wurde festgestellt, dass der Verlust des A-Stroms offensichtlich durch eine Hochregulation anderer transienter Kaliumströme kompensiert werden kann. In unseren Experimenten konnten wir keine signifikante Veränderung der Amplitude der transienten Kaliumströme bei [+/-] Neuronen feststellen. Des Weiteren gibt es keinen Hinweis auf eine mögliche Hochregulation anderer K_v7 Untereinheiten wie z.B. $K_v7.3$ oder $K_v7.5$ (vgl. Watanabe et al. 2003).

Möglich ist eine Hochregulation oder veränderte Expression von hypolarisations-aktivierten Kationen (HCN) Kanälen, die den sog. H-Strom generieren (Santoro et Tibbs, 1998). Der H-Strom ist ein bei Hyperpolarisation aktivierender, wenig selektiver Kationenstrom. Im Gehirn und im Herzen spielt der H-Strom eine wichtige Rolle als Schrittmacherstrom bei der Entstehung von rhythmischen Erregungsmustern und Netzwerkoszillationen (Kaupp et Seifert, 2001). Allerdings sind H-Stromkanäle im ZNS, v.a. im Hippokampus, verstärkt in den distalen Dendriten zu finden, wo sie die neuronale Erregbarkeit dadurch reduzieren, dass sie die Amplitude und Kinetik von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen reduzieren und dadurch die zeitliche Summation von synaptischen Eingängen in die Dendriten limitieren (Magee, 1998 und 1999). Des Weiteren ist der H-Strom auch an der Ausbildung der mAHP beteiligt (Storm, 1989 und 1990; Williamson et Alger, 1990). Man geht davon aus, dass die mAHP bei einem Membranpotential von -60 mV v.a. durch den M-Strom vermittelt wird,

während bei weiter hyperpolarisierten Potentialen zunehmend der H-Strom zum Tragen kommt (Gu et al., 2005). Angesichts dieser Dichotomie der mAHP könnte eine Hochregulation des H-Stroms die Angleichung der mAHP in der zweiten Woche nach Präparation und der damit verbundenen Angleichung der Exzitabilität der [+/-] Neurone erklären. Gestützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass die ADP nach einzelnen Aktionspotentialen bei einem Potential von -80 mV im Laufe der in vitro Entwicklung bei [+/-] Neuronen stark supprimiert wird, während sie bei [+/+] Neuronen zunimmt. Eine Reduktion des M-Stroms würde jedoch eine Zunahme der ADP erwarten lassen. Davon ausgehend, dass die ADP bei -80 mV v.a. durch H-Kanäle bestimmt wird (Gu et al., 2005), führt eine Hochregulation des H-Stroms zu einer Abnahme der ADP. Tatsächlich konnte an DIV 13 bei hyperpolarisierten Potentialen im Rahmen des klassischen M-Stromprotokolls bei einer zunehmenden Anzahl an v.a. [+/-] Neuronen ein Stromverhalten beobachtet werden, welches bekanntlich bei Anwesenheit eines H-Stroms entsteht (Schweitzer et al., 1993; Gu et al., 2005). Diese Neurone zeigten in unseren Experimenten -wenn auch nur sehr schwach- die typische Absackung (*eng.* „sag“) des H-Stroms in der Spannungskurve bei hyperpolarisierenden Strompulsen im Rahmen der Current-Clamp Versuche (Gu et al., 2005).

Weitere Gruppen haben die Entwicklung des H-Stroms in frischen und in kultivierten Gewebsschnitten aus dem Hippokampus untersucht und beschreiben eine ca. Vervierfachung der H-Kanalexpression in der Entwicklung von der Neonatalperiode zu reifen Tieren, mit einem besonders starken Anstieg in den ersten zwei Wochen (Bender et al., 2001; Vasilyev et Barish, 2002; Bender et al., 2005; Brewster et al., 2007). Shin et Chetkovich (2007) zeigten ein Erreichen der maximalen HCN1-Expression in kultivierten Hippokampusschnitten an DIV 14, und Surges et al. (2006) beschreiben das Erreichen der maximalen H-Stromamplitude ebenfalls bei P14 (P10 bei Vasilyev et Barish, 2002). Interessanterweise ergaben die Untersuchungen von Bahrey et Moody (2002), dass die Expression des H-Stroms der Entwicklung des M-Stroms mit einer gewissen Verzögerung folgt. Eine geringere K_V7.2 Expression könnte nun die Entwicklung des H-Stroms im Sinne eines Kompensationsmechanismus beschleunigen. Brewster et al. (2007) konnten eine 3- bzw. 2-fache Zunahme der HCN1 und HCN2 Untereinheiten in den ersten

11 postnatalen Tagen zeigen, wobei die Untereinheiten zunehmend in den Dendriten zu finden waren, wodurch sie die neuronale Erregbarkeit reduzieren (Magee, 1998 und 1999). Insgesamt scheinen die HCN Kanäle in der frühen Entwicklung des Hippokampus einerseits in ihrer Anzahl zuzunehmen, andererseits die Lokalisation innerhalb des Neurons zu verändern.

Mehr noch scheint anhaltende elektrische Aktivität die Anzahl an H-Kanälen in den Dendriten (Fan et al., 2005; Shin et Chetkovich, 2007) und Axonen (Bender et al., 2007) zu erhöhen und so als möglicher Kompensationsmechanismus die neuronale Exzitabilität zu reduzieren (Fan et al., 2005). So beobachtet man auch eine erhöhte H-Kanalexpression in humanem Hippokampusgewebe von Patienten mit chronischer Epilepsie (Bender et al., 2003). Gleichzeitig wurde eine verstärkte Heterotetramerisierung von HCN1 und HCN2 Untereinheiten über translationale und posttranslationale Mechanismen nach anhaltender epileptischer Entladung beschrieben (Brewster et al., 2005; Richichi et al., 2007; Zha, 2008). Da diese heterotetrameren Kanäle mit verlangsamten kinetischen Eigenschaften und einer Aktivierung bei negativeren Potentialen als homomere HCN1 Kanäle hervorbringen (Chen et al., 2001; Ulens et Tytgat, 2001; Simeone et al., 2005), wird auch eine Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit durch epileptische Aktivität diskutiert, so dass einige Autoren auch von einer „transkriptionalen oder erworbenen Channelopathy“ sprechen (Richichi et al., 2007). Eventuell muss unterschieden werden, ob es sich um eine akute oder chronische neuronale Übererregung handelt und ob der inhibitorische Einfluss von Interneuronen noch besteht (Bender et al., 2003). Letztlich ist die genaue Rolle der veränderten H-Stromexpression nach anhaltender epileptischer Erregung noch ungeklärt.

