

Funktionelle Auswirkungen Epilepsie-assoziiierter Kaliumkanalmutationen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Yvonne Füll
aus Langen

Tübingen
2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

22.07.2013

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Holger Lerche

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Doron Rapaport

Für meinen Bruder Benjamin.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| 1. <u>Einleitung</u> | 1 |
| 1.1 Ionenkanäle | 1 |
| 1.1.1 Spannungsgesteuerte Ionenkanäle | |
| 1.1.2 Ligandengesteuerte Ionenkanäle | 2 |
| 1.2 Epilepsie | |
| 1.2.1 Neuronale Erregbarkeit und Epilepsie | 3 |
| 1.3 K _v Kanäle | 4 |
| 1.3.1 K _v 7 Kanäle und BFNS | 5 |
| 1.3.2 M-Strom | 8 |
| 1.4 Untersuchung von Ionenkanalerkrankungen | 9 |
| 1.4.1 Untersuchungsmethoden und Wahl des Expressionssystems | |
| 1.4.2 Möglichkeiten der Transfektion | 10 |
| 1.4.3 Mausmodelle | 11 |
| 1.5 Zielsetzung | 12 |
| 2. <u>Material und Methoden</u> | 14 |
| 2.1 Material | 14 |
| 2.1.1 Chemikalien | |
| 2.1.2 Enzyme | |
| 2.1.3 Primer | |
| 2.1.4 Vektoren | 15 |
| 2.1.5 Lösungen, Puffer und Medien | 17 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.2 | Molekularbiologische Methoden | 20 |
| 2.2.1 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR): | |
| 2.2.2 | Agarose-Gelelektrophorese | |
| 2.2.3 | Extraktion von DNA aus Agarosegelen | 21 |
| 2.2.4 | Restriktionsverdau von DNA | |
| 2.2.5 | Transformation von kompetenten Zellen | |
| 2.2.6 | Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien | 22 |
| 2.2.7 | Sequenzierung | |
| 2.2.8 | Mutagenese | 23 |
| 2.2.9 | Klonierung von K _v 7.2 WT und Mutationen in lentivirale Vektoren | 24 |
| 2.2.9.1 | Gateway-System: Klonierung in TOPO Donorvektor | |
| 2.2.9.2 | Rekombination in Ziel-Lenti-Vektor | |
| 2.2.10 | Genotypisierung | 25 |
| 2.3 | Biochemische Methoden | 26 |
| 2.3.1 | Biotinylierungs-Assay zur Gewinnung von Membranproteinen | |
| 2.3.2 | Herstellung von Proteingesamtlysaten | |
| 2.3.3 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 27 |
| 2.3.4 | Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot | |
| 2.4 | Zellkultur | 28 |
| 2.4.1 | Kultivierung der Säugerzelllinie CHO | |
| 2.4.1.1 | Transfektion von CHO-Zellen | |
| 2.4.2 | Herstellung von primären hippokampalen Nervenzellkulturen | |
| 2.4.3 | Virenproduktion: Transfektion der Produzier-Zelllinie | 30 |
| 2.4.4 | Virenernte | |
| 2.4.5 | Infektion der Zielzellen | 31 |
| 2.4.6 | Transfektion neuronaler Kulturen mit Optifect | |
| 2.5 | Immunzytochemische Färbungen | 32 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.6 | Elektrophysiologie | 32 |
| 2.6.1 | Voltage-Clamp Messungen von Kaliumströmen in CHO-Zellen | 34 |
| 2.6.1.1 | Messprotokolle | |
| 2.6.2 | Voltage-Clamp Messungen von M-Strom in Neuronen | 35 |
| 2.6.2.1 | Messprotokoll | 36 |
| 2.6.3 | Current-Clamp Messungen von Aktionspotentialen in Neuronen | |
| 2.6.4 | Messung der Netzwerkaktivität auf Multielektroden-Arrays (MEAs) | 37 |
| 2.7 | Datenanalyse | 38 |
| 3. | <u>Ergebnisse</u> | 41 |
| 3.1 | Charakterisierung eines hoch konservierten Threonin-Restes im S1-S2-Loop von $K_V7.2$ und $K_V7.3$ | 41 |
| 3.1.1 | Mutation von Thr zu Ala führt zu verringerten Kalium- Strömen | 42 |
| 3.1.2 | $K_V7.2T114A$ zeigt eine Verschiebung der Aktivierungskurve sowie veränderte Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik | 43 |
| 3.1.3 | Die Effekte des Threoninaustauschs auf die Funktion heteromerer $K_V7.2/K_V7.3$ -Kanäle sind ähnlich wie bei Homomeren | 45 |
| 3.1.4 | Die immunzytochemische Analyse zeigt keine Unterschiede von Lokalisation oder Oberflächenexpression der mutierten Kanäle | 47 |
| 3.1.5 | Nachweis der Oberflächenproteine mittels Biotinylierung und Quantifizierung im Western Blot | 47 |

| | | |
|---------|---|-----------|
| 3.2 | Untersuchung verschiedener Epilepsie-assoziiertes <i>KCNQ2</i> - Mutationen in neuronalen <i>KCNQ2</i> +/- Kulturen mittels lentiviraler Expression | 49 |
| 3.2.1 | Optimierung der lentiviralen Konstrukte | 49 |
| 3.2.2 | Fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der Expression des GFP-markierten Kanals | 51 |
| 3.2.3 | Verifizierung der Expression mittels Western Blot Analyse | 53 |
| 3.2.4 | Verifizierung der Expression mittels Immunfärbung | 54 |
| 3.2.5 | Elektrophysiologische Untersuchung infizierter <i>KCNQ2</i> +/- Neuronenkulturen | 57 |
| 3.2.5.1 | M-Strom: Größe und Aktivierung | |
| 3.2.5.2 | Feuerungsverhalten | 59 |
| 3.2.5.3 | Netzwerk-Feuerungsverhalten auf Multielektroden-Arrays (MEAs) | 63 |
| 4. | <u>Diskussion</u> | <u>73</u> |
| 4.1 | Charakterisierung eines hoch konservierten Threonin-Restes im S1-S2-Loop von $K_v7.2$ und $K_v7.3$ | 73 |
| 4.2 | Untersuchung verschiedener Epilepsie-assoziiertes <i>KCNQ2</i> - Mutationen in neuronalen <i>KCNQ2</i> +/- Kulturen mittels lentiviraler Expression | 76 |
| 5. | <u>Zusammenfassung</u> | <u>82</u> |
| 6. | <u>Literaturverzeichnis</u> | <u>84</u> |
| 7. | <u>Anhang</u> | <u>94</u> |
| 7.1 | Danksagung | 94 |
| 7.2 | Lebenslauf | 96 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| 4-AP | 4-Aminopyridin |
| A | Adenin |
| amp | Ampicillin |
| AP | Aktionspotential |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BFNS | benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| CamKII | Calmodulin Kinase II |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CHO | Chinesische Hamster Ovarienzellen |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DIV | <i>Days in vitro</i> , Tage in vitro |
| DMEM | Dulbecco`s modified eagle medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EEG | Elektroenzephalografie |
| EGTA | Ethylenglycoltetraessigsäure |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| FKS | Fötales Kälberserum |
| G | Guanin |
| GABA | γ -Aminobuttersäure |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| HBSS | Hanks balanced salt solution |
| HEK | humane embryonale Nierenzellen |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| IBI | Inter-Burst-Intervall |
| ISI | Inter-Spike-Intervall |
| K.O. | <i>Knock-Out</i> |
| kb | Kilobasen |
| <i>KCNQ</i> | Kaliumkanalgen |
| kDa | Kilodalton |
| K _v | Spannungsabhängiger Kaliumkanal |
| MAP2 | <i>microtubule-associated protein 2</i> |
| MEA | Multielektroden-Array |
| n.s. | (statistisch) nicht signifikant |
| PB | <i>Population Burst</i> |
| PBS | Phosphat gepufferte Saline |
| PDL | Poly-D-Lysin |
| PFR | <i>Peak Firing Rate</i> |

| | |
|------------------|--|
| Phe | Phenylalanin |
| PI | post-Infektion |
| PNH | Neuromyotonie |
| ROCK | <i>Rho-associated kinase</i> |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| S1 - S6 | Transmembransegment in der α -Untereinheit von Ionenkanälen |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylgelelektrophorese |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| Thr | Threonin |
| Tyr | Tyrosin |
| UE | Untereinheit |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumen zu Volumen |
| V _{0.5} | Halbmaximale Aktivierung |
| w/v | Gewicht zu Volumen |
| WT | Wildtyp |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

1. Einleitung

1.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind Transmembranproteine, die selektive Poren für Na^+ , K^+ , Cl^- - oder Ca^{2+} - Ionen bilden. Sie öffnen und schließen als Antwort auf Stimuli und bieten die Möglichkeit, elektrisch geladene Teilchen über Zellmembranen zu schleusen, was sonst eine Barriere darstellt. Durch unterschiedliche Ladungsverteilung besitzen Nervenzellmembranen ein Ruhemembranpotential von etwa -70 mV und sind somit polarisiert. Durch den Fluss von Ionen über die Membran wird die Zelle entweder de- oder hyperpolarisiert. Erreicht die Zelle bei Depolarisation einen Schwellwert, wird ein Aktionspotential ausgelöst, welches dann entlang des Axons propagiert. An den axonalen Enden erfolgt die Ausschüttung von Neurotransmittern und somit die Übertragung des Signals auf weitere Nervenzellen. Für diese Prozesse ist eine Vielzahl verschiedener Ionenkanäle nötig (Kandel et al. 2000, Ashcroft 1999).

1.1.1 Spannungsgesteuerte Ionenkanäle

Spannungsgesteuerte Ionenkanäle öffnen als Antwort auf Änderung des Membranpotentials. Im Anschluss schließen sie wieder. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen geöffneter (*open*; O) und geschlossener Konformation (*closed*; C), die von den Zeitkonstanten der Aktivierung und Deaktivierung abhängen: $C \rightleftharpoons O$.

Manche Kanäle inaktivieren und können dann erst nach einer gewissen Erholungszeit erneut öffnen. Der Durchfluss der Ionen erfolgt dabei hoch selektiv. Die spannungsgesteuerten Kationenkanäle für K^+ , Na^+ und Ca^{2+} bestehen aus einer so genannten Hauptuntereinheit α , die sich zu einem Tetramer anordnet um die Pore zu bilden, wobei jede dieser 4 Untereinheiten (UE) aus 6 Transmembransegmenten (S1 - S6) besteht. Das S4-Segment beinhaltet 4 – 8 positiv geladene Reste, die den Spannungssensor bilden. Die Schleife zwischen S5 und S6 bildet die Pore mit Selektivitätsfilter, N- und C-Terminus befinden sich auf der cytosolischen Membranseite (Abb.1). Viele

dieser Kanäle werden durch kleinere β , γ oder δ - UE modifiziert und reguliert (Lehmann-Horn und Jurkatt-Rott 1999).

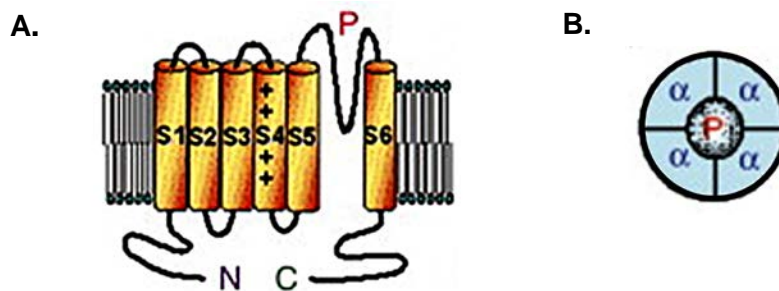


Abb.1:

A. Struktur (schematisch) eines spannungsgesteuerten Kaliumkanals (α -UE). Bei Na^+ und Ca^{2+} - Kanälen werden alle 4 UE von einem Gen kodiert und als Domänen bezeichnet.

B. 4 α -UE lagern sich tetramerisch zusammen und bilden die Pore (P).

(Bild verändert aus Li et al. 2010).

1.1.2 Ligandengesteuerte Ionenkanäle

Ligandengesteuerte Ionenkanäle werden durch die Bindung verschiedener Neurotransmitter aktiviert, wie z.B. Acetylcholin, γ -Aminobuttersäure (GABA), Glutamat, Glyzin oder Nukleotide. Die Kanäle werden in der Regel aus 4 – 5 Untereinheiten gebildet (Ashcroft 1999). Exzitatorische Rezeptoren sind meist permeabel für Kationen und inhibitorische Rezeptoren für Anionen (Lerche et al. 2001). Bei der Nervenreizweiterleitung gelangt der Reiz in Form von Aktionspotentialen an die Prä-Synapse, wo Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt werden und an Rezeptoren von Post-Synapsen binden können, um ein exzitatorisches oder inhibitorisches Signal weiterzuleiten (Hille 2001).

1.2 Epilepsie

Epilepsie ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen mit einer Lebenszeitinzidenz von etwa 3 % (Hauser et al. 1996). Sie ist durch das Auftreten wiederkehrender, unprovoked epileptischer Anfälle gekennzeichnet, die durch unkontrollierte, synchrone elektrische Entladungen im Gehirn ausgelöst werden (Weber und Lerche 2008). Die Art und Ursache eines epileptischen Anfalls kann allerdings sehr unterschiedlich ausfallen. Man

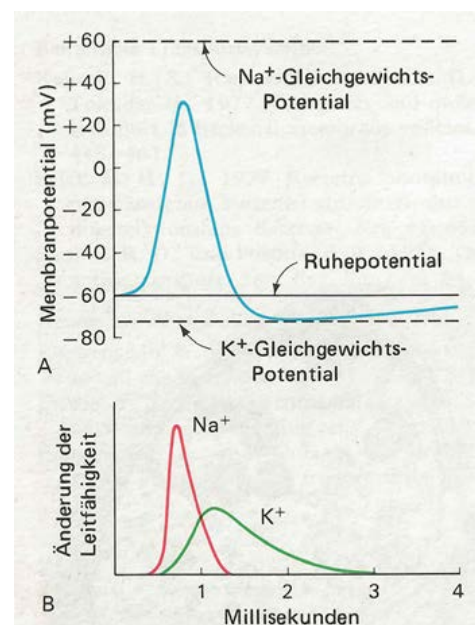
unterscheidet zunächst symptomatische Epilepsien, bei denen Anfälle z.B. durch eine Läsion im Gehirn oder einen Tumor ausgelöst werden, von idiopathischen Epilepsien, die mehr als 40 % der Epilepsien ausmachen. Diesen liegt meist eine genetische Ursache zugrunde, wobei nicht bei allen Patienten der krankheitsauslösende Gendefekt identifiziert werden kann und häufig erst eine Kombination genetischer Varianten zu Anfällen führt (Weber und Lerche 2008). Eine Vielzahl an Epilepsiegenen konnte in den letzten Jahren allerdings identifiziert und der pathogene Effekt teilweise aufgeklärt werden, wodurch nun vielen Patienten durch gezielte Therapie geholfen werden kann. Der größte Teil der Epilepsie-assoziierten Genmutationen führt zu Ionenkanaldefekten (Mulley et al. 2003). Da Ionenkanäle essentielle Rollen in der Neurotransmission spielen, können Funktionsverluste zu übererregten Nervenzellen führen, was epileptische Anfälle auslösen kann.

1.2.1 Neuronale Erregbarkeit und Epilepsie

Im zentralen Nervensystem (ZNS) herrscht ein Gleichgewicht aus exzitatorischen und inhibitorischen Signalen, um die Nervenreizweiterleitung zu regulieren (Lerche et al. 2001). Wird dieses Gleichgewicht gestört, kann es zu unkontrollierten Entladungen kommen, die sich dann z.B. in Form eines epileptischen Anfalles auswirken. Die Basis für die Nervenreizweiterleitung über Aktionspotentiale und synaptische Übertragung bilden eine Vielzahl von Ionenkanälen (Hille 2001). Die Generierung eines Aktionspotentials geschieht am Axoninitialsegment durch Öffnen spannungsgesteuerter Na^+ -Kanäle, wenn ein Reiz zur Depolarisation vom Ruhemembranpotential über einen Schwellwert führt. Der Einstrom von Natrium in die Zelle führt zur weiteren Depolarisation des Neurons, die Kanäle inaktivieren und es kommt zur Öffnung spannungsgesteuerter K^+ -Kanäle. Durch die erhöhte Leitfähigkeit der Membran für K^+ mit Konzentrationsgradienten nach Außen kommt es zur Repolarisation und zum Wiederaufbau des Ruhemembranpotentials (Abb.2). Kurz nach der Depolarisationsphase folgt eine Refraktärzeit, in der die Zelle für kurze Zeit nicht mehr erregbar ist, bis der Ausgangszustand wieder erreicht ist. Das Aktionspotential propagiert entlang des Axons bis zu den Nervenenden, wo es zur Freisetzung von Neurotransmittern kommt. Führen Kanalmutationen zur unvollständigen Inaktivierung der Na^+ -Kanäle oder reduziertem K^+ -Fluss über

die Membran, kann es zur unvollständigen Repolarisation und damit zur Übererregbarkeit von Nervenzellen führen, was als Hauptursache krankheitsauslösender Kanaldefekte gilt (Lerche et al. 2001; Kullmann 2002). Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle regulieren die Transmitterfreisetzung an den Nervenenden und spielen daher ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Nervenreizweiterleitung. Epilepsie-assoziierte Ionenkanaldefekte sind häufig in Natriumkanälen von exzitatorischen und inhibitorischen Nervenzellen, in GABA-Rezeptoren, oder Kanälen am Axoninitialsegment zu finden, die bei Dysfunktion neuronale Übererregbarkeit verursachen (Lerche et al. 2013; Vacher et al. 2012). Auch therapeutisch sind Ionenkanäle höchstrelevant, da die meisten Antiepileptika Ionenkanäle modulieren und z.B. als Inhibitoren exzitatorischer Na^+ - oder Ca^{2+} -Kanäle fungieren oder die inhibitorischen Antworten von GABA-Rezeptoren erhöhen (Macdonald und Kelly 2007). Dadurch kann eine Übererregbarkeit verringert und Anfälle können verhindert werden.

Abb.2: Aktionspotential;
Zeitverlauf für (A) Änderung des Membranpotentials und (B) Änderung der Leitfähigkeit für Na^+ und K^+ -Ionen. Bei Depolarisation durch einen Reiz erhöht sich die Leitfähigkeit für Na^+ und Erreichen eines Schwellwerts führt zur Depolarisation. Öffnen von K^+ -Kanälen leitet im Anschluß die Repolarisation ein.
 (Bild aus Lubert Stryer (1987), Biochemie)

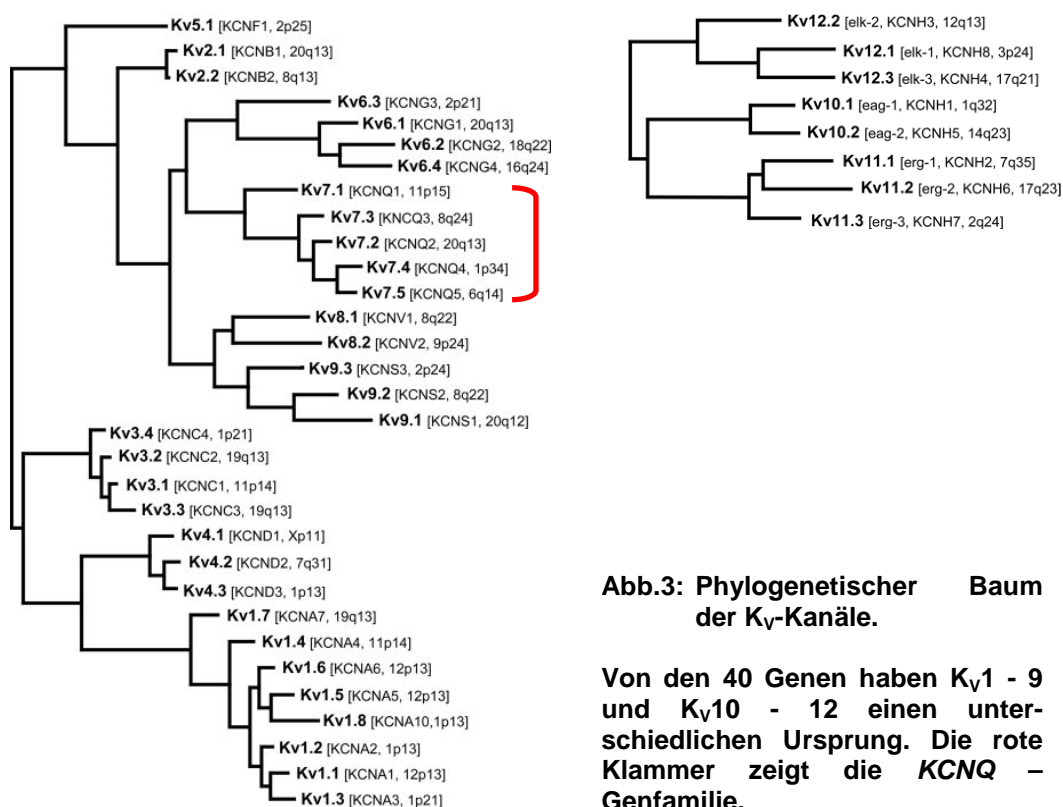


1.3 K_V Kanäle

Die α -Untereinheiten spannungsgesteuerter Kaliumkanäle (K_V) werden von 40 Genen kodiert, wodurch sie zu einer der größten Gruppen von Ionenkanälen zählen (Gutman et al. 2005).

Diese Kanäle spielen essentielle Rollen bei diversen physiologischen Prozessen, z.B. bei der Repolarisation von Aktionspotentialen, Regulation von Zellwachstum, -migration und -volumen sowie Kalzium-Signalübermittlung

(Wulff et al. 2009). Der Aufbau von K_V -Kanälen ist entsprechend dem der spannungsgesteuerten Ionenkanäle und wird unter 1.1.1 näher beschrieben. Die leitfähige Pore wird durch Zusammenlagerung von 4 α -Untereinheiten gebildet (Long et al. 2005). Durch modulierende β -Untereinheiten, akzessorische Proteine und alternatives Spleissen wird eine unglaublich hohe Diversität erlangt, welche zusätzlich erweitert wird durch die Fähigkeit, heteromere Kanäle aus unterschiedlichen α -Untereinheiten auszubilden.



1.3.1 K_V7 Kanäle und BFNS

Fünf *delayed rectifier*, langsam oder nicht-inaktivierende K_V7 Kanäle ($K_V7.1 - 7.5$) werden von der $KCNQ$ Genfamilie (Abb.3) kodiert. $K_V7.1$ wird hauptsächlich im Herzmuskel exprimiert und Mutationen in diesem Kanal können zu Herzrhythmusstörungen beim Long-QT Syndrom führen (Wang et al. 1996). $K_V7.1$ und $K_V7.4$ sind außerdem im Innenohr lokalisiert und Dysfunktion von $K_V7.4$ kann zu Taubheit führen (Kubisch et al. 1999). $K_V7.2 - K_V7.5$ sind überwiegend im zentralen Nervensystem zu finden. $K_V7.5$ ist außerdem im Skelettmuskel nachweisbar, jedoch konnte noch keine pathogene

Mutation in *KCNQ5* nachgewiesen werden und die genaue Funktion der Untereinheit ist bislang unklar. Zusammen mit $K_v7.3$ kann sie funktionelle Kanäle ausbilden, was aber eine geringere Präferenz im Vergleich zu $K_v7.2/K_v7.3$ Heteromeren hat (Jentsch 2000; Robbins 2001; Brown und Passmore 2009).

Mutationen in den Genen *KCNQ2* und *KCNQ3* ($K_v7.2$ und $K_v7.3$) konnten als Ursache für eine spezielle Form der Epilepsie bei Neugeborenen identifiziert werden- den benignen familiären neonatalen Anfällen (BFNS) (Biervert et al. 1998; Charlier et al. 1998; Singh et al. 1998). Diese Anfälle entstehen in den ersten Lebenstagen und verschwinden nach Wochen bis Monaten wieder spontan (Plouin 1994). Es wird als seltenes, dominant vererbtes Epilepsiesyndrom eingestuft (Lerche et al. 2001). Das Anfallsrisiko später liegt bei etwa 15 %. Warum die Anfälle wieder verschwinden ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine mögliche Erklärung für das Sistieren der Anfälle ist, dass die Kanäle früh in der Entwicklung mit geringerer Dichte exprimieren und der Strom bei mehr depolarisierten Potentialen aktiviert wird (Safiulina et al. 2008), wodurch Kanaldefekte in dieser Entwicklungsphase zu Anfällen führen können. Eine Reduktion des Stromes um 20 – 30 % ist ausreichend, um BFNS auszulösen (Schroeder et al. 1998). Es wird auch diskutiert, dass die in der frühen Entwicklung bestehende exzitatorische Wirkung von GABA die Anfallsanfälligkeit begünstigen könnte, was später durch die inhibitorische GABA-Wirkung ersetzt wird (Cherubini et al. 1991). $K_v7.2/K_v7.3$ - Kanäle sind in den meisten Regionen des Gehirns zu finden, wobei sie hauptsächlich am Axoninitialsegment lokalisiert sind (Cooper 2011). Das Expressionsmuster verändert sich aber im Laufe der frühen Entwicklung (Maljevic et al. 2008), was auch Einfluss auf die Erregbarkeit der Nervenzellen haben kann.

Mittlerweile konnten über 50 Mutationen in den Genen *KCNQ2* und *KCNQ3* ermittelt werden, die zu BFNS führen (Abb.4) (Maljevic et al. 2008; Singh et al. 2003). Desweiteren konnten Mutationen im Spannungssensor von $K_v7.2$ nachgewiesen werden, die zu *Peripheral nerve hyperexcitability* (PNH) führen (Dedek et al. 2001; Wuttke et al. 2007). Neben dem ZNS werden die Kanäle auch in den peripheren Nerven exprimiert (Devaux et al. 2004). Eine Überaktivität der Muskulatur, wie es sich bei dieser Krankheit äußert, kann daher auch über diese Kanäle vermittelt werden. In der Regel führen die Mutationen zu einem Funktionsverlust der Kanäle, verringerten Kaliumströmen und damit zur Übererregbarkeit der Zellen.

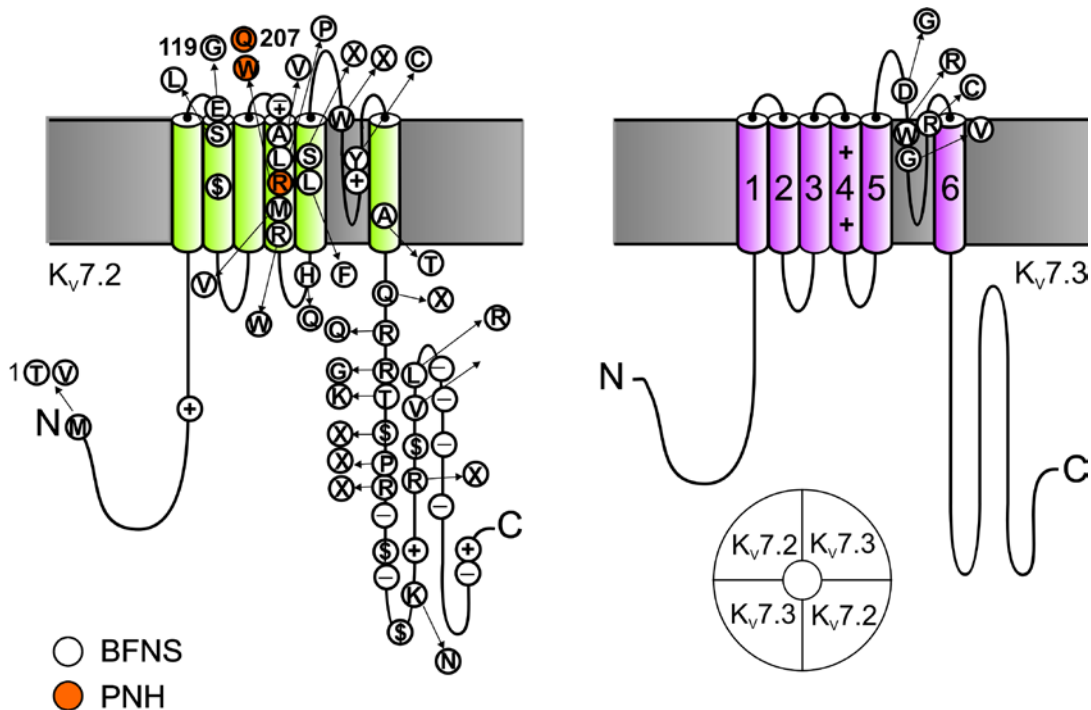


Abb.4:
Schematische Darstellung einer $K_v7.2$ und $K_v7.3$ UE mit Epilepsie- und PNH-assozierten Mutationen. Die meisten Mutationen sitzen im C-terminalen Bereich oder im Spannungssensor S4 (Transmembransegmente S1 – S6 in grün bzw. pink hinterlegt), bei $K_v7.3$ hauptsächlich in der Porenregion. 4 UE bilden einen vollständigen Kanal.

Die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen sind in verschiedenen Regionen des Kanals lokalisiert und verursachen unterschiedliche Symptome. Die Mutation von Arginin (R) an Position 207 im Spannungssensor (Abb.4) wird mit PNH in Verbindung gebracht, wobei Patienten, bei denen diese Aminosäure durch ein Tryptophan (W) ausgetauscht ist, zusätzlich an BFNS leiden (Dedek et al. 2001). Ein anderer Patient, bei dem dieser Rest durch ein Glutamin (Q) ersetzt ist, zeigt nur eine sporadische PNH (Wuttke et al. 2007). Experimentell konnten eine verlangsamte Aktivierung sowie Verschiebung der Aktivierungskurve zu depolarisierteren Potentialen in Kanälen mit diesen Mutationen nachgewiesen werden.

Eine weitere BFNS-assozierte Mutation liegt zwischen dem S5-Segment und dem Porenbereich (N258S) (Yalcin et al. 2007). Als Pathomechanismus für diese Mutation wurde ein Faltungs- und *Trafficking*-Defekt des Proteins mit verminderter Oberflächenexpression nachgewiesen, mit dominant-negativem Effekt auf Wildtyp-Kanäle (Maljevic et al. 2011). Das bedeutet, dass das

mutierte Genprodukt die Funktion des normalen Genproduktes stört oder aufhebt.

Die meisten Mutationen in $K_v7.2$ und $K_v7.3$, die zu einem Funktionsverlust des Kanals führen, liegen im Bereich des Spannungssensors, der Porenregion oder im C-terminalen Bereich (Abb.4). Im Bereich der S1/S2 – Segmente wurden lediglich 2 mit Epilepsie assoziierte Mutationen identifiziert (E119G und S122L). Diese führen zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve zu depolarisierteren Potentialen im Subschwellenbereich von Aktionspotentialen (Hunter et al. 2006; Wuttke et al. 2008). Auf welche Weise genau Mutationen in diesem Bereich Auswirkungen auf die Funktion des Kanals haben können, ist noch unklar. Vermutlich stabilisieren Reste im S1/S2-Bereich die Poren- und/ oder Spannungssensorregion (Wuttke et al. 2008; Lee et al. 2009).

1.3.2 M-Strom

1998 wurden $K_v7.2/ K_v7.3$ Kanäle als das molekulare Korrelat des sogenannten M-Stroms identifiziert (Wang et al. 1998). Dieser wurde 1980 erstmals von Brown und Adams in sympathischen Ganglien des Ochsenfrosches als langsam aktivierender und deaktivierender Kaliumstrom beschrieben, der keine Inaktivierung zeigt (Brown und Adams 1980). Ein weiterer Unterschied zu diversen „*delayed rectifier*“ Kaliumkanälen ist der sigmoidale Verlauf der Stromkurve nach Aktivierung der Kanäle, welche bei negativeren Potentialen ausgelöst wird (ca. -60 mV). Aufgrund seiner Eigenschaft, durch muskarine Rezeptoragonisten inhibiert zu werden, wurde er als „M-Strom“ bezeichnet (Brown und Adams 1980). Der M-Strom reguliert das Feuerungsverhalten von Nervenzellen im Subschwellenbereich und ist damit von großer Bedeutung für die Erregbarkeit der Zelle sowie die Reizweiterleitung (Marrion 1997). Auch $K_v7.5$ -Untereinheiten können funktionelle heteromere Kanäle mit $K_v7.3$ -Untereinheiten ausbilden, und eine Beteiligung solcher Kanäle am M-Strom in Nervenzellen ist sehr wahrscheinlich (Lerche et al. 2000; Robbins 2001; Schroeder et al. 2000; Shah et al. 2002).

In heterologen Expressionssystemen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Ströme von ko-exprimierten $K_v7.2/ K_v7.3$ Untereinheiten etwa 10-mal größer sind als die Ströme von homotetrameren Kanälen (Schroeder et al 1998; Wang et al 1998). Dies wird u.a. durch eine erhöhte Anzahl von Kanälen

in der Membran und eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der Heteromeren erklärt (Schwake et al. 2000). Diese Studien zeigen aber auch, dass die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften denen des nativen M-Stroms entsprechen.

Für verschiedene Mutationen in *KCNQ2* und *KCNQ3* konnte nachgewiesen werden, dass eine Reduktion des M-Stroms zu übererregbaren Zellen und somit zu Anfällen führt (Jentsch 2000; Brown und Passmore 2009). Außerdem wurde gezeigt, dass durch spezifische Inhibition des M-Stroms die Aktionspotentialfrequenz in sympathischen Ratten-Neuronen erhöht wird (Abb.5) (Delmas und Brown 2005).

