

Hertie Institut für klinische Hirnforschung
Abt. für Neurologie mit Schwerpunkt Epileptologie

**Einfluss von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen auf
die neuronale Morphologie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Schwarz, Hannah Rebecca

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Lerche

2. Berichterstatter: Professorin Dr. O. Garaschuk

Tag der Disputation: 09.10.2025

Widmung

Dieses Manuskript widme ich meiner Familie.

I. INHALTSVERZEICHNIS

I.	INHALTSVERZEICHNIS	3
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
III.	TABELLENVERZEICHNIS	9
IV.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
1.	EINLEITUNG	11
1.1.	Epilepsie	11
1.2.	Kanalopathien als Ursache von genetischen epileptischen Syndromen	11
1.3.	Spannungsabhängige Kaliumkanäle	12
1.3.1.	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal Kv1.2	14
1.4.	Ionenkanalblocker	15
1.4.1.	Blocker spannungsabhängiger Kaliumkanäle	15
1.4.2.	Spezifische Blocker spannungsabhängiger Kv1.2-Kaliumkanäle	16
1.5.	Wissenschaftliche Fragestellung	17
2.	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1.	Reagenzien und Lösungen	18
2.1.1.	Chemikalien und Toxine	18
2.1.2.	Medien	18
2.1.3.	Lösungen für Patch Clamp-Untersuchungen an <i>Chinese Hamster Ovary</i> (CHO) Zellen	18
2.1.4.	Lösungen für Patch Clamp-Experimente an murinen Neuronen	19
2.1.5.	Antikörper (Immunzytochemie mit Fluorophoren)	20
2.1.6.	Färbungen	20
2.2.	Molekulare und zellbiologische Methoden	20
2.2.1.	Mutagenese	20
2.2.2.	Zellkultur	21

2.3.	Langzeitbehandlung mit K _V 1.2-Kanalblockern	22
2.4.	Transfektion und Transduktion	23
2.4.1.	Transiente Transfektion von K _V 1.2 cDNA in CHO Zellen	23
2.4.2.	Transiente Transfektion von K _V 1.2 WT/LOF/GOF-cDNA in murinen primären Neuronen	24
2.4.3.	Virale Transduktion in primären murinen Neuronen	25
2.5.	Elektrophysiologie	25
2.5.1.	Experimentelles Vorgehen und Setup	25
2.5.2.	Glaselektroden	26
2.5.3.	„Whole Cell Patch Clamp“-Messungen	27
2.5.4.	Patch Clamp-Protokolle und Datenanalyse	27
2.6.	Imaging mittels Fluoreszenz-Mikroskop	30
2.7.	Imagebearbeitung mittels FIJI/ ImageJ Software	31
2.8.	Rekonstruktion mittels neuTube Software	32
2.9.	Sholl Analyse	33
2.10.	Statistik	33
3.	ERGEBNISSE	35
3.1.	Ermittlung einer relevanten K _V 1.2-Kanalhemmung in CHO Zellen	35
3.1.1.	Relevante Kanalhemmung von K _V 1.2 WT-Homomeren in CHO Zellen	35
3.1.2.	Testung der Toxinspezifität bei K _V 1.1 WT-Homomeren in CHO Zellen	38
3.1.3.	Testung der Toxinspezifität bei K _V 1.4 WT-Homomeren in CHO Zellen	41
3.2.	Analyse von Ruhemembranpotential und Erregbarkeit in primären murinen kortikalen K _V 1.2 WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone unmittelbar nach Toxingabe	43
3.2.1.	Analyse von Ruhemembranpotential und Eingangswiderstand primärer muriner kortikaler K _V 1.2 WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone	44
3.2.2.	Analyse der Erregbarkeit primärer muriner kortikaler K _V 1.2 WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone	45

3.2.3.	Analyse von Ruhemembranpotential und Erregbarkeit in primären murinen kortikalen $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierten Neuronen unmittelbar nach Gabe von Conotoxin $\kappa M-R111J$	46
3.2.4.	Analyse von Ruhemembranpotential und Erregbarkeit muriner kortikaler $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone unmittelbar nach Gabe von Tityustoxin	51
3.3.	Untersuchung der Funktionalität der kortikaler $K_v1.2$ WT/R297Q-transduzierter Neurone	54
3.3.1.	Ruhemembranpotential und Eingangswiderstand kortikaler muriner Neurone	54
3.3.2.	Erregbarkeit kortikaler muriner $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone	56
3.4.	Sholl Analyse kortikaler muriner primärer $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone	57
3.5.	Sholl Analyse hippocampaler primärer GFP- bzw. $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone	59
3.5.1.	Sholl Analyse: hippocampale neuronale murine Primärkulturen nach Langzeitbehandlung mit $K_v1.2$ -Blockern	62
3.6.	Untersuchung der Funktionalität der hippocampaler GFP/ $K_v1.2$ WT/R297Q-transfizierter Neurone	68
3.6.1.	Analyse von Ruhemembranpotential und Eingangswiderstand in primären murinen hippocampalen Neuronen	68
3.6.2.	Erregbarkeit hippocampaler GFP- bzw. $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter muriner Neurone	69
4.	DISKUSSION	72
4.1.	$K_v1.2$ -Kanalhemmung in CHO Zellen	72
4.2.	Ruhemembranpotential und Erregbarkeit in primären murinen kortikalen Neuronen während akuter Toxingabe	73
4.3.	Sholl Analyse primären murinen Neurone	75

4.3.1.	Zellmortalität kortikaler und hippokampaler muriner Neuronenkulturen ohne bzw. nach Toxin-Langzeitbehandlung	75
4.3.2.	Sholl Analyse primärer kortikaler und hippokampaler Neurone	76
4.3.3.	Sholl Analyse hippokampaler neuronaler muriner Primärkulturen nach Langzeitbehandlung mit Kv1.2-Kanalblockern	77
4.4.	Funktionalität der untersuchten Neurone	78
4.5.	Limitationen der Arbeit	79
4.6.	Kernaussagen	79
5.	AUSBLICK	80
6.	ZUSAMMENFASSUNG	81
7.	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	82
8.	LITERATURVERZEICHNIS	83
9.	DANKSAGUNG	89
V.	ANHANG	90
10.1.	Chemikalien	90
10.2.	KITs	91
10.3.	Medien	91
10.4.	Lösungen für Zellkultur	91

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Alpha-Untereinheit eines $K_v1.2$ -Kanals.	13
Abbildung 2: Voltage Clamp-Messprotokoll für CHO Zellen zur Messung des K^+ Stroms.	28
<i>Abbildung 3: Current Clamp-Messprotokoll zur Messung von Spannungsänderungen.</i>	29
Abbildung 4: Current Clamp-Messprotokoll zur Aufzeichnung von Aktionspotentialen.	30
Abbildung 5: Bildreihenfolge	31
Abbildung 6: Rekonstruktion eines Neurons.	32
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Patch Clamp-Messungen an CHO Zellen.	35
Abbildung 8: Repräsentative K^+ Ströme abgeleitet von einer $K_v1.2$ WT-transfizierten CHO Zelle vor (links) und nach (rechts) Gabe von 150 nM κM -R111J.	36
Abbildung 9: Prä und post Toxin-Messungen in $K_v1.2$ WT-transfizierten CHO Zellen nach Gabe von Ionenkanalblockern.	37
Abbildung 10: Repräsentative K^+ Ströme abgeleitet von einer $K_v1.1$ WT-transfizierten CHO Zelle vor (links) und nach (rechts) Gabe von 150 nM κM -R111J.	39
Abbildung 11: Prä und post Toxin-Messungen in $K_v1.1$ WT-transfizierten CHO Zellen (n=7) nach Gabe von Ionenkanalblockern.	40
Abbildung 12: Repräsentative K^+ Ströme der prä und post Toxin-Messungen abgeleitet von einer $K_v1.4$ WT-transfizierten CHO Zelle vor (links) und nach (rechts) Gabe von 150 nM κM -R111J.	41
<i>Abbildung 13: Prä und post Toxin-Messungen in $K_v1.4$ WT-transfizierten CHO Zellen nach Gabe von Ionenkanalblockern.</i>	42
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Experimentaldurchführung der Patch Clamp-Messungen zur akuten Toxinwirkung an kortikalen Neuronen.	44
Abbildung 15: RMPs (A) und IRs (B) kortikaler $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone (DIV10-15).	45
Abbildung 16: Anzahl Aktionspotentiale kortikaler $K_v1.2$ WT/R297Q-transduzierter Neurone (n=4) an DIV 10-15.	46
Abbildung 17: RMPs und IRs kortikaler $K_v1.2$ WT/R297Q-transduzierter Neurone unmittelbar nach Gabe von Conotoxin κM -R111J (DIV 10-15).	48
Abbildung 18: Anzahl Aktionspotentiale kortikaler $K_v1.2$ WT/R297Q-transduzierter Neurone (DIV 10-15) nach Gabe von Conotoxin κM -R111J.	50
Abbildung 19: RMPs (A) und IRs (B) kortikaler $K_v1.2$ WT/R297Q-transduzierter Neurone nach Gabe von Tityustoxin (DIV 10-15).	52
Abbildung 20: Anzahl Aktionspotentiale kortikaler $K_v1.2$ WT/R297Q-transduzierter Neurone (DIV 10-15) nach Gabe von Tityustoxin.	54
Abbildung 21: Schematische Darstellung des Experimentalablaufs	55

Abbildung 22: RMPs kortikaler $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone.	56
Abbildung 23: Anzahl Aktionspotentiale kortikaler $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone an DIV 10-15.	57
Abbildung 24: Übersichtsbilder 20-fach vergrößert von vitalen $K_v1.2$ WT/R297Q-transduzierten kortikalen Neurone.	58
Abbildung 25: Sholl Analyse kortikaler $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone im Alter von DIV 10-15.	59
Abbildung 26: Exemplarische Darstellung von Übersichtsbildern (20-fache Vergrößerung) von GFP/ $K_v1.2$ WT/R297Q-transfizierten hippocampalen Neuronen (DIV 10-14) mit und ohne Langzeitbehandlung mit 150 nM Conotoxin κ M-R111J.	61
Abbildung 27: Sholl Analyse hippocampaler GFP- bzw. $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone im Alter von DIV 10-14.	62
Abbildung 28: Sholl Analyse rekonstruierter hippocampaler GFP- bzw. $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone nach Langzeitbehandlung mit Tityustoxin im Alter von DIV 10-14 (A und B).	63
Abbildung 29: Sholl Analyse hippocampaler GFP/ $K_v1.2$ WT/R297Q-transfizierter Neurone nach Langzeitbehandlung mit Conotoxin κ M-R111J (DIV 10-14).	65
Abbildung 30: Sholl Analyse hippocampaler GFP- bzw. $K_v1.2$ WT- (A) bzw. R297Q-transfizierter Neurone (B) im Alter von DIV 10-14 nach Langzeitbehandlung mit 4-AP.	67
Abbildung 31: RMPs (A) und IRs (B) hippocampaler GFP- bzw. $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone DIV 10-14.	69
Abbildung 32: Exemplarische Darstellung des Feuerungsverhaltens GFP- bzw. $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone bei 50 bzw. 175 pA Strominjektion.	70
Abbildung 33: Anzahl Aktionspotentiale in Abhängigkeit vom injizierten Strom, gemessen in mit GFP- bzw. $K_v1.2$ WT- oder R297Q-transfizierten hippocampalen Neuronen an DIV 10-14.	71

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: im Rahmen der Experimente verwendete Toxine	18
Tabelle 2: in Zellkultur verwendete Medien	18
Tabelle 3: Intrazellulärlösung für Messungen an CHO Zellen	18
Tabelle 4: Extrazellulärlösung für Messungen an CHO Zellen	19
Tabelle 5: Intrazellulärlösung für Messungen an murinen Neuronen	19
Tabelle 6: Extrazellulärlösung für Messungen an murinen Neuronen	19
Tabelle 7: Verwendete Antikörper für immunzytochemische Färbungen	20
Tabelle 8: Weitere Materialien für immunzytochemische Färbungen	20
Tabelle 9: bei Langzeitbehandlung muriner neuronaler Primärkulturen verwendete Toxinkonzentrationen	23
Tabelle 10: Exemplarische Darstellung der relevanten Kv1.2-Kanalhemmung als AUCs nach Gabe von 150 nM Conotoxin κ M-R111J	38
Tabelle 11: Exemplarische Darstellung der signifikant größeren AUCs nach unmittelbarer Toxinwirkung von 150 nM Conotoxin κ M-R111J auf die Anzahl APs in transduzierten R297Q-Neuronen.	51
Tabelle 12: Messparameter publizierter Kv1.2 Kanal-Inhibitoren	72

III. Abkürzungsverzeichnis

AP	Aktionspotential
bzw.	beziehungsweise
CHO	Chinese Hamster Ovary- Zellen
DIV	Days in vitro
ED	Embryo Tag (eng.: Embryo Day)
eng.	englisch
FCS	fetal cow serum
GOF	gain of function
hippokampal	hipp.
IR	Eingangswiderstand (eng.: Input Resistance)
κ M-R111J	Conotoxin KM- R111J
K ⁺ -Kanal	Kaliumkanal
kortikal	kort.
LJP	Leck-Ströme, eng.: Liquid Junction Potential
LOF	loss of function
min	Minute
mV	Millivolt
nA	Nanoampere
o.g.	oben genannte
pA	Picoampere
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RM	repeated measures ANOVA
RMP	Ruhemembranpotential
SEM	Standard Error of Means
sog.	sogenannte
TsTx-K α	Tityustoxin
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
4-AP	4-Aminopyridin

1. Einleitung

1.1. Epilepsie

Epilepsien gehören zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen weltweit (Weber and Lerche, 2013). Die Prävalenz liegt bei ca. 0,5-1% der Weltbevölkerung, wobei die Inzidenz 0,04% Neuerkrankungen pro Jahr beträgt. Allein in Deutschland sind rund 600.000 Menschen betroffen. Jährlich kommen ca. 30.000 Neuerkrankungen hinzu (Pfäfflin, 2011, Brandt, 2016). Etwa 5% der Bevölkerung erleidet während ihres Lebens mindestens einen epileptischen Anfall, ohne eine klinisch manifeste Epilepsie zu entwickeln (Brandt, 2016). Rund 40% aller diagnostizierten Epilepsien sind genetisch bedingt, z.B. in Form von Ionenkanalmutationen (Oyler et al., 2018). Ca. 25% der bislang untersuchten epileptogenen Genvarianten kodieren Ionenkanäle (Oyler et al., 2018). Bei diesen genetischen epileptischen Syndromen gibt es in der Regel keinen Hinweis auf morphologische Veränderungen des Gehirns und/oder äußere Ursachen (Weber and Lerche, 2013). Ein gehäuftes altersgebundenes Auftreten konnte gezeigt werden. Weitere mögliche Ursachen für epileptische Anfälle sind struktureller (z.B. bei Schlaganfällen, Hirntumoren, Fehlbildungen), metabolischer (z.B. Hypoglykämien, Hypoxie), oder entzündlicher, autoimmuner oder unbekannter Genese (Scheffer et al., 2017). Die höchste Rate an Neuerkrankungen findet sich in den ersten 5 Lebensjahren und ab dem 60. Lebensjahr (Pfäfflin, 2011, Brandt, 2016).