Insgesamt konnte der H-Strom in unseren Stimulationsprotokollen nicht sicher ausgewertet werden. Mögliche Erklärungen sind eine Maskierung des H-Stroms durch den nicht-geblockten M-Strom, zu kurze Spannungspulse im Vergleich zur Deaktivierungskinetik des H-Stroms oder zu geringe Hyperpolarisation durch die Strompulse von -0,1 nA. Des Weiteren ist bekannt, dass die H-Stromamplitude bei lang andauernden Messungen in der Ganzzellkonfiguration aufgrund der cAMP Abhängigkeit der HCN Kanäle abnimmt

(DiFrancesco et al., 1986). So sind sicher weitere Experimente zur Klärung der Rolle des H-Stroms notwendig.

4.2.5 Das „Gleichgewicht“ der Ionenkanäle

Elektrophysiologische Membraneigenschaften von Neuronen werden bestimmt durch das Zusammenspiel einer Vielzahl von unterschiedlichen Ionenkanälen. Obwohl diese Membraneigenschaften eine ausgesprochen wichtige Rolle für die normale neuronale Netzwerkfunktion haben, ist nur wenig darüber bekannt, wie die Expression und Verteilung der unterschiedlichen Kanalarten während der neuronalen Entwicklung oder im reifen Gewebe reguliert werden (Davis, 2006). Aktuelle Studien legen gemeinsame Mechanismen bei der Oberflächenexpression mit u.U. lokaler Konkurrenz von unterschiedlichen Kanalfamilien nahe. So zeigen homozygote Knock-Out Tiere für $\text{Na}_v1.6$ eine Veränderung der Na_v Kanalzusammensetzung, die den Ausfall der $\text{Na}_v1.6$ -Untereinheit z.T. kompensieren kann (Van Wart et Matthews, 2006). Des Weiteren wird diskutiert, ob das „Gleichgewicht“ der Ionenkanäle durch Regulationsmechanismen aufrechterhalten wird, welche durch Rekrutierung von kompensatorischen Kanalfamilien die physiologische Exzitabilität herzustellen versuchen (Davis et Bezprozvanny, 2001; MacLean et al. 2003; Zhang et Linden, 2003; Turrigano et Nelson, 2004; Davis, 2006). Besonders eindrucksvoll bewiesen haben dies Nerbonne et al. (2008), die zeigen konnten, dass ein kompletter Ausfall der $\text{K}_v4.2$ Untereinheit, welche als Hauptträger des A-Stroms betrachtet wird (Kim et al., 2005; Yuan et al., 2005), durch eine Hochregulation anderer transienter Kaliumströme zu einer Stabilisierung der neuronalen Exzitabilität führt, obwohl bekannt ist, dass eine transiente Blockierung des A-Stroms eine Übererregbarkeit zur Folge hat (Kim et al., 2005; Yuan et al., 2005).

Den spannungsabhängigen Kaliumkanälen kommt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Erregbarkeit von Säugetierneuronen zu. Insbesondere in der Neonatalperiode spielt der M-Strom eine besondere Rolle. Der H-Strom könnte dabei als Partner beim Ausüben dieser Funktion auftreten. Die vorliegende Arbeit gibt Hinweise darauf, dass eine Reduktion des M-Stroms durch Haploinsuffizienz zu einer kompensatorischen Hochregulation von H-Kanälen führen könnte, welche

u.U. für die Limitierung der BFNS Anfälle in der neonatale Periode verantwortlich gemacht werden kann. Der gleiche Mechanismus könnte eine Erklärung liefern, wieso dominant-negative Mutationen der $K_v7.2$ M-Kanaluntereinheiten nicht notwendigerweise zu einem erweiterten Epilepsiephänotyp führen müssen. Hierfür sprechen die Ergebnisse bzgl. der homozygoten KCNQ2 Knock-Out Mäuse, die trotz weiterer Reduktion des M-Stroms keine weitere Erhöhung der neuronalen Exzitabilität im Vergleich zu den heterozygoten Neuronen zeigen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die autosomal-dominant vererbte benigne familiäre Neugeborenenanfälle (BFNS) gehören zu den idiopathischen fokalen Epilepsien. Sie treten in den ersten Lebenstagen in Form unprovoked Anfälle auf und sistieren spontan nach einigen Wochen bis Monaten. In den vergangenen Jahren konnten mehrere Mutationen in den Genen der $K_v7.2$ und $K_v7.3$ Kaliumkanäle als Ursache für dieses seltene epileptische Syndrom identifiziert werden. Mittlerweile sind über 30 BFNS Mutationen in allen Bereichen des $K_v7.2$ Kanals entdeckt worden, welche alle zu einer Reduktion des resultierenden Kaliumstroms führen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Analyse einer neuen BFNS Mutation der $K_v7.2$ Untereinheit (N258S), der ersten Mutation zwischen der S5 Helix und der Porenregion, dem sog. extrazellulären S5-H5-Linker.

Die meisten $K_v7.2$ Mutationen führen durch den Mechanismus einer Haploinsuffizienz zur Reduktion des Kaliumstroms, welcher als sog. M-Strom an der Regulation der neuronalen Exzitabilität beteiligt ist. Dementsprechend wird postuliert, dass dominant-negative $K_v7.2$ Mutationen mit einem erweiterten Phänotyp einhergehen könnten. Allerdings sind die Daten zu den bisher gefundenen dominant-negativen $K_v7.2$ Mutationen kontrovers. So zeigen heterozygote KCNQ2 Knock-Out Mäuse [+/-] einen unauffälligen Phänotyp, während homozygote Mäuse [-/-] am ersten Lebenstag an pulmonalen Atelektasen versterben. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die elektrophysiologische Charakterisierung von kultivierten, hippokampalen Neuronen von KCNQ2 Knock-Out Mäusen. Es sollten die Fragen bearbeitet werden, (i) warum [+/-] Mäuse einen unauffälligen Phänotyp haben, (ii) ob postnatale Veränderungen des neuronalen Feuerungsverhaltens für das fehlende Auftreten von Anfällen verantwortlich gemacht werden können, und (iii) sollte ein neuronales Expressionssystem für die Analyse von $K_v7.2$ Mutationen etabliert werden.

Zunächst führten wir nach Expression der entsprechenden Untereinheiten in einem heterologen Expressionssystem (CHO Zellen) Ganzzell- und Einzelkanalmessungen mit Hilfe der Patch-Clamp Technik durch. Dabei ergaben homomere N258S Kanäle lediglich sehr kleine Kaliumströme. Auch eine Koexpression mit der $K_v7.3$ Untereinheit oder eine Expression in Fusionsproteinen führte zu einem etwa 50% reduzierten Kaliumstrom durch die Mutation. Das

spannungsabhängige Schaltverhalten war hingegen nicht verändert. Ferner zeigte die N258S Mutation einen dominant-negativen Effekt auf den WT Strom. In einer zweiten Reihe von Experimenten konnte -zum ersten Mal für eine $K_v7.2$ Mutation- eine partielle Wiederherstellung des N258S Kaliumstroms durch eine Erniedrigung der Inkubationstemperatur (*engl.* temperature rescue) und durch Inkubation mit dem $K_v7.2$ Kanalöffner Retigabin (*engl.* pharmacological rescue) gezeigt werden. Unsere Experimente lassen nun den Schluss zu, dass der Pathomechanismus der N258S Mutante in einer Störung des post-translationalen Transports des Proteins zur Membranoberfläche (*engl.* trafficking defekt) besteht. Dadurch kommt es zu verminderten Kaliumauswärtsströmen, die eine neuronale Übererregbarkeit mit epileptischen Anfällen erklären können.