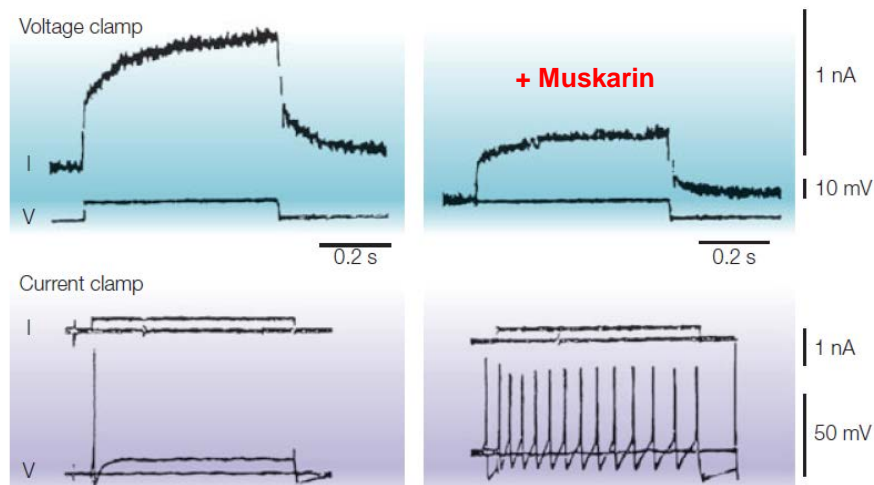


Abb.5:
Aufnahmen des M-Stroms mit sigmoidalem Kurvenverlauf ohne Inaktivierung (Voltage-Clamp) und Aktionspotentiale (Current-Clamp) in Neuronen. Nach Inhibition durch Muskarin ist der M-Strom verringert und die Feuerungsrate erhöht (aus Delmas und Brown, 2005)

1.4 Untersuchung von Ionenkanalerkrankungen

1.4.1 Untersuchungsmethoden und Wahl des Expressionssystems

Die funktionellen Auswirkungen von Ionenkanalmutationen können in heterologen Expressionssystemen untersucht werden. Hierzu wird die für den Kanal kodierende cDNA oder RNA in die verwendete Zelllinie eingebracht, die

dann den Kanal exprimiert und weiter analysiert werden kann. Durch Markierung oder Anfärben der Kanäle kann man zum einen die Expression und Lokalisation mutierter Kanäle mit Wildtyp-Kanälen vergleichen. Außerdem kann der Ionenfluss durch den Kanal elektrophysiologisch charakterisiert werden, um pathogene Mechanismen nachweisen und nachvollziehen zu können.

Frosch-Oozyten von *Xenopus laevis* haben sich durch ihre einfache Handhabung für solche Experimente bewährt (Dascal 1987). Säugerzelllinien wie HEK oder CHO werden auch gerne verwendet, da sie physiologischere Bedingungen erfüllen (Pusch 2008). Da diese Zellen aber auch endogene Kanäle besitzen, ist dies zu berücksichtigen wenn man die Ströme seines zusätzlich exprimierten Kanals separat analysieren möchte. Für die Untersuchung von Kaliumkanälen werden aus diesem Grund häufig CHO-Zellen verwendet, da diese keine endogenen Kaliumkanäle besitzen (Gamper et al. 2005).

Kaliumkanäle, die im Falle von Defekten im ZNS ein Ungleichgewicht bei der Nervenreizweiterleitung und somit Epilepsie verursachen, unterliegen einer komplexen Regulation durch diverse Faktoren (Delmas und Brown 2005). Daher wäre die direkte Untersuchung pathogener Effekte in Nervenzellen wünschenswert, da die physiologischen regulatorischen Komponenten dort größtenteils vorhanden sind. Auch der direkte Einfluss von Kanalmutationen auf das Feuerungsverhalten von Nervenzellen kann nur in diesen Zellen selbst elektrophysiologisch charakterisiert werden. Jedoch ist die Expression von Kanälen in Nervenzellen schwieriger als in den einfacheren Zelllinien und bedarf längerer Optimierung, da Nervenzellkulturen sehr sensitiv sind.

1.4.2 Möglichkeiten der Transfektion

Für das Einbringen von Fremd-DNA in Zellen gibt es mittlerweile eine Vielzahl optimierter Methoden, die eine hohe Effizienz und Viabilität der Zellen versprechen. Die meisten dieser Methoden gelangen aber an ihre Grenzen, wenn es um die erfolgreiche Transfektion von Nervenzellen geht.

Elektroporationsmethoden bringen DNA in Zellen durch elektrische Pulse, die Poren in der Zellmembran verursachen. Viele auf Lipid- oder Polymerbasis bestehende Reagenzien können über Endozytose oder Fusion mit der Zellmembran Moleküle in Zellen schleusen. Auch genetisch veränderte virale

Partikel können mittels Infektion von Zellen DNA einschleusen. Die Effizienz und Verträglichkeit jeder Methode muss allerdings für jede Zelllinie individuell getestet und optimiert werden- auch abhängig von den Eigenschaften der einzubringenden DNA. Mittlerweile findet man in der Literatur Beschreibungen der Vor- und Nachteile verschiedener Transfektionsmethoden auch für Nervenzellen (Karra und Dahm 2010; Washbourne 2002). Lentiviren haben den Vorteil, dass sie post-mitotische Zellen *in vitro* und *in vivo* mit hoher Effizienz und geringer Toxizität infizieren können und durch stabile Integration ins Genom z.B. auch in der Gentherapie Verwendung finden. Die Transduktion mittels Viren ist zwar zeitaufwändiger als viele herkömmliche Transfektionsmethoden, jedoch sehr vielversprechend bei schwierig zu transfizierenden Zellen wie Neuronen.

1.4.3 Mausmodelle

Die Auswirkungen von Kanalmutationen können auch anhand von Mausmodellen ermittelt werden. Es gibt die Möglichkeit, die Mutation in das Genom der Maus einzuführen („*Knock-In*“) oder das komplette Gen auszuschalten („*Knock-Out*“). Die so veränderten Mäuse können dann in Hinblick auf Anfallsentwicklung, Verhalten, neurologische Auffälligkeiten usw. untersucht werden. Desweiteren können die Nervenzellen auch elektrophysiologisch und immunhistochemisch charakterisiert werden, wodurch evtl. Pathomechanismen aufgeklärt werden können.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Kaliumkanäle existieren verschiedene Mausmodelle. Die erste *KCNQ2-Knock-Out* Maus wurde im Jahr 2000 von Watanabe *et al.* generiert und untersucht. Bei homozygoter Deletion des *KCNQ2*-Gens (-/-) sterben die Mäuse postnatal durch pulmonale Atelektase, die Ursache dafür ist bis heute noch nicht geklärt (Watanabe et al. 2000). Man konnte allerdings zeigen, dass *KCNQ*-Kanäle chemosensitive Neuronen im retrotrapezoiden Nukleus (RTN) regulieren, die an der Atmungskontrolle beteiligt sind (Hawryluk et al. 2012). Heterozygote Tiere entwickeln sich weitgehendst normal, zeigen aber eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber anfallsauslösenden Reagenzien, was auf eine Übererregbarkeit der Nervenzellen hinweist (Watanabe et al. 2000).

Es wurden außerdem verschiedene *Knock-in*-Modelle untersucht, die *KCNQ2* oder 3 Untereinheiten mit BFNS-assoziierten Mutationen exprimieren. Mäuse mit eingeführter *Missense*-Mutation zeigen reduzierte M-Ströme und spontane Anfälle bei homozygotem *Knock-in* und eine reduzierte Reizschwelle für induzierte Anfälle bei heterozygoten Tieren im Vergleich zum Wildtyp (Singh et al. 2008). Peters *et al.* nutzte eine dominant-negative *KCNQ2*-Mutation, um konditionelle transgene Mäuse herzustellen und zu untersuchen. Abhängig vom Zeitpunkt in der Entwicklung führte die Unterdrückung des M-Stroms auch bei diesen Mäusen zu spontanen Anfällen, Verhaltensauffälligkeiten und morphologischen Veränderungen im Hippokampus (Peters et al. 2004). Bei Patienten ist in der Regel nur ein Allel von der Mutation betroffen, d.h. etwa die Hälfte der gebildeten Kanaluntereinheiten ist fehlerhaft und die andere Hälfte normal. Um diese Situation in den Experimenten dieser Arbeit weitgehendst zu simulieren, sollen neuronale Kulturen von heterozygoten Tieren verwendet werden, die also noch die Hälfte der Kanäle exprimieren, und zusätzlich Kanaluntereinheiten mit Mutation zugeführt werden.

1.5 Zielsetzung

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Struktur-Funktions-Analyse von $K_v7.2$ und $K_v7.3$. Durch Aufklärung von Struktur-Funktions-Korrelationen können Pathomechanismen besser nachvollzogen werden und gezielt therapeutische Reagenzien zum Ausgleich des Defektes entwickelt werden.

Nachdem in anderen spannungsgesteuerten Kaliumkanälen ein hoch konservierter Threoninrest in der Schleife zwischen S1 und S2 als essentiell für die Oberflächenexpression oder die Kanalfunktion identifiziert wurde (Lee et al. 2009; McKeown et al. 2008), sollte in dieser Arbeit der homologe Threoninrest in $K_v7.2$ und $K_v7.3$ auf seine Rolle für die Funktionalität des Kanals hin untersucht werden. Dafür wurden die Effekte eines Austausches der Aminosäure gegen Alanin auf die Oberflächenexpression und elektrophysiologische Eigenschaften des Kanals charakterisiert. Folgende Fragestellung soll dabei geklärt werden:

- Spielt der hochkonservierte Thr-Rest in der S1/S2-Region ebenfalls eine essentielle Rolle für die Kanalfunktion in $K_v7.2$ und $K_v7.3$?

Im zweiten Teil der Arbeit geht es um die Entwicklung eines Expressionssystems von $K_v7.2$ - Mutationen in Nervenzellen, um diese im Anschluss unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen. $K_v7.2$ Wildtypkanäle und solche mit Epilepsiemutation sollten in heterozygoten *KCNQ2* (+/-) Nervenzellkulturen zusätzlich exprimiert und die elektrophysiologischen Auswirkungen verglichen werden.

Neben Ansätzen mit herkömmlichen Transfektionsmethoden wurde ein lentivirales System etabliert, bei dem erfolgreich transduzierte Neurone in unterschiedlichen Entwicklungsstadien hinsichtlich M-Strom und Feuerungsverhalten charakterisiert werden konnten. Damit soll geklärt werden:

- Wie können Epilepsie-assoziierte Mutationen effizient in Nervenzellen exprimiert und analysiert werden?
- Gibt es Unterschiede hinsichtlich Expression, M-Strom und Feuerungsverhalten bei Neuronen, die mutierte $K_v7.2$ -Kanäle exprimieren, die die Entstehung von Anfällen erklären können?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden wenn nicht explizit angegeben von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (München) verwendet.

Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen BD Biosciences (Heidelberg), Greiner Bio-One (Frickenhausen), Sarstedt (Nümbrecht), Nunc GmbH (Wiesbaden) und Eppendorf (Hamburg) benutzt.

2.1.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen sowie die dazugehörigen Puffer wurden von den Firmen New England Biolabs (NEB, Frankfurt) und Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

Restriktionsenzyme: BamHI, EcoRI, HincII, HindII, NotI, SacI, XmnI

Weitere Enzyme: T4 DNA Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot), Phusion Polymerase (Finnzymes, Vantaa, Finnland), Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene, Waldbronn)

2.1.3 Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Ulm) synthetisiert.

| Primer (Name) | Verwendung | Sequenz |
|-------------------|---------------------|---|
| Q2_T114A-R | Mutagenese | 5` - CATACTCCTTGATGGCGGAAAACACA GACAG-3` |
| Q2_T114A-F | Mutagenese | 5` - CTGTCTGTGTTTTCCGCCATCAAGGAG TATG-3` |
| Q3_T144A-R | Mutagenese | 5` - CATACTCCTTGAATGCGGTCAGGACAG CCAG-3` |
| Q3_T144A-F | Mutagenese | 5` - CTGGCTGTCCTGACCGCATTCAAGGAG TATG-3` |
| Q3-TA-BamHI-F | <i>Overlap</i> -PCR | 5` - CTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTT ATCG-3` |
| Q3-TA-HindIII-R | <i>Overlap</i> -PCR | 5` - GAGTGTGTCAGGAAACCGATGTACCAGG-3` |
| Q2_PE-F | TOPO Klonierung | 5` - CACCATGGTGCAGAAGTCGCGCAAC GGCG-3` |
| Q2_eGFP-Rev | TOPO Klonierung | 5` - TTA CTTGTACAGCTCGTCCATGCCGA GAGT-3` |
| Q2_seq-1 | Sequenzierung | 5` - GTACTTGGCAGAGAAGGGGGAGAACGA-3` |
| Q2_seq-2 | Sequenzierung | 5` - TGTGGATGACAAGAGCTGCCCTG-3` |
| Q2 R207Q-R | Mutagenese | 5` - TCCATGCGGATCCGCAGAATCTGCA-3` |
| Q2 R207Q-F | Mutagenese | 5` - TGCAGATTCTGCAGATGATCCGCA TGGA-3` |
| pLenti-CMV-F | Sequenzierung | 5` - CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3` |
| pLenti-V5-Cterm-R | Sequenzierung | 5` - ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3` |
| Lenti4220_rev | Sequenzierung | 5` - TAACTGACACACATTCCACA-3` |
| KCNQ2-Neo-F | Genotypisierung | 5` - GGGCCAGCTCATTCTCCCACTCAT-3` |
| KCNQ2-GS-R | Genotypisierung | 5` - GGTGATAAGAAGGAACTTCCAGAAG-3` |
| KCNQ2-GS-F | Genotypisierung | 5` - ATCGTGACTATCGTGGTATTCCGGTG-3` |

2.1.4 Vektoren

Für die Messungen in CHO-Zellen wurden Plasmide verwendet, in denen die cDNA von $K_v7.2$ und $K_v7.3$ im pcDNA3.1 Vektor von Life Technologies (Darmstadt) kloniert sind.

Für die Umklonierung in lentivirale Konstrukte wurde zunächst der pENTR/D-TOPO – *Entry*-Vektor benötigt (Abb.6 A) und anschließend in den lentiviralen Vektor umkloniert, pLenti4/TO/V5-DEST (Life Technologies) (Abb.6 B) oder pLenti04CamKII/Linker (NMI Reutlingen) (Abb.6 C).

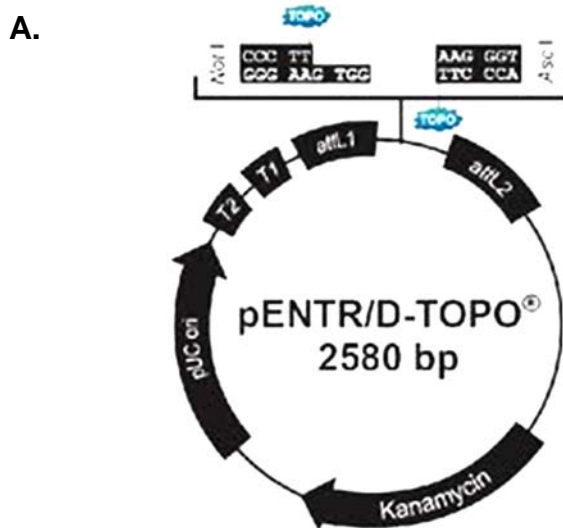
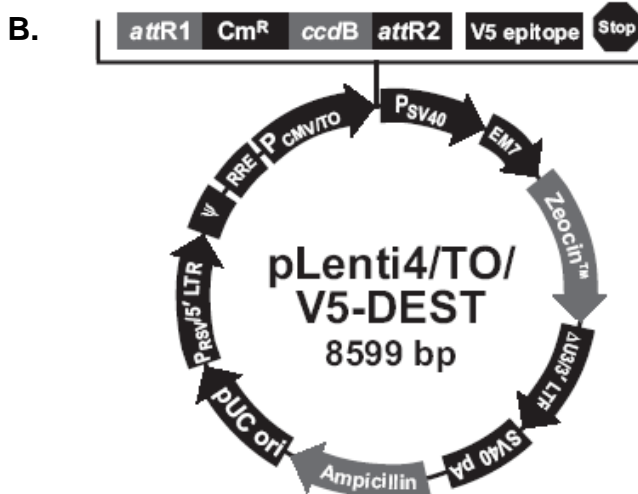


Abb.6: Verwendete Vektoren

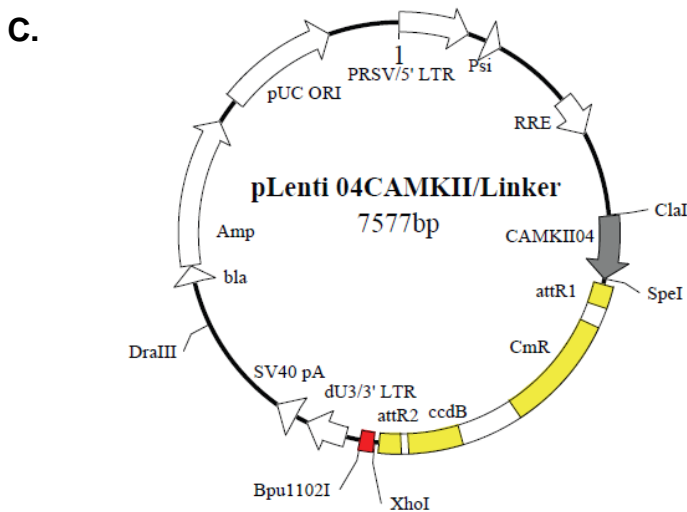
A. Entry-TOPO-Vektor für die Gateway[®]-Klonierung nach Life Technologies

B. Zielvektor „Lentiplasmid“, in das die *KCNQ2* cDNA eingefügt wurde: pLenti4/TO/V5-Dest

C. Zielvektor „Lentiplasmid“, in das die *KCNQ2* cDNA eingefügt wurde: pLenti04/CamKII/Linker



(genauere Beschreibung in der Anleitung „ViraPower[™] Lentiviral Gateway[®] Expression Kit“ von Life Technologies)



2.1.5 Lösungen, Puffer und Medien (alphabetisch)

Alle Lösungen wurden mit VE-Wasser angesetzt und bei Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert.

| | | |
|--|--|------------|
| Blotpuffer Towbin, pH 8.3: (Western Blot) | Tris-Base | 25 mM |
| | Glycin | 192 mM |
| | Methanol | 10 % (v/v) |
| Ladepuffer "Orange G" (Agarosegele) | Orange G | 2 mg/ml |
| | Sucrose | 40 % |
| Laufpuffer: (SDS-PAGE) | Tris-Base | 25 mM |
| | Glycin | 192 mM |
| | SDS | 0.1 % |
| LB-Medium: | Hefe | 5 g/l |
| | Trypton | 10 g/l |
| | NaCl | 10 g/l |
| LB-Platten: | LB-Medium + 1.5 % Agar (w/v) Aufkochen, nach abkühlen + 50 - 100 µg/ml Antibiotika | |
| Lysepuffer: (Genotypisierung) | Tris-HCl pH 7.5 | 50 mM |
| | EDTA pH 8 | 50 mM |
| | NaCl | 100 mM |
| | DTT | 5 mM |
| | Spermidin | 0.5 mM |
| | SDS | 2 % (v/v) |

| | |
|-------------------------------------|---|
| Lysepuffer: (Western Blot) | Tris pH 7.5 20 mM NaCl 150 mM EDTA pH 8 1 mM EGTA pH 8 1 mM Triton X-100 1 % (v/v) Na-Pyrophosphat 2.5 mM β -Glycerolphosphat 1 mM Na_3VO_4 1 mM DTT 10 mM Complete Proteaseinhibitoren (Roche) 1 Tbl./2ml |
| Ponceau S Lösung: (Western Blot) | Ready-to-use von AppliChem |
| Probenpuffer 5x: (SDS-PAGE) | 0.3 M Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM DTT 5 % SDS, 50 % Glycerol, Bromphenolblau |
| S.O.C- Medium: | Ready-to-use von Life Technologies |
| Sammelgel-Lösung: (SDS-Gele) | Acrylamid 8 % Tris pH 8.8 375 mM SDS 0.1% (v/v) APS 0.1% (v/v) TEMED 0.06% (v/v) |
| Trenngel-Lösung: (SDS-Gele) | Acrylamid 5 % Tris pH 6.8 125 mM SDS 0.1 % (v/v) APS 0.1 % (v/v) TEMED 0.01 % (v/v) |
| TBE Puffer (10x): (Agarosegele) | TBE-Puffer Pulver 170.23 g/l |

Zellkultur: Lösungen, Medien und Zusätze:

| | Firma | Anwendung |
|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| PBS | Gibco (Life Technologies) | Waschschritte |
| HBSS | PAA Laboratories, Cölbe | Waschschritte |
| Ham` s F-12 | Biochrom, Berlin | CHO-Zellen |
| DMEM | Gibco (Life Technologies) | Primärkulturen / FT- Zellen |
| Neurobasal | Gibco (Life Technologies) | Primärkulturen |
| OptiMEM | Gibco (Life Technologies) | Transfektionen |
| FKS (fötales Kälberserum) | PAN-Biotech, Aidenbach | 1:10 in DMEM |
| B-27 supplement | Gibco (Life Technologies) | 1:50 in Neurobasal |
| PDL (Poly-D-Lysin) 50 mg | Sigma-Aldrich | 1:50 in HBSS |
| Laminin (1mg/mL) | Sigma-Aldrich | 1:200 in PBS |
| Trypsin (10x) | Gibco (Life Technologies) | flüssig 2.5%, 1:50 in HBSS |
| Non-essential Amino acids | Biochrom, Berlin | 1:100 in DMEM |
| Na-Pyruvat (100 mM) | PAA Laboratories, Cölbe | 1:100 in DMEM |
| Pen/Strep (10000 µg/ml) | Biochrom, Berlin | 1:500 - 1:100 |
| ROCK Inhibitor Y 27632 | Ascent Scientific | 1:1000, Apoptoseinhibitor |

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion wird genutzt, um DNA *in vitro* zu amplifizieren. Das zu amplifizierende DNA-Stück wird ausgehend von zwei Oligonukleotid-Primern mit Hilfe einer DNA Polymerase kopiert. Für Mutagenese PCRs wurde die Pfu Turbo DNA Polymerase verwendet, für Genotypisierungen die Phusion DNA Polymerase (siehe 2.1.2). Diese besitzen eine *proofreading*-Funktion und sichern somit ein fehlerfreies Kopieren der DNA-Matrize. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt und nach dem Standardprotokoll der Polymerase-Firmen verfahren. Die Reaktionsvolumina lagen bei 25 oder 50 µL mit 30 – 100 ng eingesetzter DNA Menge. Zunächst wurde die DNA 2-3 min bei 94 -95°C denaturiert, in einem zweiten Schritt für 30 – 50 sek wiederholt, die Primer wurden bei 60°C +/- 5°C für 30 – 50 sek angelagert und im Anschluss die Stränge bei 72°C für 30 - 60 sek pro kB amplifiziert. Diese Schritte wurden 17 – 35 x wiederholt und zum Schluss 3 - 10 min bei 72°C die Reaktion vervollständigt und die Proben auf 4°C abgekühlt.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA Fragmenten nach ihrer Größe. Für die Gele wurde 0.8 – 1.5 % (w/v) Agarose in 1x TBE Puffer gelöst. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes von 100 – 130 V wandern die mit „Orange G“ – Ladepuffer versetzten Proben durch ihre negative Ladung Richtung Kathode. Um die DNA im Gel sichtbar zu machen, wurde RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea) in die Gellösung gegeben. Durch einen Standard-Marker (peqGold Range Mix DNA-Ladder 10000 bp, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) konnte die DNA-Fragmentgröße verglichen und abgeschätzt werden. Auf diese Weise können DNA-Stücke aus einer Lösung isoliert und auch aufgereinigt werden.

2.2.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um einzelne DNA-Banden aus Agarosegelen zu extrahieren, wurden die Banden mit Hilfe eines Skalpell unter UV-Durchlicht ausgeschnitten und das „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ von GE Healthcare (München) verwendet und laut Protokoll des Herstellers verfahren.

2.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Für die Klonierung und Analyse von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurden verschiedene Restriktionsverdau durchgeführt. Diese erfolgten nach Angaben des Herstellers der verwendeten Enzyme (siehe 2.1.2). Die Restriktionsendonukleasen erkennen bestimmte Basenabfolgen und spalten DNA an dieser Stelle auf.

2.2.5 Transformation von kompetenten Zellen

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von Bakterien vervielfältigt. Die Plasmid-DNA wurde per Hitzeschock-Methode in die Zellen eingebracht. Hierfür wurde die DNA 30 min in einer Lösung mit kompetenten Bakterien inkubiert und anschließend ein Hitzeschock bei 42°C für 30 – 45 sek durchgeführt, wodurch die an den Zellen angelagerte DNA vom Bakterium aufgenommen wird. Im Anschluss wurde die Kultur nach Zugabe von Nährmedium eine Stunde bei 37°C geschüttelt und auf einer LB-Selektionsplatte ausgestrichen. Bakterien, die das gewünschte Plasmid aufgenommen haben, können auf der Selektionsplatte eine Kolonie bilden und die DNA der Kolonien isoliert und analysiert werden. Die verwendeten Plasmide enthielten Ampicillin- oder Kanamycinresistenz (siehe 2.1.4).

In dieser Arbeit wurden kompetente Zellen der *E.coli* -Stämme TOP10, XL-1 blue, Stbl3 und DB3.1 verwendet. Die Variationen im Protokoll sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Variationen im Protokoll bei der Transformation verschiedener *E.coli*-Stämme mit der Hitzeschockmethode

| Bakterien | Hitzeschock | Kultiviermedium | Verwendung |
|-----------|-------------|-----------------|--------------------------------|
| | Dauer | Menge / Art | |
| XL1-blue | 45 sek | 800 µL / LB | Plasmide pcDNA3.1 |
| TOP10 | 30 sek | 250 µL / S.O.C. | TOPO-Plasmide |
| Stbl3 | 45 sek | 250 µL / S.O.C. | Lenti-Plasmide |
| DB3.1 | 45 sek | 900 µL / S.O.C. | Lenti-Plasmide mit ccdB-Gen |

2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden für kleine Ansätze (Mini-Präp) das „Plasmid Prep Mini Spin Kit“ von GE Healthcare (München) und für große Ansätze (Maxi-Präp) das „Pure Link HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit“ von Life Technologies verwendet und nach Protokoll des Herstellers verfahren. Die Konzentration und Reinheit der gewonnenen DNA wurde photometrisch am „Nanodrop“™ Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) bestimmt.

2.2.7 Sequenzierung

Zur Kontrolle isolierter Plasmide und Verifizierung von Punktmutationen wurden DNA Proben sequenziert. Dies wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt. Die Technik beruht auf der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger et al. 1977).

2.2.8 Mutagenese

Für den Austausch von Threonin 114 bzw. 144 in K_V7.2 und K_V7.3 gegen Alanin wurde auf DNA-Ebene eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt, um die kodierende Sequenz von Threonin für die eines Alanin an entsprechender Stelle zu ersetzen (A 340 bzw. 430 → G). Dies wurde zunächst mit dem QuickChange PCR Mutagenese Kit von Stratagene durchgeführt. Hierbei wird ein Plasmid, welches den Kanal enthält, über eine PCR amplifiziert und komplett kopiert. Die verwendeten Primer setzen dabei an der Stelle an, an welcher die Mutation sitzen soll und tragen die ausgetauschte Base, sodass die kopierten Plasmide die Mutation tragen. Nach Transformation des PCR-Produktes wurde die DNA einzelner Kolonien isoliert und durch Restriktionsverdau und Sequenzierung positive Klone identifiziert, welche anschließend zur Gewinnung größerer Mengen des richtigen Plasmides verwendet wurden.

Bei K_V7.3 wurde eine *Overlap*-PCR zum Einfügen der Mutation durchgeführt. Dabei werden zunächst 2 Einzelabschnitte des Kanals über eine PCR amplifiziert und die Mutation über Primer eingefügt. Die PCR-Produkte überlappen und können in einer dritten PCR als ganzes Stück amplifiziert werden (siehe Schema Abb.7). Durch flankierende Restriktionsschnittstellen kann das Stück im WT-Kanal herausgeschnitten und das verdaute PCR-Produkt über Ligation ins Plasmid subkloniert werden. Die Ligation erfolgte durch T4 DNA Ligase nach Protokoll des Herstellers.

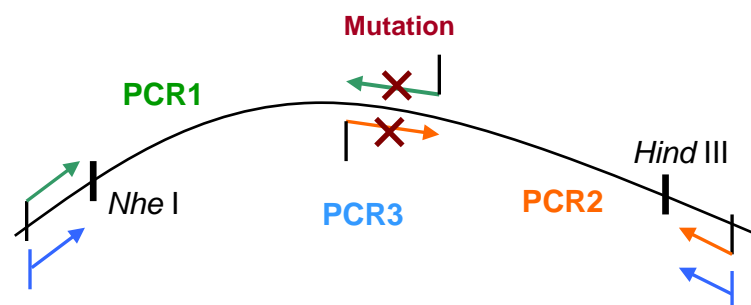


Abb.7:
 Klonierungsstrategie „Overlap-PCR“ zum Einfügen der T144A-Mutation in K_V7.3
 Schwarze Linie = DNA-Strang des Ausgangs-plasmides mit WT *KCNQ3*-Gen
 Farbige Pfeile = Primerpaare für die PCRs

2.2.9 Klonierung von K_V7.2 WT und Mutationen in lentivirale Vektoren

2.2.9.1 Gateway[®]-System: Klonierung in TOPO Donorvektor

Für die Klonierung der K_V7-Kanäle in lentivirale Vektoren wurde das Gateway[®]-System von „Life Technologies“ verwendet. Hierbei wurde zunächst der Kanal mit passenden flankierenden Enden über eine PCR amplifiziert und anschließend in einen TOPO-*Entry* Vektor eingefügt. Dieser liegt in der Reaktion linearisiert vor und enthält einen Überhang von 4 Basenpaaren, der das flankierende Ende des PCR-Produktes erkennt und somit in den Vektor einfügt (siehe Anleitung „ViraPower™ Lentiviral Gateway[®] Expression Kit“ von Life Technologies). Die Reaktion erfolgte nach Protokoll, die Inkubationszeit wurde von 5 auf 12 min verlängert. Im Anschluss wurden kompetente TOP10 Bakterien mit dem Reaktionsmix transformiert und auf LB-Kanamycinplatten selektioniert. TOPO-Vektoren ohne Insert konnten dabei nicht entstehen, da die Enden des linearisierten TOPO-Vektors nicht kompatibel sind. Auf diese Weise wurden K_V7.2 und K_V7.3 WT sowie die K_V7.2-Mutationen N258S, S122L und R207Q in den TOPO-*Entry* Vektor kloniert.

2.2.9.2 Rekombination in den Ziel-Lentivektor

Die Ionenkanalgene sollten anschließend in den lentiviralen Zielvektor übertragen werden. Dies geschieht über Rekombination der L- und R Stellen von TOPO-*Entry*- und Zielvektor. Die LR Clonase triggert dabei die Rekombinationsreaktion. Auf den Selektionsplatten sollten nur erfolgreich rekombinierte Klone wachsen, da die Ausgangsplasmide und Nebenprodukte durch das *ccdB*-Suizidgen oder fehlende Antibiotikaresistenz ausgeschlossen werden können (Abb.8).

Auf diese Weise wurden die Kanaluntereinheiten vom TOPO-Vektor in den pLenti4TO/V5-dest und pLenti04CamKII-Vektor Vektor übertragen.

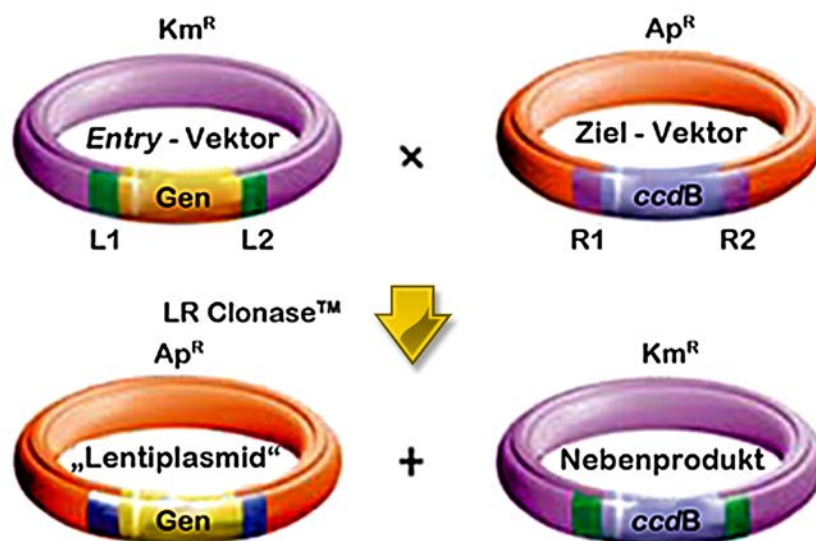


Abb.8: Rekombinationsreaktion von *Entry*- und Zielvektor

Nach Transformation des Reaktionsmixes können nur Bakterien überleben, die das gewünschte Zielpasmid enthalten.

L, R = Rekombinationsstellen, Km^R = Kanamycinresistenzgen

Ap^R = Ampicillinresistenzgen, *ccdB* = Suizidgen

(Bild verändert nach dem *Gateway Cloning Manual* von Life technologies)

2.2.10 Genotypisierung

Um den genetischen Status in Bezug auf das *KCNQ*-Gen von Mäusen zu bestimmen, wurde eine Genotypisierung mittels PCR vorgenommen. Die Kreuzung heterozygoter Tiere (*KCNQ* +/-) erzeugt neben heterozygoten auch Wildtyp-Tiere (+/+) und homozygote *knock-out*-Tiere (-/-). Für die Weiterverwendung neuronaler Kulturen des gewünschten Genotyps wurde den E17 Embryonen bei Präparation eine Schwanzspitzenbiopsie entnommen. Aus diesen Zellen wurde durch Lyse über Nacht bei 55°C und Verdauung mit Proteinase K mit anschließender Fällung durch Isopropanol die genomische DNA gewonnen. Mit Hilfe geeigneter Primer im *KCNQ*-Gen (siehe Tabelle in 2.1.3) konnte dann über eine PCR durch das spezifische Bandenmuster der Genotyp der Tiere ermittelt werden.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Biotinylierungs-Assay zur Gewinnung von Membran-proteinen

Mit Hilfe des „Cell surface protein isolation Kits“ von Pierce (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) konnten die Membranproteine auf der Oberfläche von CHO-Zellen markiert und isoliert werden, um nach Transfektion deren Oberflächen-Expression zu vergleichen. Damit konnte die Expression der $K_v7.2$ -Kanalvarianten verglichen werden. Hierfür wurden die Zellen in 10 cm-Schalen kultiviert und mit Dreamfect™ (OZ Biosciences, Marseille, Frankreich) nach Protokoll des Herstellers transfiziert. Für alle Ansätze wurde eine Gesamtmenge von 8 µg DNA pro Schale der Kanal-Untereinheiten eingesetzt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen für 30 min mit Biotinlösung inkubiert, anschließend wurde die Reaktion mit Quenching-Lösung abgestoppt und die Zellen mit einem Gummispatel (Corning, NY, USA) aus den Schalen gekratzt. Nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten wurden die Zellen lysiert und die Lysate auf eine Säule mit NeutrAvidin Agarose gegeben, um die biotinylierten Membranproteine daran zu binden. Nach weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritten wurden die Proteine mit DTT versetztem SDS-Probenpuffer 1 Stunde von der Agarose eluiert. Die so isolierten Membranproteine konnten anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot weiter untersucht werden.