Das elektrophysiologische Korrelat epileptischer Anfälle sind vorübergehende, synchrone Entladungen von Nervenzellverbänden (Fisher et al., 2014). Sie entstehen aufgrund von Übererregbarkeit einzelner Neurone bzw. Neuronengruppen (WHO, 2023). Je nach Erkrankungstyp gibt es Unterschiede in der Anfallsfrequenz und -lokalisation (WHO, 2023). 27% der untersuchten Epilepsie-induzierenden Gen-defekte zeigen, dass die neuronale Übererregbarkeit aus einem Ungleichgewicht von erregenden (Natriumkanäle, Kalziumkanäle, Glutamatrezeptoren (NMDA)) und hemmenden (Kaliumkanäle, Chloridkanäle) Einflüssen auf das neuronale Membranpotential aufgrund einer Ionenkanalvariante (oder in seltenen nachgewiesenen Fällen auch mehrerer Varianten) resultiert (Oyler et al., 2018).

1.2. Kanalopathien als Ursache von genetischen epileptischen Syndromen

In ihrer Funktion als Transmembranproteine leiten Ionenkanäle Ionen selektiv durch die Zellmembran. Dies führt zu Änderungen des Membranpotentials und ist Grundlage

für die Erregbarkeit der Zellen sowie die Generierung und Fortleitung von Aktionspotentialen (Sakmann and Neher, 1984).

Viele der bisher untersuchten Gendefekte von genetischen epileptischen Syndromen betreffen Ionenkanäle oder Ionentransporter, die für die Weiterleitung elektrischer Signale im Gehirn notwendig sind (Oyrer et al., 2018). Insbesondere spannungsgesteuerte Kaliumkanäle scheinen eine große Rolle zu spielen (Weber and Lerche, 2013, Allen et al., 2020). Hierbei zeigte sich eine große Variabilität der resultierenden epileptischen Syndrome (Allen et al., 2020, Gribkoff and Winkvist, 2023). In diesem Zusammenhang besonders erwähnenswert ist die *KCNA2*-assoziierte Enzephalopathie, die in den letzten 10 Jahren entdeckt und erforscht wurde. Klinisch äußert sich die *KCNA2*-assoziierte Enzephalopathie durch geistige Retardierung, wie z.B. Intelligenzminderung und fehlende oder verzögerte Sprachentwicklung, Ataxie, psychomotorische Entwicklungsstörungen, Fieberkrämpfe, fokale oder generalisierte epileptische Anfälle, wie Absencen oder generalisierte tonisch-klonische Anfälle. Es zeigte sich, dass die Klinik der Patienten abhängig von der auslösenden $K_v1.2$ Variante früher auftritt und/oder schwerwiegender verläuft (Syrbe et al., 2015, Masnada et al., 2017). Zwei der hierbei als epilepsieauslösend identifizierten Genvarianten werden im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht.

1.3. Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Kaliumkanäle lassen sich in folgende drei Gruppen untergliedern:

- Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (z.B. K_v1 -Familie),
- Liganden-gesteuerte Kaliumkanäle und
- G-Protein-gesteuerte Kaliumkanäle (K_{IR}) (Hommers, 2008).

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle bestehen aus 4 Alpha-Untereinheiten, die um eine zentrale Pore angeordnet sind (Tetramer). Jede Alpha-Untereinheit enthält, wie in Abbildung 1 dargestellt, 6 Transmembrandomänen. Die ersten 4 Transmembrandomänen (S1-S4) bilden den Spannungssensor. Die Domänen S5 und S6 mit dem dazwischen angeordneten P-Loop begrenzen die Kanalpore (Yellen, 2002, Niday and Tzingounis, 2018).

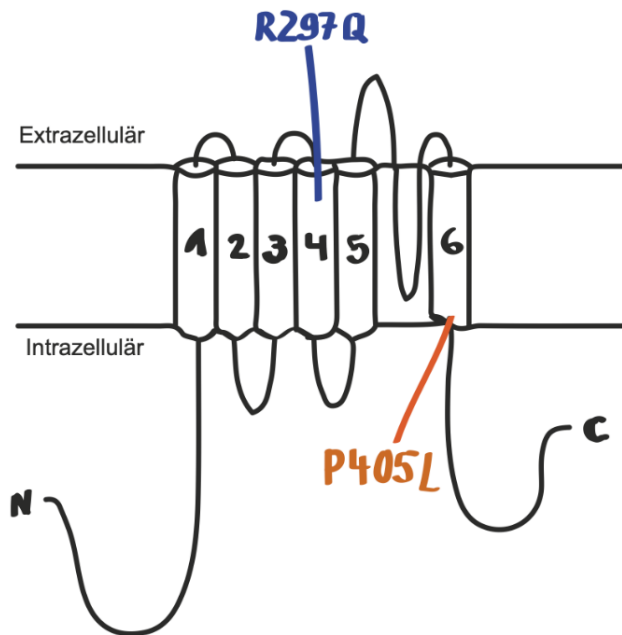


Abbildung 1: Alpha-Untereinheit eines Kv1.2-Kanals.

Bestehend aus 6 Transmembrandomänen (S1-S6). S1 bis S4 bilden den Spannungssensor und S5-S6 die Kanalpore. Ebenfalls dargestellt ist die Lokalisation der beiden untersuchten Kv1.2-Varianten. Adaptiert nach Syrbe et al., 2015.

Zu den Funktionen von spannungsabhängigen Kaliumkanälen gehören die Steuerung der neuronalen Erregbarkeit, die Regulation von Neurotransmitter-Freisetzung und Herzfrequenz, der Insulinsekretion, des epithelialen Elektrolyttransports sowie der Kontraktion von glatten Muskelzellen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=3737>, 2019). Diese Kanäle sind essenziell für viele physiologische Vorgänge im Körper. Genetische Defekte in solchen Kaliumkanälen können daher zu Krankheiten, sogenannten Kanalopathien, führen, welche schwere Erkrankungen, wie z.B. Epilepsie, Ataxie oder geistige Retardierung, hervorrufen können (Niday and Tzingounis, 2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=3737>, 2019).

1.3.1. Spannungsgesteuerter Kaliumkanal Kv1.2

2015 wurden von den Arbeitsgruppen um Johannes Lemke und Holger Lerche und Kooperationspartnern genetische *de novo* Varianten in einem Kaliumkanalgen identifiziert, welche schwere entwicklungsbedingte und epileptische Enzephalopathien (DEE) beim Menschen verursachen. Dieses *KCNA2*-Gen kodiert den spannungsgesteuerten Kaliumkanal Kv1.2 (Syrbe et al., 2015, Masnada et al., 2017).

Der aus 4 Kv1.2-Untereinheiten aufgebaute Kaliumkanal gehört zur Subfamilie A der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle. Sowohl *KCNA2* RNA- als auch Kv1.2-Proteinexpression konnte im zentralen und peripheren Nervensystem sowohl in erregenden, als auch hemmenden, Neuronen nachgewiesen werden (Lorincz and Nusser, 2008, Niday and Tzingounis, 2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=3737>, 2019).

Kv1.2-Kanäle sind sowohl distal des axonalen Initialsegments als auch in den Juxtaparanodien der Ranvier'schen-Schnürringe lokalisiert (Wang et al., 1993). Der Kv1.2 Kanal konstituiert sowohl als Homomer, als auch als Heteromer mit Kv1.1 den spannungsabhängigen „delayed rectifier“- Kaliumstrom (D-current), der durch eine langsame Inaktivierung gekennzeichnet ist (Storm, 1988, Brew et al., 2003, Niday and Tzingounis, 2018, Chow and Leung, 2020). Dieser sog. *D-type* Strom (I_D) spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation neuronaler Erregbarkeit (Rama et al., 2017). Als Heteromer mit Kv1.4 konstituiert Kv1.2 einen präsynaptischen A- Strom, der sich durch eine schnelle Aktivierung und Inaktivierung auszeichnet (Sheng et al., 1993, Fransen and Tigerholm, 2010).

Varianten im Kv1.2-Kanal sind Ursachen für schwere frühkindliche Epilepsien mit Entwicklungsstörungen, Intelligenzminderung und weiteren neuropsychiatrischen Symptomen. Bei einigen Patienten mit einer etwas milderer Form der DEE konnte mittels funktioneller Charakterisierung in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* ein stark eingeschränkter Kaliumfluss beschrieben werden (*loss of function* (LOF)). Bei einer zweiten Patientenkohorte zeigte sich eine signifikant gesteigerte Kanalfunktion mit gesteigertem Kaliumfluss (*gain of function* (GOF)). Diese war vergesellschaftet mit anhaltenden generalisierten epileptischen Anfällen sowie schwereren Entwicklungsproblemen (Syrbe et al., 2015, Masnada et al., 2017). Dabei führen die GOF-Varianten nicht nur zu einer starken Vergrößerung der Stromamplitude im Vergleich zum Wildtyp

(WT)-Kanal, sondern auch zur Aktivierung des Kanals bei hyperpolarisierteren Potentialen (Syrbe et al., 2015). Mittels Transduktion muriner hippocampaler Neurone konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von $K_v1.2$ -Kanälen mit GOF-Variante zu einer Reduktion der Aktionspotentialfrequenz und einer gleichzeitigen Verkürzung der Aktionspotential-dauer führt (Hedrich et al., 2021). Für diese GOF-Varianten konnte gezeigt werden, dass eine Applikation von 4-Aminopyridin (4-AP), einem relativ spezifischen Blocker der K_v1 -Familie, eine deutliche Reduktion der Stromamplitude bewirkt und die Aktivierung der Kanäle zu depolarisierteren Potentialen verschoben wird, die ähnlich zu den Potentialen sind, bei denen WT-Kanäle aktivieren (Hedrich UBS, 2019).

1.4. Ionenkanalblocker

In Folge der essentiellen Funktion von Ionenkanälen für die neuronale Erregbarkeit, kann mit Hilfe von Ionenkanal-modulierenden Substanzen, wie bestimmten Pharmaka oder z.B. Tiergiften, die in der Forschung eingesetzt werden, neuronale Übererregbarkeit beeinflusst werden. Diese Eigenschaft bestimmter Pharmaka kommt bereits bei vielen medizinischen Indikationen zum Tragen, wie in der Therapie von Epilepsien und neuropathischen Schmerzen, bei Lokalanästhesien oder Narkosen. Es gibt zudem immer mehr Hinweise, dass Ionenkanalmodulatoren auch ganz spezifisch bei genetischen Syndromen oder anderen neuen Indikationen eingesetzt werden können, wenn der Pathomechanismus bekannt ist und gezielt antagonisiert werden kann (Hedrich et al., 2021, Kapell et al., 2023).

1.4.1. Blocker spannungsabhängiger Kaliumkanäle

1.4.1.1. 4-Aminopyridin

4-Aminopyridin ($C_5H_6N_2$; 4-AP) ist ein reversibler, relativ spezifischer Blocker spannungsabhängiger Kaliumkanäle der K_v1 -, K_v3 - und K_v4 -Familien. Die Bindungsdomäne von 4-AP wird innerhalb der Transmembrandomäne S6 vermutet (Werkman et al., 1993, Kirsch et al., 1993, Caballero et al., 2007). Durch Blockade des Ionenkanals mit 4-AP wird die Dauer der Aktionspotentiale verlängert.

Kaliumströme von neuronalen Zellen können in mehrere Teilkomponenten differenziert werden: I_D , I_A und I_K . Mitterdorfer und Bean (Mitterdorfer and Bean, 2002) haben einen Einfluss von 4-AP auf I_D und I_A in hippocampalen (C3) Rattenneuronen nachgewiesen. Wie in 1.3.1 beschrieben, trägt $K_v1.2$ je nach Zusammensetzung des Heteromers

sowohl zu I_D als auch zu I_A bei (Sheng et al., 1993, Wang et al., 1993). Der Kaliumstrom I_D wurde als schnell aktivierend und langsam inaktivierend beschrieben. Es wurde ein hemmender Effekt von 30 μM 4-AP beobachtet. Dagegen wurde der Kaliumstrom I_A als schnell aktivierend und schnell inaktivierend beschrieben. Ein hemmender Effekt von 4-AP konnte erst bei höheren Konzentrationen (3 mM 4-AP) nachgewiesen werden (Mitterdorfer and Bean, 2002).

4-AP ist zugelassen zur Therapie bei adulten Patienten mit Multipler Sklerose (Meyer, 2009).

1.4.2. Spezifische Blocker spannungsabhängiger $K_V1.2$ -Kaliumkanäle

1.4.2.1. Tityustoxin

Kaliumkanäle sind Zielstrukturen natürlich vorkommender Gifte, wie z. B. von Skorpiongiften (Hille, 2001). Tityustoxin (TsTx- $K\alpha$) ist ein α -Peptidtoxin. Es wird von Skorpionen der Subfamilie Titynae produziert. TsTx- $K\alpha$ bewirkt eine reversible Hemmung spannungsgesteuerter $K_V1.2$ Kaliumkanäle durch Bindung an einer extrazellulären Bindungsstelle. Dies konnte gezeigt werden, da die Hemmung der $K_V1.2$ Kanäle nur im Rahmen von outside-out Patch Clamp-Messungen beobachtet werden konnte (Werkman et al., 1993, Baronas et al., 2015). Die outside-out Patch Clamp-Technik ist eine spezielle Technik, bei der Charakteristiken der extrazellulären Kanaldomäne untersucht werden können.