Die elektrophysiologische Untersuchung kultivierter fötaler Hippokampusneurone mittels Spannungsklemm- und Stromklemmversuchen zeigte für [+/+] Neurone einen starken Anstieg der M-Stromamplitude mit einer Vervierfachung bis zu DIV 11 (*engl.* day in vitro) mit gleichzeitigem Anstieg der mAHP (*engl.* medium afterhyperpolarization). Diese Hyperpolarisation nach Aktionspotentialen wird für die Frequenzadaptation und Kontrolle neuronaler Exzitabilität verantwortlich gemacht. [+/-] Neurone zeigten eine reduzierte M-Strom- und mAHP-Amplitude. Mit der Zunahme des M-Stroms kam es in der zweiten Woche nach Präparation bei gleicher Strominjektion zu einem Abfall der AP-Frequenz. Für [+/-] Neuronen zeigte sich an DIV 11 und DIV 13 im Vergleich zu [+/+] signifikant höhere AP-Frequenzen. Ab DIV 15 waren jedoch keine Unterschiede mehr zwischen [+/+] und [+/-] erkennbar. Bei [-/-] Neurone kam es im Vergleich zu [+/-] Neuronen zu einer weiteren Reduktion des M-Stroms und der mAHP. Allerdings ist das Feuerungsverhalten der [-/-] Neurone im Hinblick auf die absolute Anzahl an APs vergleichbar. Dies bedeutet, dass eine Reduktion des M-Stroms jenseits der Haploinsuffizienz nicht zu einer weiteren Erhöhung der neuronalen Hyperexzitabilität im Vergleich zu den homozygoten Tieren führt, was erklären könnte, warum eine dominant-negative Mutation nicht notwendigerweise mit einem erweiterten ZNS Phänotyp einhergehen muss. Desweiteren liefern unsere Experimente Hinweise, dass eine Hochregulation des H-Stroms als möglicher Kompensationsmechanismus an der Begrenzung der BFNS Anfälle auf die Neonatalperiode beteiligt sein könnte, was in weiterführenden Experimenten genauer untersucht werden muss.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Aiken SP, Lampe BJ, Murphy PA, Brown BS (1995) Reduction of spike frequency adaptation and blockage of M-Current in rat CA1 pyramidal neurons by Linopirdine (DUP-996), a neurotransmitter release enhancer. *British Journal of Pharmacology* 115:1163-1168.
- [2] Azouz R, Jensen MS, Yaari Y (1996) Ionic basis of spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *Journal of Physiology-London* 492:211-223.
- [3] Bahrey HLP, Moody WJ (2003) Early development of voltage-gated ion currents and firing properties in neurons of the mouse cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology* 89:1761-1773.
- [4] Banker G, Cowan W (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* 126:397-342.
- [5] Banker G, Cowan W (1979) Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture. *J Comp Neurol* 187:469-493.
- [6] Bartlett W, Banker G (1984) An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J Neurosci* 4:1954-1965.
- [7] Bekkers JM (2000a) Distribution and activation of voltage-gated potassium channels in cell-attached and outside-out patches from large layer 5 cortical pyramidal neurons of the rat. *Journal of Physiology-London* 525:611-620.
- [8] Bekkers JM (2000b) Properties of voltage-gated potassium currents in nucleated patches from large layer 5 cortical pyramidal neurons of the rat. *Journal of Physiology-London* 525:593-609.
- [9] Bender RA, Brewster A, Santoro B, Ludwig A, Hofmann F, Biel M, Baram TZ (2001) Differential and age-dependent expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel isoforms 1-4 suggests evolving roles in the developing rat hippocampus. *Neuroscience* 106:689-698.
- [10] Bender RA, Soleymani SV, Brewster AL, Nguyen ST, Beck H, Mathern GW, Baram TZ (2003) Enhanced expression of a specific hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN) in surviving dentate gyrus granule cells of human and experimental epileptic hippocampus. *Journal of Neuroscience* 23:6826-6836.
- [11] Bender RA, Galindo R, Mameli M, Gonzalez-Vega R, Valenzuela CF, Baram TZ (2005) Synchronized network activity in developing rat hippocampus involves regional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel function. *European Journal of Neuroscience* 22:2669-2674.

- [12] Bender RA, Kirschstein T, Kretz O, Brewster AL, Richichi C, Ruschenschmidt C, Shigemoto R, Beck H, Frotscher M, Baram TZ (2007) Localization of HCN1 channels to presynaptic compartments: Novel plasticity that may contribute to hippocampal maturation. *Journal of Neuroscience* 27:4697-4706.
- [13] Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK (1998) A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279:403-406.
- [14] Biervert C, Steinlein OK (1999) Structural and mutational analysis of KCNQ2, the major gene locus for benign familial neonatal convulsions. *Human Genetics* 104:234-240.
- [15] Bixby KA, Nanao MH, Shen NV, Kreusch A, Bellamy H, Pfaffinger PJ, Choe S (1999) Zn²⁺-binding and molecular determinants of tetramerization in voltage-gated K⁺ channels. *Nature Structural Biology* 6:38-43.
- [16] Bleich M, Warth R (2000) The very small-conductance K⁺ channel KvLQT1 and epithelial function. *Pflugers Arch* 440:202-206.
- [17] Bois P, Bescond J, Renaudon B, Lenfant J (1996) Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *British Journal of Pharmacology* 118:1051-1057.
- [18] Brewster A, Bender RA, Chen YC, Dube C, Eghbal-Ahmadi M, Baram TZ (2002) Developmental febrile seizures modulate hippocampal gene expression of hyperpolarization-activated channels in an isoform- and cell-specific manner. *Journal of Neuroscience* 22:4591-4599.
- [19] Brewster AL, Bernard JA, Gall CM, Baram TZ (2005) Formation of heteromeric hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the hippocampus is regulated by developmental seizures. *Neurobiology of Disease* 19:200-207.
- [20] Brewster AL, Chen YC, Bender RA, Yeh A, Shigemoto R, Baram TZ (2007) Quantitative analysis and subcellular distribution of mRNA and protein expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels throughout development in rat hippocampus. *Cerebral Cortex* 17:702-712.
- [21] Brown BS, Yu SP (2000) Modulation and genetic identification of the M channel. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 73:135-166.
- [22] Brown D, Adams P (1980) Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283:673-676.
- [23] Brown H, DiFrancesco D, Noble S (1979) How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 280:235-236.