2.3.2 Herstellung von Proteingesamtlysaten

Für die Expressionsanalyse konnten aus kultivierten Zellen Proteingesamtlysate gewonnen werden. Hierfür wurden die Zellen in 6- oder 12-Well Platten kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion oder Transduktion lysiert. Nach Waschschritten in eiskaltem PBS wurde 50 – 100 µL Lysepuffer zu den Zellen gegeben, diese mit einem Gummispatel aus den Schalen gekratzt und in ein 1.5 mL - Reaktionsgefäß überführt und homogenisiert. Es folgten 6 Schritte, in denen die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und direkt bei 37°C wieder aufgetaut und homogenisiert wurden.

Zelldebris wurden im anschließenden Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm, 20 min, 4°C entfernt und der klare Überstand weiterverwendet.

2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mittels BioRad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bestimmt und nach Protokoll des Herstellers verfahren. Die Standardkurven wurden mit BSA-Lösungen von 0 – 12 mg/mL hergestellt und die OD der Proben bei 700 nm auf einer 96-Wellplatte im ELISA-(Enzyme-linked immunosorbent assay) Reader (Thermo Fisher Scientific) ermittelt.

2.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western Blot

Aus Zellen gewonnene Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot weiter untersucht. Nach dem Auftrennen der Proteine in einem 8%igem SDS-Gel (30mA, 1.5 Std., 10 – 30 µg pro Probe) wurden die Proteine im Tank-Blot-Verfahren in Towbin-Puffer für etwa 1.5 Stunden bei 300 – 370 mA auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (PALL Corporation, Port Washington, NY, USA) übertragen. Die freien Bindestellen auf der Membran wurden mit 5% Milchpulver in PBS + 0.1% Tween blockiert. Auf dieser konnten dann im Anschluss über Antikörper die Ionenkanäle bei ca. 92 kDa und Aktin als Kontrolle bei ca. 40 kDa aus den Zelllysaten nachgewiesen werden. Die Chemilumineszenzdetektion erfolgte mit dem „ECL Western Detection Kit“ nach Protokoll des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg). Die spezifischen anti-K_v7.2 Antikörper wurden von der Firma Pineda (Pineda Antikörper-Service, Berlin) hergestellt und sind in Cooper *et al.* (2001) beschrieben und in Maljevic *et al.* (2011) ebenfalls verwendet.

Primärantikörper: polyklonaler rabbit anti-*KCNQ2* (Pineda)
1:750 – 1:1000; Inkubation über Nacht bei 4°C

Sekundärantikörper: HRP – gekoppelter goat-anti-rabbit IgG
(Bio-Rad, München) 1:10000
Inkubation 1-2 Stunden bei RT

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kultivierung der Säugerzelllinie CHO

CHO-Zellen bezeichnet eine immortalisierte Zelllinie aus den Ovarien des chinesischen Hamsters. Sie wurden in F-12 Medium kultiviert, angereichert mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) in einem luftbefeuchteten Inkubator bei 37°C und 5% CO₂. 2-3 mal pro Woche wurden die Zellen passagiert und für Experimente in 35 mm oder 10 cm Schalen ausgesät. 12 – 20 Stunden nach der Aussaat konnten die Zellen transfiziert werden. Da diese Zelllinie keine endogenen Kaliumkanäle aufweist, eignet sie sich besonders für die heterologe Expression und Untersuchung von Kaliumkanälen.

2.4.1.1 Transfektion von CHO-Zellen

Für die Transfektion von CHO-Zellen wurde Lipofectamine / Lipofectamine LTX™ (Life Technologies) oder Dreamfect™ (OZ Biosciences) verwendet und nach Angaben im Herstellerprotokoll verfahren. Für elektrophysiologische Messungen wurden in 35 mm Schalen 2 µg Kanal-DNA + 1 µg CD8 kodierende cDNA als Kotransfektionsmarker eingesetzt, um transfizierte Zellen mit anti-CD8 gekoppelten Mikrobeads (Life Technologies) zu markieren. Bei Ko-Expression von Ionenkanal-untereinheiten wurde die entsprechende Plasmid-DNA im Verhältnis 1:1 eingesetzt und die Gesamtmenge konstant gehalten.

2.4.2 Herstellung von primären hippokampalen Nervenzellkulturen

Die hippokampalen Neuronen wurden aus E17 Embryonen von schwangeren *KCNQ2-KO* Mäusen (B6.129P2-Kcnq2^{tm1Dgen}/J; Deltagen, Mühldorf am Inn) gewonnen. Die trächtige Maus wurde mit CO₂ getötet und deren Embryonen aus dem Uterus isoliert. Die Embryonen wurden anschließend dekaptiert, die Gehirne herauspräpariert und die Hippokampi isoliert (Abb.9). Für die anschließende Genotypisierung wurden Gewebeproben aus den Schwanzspitzen der Embryonen entnommen. Die Dissoziation der Hippokampi

zu neuronalen Kulturen erfolgte unmittelbar nach der Isolation unter der Sterilbank. Nach Waschschriffen in HBSS wurden die Hippokampi mit 0.05 - 2.5% Trypsin 10 - 20 min bei 37°C angedaut und mechanisch mit einer Pipettenspitze durch Triturieren vereinzelt.

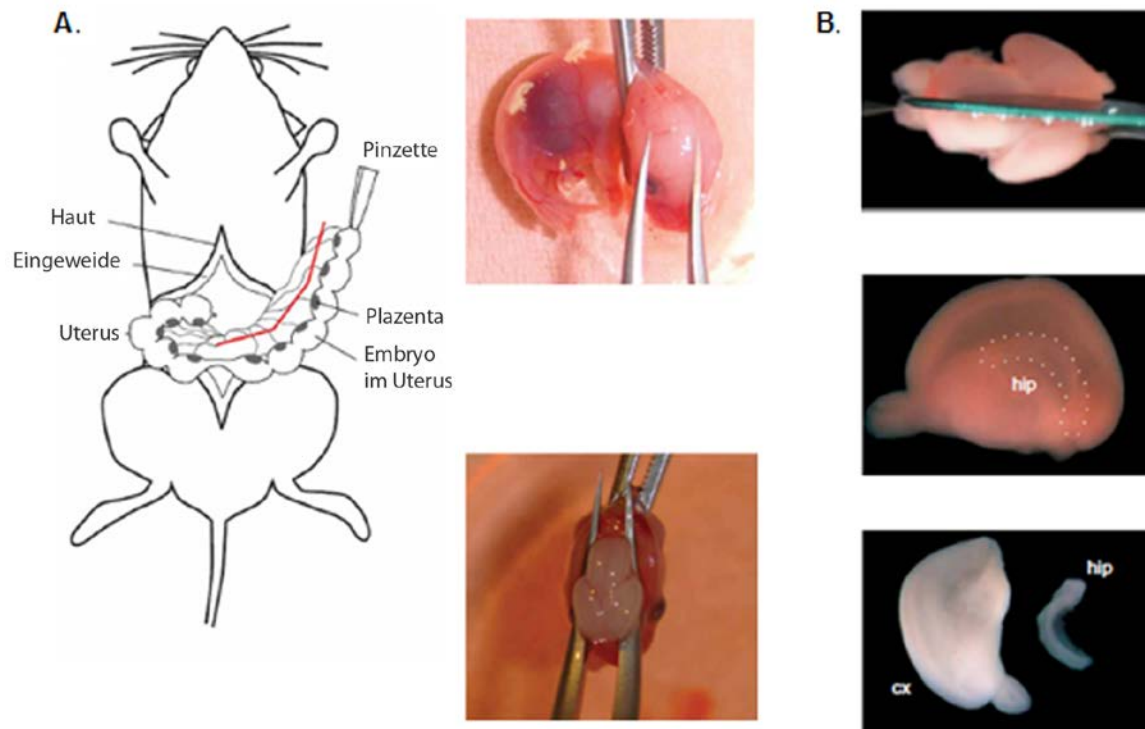


Abb.9:
Präparation von primären hippocampalen Neuronenkulturen (aus Fath *et al.* 2008)
A: Entnahme der Embryonen aus dem Uterus und Isolierung des Gehirns
B: Präparation des Hippokampus (hip) aus dem Gehirn (cx = Cortex)

Vor der Aussaat auf Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläschen wurde die Zellsuspension durch ein Zell-Mikrosieb (40 μ m Nylon) gefiltert, um Klumpen und Gewebereste auszuschließen. Die isolierten Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, je 90 - 150 000 Zellen pro Well mit 500 μ L DMEM +10 % FCS + Pen/Strep.

Nach 4 - 12 Stunden erfolgte ein Medienwechsel zu Neurobasal + 2 % B27-Supplement. Mindestens einmal pro Woche wurde das Kulturmedium komplett oder zur Hälfte gewechselt.

2.4.3 Virenproduktion: Transfektion der Produzierzelllinie

Die Herstellung von Viren erfolgte in der Zelllinie 293-FT (HEK-Variante, Life Technologies). Diese wird mit 4 Plasmiden transfiziert, die zur Virusherstellung benötigt werden:

- dem lentiviralen Konstrukt, das auch das Zielgen beinhaltet („Lentiplasmid“ mit *KCNQ2*-Gen)
- Verpackungsplasmide „Packaging Mix“:
 - PLP-1, kodierend für gag/pol (Matrix + Kapsidproteine, Enzyme)
 - PLP-2, kodiert die reverse Transkriptase
 - VSV-G, für die Expression der Virus-Hüllproteine

Für die Transfektion wurden am Tag vorher 1 – 1.2 Mio Zellen in einer 10 cm Petrischale ausgesät. 3 µg Lentiplasmid + Verpackungsplasmide wurden nach Angaben im Herstellerprotokoll mit dem Transfektionsreagenz Mirus™ *TransIT*®-LT1 (Mirus Bio, Madison, USA) gemischt und auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium mit frischem ausgetauscht und die Zellen zur Virusproduktion ins S2-Labor überführt. Die transfizierten Zellen konnten nun Viren bzw. virale Partikel produzieren und ins Medium abgeben. Dies war erkennbar durch die Bildung von Synzytien - mehrkernigen Zellen, sowie anhand der GFP-Expression der eingebrachten Plasmide. Die viralen Partikel selbst sind replikations-inkompetent und können sich nach Infektion der Zielzelle nicht weiter vermehren. Das lentivirale Konstrukt basiert auf dem HIV-1, wobei die Pathogenität durch Veränderung und Reduktion der Gene verhindert wird.

2.4.4 Virenernte

Nach weiteren 48 Stunden konnten die viralen Partikel aus dem Überstand geerntet werden. Zur Aufkonzentration wurde entweder ein Vivaspin-Röhrchen (Satorius, Göttingen) verwendet (Zentrifugation 60 – 90 min bei 4000 rpm), wobei die viralen Partikel direkt mit dem Rest Kulturmedium aliquotiert und bei -80°C eingefroren wurden oder der Virus wurde mittels Ultrazentrifugation (2-3

Stunden, 4°C, 40000 rpm) pelletiert und im Anschluss in 1 % BSA / PBS oder Kulturmedium gelöst.

2.4.5 Infektion der Zielzellen

Zur Infektion der primären Neurone wurde das Kulturmedium in 24-Well-Platten auf 300 µL reduziert und die viralen Partikel zugegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium auf 500 µL aufgefüllt und nach ein paar Tagen komplett ausgetauscht. Nachdem die viralen Partikel in die Zelle eingedrungen sind, wird die virale RNA revers-transkribiert, in den Zellkern transportiert und integriert dort stabil in das Genom der Wirtszelle. Die Infektion erfolgte an DIV 3 (*days in vitro*), die Expression konnte anhand der GFP-Fluoreszenz 6 - 7 Tage nach Infektion (post-Infektion; PI) beobachtet werden.

2.4.6 Transfektion neuronaler Kulturen mit Optifect

In weiteren Tests wurden neuronale Kulturen (DIV 3 – DIV 8) mit dem Transfektionsreagenz Optifect™ von Life Technologies transfiziert. Pro 24-Well wurden 4µL Optifect sowie 1 µg DNA in 100 µL OptiMEM für 1.5 – 2 Stunden inkubiert und anschließend das Medium erneuert.

Für die Experimente zur Verhinderung der Apoptose wurden nach der Transfektion bei Medienwechsel verschiedene Zusätze ins Medium gegeben:

- KCl (5, 8.75, 10,12.5 und 25 mM Endkonzentration)
- Apoptoseinhibitor 1:1000 (Ascent, Cambridge, UK)
- 1 mM 4-AP (Kaliumkanalblocker)

Nach verschiedenen Inkubationszeiten 1 - 42 Stunden wurden die Zusätze wieder entfernt.

2.5 Immunzytochemische Färbungen

Für die immunzytochemische Färbung wurden mit K_v7 -Kanälen transfizierte CHO-Zellen 3 - 5 Stunden vor der Färbung auf Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät. Die Fixierung erfolgte für 15 – 20 min in 4 % PFA. Nach Waschen mit PBS und Blockieren der freien Bindestellen mit 3 % Ziegenserum in PBS + 0.1 % Triton wurde der Erstantikörper auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert (rabbit anti-*KCNQ2*, 1:500; Pineda). Der Zweitantikörper (Alexa488 goat-anti-rabbit IgG, 1:500) wurde am nächsten Tag 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Die Deckgläschen wurden anschließend auf Objektträger übertragen und in Mowiol (Polyvinylalkohol) eingebettet.

Die Färbung von Neuronen erfolgte auf die gleiche Weise. Die Primärkulturen konnten an jedem Tag nach Aussaat für die immunzytochemische Färbung verwendet werden. Es wurde zusätzlich mit „mouse anti-MAP2“ (1:800 – 1:1000; BD Biosciences, Heidelberg) als Erstantikörper und Alexa568 anti-mouse IgG (Life Technologies) als Sekundärantikörper gefärbt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden an einem Axioplan2 Mikroskop von Zeiss mit den Objektiven Plan-APOCHROMAT 20x/0.8 und Plan-NEOFLUAR 5x/0.15 durchgeführt.

2.6 Elektrophysiologie

Die Messung von Strömen durch Ionenkanäle mittels elektrophysiologischer Methoden hat sich zu einem wichtigen Standardverfahren zur Erforschung von Ionenkanalerkrankungen entwickelt. Verschiedene Parameter können untersucht werden, die bei defekten Kanälen gestört sein können und durch Analyse zur Erklärung von Pathomechanismen beitragen. Hierzu zählen z.B. die Größe des Maximalstroms, Kinetik von Aktivierung und Deaktivierung, Öffnungsdauer der Kanäle, Strom-Spannungsabhängigkeit uvm., was mit den verschiedenen elektrophysiologischen Techniken untersucht werden kann (Pusch 2008).

Die 1976 von Neher und Sakman erstmals beschriebene *Patch-Clamp*-Technik revolutionierte die elektrophysiologische Forschung (Neher und Sakmann 1976;

Sakmann und Neher 1984). Bei diesem Verfahren wird eine Pipette, die zugleich als Messelektrode dient, auf einen Membranausschnitt auf die Zelle gesetzt (\rightarrow *patch*) und eine elektrisch dichte Verbindung hergestellt. Die Membran kann dann auf einem vorgegebenen Potential gehalten und die Ionenströme gemessen werden. Es gibt vier verschiedene Konfigurationen, die im Anschluss hergestellt werden können und unterschiedliche Messtechniken ermöglichen (Abb.10): *Cell-attached*, *Whole-cell*, *Inside-out* und *Outside-out* (Hamill et al. 1981).

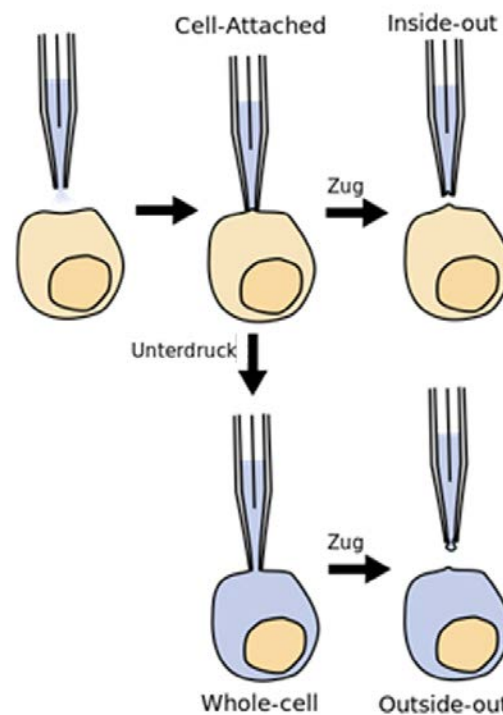


Abb.10:
Patch-Clamp Konfigurationen.
 Nach aufsetzen der Messpipette auf die Zelle können verschiedene Ableitkonfigurationen hergestellt werden. Für Ganzzell-Ableitungen (*Whole-cell*) wird die Zelle durch Unterdruck geöffnet.
 (Bild: patchmodes.svg)

Bei der *Whole-cell* Konfiguration wird von der gesamten Zellmembran abgeleitet und es können Stromstärken von wenigen Picoampère bis zu mehreren Nanoampère aufgenommen werden.

Nach dem Prinzip der Spannungsklemme wird ein Haltepotential angelegt und durch Spannungsänderung die Öffnung der Kanäle und somit ein resultierender Stromfluss eingeleitet, der aufgenommen wird (*Voltage-Clamp*). Möchte man aber Aktionspotentiale in Nervenzellen analysieren, kann man in derselben Konfiguration in den *Current-Clamp*-Modus wechseln. Hierbei wird Strom appliziert und die resultierende Spannungsänderung beobachtet, was in Nervenzellen die Aufzeichnung von Aktionspotentialen erlaubt.

2.6.1 *Voltage-Clamp* Messungen von Kaliumströmen in CHO-Zellen

Ganzzell-*Patch-Clamp* Ableitungen in transient transfizierten CHO-Zellen wurden bei Raumtemperatur (20 – 22°C) mit einem Axopatch 200B Verstärker (Axon Instruments, Union City, USA) durchgeführt. Die Daten wurden mittels der pClamp 8.2 Software erhalten und Signale mit einer Abtastrate von 5 kHz aufgezeichnet, mit 2 kHz gefiltert und auf einem PC gespeichert. Patch-Pipetten wurden aus dünnwandigem Borosilicat-Glas mit Filament (Science Products, Hofheim) gezogen und hatten einen Widerstand von 1.5 – 3 M Ω . Die Pipetten-Messlösung enthielt (mM): 130 KCl, 1 MgCl₂, 5 K₂ATP, 5 EGTA and 10 HEPES eingestellt auf pH 7.4 mit KOH. Die Bad-Lösung bestand aus (mM): 140 NaCl, 4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 11 Glucose und 5.5 HEPES eingestellt auf pH 7.4 mit NaOH (nach Peretz et al. 2005). Die Osmolarität der Lösungen lag zwischen 300 und 330 mOsm/kg, wobei die Differenz zwischen Mess- und Badlösung nicht mehr als 10 mOsm/kg betrug.

Die Zellen wurden unter einem AxioVert A1 Mikroskop von Zeiss mit A-Plan 10x/0.25 und ACHROSTIGMA 32x/0.4 Objektiv visualisiert.

2.6.1.1 Messprotokolle

Zur Analyse des M-Stroms in CHO-Zellen wurden die Zellen von einem Haltepotential von -80 mV in 2 sek depolarisierenden Pulsen in 10 mV-Schritten bis auf ein Potential von +60 mV gebracht und die resultierenden Kaliumströme aufgenommen. Aus diesen Aufzeichnungen konnten Stromgröße und Aktivierung charakterisiert werden. Durch einen anschließenden hyperpolarisierenden Puls auf -120 mV wurden die Kanäle wieder geschlossen (Abb.11 A). Aus den dabei entstehenden Schwanzströmen wurden die Leitfähigkeits-Spannungskurven generiert, da die Amplitude dieses Stromes die Anzahl aktivierter Kanäle zum entsprechenden Membranpotential wiedergibt. Um die Deaktivierungskinetik zu ermitteln, wurden die Zellen vom Haltepotential von -80 mV für 2 sek auf +20 mV depolarisiert und anschließend hyperpolarisierende Pulse von -30 mV bis -120 mV gegeben, um die Kanäle zu schließen (Abb.11 B).

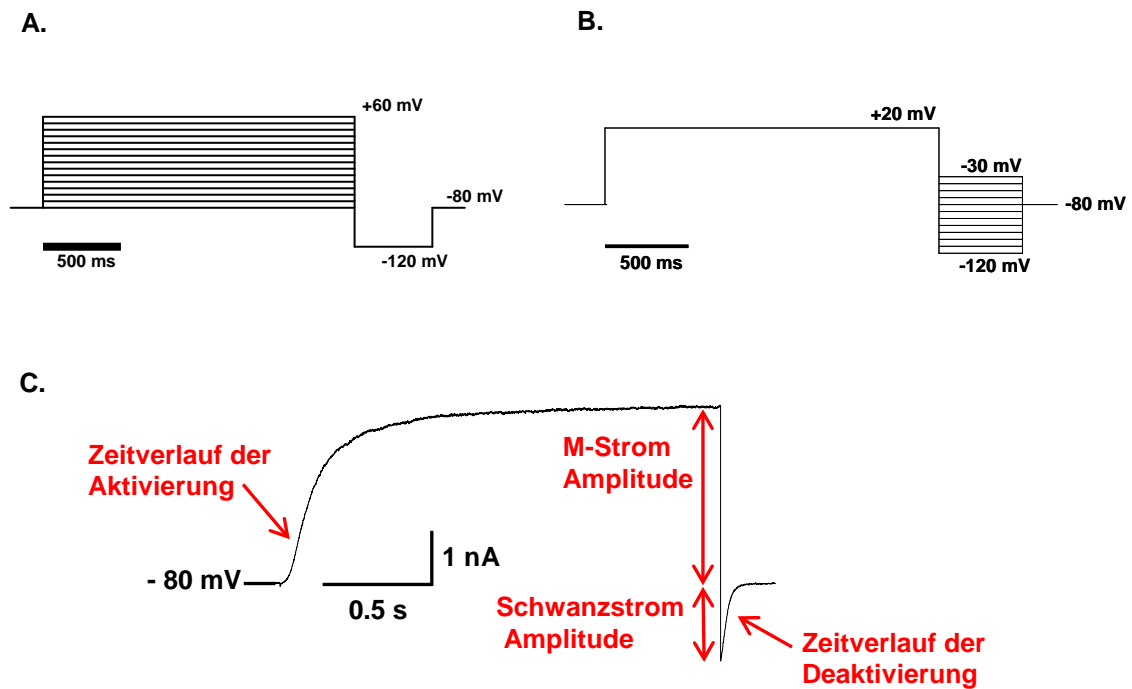


Abb.11:
Messprotokolle zur Analyse von Kaliumströmen in CHO-Zellen
A: Aktivierungsprotokoll
B: Deaktivierungsprotokoll
C. Repräsentativer M-Strom in CHO-Zellen. Rote Pfeile zeigen, wo Amplituden und Zeitkonstanten ausgewertet wurden.

2.6.2 Voltage-Clamp Messungen von M-Strom in Neuronen

Die Ganzzell- *Patch-Clamp* Ableitungen in Neuronen wurden ebenso an dem unter 2.6.1 beschriebenen Aufbau durchgeführt. Die Daten wurden bei 2 kHz gefiltert und mit einer Abtastrate von 20 kHz aufgezeichnet. Die Widerstände der Pipetten lagen zwischen 2 und 4 M Ω . Die Pipetten-Messlösung enthielt (mM): 160 K-Acetat, 3 MgCl₂, 20 HEPES eingestellt auf pH 7.4 mit KOH. Die Badlösung bestand aus (mM): 120 NaCl, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 11 Glucose, 5 HEPES und 23 NaHCO₃ eingestellt auf pH 7.4 (nach Shahidullah et al. 2005). Die Osmolarität der Lösungen lag zwischen 280 und 320 mOsm/kg, wobei die Differenz zwischen Mess- und Badlösung nicht mehr als 10 mOsm/kg betrug. Das Grenzpotential (*junction potential*) betrug -10.4 mV und wurde in den Abb. nicht mit einberechnet.

2.6.2.1 Messprotokoll

Es wurde das „klassische“ M-Strom Protokoll verwendet (Brown und Adams, 1980). Die Zellen wurden bei -70 mV zunächst zur Stabilisation für 5 sek gehalten, für 1 sek auf -20 mV depolarisiert, um andere Natrium- und Kaliumströme auszulösen und zu inaktivieren und im Anschluss in 10 mV -Schritten von -30 mV bis -120 mV wieder 0.6 sek hyperpolarisiert, wobei die Deaktivierung des M-Stroms zu beobachten ist (Abb.12). Für die Bestimmung der Amplitude des M-Stroms I_M wurde die Kurve bei Hyperpolarisation auf -40 mV ausgewertet und die Stromdifferenz vom Start – bis Endpunkt des Pulses bestimmt. Für Strom-Spannungskurven wurden die Stromamplituden zum gegebenen Potential geplottet.

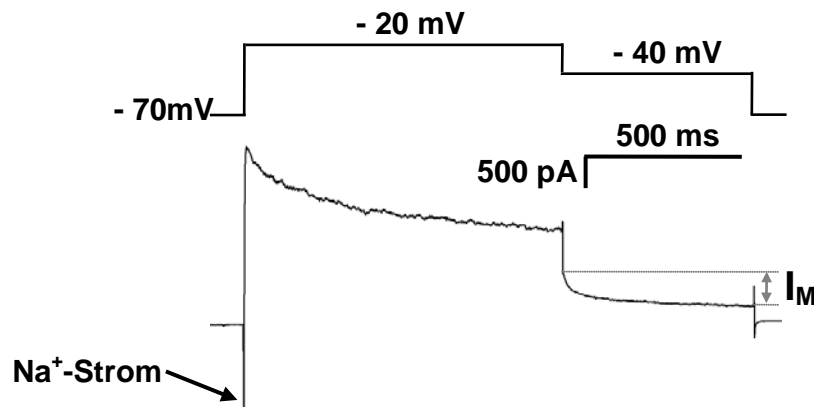


Abb.12: Messprotokoll zur Analyse vom M-Strom I_M und Beispiel des resultierenden Stromes in Neuronen. Der erste Puls aktiviert andere Kaliumkanäle, sodass im Anschluss nur die nicht inaktivierenden *KCNQ*-Kanäle betrachtet werden können.

2.6.3 *Current-Clamp* Messungen von Aktionspotentialen in Neuronen

Die *Current-Clamp*-Messungen an Neuronen wurden in derselben Konfiguration wie die oben genannten *Voltage-Clamp* Messungen durchgeführt, jedoch wurde der Verstärker so eingestellt, dass die Strominjektion zur Herstellung des Haltepotentials konstant gehalten wird. Man detektiert die Spannungsänderung und nicht mehr den über die Membran fließenden Strom. So können Aktionspotentiale als Antwort auf Strompulse aufgezeichnet werden.

Zur Bestimmung des Eingangswiderstandes und des Feuerungsverhaltens der Neurone wurde für 500 ms Strom injiziert von -0.1 nA in 0.025 nA -Schritten bis $+0.3\text{ nA}$ (bzw. $+0.45\text{ nA}$). Der Eingangswiderstand wurde nach dem

Ohm'schen Gesetz $R = U/I$ aus der resultierenden Spannungsänderung bei injizierter Stromstärke berechnet.

In einem weiteren Protokoll wurde ein 200 ms langer Strompuls injiziert und die Stromstärke so angepasst, dass im Intervall genau 8 Aktionspotentiale entstehen. So kann die benötigte Stromstärke für Neurone mit WT-Kanälen und solchen mit mutierten Kanälen verglichen werden.

2.6.4 Messung der Netzwerkaktivität auf Multielektroden-Arrays (MEAs)

Die Netzwerkaktivität von infizierten Neuronenkulturen wurde 7, 11 und 14 Tage nach Infektion durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen nach Präparation direkt in die MEA-Messkammern (Multichannel Systems, Reutlingen) ausgesät (120.000), die zuvor mit Poly-D-Lysin und Laminin beschichtet wurden (Abb.13). Die Infektion erfolgte an DIV 3. Ein Tag vor jeder Messung wurde das Medium mit 1 mL frischem Neurobasal ausgetauscht.

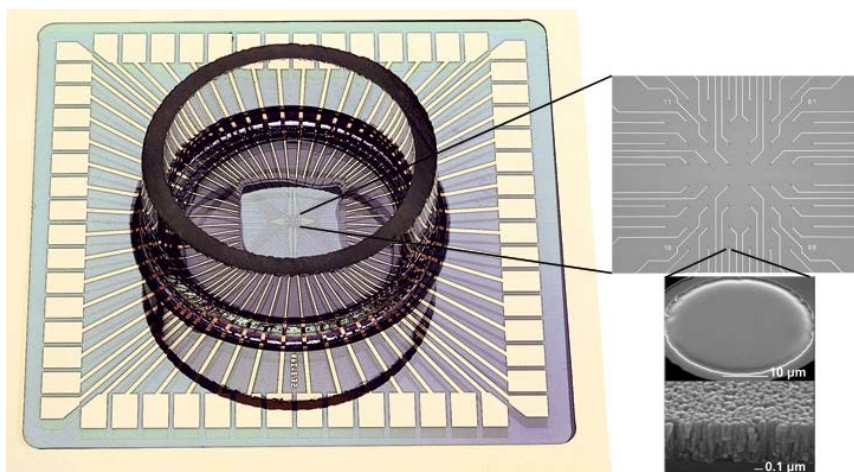


Abb.13: Multielektroden-Array zur Messung der Netzwerk-aktivität primärer Neuronenkulturen (Bild aus Broschüre „MEA-Systeme“ von Multichannel Systems). Die 60 Elektroden in der Messkammer nehmen parallel auf.

Die Signale aller Elektroden (extrazelluläre Ableitungen) wurden bei 25 kHz abgetastet und mit einem Bandpassfilter (Butterworth -2. Ordnung) mit einer

Cut-Off Frequenz von 200 und 5000 Hz gefiltert. Mit der Standardsoftware für das Multielektroden-Array-System von Multichannel Systems „MC_Rack“ wurden die Messungen visualisiert und gespeichert.

Die Spontanaktivität der Neuronenkulturen auf jedem MEA wurde zunächst ohne Zusatz und anschließend mit 5, 10 und 25 μ M Bicucullin für jeweils 2 min gemessen.

2.7 Datenanalyse

Für die Auswertung der Kaliumströme von transfizierten CHO-Zellen wurden die Mittelwerte aus Messungen verschiedener Zellen von unterschiedlichen Tagen zusammengefasst, die aber alle zum gleichen Zeitpunkt nach Transfektion elektrophysiologisch charakterisiert wurden (40 – 50 Stunden). Stromamplituden, Leitfähigkeits-Spannungskurven und exponentielle Fits zur Ermittlung von Zeitkonstanten wurden direkt in ClampFit ermittelt.

An die Leitfähigkeits-Spannungskurven wurde folgende Boltzmann-Funktion angepasst:

$$I(V) = I_{\max} / (1 + \exp[(V - V_{0.5})/k]) + C$$

Mit I_{\max} = maximale Stromamplitude beim Testpotential V , $V_{0.5}$ = halbmaximale Aktivierung, k = Steigungsfaktor und C = Konstante. Die Aktivierungskinetik wurde mit einer Exponentialfunktion zweiter Ordnung analysiert und die Deaktivierungskinetik mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung, die an die Stromspuren angepasst wurden.

Normalisierung und Zusammenfassung der Daten erfolgte in Excel, Kurvenfits wurden mit Hilfe von GraFit durchgeführt und statistische Signifikanzen mittels des Studentschen t-Tests in Origin ermittelt mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$.

Alle Daten werden, wenn nicht anders angegeben, angezeigt als Mittelwerte +/- SEM.

Die Analyse der Messdaten aus Neuronen erfolgte ebenfalls in Clampfit, wobei M-Stromamplituden und Anzahl der Aktionspotentiale bestimmt wurden. Um die Aktionspotential-Schwelle zu ermitteln, wurde von der Aufnahme der 8 Aktionspotentiale in Clampfit die 1. Ableitung dV/dt erstellt und das Potential

abgelesen, bei dem die Steigung (Wert der 1. Ableitung) 10 mV/ms entspricht (nach Wimmer et al. 2010) (Abb. 14).

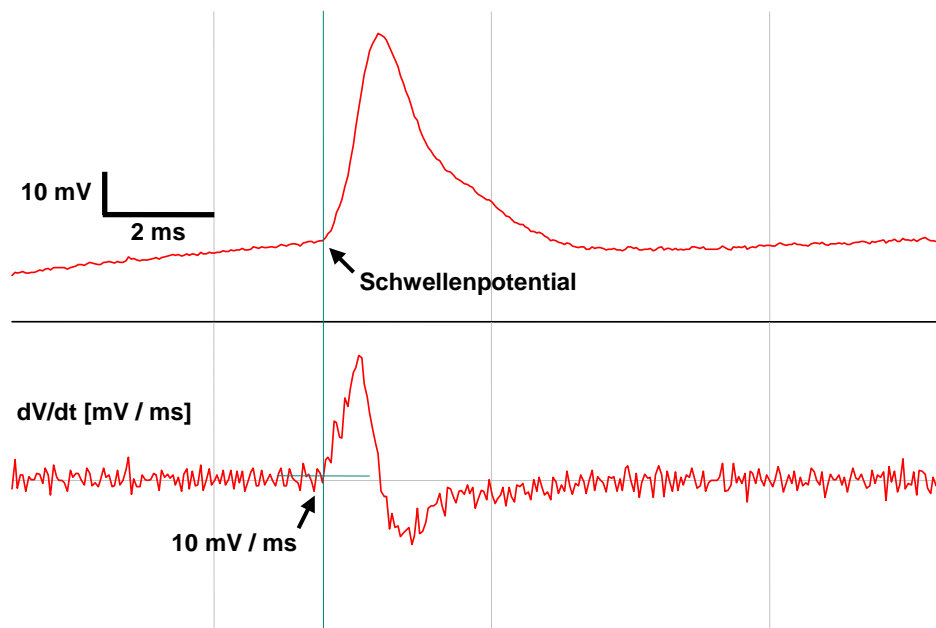


Abb.14:
Analyse des Schwellenpotentials eines Aktionspotentials. Die 1. Ableitung der Aufnahme wird im Programm Clampfit generiert und das Potential (mV) bei einer Steigung von 10 mV/ms bestimmt.

Es wurden Neurone des gleichen Alters von unterschiedlichen Messungen zusammengefasst. Weitere Datenbearbeitung erfolgte ebenfalls in Excel und Statistik mittels Origin.