1.4.2.2. Conotoxin $\kappa\text{M-RIIIJ}$

Conotoxin $\kappa\text{M-RIIIJ}$ ist ein von Konusschnecken produziertes Peptidtoxin. Es gehört zur M-Superfamilie der Conotoxine (Heng et al., 1999, Chen et al., 2010). $\kappa\text{M-RIIIJ}$ bewirkt eine reversible Hemmung insbesondere spannungsabhängiger heteromerer $K_V1.2$ - $K_V1.x$ -Kaliumkanäle (Chen et al., 2010, Cordeiro et al., 2019). Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure Lysin an neunter Stelle der Aminosäuresequenz für die deutlich höhere Bindungsaffinität von $\kappa\text{M-RIIIJ}$ zu $K_V1.2$ im Vergleich zu anderen Conotoxinen (z.B. $\kappa\text{M-RIIIK}$) verantwortlich ist (Chen et al., 2010).

1.5. Wissenschaftliche Fragestellung

Ziel des Projektes war die Beantwortung folgender Fragen:

1. Welche a) elektrophysiologischen und b) morphologischen Veränderungen in murinen hippocampalen und kortikalen Neuronen können bei Überexpression von $K_v1.2$ -Kanälen durch transiente Transfektionen beobachtet werden (WT vs. GOF- und LOF-Varianten)?
2. Ist eine Intervention der ggfs. pathogenen Effekte der o.g. $K_v1.2$ -Varianten durch selektive Ionenkanalblocker möglich?

2. Material und Methoden

Die Nummer der Mitteilung für die Tierexperimente nach §4 lautet N12/20M.

Die Herstellerempfehlungen zum sicheren Gebrauch, zur Lagerung und Entsorgung aller Chemikalien, Toxine, Puffer sowie Antikörper wurden eingehalten.

2.1. Reagenzien und Lösungen

2.1.1. Chemikalien und Toxine

Tabelle 1: im Rahmen der Experimente verwendete Toxine

Toxin	Zielstruktur (target)	Konzentration (nM)	Verdünnung (stock sol.)	Katalognummer	Hersteller
4-Aminopyridine (4-AP)	K _v 1-/ K _v 3-/ Familie	1x 10 ⁵	1 M	A78403	Sigma Aldrich
Tityustoxine (TsTx- K _α)	spezif. K _v 1.2	10 bzw. 20	1 μM	39465-37-7	Alomone labs
Conotoxin κM-R111J	spezif. K _v 1.2	75 bzw. 150	1 μM	STC-660	Alomone labs
Stauroporine	unspezif. Proteinkinasen	100	100 μM	CAS 62996-74-1	Sigma Aldrich

2.1.2. Medien

Tabelle 2: in Zellkultur verwendete Medien

Medium	Spezifikation
DMEM ⁺	5 ml FCS + 250 μl P/S
Ham's F12 ⁺ (CHOs)	5 ml FCS
Neurobasal (NB)-Medium (Neurone)	100l μP/S

2.1.3. Lösungen für Patch Clamp-Untersuchungen an Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen

Tabelle 3: Intrazellulärlösung für Messungen an CHO Zellen

<i>Intrazellulärlösung</i>		
Chemikalien	Konzentration (mM)	g/100 ml
KF	90	0,52
KCl	10	0,08
CaCl ₂ *2H ₂ O	1	0,01
MgCl ₂ 6H ₂ O	1	0,02
EGTA	11	0,42
HEPES	10	0,24
Na ₂ ATP	2	0,11
pH 7,4 mit KOH		

300 mOsm

Tabelle 4: Extrazellulärlösung für Messungen an CHO Zellen

<i>Extrazellulärlösung</i>		
Chemikalien	Konzentration (mM)	g/1000 ml
NaCl	135	7,89
KCl	5	0,37
CaCl ₂	2	0,29
MgCl ₂	2	0,41
HEPES	5	1,19
Glucose	10	1,80
pH 7,4 mit NaOH		
310mOsm		

2.1.4. Lösungen für Patch Clamp-Experimente an murinen Neuronen

Tabelle 5: Intrazellulärlösung für Messungen an murinen Neuronen

<i>Intrazellulärlösung</i>			
Chemikalien	Mol Masse (g/mol)	Konzentration (mM)	g/50 ml
K gluconate	234,25	135	1,58
NaCl	58,44	4	0,012
CaCl ₂	Stock 1000mM	0,5	22,72µl
HEPES	238,31	10	0,12
EGTA	380,4	5	0,1
Mg-ATP	507,18	2	0,05
GTP-Na	523,18	0,4	0,01
Biocytin	20%		0,1
pH 7,3 mit KOH			
300 mOsm			

Tabelle 6: Extrazellulärlösung für Messungen an murinen Neuronen

<i>Extrazellulärlösung</i>			
Chemikalien	Osmolarität	Konzentration (mM)	g/500 ml
NaCl	280	140	4,09
KCl	8,4	4,2	0,16
CaCl ₂	3,3	1,1	0,06
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2	1	0,12
Na ₂ HPO ₄	1,5	0,5	0,04
NaH ₂ PO ₄	1	0,45	0,03
HEPES	5	5	0,6

Glucose		10	0,9
pH 7,3 mit NaOH			
300mOsm			

2.1.5. Antikörper (Immunzytochemie mit Fluorophoren)

Tabelle 7: Verwendete Antikörper für immunzytochemische Färbungen

Antikörper	Host	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
DAPI		1:5000	D9542	Sigma Aldrich
Caspase 3	rabbit	1:400	#9661	Cell Signaling Technology
Streptavidin Cy3		1:1000	CAS S6402-1ML	Sigma Aldrich
MAP2	chicken	1:2000	ab5392	Abcam
Alexa 647	Goat anti Chicken	1:500	A-21449	ThermoFisher
Alexa 568	Goat anti Rabbit	1:500	A-11011	ThermoFisher

2.1.6. Färbungen

Tabelle 8: Weitere Materialien für immunzytochemische Färbungen

	Katalognummer	Hersteller
Fluormount- G	0100-01	SouthernBiotech
Nagellack		
SuperFrost Objektträger	H867.1	Carl ROTH

2.2. Molekulare und zellbiologische Methoden

2.2.1. Mutagenese

Die Mutagenese der humanen Kv1.2 cDNA zum Einbau der GOF- und LOF-Varianten wurde von anderen Mitarbeitern des Labors vor Beginn dieser Arbeit bereits durchgeführt (Syrbe et al. 2015). Das Konstrukt mit der humanen Kv1.2 cDNA im pcDNA3.1-Vektor wurde freundlicherweise von Stephan Grissmer (Universität Ulm) zur Verfügung gestellt und von Mahmoud Koko in ein pIRES-acGFP-Konstrukt umklontiert. Die Kv1.1 cDNA (NM_00217.3, Lotnummer: 740024-1641/C75500, Gene Script BioTech Corporation, Niederlande) wurde ebenfalls mit dem o.g. pIRES-acGFP-Konstrukt von M. Koko kloniert. Kv1.4 cDNA stammte ebenfalls von Gene-Script (GeneScript, NM_002233.4, 740024-1649/C79953) und wurde ebenso von M. Koko mit dem pIRES-acGFP-Konstrukt kloniert.

2.2.2. Zellkultur

2.2.2.1. Subkultivierung und Erhaltung einer CHO Zelllinie

CHO Zellen epithelialen Ursprungs entstammen Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters (Puck, 1958). Wegen der minimalen Expression endogener Kaliumkanäle eignen sich CHO Zellen für experimentelle Studien zur heterologen Expression und funktionellen Charakterisierung von Kaliumionenkanälen mit der Patch Clamp Technik (Gamper et al., 2005). Es wurden standardisierte Zellkulturprotokolle für adhärenente Zelllinien verwendet (Kruger et al., 2022). Die Kultivierung der CHO Zellen erfolgte bei Passage 7 in sterilen T25 Flaschen (25 ml) bei 37°C in kontrollierter 5% CO₂-Atmosphäre (Zellinkubator IG 150, Jouan, Unterhachingen, Deutschland). Je nach Zellwachstum wurde die CHO- Zellkultur ein- bis zweimal pro Woche passagiert und es wurden Subkulturen angelegt. Durch vorsichtiges Waschen der Zellen vor der Passage mit Ca²⁺-/Mg²⁺-freier phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, PAA, H15-002) wurden die Zellen von verbliebenen fetalen Kälberserum (FCS, Biochrom; Lot: 616)-Spuren gereinigt sowie Trypsin (2,5% Endkonzentration, Gibco CAS 15090-046; Thermo Fisher Scientific) reduziert (<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/subc-culture-of-adherent.html>). Die Zellen wurden 2-10 min bei 37°C in 1 ml Trypsin suspendiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellablösung vom T25-Flaschenboden wurde die Trypsinwirkung durch Zugabe des FCS-haltigen F12⁺-Mediums terminiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer Zählkammer eingesetzt. In eine neue T25-Flasche mit 5 ml Medium wurden 200.000 Zellen ausgesät. Der Medienwechsel erfolgte jeden zweiten Tag gemäß Kruger et al. (2022). CHO Zellen wurden maximal bis Passage 20 für Experimente verwendet.

2.2.2.2. Subkultivierung von primären murinen Neuronen

Um das Kontaminationsrisiko möglichst gering zu halten und um die Patch Clamp-Untersuchungen im weiteren Verlauf der Experimente durchführen zu können, wurden die Neurone nicht direkt in die 24-well Platten ausgesetzt. Stattdessen erfolgte das Aussetzen der Neurone auf Deckgläser mit 12 mm Durchmesser. Die Aufbereitung dieser Deckgläser erfolgte durch dreimalige Waschung auf der Schüttelplatte für mindestens 5 Minuten, einmal mit H₂O, einmal mit 75% Ethanol (AppliChem Panreac, A1613,2500PE), und einmal mit Aceton (Carl Roth, HN40.2).

Vorbereitend für die Kultivierung der Neurone wurden Deckgläser mit 12 mm Durchmesser (VWR; ECN 631-1578) in eine 24-well Platte (Greiner, 662160) gelegt, mit 500 µl poly-D-lysine (PDL, Sigma, P6282, 0,1mg/ml) bedeckt und für mindestens 12 h im Kühlraum (bei 4°C) belassen. Im Verlauf wurden die Deckgläser mit jeweils 500 µl sterilem PBS Ca²⁺/Mg²⁺ (PAA, H15-001) gewaschen und für 20 Minuten unter UV-Licht sterilisiert und getrocknet. Nach Hinzugeben von 500 µl DMEM⁺ (Thermo Fisher Scientific, CAS 11330-032) wurden die Platten im Inkubator gelagert.

Gemäß Hedrich et al. (2014) wurde die trächtige C57BL/6NCrl-Maus am 18. Tag der Trächtigkeit von wissenschaftlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe unter dem Abzug mit CO₂ betäubt und dann durch zervikale Dislokation getötet. Danach wurden die Embryos einzeln aus dem Uterus entfernt und sofort nach Entnahme durch Dekapitation getötet. Das Gehirn wurde bis zur Präparation in Hanks-Buffer auf Eis gelegt. Bei der Präparation wurden Kortex und Hippocampus isoliert. Die Vereinzelnung der Neurone erfolgte mittels Trypsin 2,5% (CAS 15090-046, Thermo Fisher Scientific) sowie einer 14-minütigen Inkubation bei 37°C. Um das Trypsin rückstandslos zu entfernen, wurden die Neurone drei bis fünf Mal mit DMEM⁺ gewaschen. Nach Filtration mittels Rotilabo 0.45µm Syringe Filter (Roth, P665.1) wurden die Neurone in der Neubauer Zählkammer gezählt. Es wurden 80.000 Neurone/well in einer 24-well Platte ausgesetzt. Nach vier Stunden waren die Neurone adhären. Nun erfolgte der Mediumwechsel zu Neurobasal⁺ (NB, Thermo Fisher Scientific, CAS 21103-049). Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt.

2.3. Langzeitbehandlung mit K_v1.2-Kanalblockern

Die Langzeitbehandlung der murinen hippokampalen und kortikalen neuronalen Primärkulturen erfolgte ab dem 4. Tag nach Beginn der Kultivierung (*Days in vitro* (DIV) 4). Die entsprechenden Kanalblocker-Konzentrationen sind Tabelle 9 zu entnehmen. Der jeweilige Kanalblocker wurde in 500 µl NB-Medium pipettiert und gevortext (RS-VA10 vortex, Phoenix Instruments, Garbsen, Deutschland). Der Mediumwechsel inklusive enthaltenem Ionenkanalblocker erfolgte alle 48 h. Ab DIV 15 wurde die Langzeitbehandlung beendet. Nach Beendigung der Langzeitbehandlung wurde das gelöste Toxin mit dem Nährmedium aus den Wells abgesaugt. Durch vorsichtiges Schwenken der mit frischem Nährmedium bestückten Platte wurden die Toxinrückstände ausgewaschen. Danach wurden die Wells mit neuem Nährmedium befüllt.

Je nach Kv1.2-Variante konnten deutliche Unterschiede der überlebenden Zellen festgestellt werden: bei DIV 22-24 waren bereits alle Kv1.2 LOF-transfizierten Neurone tot. Aus diesem Grund wurde DIV 17-19 bei dieser Neuronengruppe als der späteste Analysezeitraum festgelegt. Aufgrund der fehlenden Vergleichbarkeit aufgrund von unterschiedlichen Analysezeitpunkten wurden die Daten der Kv1.2 LOF-Variante in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Nach den Patch Clamp-Messungen erfolgte eine zehnmünütige Fixierung der Zellen in Formaldehyd (CAS 50-00-0, Merck). Danach wurden die Neurone zwei Mal mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen. Im Anschluss wurden die fixierten Neurone im Kühlraum bei 4°C gelagert.