- [24] Bruford EA, Lush MJ, Wright MW, Sneddon TP, Povey S, Birney E (2008) The HGNC Database in 2008: a resource for the human genome. *Nucleic Acids Research* 36:D445-D448.
- [25] Buchhalter JR, Dichter MA (1991) Electrophysiological comparison of pyramidal and stellate nonpyramidal neurons in dissociated cell-culture of rat hippocampus. *Brain Research Bulletin* 26:333-338.
- [26] Burgess DL (2004) Neonatal epilepsy syndromes and GEFS+: Mechanistic considerations. In: *Annual Meeting of the American-Epilepsy-Society on Genetics and Epilepsy Syndromes*, pp 51-58. New Orleans, LA.
- [27] Cannon SC (2006) Pathomechanisms in channelopathies of skeletal muscle and brain. *Annual Review of Neuroscience* 29:387-415.
- [28] Catterall WA (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26:13-25.
- [29] Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, Leppert M (1998) A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nature Genetics* 18:53-55.
- [30] Chen C, Wang C, Siegelbaum SA (2001) Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *Journal of General Physiology* 117:491-503.
- [31] Constanti A, Brown D (1981) M-Currents in voltage-clamped mammalian sympathetic neurones. *Neuroscience Letters* 24:289-294.
- [32] Cooper EC, Aldape KD, Abosch A, Barbaro NM, Berger MS, Peacock WS, Jan YN, Jan LY (2000) Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:4914-4919.
- [33] Costa AMN, Brown BS (1997) Inhibition of M-current in cultured rat superior cervical ganglia by linopirdine: Mechanism of action studies. *Neuropharmacology* 36:1747-1753.
- [34] Davis GW, Bezprozvanny I (2001) Maintaining the stability of neural function: A homeostatic hypothesis. *Annual Review of Physiology* 63:847-869.
- [35] Davis GW (2006) Homeostatic control of neural activity: From phenomenology to molecular design. *Annual Review of Neuroscience* 29:307-323.

- [36] Dedek K, Kunath B, Kananura C, Reuner U, Jentsch TJ, Steinlein OK (2001) Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K⁺ channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:12272-12277.
- [37] Delmas P, Brown D (2005) Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nature Reviews Neuroscience* 6:850-862.
- [38] Deutsch C (2002) Potassium channel ontogeny. *Annual Review of Physiology* 64:19-46.
- [39] Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC, Scherer SS (2004) KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *Journal of Neuroscience* 24:1236-1244.
- [40] Di Pasquale E, Keegan K, Noebels J (1997) Increased excitability and inward rectification in layer V cortical pyramidal neurons in the epileptic mutant mouse Stargazer. *Journal of Neurophysiology* 77:621-631.
- [41] DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C (1986) Properties of the hyperpolarizing-activated current (I_h) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *The Journal of Physiology* 377:61-88.
- [42] DiFrancesco D (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annual Review of Physiology* 55:455-472.
- [43] Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo AL, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
- [44] Dreyfus C, Gershon M, Crain S (1979) Innervation of hippocampal explants by central catecholaminergic neurons in co-cultured fetal mouse brain stem explants. *Brain Research* 161:431-445.
- [45] Du J, Haak LL, Phillips-Tansey E, Russell JT, McBain CJ (2000) Frequency-dependent regulation of rat hippocampal somato-dendritic excitability by the K⁺ channel subunit Kv2.1. *Journal of Physiology-London* 522:19-31.
- [46] Fan Y, Fricker D, Brager DH, Chen XX, Lu HC, Chitwood RA, Johnston D (2005) Activity-dependent decrease of excitability in rat hippocampal neurons through increases in I_h. *Nature Neuroscience* 8:1542-1551.
- [47] Ficker E, Heinemann U (1992) Slow and fast transient currents in cultured rat hippocampus cells. *Journal of Physiology-London* 445:431-455.
- [48] Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- [49] Gahwiler B, Brown D (1985) Functional innervation of cultured hippocampal neurones by cholinergic afferents from co-cultured septal explants. *Nature* 313:577-579.

- [50] Gamper N, Shapiro MS (2003) Calmodulin mediates Ca^{2+} -dependent modulation of M-type K^{+} channels. *Journal of General Physiology* 122:17-31.
- [51] Gamper N, Stockand J, Shapiro M (2005) The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51:177-185.
- [52] Gasparini S, DiFrancesco D (1997) Action of the hyperpolarization-activated current (I_h) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflügers Archiv* 435:99-106.
- [53] Geiger J, Weber YG, Landwehrmeyer B, Sommer C, Lerche H (2006) Immunohistochemical analysis of KCNQ3 potassium channels in mouse brain. *Neuroscience Letters* 400:101-104.
- [54] Gong QM, Anderson CL, January CT, Zhou ZF (2004) Pharmacological rescue of trafficking defective HERG channels formed by coassembly of wild-type and long QT mutant N470D subunits. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 287:H652-H658.
- [55] Gong QM, Jones MA, Zhou ZF (2006) Mechanisms of pharmacological rescue of trafficking-defective hERG mutant channels in human long QT syndrome. *Journal of Biological Chemistry* 281:4069-4074.
- [56] Gray R, Johnston D (1985) Rectification of single GABA-gated chloride channels in adult hippocampal neurons. *Journal Neurophysiology* 54:134-142.
- [57] Grissmer S, Nguyen A, Aiyar J, Hanson D, Mather R, Gutman G, Karmilowicz M, Auperin D, Chandy K (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K^{+} channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Molecular Pharmacology* 45:1227-1234.
- [58] Grosse G, Draguhn A, Hohne L, Tapp R, Veh RW, Ahnert-Hilger G (2000) Expression of Kv1 potassium channels in mouse hippocampal primary cultures: Development and activity-dependent regulation. *Journal of Neuroscience* 20:1869-1882.
- [59] Gu N, Vervaeke K, Hu H, Storm J (2005) Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa_2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Physiology* 566:689-715.
- [60] Gustafsson B, Galvan M, Grafe P, Wigström H (1982) A transient outward current in a mammalian central neurone blocked by 4-aminopyridine. *Nature* 299:252-254.

- [61] Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang XL (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews* 57:473-508.
- [62] Hadley JK, Noda M, Selyanko AA, Wood IC, Abogadie FC, Brown DA (2000) Differential tetraethylammonium sensitivity of KCNQ1-4 potassium channels. *British Journal of Pharmacology* 129:413-415.
- [63] Halliwell J, Adams P (1982) Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Research* 250:71-92.
- [64] Hamill O, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv* 391:85-100.
- [65] Hart IK, Maddison P, Newsom-Davis J, Vincent A, Mills KR (2002) Phenotypic variants of autoimmune peripheral nerve hyperexcitability. *Brain* 125:1887-1895.
- [66] Heginbotham L, Mackinnon R (1992) The aromatic binding-site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron* 8:483-491.
- [67] Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, Mackinnon R (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophysical Journal* 66:1061-1067.
- [68] Heinemann S, Rettig J, Graack H, Pongs O (1996) Functional characterization of Kv channel beta-subunits from rat brain. *The Journal of Physiology* 493 (Pt 3):625-633.
- [69] Hille B (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA. Third Edition.
- [70] Hirose S, Zenri F, Akiyoshi H, Fukuma G, Iwata H, Inoue T, Yonetani M, Tsutsumi M, Muranaka H, Kurokawa T, Hanai T, Wada K, Kaneko S, Mitsudome A (2000) A novel mutation of KCNQ3 (c.925T -> C) in a Japanese family with benign familial neonatal convulsions. *Annals of Neurology* 47:822-826.
- [71] Hodgkin AL, Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology* 117:500-544
- [72] Jan LY, Jan YN (1994) Potassium channels and their evolving gates. *Nature* 371:119-122.
- [73] Jentsch TJ (2000) Neuronal KCNQ potassium channels: Physiology and role in disease. *Nature Reviews Neuroscience* 1:21-30.