Die Analyse der MEA-Messungen erfolgte mittels des Programms Spanner (S. Theiss u.a., Düsseldorf). Diese Software detektiert und analysiert automatisch Spikes feuender Neurone, die in den MEA-Ableitungen aufgenommen werden. Der Grenzwert für die Spike-Detektion wurde auf 20 μ V festgelegt, mit maximaler Spike-Amplitude von 300 μ V. Aus jeder 2-min Aufnahme werden die Anzahl der Spikes, Interspike-Intervalle, Anzahl der Bursts sowie Intervalle zwischen Spikes und Bursts und Kappa (κ) als Wert für die Synchronizität des Netzwerks ermittelt (Abb.15 A). Die detaillierte Definition und Herleitung von Kappa ist in Illes *et al.* (2009) beschrieben. Bei maximaler Synchronizität ist $\kappa = 1$. Zur gezielteren Analyse der Bursts im Netzwerk wurde die Auswertung erweitert und durch ein dafür entwickeltes Matlab-Programm (SSMT, Düsseldorf) überarbeitet. Hierbei konnten sogenannte „Population Bursts“ detektiert werden, die synchron im gesamten Netzwerk auftreten. Das

bedeutet, dass auf mehreren Elektroden zum gleichen Zeitpunkt korrelierende Bursts detektiert werden. Die Analyse lieferte ebenfalls Anzahl und Breite der Bursts, Inter-Burst Intervalle und die *Peak Firing Rate* (PFR) im Burst. Die PFR gibt die maximale Anzahl an Spikes in einem Burst wieder, was auch der Burst-Amplitude entspricht (Abb.15 B). Die Spike-Raster-Plots wurden ebenfalls automatisch in den Programmen generiert. Die Zusammenfassung der Daten erfolgte in Excel.

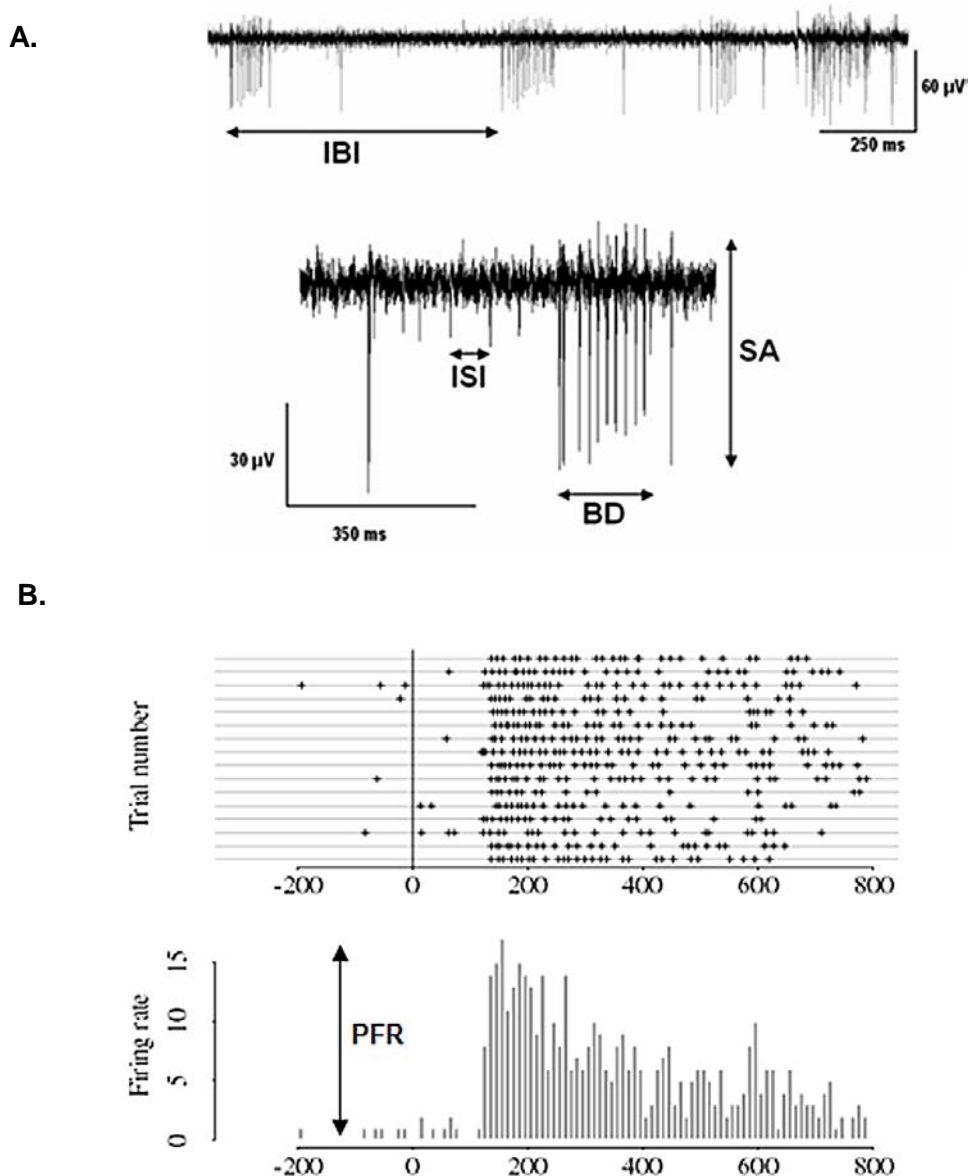


Abb.15:

A: MEA-Aufnahme / Spur aus einer Elektrode (aus Otto *et al.* 2009) mit einzelnen Spikes und Bursts. Die Pfeile zeigen Inter-Burst-Intervalle (IBI), Inter-Spike-Intervalle (ISI) und Burst-Dauer (BD) sowie Spike Amplitude (SA), welche im Programm „Spanner“ ausgewertet werden.

B: Raster Plot (oben) mit korrelierender *Firing Rate* eines Bursts (unten). Die PFR entspricht der maximalen *Firing Rate* in einem Burst (aus Kass *et al.* 2003)

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung eines hoch konservierten Threonin-Restes im S1-S2-Loop von $K_V7.2$ und $K_V7.3$

In verschiedenen K_V -Kanälen konnte gezeigt werden, dass ein Austausch des hoch konservierten Threoninrestes (Abb.16 B) im S1-S2-Loop zum Funktionsverlust des Kanals oder gar Verhinderung der Oberflächenexpression führt. Um den homologen Rest in $K_V7.2$ und $K_V7.3$ zu untersuchen (T114 bzw. T144), wurde der Threonin-Rest durch ein Alanin (Abb.16 A) ersetzt und sowohl homomere $K_V7.2$ und heteromere $K_V7.2/K_V7.3$ -Kanäle auf Funktion der Kanäle und Oberflächenexpression analysiert.

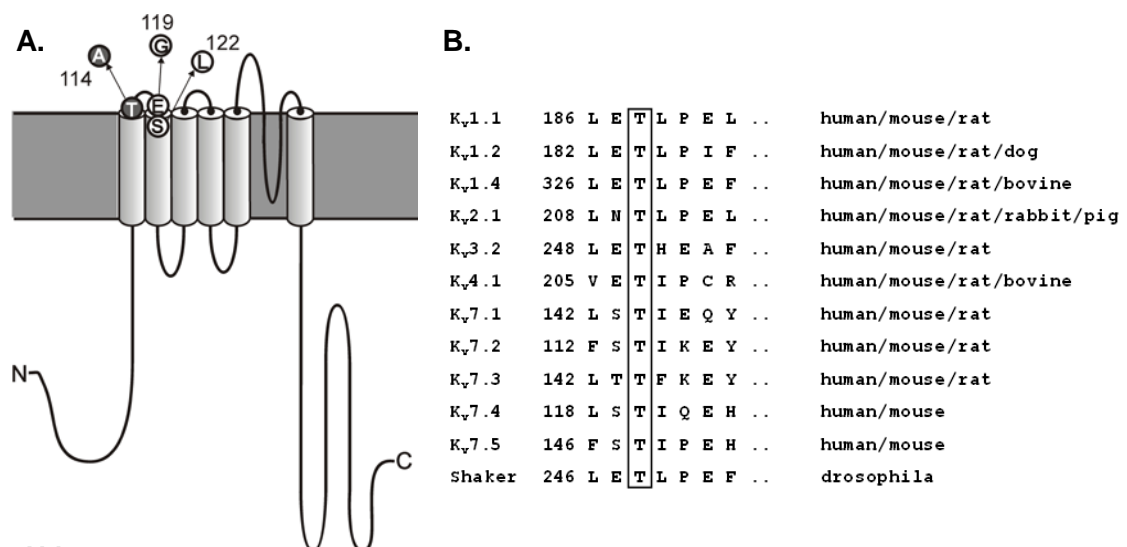


Abb. 16:

A. $K_V7.2$ – Kanal mit hochkonserviertem Thr-Rest in der Schleife zwischen S1/S2, welcher gegen Ala getauscht wird und benachbarte Epilepsie-assoziierte Mutationen E119G und S122L.

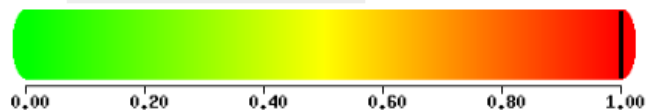
B. Beispiele der hohen Konservierung des Thr-Restes in verschiedenen Kaliumkanälen und Spezies.

Mit Hilfe des Vorhersage-Programms PolyPhen-2, was die Auswirkungen von Aminosäuresubstitutionen auf Proteine prognostiziert, konnte im Vorfeld abgeschätzt werden, ob ein funktioneller Effekt des Aminosäureaustausches bei $K_V7.2$ und $K_V7.3$ wahrscheinlich ist (Online Tool: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Laut Vorhersageprogramm wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Austausch des Threonin-Restes eine Störung von Struktur und/oder Funktion des Proteins sowohl für $K_V7.2$ als auch $K_V7.3$ verursacht (Abb. 17).

PolyPhen-2 report for O43526 T114A

This mutation is predicted to be **PROBABLY DAMAGING** with a score of **0.999** (sensitivity: **0.14**; specificity: **0.99**)

K_v7.2



PolyPhen-2 report for O43525 T144A

This mutation is predicted to be **PROBABLY DAMAGING** with a score of **0.997** (sensitivity: **0.41**; specificity: **0.98**)

K_v7.3

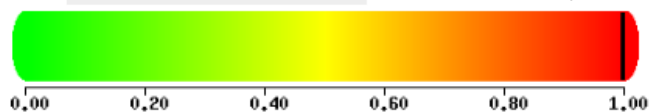


Abb. 17:

PolyPhen2-Vorhersage des Effektes vom Austausch des konservierten Thr gegen Ala in K_v7.2 und 7.3. Beide Mutationen werden mit hoher Wahrscheinlichkeit einen schädlichen Effekt auf die Proteinfunktion haben (Werte von ca. 0.99 bei 0 = kein Effekt und 1 = maximaler Effekt).

3.1.1 Mutation von Threonin zu Alanin führt zu verringerten Kaliumströmen

Für die elektrophysiologischen Messungen wurden die K_v7-Kanäle in CHO-Zellen exprimiert und die Kaliumströme mittels der *Whole-cell Patch-clamp* Technik aufgenommen. Der M-Strom wurde aufgenommen, indem das Haltepotential von -80 mV in 10 mV-Schritten für 2 Sekunden bis auf +60 mV verändert wurde. Zur Bestimmung des Gesamtstromes wurde die Amplitude des letzten Schrittes auf die Zellkapazität normalisiert und die Ströme von tetrameren Wildtyp und K_v7.2-T114A-Kanälen miteinander verglichen. Abb.18 zeigt repräsentative Messungen von Wildtyp und mutierten Kanälen. Die Auswertung mehrerer Messungen ist in Abb. 18 B aufgeführt. Kanäle, die mutierte Untereinheiten (UE) enthalten, weisen deutlich reduzierte Ströme auf etwa 50 % des WT auf. Der Stromkurvenverlauf (Abb.18 A) lässt auch eine verlangsamte Aktivierung mutierter Kanäle vermuten.

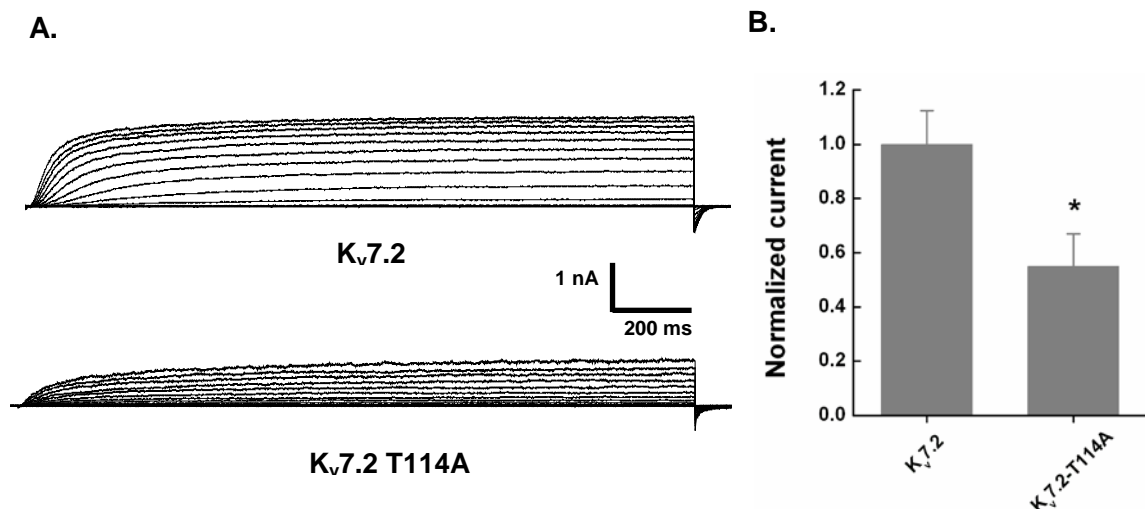


Abb. 18:

A. Repräsentative Kaliumströme von Kv7.2 und Kv7.2T114A in CHO-Zellen.
B. Stromdichte normalisiert zum WT, aufgenommen bei +60 mV, zeigt eine Reduktion für Kanäle mit mutiertem Kv7.2 um etwa 50 % (n = 12 -16).

3.1.2 Kv7.2T114A zeigt eine Verschiebung der Aktivierungskurve sowie veränderte Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik

Um die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung zu bestimmen, wurden mit Hilfe der Amplituden der Schwanzströme Leitfähigkeits-Spannungskurven erstellt und eine Boltzmann-Funktion angepasst. Mutierte Kanäle weisen eine starke Verschiebung der Aktivierungskurve um bis zu 25 mV im Vergleich zum WT auf (Abb.19 A). Die halbmaximale Aktivierung $V_{0.5}$ lag beim WT bei -12.3 ± 1.3 mV, bei Mutation bei $+12.5 \pm 1.3$ mV (n = 12).

Um die Aktivierungskinetik zu untersuchen, wurde eine Exponentialfunktion zweiten Grades an den Stromverlauf der 2 sek- Pulse bei verschiedenen Potentialen angepasst. Die daraus erhaltenen Zeitkonstanten τ_{akt} für die schnelle Aktivierung wurden miteinander verglichen (Abb.19 B). Enthält der Kanal mutierte UE, sind die Zeitkonstanten signifikant größer im Vergleich zu WT Kanälen, d.h. die Aktivierung ist verlangsamt. Beim +20 mV- Puls ist $\tau_{akt} = 76 \pm 5$ ms beim WT und 144 ± 10 ms bei Mutation, *** p < 0.001; n = 12 - 13. Der Anteil (Amplitude) der schnellen Zeitkonstante lag bei 40 – 50%.

Auch die Deaktivierungskinetik wird durch die Mutation des Threonin-Restes beeinflusst. Um diese zu bestimmen, wurde eine Exponentialfunktion ersten Grades an den Stromverlauf nach einem 0.5 sek- Puls auf Potentiale von +30

mV bis -140 mV angepasst, die auf einen 1.5 sek langen Prä-Puls auf +50 mV folgten, um die Kanäle zu öffnen. Die Deaktivierung mutierter Kanäle war bis zu doppelt so schnell und zeigte eine starke Reduktion der Spannungsabhängigkeit im Vergleich zu WT Kanälen (Abb.19 C). Beim -100 mV- Puls ist $\tau_{\text{deakt}} = 27.3 \pm 2.2$ für den WT und 13.6 ± 0.9 ms für die Mutation, ** $p < 0.05$; mit $n = 8 - 10$. Statistisch signifikante Unterschiede wurden hier im Bereich zwischen -100 mV und -90 mV festgestellt.

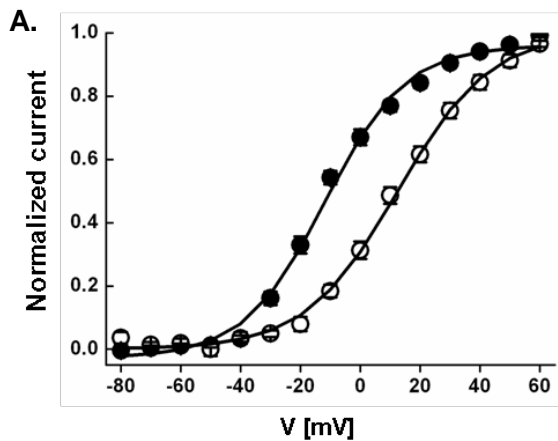
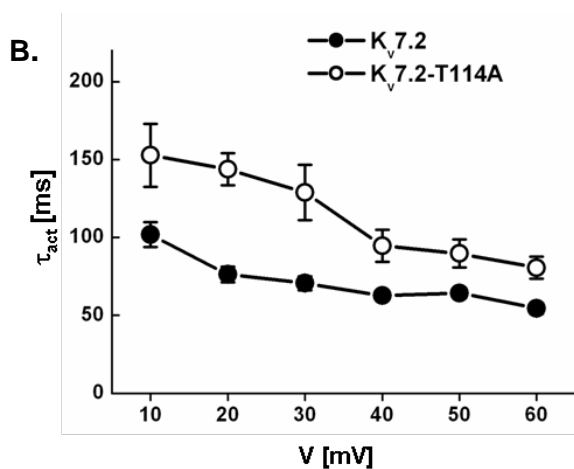


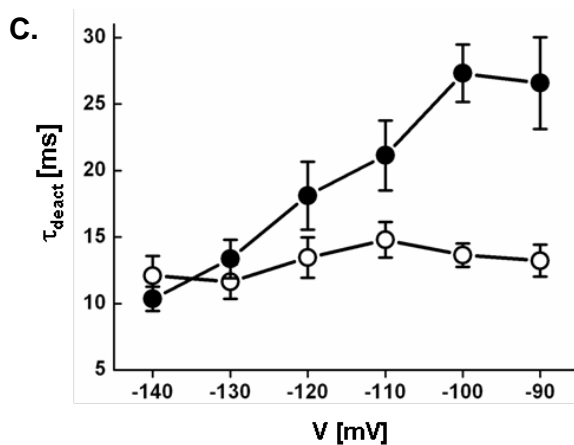
Abb. 19:
Auswertung der Ströme von homomeren $K_v7.2$ und $K_v7.2T114A$ -Kanälen

A. Leitfähigkeits-Spannungskurve von WT $K_v7.2$ und $K_v7.2T114A$. Die Mutation zeigt eine starke Verschiebung der Aktivierungskurve zu mehr depolarisierten Potentialen.



B. Der erhöhte Wert der Aktivierungszeitkonstante zeigt eine verlangsamt Aktivierung von mutierten Kanälen im Vergleich zum WT an.

C. Die Deaktivierung ist beschleunigt und verliert ihre Spannungsabhängigkeit.



3.1.3 Die Effekte des Threoninaustauschs auf die Funktion heteromerer $K_V7.2/K_V7.3$ -Kanäle sind ähnlich wie bei Homomeren

Bei Ko-Expressionsexperimenten mit dem entsprechendem Threoninaustausch in der $K_V7.2$ oder $K_V7.3$ - Kanaluntereinheit konnte ebenso eine verminderte Stromdichte festgestellt werden. Die stärksten Auswirkungen gab es, wenn beide Kanaluntereinheiten mutiert waren (Abb.20).

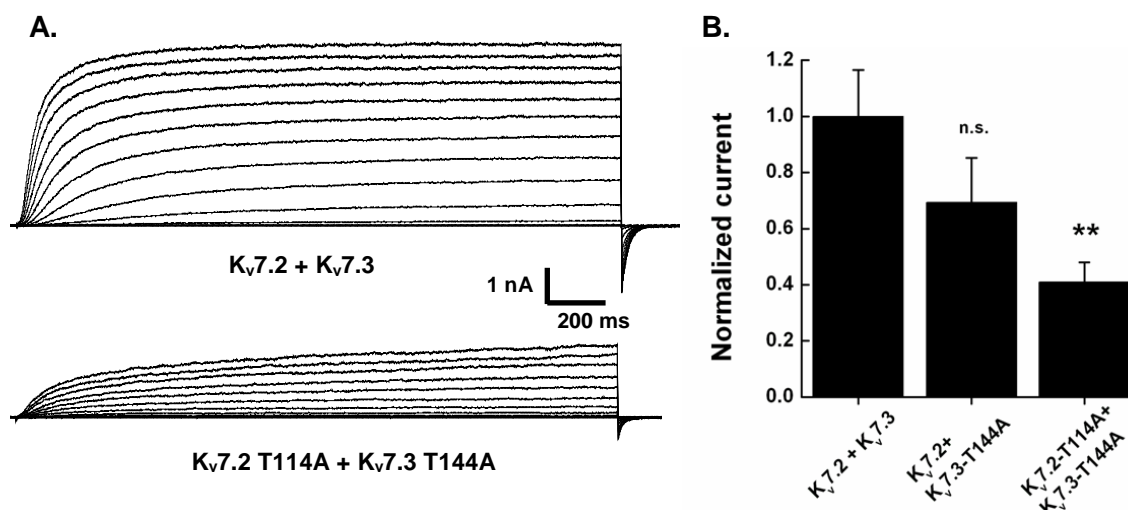


Abb. 20:

- A. Repräsentative Ströme von heteromeren $K_V7.2/K_V7.3$ WT und mutierten Kanälen.**
**B. Stromdichte normalisiert zum WT, aufgenommen bei +60 mV, zeigt eine Reduktion für heterotetramere Kanäle mit mutierten UE. Die Reduktion ist am stärksten für Kanäle mit beiden mutierten UE (~40%) (n = 10 - 14).
 ** p < 0.05; n.s. = nicht signifikant**

Auch die Leitfähigkeits-Spannungskurve zeigt eine Verschiebung der Aktivierung zu stärker depolarisierten Potentialen für Kanäle mit Threonin-Austausch (Abb.21 A), mit halbmaximaler Aktivierung $V_{0.5} = -11 \pm 2$ mV für WT-Kanäle, -1.1 ± 1.7 mV für WT $K_V7.2 + K_V7.3-T144A$ und $+17.2 \pm 1.5$ mV für Kanäle mit komplett mutierten UE (n = 9 - 14).

Die Zeitkonstanten für die Aktivierung waren nur signifikant unterschiedlich bei Kanälen mit ausschließlich mutierten UE (Abb.21 B). Beim +20 mV- Puls z.B. war $\tau_{akt} = 85 \pm 8$ ms bei WT-Kanälen und 123 ± 12 ms bei Kanälen mit komplett mutierten UE, * p < 0.01 (n = 8 - 14). Bei der Deaktivierung hingegen führte der Threonin-Austausch beider UE zu einer erheblichen Beschleunigung der Deaktivierung mit nahezu komplettem Verlust der Spannungsabhängigkeit. Für heteromere Kanäle mit $K_V7.3-T144A$ und $K_V7.2$ WT - UE waren die Effekte schwächer ausgeprägt, jedoch deutlich erkennbar

für die Leitfähigkeits-Spannungskurve und Kinetik der Deaktivierung im Vergleich zu WT-Kanälen (Abb.21 C). Beim -100 mV- Puls war $\tau_{\text{deakt}} = 33.3 \pm 2.2$ ms für WT-Kanäle, 23.2 ± 3.5 ms für $K_V7.3\text{-T144A} + K_V7.2$ WT (n.s.) und 11 ± 1.7 ms für Kanäle mit allen UE mutiert, *** (n = 6 - 10). Statistisch signifikante Unterschiede wurden für komplett mutierte Kanäle im Bereich -140 mV bis -90 mV im Vergleich zum WT gefunden.

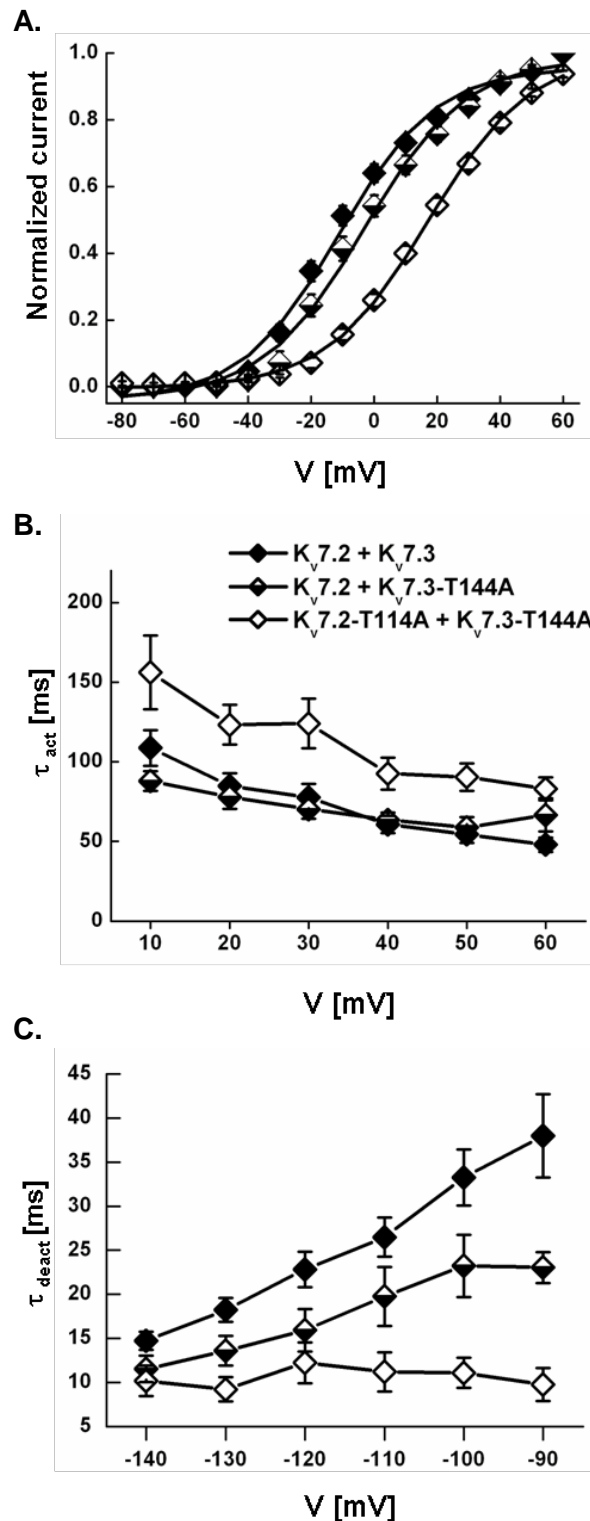


Abb. 21:
Auswertung der Ströme von heteromeren $K_V7.2/K_V7.3$ WT und mutierten Kanälen

- A.** Leitfähigkeits-Spannungskurve. Kanäle mit ausschließlich mutierten UE zeigen eine starke Verschiebung der Aktivierungskurve zu mehr depolarisierten Potentialen.
- B.** Die Aktivierungszeitkonstanten für Kanäle mit ausschließlich mutierten UE sind größer und somit die Aktivierung verlangsamt im Vergleich zum WT.
- C.** Die Deaktivierung ist wie bei $K_V7.2$ Homomeren beschleunigt und verliert die Spannungsabhängigkeit. Sind nur die $K_V7.3$ UE mutiert, sind nur sehr geringfügige Effekte auszumachen.

Zusammengefasst bewirkt der Austausch des konservierten Threonin-Restes in $K_V7.2$ und $K_V7.3$ eine Reduktion des Stromes, eine Verschiebung der Aktivierung zu mehr depolarisierten Potentialen sowie eine verlangsamte Aktivierungskinetik und eine beschleunigte Deaktivierung der Kanäle, mit ausgeprägteren Effekten bei $K_V7.2$.

3.1.4 Die immunzytochemische Analyse zeigt keine Unterschiede von Lokalisation oder Oberflächenexpression der mutierten Kanäle

Die mit WT und mutierten K_V7 -Kanälen transfizierten CHO-Zellen wurden mit anti- $K_V7.2$ Antikörpern angefärbt und die Expressionsmuster am Fluoreszenzmikroskop verglichen (Abb.22). Nur ein geringer Teil der Kanäle gelangt in die Membran, hauptsächlich sind sie im ER nachweisbar, was die verstärkte Detektion um den Zellkern zeigt. Zwischen Wildtyp und Mutation ist kein Unterschied im Expressionsmuster erkennbar.

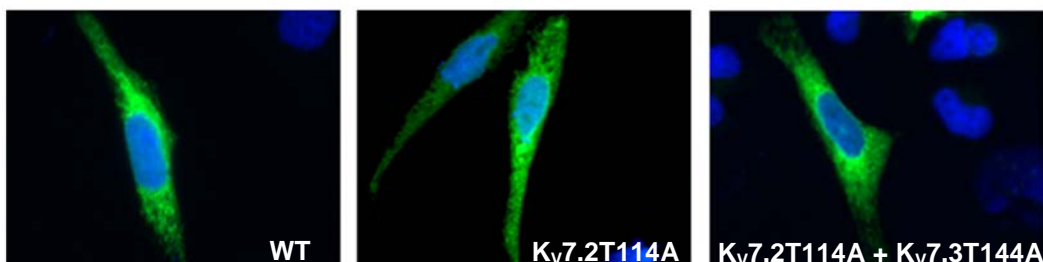


Abb. 22:
Immunzytochemischer Nachweis der Expression von WT $K_V7.2$ Kanälen im Vergleich zu homomeren $K_V7.2T114A$ und heteromeren $K_V7.2T114A + K_V7.3T144A$ – Kanälen in transfizierten CHO-Zellen. Alexa 488 anti- $K_V7.2$ (grün) und DAPI (blau).

3.1.5 Nachweis der Oberflächenproteine mittels Biotinylierung und Quantifizierung im Western Blot

Ein möglicher *Trafficking*-Defekt und verminderte Oberflächenexpression kann auch über Markierung der Oberflächenproteine und anschließende Analyse im Western Blot nachgewiesen werden. Es konnte jedoch auch mit diesem Verfahren keine Reduktion der Oberflächenexpression der mutierten Kanäle festgestellt werden.

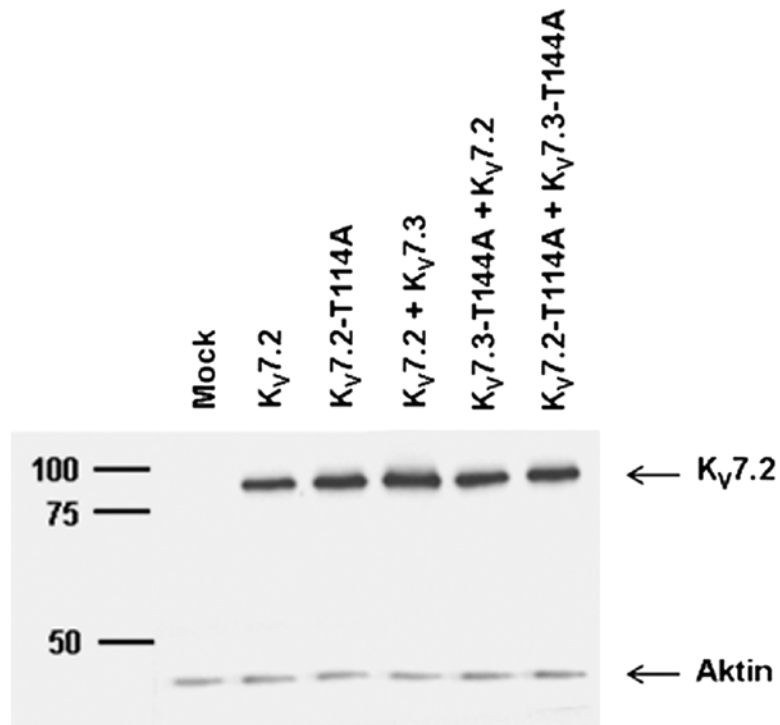


Abb. 23:
Nachweis der Oberflächenexpression von Kv7.2 im Western Blot. Die Signale für WT und Kanäle mit mutierten UE sind vergleichbar.

Die Oberflächenproteine wurden aus mit der entsprechenden Kv7.2-Variante transfizierten CHO-Zellen gewonnen, als Kontrolle (Mock) wurden CHO-Zellen verwendet, die ohne DNA transfiziert wurden. Das Signal für Kv7.2 bei ca. 90 kDa war bei allen Proben außer der Kontrolle etwa gleich und weist daher nicht auf eine Reduktion des Kanals auf der Membranoberfläche hin (Abb. 23). Die Ladekontrolle (Aktin) bestätigt die Verwendung äquivalenter Probenmengen, sollte bei Biotinylierungs-Assays allerdings nur schwache Signale zeigen, da sich das Protein innerhalb der Zelle befindet und nur wenig an Membranproteine gebunden vorliegt.

3.2 Untersuchung verschiedener Epilepsie-assoziiertes *KCNQ2*-Mutationen in neuronalen *KCNQ2* +/- Kulturen mittels lentiviraler Expression

3.2.1 Optimierung der lentiviralen Konstrukte

In den ersten Infektions-Ansätzen mit viralen Partikeln auf der Basis des pLenti4/TO/V5-Dest Vektors konnte auch nach Variation verschiedenster Komponenten keine erfolgreiche Expression mit zufriedenstellender Viabilität der Zellen erreicht werden. Folgende Bedingungen wurden hierfür variiert:

- Dauer der Virusproduktion 24 – 72 Std
- Menge des zugegebenen Virus bei Infektion
- Infektion an verschiedenen Tagen der Kultur *in vitro* (*Days in vitro*; DIV 0 – 12)
- Zugabe von Polybren als Infektionsverstärker
- Zugabe von Apoptoseinhibitoren
- Zugabe von Arabinose C (Ara C) zur Inhibition des Gliawachstums

Trotz der Optimierungsversuche ergab sich entweder gar keine Expression bzw. keine nachweisbare Fluoreszenz oder in den meisten Fällen ein Absterben der transduzierten neuronalen Kultur. Diese Effekte waren schon 1 Tag nach Infektion zu beobachten. Die absterbenden Nervenzellen konnten aber als grüne „Trümmer“ in der Kultur identifiziert werden, was auf zunächst erfolgreiche Infektion und Expression hindeutet. Demnach könnten die toxischen Effekte entweder durch die Infektion an sich oder die Expression entstanden sein.