Tabelle 9: bei Langzeitbehandlung muriner neuronaler Primärkulturen verwendete Toxinkonzentrationen

Kanalblocker/ Toxin	Tityustoxin (TsTx- K α)	Conotoxin κ M-R111J	4-Aminopyridin (4- AP)
Konzentration	10 bzw. 20 nM	75 bzw. 150 nM	100 μ M

2.4. Transfektion und Transduktion

Im Rahmen des Projekts wurde die chemische Transfektion mittels Lipofektion (Optifect) und kationischen Polymeren (Polyethylenimine, PEI) durchgeführt (Tae Kyung Kim, 2010). Im Verlauf des Projekts wurde außerdem die virale Transduktion angewendet.

2.4.1. Transiente Transfektion von Kv1.2 cDNA in CHO Zellen

Ein Transfektionsreagenz bestehend aus 250 μ l Gibco™ Opti-MEM™ (ThermoFischer Scientific) und Polyethylenimine™ (PEI, Sigma-Aldrich) wurde in einer Ratio von 1:3 zur cDNA (1 μ g cDNA : 3 μ l PEI) pipettiert. Nach 5 Minuten wurde 1 μ g cDNA hinzugegeben. In den folgenden 20 Minuten kondensierte das PEI die cDNA in positiv geladene Partikel, die an anionische Zelloberflächen binden. Die fertige Transfektionslösung wurde auf die zu transfizierenden Zellen in eine Petrischale (Greiner Bio-One GmbH) getropft und durch Endozytose wurde die cDNA in die Zellen aufgenommen (Longo et al., 2013). Die Transfektion wurde nach 24 Stunden durch einen Mediumwechsel terminiert. Die Transfektion von Kv1.1- (Gene Script) und Kv1.4-homomerer cDNA (Gene Script) erfolgte nach demselben Transfektionsprotokoll.

Zunächst wurde die Transfektion mit Hilfe eines pIRES-KCNA2-AcGFP-WT-Konstruktes (Cytomegalievirus (CMV)-Promotor) durchgeführt. Der in 2.2.1. beschriebene pcDNA3.1 Vektor des humanen K_v1.2 Kanals wurde als Grundlage für die Transfektion in allen Experimenten verwendet. Die eGFP-Expression war nicht effizient genug, sodass stattdessen ein CBIG-eGFP-WT-Konstrukt (CAG-Promotor) verwendet wurde. Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von JD Macklis, Harvard Medical School, zur Verfügung gestellt. Bei dem CAG-Promotor handelt es sich um einen synthetisch hergestellten Promotor auf Basis eines Cytomegalievirus-Enhancers, der mit einem β -Aktin-Promotor (Huhn) fusioniert wurde (Alexopoulou et al., 2008, Dou et al., 2021). Nach 48 bis 72 h konnten bei erfolgreicher Transfektion grün fluoreszierende Zellen mikroskopisch nachgewiesen werden (=Transfektionskontrolle).

2.4.2. Transiente Transfektion von K_v1.2 WT/LOF/GOF-cDNA in murinen primären Neuronen

Ein Transfektionsreagenz bestehend aus 100 μ l Gibco™ Opti-MEM™ (Fischer Scientific) und Optifect™ Transfektionsreagenz (ThermoFischerScientific) wurde wie unter 1.2.3.1 durchgeführt, aber mit einer Ratio von 1:4 zur DNA pipettiert (Liu et al., 2003). Die fertige Transfektionslösung wurde im Anschluss langsam auf die zu transfizierenden Neurone pipettiert. Die Transfektionsreaktion wurde 12 h nach Transfektionsbeginn durch einen Mediumwechsel beendet. Die Transfektion mit P405L-cDNA (LOF-Variante, zukünftig kurz P405L genannt) und R297Q-cDNA (GOF-Variante, zukünftig kurz R297Q genannt) erfolgte nach dem gleichen Protokoll. Im Verlauf der Experimente wurden insgesamt 10 verschiedene hippokampale Neuronenkulturen angelegt.

Bei der Transfektion des humanen K_v1.2-Kanals muriner primärer Neuronenkulturen wurde ebenfalls der pcDNA3.1 Vektor von S. Grissmer, Universität Ulm, sowie das CBIG-eGFP-WT/R297Q-Konstrukt von JD Macklis, Harvard Medical School, verwendet. Bei den P405L-Experimenten wurden sowohl ein pIRES-KCNA2-AcGFP-P405L-Konstrukt (CMV-Promotor) als auch ein CBIG-eGFP-P405L-Konstrukt (CAG-Promotor) verwendet.

Nach 48 bis 72 h konnten bei erfolgreicher Transfektion grün fluoreszierende Zellen mikroskopisch nachgewiesen werden (=Transfektionskontrolle).

2.4.3. Virale Transduktion in primären murinen Neuronen

Bereits vor Beginn des Projekts im Labor hergestellte Adeno-assoziierte Viren (AAV) als Träger von Kv1.2 WT- bzw. R297Q- oder P405L-cDNA, sind für die Transduktion verwendet worden (AAV8-hSyn-KCNA2-WT-T2A-EGFP bzw. AAV8-hSyn-KCNA2-R297Q-T2A-EGFP bzw. AAV8-hSyn-KCNA2-P405L-T2A-EGFP) (Hedrich et al., 2021). In 500 μ l NB- Medium wurden 0,2 μ l Virus mit WT-/GOF- bzw. LOF-cDNA direkt nach dem Auftauen pipettiert. Dies entsprach einem Titer von $8,3 \times 10^{12}$ viralen Genomen/ml bei Kv1.2 WT bzw. $3,1 \times 10^{12}$ viralen Genomen/ml bei Kv1.2 GOF (Hedrich et al., 2021). Im Verlauf der Experimente wurden insgesamt 10 verschiedene kortikale Neuronenkulturen angelegt.

Aufgrund der Integration in das Wirtsgenom, ist die virale Transduktion gekennzeichnet durch eine hohe Effizienz und eine stetige Expression im Sinne einer stabilen Transfektion (Kim and Eberwine, 2010).

2.5. Elektrophysiologie

2.5.1. Experimentelles Vorgehen und Setup

Die Intrazellulärlösungen wurden bei -20°C gelagert und zum Auftauen auf Eis gelegt. Die Extrazellulärlösungen wurden im Kühlraum bei 4°C gelagert. Bei Membranstabilität der gepatchten Neurone wurde die Osmolarität der Extrazellulärlösung kontrolliert (Osmometer; Löser Messtechnik; Berlin, Germany).

Für die elektrophysiologischen Ableitungen wurde ein Zeiss Mikroskop (Vert.A1 Axio microscope, Zeiss, Stuttgart, Germany) verwendet. Die Messungen wurden mit Hilfe eines Axopatch 200B Amplifiers (Axon Instruments, San Jose, CA, USA), des Axon Digidata 1550B Digitizers (Axon Instruments, San Jose, CA, USA) und Clampex 11 Software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) aufgezeichnet. Bei den Patch Clamp-Messungen der CHO Zellen wurde der Lowpass-Filter auf 2 kHz eingestellt und eine automatische Subtraktion von Leck-Strömen durchgeführt. Die Sampling Rate bei den Patch Clamp-Messungen der CHO Zellen betrug 5 kHz. Bei den Neuronen wurden die Messungen bei 10 kHz gefiltert und bei 100 kHz gesampelt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden einzelne, vitale, transfizierte Neurone ausgewählt. Avitale oder membrangeschädigte transfizierte Neurone zeigten sich unter Fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle als grün gepunktet. Bei Einführung der Elektrodenpipette in die Extrazellulärlösung wurde ein positiver Druck eingestellt und der Pipettenwiderstand gemessen. Dies verhinderte, dass die Pipettenspitze verstopfte. Dieser

sollte bei Messungen an CHO Zellen 2-3 M Ω und bei solchen an murinen Neuronen 4-5 M Ω betragen. Die durch Diffusion von Kationen und Anionen zwischen Intra- und Extrazellulärlösung entstandenen Leck-Ströme (Liquid Junction Potential, kurz LJP) wurden nach der Nernst-Planck-Gleichung mittels LJPcalc Software (<https://swharden.com/LJPcalc>) berechnet (Marino et al., 2014) und betragen +5,5 mV bei den Patch Clamp-Messungen der CHO Zellen bzw. +17 mV bei den Neuronen. In allen hier in dieser Arbeit aufgeführten Daten wurden die Leck-Ströme nicht korrigiert. Bei Annäherung an die Zielzelle konnte eine kleine Eindellung der Zellmembran beobachtet werden. Sobald diese Delle sichtbar wurde, wurde der bestehende Überdruck aufgelöst. Hierbei konnte eine leichte Erhöhung des Pipettenwiderstandes gemessen werden. Daraufhin wurde ein Unterdruck angelegt, der zur Ausbildung eines sogenannten Gigaseals führte. Das Gigaseal beschreibt den sprunghaften Anstieg des Widerstandes zwischen Pipettenspitze und Zellmembran in Bereichen von MegaOhm (M Ω) zu GigaOhm (G Ω). Hierauf folgte eine unmittelbare Kompensation der Pipettenkapazität. Als nächstes wurde kurzzeitig Sog auf die Zellmembran ausgeübt. Dies führte zum Einreißen der Zellmembran unterhalb der Pipettenspitze und einem Austausch von Zytoplasma und Intrazellularflüssigkeit. Unmittelbar nach Erreichen dieser sog. Whole Cell Konfiguration, wurden folgende Parameter gemessen: Membrankapazität (Cm), Membranwiderstand (Rm), Leckage (leak) und der Pipettenwiderstand (access resistance (Ra)). Daraufhin wurde eine 80%ige Kompensation des Serienwiderstands vorgenommen. Entsprechend der unterschiedlichen experimentellen Fragestellungen und unterschiedlichen verwendeten Zelltypen (CHO Zellen vs. murine Neurone), wurden verschiedene Patch Clamp-Techniken und -Protokolle verwendet. Das Haltepotential („holding potential“) betrug -90 mV bei den CHO Zellen. Bei den Neuronen wurde im Current Clamp-Modus ein Haltestrom eingestellt, sodass das Membranpotential ca. -70 mV betrug. Wenn die Leckage mehr als 150 pA oder mehr als 10% des Maximalstromes betrug, wurde die CHO Zelle im Rahmen der Datenanalyse nicht verwendet. Bei den Neuronen wurden bei der Datenanalyse nur Zellen mit einer Leckage kleiner als 150 pA berücksichtigt.

2.5.2. Glaselektroden

Zur Messung von transfizierten CHO Zellen wurden Glaselektroden mit 2-3 M Ω Pipettenwiderstand mit dem Mikropipette Puller (P-97 flaming/brown micropipette puller, Sutter Instruments) gezogen. Hierfür wurden Glaskapillaren GB150F-8P

(Science Products) verwendet. Für die Neurone wurden Glaselektroden mit 4-5 M Ω Pipettenwiderstand gezogen. Anschließend wurden die Spitzen der Glaspipetten unter einem Mikroskop (Micro-forge MF-79 microscope, Narishige Japan) auf die passende Größe und auf Glasschäden kontrolliert.

2.5.3. „Whole Cell Patch Clamp“-Messungen

2.5.3.1. Whole Cell Patch Clamp-Messungen an CHO Zellen

Die CHO Zellen wurden unter Verwendung von Accutase (Sigma Aldrich) in Petrischalen (Greiner Bio-One GmbH) ausgesetzt, da im Vergleich zu Patch Clamp-Messungen nach Verwendung von Trypsin kleinere Ströme gemessen wurden. Nach mikroskopischer Bestätigung, dass sich die CHO Zellen am Boden der Petrischale abgesetzt hatten, konnte mit den elektrophysiologischen Ableitungen begonnen werden.

Zunächst wurde das Messprotokoll (siehe 2.5.4.1.) einmal aufgezeichnet (prä Toxin-Messung). Dann wurde der Kanalblocker vorsichtig in der entsprechenden Konzentration in die Petrischale (Greiner Bio-One GmbH) pipettiert. Daraufhin wurde mit Hilfe einer Spritze dreimal über eine kleine Glaselektrode die Extrazellulärflüssigkeit in Bewegung versetzt, um eine rasche und möglichst gleichmäßige Verteilung der Kanalblocker zu begünstigen. Nach einer Wartezeit von 5 min wurde das Messprotokoll zum zweiten Mal aufgezeichnet (post Toxin-Messung).

2.5.3.2. Whole Cell Patch Clamp-Messungen an primären murinen Neuronen

Mithilfe von zwei chirurgischen Pinzetten wurde das Deckglas vorsichtig mit einer Pinzette aus der 24-well Platte herausgehoben und in eine Petrischale mit Extrazellulärlösung transferiert. Dabei war zu beachten, dass das Deckglas intakt blieb und nicht zu schnell aus der Platte herausgehoben wurde, sodass die Neurone sich nicht von der Oberfläche des Deckgläschens ablösten.

Die Messungen vor und nach der Applikation der Kanalblocker erfolgten wie unter 2.3.3.1. beschrieben.

2.5.4. Patch Clamp-Protokolle und Datenanalyse

Sämtliche verwendete Protokolle waren bereits im Labor etabliert und werden in den folgenden Abschnitten der Arbeit genauer beschrieben (Hedrich et al., 2021).

2.5.4.1. Voltage Clamp-Protokolle

Bei einer Voltage Clamp Messung wird der elektrische Strom, der durch einen Ioneneinstrom in die Zelle, oder einen Ionenausstrom aus der Zelle verursacht wird, bei konstant gehaltener/geklemmter Spannung (deshalb ‚voltage-clamp‘) aufgezeichnet (Perkins, 2006).

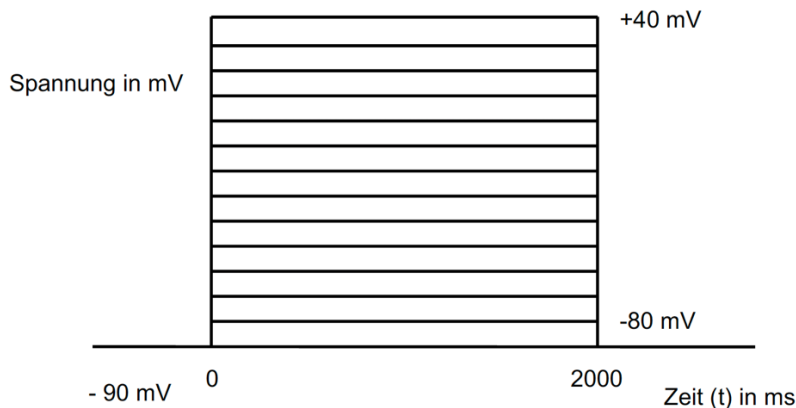


Abbildung 2: Voltage Clamp-Messprotokoll für CHO Zellen zur Messung des K⁺ Stroms.