- [74] Kang J, Huguenard JR, Prince DA (2000) Voltage-gated potassium channels activated during action potentials in layer V neocortical pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology* 83:70-80.
- [75] Kaupp UB, Seifert R (2001) Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annual Review of Physiology* 63:235-257.
- [76] Kay A, Wong R (1986) Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous systems. *Journal of Neuroscience Methods* 16:227-238.
- [77] Kharkovets T, Hardelin JP, Safieddine S, Schweizer M, El-Amraoui A, Petit C, Jentsch TJ (2000) KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:4333-4338.
- [78] Kim J, Wei D, Hoffman D (2005) Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *The Journal of Physiology* 569:41-57.
- [79] Korngreen A, Sakmann B (2000) Voltage-gated K⁺ channels in layer 5 neocortical pyramidal neurones from young rats: subtypes and gradients. *Journal of Physiology-London* 525:621-639.
- [80] Kreusch A, Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S (1998) Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* 392:945-948.
- [81] Kriegstein A, Dichter M (1983) Morphological classification of rat cortical neurons in cell culture. *The Journal of Neuroscience* 3:1634-1647.
- [82] Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lütjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch TJ (1999) KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96:437-446.
- [83] Lamas J, Selyanko A, Brown D (1997) Effects of a cognition-enhancer, linopirdine (DuP 996), on M-type potassium currents (I_{K(M)}) and some other voltage- and ligand-gated membrane currents in rat sympathetic neurons. *The European Journal of Neuroscience* 9:605-616.
- [84] Lancaster B, Nicoll R (1987) Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *The Journal of Physiology* 389:187-203.
- [85] Larsson HP, Baker OS, Dhillon DS, Isacoff EY (1996) Transmembrane movement of the Shaker K⁺ channel S4. *Neuron* 16:387-397.

- [86] Lee WL, Biervert C, Hallmann K, Tay A, Dean JCS, Steinlein OK (2000) A KCNQ2 splice site mutation causing benign neonatal convulsions in a Scottish family. *Neuropediatrics* 31:9-12.
- [87] Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K (1999) Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiological Reviews* 79:1317-1372.
- [88] Lennarz W (1983) Role of intracellular membrane systems in glycosylation of proteins. *Methods in Enzymology* 98:91-97.
- [89] Lerche C, Scherer CR, Seeböhm G, Derst C, Wei AD, Busch AE, Steinmeyer K (2000) Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *Journal of Biological Chemistry* 275:22395-22400.
- [90] Lerche H, Biervert C, Alekov AK, Schleithoff L, Lindner M, Klingler W, Bretschneider F, Mitrovic N, Jurkat-Rott K, Bode H, Lehmann-Horn F, Steinlein OK (1999) A reduced K⁺ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. *Annals of Neurology* 46:305-312.
- [91] Lerche H, Weber YG, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F (2005) Ion channel defects in idiopathic epilepsies. *Current Pharmaceutical Design* 11(21):2737-2752.
- [92] Li M, Jan YN, Jan LY (1992) Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* 257:1225-1230.
- [93] Li Y, Gamper N, Shapiro MS (2004a) Single-channel analysis of KCNQ K⁺ channels reveals the mechanism of augmentation by a cysteine-modifying reagent. *The Journal of Neuroscience* 24:5079-5090.
- [94] Li Y, Langlais P, Gamper N, Liu F, Shapiro MS (2004b) Dual phosphorylations underlie modulation of unitary KCNQ K⁺ channels by Src tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 279:45399-45407.
- [95] Li Y, Gamper N, Hilgemann DW, Shapiro MS (2005) Regulation of Kv7 (KCNQ) K⁺ channel open probability by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of Neuroscience* 25:9825-9835.
- [96] Locke RE, Nerbonne JM (1997) Three kinetically distinct Ca²⁺-independent depolarization-activated K⁺ currents in callosal-projecting rat visual cortical neurons. *Journal of Neurophysiology* 78:2309-2320.
- [97] Ludwig J, Owen D, Pongs O (1997) Carboxy-terminal domain mediates assembly of the voltage-gated rat ether-a-go-go potassium channel. *The EMBO Journal* 16:6337-6345.
- [98] Ma DK, Zerangue N, Lin YF, Collins A, Yu M, Jan YN, Jan LY (2001) Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 291:316-319.

- [99] Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A, DiFrancesco D (1993) Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *Journal of Neurophysiology* 69:2129-2136.
- [100] Mackinnon R (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350:232-235.
- [101] Mackinnon R, Aldrich RW, Lee AW (1993) Functional stoichiometry of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 262:757-759.
- [102] MacKinnon R, Doyle DA (1997) Prokaryotes offer hope for potassium channel structural studies. *Nature Structural Biology* 4:877-879.
- [103] MacKinnon R, Cohen SL, Kuo AL, Lee A, Chait BT (1998) Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* 280:106-109.
- [104] MacLean JN, Zhang Y, Johnson BR, Harris-Warrick RM (2003) Activity-independent homeostasis in rhythmically active neurons. *Neuron* 37:109-120.
- [105] Madison D, Nicoll R (1984) Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *The Journal of Physiology* 354:319-331.
- [106] Madison D, Lancaster B, Nicoll R (1987) Voltage clamp analysis of cholinergic action in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 7:733-741.
- [107] Magee JC (1998) Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience* 18:7613-7624.
- [108] Magee JC (1999) Dendritic I-h normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nature Neuroscience* 2:508-514.
- [109] Maleticsavatic M, Lenn NJ, Trimmer JS (1995) Differential spatiotemporal expression of K⁺ channel polypeptides in rat hippocampal-neurons developing in-situ and in-vitro. *The Journal of Neuroscience* 15:3840-3851.
- [110] Maljevic S, Lerche C, Seeböhm G, Alekov AK, Busch AE, Lerche H (2003) C-terminal interaction of KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels. *Journal of Physiology-London* 548:353-360.
- [111] Maljevic S (2004) Molecular characterization of ion channel defects associated with idiopathic epilepsies, Dissertation. Med. Fakultät, Ulm
- [112] Maljevic S, Wuttke T, Lerche H (2008) Nervous system KV7 disorders: breakdown of a subthreshold brake. *The Journal of Physiology* 586:1791-1801.