In parallel laufenden Experimenten wurde versucht, $K_v7.2$ markiert mit GFP ($K_v7.2$ -GFP) mit Hilfe gängiger Transfektionsmethoden in den Neuronenkulturen zu exprimieren. Die sensitiven Primärkulturen reagieren empfindlich auf die meisten Transfektionsreagenzien und lassen sich sehr uneffizient transfizieren. Nach Optimierung der Protokolle mit Optifect™ konnten erfolgreich transfizierte und ausreichend vitale Neurone nachgewiesen werden. Jedoch war auffällig, dass die meisten transfizierten Neurone ein untypisches Expressionsmuster für K_v7 -Kanäle aufweisen (Abb.24 A). Die

Expression schien nicht gleichmäßig über die Membran verteilt, sondern in mehreren Klumpen in der Zelle, was auf die Bildung aggregierter Proteine hindeuten kann.

Zur Erklärung dieses Effekts wurde die derzeitige Literatur überprüft und Studien über die toxischen Effekte durch Überexpression von K_V7 -Kanälen gefunden. Zhou *et al.* (2010) konnten in verschiedenen Experimenten nachweisen, dass durch Überaktivierung oder -expression der *KCNQ2* und *KCNQ3* Gene Apoptose in neuronalen Kulturen eingeleitet wird, was wahrscheinlich durch die Depletion von Kalium aus der Zelle ausgelöst wird. In einem *Rescue*-Experiment wurde mit erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration diesem Effekt entgegengewirkt.

Da in unserem Fall mit dem CMV-Promotor im lentiviralen Konstrukt auch eine starke Expression von *KCNQ2* und *KCNQ3* erreicht wird, könnten auch hier toxische Effekte durch Einleiten von Apoptose ein Grund für das Absterben der Kulturen sein. Deshalb wurden vergleichbare *Rescue*-Experimente mit erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration unternommen und die Expression und Viabilität transfizierter Neuronen mit den herkömmlichen Bedingungen verglichen.

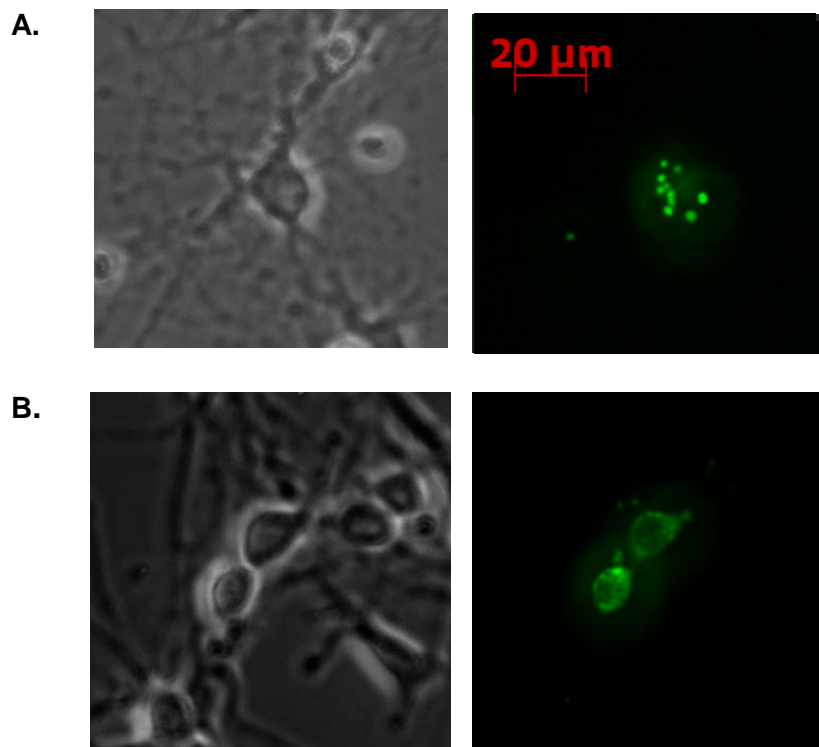


Abb. 24:
Neurone, transfiziert mit $K_V7.2$ -GFP (grün)
A: normale Bedingungen, 24 h nach Transfektion. Aggregiertes $K_V7.2$ -GFP.
B: Nach Zugabe von KCl ins extrazelluläre Kulturmedium (~10 mM) . Normales
Expressionsmuster.

Unmittelbar nach Inkubation mit dem Transfektionsreagenz wurden bei Medienwechsel verschiedene Konzentrationen an KCl ins Medium gegeben (5 – 25 mM Endkonzentration) oder zum Vergleich ein Apoptoseinhibitor oder der Kaliumkanalblocker 4-AP. Ein verbessertes Expressionsmuster sowie eine leicht erhöhte Transfektionseffizienz konnte ab einer K^+ -Konzentration > 5 mM und einer Inkubationszeit >3 Std, aber <24 Std beobachtet werden (s. Abb. 24). Die anderen Reagenzien schienen keinen erheblichen Effekt zu erzielen. Die besten Ergebnisse wurden mit einer Kaliumkonzentration von etwa 10 mM erzielt. Jedoch verschiebt sich durch die erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration das Membranpotential der Zellen, was die Zellen dauerhaft depolarisiert und längerfristig auch schädliche Effekte auf die Kulturen zeigt. Vor allem bei Konzentrationen > 10 mM zeigten die Kulturen nach >24 Std wieder apoptotische Effekte in den Kulturen mit aggregierten Kanälen und Absterben der Zellen. Daher muss der apoptotische Effekt aufgrund der starken Kanalexpression anderweitig verhindert werden.

Um dem Überexpressionseffekt entgegenzuwirken wurde auf die Wahl eines schwächeren Promotors gesetzt. Durch Austausch mit dem benachbarten Naturwissenschaftlichen und medizinischem Instituts (NMI) in Reutlingen konnte ein ebenfalls auf dem von Life Technologies basierendes lentivirales Konstrukt mit einem CamKII Promotor getestet werden. Die Calmodulin-abhängige Kinase II ist eine Serin-Threonin-Kinase, die hauptsächlich im Gehirn exprimiert und diverse neuronale Funktionen reguliert (Yamauchi 2005). Nach erfolgreicher Infektion mit einem GFP-kodierenden Kontrollplasmid wurden die bisherigen Konstrukte über das Gateway®-System aus dem ursprünglichem TOPO-Vektor in den neuen Vektor umklontiert und virale Partikel mit diesen hergestellt.

3.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der Expression des GFP-markierten Kanals

Circa 6-7 Tage nach der Infektion der neuronalen Kulturen mit den viralen Partikeln konnte die Expression der Kanäle über die Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Bis etwa 12 Tage post-Infektion wurde das Signal noch etwas stärker und blieb dann auf einem konstanten Level, was bis zu 25 Tage nach Infektion beobachtet wurde.

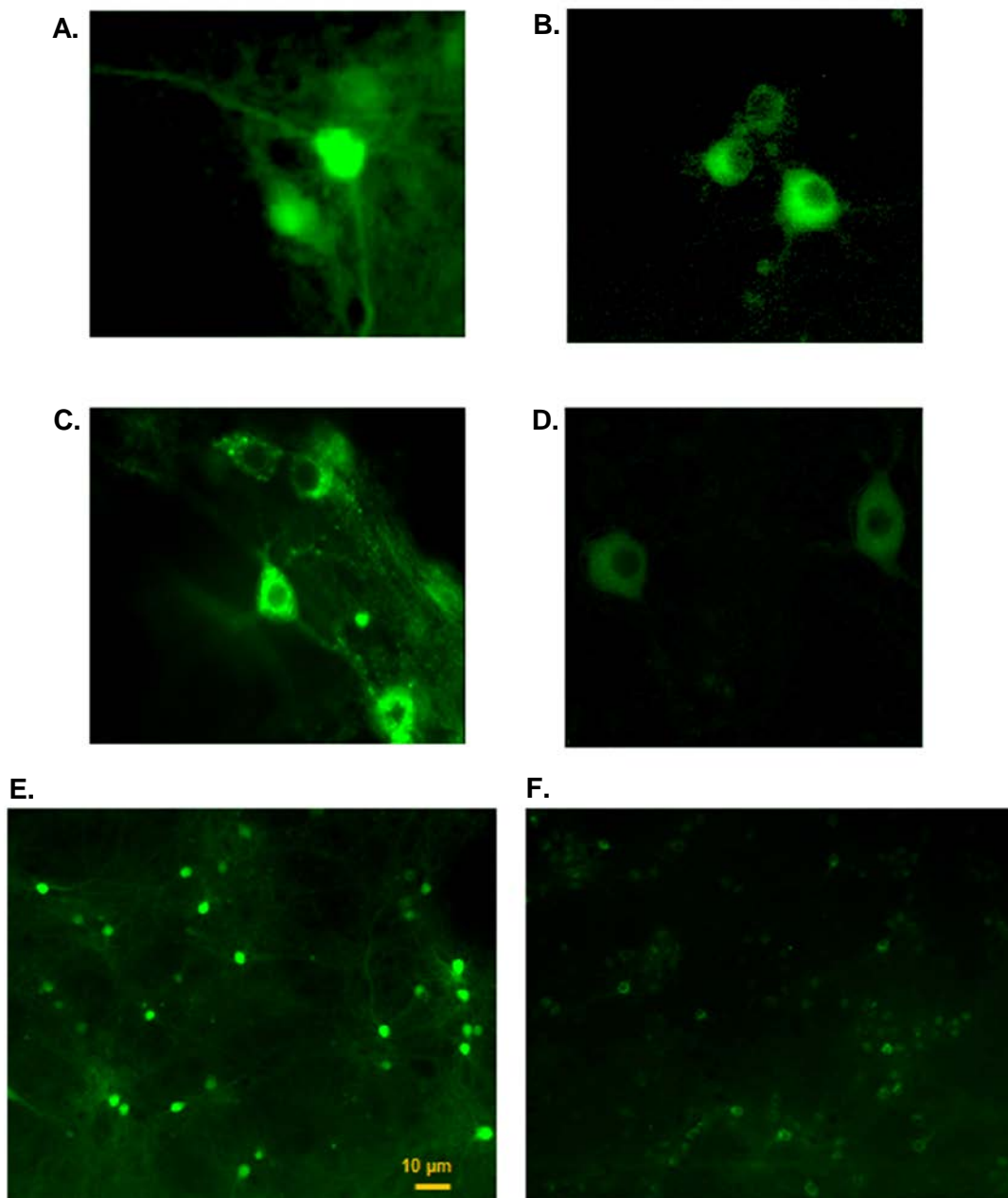


Abb. 25:
Spezifische neuronale Expression nach Infektion mit Lenti04/CamKII-Vektor, 11 – 16 Tage nach Infektion
A: GFP-Kontrolle B: $K_v7.2$ -GFP C: $K_v7.2$ -GFP [R207Q]
D: $K_v7.2$ -GFP [N258S] E: Übersicht einer infizierten Neuronenkultur (GFP) zur Visualisierung der Transduktionseffizienz F: wie E, $K_v7.2$ -GFP

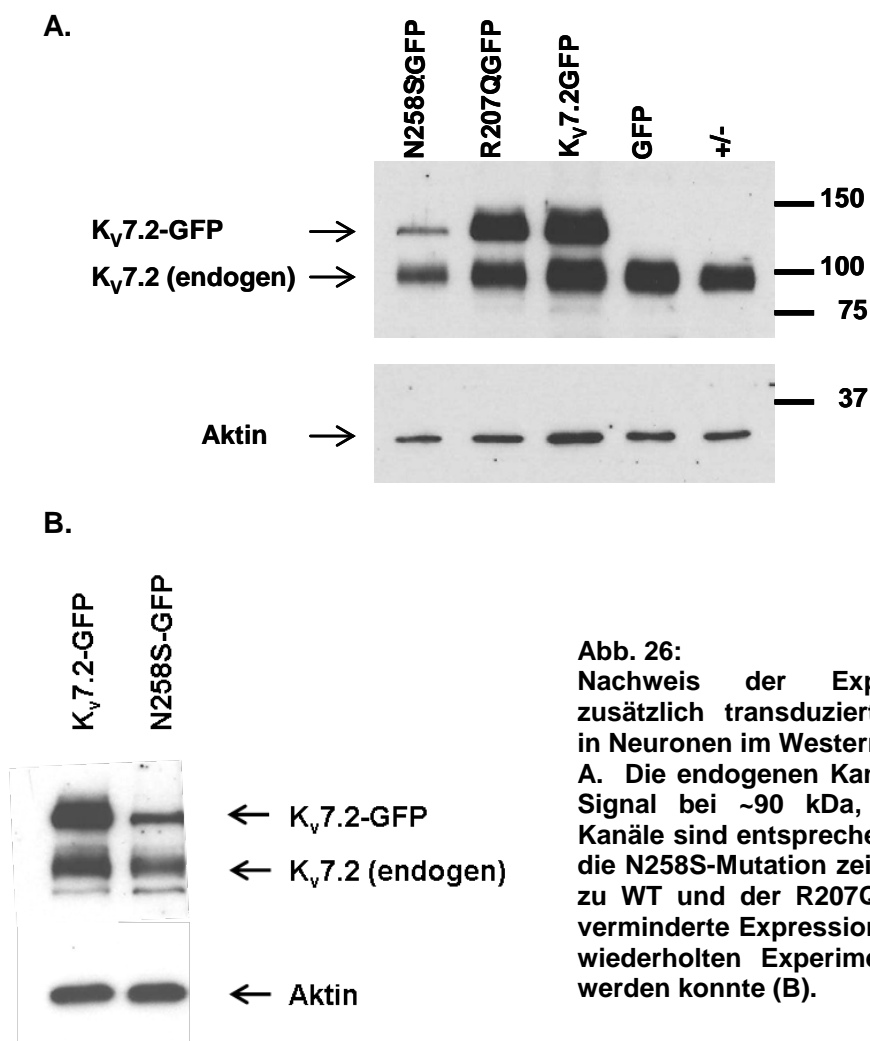
Die GFP-Kontrolle exprimiert in der gesamten Zelle (Abb.25 A). Die Kanäle weisen hingegen eine Aussparung des Fluoreszenzsignales im Bereich des Zellkerns auf, da sich die Kanäle hauptsächlich im ER und der Zellmembran

befinden sollten (Abb.25 B - D). Ein besonders starkes Signal am Axoninitialsegment konnte nicht beobachtet werden.

Die Mutation N258S weist ein wesentlich schwächeres Expressionssignal im Vergleich zum WT oder der R207Q-Mutation auf (Abb.25 D). Bei der GFP-Kontrolle war die Transduktionseffizienz noch etwas höher (Abb.25 E), was bei den immunzytochemischen Färbungen (siehe 3.2.4) quantifiziert wurde.

3.2.3 Verifizierung der Expression mittels Western Blot Analyse

Die erfolgreiche Expression der GFP-markierten $K_v7.2$ Konstrukte wurde neben der Identifizierung grün leuchtender Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auch durch Detektion im Western Blot kontrolliert. Es wurden je 15 μ g Proteingesamtlysat infizierter Zellen PI 10 im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend im Western Blot mit dem anti- $K_v7.2$ –Antikörper detektiert.



Die Expression von $K_v7.2$ -GFP ist am Tag 10 nach Infektion deutlich erkennbar und durch die Bandenverschiebung auf >100 kDa vom endogenen $K_v7.2$ (ca. 90 kDa) zu unterscheiden (Abb.26).

Die zusätzliche Expression der GFP-markierten Kanäle nach Infektion ist ähnlich der Expression der endogenen Kanäle. Auffällig ist das abgeschwächte Signal bei der N258S-Mutation. Im Vergleich zum WT und auch R207Q ist die Expression wesentlich schwächer, was auch fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden konnte. Zwar ist hier auch das Signal der Aktin-Kontrolle etwas schwächer, aber nicht so deutlich wie für das Signal von $K_v7.2$. Der endogene $K_v7.2$ -Kanal ist bei den restlichen Proben verhältnismäßig gleich stark exprimiert, wenn man die leichte Variation der Proteinkonzentration auch in der Aktinkontrolle mit betrachtet, auch wenn keine zusätzlichen Kanäle exprimiert werden wie in der GFP-Kontrolle oder bei komplett unbehandelten heterozygoten *KCNQ2* Neuronenkulturen (+/-) (Abb.26 A). Da es sich um Mischkulturen aus hippokampalen Zellen handelt, in denen unterschiedliche Anteile von Glia- und Nervenzellen vorhanden sind, ist eine geringe Variation der Menge der Kanäle von Probe zu Probe nachvollziehbar und nicht zu vermeiden. In Wiederholungen des Experimentes (Western Blot mit Proteinproben aus im neuen Ansatz transduzierten Zellen mit Virus aus einer alternativen Ernte) konnte aber das beobachtete Ergebnis reproduziert werden- die N258S-Variante zeigt eine geringere Expression der Kanäle, sowohl der endogenen als auch der durch Infektion zusätzlich exprimierten Kanäle (Abb.26 B). Dies deutet auf einen dominant-negativen Effekt auf die endogenen WT-Kanäle und *Trafficking*-Defekt dieser Mutation hin.

3.2.4 Verifizierung der Expression mittels Immunfärbung

Zur zusätzlichen Verifizierung der Expression von $K_v7.2$ -GFP nach Infektion wurden die Neurone ab 10 Tage nach Infektion immunzytochemisch analysiert. Zunächst wurden hippokampale Neurone transduziert mit $K_v7.2$ -GFP 14 Tage post-Infektion (PI 14) mit einem anti-GFP Antikörper und sekundären Alexa568-Antikörper (rot) angefärbt und das Signal mit dem des GFP-Signals der exprimierten Kanäle verglichen. Die Fluoreszenzsignale zeigen wie erwartet eine starke Überlappung, d.h. das mit anti-GFP-Antikörper detektierte Signal

sollte tatsächlich von zusätzlich exprimierten GFP-markierten Kanälen stammen und nicht durch Hintergrundfluoreszenz entstanden sein. Außerdem zeigt es die spezifische Bindung der Antikörper (Abb. 27).

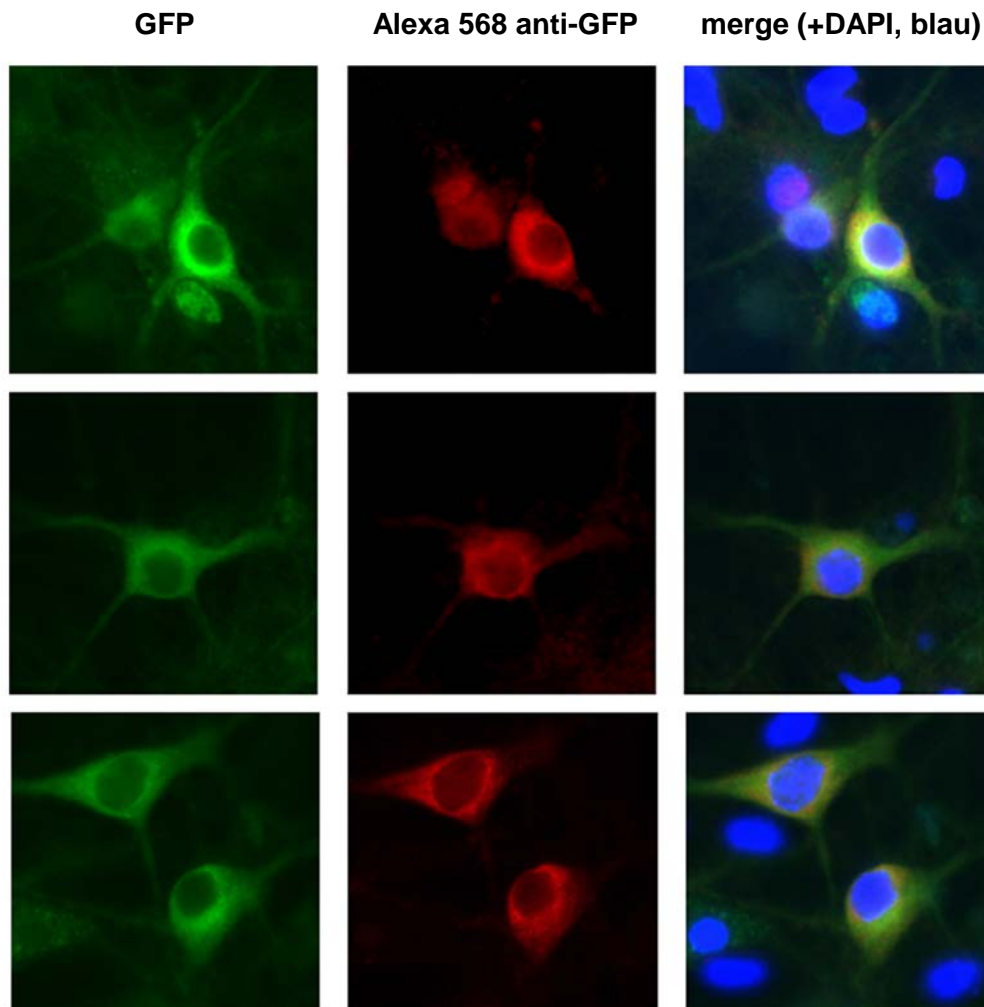


Abb. 27:
Nachweis der Expression von zusätzlich transduziertem $K_V7.2$ -GFP in Neuronen mittels Immunfärbung PI 14. Grün = Signal des exprimierten $K_V7.2$ -GFP; Rot = Alexa568 anti-GFP; Blau = DAPI; Zellkernfärbung

Eine weitere Färbung infizierter Neurone mit WT und mutierten $K_V7.2$ -GFP PI 11 (= Tag 14 der Kultur *in vitro*; DIV 14) erfolgte mit anti-GFP und dem neuronalen Marker anti-MAP2, durch den die Nervenzellen von den Gliazellen in der Kultur unterschieden werden können (Abb.28).

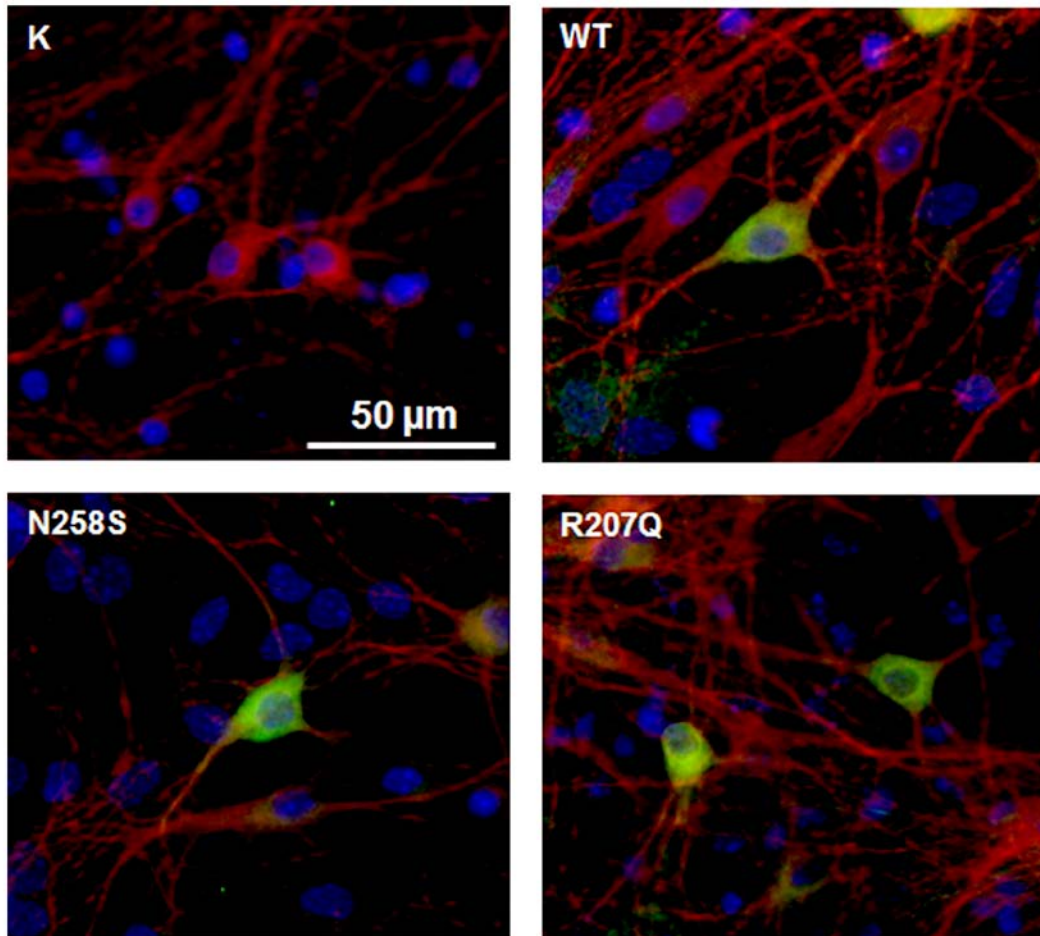


Abb. 28:
Nachweis der Expression von zusätzlich transduziertem $K_v7.2$ -GFP in Neuronen mittels Immunfärbung. K = Kontrolle, GFP gefärbt nur mit anti-MAP2 ohne anti-GFP. Grün = Alexa 488 anti-GFP; Rot = Alexa568 anti-MAP2; Blau = DAPI; Zellkernfärbung (zeigt neben Neuronen auch Glia-Zellen).

Die Färbung der Neurone ist hier bei WT und Mutationen hinsichtlich des Expressionsmusters und der Transduktionseffizienz vergleichbar. Die Expression von $K_v7.2$ in der Membran pyramidaler Neurone und das mit anti-MAP2 gefärbte neuronale Netzwerk sind gut erkennbar. Von in der Kultur ebenso enthaltenen Glia-Zellen wird nur der Zellkern angefärbt (Abb. 28).

Um die Transduktionseffizienz zu quantifizieren, wurden aus je 2 Färbungen jeder Variante 2 – 3 Bildausschnitte (20er Objektiv) ausgewählt und die Gesamtanzahl der Neurone (ca. 30 – 80 pro Bildausschnitt) ausgezählt und der Anteil GFP-exprimierender Neurone bestimmt. Daraus ergab sich für alle Varianten, die GFP-markierte $K_v7.2$ -Kanäle exprimieren, eine Transduktionseffizienz von 85 – 92 % und für die GFP-Kontrolle 93 – 94 %.

3.2.5 Elektrophysiologische Untersuchung infizierter *KCNQ2* +/- Neuronenkulturen

Nach ca. 7 Tagen in Kultur sind die Neurone so weit ausgebildet, dass sie Netzwerke bilden und Aktionspotentiale generieren. Auch die Expression der zusätzlich transduzierten Kanäle ist ab diesem Alter gut erkennbar und stabil. Ab DIV 10 wurden Ganzzell- Patch Clamp Ableitungen und Aufnahmen auf Multielektroden-Arrays (MEAs) durchgeführt. Aufgrund der schwachen Expression der N258S-Mutation konnte diese nur in der Netzwerkanalyse elektrophysiologisch untersucht werden, da einzelne positiv transduzierte Neurone für Patch-Clamp Untersuchungen nicht zu identifizieren waren.

3.2.5.1 M-Strom Größe und Aktivierung

Für die Analyse des M-Stroms wurde auch hier das „klassische“ M-Stromprotokoll verwendet (siehe 2.6.2.1). Es wurden die Amplitude des M-Stromes (Abb. 29) sowie die spannungsabhängige Aktivierung 8 – 9 Tage PI (DIV 11/12) untersucht.

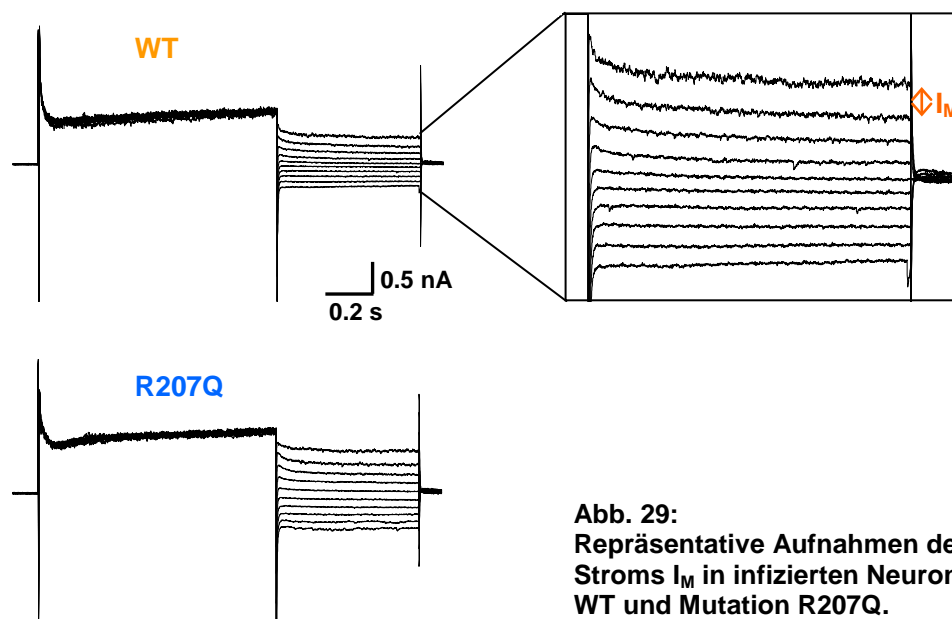


Abb. 29:
Repräsentative Aufnahmen des M-Stroms I_M in infizierten Neuronen, WT und Mutation R207Q. (Beschreibung s. 2.6.2.1)

Bei der Amplitude des M-Stroms gibt es keine signifikanten Unterschiede in Zellen mit zusätzlich transduzierten WT (Q2GFP) oder R207Q-Kanälen (Abb.30 A). Die Aktivierungskurve ist jedoch signifikant verschoben bei Potentialen von -70 mV bis -50 mV (Abb.30 B) und die Tendenz ist auch bei -40 mV noch erkennbar. Die Kanäle öffnen also erst bei stärker depolarisierenden Potentialen. Dieser Effekt konnte für diese Mutation bereits in elektrophysiologischen Messungen an Oozyten nachgewiesen werden (Wuttke et al. 2007) und ist in transfizierten Neuronen reproduzierbar.

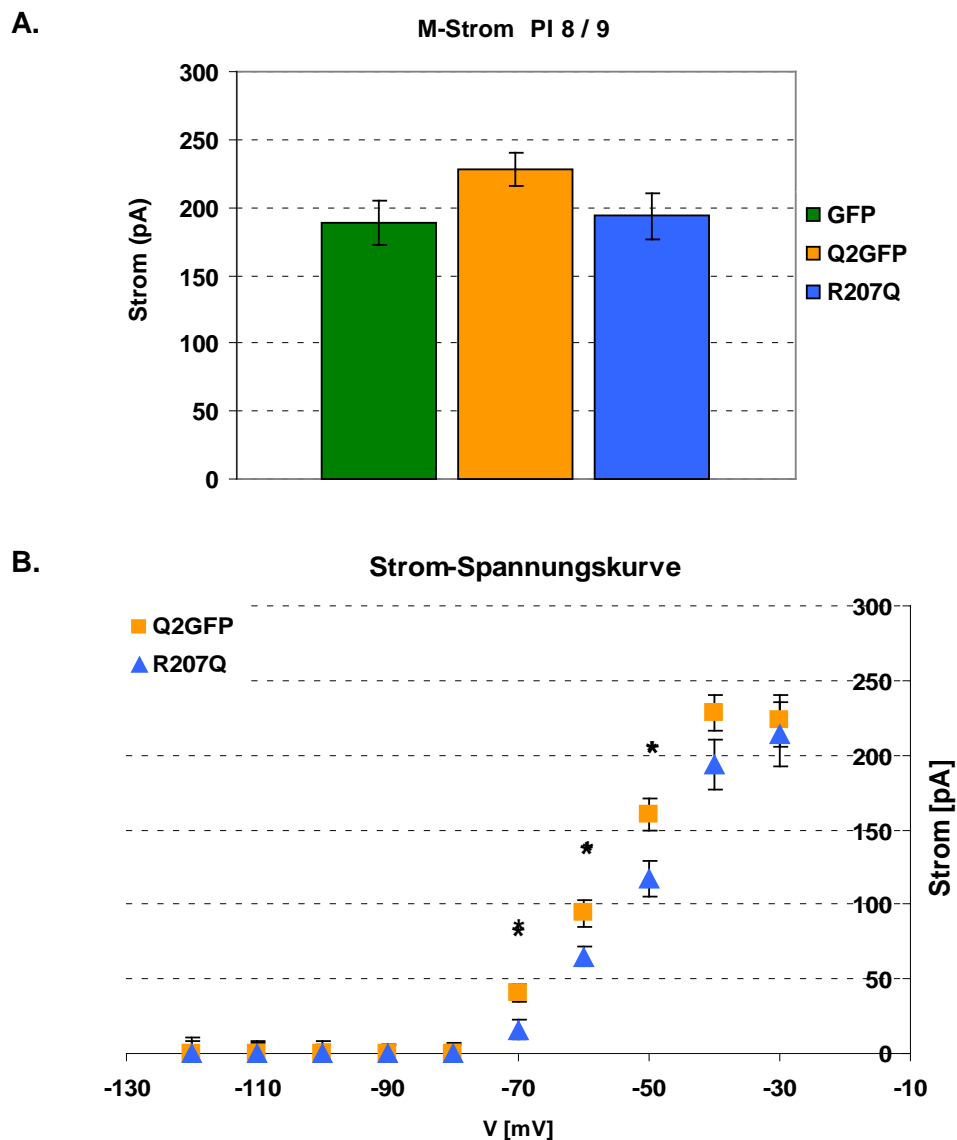


Abb. 30: Analyse aus M-Stromprotokoll infizierter Neurone

A. M-Stromamplitude infizierter Neurone PI 8 / 9. Neurone mit WT-Kanälen (Q2GFP) zeigen tendenziell einen erhöhten M-Strom im Vergleich zur Mutation R207Q (n = 12 – 16).

B. Strom-Spannungs-Kurve infizierter Neurone PI 8 / 9

Bei Potentialen von -70 bis -50 mV zeigt die Mutation eine signifikante Verschiebung in Richtung stärker depolarisierender Potentiale (n = 12), $V_{0.5}$ für WT = -56.9 mV; für R207Q = -51.4 mV.

3.2.5.2 Feuerungsverhalten

Das Feuerungsverhalten der infizierten Neurone wurde im *Current-Clamp* Modus untersucht. Durch Injizieren von Strompulsen verschiedener Stärken und Dauer werden Aktionspotentiale (APs) ausgelöst.

Im Standardprotokoll zur Bestimmung von Eingangswiderstand und Feuerungsrate wurde Strom von -0.1 bis 0.3 nA in 0.025 nA-Schritten für eine Dauer von 500 ms injiziert, ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV. Für die Feuerungsrate ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb.31).