Gestartet wurde mit einer Spannung von -90 mV (holding potential), dann Erhöhung der Spannung um 10 mV auf eine Zielspannung von +40 mV. Das Zeitintervall der angelegten Spannung betrug jeweils 2 s.

Beim Messprotokoll wurde eine Spannung von -90 mV („holding potential“) angelegt. Im Protokollverlauf wurden 15 verschiedene Spannungen über 2 s angelegt. Begonnen wurde mit -80 mV. Pro Durchlauf wurde die Spannung um ein Delta von 10 mV erhöht, bis eine Spannung von +40 mV erreicht wurde.

2.5.4.2. Current Clamp-Protokolle

Bei der Current Clamp-Methode wurde ein elektrischer Strom an der Zellmembran injiziert. Dies bewirkt eine (intrinsische) Aktivierung der Ionenkanäle in der Zellmembran. Die dadurch verursachten Veränderungen des Membranpotentials (=elektrische Spannung) werden aufgezeichnet (Perkins, 2006). Geeignet ist diese Patch Clamp-Methode vor allem für die Untersuchung von Aktionspotentialen und synaptischen Potentialen (Perkins, 2006).

Zuerst wurde das Ruhemembranpotential (RMP) des Neurons über 2 Minuten gemessen, ohne dass ein Strom injiziert wurde.

Wie in Abbildung 3 gezeigt, wurde im Rahmen des nächsten Messprotokolls eine episodische Stimulation des gepatchten Neurons in 11 Messdurchläufen mit jeweils 500 ms Laufzeit aufgezeichnet. Zu Beginn wurde ein Strom von $-0,01$ nA injiziert. Pro Durchlauf wurde der Strom in Schritten von $-0,01$ nA verändert, bis zum Erreichen von $-0,11$ nA. Bei jedem der 11 Messdurchläufe wurde die Änderung des Membranpotentials (Spannung U) in mV aufgezeichnet. Mit den gemessenen Werten konnte der Eingangswiderstand (eng.: Input Resistance, kurz IR) die Steigung berechnet werden. Zwischen den einzelnen Messdurchläufen lag ein fest definiertes Zeitintervall von 5 ms.

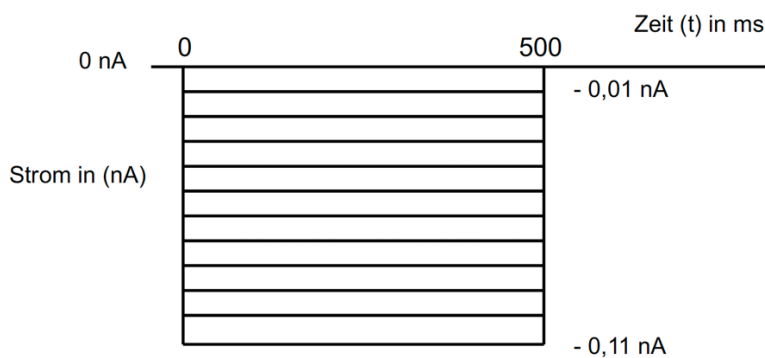


Abbildung 3: Current Clamp-Messprotokoll zur Messung von Spannungsänderungen.

Gestartet wurde mit einem injizierten Strom (Zeitintervall 500 ms) von $-0,01$ nA, dann Reduktion des Stroms um $-0,01$ nA bis zum Erreichen $-0,11$ nA. Die aufgezeichneten Spannungsänderungen der Nervenzellmembran wurden verwendet zur Berechnung des Eingangswiderstandes.

Im nächsten Current Clamp-Messprotokoll wurden, wie in Abbildung 4 dargestellt, in 12 Schritten mit unterschiedlichen Strominjektionen alle gemessenen Spannungen bzw. (wenn vorhanden) alle generierten Aktionspotentiale aufgezeichnet. Anfangs wurde ein Strom von $-0,05$ nA injiziert. Im Verlauf wurde der Strom um ein Delta von $0,025$ nA mit einer Laufzeit von 800 ms erhöht, bis der Zielstrom von $+0,225$ nA erreicht wurde. Die einzelnen Messdurchläufe wurden durch ein fest definiertes Zeitintervall von 5 ms unterbrochen.

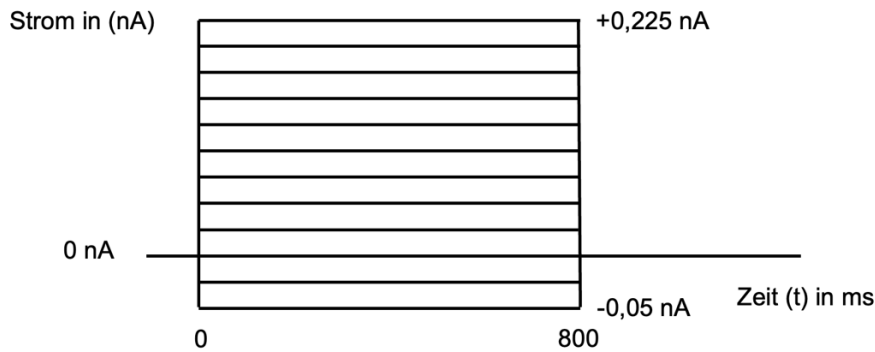


Abbildung 4: Current Clamp-Messprotokoll zur Aufzeichnung von Aktionspotentialen.

Gestartet wurde mit einem Strom von $-0,05$ nA, dann Erhöhung des Stroms um jeweils $0,025$ nA bis zum Erreichen von $+0,3$ nA. Das Zeitintervall des injizierten Stroms betrug jeweils 800 ms.

2.6. Imaging mittels Fluoreszenz-Mikroskop

Es wurden mikroskopische Bilder der GFP-fluoreszierenden Neurone mittels Fluoreszenzmikroskopie (Prior Mikroskop, Model Typ HP2085, Prior Scientific Instruments GmbH, Maria-Pawlowna- Str. 4, Jena, Germany) gewonnen. Um eine Vergleichbarkeit der mikroskopischen Bilder zu gewährleisten, wurden folgende einheitliche Mikroskopeinstellungen verwendet: Binning: 1×1 , exposure time: 100 ms bei einer $40 \times$ Vergrößerung. Die Pixelgröße wurde mittels Excel errechnet und betrug $0,16125$ μm . Eine 20% -ige Überlappung der aufgenommenen Bilder wurde manuell eingestellt, wodurch im Verlauf ein Zusammenfügen der Bilder ohne Verlust von Bildabschnitten ermöglicht wurde. Die einzelnen Bildabschnitte wurden links oben beginnend Spalte für Spalte aufgenommen (Abbildung 5 A).

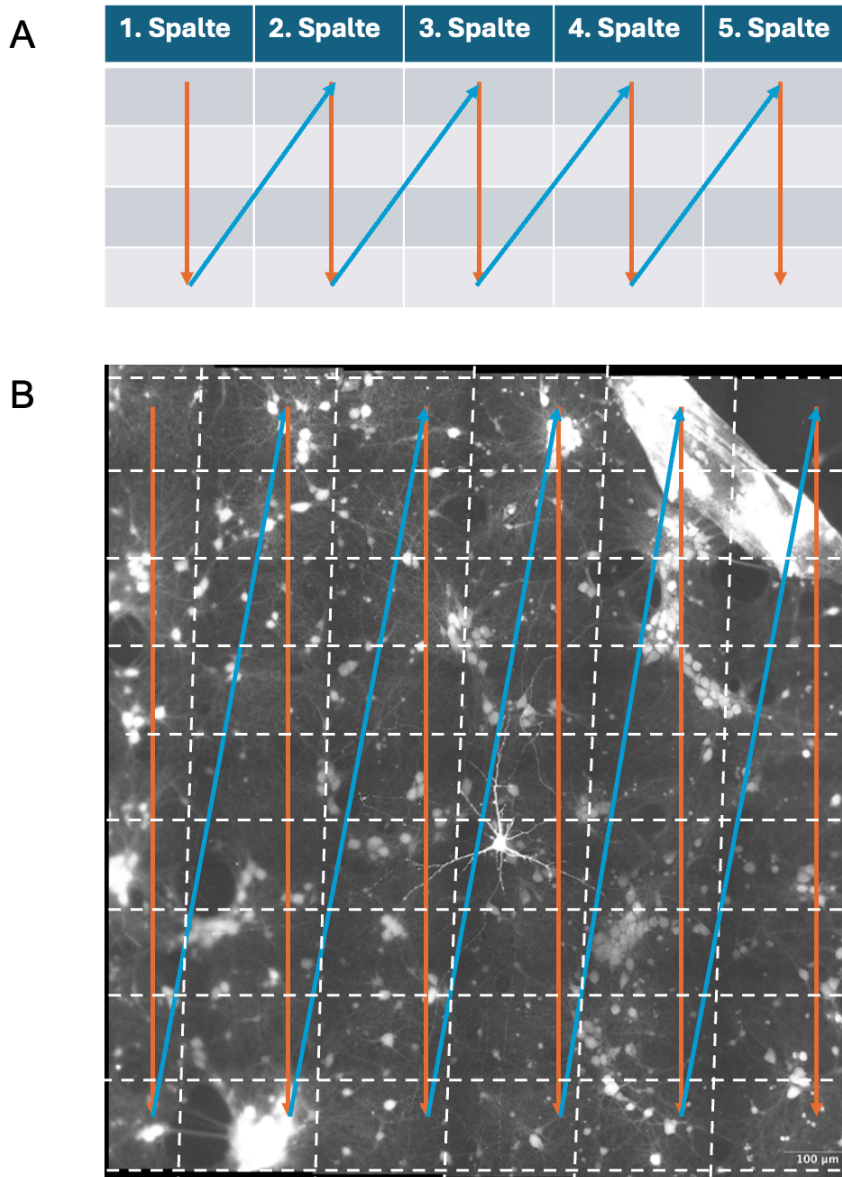


Abbildung 5: Bildreihenfolge

(A) Die einzelne Bildabschnitte wurden links oben beginnend, Spalte für Spalte aufgenommen und im Imagebearbeitungsprogramm Fiji (B) in identischer Reihenfolge wieder zusammengefügt.

2.7. Imagebearbeitung mittels FIJI/ ImageJ Software

Für die detaillierte Darstellung und Rekonstruktion der dendritischen Verzweigungen wurde eine 40x Vergrößerung verwendet. Zudem wurde eine 20%-ige Überlappung der aufgenommenen Bilder manuell eingestellt. Hierdurch wurde im Verlauf ein Zusammenfügen der Bilder ohne Verlust von Bildabschnitten ermöglicht. Die einzelnen Bildabschnitte wurden links oben beginnend, Spalte für Spalte aufgenommen (Abbildung 5). Mithilfe des Stitching Plugins von ImageJ wurden die Bilder dann in identischer Reihenfolge zusammengefügt (Abbildung 5 B). Hiernach wurden alle Bildinformationen auf einer Bildebene komprimiert (Schindelin et al., 2012). Daraufhin

wurde der Kontrast angepasst, sodass sich die GFP-fluoreszierenden Neurone bestmöglich vom Bildhintergrund abgehoben haben und die Nervenzellrekonstruktion im Verlauf durchgeführt werden konnte.

2.8. Rekonstruktion mittels neuTube Software

Die Rekonstruktion der Images wurde semiautomatisch unter Verwendung der Software neuTube in der Mac-Version durchgeführt (Feng et al., 2015). Beispielhaft für ein Kv1.2 WT-Neuron (DIV 11) sind in der folgenden Abbildungen 6 die einzelnen Rekonstruktionsschritte dargestellt.

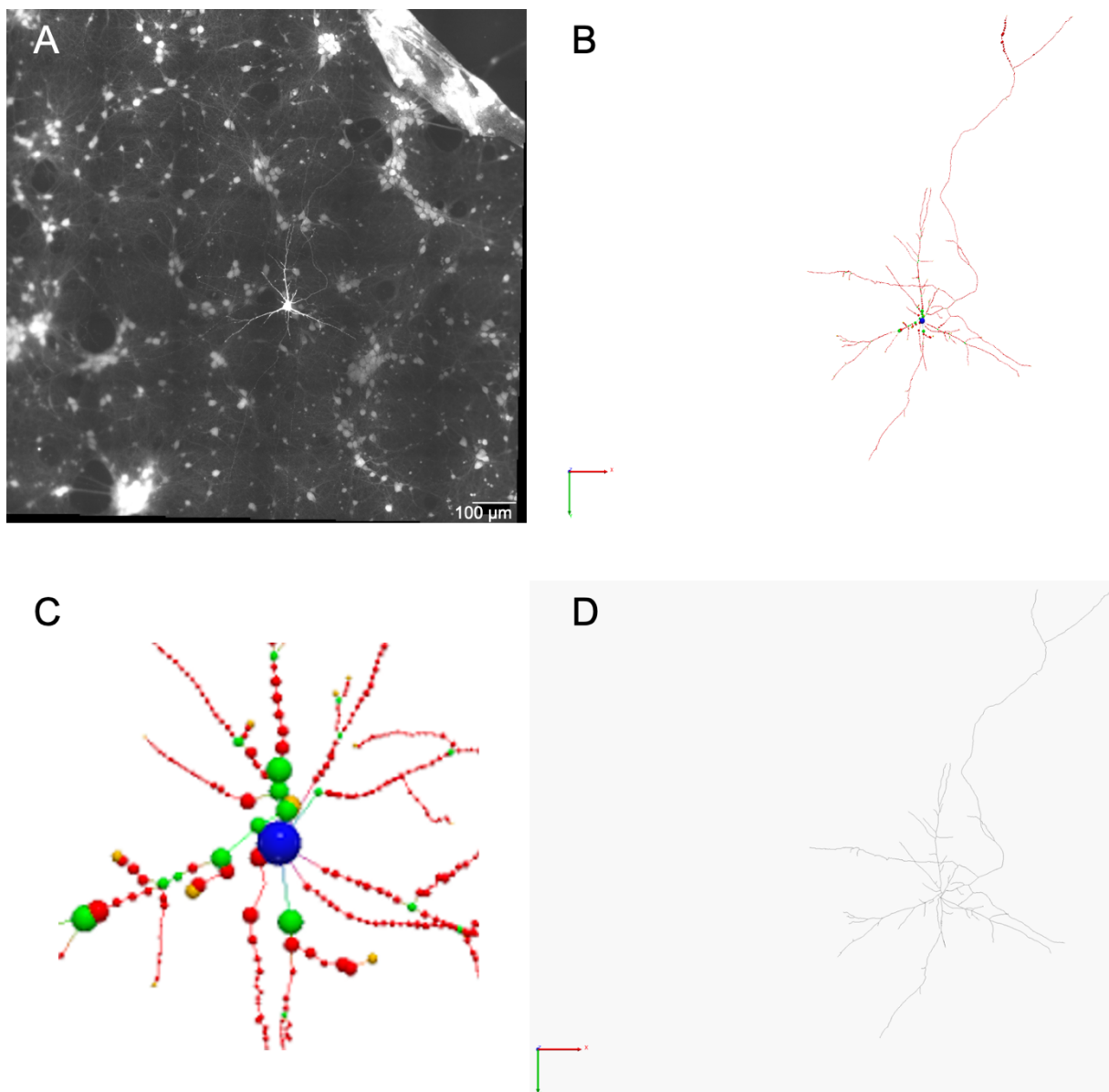


Abbildung 6: Rekonstruktion eines Neurons.