- [113] Marrion NV (1997) Control of M-current. *Annual Review of Physiology* 59:483-504.
- [114] McCormick D, Pape H (1990) Noradrenergic and serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurones. *The Journal of Physiology* 431:319-342.
- [115] Metz AE, Spruston N, Martina M (2007) Dendritic D-type potassium currents inhibit the spike afterdepolarization in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of Physiology-London* 581:175-187.
- [116] Meves H, Schwarz JR, Wulfsen I (1999) Separation of M-like current and ERG current in NG108-15 cells. *British Journal of Pharmacology* 127:1213-1223.
- [117] Miledi R, Parker I, Sumikawa K (1983) Recording of single gamma-aminobutyrate- and acetylcholine-activated receptor channels translated by exogenous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)* 218:481-484.
- [118] Much B, Wahl-Schott C, Zong XG, Schneider A, Baumann L, Moosmang S, Ludwig A, Biel M (2003) Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *Journal of Biological Chemistry* 278:43781-86.
- [119] Murakoshi H, Trimmer JS (1999) Identification of the Kv2.1 K⁺ channel as a major component of the delayed rectifier K⁺ current in rat hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience* 19:1728-1735.
- [120] Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802.
- [121] Nerbonne JM, Gerber BR, Norris A, Burkhalter A (2008) Electrical remodelling maintains firing properties in cortical pyramidal neurons lacking KCND2-encoded A-type K⁺ currents. *Journal of Physiology-London* 586:1565-1579.
- [122] Noma A, Irisawa H (1976) Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. *Pflugers Archiv* 364:45-52.
- [123] Numann R, Wadman W, Wong R (1987) Outward currents of single hippocampal cells obtained from the adult guinea-pig. *The Journal of Physiology* 393:331-353.
- [124] Numberger M, Draguhn A (1996) *Patch-Clamp Technik*, Spektrum, Heidelberg Berlin Oxford

- [125] Okada M, Zhu G, Hirose S, Ito KI, Murakami T, Wakui M, Kaneko S (2003) Age-dependent modulation of hippocampal excitability by KCNQ-channels. *Epilepsy Research* 53:81-94.
- [126] Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY (1991) Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4-sequence. *Nature* 349:305-310.
- [127] Papazian DM (1999) Potassium channels: Some assembly required. *Neuron* 23:7-10.
- [128] Pape H (1994) Specific bradycardic agents block the hyperpolarization-activated cation current in central neurons. *Neuroscience* 59:363-373.
- [129] Pape H (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annual Review of Physiology* 58:299-327.
- [130] Pape HC, Driesang RB (1998) Ionic mechanisms of intrinsic oscillations in neurons of the basolateral amygdaloid complex. *Journal of Neurophysiology* 79:217-226.
- [131] Passmore GM, Selyanko AA, Mistry M, Al-Qatari M, Marsh SJ, Matthews EA, Dickenson AH, Brown TA, Burbidge SA, Main M, Brown DA (2003) KCNQ/M currents in sensory neurons: Significance for pain therapy. *The Journal of Neuroscience* 23:7227-7236.
- [132] Peacock J (1979) Electrophysiology of dissociated hippocampal cultures from fetal mice. *Brain Research* 169:247-260.
- [133] Peacock J, Rush D, Mathers L (1979) Morphology of dissociated hippocampal cultures from fetal mice. *Brain Research* 169:231-246.
- [134] Peretz A, Degani N, Nachman R, Uziyel Y, Gibor G, Shabat D, Attali B (2005) Meclofenamic acid and diclofenac, novel templates of KCNQ2/Q3 potassium channel openers, depress cortical neuron activity and exhibit anticonvulsant properties. *Molecular Pharmacology* 67:1053-1066.
- [135] Peters H, Hu H, Pongs O, Storm J, Isbrandt D (2005) Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nature Neuroscience* 8:51-60.
- [136] Pineda JC, Galarraga E, Bargas J, Cristancho M, Aceves J (1992) Charybdotoxin and Apamin sensitivity of the calcium-dependent repolarization and the afterhyperpolarization in neostriatal neurons. *Journal of Neurophysiology* 68:287-294.
- [137] Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO, Pongs O (1994) Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature* 369:289-294.

- [138] Richichi C, Brewster AL, Bender RA, Simeone TA, Zha Q, Yin HZ, Weiss JH, Baram TZ (2008) Mechanisms of seizure-induced 'transcriptional channelopathy' of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated (HCN) channels. *Neurobiology of Disease* 29:297-305.
- [139] Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999) The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397:251-255.
- [140] Robertson G, January C (2006) HERG trafficking and pharmacological rescue of LQTS-2 mutant channels. *Handbook of Experimental Pharmacology*:349-355.
- [141] Robinson RB (2003) Hyperpolarization-activated cation currents: From molecules to physiological function. *Annual Review of Physiology* 65:453-480.
- [142] Sakmann B, Neher E (1995) *Single-Channel Recording*. Plenum Press, New York. 2. Auflage
- [143] Santoro B, Tibbs GR (1998) The HCN gene family: Molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. In: *Conference on Molecular and Functional Diversity of Ion Channels and Receptors* (Rudy BSP, ed), pp 741-764. New York, New York.
- [144] Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, Siegelbaum SA (2000) Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *The Journal of Neuroscience* 20:5264-5275.
- [145] Schenzer A, Friedrich T, Pusch M, Saftig P, Jentsch TJ, Grotzinger J, Schwake M (2005) Molecular determinants of KCNQ (K(V)7) K⁺ channel sensitivity to the anticonvulsant retigabine. *The Journal of Neuroscience* 25:5051-5060.
- [146] Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O (2000) A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *The EMBO Journal* 19:332-340.
- [147] Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, Jentsch TJ (1998) Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* 396:687-690.
- [148] Schroeder BC, Hechenberger M, Weinreich F, Kubisch C, Jentsch TJ (2000a) KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *Journal of Biological Chemistry* 275:24089-24095.
- [149] Schroeder BC, Waldegger S, Fehr S, Bleich M, Warth R, Greger R, Jentsch TJ (2000b) A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* 403:196-199.