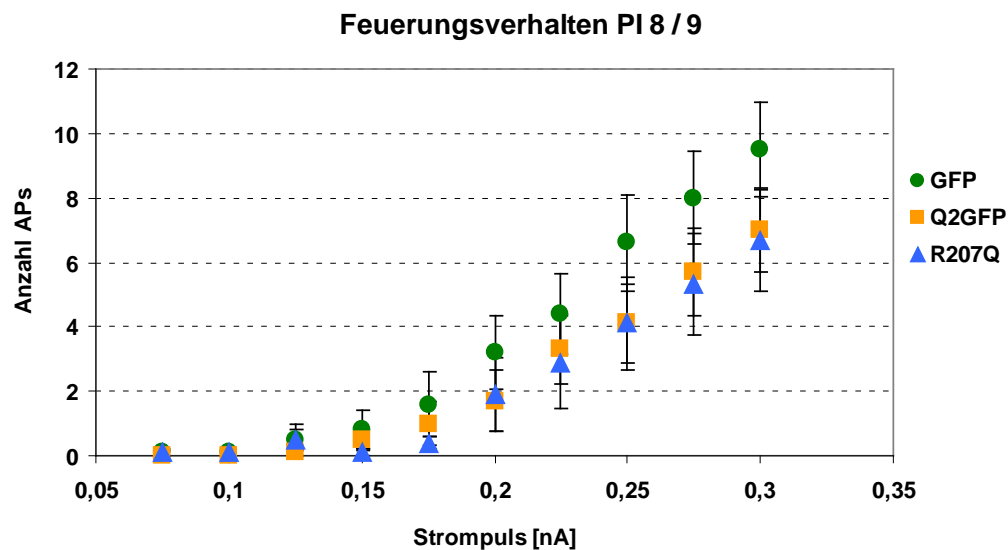


Abb. 31: Anzahl ausgelöster Aktionspotentiale in infizierten Neuronen von +0.075 nA bis +0.3 nA Strompuls. Die Anzahl der APs zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle (GFP), WT (Q2GFP) und Mutation (R207Q) (n = 10).

Tabelle 2: Elektrophysiologische Parameter infizierter Neurone: Ruhemembranpotential und Eingangswiderstand. Werte +/- S.E.M. (n = 12)

| | GFP | Q2GFP | R207Q |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| Membranpotential | -60.1 +/- 1.85 | -58.8 +/- 2.84 | -57.5 +/- 1.33 |
| Eingangswiderstand | 234 +/- 20.8 | 182 +/- 20 | 190 +/- 17.6 |

Die Eingangswiderstände sind bei Neuronen, die zusätzlich Kanäle exprimieren, wie zu erwarten etwas niedriger als bei der GFP-Kontrolle (Tabelle 2). Dies bestätigt auch das Vorhandensein von mehr Kanälen in der Membran und damit die erfolgreiche Expression. Das Ruhemembranpotential lag bei allen gemessenen Neuronen im vergleichbaren Bereich. Neurone mit einem

Ruhemembranpotential > -50 mV wurden von den Messungen und für die Analyse ausgeschlossen.

Im zweiten Protokoll wurde ebenfalls ausgehend vom Haltepotential von -80 mV ein 200 ms langer Strompuls gegeben und die Pulsstärke so angepasst, dass genau 8 Aktionspotentiale im Intervall entstehen. Die benötigte Stromstärke wurde dann für Kontrolle, WT und R207Q-Mutation gemittelt und miteinander verglichen (Abb.32).

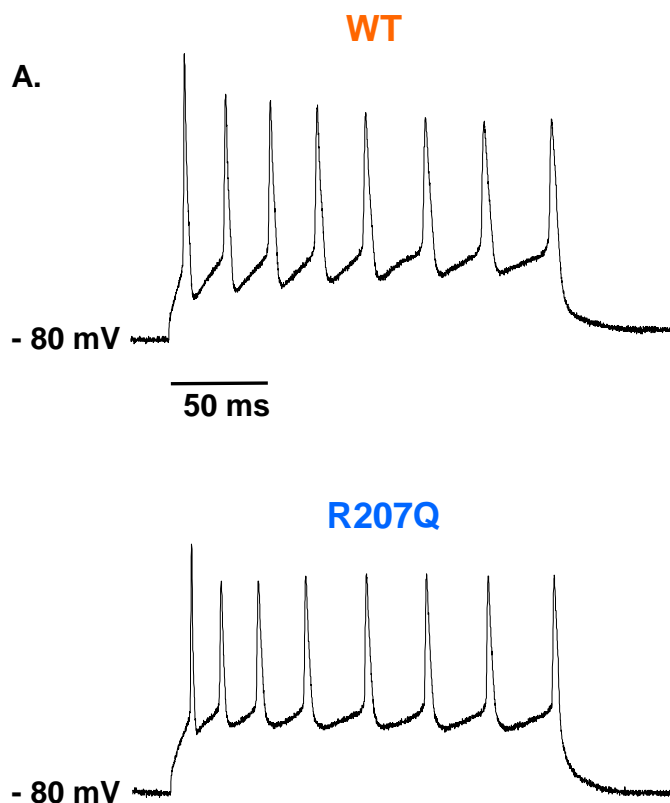
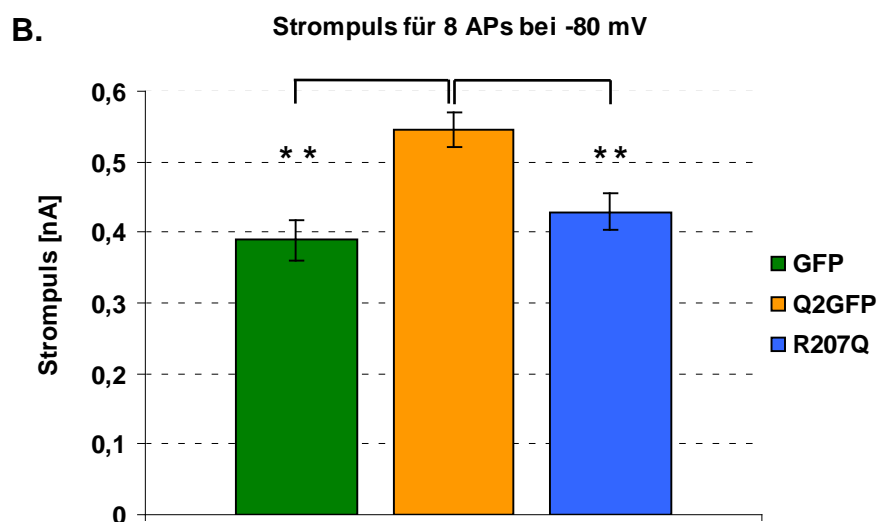


Abb. 32:

A. Repräsentative Aufnahmen des Feuerungsverhaltens in infizierten Neuronen; WT und Mutation R207Q, Auslösen von 8 APs in einem 200 ms – langen Puls mit variabler Stromstärke

B. Benötigte Stromstärke für das Auslösen von 8 Aktionspotentialen in einem 200ms langen Puls. Bei der Mutation und GFP-Kontrolle reicht eine geringere Stromstärke aus um die 8 APs auszulösen im Vergleich zum WT (n = 8-11)



Im Vergleich zur GFP-Kontrolle, die bzgl. der Expression von $K_V7.2$ –Kanälen heterozygoten *KCNQ2* +/- Neuronen entsprechen sollte, benötigt man bei Zellen, die zusätzlich WT-Kanäle exprimieren, einen stärkeren Strompuls um 8 Aktionspotentiale auszulösen. Werden jedoch zusätzlich nur Kanäle mit R207Q-Mutation exprimiert, werden die 8 APs wieder bei geringerer Stromstärke erreicht (Abb.32 B). Die Kanäle regulieren APs, indem sie nach langsamer Aktivierung die Zelle hyperpolarisieren und die Feuerungsrate so reduzieren. Da die R207Q-Mutation Effekte im Subschwellenbereich von APs aufweist, kann die Anzahl funktionsfähiger Kanäle in der Membran Auswirkungen auf die Erregbarkeit der Zellen haben. Die Stromstärke, die benötigt wird, um nur ein einzelnes Aktionspotential auszulösen, ist aber bei allen Varianten gleich (Daten nicht gezeigt). Da die Effekte erst bei einer höheren Anzahl von APs erkennbar sind und höhere Stromstärken zum Auslösen längerer AP-Folgen benötigt werden, wurde das Standardprotokoll zur Analyse des Feuerungsverhaltens erweitert und Strom bis zu einer Stärke von +0.45 nA injiziert.

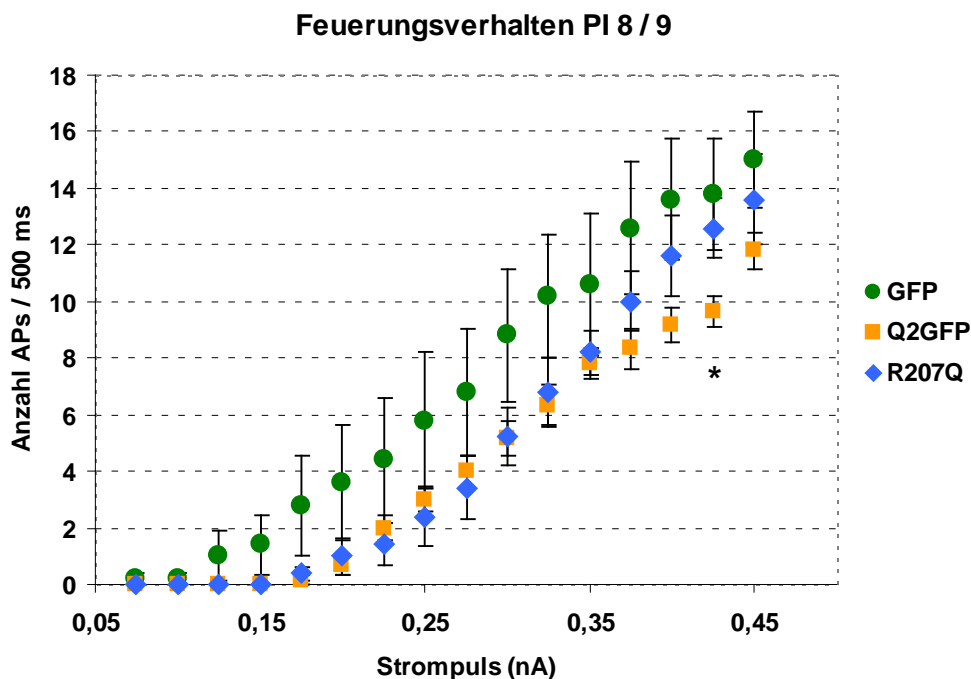


Abb.33:

Anzahl ausgelöster APs in injizierten Neuronen von +0.075 nA bis +0.45 nA Strompuls. Die Anzahl der APs zeigt eine tendenziell erhöhte Feuerungsrate für die Kontrolle ohne zusätzlich exprimierte Kanäle (GFP), die Mutation (R207Q) scheint ab einer Stromstärke von > +0.35nA auch eine höhere Feuerungsrate im Vgl. zum WT (Q2GFP) zu entwickeln (n = 5 - 6).

Die Analyse des Feuerungsverhaltens mit größeren Stromstärken, was zur Auslösung längerer AP-Folgen führt, deutet an, dass die R207Q-Mutation Effekte erst bei längeren AP-Folgen und stärkeren Reizen zeigt. Denn die Feuerungsrate differenziert sich vom WT erst ab einer injizierten Stromstärke von $> +0.35\text{nA}$ und ist etwas erhöht (Abb. 33), was durch eine Übererregbarkeit der Zellen ausgelöst werden kann.

Um die Auswirkung auf AP-Folgen genauer zu untersuchen, wurde von den 8 ausgelösten APs das Schwellenpotential bestimmt. Das ist das Potential, bei welchem das jeweilige AP ausgelöst wird. Dafür wurde die erste Ableitung der AP-Messung in Clampfit generiert und das Potential abgelesen, das bei einer Steigung von 10 mV/ms vor jedem der 8 APs aufgezeichnet wurde (Beschreibung siehe 2.7; nach Wimmer et al. 2010).

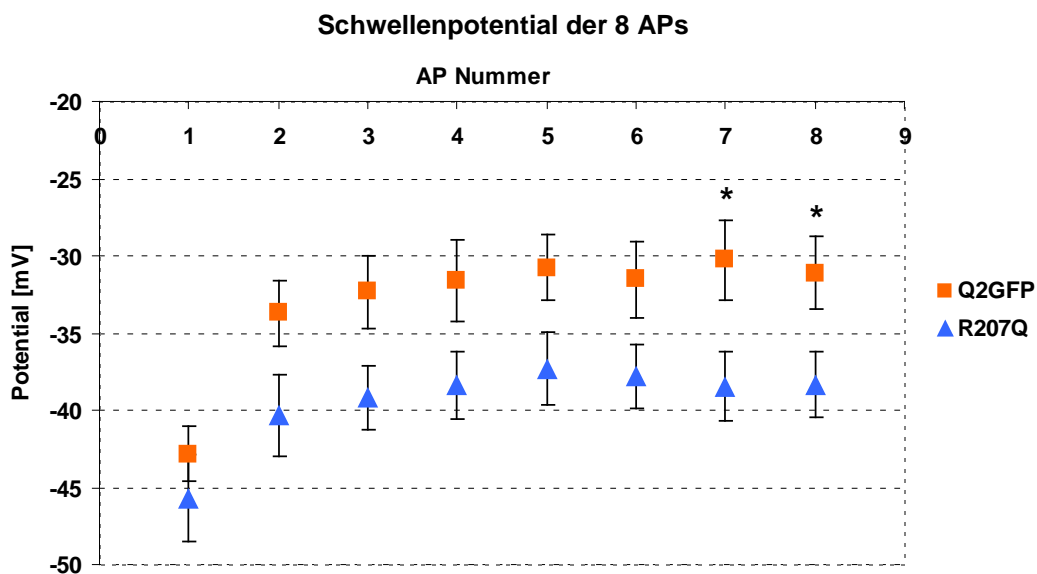


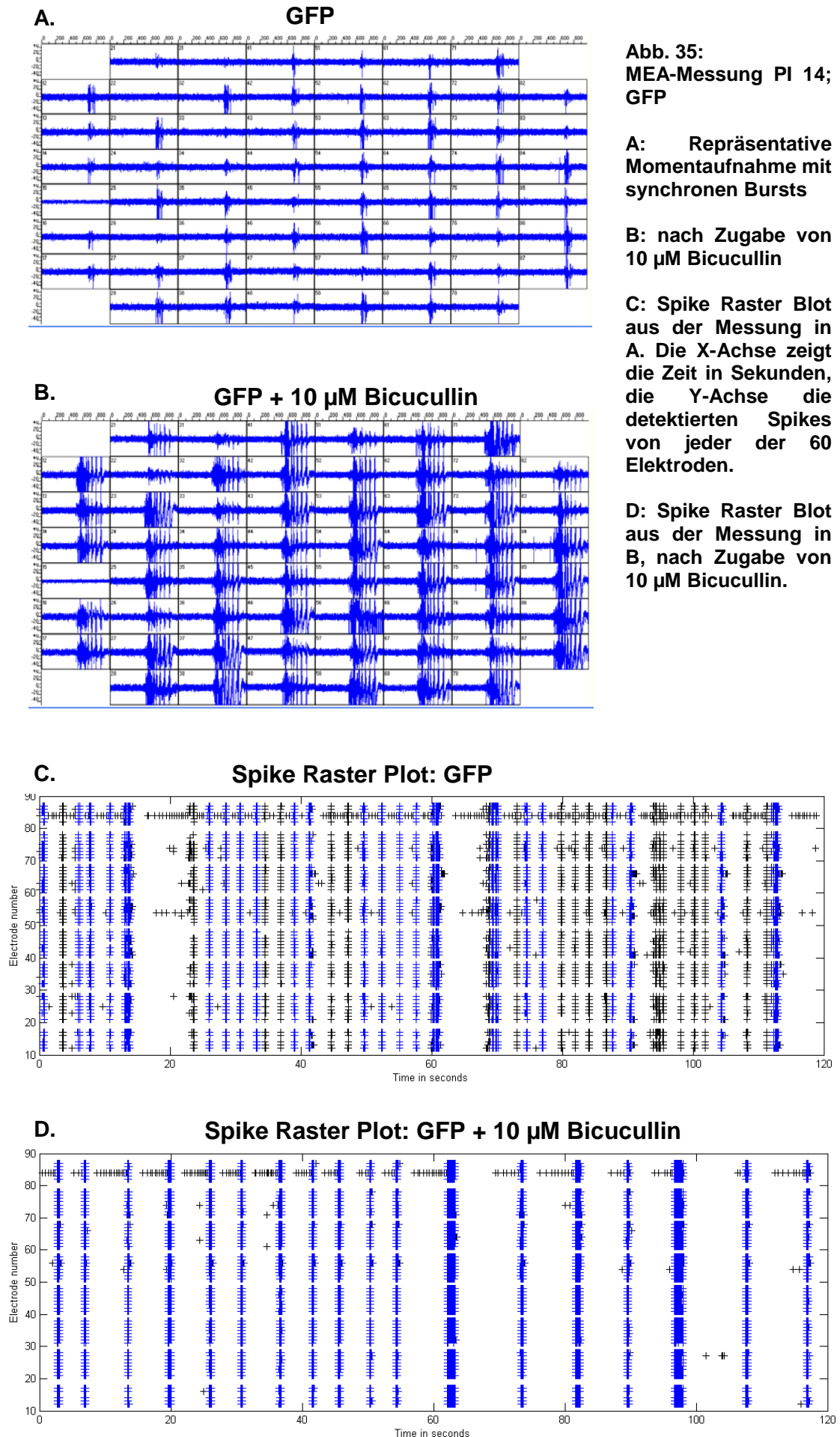
Abb.34: Schwellenpotential der 8 APs in infizierten Neuronen. Bei Neuronen mit mutierten $K_v7.2$ -UE (R207Q) liegt die Schwelle ab dem 2. AP niedriger als bei solchen mit zusätzlichen WT-UE (Q2GFP) signifikanten Unterschieden beim 7. und 8. AP (Mittelwerte \pm S.E.M; $n = 6$).

Das Schwellenpotential ist beim 1. AP noch vergleichbar. Danach zeigt sich für die Mutation eine niedrigere Schwelle im Vergleich zum WT, mit signifikanten Unterschieden beim 7. und 8. AP (Abb. 34). Die Effekte sind also ausgeprägter mit steigender AP-Zahl. Da die Aktionspotentiale schon bei einem niedrigeren Potential ausgelöst werden, spricht es für eine höhere Erregbarkeit der Zelle.

3.2.5.3 Netzwerk-Feuerungsverhalten auf Multielektroden-Arrays (MEAs)

Das Netzwerk-Feuerungsverhalten infizierter neuronaler Kulturen wurde mittels Multielektroden-Arrays mit 60 Elektroden untersucht. Das Feuerungsverhalten wurde zu den Zeitpunkten PI 7, 10 und 14 mit und ohne Zugabe von Bicucullin für jeweils 2 min aufgenommen. Spike Raster Plots zeigen die detektierten Spikes feuernder Neurone von jeder Elektrode im gemessenen Zeitfenster. Liegen die Spikes auf einer vertikalen Linie mehrerer Elektroden, werden sie als synchrone *Population Bursts* (PB) gewertet, sofern die Anzahl der Spikes in einem PB über 20 % des maximalen Werts der Spike-Anzahl in einem PB aus der jeweiligen 2-min Messung entsprechen. Die als PB gewertete Spikes sind im Spike Raster Plot blau gekennzeichnet, nicht gewertete, also solche mit einer Spike-Anzahl <20% des Maximums, sind schwarz (Abb.35-38 C, D). Momentaufnahmen aus den Messungen zeigen Spikes und Bursts aus dem neuronalen Netzwerk auf allen Elektroden, visualisiert mit dem Programm „MC_Rack“. Ein Kästchen entspricht dabei den Signalen von einer Elektrode (Abb. 35-38 A, B).

Durch die Zugabe von Bicucullin werden die inhibitorischen GABA-Antworten im neuronalen Netzwerk blockiert. Dadurch kommt es zu längeren Bursts mit mehr Spikes, die auch synchroner und in größeren Abständen auftreten (Abb. 35-38 B). In Tiermodellen kann Bicucullin epileptische Anfälle auslösen (Meldrum und Nilsson, 1976; Calderini et al. 1978).



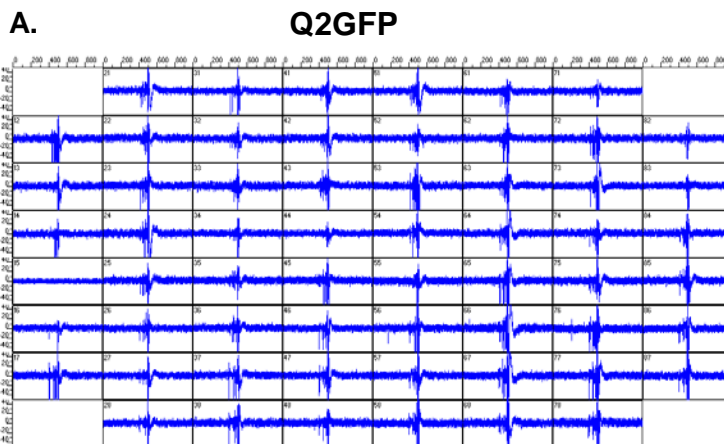


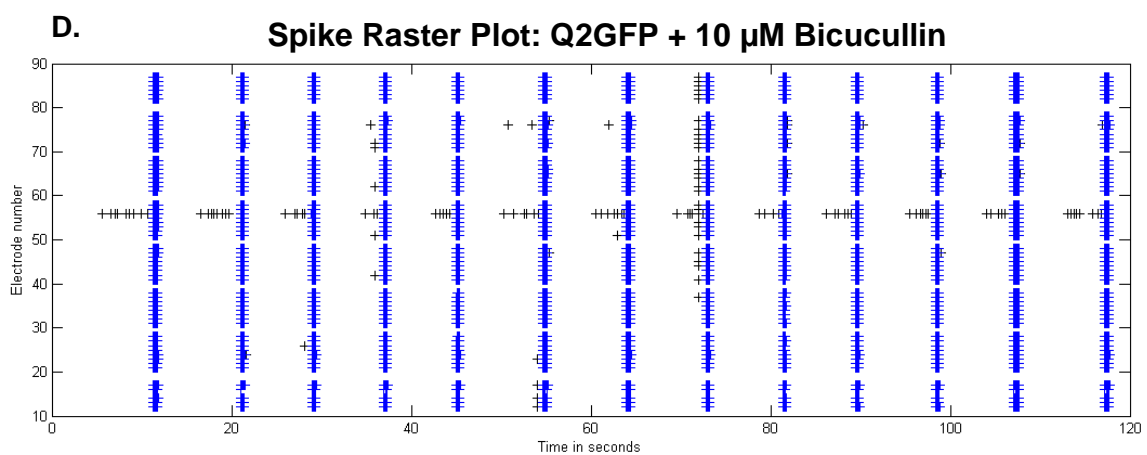
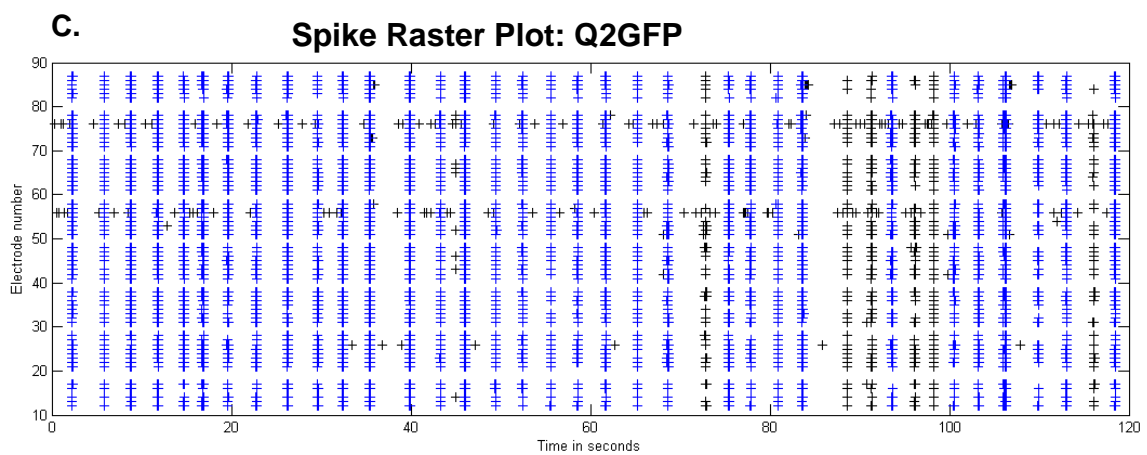
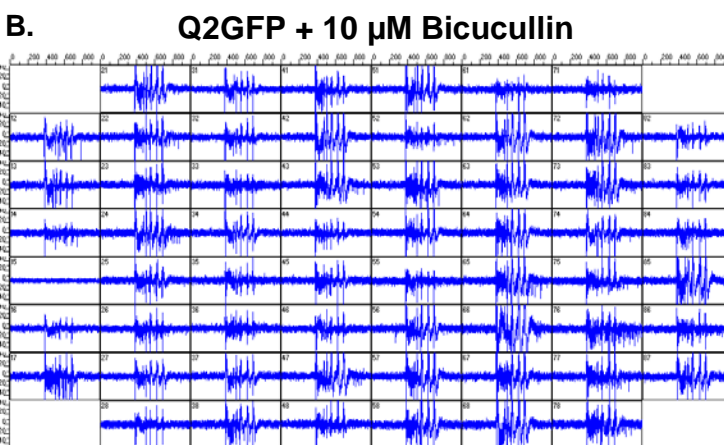
Abb. 36:
MEA-Messung PI 14;
Q2GFP

A: Repräsentative Momentaufnahme mit synchronen Bursts

B: nach Zugabe von 10 μM Bicucullin

C: Spike Raster Blot aus der Messung in A.

D: Spike Raster Plot aus der Messung in B, nach Zugabe von 10 μM Bicucullin.



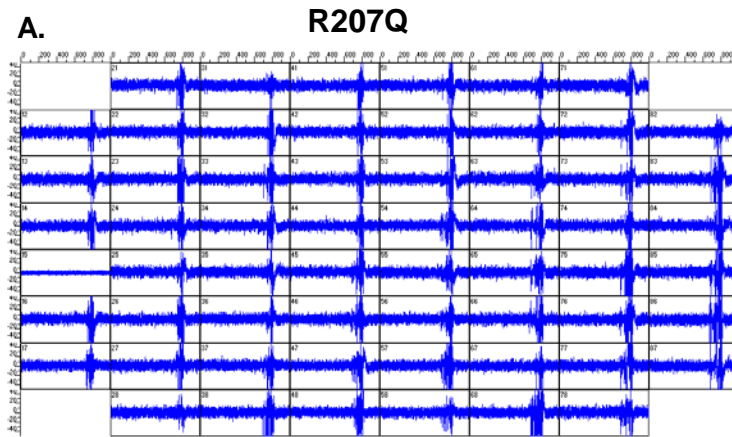
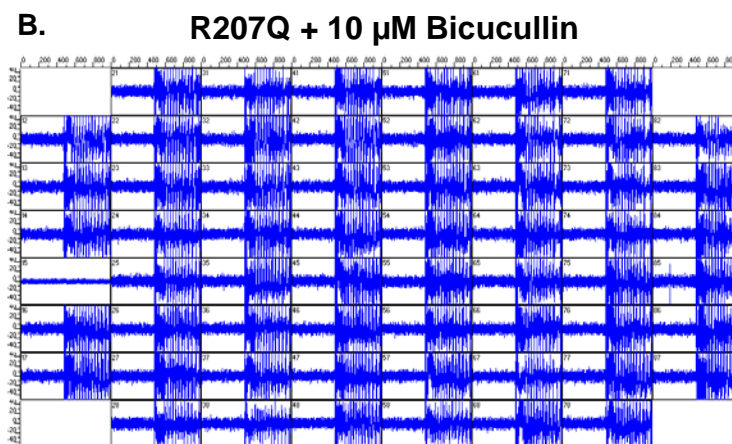


Abb. 37:
MEA-Messung PI
14; R207Q

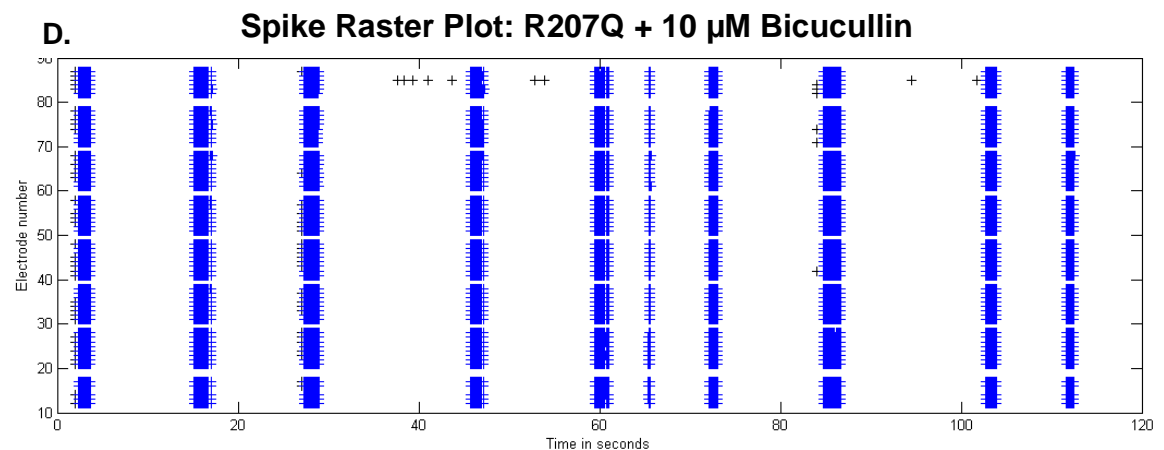
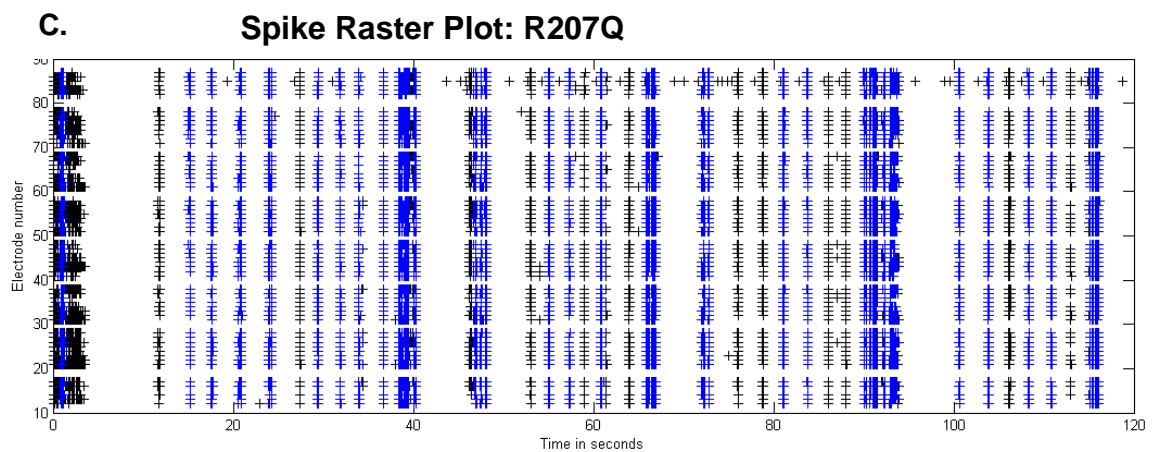
A: Repräsentative
Momentaufnahme
mit synchronen
Bursts

B: nach Zugabe von
10 μM Bicucullin

C: Spike Raster Plot
aus der Messung in
A.



D: Spike Raster Plot
aus der Messung in
B, nach Zugabe von
10 μM Bicucullin.



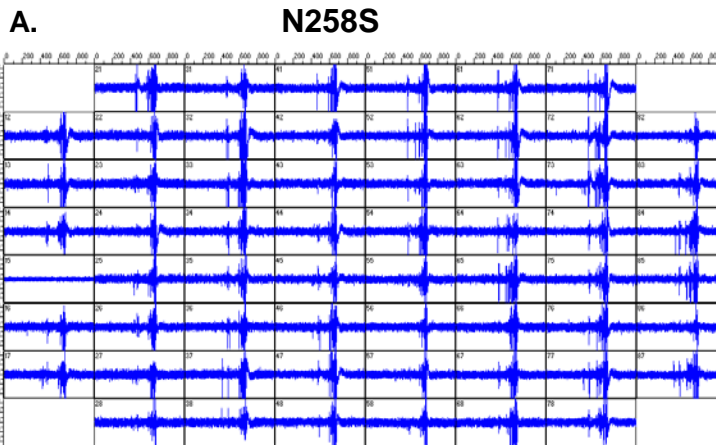
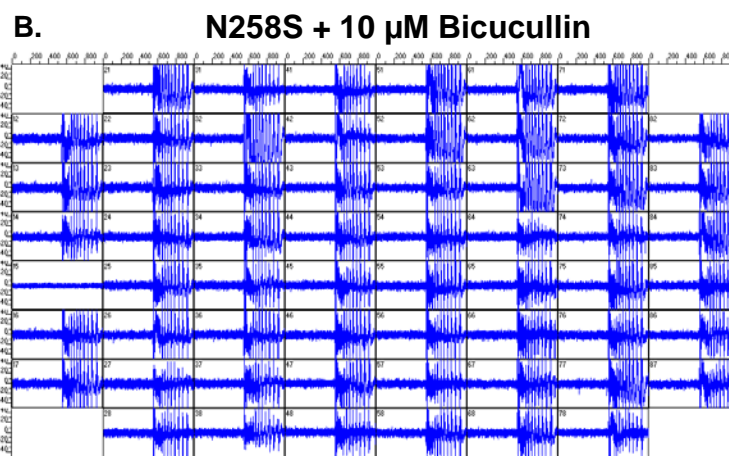


Abb. 38:
MEA-Messung PI 14;
N258S

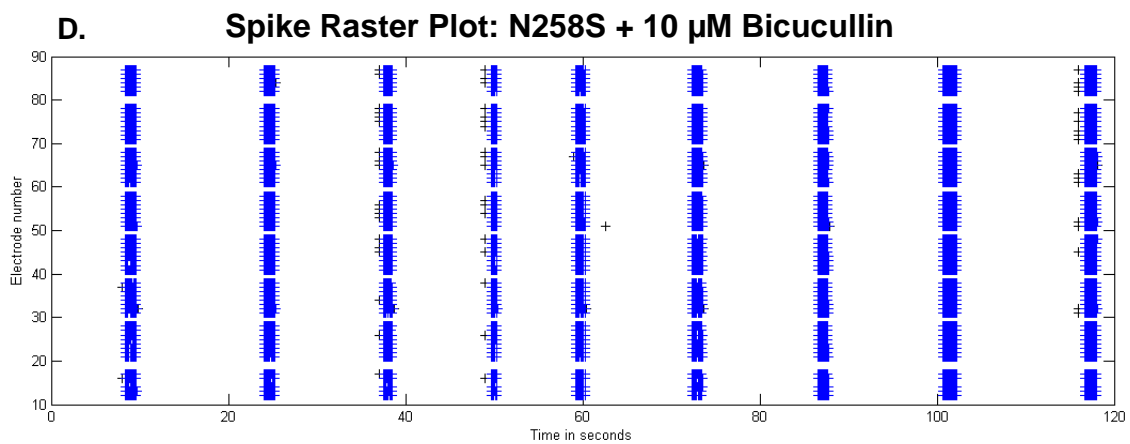
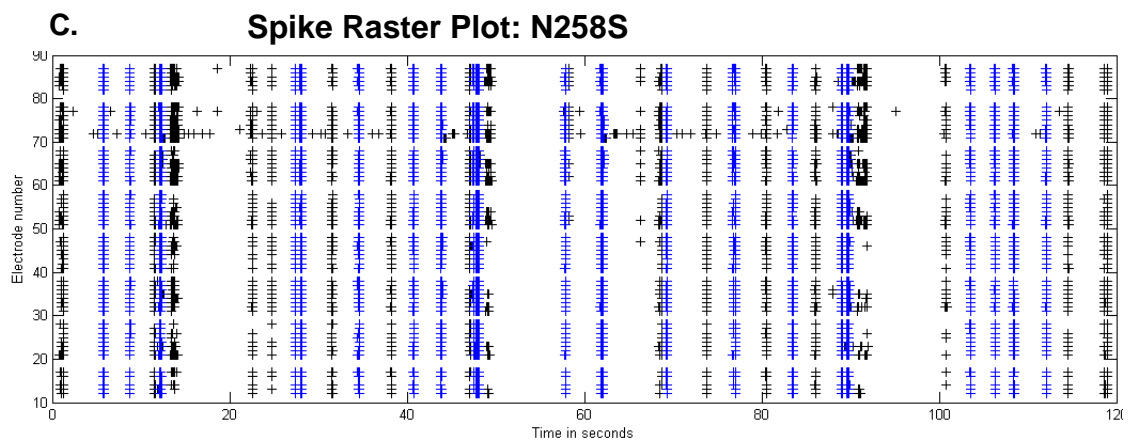
A: Repräsentative
Momentaufnahme
mit synchronen
Bursts

B: nach Zugabe von
10 μM Bicucullin

C: Spike Raster Blot
aus der Messung in
A.