Die Größenverhältnisse in den drei Abbildungen sind identisch, die Skalierung wurde in Abbildung 6 A gezeigt. (A) zeigt das mit ImageJ spaltenweise zusammengefügte Bild eines Kv1.2 WT-transfizierten

hippokampalen Neurons (DIV 11). Die semiautomatische Rekonstruktion (B) des Neurons wurde mit Hilfe der Software neuTube durchgeführt. Der blaue Punkt entspricht dem Soma und die grünen Punkte symbolisieren neuronale Verzweigungen. Die roten Punkte symbolisieren unverzweigte Neuronenausläufer (Axon/Dendriten). Ein Zoom-In ist in (C) zu sehen. In (D) ist das Kv1.2 WT-transfizierte Neuron nach vollendeter Rekonstruktion zu sehen.

In Abbildung 6 B symbolisiert der blaue Punkt das Soma. Die grünen Punkte stehen für neuronale Verzweigungen und die roten Punkte entsprechen unverzweigten neuronalen Ausläufern (Axon/ Dendriten). Die abgeschlossene Rekonstruktion ist in Abbildung 6 D dargestellt.

2.9. Sholl Analyse

Um die Anzahl dendritischer Verzweigungen sowie die aufsummierte Neuritenlänge (Länge von Axon und allen Dendriten) bestimmen zu können, wurde eine Sholl Analyse durchgeführt.

Die Sholl Analyse erfolgte unter Verwendung von FIJI ImageJ-Programm (Version 2.3.0/1.53p; 13. September 2021, Open source image processing software) (Schindelin et al., 2012). Um Gesamtlänge und Verzweigungen der Neurone zu ermitteln, wurde ausgehend vom Soma ein radiales Raster in 10 µm Abständen verwendet. Daraufhin wurde pro Radius die Summe der dendritischen Verzweigungen ermittelt. Des Weiteren wurde die Pixelgröße der Images an die verwendete Vergrößerung des Mikroskops angepasst.

2.10. Statistik

Für die tabellarische Darstellung der erhobenen Daten wurde Excel (Microsoft Excel für Mac, Version 16.60 (22041000), Lizenz: Microsoft 365-Abonnement) verwendet. Die statistische Auswertung, als auch die graphische Darstellung der Ergebnisse, erfolgte unter Verwendung von GraphPad Prism (GraphPad Software LLC., Prism 9 for macOs, Version: 9.5.0 (525) 8. November 2022, Lizenz: students licence). Als Signifikanzniveau für die Datenanalyse wurde $p < 0,05$ festgelegt. Die Messergebnisse der Experimente wurden zusammengefasst und statistisch analysiert.

Als Grundlage für die Auswahl des statistischen Tests wurde mit Hilfe von GraphPad Prism eine Kontrolle der Normalverteilung der Daten mittels Shapiro Wilk-Test sowie eine deskriptive Analyse durchgeführt. Als nächste statistische Methode wurde die Ein- bzw. Zweifaktor (one- bzw. two-way) Varianzanalyse (Analysis of Variance, kurz

ANOVA) mit Interaktion durchgeführt. Die ANOVA wurde zum Vergleich der Mittelwerte von mindestens drei Experimentalgruppen bei normalverteilten Daten verwendet. Beim Vergleich der Toxinwirkung an unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten wurde die Zweifaktor-ANOVA durchgeführt. Bei der Auswertung von wiederholten Messungen zu einem bestimmten Zeitpunkt t wurde eine Einfaktor-ANOVA mit *Repeated Measures* (RM) verwendet. Zusätzlich wurde ein Post-hoc Vergleich nach Tukey zur Korrektur multipler Vergleiche angewendet. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde bei ≥ 3 Versuchsgruppen der Kruskal-Wallis-Test bzw. bei Messwiederholungen der Friedmann-Test (beides sog. ANOVA on Ranks-Tests) mit Post-hoc Vergleich nach Dunn verwendet. Diese ermöglichten den Vergleich aller Experimentalgruppen untereinander zur genaueren Analyse der einzelnen p-Werte. Beim Vergleich von Messungen von CHO Zellen vor und nach Zugabe des $K_v1.2$ -Blockers (maximal 2 Versuchsgruppen) wurde die „*Area under the Curve*“ (kurz: AUC) ($AUC \pm SD$) berechnet und mittels t-Test für unabhängige Stichproben mit Welch-Korrektur zur Korrektur multipler Vergleiche verglichen. Beim Vergleich von Messungen von Neuronen vor und nach Zugabe des $K_v1.2$ -Blockers bei mindestens drei Versuchsgruppen wurde die „*Area under the Curve*“ (kurz: AUC) ($AUC \pm SD$) berechnet und mittels Einfaktor-ANOVA verglichen. Die AUC berechnete sich wie folgt:

$$AUC = (x_1 + x_2) / 2 * (y_2 - y_1).$$

3. Ergebnisse

3.1. Ermittlung einer relevanten $K_V1.2$ -Kanalhemmung in CHO Zellen

Im ersten Abschnitt des Projekts wurde die Toxinwirkung zweier $K_V1.2$ -Kanalblocker (Tityustoxin und Conotoxin $\kappa M-R111J$) auf zellulärer Ebene untersucht. Hierfür wurden zunächst die Toxinkonzentrationen für die halbmaximale Hemmung des $K_V1.2$ WT Kanals in CHO Zellen bestimmt. Zusätzlich wurde die Toxinspezifität an $K_V1.2$, $K_V1.1$ und $K_V1.4$ WT-Homomeren in CHO Zellen analysiert. Die hierbei ermittelten Toxinkonzentrationen wurden im Verlauf als Ausgangskonzentrationen der Toxine für die weiteren Experimente an hippokampalen und kortikalen Neuronen verwendet. Als statistisches Mittel wurde der paired t-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Die detaillierte Durchführung der Patch Clamp-Messungen zur Untersuchung der Toxinspezifität ist unter 2.5.3.1. beschrieben. Zuerst wurde die „prä Toxin-Messung“ (1. Messung) (Abbildung 8) aufgezeichnet. Danach wurde der jeweilige Ionenkanalblocker in die Extrazellulärlösung pipettiert. Bei der Kontrollgruppe wurde kein Kanalblocker verwendet (Extrazellulärlösung = Kontrolllösung). Damit sich der $K_V1.2$ -Kanalblocker gleichmäßig in der Extrazellulärlösung verteilen konnte, wurde 5 Minuten abgewartet. Erst nach Ablauf der 5 Minuten wurde die „post Toxin-Messung“ (2. Messung) (Abbildung 8) aufgezeichnet.

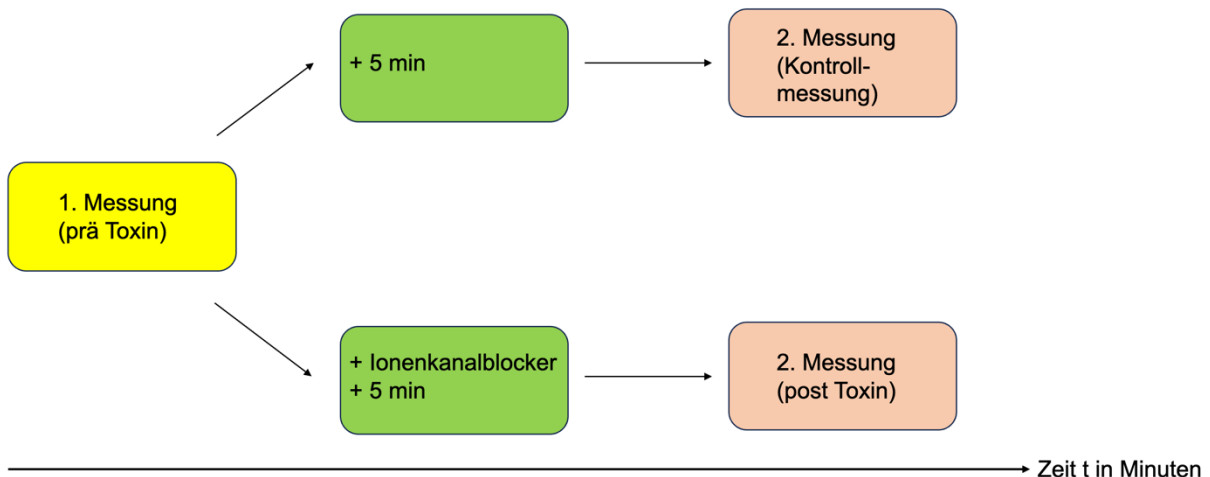


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Patch Clamp-Messungen an CHO Zellen.

3.1.1. Relevante Kanalhemmung von $K_V1.2$ WT-Homomeren in CHO Zellen

Um die Konzentration des jeweiligen Ionenkanalblockers zu bestimmen, bei der >50% der $K_V1.2$ WT-Kanäle blockiert wurden, wurde eine ca. halbmaximale Hemmkonzentration an 3-4 CHO Zellen ermittelt.

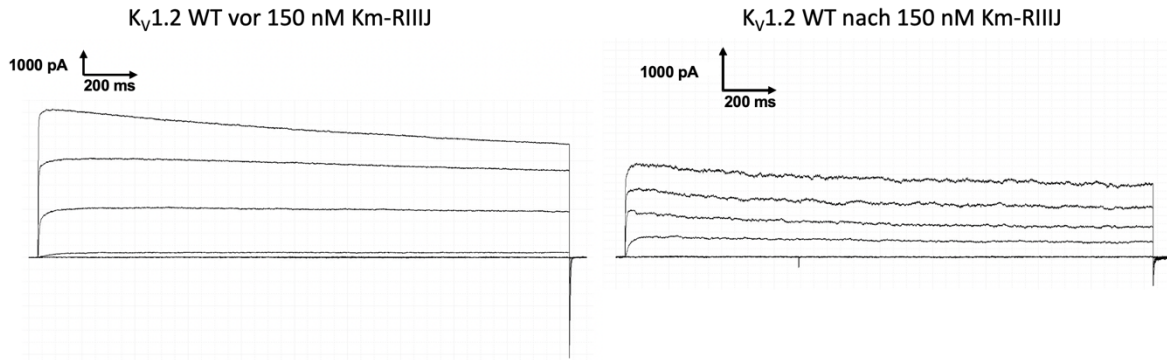
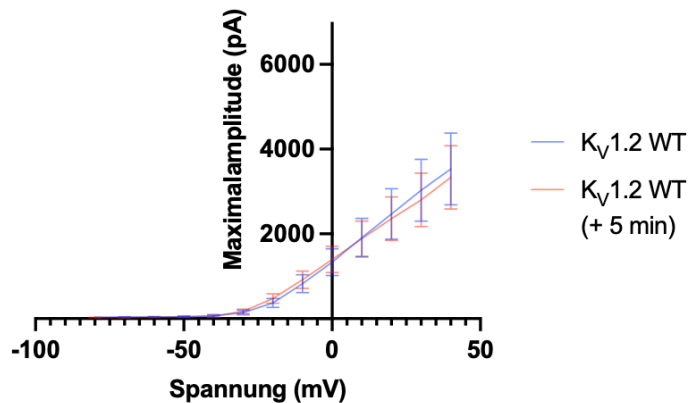


Abbildung 8: Repräsentative K^+ Ströme abgeleitet von einer $K_v1.2$ WT-transfizierten CHO Zelle vor (links) und nach (rechts) Gabe von 150 nM $\kappa M-R111J$.