- [150] Schuhmann K (1995): Regulation von glattmuskulären L-Typ-Ca²⁺-Kanälen, Dissertation, Graz
- [151] Schwake M, Pusch M, Kharkovets T, Jentsch TJ (2000) Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K⁺ channels involved in epilepsy. *Journal of Biological Chemistry* 275:13343-13348.
- [152] Schwake M, Jentsch TJ, Friedrich T (2003) A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO Reports* 4:76-81.
- [153] Schwappach B, Zerangue N, Jan YN, Jan LY (2000) Molecular basis for K-ATP assembly: Transmembrane interactions mediate association of a K⁺ channel with an ABC transporter. *Neuron* 26:155-167.
- [154] Schweitzer P, Madamba S, Champagnat J, Siggins GR (1993) Somatostatin inhibition of hippocampal CA1 pyramidal neurons - mediation by arachidonic-acid and its metabolites. *The Journal of Neuroscience* 13:2033-2049.
- [155] Schwindt PC, Spain WJ, Foehring RC, Stafstrom CE, Chubb MC, Crill WE (1988) Multiple potassium conductances and their functions in neurons from cat sensorimotor cortex in vitro. *Journal of Neurophysiology* 59:424-449.
- [156] Segal M (1983) Rat hippocampal neurons in culture: responses to electrical and chemical stimuli. *Journal of Neurophysiology* 50:1249-1264.
- [157] Segal M, Barker J (1984) Rat hippocampal neurons in culture: potassium conductances. *Journal of Neurophysiology* 51:1409-1433.
- [158] Selyanko A, Hadley J, Wood I, Abogadie F, Delmas P, Buckley N, London B, Brown D (1999) Two types of K(+) channel subunit, Erg1 and KCNQ2/3, contribute to the M-like current in a mammalian neuronal cell. *The Journal of Neuroscience* 19:7742-7756.
- [159] Selyanko A, Hadley J, Wood I, Abogadie F, Jentsch T, Brown D (2000) Inhibition of KCNQ1-4 potassium channels expressed in mammalian cells via M1 muscarinic acetylcholine receptors. *The Journal of Physiology* 522 Pt 3:349-355.
- [160] Selyanko AA, Hadley JK, Brown DA (2001) Properties of single M-type KCNQ2/KCNQ3 potassium channels expressed in mammalian cells. *Journal of Physiology-London* 534:15-24.
- [161] Serodio P, Rudy B (1998) Differential expression of Kv4 K⁺ channel subunits mediating subthreshold transient K⁺ (A-type) currents in rat brain. *Journal of Neurophysiology* 79:1081-1091.
- [162] Shah MM, Mistry M, Marsh SJ, Brown DA, Delmas P (2002) Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Physiology-London* 544:29-37.

- [163] Shahidullah M, Santarelli LC, Wen H, Levitan IB (2005) Expression of a calmodulin-binding KCNQ2 potassium channel fragment modulates neuronal M-current and membrane excitability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:16454-16459.
- [164] Shi G, Trimmer JS (1999) Differential asparagine-linked glycosylation of voltage-gated K⁺ channels in mammalian brain and in transfected cells. *Journal of Membrane Biology* 168:265-273.
- [165] Shin M, Chetkovich DM (2007) Activity-dependent regulation of h channel distribution in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of Biological Chemistry* 282:33168-33180.
- [166] Simeone TA, Rho JM, Baram TZ (2005) Single channel properties of hyperpolarization-activated cation currents in acutely dissociated rat hippocampal neurones. *Journal of Physiology-London* 568:371-380.
- [167] Singer S, Nicolson G (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
- [168] Singh NA, Westenskow P, Charlier C, Pappas C, Leslie J, Dillon J, Anderson VE, Sanguinetti MC, Leppert MF, Consortium BP (2003) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain* 126:2726-2737.
- [169] Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A, Anderson VE, Leppert M (1998) A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature Genetics* 18:25-29.
- [170] Smith JS, Iannotti CA, Dargis P, Christian EP, Aiyar J (2001) Differential expression of KCNQ2 splice variants: Implications to M current function during neuronal development. *The Journal of Neuroscience* 21:1096-1103.
- [171] Spigelman I, Zhang L, Carlen PL (1992) Patch-clamp study of postnatal-development of CA1 neurons in rat hippocampal slices - membrane excitability and K⁺ currents. *Journal of Neurophysiology* 68:55-69.
- [172] Stackman RW, Hammond RS, Linardatos E, Gerlach A, Maylie J, Adelman JP, Tzounopoulos T (2002) Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels modulate synaptic plasticity and memory encoding. *The Journal of Neuroscience* 22:10163-10171.
- [173] Stocker M, Krause M, Pedarzani P (1999) An apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ current in hippocampal pyramidal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:4662-4667.

- [174] Storm JF (1987) Action-potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *Journal of Physiology-London* 385:733-759.
- [175] Storm JF (1988a) 4 voltage-dependent potassium currents in adult hippocampal pyramidal neurons (HPCS). *Biophysical Journal* 53:A148-A148.
- [176] Storm JF (1988b) Temporal integration by a slowly inactivating K⁺ current in hippocampal-neurons. *Nature* 336:379-381.
- [177] Storm JF (1989) An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *Journal of Physiology-London* 409:171-190.
- [178] Storm JF (1990) Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Progress in Brain Research* 83:161-187.
- [179] Su HL, Alroy G, Kirson ED, Yaari Y (2001) Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience* 21:4173-4182.
- [180] Surges R, Brewster AL, Bender RA, Beck H, Feuerstein TJ, Baram TZ (2006) Regulated expression of HCN channels and cAMP levels shape the properties of the h current in developing rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 24:94-104.
- [181] Takahashi T (1990) Membrane currents in visually identified motoneurons of neonatal rat spinal-cord. *Journal of Physiology-London* 423:27-46.
- [182] Tinel N, Lauritzen I, Chouabe C, Lazdunski M, Borsotto M (1998) The KCNQ2 potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with KCNQ3. *FEBS Letters* 438:171-176.
- [183] Tokimasa T, Akasu T (1990) ATP regulates muscarine-sensitive potassium current in dissociated bull-frog primary afferent neurones. *The Journal of Physiology* 426:241-264.
- [184] Tsai B, Ye YH, Rapoport TA (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3:246-255.
- [185] Turrigiano GG, Nelson SB (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 5:97-107.
- [186] Ulens C, Tytgat J (2001) Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *Journal of Biological Chemistry* 276:6069-6072.
- [187] Van Wart A, Matthews G (2006) Impaired firing and cell-specific compensation in neurons lacking nav1.6 sodium channels. *The Journal of Neuroscience* 26:7172-7180.

- [188] Vasilyev D, Barish M (2002) Postnatal development of the hyperpolarization-activated excitatory current Ih in mouse hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience* 22:8992-9004.
- [189] Viana F, Bayliss DA, Berger AJ (1993) Multiple potassium conductances and their role in action-potential repolarization and repetitive firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *Journal of Neurophysiology* 69:2150-2163.
- [190] Wang HS, Pan ZM, Shi WM, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D (1998) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: Molecular correlates of the M-channel. *Science* 282:1890-1893.
- [191] Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, deJager T, Schwartz PJ, Towbin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genetics* 12:17-23.
- [192] Wann K, Goodwin P, Richards C (1999) High activity K⁺ channels in rat hippocampal neurones maintained in culture. *Experimental Physiology* 84:501-514.
- [193] Watanabe I, Zhu J, Recio-Pinto E, Thornhill WB (2004) Glycosylation affects the protein stability and cell surface expression of Kv1.4 but not Kv1.1 potassium channels - A pore region determinant dictates the effect of glycosylation on trafficking. *Journal of Biological Chemistry* 279:8879-8885.
- [194] Weber YG, Geiger J, Kampchen K, Landwehrmeyer B, Sommer C, Lerche H (2006) Immunohistochemical analysis of KCNQ2 potassium channels in adult and developing mouse brain. *Brain Research* 1077:1-6.
- [195] Williamson A, Alger BE (1990) Characterization of an early afterhyperpolarization after a brief train of action-potentials in rat hippocampal-neurons invitro. *Journal of Neurophysiology* 63:72-81.
- [196] Wuttke TV, Seeböhm G, Bail S, Maljevic S, Lerche H (2005) The new anticonvulsant retigabine favors voltage-dependent opening of the K(v)7.2 (KCNQ2) channel by binding to its activation gate. *Molecular Pharmacology* 67:1009-1017.
- [197] Wuttke TV, Jurkat-Rott K, Paulus W, Garncarek M, Lehmann-Horn F, Lerche H (2007) Peripheral nerve hyperexcitability due to dominant-negative KCNQ2 mutations. *Neurology* 69:2045-2053.
- [198] Yang J, Thio LL, Clifford DB, Zorumski CF (1993) Electrophysiological properties of identified postnatal rat hippocampal pyramidal neurons in primary culture. *Developmental Brain Research* 71:19-26.