D: Spike Raster Plot
aus der Messung in
B, nach Zugabe von
10 μM Bicucullin.



Die repräsentativen Momentaufnahmen aus den MEA-Messungen zeigen die synchrone Netzwerkaktivität der neuronalen Kulturen, was für die gesamte 2-min Messung im Spike Raster Plot ausgewertet wird. Man erkennt deutlich die Auswirkung von Bicucullin auf das Feuerungsverhalten, da die Bursts größer werden, also mehr Spikes enthalten und länger andauern. Im Spike Raster Plot sieht man, dass die Anzahl der Bursts geringer wird und somit die Inter-Burst-Intervalle (IBI) entsprechend größer werden. Vergleicht man die Netzwerkaktivität neuronaler Kulturen, die zusätzlich WT $K_v7.2$ -Kanäle exprimieren (Q2GFP), mit solchen die keine zusätzlichen (GFP) oder mutierte Kanäle exprimieren (R207Q / N258S), fällt das schwächer ausgeprägte Feuerungsverhalten des WT auf, was besonders nach Zugabe von Bicucullin auffällt. Die Burst-Amplitude und besonders die Spike Anzahl scheinen geringer zu sein. Diese und weitere Parameter wurden analysiert und verglichen.

Tabelle 3 zeigt die analysierten Parameter der Population Bursts, gemittelt aus verschiedenen MEA-Messungen der einzelnen Varianten. Mit zunehmendem Alter und Ausbildung des neuronalen Netzwerkes erhöht sich lediglich etwas die Anzahl (%) an Spikes in Bursts, da die Zellen dann besser untereinander verbunden sind. Die Anzahl und Breite der Bursts sowie Inter-Burst-Intervalle ändert sich jedoch nicht wesentlich. Hier lassen sich auch keine erheblichen Unterschiede zwischen WT, Kontrolle und den Mutationen ausmachen. Die Zugabe von Bicucullin erniedrigt die Burst Anzahl und erhöht die Burst Breite und Inter-Burst-Intervalle, was auch schon in den Spike Raster Plots zu erkennen war. Auch die Anzahl an Spikes in den Bursts wird durch die Zugabe von Bicucullin erhöht, sodass fast 100% der Spikes in den Bursts vorkommen.

Tabelle 3:
Parameter des Netzwerk-Feuerungsverhaltens infizierter Neurone auf MEAs:
Burst Anzahl, Breite und IBIs sowie Anzahl der Spikes im Burst 7, 10 und 14 Tage PI.

| <u>PI 7</u> | GFP | Q2GFP | R207Q | N258S | GFP | Q2GFP | R207Q | N258S |
|----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | - | - | - | - | 10 μ M Bicucullin | 10 μ M Bicucullin | 10 μ M Bicucullin | 10 μ M Bicucullin |
| Burst Anzahl | 24.25 +/- 3.4 | 20.8 +/- 4.6 | 20.8 +/- 1.9 | 24 +/- 3.2 | 16.75 +/- 2.75 | 14.6 +/- 1.8 | 13.5 +/- 1.75 | 14.2 +/- 1.8 |
| Burst Breite | 0.31 +/- 0.06 | 0.26 +/- 0.01 | 0.34 +/- 0.03 | 0.34 +/- 0.06 | 0.55 +/- 0.04 | 0.65 +/- 0.9 | 0.84 +/- 0.06 | 0.74 +/- 0.17 |
| Inter-Burst- Intervalle | 5.1 +/- 0.8 | 4.5 +/- 0.7 | 5.7 +/- 0.5 | 5.2 +/- 0.9 | 7.4 +/- 1.1 | 8.4 +/- 1.3 | 9.1 +/- 0.9 | 9 +/- 1.1 |
| % Spikes in Bursts | 81.8 +/- 3.7 | 68 +/- 13.3 | 76.4 +/- 5.5 | 87.3 +/- 1.7 | 95.4 +/- 1.4 | 96.1 +/- 0.9 | 95.4 +/- 1.9 | 98.4 +/- 0.6 |

| <u>PI 10</u> | GFP | Q2GFP | R207Q | N258S | GFP | Q2GFP | R207Q | N258S |
|----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | - | - | - | - | 10 μ M Bicucullin | 10 μ M Bicucullin | 10 μ M Bicucullin | 10 μ M Bicucullin |
| Burst Anzahl | 34.25 +/- 4.2 | 23.8 +/- 4.9 | 41.5 +/- 8.3 | 24.4 +/- 2.5 | 19.5 +/- 2.5 | 14.8 +/- 1.8 | 17.8 +/- 2.5 | 15 +/- 1.1 |
| Burst Breite | 0.28 +/- 0.05 | 0.32 +/- 0.04 | 0.28 +/- 0.03 | 0.33 +/- 0.04 | 0.53 +/- 0.08 | 0.66 +/- 0.1 | 0.71 +/- 0.12 | 0.6 +/- 0.06 |
| Inter-Burst- Intervalle | 3.6 +/- 0.5 | 7 +/- 2.8 | 3.4 +/- 0.6 | 4.9 +/- 0.4 | 6.4 +/- 0.8 | 8.3 +/- 0.7 | 7.7 +/- 1.5 | 7.8 +/- 0.7 |
| % Spikes in Bursts | 89.6 +/- 4.9 | 80.6 +/- 9 | 86.1 +/- 3.8 | 86.6 +/- 5.6 | 97.9 +/- 0.7 | 97.9 +/- 0.8 | 98 +/- 1 | 96.4 +/- 1 |

| <u>PI 14</u> | GFP | Q2GFP | R207Q | N258S | GFP | Q2GFP | R207Q | N258S |
|----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | - | - | - | - | 10 μ M Bicucullin | 10 μ M Bicucullin | 10 μ M Bicucullin | 10 μ M Bicucullin |
| Burst Anzahl | 25 +/- 7.6 | 31.6 +/- 4.1 | 25.5 +/- 3.3 | 20 +/- 4 | 19 +/- 2.4 | 19.2 +/- 3.2 | 12.2 +/- 1.8 | 12.2 +/- 1.85 |
| Burst Breite | 0.26 +/- 0.06 | 0.21 +/- 0.02 | 0.38 +/- 0.08 | 0.24 +/- 0.06 | 0.45 +/- 0.06 | 0.4 +/- 0.04 | 0.79 +/- 0.16 | 0.75 +/- 0.14 |
| Inter-Burst- Intervalle | 5.97 +/- 1.38 | 3.96 +/- 0.51 | 5.18 +/- 0.9 | 7.04 +/- 1.74 | 6.65 +/- 0.71 | 6.8 +/- 0.96 | 10.46 +/- 1.05 | 10.92 +/- 1.87 |
| % Spikes in Bursts | 79.6 +/- 11.3 | 87.1 +/- 2.9 | 83.8 +/- 0.8 | 93 +/- 4 | 98 +/- 0.95 | 98.6 +/- 0.49 | 99.1 +/- 0.4 | 99.1 +/- 0.4 |

Desweiteren wurde die Peak Firing Rate (PFR) betrachtet, die die maximale Feuerungsrate in einem Burst wiedergibt (Beschreibung siehe 2.7). Die PFR steigt mit zunehmendem Alter des neuronalen Netzwerks, und wird deutlich höher nach der Zugabe von Bicucullin. Vergleicht man wieder Kulturen mit zusätzlich exprimierten WT-Kanälen (Q2GFP) mit den anderen Varianten, weisen diese jedes Mal eine niedrigere PFR auf, unabhängig vom Alter und Bicucullinzusatz. D.h. Kulturen mit weniger Kanälen (GFP = heterozygote

Bedingung) oder zusätzlich exprimierten mutierten Kanälen (R207Q / N258S) zeigen tendenziell eine erhöhte Feuerungsrate (Abb.39).

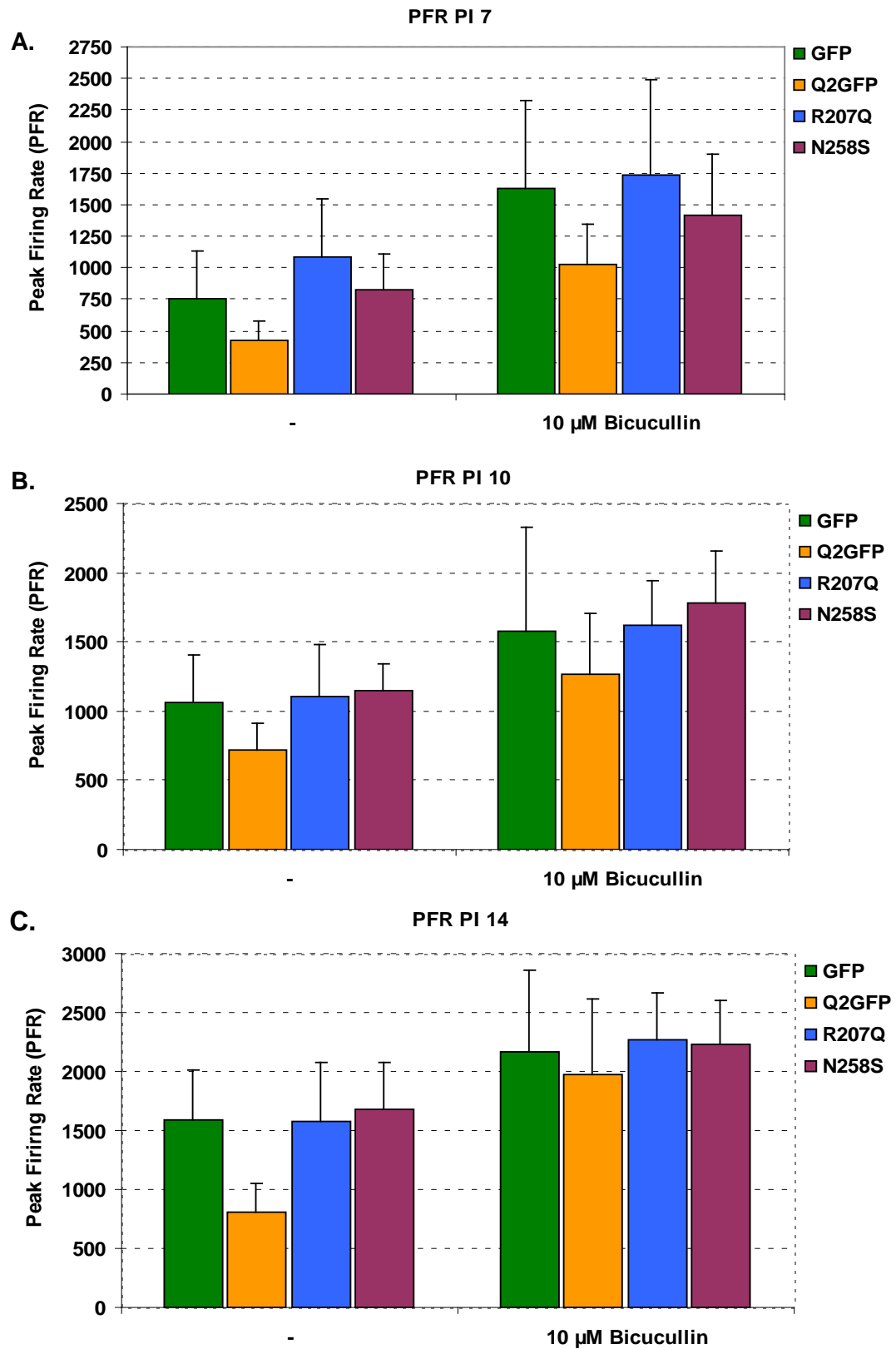


Abb. 39: PFR aller Varianten, ohne Zusatz und nach Zugabe von 10 μ M Bicucullin PI 7 (A), PI 10 (B) und PI 14 (C). Für Neurone, die zusätzlich WT-UE exprimieren (Q2GFP), ist die PFR jedesmal am niedrigsten.

Dies spiegelt sich auch in der Analyse der Gesamtzahl der Spikes wieder. Diese erhöht sich ebenfalls mit zunehmendem Alter der Kultur und nach Zugabe von Bicucullin, ist aber auch für den WT immer geringer im Vergleich zu Kontrolle oder Mutationen (Abb.40).

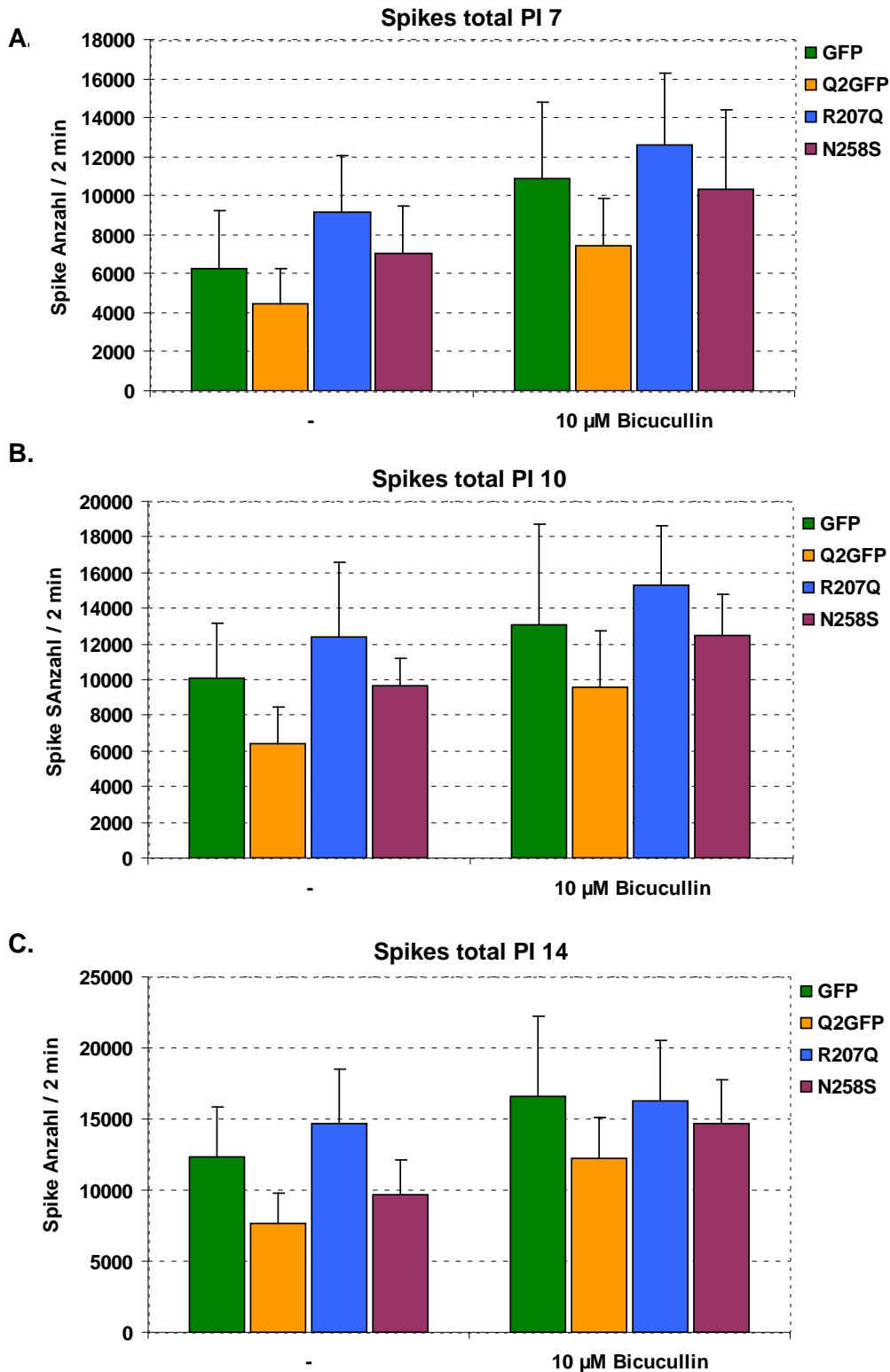


Abb. 40: Gesamtanzahl der Spikes aller Varianten, ohne Zusatz und nach Zugabe von 10 µM Bicucullin; PI 7 (A), PI 10 (B) und PI 14 (C). Für Neurone, die zusätzlich WT-UE exprimieren (Q2GFP), ist die Gesamtanzahl an Spikes jedesmal am niedrigsten.

Dieses Ergebnis zeigt auch eine erhöhte Netzwerkaktivität für neuronale *KCNQ2* +/- Kulturen ohne zusätzlich exprimierte WT-Kanäle (GFP-Kontrolle) oder mit zusätzlichen $K_V7.2$ -Kanälen mit Mutation.

Die Synchronizität des neuronalen Netzwerks wird durch den Wert κ beschrieben. Mit steigender Synchronizität nähert sich der Wert an 1 (= maximale Synchronizität).

Mit erhöhter Zugabe von Bicucullin konnte für WT und Mutationen eine Erhöhung der Synchronizität des Netzwerkes beobachtet werden. Auch mit zunehmendem Alter und damit einhergehenden Ausbildung des neuronalen Netzwerkes nimmt die Synchronizität zu, was sich durch höhere κ -Werte zeigt (Tab.4).

Im Vergleich zu den neuronalen Kulturen infiziert mit WT-Kanälen zeigen sich für solche mit *KCNQ2*-Mutation tendenziell erhöhte κ -Werte, also eine erhöhte Synchronizität des Netzwerkes (Tab.4). Auch für Kulturen ohne zusätzlich exprimierte Kanäle (GFP) ist der Wert erhöht im Vergleich zu solchen mit zusätzlichen WT-Kanälen.

Tabelle 4: κ -Werte aus dem Netzwerk-Feuerungsverhalten infizierter Neuronenkulturen auf MEAs, 7, 10 und 14 Tage PI, ohne Zusatz und nach Zugabe von 10 μ M Bicucullin.

| κ | GFP | Q2GFP | R207Q | N258S | GFP | Q2GFP | R207Q | N258S |
|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | - | - | - | - | 10 μ M Bicucullin | 10 μ M Bicucullin | 10 μ M Bicucullin | 10 μ M Bicucullin |
| PI 7 | 0.28 +/- 0.06 | 0.21 +/- 0.06 | 0.32 +/- 0.06 | 0.32 +/- 0.09 | 0.41 +/- 0.08 | 0.37 +/- 0.1 | 0.4 +/- 0.08 | 0.4 +/- 0.08 |
| PI 10 | 0.41 +/- 0.06 | 0.34 +/- 0.04 | 0.36 +/- 0.09 | 0.4 +/- 0.05 | 0.45 +/- 0.07 | 0.43 +/- 0.06 | 0.47 +/- 0.06 | 0.47 +/- 0.06 |
| PI 14 | 0.52 +/- 0.03 | 0.41 +/- 0.05 | 0.44 +/- 0.05 | 0.51 +/- 0.03 | 0.53 +/- 0.05 | 0.49 +/- 0.08 | 0.54 +/- 0.04 | 0.55 +/- 0.04 |

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung eines hoch konservierten Threonin-Restes im S1-S2-Loop von $K_V7.2$ und $K_V7.3$

Die Ergebnisse zeigen, dass der hochkonservierte Threoninrest im S1-S2-Loop eine wichtige Rolle für die Funktion von $K_V7.2$ und $K_V7.3$ spielt. Der Austausch des Threonins führt zu verringerten Kaliumströmen, einer Verschiebung der Aktivierungskurve sowie verlangsamten Aktivierungs- und beschleunigten Deaktivierungskinetik. Dies impliziert eine erhöhte Präferenz des Kanals für den geschlossenen Konformations-Zustand. Die Wichtigkeit des S1-S2-Loops und dessen Interaktion mit der Porenschleife wurde für andere Kaliumkanäle bereits gezeigt (Lee et al. 2009) sowie die entscheidende Rolle des konservierten Threoninrestes für die Oberflächenexpression von Kaliumkanälen (McKeown et al. 2008).

Für $K_V7.2$ und $K_V7.3$ konnte gezeigt werden, dass der Austausch des Threoninrestes die K^+ -Ströme zwar reduziert und deren Kinetik verändert, sie aber noch vorhanden und messbar sind. Dies lässt vermuten, dass im Vergleich zu anderen Kaliumkanälen der Threoninrest hier keine essentielle Rolle für die Oberflächenexpression darstellt. Auch die Immunfärbung transfizierter CHO-Zellen und der Biotinylierungs-Assay zur Kontrolle der Oberflächenexpression der Kanäle zeigen keinen Unterschied zwischen WT-Kanälen und solchen mit mutiertem Thr, was darauf schließen lässt, dass die Mutation keine großen Auswirkungen auf das *Trafficking* des Kanals hat.

In $K_V7.2$ und $K_V7.3$ scheint der Thr-Rest eher eine bedeutende Rolle für das *Gating* des Kanals zu spielen. In homo- oder heterotetrameren Kanälen mit komplett mutierten UE sind schwerwiegende Effekte auf Aktivierung und Deaktivierung der Kanäle nachzuweisen. Werden WT und mutierte UE gemeinsam exprimiert, sind die Effekte weniger ausgeprägt, was darauf hindeutet, dass sich die Stabilisation des gesamten Kanals durch die Anzahl mutierter UE beeinflussen lässt.

Um einen ersten Eindruck zu bekommen, welche Interaktionen an der Stabilisation des Kanals während des *Gatings* beteiligt sein könnten, wurde mit Hilfe unseres Kollaborationspartners G. Seebohm von der Universität Münster

ein 3D-Homologiemodell von $K_v7.2$ erstellt (Beschreibung siehe Füll et al. 2012). In diesem Modell ist der Thr-Rest beteiligt an der Bildung einer stabilen Verbindung mit der S5-Porenregion (Abb.41).

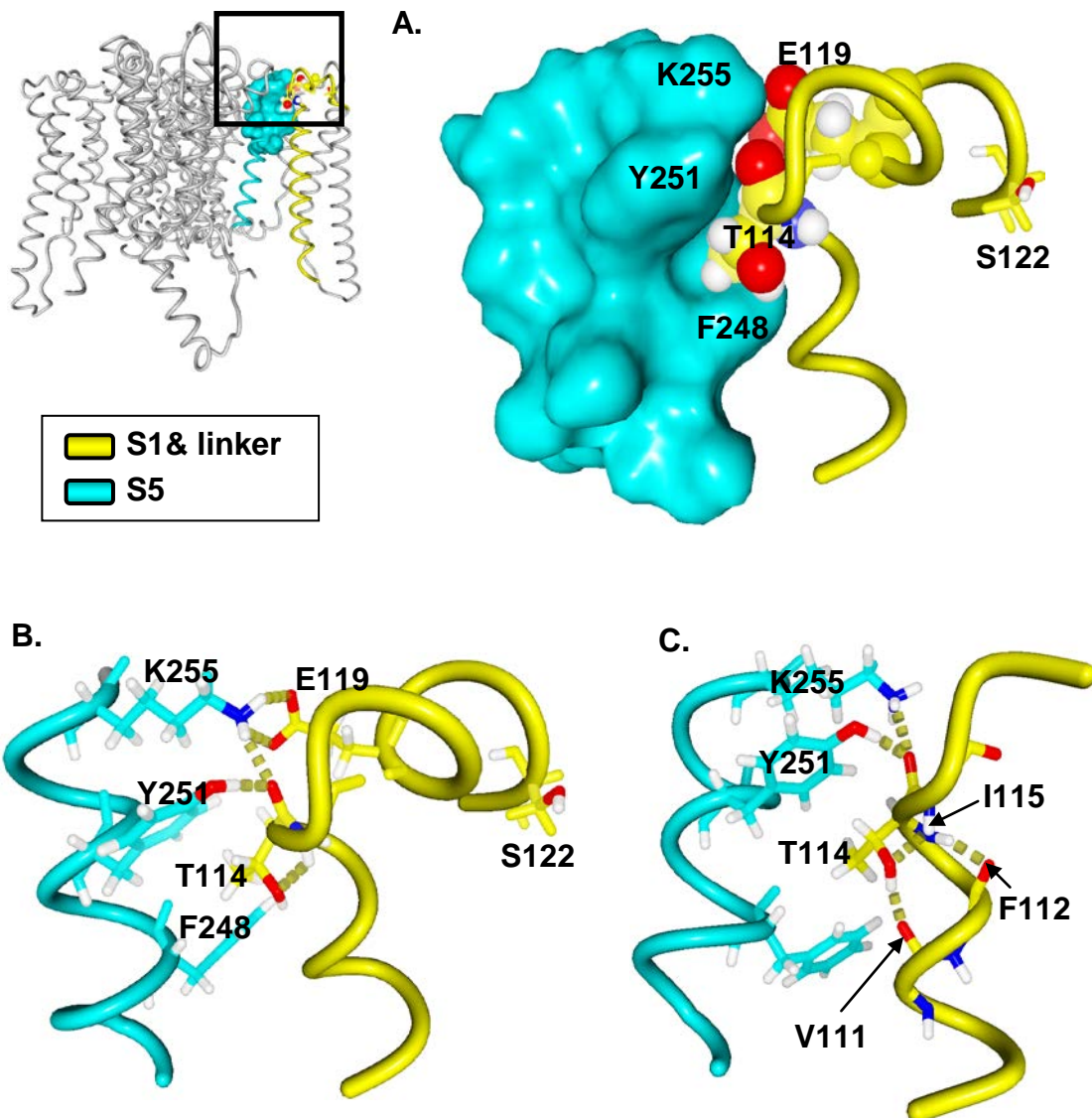


Abb. 41:
 Homologiemodell von $K_v7.2$ im geöffneten Konformationszustand
 A. Übersicht des Modells in Bänder-Präsentation mit vergrößerter Anzeige der Verbindung zwischen S1 mit Schleife (gelb) und S5-Porenregion (blau).
 B. + C. Bändermodell der oberen S5-Region in Wechselwirkung mit S1 und Schleife. Der Thr-Rest bildet Verbindungen zu nahe liegenden Aminosäureresten und stabilisiert so möglicherweise die Struktur des Proteins (E119 und Thr114 im CPK-Modell mit entspr. Farbcode; O = rot, H = weiß, N = blau).

Tyr251 (Y) und Phe248 (F) bilden eine Spalte, in die sich Thr114 legt und die Verbindung der Segmente so stabilisiert. Des Weiteren tragen H-Brücken zur Stabilisierung dieser Konformation bei, an denen auch der mit Epilepsie assoziierte Rest Glu119 beteiligt ist.

Dieses Modell unterstützt die Hypothese einer essentiellen Beteiligung von Thr114 an der Stabilisierung der geöffneten Konformation des Kanals. Im Falle einer Mutation dieses Restes wird damit der geöffnete Zustand instabil und der geschlossene Kanalzustand energetisch bevorzugt, was die verlangsamte und verschobene Aktivierung und beschleunigte Deaktivierung erklären könnte.

McKeown *et al.* (2008) konnten für $K_V1.4$ zeigen, dass der Austausch von Threonin zu Serin nur geringfügige Auswirkung auf Oberflächenexpression und Kaliumstrom hat im Vergleich zum Austausch gegen andere Aminosäuren. Dies unterstreicht die wichtige Rolle der OH-Gruppe, die an der Ausbildung stabiler Wasserstoffbrücken beteiligt zu sein scheint. Die Vermutung, dass dieser Rest womöglich eine regulatorische Funktion durch Phosphorylierung über Serin/Threonin-Kinasen darstellt, ist aber eher unwahrscheinlich. Extrazelluläre Reste werden nur selten von den regulatorischen Enzymen erreicht, Ser/Thr-Kinasen kommen auch nicht im ER Lumen vor (Goder *et al.* 2000). In einer massenspektrometrischen Analyse wurden für $K_V7.2$ und $K_V7.3$ außerdem nur 2 Phosphorylierungsstellen identifiziert, die sich auf der cytosolischen Seite des Kanals befinden (Surti *et al.* 2005).

Die meisten krankheitsverursachenden Mutationen in $K_V7.2$ und $K_V7.3$ liegen in der Porenregion und im C-Terminalen Bereich des Kanals. Die Entdeckung von 2 Epilepsie-assoziierten Mutationen im S1-S2-Bereich (E119G und S122L) ließ jedoch vermuten, dass auch diese Region eine wichtige Rolle für die Kanalfunktion spielt, da für diese Mutationen eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurve zu mehr depolarisierten Potentialen nachgewiesen wurde (Hunter *et al.* 2006; Wuttke *et al.* 2008). Bisher wurde eine Interaktion dieser Aminosäuren mit dem Spannungssensor S4 vermutet, was die Effekte erklären könnte. Das neue Modell legt nahe, dass E119 direkt an der Stabilisation des Kanals über die Interaktion von S1/S2 mit S5 beteiligt ist. Die veränderte Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik von E119G kann auch auf die Destabilisierung des geöffneten Konformationszustandes des Kanals und die damit einhergehende Präferenz für den geschlossenen Zustand zurückgeführt werden. S122 scheint außerhalb des S1/S5 Interaktionsbereichs zu liegen. Diese Mutation hat aber auch keine Auswirkungen auf die Deaktivierungskinetik von $K_V7.2$, und die funktionellen Auswirkungen könnten auf anderen molekularen Mechanismen basieren.

Zusammengefasst bekräftigen die Ergebnisse eine wichtige Rolle des hochkonservierten Thr-Restes für das spannungsabhängige Schaltverhalten (*Gating*) von Kaliumkanälen und unterstreichen die Wichtigkeit der S1-S2-Region auch in neuronalen K_v7 Kanälen für diese Prozesse.

4.2 Untersuchung verschiedener Epilepsie-assoziiierter *KCNQ2*-Mutationen in neuronalen *KCNQ2* +/- Kulturen mittels lentiviraler Expression

Die Expression von K_v7 -Kanälen in neuronalen Kulturen über lentivirale Transduktion war erfolgreich und effizient und kann als neues System zur Charakterisierung von Ionenkanalmutationen in Nervenzellen verwendet werden. Die fluoreszenzmikroskopische Kontrolle, immunzytochemische Färbungen und Western Blot Analyse bestätigen die Expression des GFP-markierten Kanals. Durch die Wahl eines geeigneten Promotors (CamKII) konnte eine zu starke Überexpression und damit toxische Effekte verhindert werden und eine stabile und effiziente Expression gewährleistet werden.

Starke Überexpression von $K_v7.2$ bei Verwendung eines CMV-Promotors führte zu einem ungewöhnlichen Expressionsmuster und schließlich zum Absterben der Zellkulturen. Ein eindeutiger Nachweis eingeleiteter Apoptose durch die starke Expression des *KCNQ2*-Gens wurde in den *Rescue*-Experimenten mit Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration nicht erbracht, jedoch konnten die auffälligen Symptome in der Kultur nach Transfektion einige Zeit verhindert werden. Der verwendete Apoptose-Inhibitor konnte keine Verbesserung der Symptome in der Kultur erzielen, d.h. das Expressionsmuster wies weiterhin zusammen-gelagerte Klumpen statt einer homogenen Verteilung der Kanäle auf. Er zielte auf die Rho-assoziierte Protein Kinase (ROCK), welche zu den Inhibitoren von Apoptose (IAPs) zählt. Nach Caspase-3 Aktivierung über verschiedene Apoptose-einleitende Wege wird u.a. ROCK aktiviert, was weitere apoptotische Signale einleitet (Koyanagi et al. 2008). Die Vermittlung neuronaler Apoptose über erhöhten K^+ -Ausstrom aus der Zelle ist schon länger bekannt (Yu et al. 1997). Die verschiedenen Signalkaskaden sind allerdings sehr komplex und durch eine Vielzahl an Faktoren reguliert und die Beteiligung aller Faktoren noch nicht vollständig aufgeklärt (Elmore 2007). Daher ist es gut

möglich, dass eine Aktivierung der Apoptose über K^+ -Depletion nicht nur über die Caspase-abhängigen Kaskaden läuft, was auch schon Zhou *et al.* in ihrer Studie vermutet haben. Das könnte erklären, warum der Apoptoseinhibitor keine Verbesserung des Expressionsmusters und der Zellviabilität in der Kultur nach Transfektion erzielt hat, so wie es der Fall war bei Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration.

Auch die Zugabe des Kaliumkanalblockers 4-AP (1 mM) konnte die apoptotischen Symptome nicht verhindern, obwohl Studien gezeigt haben, dass der K_V -Kanal Antagonist Apoptose verhindern kann (Hu et al. 2006). Jedoch waren in dieser Studie die anti-apoptotischen Effekte erst deutlich bei Konzentrationen ab 5 mM 4-AP, bei 1 mM gab es nur geringfügige Effekte. Außerdem ist bekannt, dass 4-AP relativ selektiv für A-Typ Kaliumkanäle bei niedrigen Konzentrationen ist und erst ab millimolaren Leveln auch auf *delayed rectifier* Kanäle wie $K_V7.2$ und 7.3 wirkt (Leung 2010). Sehr wahrscheinlich war deshalb die verwendete Konzentration von 4-AP mit 1 mM zu gering, um bei Überexpression von $K_V7.2$ und 7.3 anti-apoptotische Effekte zu erzielen. Durch Wechsel des Plasmides bzw. Promotors wurde aber erstmals eine erfolgreiche und stabile Expression der Kanäle mit hoher Viabilität in den Nervenzellen erreicht, was das Ziel der Optimierung war.