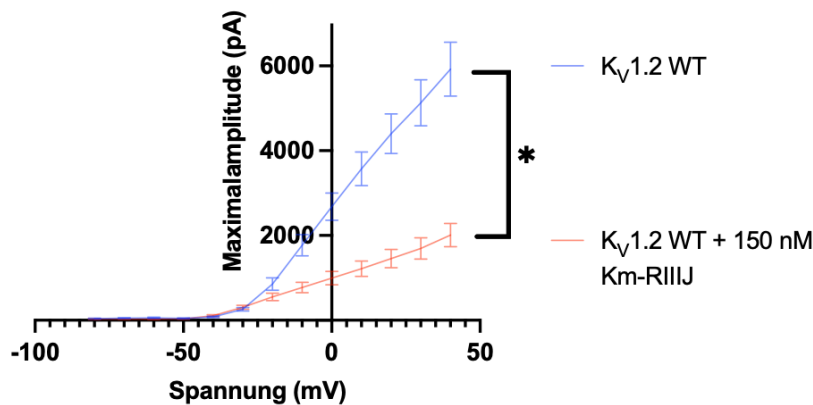
In Abbildung 9 C sind die Kontrollmessungen ohne Kanalblocker in $K_v1.2$ WT-transfizierten CHO Zellen ($n=7$) gezeigt. Hiermit konnte die Validität des Versuchsaufbaus bestätigt werden, da zwischen der ersten und zweiten Messung kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen K^+ Strömen ermittelt werden konnte ($p>0,05$). Nach Gabe von 150 nM Conotoxin $\kappa M-R111J$ konnte, wie in Abbildung 9 B gezeigt, eine statistisch signifikante Reduktion der K^+ Ströme der $K_v1.2$ WT-Kanäle um mindestens 50% bei $n=7$ CHO Zellen aufgezeichnet werden ($*p<0,05$). Exemplarisch für alle mit $K_v1.2$ WT-transfizierten CHO Zellen sind die Patch Clamp-Ableitungen einer CHO Zelle vor und nach Gabe des Ionenkanalblockers $\kappa M-R111J$ in Abbildung 8 zu sehen. Ebenso konnte für $K_v1.2$ WT-transfizierte CHO Zellen ($n=7$) nach Gabe von 20 nM Tityustoxin eine statistisch signifikante Reduktion der K^+ Ströme um 50% in den untersuchten CHO Zellen aufgezeichnet werden ($*p<0,05$). Die entsprechende Grafik ist in Abbildung 9 C zu sehen.

Für die statistische Auswertung der gemessenen K^+ Ströme wurde die AUCs aller Messpunkte berechnet und mittels paired t-Test verglichen.

A $K_v1.2$ WT (CHO Zellen) ohne $K_v1.2$ -Blocker (n=7)



B $K_v1.2$ WT (CHO Zellen) + Km-R111J (n=7)



C $K_v1.2$ WT (CHO Zellen) + TsTx (n=7)

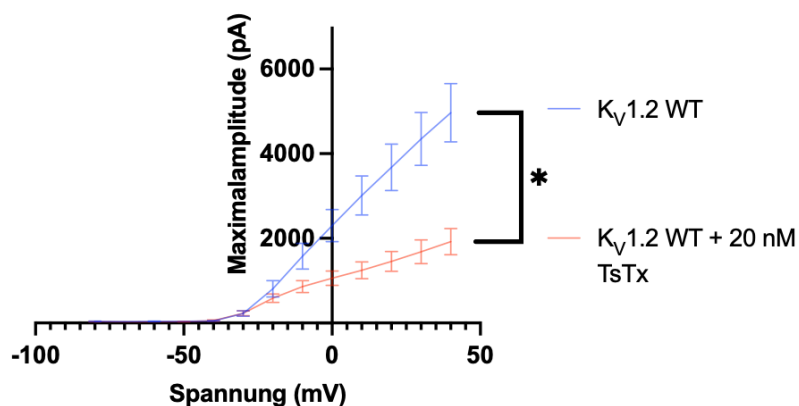


Abbildung 9: Prä und post Toxin-Messungen in $K_v1.2$ WT-transfizierten CHO Zellen nach Gabe von Ionenkanalblockern.

Zu sehen sind sog. Input-Output-Kurven von $K_v1.2$ WT-transfizierten CHO Zellen, aufgezeichnet im Voltage Clamp-Modus. In (A) zeigen sich unveränderte K^+ Ströme der abgeleiteten $K_v1.2$ WT-transfizierten CHO Zellen (n=7) ohne Gabe von Ionenkanalblockern ($p > 0,05$). Sowohl nach Gabe von 150 nM $K_m-R111J$ (B), als auch nach Gabe von 20 nM Tityustoxin (C), konnten signifikant reduzierte K^+ Ströme in $K_v1.2$ WT-transfizierten CHO Zellen (jeweils n=7) aufgezeichnet werden (jeweils $*p < 0,05$).

Für die statistische Auswertung wurde jeweils die AUC der beiden Kurven berechnet und mittels t-Test für abhängige Stichproben verglichen.

Eine exemplarische Darstellung der Reduktion der AUCs nach Gabe von 150 nM Conotoxin κ M-R111J im Sinne einer relevanten $K_V1.2$ -Kanalhemmung um mindestens 50 % ist in Tabelle 10 zu sehen.

Tabelle 10: Exemplarische Darstellung der relevanten $K_V1.2$ -Kanalhemmung als AUCs nach Gabe von 150 nM Conotoxin κ M-R111J.

$K_V1.2$ WT + Conotoxin κ M-R111J (CHO Zellen, n=7)

vor Toxin			nach Toxin	
Spannung (mV)	AUC		AUC	
-80				
-70	445	→	264	
-60	528	→	268	
-50	493	→	316	
-40	614	→	716	
-30	1.706	→	2.070	
-20	5.595	→	4.281	
-10	13.127	→	6.619	
0	22.255	→	8.834	
10	31.265	→	11.065	
20	39.864	→	13.377	
30	47.666	→	15.762	
40	55.278	→	18.539	

3.1.2. Testung der Toxinspezifität bei $K_V1.1$ WT-Homomeren in CHO Zellen

In 3.1.1. wurden folgende Toxinkonzentrationen zur halbmaximalen Hemmung der $K_V1.2$ WT-transfizierten CHO Zellen ermittelt: 150 nM κ M-R111J und 20 nM Tityustoxin. Diese Toxinkonzentrationen wurden analog zu 3.1. verwendet, um die Spezifität der untersuchten Toxine auf weitere K^+ -Kanäle zu testen. Da $K_V1.2$ -Kanäle, wie in 1.3.1. beschrieben, *in vivo* häufig als Heteromere mit $K_V1.1$ - bzw. $K_V1.4$ -Kanälen vorkommen, wurde die Toxinspezifität an den beiden o.g. K^+ -Kanälen untersucht.

In Abbildung 10 werden exemplarisch die Patch Clamp-Ableitungen mit den aufgezeichneten K^+ Strömen in einer mit $K_V1.1$ WT-transfizierten CHO Zelle vor und nach Gabe von 150 nM κ M-R111J gezeigt.

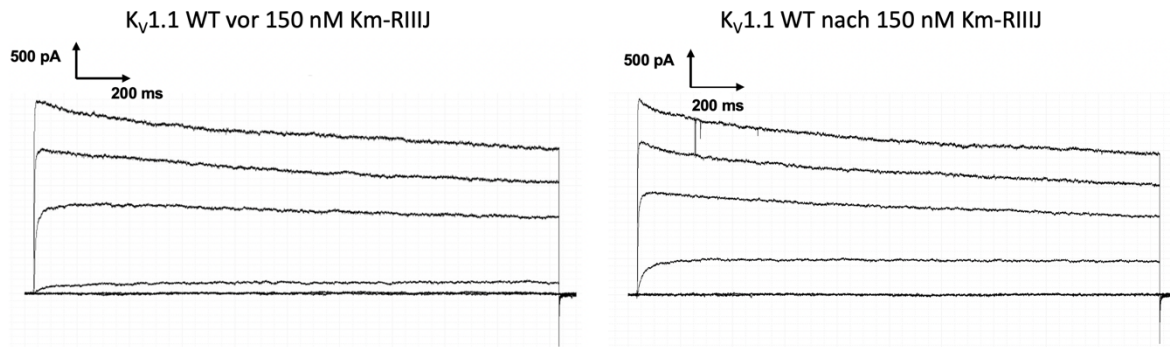


Abbildung 10: Repräsentative K^+ Ströme abgeleitet von einer $K_v1.1$ WT-transfizierten CHO Zelle vor (links) und nach (rechts) Gabe von 150 nM $\kappa M-R111J$.

In Abbildung 11 A sind die Kontrollmessungen ohne Kanalblocker in $K_v1.1$ WT-transfizierten CHO Zellen ($n=7$) gezeigt. Hiermit konnte erneut die Validität des Versuchsaufbaus bestätigt werden, da zwischen der ersten und zweiten Messung analog zu 3.1.1 kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen K^+ Strömen ermittelt werden konnte ($p>0,05$). Nach Gabe von 150 nM Conotoxin $\kappa M-R111J$ konnte mit dem in 3.1. beschriebenen Messprotokoll keine statistisch signifikante Reduktion der K^+ Ströme für homomere $K_v1.1$ WT-transfizierte CHO Zellen ($n=7$) nachgewiesen werden. Im Gegenteil zeigte sich eine signifikante Zunahme der gemessenen K^+ Ströme ($***p<0,0001$) (Abbildung 10 und 11 B). In den untersuchten, mit $K_v1.1$ WT-transfizierten CHO Zellen ($n=7$) konnte nach Gabe von 20 nM Tityustoxin in der post Toxin-Messung keine statistisch signifikante Reduktion der K^+ Ströme im Vergleich zur prä Toxin-Messung aufgezeichnet werden ($p>0,05$) (Abbildung 11 C). Für die statistische Auswertung der gemessenen K^+ Ströme wurde die AUC unter jeder Kurve berechnet und mittels paired t-Test verglichen.

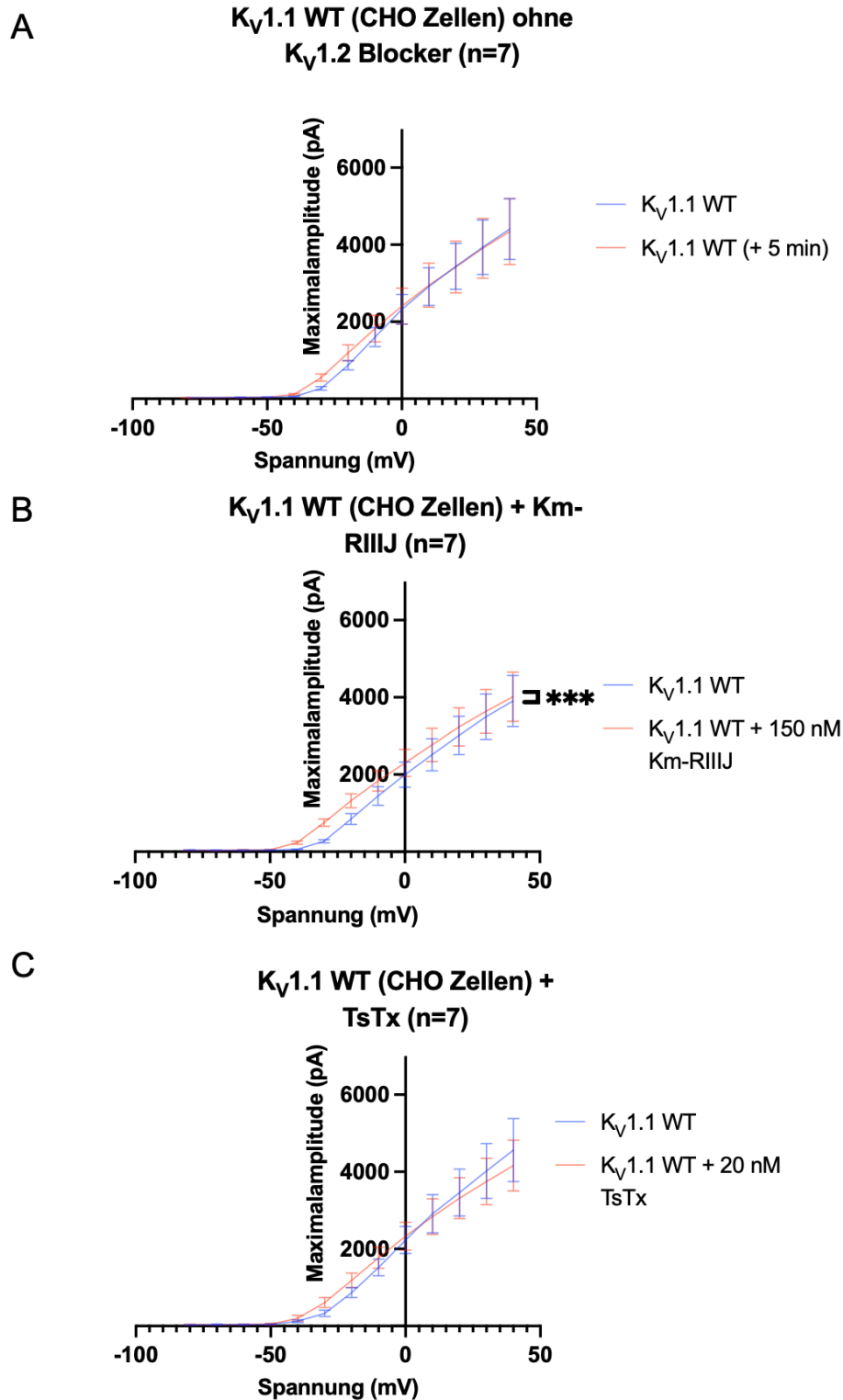


Abbildung 11: Prä und post Toxin-Messungen in $K_v1.1$ WT-transfizierten CHO Zellen (n=7) nach Gabe von Ionenkanalblockern.

Zu sehen sind sog. Input-Output-Kurven von $K_v1.1$ WT-transfizierten CHO Zellen, aufgezeichnet im Voltage Clamp-Modus. In (A) zeigen sich unveränderte K^+ Ströme der abgeleiteten $K_v1.1$ WT-transfizierten CHO Zellen ohne Gabe von Ionenkanalblockern ($p > 0,05$). Nach Gabe von 150 nM κM -R111J (B) konnte eine signifikante Zunahme der K^+ Ströme $K_v1.1$ WT-transfizierter CHO Zellen gemessen werden ($***p < 0,0001$). Nach Gabe von 20 nM Tityustoxin (C) zeigte sich keine signifikante

Veränderung der K^+ Ströme in $K_v1.1$ WT-transfizierten CHO Zellen ($p > 0,05$). Für die statistische Auswertung wurde jeweils die AUC der beiden Kurven berechnet und mittels t-Test für abhängige Stichproben verglichen.

3.1.3. Testung der Toxinspezifität bei $K_v1.4$ WT-Homomeren in CHO Zellen

Analog zu 3.1.2. wurden die in 3.1.1. ermittelten Toxinkonzentrationen zur halbmaximalen Hemmung der $K_v1.2$ WT-transfizierten CHO Zellen (150 nM κ M-R111J und 20 nM Tityustoxin) für die Testung der Toxinspezifität an $K_v1.4$ WT-transfizierten CHO Zellen verwendet.