- [199] Yang WP, Levesque PC, Little WA, Conder ML, Ramakrishnan P, Neubauer MG, Blannar MA (1998) Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *Journal of Biological Chemistry* 273:19419-19423.
- [200] Yuan W, Burkhalter A, Nerbonne J (2005) Functional role of the fast transient outward K⁺ current I_A in pyramidal neurons in (rat) primary visual cortex. *The Journal of Neuroscience* 25:9185-9194.
- [201] Yue CY, Yaari Y (2004) KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience* 24:4614-4624.
- [202] Zaczek R, Chorvat RJ, Saye JA, Pierdomenico ME, Maciag CM, Logue AR, Fisher BN, Rominger DH, Earl RA (1998) Two new potent neurotransmitter release enhancers, 10,10-bis(4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone and 10,10-bis(2-fluoro-4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone: Comparison to linopirdine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 285:724-730.
- [203] Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K-ATP channels. *Neuron* 22:537-548.
- [204] Zha QQ, Brewster AL, Richichi C, Bender RA, Baram TZ (2008) Activity-dependent heteromerization of the hyperpolarization-activated, cyclic-nucleotide gated (HCN) channels: role of N-linked glycosylation. *Journal of Neurochemistry* 105:68-77.
- [205] Zhang W, Linden DJ (2003) The other side of the engram: Experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nature Reviews Neuroscience* 4:885-900.
- [206] Zhou FM, Hablitz JJ (1996) Layer I neurons of the rat neocortex .2. Voltage-dependent outward currents. *Journal of Neurophysiology* 76:668-682.
- [207] Zhou ZF, Gong QM, January CT (1999) Correction of defective protein trafficking of a mutant HERG potassium channel in human long QT syndrome - Pharmacological and temperature effects. *Journal of Biological Chemistry* 274:31123-31126.

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1 Membranströme in hippocampalen Neuronen	3
Abb. 2 spannungsabhängige Kaliumströme in hippocampalen Neuronen.....	5
Abb. 3 Topologiemodell von α -Untereinheiten der K_v Kanäle.	12
Abb. 4 Die KCNQ/ K_v7 Kaliumkanalfamilie.....	16
Abb. 5 BFNS Mutationen der $K_v7.2$ und $K_v7.3$ Untereinheiten.....	18
Abb. 6 Lokalisation des embryonalen Hippokampus	27
Abb. 7 Schema der unterschiedlichen Messkonfigurationen der Patch-Clamp- Technik und ihre Herstellung	32
Abb. 8 Schema des Axoclamp 200B	33
Abb. 9 Aufbau des Patch-Clamp Messplatzes	34
Abb. 10 Vereinfachtes elektrisches Ersatzbild des Patch-Clamp Experiments....	38
Abb. 11 Protokolle und Datenauswertung der Ganzzellableitungen in CHO	44
Abb. 12 Auswertung der Einzelkanalmessungen in CHO Zellen	45
Abb. 13 Auswertung der M-Stromamplitude	47
Abb. 14 Analyse der Aktionspotentiale	47
Abb. 15 Bestimmung der Aktionspotentialfrequenz	48
Abb. 16 Bestimmung der mAHP ($\blacktriangle$) bzw. ADP (*) nach einzelnen Aktionspotentialen	49
Abb. 17 Bestimmung der Aktionspotentialadaptation	49
Abb. 18 Bestimmung der transienten Kaliumströme.....	50
Abb. 19 N258S Expression in Xenopus Oozyten.....	52
Abb. 20 Funktionelle Expression von N258S in CHO Zellen	54
Abb. 21 Parameter der Aktivierung und Deaktivierung	55
Abb. 22 Dominant-negativer Effekt der N258S Mutation auf Wildtypströme.....	56
Abb. 23 Expression der Fusionsproteine in CHO Zellen.....	57
Abb. 24 Einzelkanalanalyse in CHO Zellen	59
Abb. 25 Immunofluoreszenz	63
Abb. 26 „Temperature Rescue“	65
Abb. 27 „Pharmacological Rescue“	67
Abb. 28 Entwicklung des Eingangswiderstand, der Kapazität und des Ruhepotentials	72
Abb. 29 Entwicklung des M-Stroms	75
Abb. 30 Entwicklung der mAHP.....	76
Abb. 31 Entwicklung der Feuerungsrate	78
Abb. 32 Unterschiede in der Adaptation	79
Abb. 33 I_{Na} und I_{tK}	81
Abb. 34 H-Strom	83
Abb. 35 M-Strom bei [-/-] Neuronen.....	85
Abb. 36 Feuerungsverhalten von [-/-] Neuronen.....	86
Abb. 37 Konservierung der Aminosäurenposition 258	87
Tabelle 1 Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchung der N258S Mutation	61
Tabelle 2 Zusammensetzung der Ergebnisse in Bezug auf Anzahl der Föten unterschiedlicher Muttertiere (MT).....	69
Tabelle 3 Entwicklung der Aktionspotentiale.....	73

DANKSAGUNGEN

Diese Arbeit wurde in den Abteilungen Angewandte Physiologie und Neurologie der Universität Ulm unter der Betreuung von Prof. Dr. Holger Lerche durchgeführt.

Allen voran möchte ich Herrn Prof. Dr. Holger Lerche für seine Unterstützung und Hilfe nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht sondern in jeglicher Situation danken, wodurch die Verwirklichung aller meiner Ideen und Wünsche ermöglicht wurde.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Snezana Maljevic für die Durchführung der Immunofluoreszenzexperimente und für die Betreuung.

Jeannette Liebrich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und der Mäusepräparation.

Yunxiang Liao und Georgeta Teodorescu für Spaß im Labor.

Astrid Bellan-Koch und Alberto Varga für die fleißige Arbeit im Hintergrund und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die noch nicht genannt wurden, für ihre wissenschaftliche Unterstützung und der angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Christine möchte ich für ihre scheinbar unendliche Geduld, Unterstützung und Liebe danken.

Schließlich gilt mein herzlichster Dank meinen Eltern und Brüdern für ihre Unterstützung und Liebe, ohne die ich nicht der Mensch wäre, der ich bin.

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes in der
Elektronischen Version entfernt.