Beim Vergleich der Expression von WT und mutierten Kanälen war die schwächere Expression der N258S-Mutation bei fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle und im Western Blot auffällig. Die verwendeten Mengen an DNA bei Transfektion der Produzierzelllinie und Virusmenge bei Transduktion waren aber bei allen Ansätzen gleich und wurden auch im Nachhinein nochmals überprüft.

Die schwächere Expression der N258S-Mutation kann darauf zurückgeführt werden, dass diese Mutation einen *Trafficking*-Defekt des Kanals verursacht, mit dominant-negativem Effekt auf WT-UE, was in einem heterologen Expressionssystem bereits gezeigt wurde (Maljevic et al. 2011). In der Western Blot Analyse konnte ein möglicher dominant-negativer Effekt sogar auf die endogenen WT-UE beobachtet werden, da das Signal sowohl von endogenen als auch zusätzlich exprimierten Kanälen mit N258S-Mutation schwächer war als bei den anderen Varianten. Bei fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle war das GFP-Signal dieser Variante auch so schwach, dass keine elektrophysiologischen Untersuchungen an einzelnen Neuronen durchgeführt wurden,

da positiv transduzierte Zellen nicht unter dem Mikroskop am Messstand zu identifizieren waren. Bei der immunzytochemischen Färbung hat man aber keine Unterschiede bezüglich der Transduktionseffizienz im Vergleich mit den anderen Varianten feststellen können. Durch die Markierung der Kanäle mit anti-GFP-Antikörpern und Verstärkung dieser Signale über den sekundären Antikörper und Anpassung der Belichtungszeit konnte ein deutlicheres Signal hergestellt werden, was die erfolgreiche und vergleichbar effiziente Transduktion dieser Variante zeigt. In einer anderen Arbeit unserer Gruppe wurde vermutet, dass UE mit N258S-Mutation zusammen mit WT-UE Tetramere bilden, allerdings mit Faltungsdefekt, was dazu führt, dass diese Kanäle womöglich in intrazellulären Kompartimenten bleiben und die Plasmamembran nicht erreichen (Maljevic et al. 2011). Da in dieser Studie die Gesamtproteinkonzentration dieser Variante reduziert schien, ist ein rascher Abbau der Faltungs-defekten Kanäle sehr wahrscheinlich. Dies könnte die in dieser Arbeit beobachtete Reduktion der endogenen WT-Kanaluntereinheiten erklären, die durch den dominant-negativen Effekt der UE mit Mutation mit betroffen sein können. Die reduzierte Oberflächenexpression dieser Mutation und die daraus resultierende Reduktion des M-Stroms kann übererregbare Zellen und somit die BFNS verursachen.

Die R207Q-Mutation zeigt eine mit WT-UE vergleichbare Expression. Die elektrophysiologische Charakterisierung einzelner Neurone mit R207Q-Mutation ergab eine Verschiebung der Aktivierungskurve zu mehr depolarisierten Potentialen, wie es auch schon für diese Mutation in Oozyten nachgewiesen wurde (Wuttke et al. 2007). Dies zeigt, dass der mutierte Kanal in Nervenzellen exprimiert wurde und vergleichbare Effekte verursacht. Der M-Strom war leicht reduziert im Vergleich zum WT, was aber auch mit der verschobenen Aktivierungskurve zusammenhängen kann, da bei gleichem Potential weniger Kanäle geöffnet sind.

Die Analyse des Feuerungsverhaltens ergab keine signifikanten Unterschiede für die Feuerungsrate mit dem Standardprotokoll. Die Varianz von Zelle zu Zelle war in diesem Bereich aber auch relativ hoch, da nur wenige APs ausgelöst wurden. Jedoch wurde für die R207Q-Mutation ein geringerer Strompuls benötigt, um 8 APs im 200 ms Intervall auszulösen. Im Protokoll zur Analyse des Feuerungsverhaltens lag die maximal injizierte Stromstärke bei +0.3 nA. Die Anzahl ausgelöster APs war hier niedriger als im darauffolgenden Protokoll,

weshalb die Effekte womöglich noch nicht erkennbar waren. Für das Auslösen von 8 APs wurde bei allen Varianten ein stärkerer Strompuls benötigt. Aus diesem Grund wurde das Standardprotokoll zur Analyse des Feuerungsverhaltens erweitert und bis zu einer maximal injizierten Stromstärke von +0.45 nA gemessen. Dabei war zu beobachten, dass sich ab einer injizierten Stromstärke von $>+0.35$ nA die Feuerungsrate der R207Q-Variante vom WT differenziert und etwas erhöht ist. Das bedeutet, dass sich der Effekt des defekten Kanals womöglich erst bei stärkeren Reizen und längeren AP-Folgen bemerkbar macht.

Die Analyse der Schwellenpotentiale der 8 ausgelösten APs konnte diese Vermutung bekräftigen. Beim 1. AP war das Schwellenpotential von WT und Mutation noch vergleichbar, die darauffolgende APs zeigten für Kanäle mit Mutation niedrigere Potentiale als beim WT mit schließlich signifikanten Effekten beim 7. und 8. AP. Dies zeigt die höhere Erregbarkeit der Zellen, die Kanäle mit R207Q-Mutation exprimieren.

K_v7-Kanäle reduzieren die Feuerungsrate, indem sie durch den M-Strom die Zelle hyperpolarisieren und so bei längeren AP-Folgen die Frequenzadaptation regulieren (Yue und Yaari, 2004). Die langsame Aktivierung des M-Stroms (mit Aktivierungs-Zeitkonstanten im Zehntel-ms-Bereich) lässt auch eine eher längerfristige Regulation des Feuerungsverhaltens vermuten (Storm 1987). Bei defekten Kanälen kann es dazu kommen, dass die Zellen leicht übererregbar werden, was zu einer höheren Anzahl an Aktionspotentialen bei gleichem Reiz im Vergleich zum WT führt. Dabei wird aber nicht die Schwelle zum Auslösen eines einzelnen APs beeinflusst, was erklären kann, dass der Strompuls, der benötigt wird, um nur ein einzelnes AP auszulösen, bei WT und Mutation gleich ist. Die R207Q-Mutation kann somit leicht übererregbare Zellen v.a. bei stärkeren Reizen und längeren AP-Folgen verursachen, was die Entstehung neurologischer Symptome erklären kann.

Die Analyse des Netzwerk-Feuerungsverhaltens heterozygoter *KCNQ2-KO*-Kulturen zeigte ebenfalls eine erhöhte Aktivität in Neuronen, die zusätzlich mutierte Kanäle oder nur GFP exprimieren, im Vergleich zu solchen, die zusätzlich WT-UE exprimieren. Im untersuchten Zeitraum zeigen heterozygote Kulturen tendenziell einen verringerten M-Strom und eine erhöhte Feuerungsrate im Vergleich zu WT-Kulturen. Die verminderte Anzahl an Spikes und niedrigere PFR von Neuronen, die zusätzlich WT-Kanäle exprimieren, zeigt,

dass die Expression gesunder Kanäle die Übererregbarkeit der Zellen reduziert und deutet deren Rolle bei der Regulation des Feuerungsverhaltens an. Defekte Kanäle mit N258S oder R207Q Mutation zeigen aufgrund der reduzierten Funktion von $K_v7.2$ noch die erhöhte Erregbarkeit des Netzwerkes.

Die Varianz der MEA-Messungen ist relativ hoch, was auf die variierende Zelldichte in der Messkammer und unterschiedlich ausgebildete Netzwerke zurückzuführen ist. Signifikante Effekte konnten bei 4-6 experimentellen Ansätzen mit unterschiedlich dichten Netzwerken noch nicht bestimmt werden. Trotzdem waren die Effekte klar und die Tendenzen offensichtlich, da unter allen Bedingungen (mit und ohne Zusatz von Bicucullin und 3 verschiedene Mess-Zeitpunkte) dieselben Ergebnisse erzielt wurden und eine stärkere Aktivität von Neuronen mit mutierten $K_v7.2$ - UE im Vergleich zu solchen mit WT-UE zeigen. Mit der Zugabe von Bicucullin und der damit hervorgerufenen Simulation von Epilepsie konnten die Effekte nochmals deutlicher gemacht werden. Die Erhöhung der Netzwerk-Synchronizität bei Zugabe von Bicucullin bestätigt auch, dass dies eine mögliche Eigenschaft epileptischer Aktivität ist, was auch mit Studien korreliert, die u.a. mit Hilfe von Elektroenzephalografie-Messungen (EEG) am Menschen durchgeführt wurden (Mormann et al. 2003; Uhlhaas und Singer 2006).

Desweiteren wurde beobachtet, dass sich WT-Kulturen von hippocampalen Neuronen in MEA-Messungen verhalten wie die heterozygoten Kulturen, die zusätzlich WT-Kanäle exprimieren, und eine geringere Spike Anzahl und PFR und damit eine niedrigere Aktivität im Vergleich zu heterozygoten Kulturen mit GFP oder solchen mit mutierten UE zeigen (Daten nicht gezeigt). Dies unterstreicht die wichtige Rolle von $K_v7.2$ bei der Regulation von Aktionspotentialen und Herstellung des Gleichgewichts bei der Erregbarkeit von Nervenzellen und deutet darauf hin, dass die erhöhte Expression von WT Kanälen als ein *Rescue*-Mechanismus für das gestörte Gleichgewicht im epileptischen Gehirn dienen könnte. Wykes *et al.* (2012) konnten über die zusätzliche Expression von $K_v1.1$ -Kanälen über lentivirale Transduktion in Nagetieren epileptische Aktivität von fokalen Epilepsien unterdrücken, was das Potential eines vergleichbaren gentherapeutischen Ansatzes für K_v7 -Kanäle bekräftigt. Das in dieser Arbeit entwickelte experimentelle System bietet aber noch weitere therapeutische Anwendungsmöglichkeiten. Da die heterozygoten

Kulturen mit zusätzlich exprimierten mutierten Kanälen Patienten-ähnliche Bedingungen schaffen, können insbesondere in der MEA-Analyse Screening Experimente verschiedener Pharmazeutika durchgeführt und die Effekte der Medikamente bei individuellen Genmutationen getestet werden. Für unspezifischere Analysen z.B. beim Vergleich von Medikamenten könnten aber auch heterozygote Kulturen ohne zusätzlich exprimierte Kanäle verwendet werden, da diese ein vergleichbares Verhalten wie bei zusätzlicher Expression mutierter UE aufweisen. Die direkte Auswirkung im neuronalen Netzwerk zu betrachten ist von großem Vorteil gegenüber einfacheren heterologen Expressionssystemen.

5. Zusammenfassung

Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle $K_V7.2$ und $K_V7.3$ generieren den M-Strom in Nervenzellen und sind an der Regulation von Aktionspotentialen beteiligt. Mutationen in diesen Kanälen können einen Funktionsverlust verursachen, was zu reduzierten M-Strömen und erhöhter Erregbarkeit von Nervenzellen führt und neurologische Krankheiten auslösen kann.

Die Untersuchung von Auswirkungen der Mutationen auf Struktur und Funktion des Kanals ist von großer Bedeutung für das Verständnis von Pathomechanismen und der gezielten Entwicklung pharmakologischer Reagenzien zum Entgegenwirken der Effekte. Dabei ist es wünschenswert, möglichst physiologische und Patienten-ähnliche Analysebedingungen zu schaffen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Struktur-Funktions-Korrelation eines in vielen K_V -Kanälen hoch konservierten Threonin-Restes aufgeklärt und der Effekt eines Austauschs der Aminosäure in $K_V7.2$ und $K_V7.3$ auf die Funktion des Kanals hin untersucht. Der Austausch bewirkt eine Verschiebung der Aktivierungskurve zu depolarisierteren Potentialen mit verlangsamter Aktivierung und beschleunigter Deaktivierung, was eine Präferenz des Kanals zum geschlossenen Konformationszustand impliziert. Dem Thr-Rest wird eine wichtige Rolle für die Stabilisierung des Kanals durch Verbindung des S1-S2-Bereiches mit der S5-Porenregion zugeteilt.

Im zweiten Teil wurde durch Expression Epilepsie-assoziiierter $K_V7.2$ -Mutationen mittels lentiviraler Transduktion von heterozygoten *KCNQ2-K.O.*-Mauskulturen ein neues System zur Untersuchung von Ionenkanalmutationen entwickelt. Die elektrophysiologische Analyse der krankheitsverursachenden $K_V7.2$ – Kanalmutationen R207Q und N258S konnte in Einzelzelleitungen und auf Multielektroden-Arrays (MEAs) im Netzwerk veränderte Ströme und Feuerungsverhalten nachweisen, was auf übererregbare Zellen und erhöhte Aktivität hinweist und damit die Entstehung der neurologischen Symptome erklären kann.

Die Expressionsanalyse konnte fluoreszenzmikroskopisch und im Western Blot einen *Trafficking*-Defekt mit dominant-negativem Effekt der N258S-Mutation in Neuronen nachweisen.

In der Einzelzell-Patch-Clamp Analyse der R207Q-Mutation in Neuronen konnte erstmals über einfache Transduktion / Transfektion die Auswirkung einer $K_v7.2$ -Mutation auf das Feuerungsverhalten untersucht werden. Der reduzierte M-Strom und die spätere Aktivierung der Kanäle mit Mutation wirken sich bei stärkeren Reizen mit längeren AP-Folgen durch eine leicht erhöhte Feuerungsrate bzw. übererregbare Zellen aus.

Die Analyse des Netzwerk-Feuerungsverhaltens auf MEAs ergab für heterozygote Kulturen, die zusätzlich WT-Kanäle exprimieren, im Vergleich zu Kulturen, die entweder mit mutierten Kanälen oder nur GFP transduziert sind, eine niedrigere Feuerungsrate sowie niedrigere Netzwerk-Synchronizität. Dies zeigt eine höhere Ausprägung epileptischer Eigenschaften für Neurone mit verminderter Anzahl oder defekten $K_v7.2$ -Kanälen.

6. Literaturverzeichnis

Ashcroft, F. M. (1999). *Ion channels and disease*. Academic press.

Biervert, C., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Berkovic, S. F., Propping, P., Jentsch, T. J., & Steinlein, O. K. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science*, *279*(5349), 403-406.

Brown, D. A., & Adams, P. R. (1980). Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ - current in a vertebrate neurone. *Nature*, *283*(5748), 673-676.

Brown, D. A. and Passmore, G. M. (2009), Neural *KCNQ* (Kv7) channels. *British Journal of Pharmacology*, *156*: 1185–1195.

Calderini, G., & Carlsson, A. (1978). Monoamine metabolism during bicuculline-induced epileptic seizures in the rat. *Brain research*, *157*(2), 295-302.

Charlier, C., Singh, N. A., Ryan, S. G., Lewis, T. B., Reus, B. E., Leach, R. J., & Leppert, M. (1998). A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nature genetics*, *18*(1), 53-55.

Cherubini, E., Gaiarsa, J. L., & Ben-Ari, Y. (1991). GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends in neurosciences*, *14*(12), 515-519.

Cooper, E. C. (2011, April). Made for "anchorin": Kv7. 2/7.3 (KCNQ2/KCNQ3) channels and the modulation of neuronal excitability in vertebrate axons. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 22, No. 2, pp. 185-192). Academic Press.

Dascal, N. (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channel. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *22*(4), 317-387.

Dedek, K., Kunath, B., Kananura, C., Reuner, U., Jentsch, T. J., & Steinlein, O. K. (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*, *98*(21), 12272-12277.

Delmas, P., & Brown, D. A. (2005). Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(11), 850-862.

Devaux, J. J., Kleopa, K. A., Cooper, E. C., & Scherer, S. S. (2004). KCNQ2 is a nodal K⁺ channel. *The Journal of neuroscience*, *24*(5), 1236-1244.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, *35*(4), 495-516.

Fath, T., Ke, Y. D., Gunning, P., Götz, J., & Ittner, L. M. (2008). Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons. *Nature protocols*, *4*(1), 78-85.

Füll, Y., Seebohm, G., Lerche, H., & Maljevic, S. (2012). A conserved threonine in the S1–S2 loop of KV7. 2 and KV7. 3 channels regulates voltage-dependent activation. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 1-8.

Gamper, N., Stockand, J. D., & Shapiro, M. S. (2005). The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, *51*(3), 177-185.

Goder, V., Crottet, P., & Spiess, M. (2000). In vivo kinetics of protein targeting to the endoplasmic reticulum determined by site-specific phosphorylation. *The EMBO journal*, *19*(24), 6704-6712.

Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L. A. *et al.* & Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews*, *57*(4), 473-508.

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*, *391*(2), 85-100.

Hauser, W. A., Annegers, J. F., & Rocca, W. A. (1996, June). Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 71, No. 6, pp. 576-586). Elsevier.

Hawryluk, J. M., Moreira, T. S., Takakura, A. C., Wenker, I. C., Tzingounis, A. V., & Mulkey, D. K. (2012). KCNQ Channels Determine Serotonergic Modulation of Ventral Surface Chemoreceptors and Respiratory Drive. *The Journal of Neuroscience*, *32*(47), 16943-16952.

Hille, B. (2001). Ion channels of excitable membranes 3rd edn. *Sunderland, MA: Sinauer*.

Hu, C. L., Liu, Z., Zeng, X. M., Liu, Z. Q., Chen, X. H., Zhang, Z. H., & Mei, Y. A. (2006). 4-Aminopyridine, a Kv channel antagonist, prevents apoptosis of rat cerebellar granule neurons. *Neuropharmacology*, *51*(4), 737-746.

Hunter, J., Maljevic, S., Shankar, A., Siegel, A., Weissman, B., Holt, P. *et al.* & Escayg, A. (2006). Subthreshold changes of voltage-dependent activation of the KV7. 2 channel in neonatal epilepsy. *Neurobiology of disease*, *24*(1), 194-201.

Illes, S., Theiss, S., Hartung, H. P., Siebler, M., & Dihn e, M. (2009). Niche-dependent development of functional neuronal networks from embryonic stem cell-derived neural populations. *BMC neuroscience*, *10*(1), 93.

Jentsch, T. J. (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *1*(1), 21-30.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (Eds.). (2000). *Principles of neural science* (Vol. 4, Ch. 6 & 7). New York: McGraw-Hill.

Karra, D., & Dahm, R. (2010). Transfection techniques for neuronal cells. *The Journal of Neuroscience*, *30*(18), 6171-6177.

Kass, R. E., Ventura, V., & Cai, C. (2003). Statistical smoothing of neuronal data. *Network-Computation in Neural Systems*, *14*(1), 5-16.

Koyanagi, M., Takahashi, J., Arakawa, Y., Fukuda, H., Hayashi, H., Narumiya, S., & Hashimoto, N. (2008). Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors. *Journal of neuroscience research*, *86*(2), 270-280.

Kubisch, C., Schroeder, B. C., Friedrich, T., Lütjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S. *et al.* & Jentsch, T. J. (1999). KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, *96*(3), 437-446.

Kullmann, D. M. (2002). The neuronal channelopathies. *Brain*, *125*(6), 1177-1195.

Lee, S. Y., Banerjee, A., & MacKinnon, R. (2009). Two separate interfaces between the voltage sensor and pore are required for the function of voltage-dependent K⁺ channels. *PLoS biology*, *7*(3), e1000047.

Lehmann-Horn, F., & Jurkat-Rott, K. (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiological reviews*, *79*(4), 1317-1372.

Lerche, C., Scherer, C. R., Seebohm, G., Derst, C., Wei, A. D., Busch, A. E., & 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*(29), 22395-22400.

Lerche, H., Jurkat-Rott, K. and Lehmann-Horn, F. (2001), Ion channels and epilepsy. *Am. J. Med. Genet.*, *106*: 146–159

Lerche, H., Shah, M., Beck, H., Noebels, J., Johnston, D. and Vincent, A. (2013), Ion channels in genetic and acquired forms of epilepsy. *The Journal of Physiology*, 591: 753–764.

Leung, Y. M. (2010). Voltage-gated K⁺ channel modulators as neuroprotective agents. *Life sciences*, 86(21), 775-780.

Long, S. B., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science Signalling*, 309(5736), 897.

Li, G. R., & Dong, M. Q. (2010). Pharmacology of cardiac potassium channels. *Advances in pharmacology*, 59, 94.

Macdonald, R. L., & Kelly, K. M. (2007). Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia*, 36(s2), S2-S12.

Maljevic, S., Naros, G., Yalçin, Ö., Blazevic, D., Loeffler, H., Çağlayan, H. *et al.* & Lerche, H. (2011). Temperature and pharmacological rescue of a folding-defective, dominantI-negative KV7. 2 mutation associated with neonatal seizures. *Human Mutation*, 32(10), E2283-E2293.

Maljevic, S., Wuttke, T. V., & Lerche, H. (2008). Nervous system KV7 disorders: breakdown of a subthreshold brake. *The Journal of physiology*, 586(7), 1791-1801.

Marrion, N. V. (1997). Control of M-current. *Annual review of physiology*, 59(1), 483-504.

Mckeown, L., Burnham, M. P., Hodson, C., & Jones, O. T. (2008). Identification of an evolutionarily conserved extracellular threonine residue critical for surface expression and its potential coupling of adjacent voltage-sensing and gating domains in voltage-gated potassium channels. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 30421-30432.

Mormann, F., Kreuz, T., Andrzejak, R. G., David, P., Lehnertz, K., & Elger, C. E. (2003). Epileptic seizures are preceded by a decrease in synchronization. *Epilepsy research*, *53*(3), 173-185.

Mulley, J. C., Scheffer, I. E., Petrou, S., & Berkovic, S. F. (2003). Channelopathies as a genetic cause of epilepsy. *Current opinion in neurology*, *16*(2), 171-176.

Naros, G. (2011) Funktionelle Analyse einer neuen dominant-negativen Mutation des KCNQ2 Kaliumkanals und die elektrophysiologische Charakterisierung hippocampaler Neurone von *KCNQ2 Knock-Out* Mäusen im Hinblick auf die Bedeutung bei benignen familiären Neugeborenenkrämpfen. *Dissertation Universität Ulm*

Neher, E. & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* *260*: 799-802.

Otto, F., Illes, S., Opatz, J., Laryea, M., Theiss, S., Hartung, H. P. *et al.* & Dihné, M. (2009). Cerebrospinal fluid of brain trauma patients inhibits in vitro neuronal network function via NMDA receptors. *Annals of neurology*, *66*(4), 546-555.

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*(4), 1053-1066.

Peters, H. C., Hu, H., Pongs, O., Storm, J. F., & Isbrandt, D. (2004). Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nature neuroscience*, *8*(1), 51-60.

Plouin, P. (1994). Benign familial neonatal convulsions. *Idiopathic generalized epilepsies: clinical, experimental and genetic aspects*, *9*, 39.

- Pusch, M. (2008). Electrophysiological Analysis of Ion Channels. *Protein Science Encyclopedia*.
- Robbins, J. (2001). KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacology & therapeutics*, *90*(1), 1-19.
- Safiulina, V. F., Zacchi, P., Tagliatela, M., Yaari, Y., & Cherubini, E. (2008). Low expression of Kv7/M channels facilitates intrinsic and network bursting in the developing rat hippocampus. *The Journal of physiology*, *586*(22), 5437-5453.
- Sakmann, B., & Neher, E. (1984). Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annual review of physiology*, *46*(1), 455-472.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(12), 5463-5467.
- Schroeder, B. C., Hechenberger, M., Weinreich, F., Kubisch, C., & Jentsch, T. J. (2000). KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(31), 24089-24095.
- Schroeder, B. C., Kubisch, C., Stein, V., & Jentsch, T. J. (1998). Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature*, *396*(6712), 687-689.
- Schwake, M., Pusch, M., Kharkovets, T., & Jentsch, T. J. (2000). Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K⁺ channels involved in epilepsy. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(18), 13343-13348.
- Shah, M. M., Mistry, M., Marsh, S. J., Brown, D. A., & Delmas, P. (2002). Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *The Journal of physiology*, *544*(1), 29-37.

Shahidullah, M., Santarelli, L. C., Wen, H., & Levitan, I. B. (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*(45), 16454-16459.

Singh, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B. R., Leach, R. J., Melis, R. *et al.* & Leppert, M. (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature genetics*, *18*(1), 25-29.

Singh, N. A., Westenskow, P., Charlier, C., Pappas, C., Leslie, J., Dillon, J. *et al.* & Leppert, M. F. (2003). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain*, *126*(12), 2726-2737.

Singh, N. A., Otto, J. F., Jill Dahle, E., Pappas, C., Leslie, J. D., Vilaythong, A., Noebels, J. L., Steve White, H., Wilcox, K. S. and Leppert, M. F. (2008), Mouse models of human *KCNQ2* and *KCNQ3* mutations for benign familial neonatal convulsions show seizures and neuronal plasticity without synaptic reorganization. *The Journal of Physiology*, *586*: 3405–3423.

Storm, J. F. (1987). Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *The Journal of physiology*, *385*(1), 733-759.

Stryer, Lubert (1987), Biochemie. 4. Aufl. *Vieweg*, Braunschweig / Wiesbaden

Surti, T. S., Huang, L., Jan, Y. N., Jan, L. Y., & Cooper, E. C. (2005). Identification by mass spectrometry and functional characterization of two phosphorylation sites of KCNQ2/KCNQ3 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(49), 17828-17833.

Uhlhaas, P. J., & Singer, W. (2006). Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology. *Neuron*, *52*(1), 155-168.

Vacher, H., & Trimmer, J. S. (2012). Trafficking mechanisms underlying neuronal voltage-gated ion channel localization at the axon initial segment. *Epilepsia*, *53*(s9), 21-31.

Wang, Q., Curran, M., Splawski, I., Burn, T. C., Millholland, J. M., VanRaay, T. J. *et al.* & Keating, M. T. (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature genetics*, *12*(1), 17-23.

Wang, H. S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B. S., Wymore, R. S., Cohen, I. S. *et al.* & McKinnon, D. (1998). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science*, *282*(5395), 1890-1893.

Washbourne, P., & McAllister, A. K. (2002). Techniques for gene transfer into neurons. *Current opinion in neurobiology*, *12*(5), 566-573.

Watanabe, H., Nagata, E., Kosakai, A., Nakamura, M., Yokoyama, M., Tanaka, K., & Sasai, H. (2001). Disruption of the epilepsy KCNQ2 gene results in neural hyperexcitability. *Journal of neurochemistry*, *75*(1), 28-33.

Weber, Y. G. and Lerche, H. (2008), Genetic mechanisms in idiopathic epilepsies. *Developmental Medicine & Child Neurology*, *50*: 648–654.

Wimmer, V. C., Reid, C. A., So, E. Y. W., Berkovic, S. F., & Petrou, S. (2010). Axon initial segment dysfunction in epilepsy. *The Journal of physiology*, *588*(11), 1829-1840.

Wulff, H., Castle, N. A., & Pardo, L. A. (2009). Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, *8*(12), 982-1001.

Wuttke, T. V., Jurkat-Rott, K., Paulus, W., Garncarek, M., Lehmann-Horn, F., & Lerche, H. (2007). Peripheral nerve hyperexcitability due to dominant-negative KCNQ2 mutations. *Neurology*, *69*(22), 2045-2053.

Wuttke, T. V., Penzien, J., Fauler, M., Seebohm, G., Lehmann-Horn, F., Lerche, H. and Jurkat-Rott, K. (2008), Neutralization of a negative charge in the S1–S2 region of the K_v7.2 (KCNQ2) channel affects voltage-dependent activation in neonatal epilepsy. *The Journal of Physiology*, 586: 545–555.

Wykes, R. C., Heeroma, J. H., Mantoan, L., Zheng, K., MacDonald, D. C., Deisseroth, K. *et al.* & Kullmann, D. M. (2012). Optogenetic and potassium channel gene therapy in a rodent model of focal neocortical epilepsy. *Science translational medicine*, 4(161), 161ra152-161ra152.

Yalçın, O., Caglayan, S. H., Saltik, S., Cokar, O., Agan, K., Dervent, A., & Steinlein, O. K. (2007). A novel missense mutation (N258S) in the KCNQ2 gene in a Turkish family afflicted with benign familial neonatal convulsions (BFNC). *Turkish Journal of Pediatrics*, 49(4), 385.

Yamauchi, T. (2005). Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(8), 1342-1354.

Yue, C., & Yaari, Y. (2004). KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience*, 24(19), 4614-4624.

Yu, S. P., Yeh, C. H., Sensi, S. L., Gwag, B. J., Canzoniero, L. M., Farhangrazi, Z. S. *et al.* & Choi, D. W. (1997). Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science*, 278(5335), 114-117.

Zhou, X., Wei, J., Song, M., Francis, K., & Yu, S. P. (2010). Novel role of KCNQ2/3 channels in regulating neuronal cell viability. *Cell Death & Differentiation*, 18(3), 493-505.

7. Anhang

7.1 Danksagung

Ich danke Prof. Holger Lerche für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten und Forschung im medizinischen Bereich durchführen zu können. Prof. Doron Rapaport danke ich vielmals für die Bereiterklärung, mich als externen Doktoranden der Biochemie zu betreuen.

Ich danke Snezana Maljevic für die Betreuung und Hilfe. Außerdem möchte ich meiner gesamten Arbeitsgruppe für eine tolle Zeit danken, insbesondere:

- meinen Denzkellenmitbewohnern StM und JK1. Durch euch waren Rückschläge erträglicher und die Arbeit im Labor angenehmer und mit viel Spaß verbunden. Außerdem habt ihr auch immer so gut es ging geholfen bei Problemen mit IT oder anderen Herausforderungen.
- Uli für die große Hilfe und Motivation beim Messen. Deine Leidenschaft für Ephys ist beinahe ansteckend, so wie du mich auch von deinem Bergbier überzeugen konntest!
- meinen Doktorschwestern Cristina und Katja, besonders für die Diskussionen draußen auf der Decke. Comportati bene!
- Heidi Löffler, besonders für das geduldige Ertragen meiner Nervosität bei „Weschtern“ und alles drumherum, Präp-Spaß an der Bench und die unvergessliche Nacht im Vögel-Zimmer! ;)
- Bernd Müller für die kleinen und großen Hilfen, die den Arbeitsplatz schöner gemacht haben (z.B. Parkplatz vor der Tür...) und das Schwäbisch-Training.

Allen anderen aus der Arbeitsgruppe, auch wenn sie zum Teil nur kurz da waren, für die tolle Atmosphäre, hilfreiche Diskussionen uvm.. Auch meinen ehemaligen Kolleginnen Aura und Yunxi möchte ich für die tolle Zeit und ihre Hilfe danken.

Caro (K-C), für die wiederholte unglaubliche Hilfe beim Keller aufräumen (da siehts aber auch immer aus..) und rosafarbene Erfrischungsgetränke zur Motivationssteigerung. Andi, danke für deine Sicht der Dinge!

Ich möchte auch vielen netten Kollegen aus dem Hertie-Institut danken, für die Hilfe, wenn man mal etwas ausleihen musste, Geräte defekt waren oder man Austausch zu Experimenten gebraucht hat, ich konnte viele nette und hilfsbereite Leute kennenlernen (z.B. Uli Naumann, Angelos, Eleni, Beni..).

Auch den Kollegen in Ulm (insbesondere Olesia und Astrid) danke ich für den tollen Start mit wunderbaren Kollegen!

Vielen Dank an die Lauers für die nette Küchennachbarschaft und die was-auf-dem-Tisch-liegt-kann-weg-Regel!

Ich danke meiner Familie, die mich liebevoll zu einer eigenständigen, kritischen, kämpferischen und das-Chaos-beherrschenden Person mit leichten Nerd-Genen erzogen hat. Ihr seid großartig! Meinen Freundinnen Laurie, Caro und Tina danke ich für die Unterstützung in all den Jahren, die Abende, Ablenkung, Krisenbewältigung, Quatschen und Blödsinn! Auch Christopher möchte ich danken für seine Unterstützung.

Patrick, vielen Dank für deine Geduld, deine Hilfe und dein Verständnis, vor allem in der stressigen Endphase! DBMBBFUMF!

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Yvonne Füll

Institutsadresse: Hertie-Institut für klin. Hirnforschung
Abt. Neurologie / Epileptologie
Otfried-Müller-Str. 27
72076 Tübingen
Tel.: 07071 – 29 87639
E-Mail: yvonne.fuell@uni-tuebingen.de

Privatadresse: Mühlstr. 18
72074 Tübingen

Geburtsdatum: 23.06.1984

Geburtsort: Langen (Hessen), Deutschland

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Schule und akademische Ausbildung:

1990 – 1994 Ludwig-Uhland Grundschule / Neu-Isenburg

1994 – 2003 Goethe-Gymnasium / Neu-Isenburg
Abschluss allg. Hochschulreife Juni 2003

2003 – 2008 Biochemiestudium an der Goethe-Universität
/ Frankfurt am Main

20.05.2008 Diplom
Hauptfächer: Biochemie, Biophysikalische Chemie;
Nebenfach: Zellbiologie
Diplomarbeit: „Isolierung synaptischer Vesikel aus
Caenorhabditis elegans“
Bei Jun. Prof. Dr. Alexander Gottschalk / Institut
für Biochemie, Frankfurt am Main

| | |
|------------------|---|
| Juni - Okt. 2008 | Wiss. Angestellte / Institut für Biochemie, Frankfurt/Main |
| Seit Nov. 2008 | Promotion zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer.nat Bei Prof. Dr. Holger Lerche / Uniklinik Ulm Thema: „Funktionelle Auswirkungen Epilepsie- assoziierter Kaliumkanalmutationen in Neuronen“ |

Publikationen:

FÜLL, Yvonne, et al. A conserved threonine in the S1–S2 loop of K_v7.2 and K_v7.3 channels regulates voltage-dependent activation. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2012, S. 1-8.

Füll, Yvonne, et al. A conserved Threonine in the S1-S2 loop of K_v7.2/7.3 is important for voltage-dependent channel activation.

Poster: Society for neuroscience, *San Diego* 2010

Poster: Deutsche Physiologische Gesellschaft, *Regensburg* 2011

Füll, Yvonne, et al. Neuronal expression of KCNQ channel mutations; Different approaches in murine primary hippocampal cultures.

Poster: Epicure Meeting, *Venice* 2011

Füll, Yvonne, et al. Neuronale Expression der K_v7.2 Kaliumkanäle.

Poster: Epilepsia, *Stuttgart* 2012

Füll, Yvonne, et al. K_v7 channels: structure-function correlation and neuronal expression. *Poster*: Evaluation Department of Neurology, *Tübingen* 2012