Exemplarisch für die mit $K_v1.4$ WT-transfizierten CHO Zellen sind die gemessenen K^+ Ströme der prä und post Toxin-Messungen einer Zelle vor und nach Gabe des Ionenkanalblockers κ M-R111J in Abbildung 12 zu sehen.

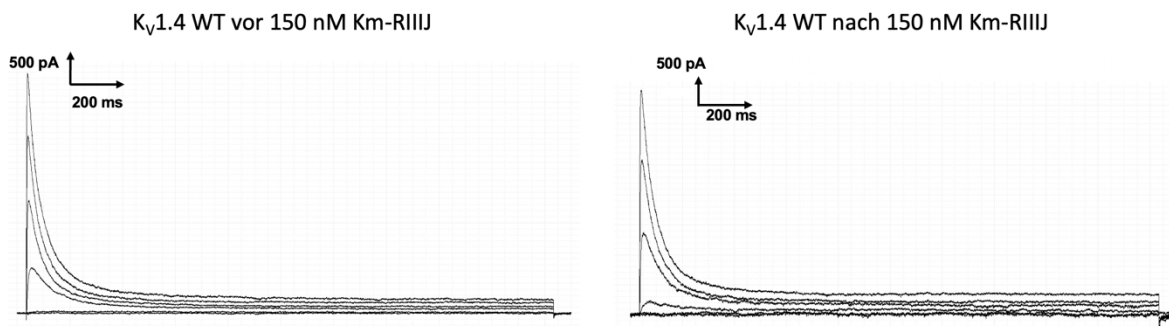


Abbildung 12: Repräsentative K^+ Ströme der prä und post Toxin-Messungen abgeleitet von einer $K_v1.4$ WT-transfizierten CHO Zelle vor (links) und nach (rechts) Gabe von 150 nM κ M-R111J.

Ebenso konnte, wie in Abbildungen 13 B und 13 C dargestellt, weder nach Gabe von 150 nM Conotoxin κ M-R111J, noch nach Gabe von 20 nM Tityustoxin eine statistisch signifikante Reduktion der K^+ Ströme der CHO Zellen mit $K_v1.4$ WT-Überexpression (jeweils $n=7$) aufgezeichnet werden (beide mit $p > 0,05$). In Abbildung 13 A sind die Kontrollmessungen ohne Kanalblocker in $K_v1.4$ WT-transfizierten CHO Zellen ($n=7$) gezeigt. Hier wurde erneut zwischen der ersten und zweiten Messung kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen K^+ Strömen ermittelt ($p > 0,05$). Für die statistische Auswertung der gemessenen K^+ Ströme wurde die AUC unter jeder Kurve berechnet und mittels paired t-Test verglichen.

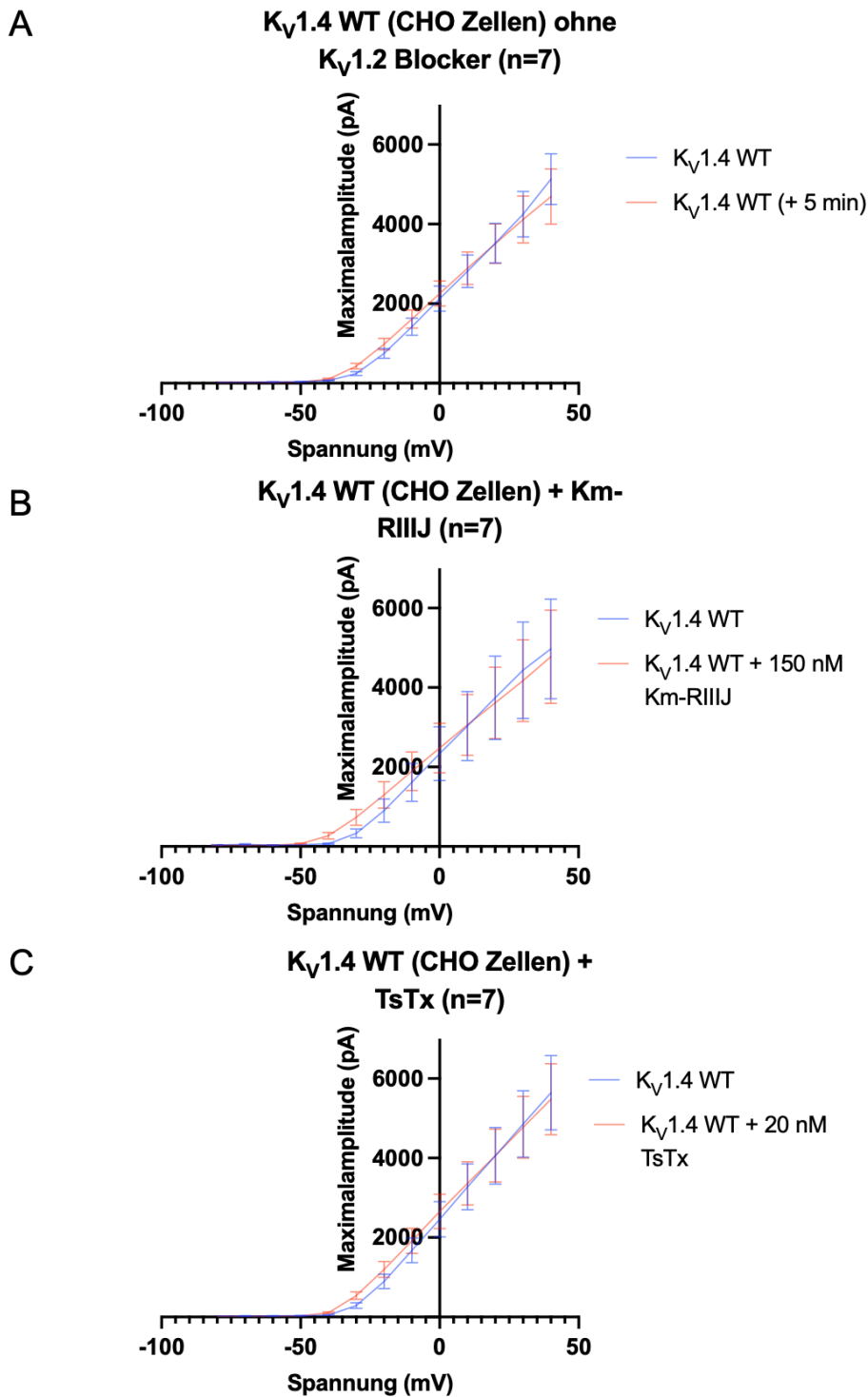


Abbildung 13: Prä und post Toxin-Messungen in $K_v1.4$ WT-transfizierten CHO Zellen nach Gabe von Ionenkanalblockern.

Zu sehen sind sog. Input-Output-Kurven von $K_v1.4$ WT-transfizierten CHO Zellen, aufgezeichnet im Voltage Clamp-Modus. Es konnte weder nach Gabe von 150 nM κM -R111J (B), noch nach Gabe von 20 nM Tityustoxin (C) signifikante Veränderung der K^+ Ströme in $K_v1.4$ WT-transfizierten CHO Zellen (jeweils n=7) aufgezeichnet werden (jeweils $p > 0,05$). In (A) zeigen sich unveränderte K^+ Ströme der abgeleiteten $K_v1.4$ WT-transfizierten CHO Zellen (n=7) ohne Gabe von Ionenkanalblockern ($p > 0,05$). Für die statistische Auswertung wurde jeweils die AUC der beiden Kurven berechnet und mittels t-Test für abhängige Stichproben verglichen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen der untersuchten $K_v1.2$ -Kanalblocker, die in $K_v1.2$ WT-transfizierten CHO Zellen eine relevante $K_v1.2$ -Kanalhemmung (>50%) verursachten, keine signifikante Reduktion der K^+ Ströme in $K_v1.1$ WT- bzw. $K_v1.4$ WT-transfizierten CHO Zellen bewirkte. Tityustoxin und Conotoxin $\kappa M-R111J$ blockieren demnach spezifisch den $K_v1.2$ WT-Kanal.

3.2. Analyse von Ruhemembranpotential und Erregbarkeit in primären murinen kortikalen $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone unmittelbar nach Toxingabe

Nach der molekularen Charakterisierung der $K_v1.2$ -Ionenkanalblocker Tityustoxin und Conotoxin $\kappa M-R111J$ in CHO Zellen, folgte die Untersuchung der zellulären Auswirkungen der Toxine in kortikalen Neuronen. Hierbei wurden in einem nächsten Schritt die Ruhemembranpotentiale und Eingangswiderstände von transduzierten Neuronen vor und nach Zugabe der in CHO Zellen charakterisierten Toxine gemessen. Hierfür wurden Mauskulturen aus dem Kortex des Mausstamms C57BL/6NCrl an Tag E18, wie unter 2.2.2.2. im Methodenteil genauer beschrieben, auf vorbehandelten Deckgläschen ausgesät und am 4. Tag in Kultur (DIV 4) mit verschiedenen Plasmiden des pcDNA3.1-Vektors mit Hilfe von Adeno-assoziierten Viren (AAV8-hSyn-KCNA2-WT-T2A-EGFP bzw. AAV8-hSyn-KCNA2-R297Q-T2A-EGFP) transduziert. Die Transduktion ist unter 2.4.3. detailliert beschrieben.

Bei der Untersuchung der unmittelbaren Toxinwirkung auf kortikale Neurone wurden zunächst Kontrollmessungen ($n \geq 3$) ohne Toxingabe durchgeführt, um die Validität der Experimente zu testen. Zunächst wurden die im Material- und Methodenteil dieser Arbeit unter 2.5.4.2. erläuterten Patch Clamp-Messungen („prä Toxin-Messung“ (1)) im Current Clamp-Modus aufgezeichnet (Abbildung 15). Daraufhin wurde 75 nM Conotoxin $\kappa M-R111J$ oder 10 nM Tityustoxin in die Extrazellulärlösung pipettiert und die erste „post Toxin-Messung“ (2) aufgezeichnet. Um die Zielkonzentration von 150 nM Conotoxin $\kappa M-R111J$ bzw. 20 nM Tityustoxin zu erreichen, wurde erneut 75 nM Conotoxin $\kappa M-R111J$ oder 10 nM Tityustoxin in die Extrazellulärlösung pipettiert und die zweite „post Toxin-Messung“ (3) aufgezeichnet. Damit sich die Toxine suffizient und gleichmäßig in der Extrazellulärlösung verteilen konnten, wurde analog zu den Experimenten an den CHO Zellen eine Wartezeit von 5 min eingehalten.

Ergebnisse

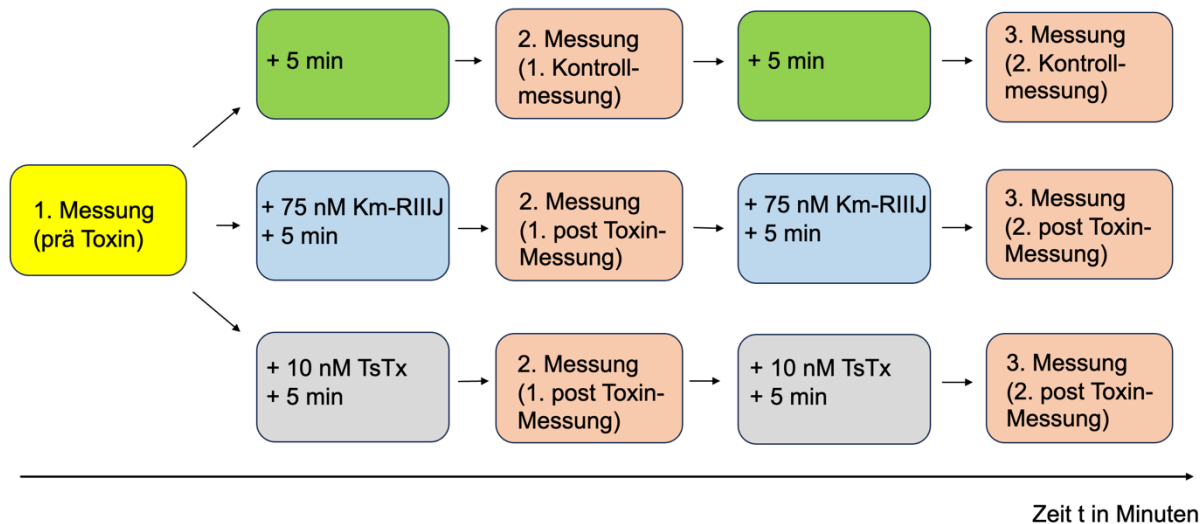


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Experimentaldurchführung der Patch Clamp-Messungen zur akuten Toxinwirkung an kortikalen Neuronen.

3.2.1. Analyse von Ruhemembranpotential und Eingangswiderstand primärer muriner kortikaler K_v1.2 WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone

Untersucht wurde zunächst das Ruhemembranpotential (RMP), das über einen Zeitraum von 2 Minuten mit der Whole Cell Patch Clamp-Methode im Current Clamp-Modus ohne die Injektion eines Stroms unmittelbar nach Öffnen der Zelle abgeleitet wurde. Der Eingangswiderstand (IR) wurde berechnet aus den gemessenen Membranspannungen, die bei einer episodischen Stimulation des untersuchten Neurons mit zunehmend hyperpolarisierten Strominjektionen aufgezeichnet wurden. Genauere Erläuterungen hierzu finden sich unter 2.5.4.2. Um die Stabilität der Neurone bei wiederholter Aufzeichnung der Messprotokolle an den gleichen Nervenzellen zu untersuchen, wurde das zu untersuchende Neuron einmal gepatcht und alle Patch Clamp-Protokolle wurden nacheinander aufgezeichnet und zweimal im Abstand von jeweils 5 Minuten wiederholt. Die Durchführung der Experimente ist in Abbildung 14 dargestellt.

Neurone mit K_v1.2 WT-Überexpression wurden als Kontrollbedingung für Neurone mit R297Q-Expression verwendet. In der Analyse von RMP und IR der prä Toxin-Messung in primären kortikalen murinen Neuronen nach 10-15 Tagen in Kultur (DIV 10-15) zeigte sich ein signifikant depolarisierteres RMP bei K_v1.2 WT- (Mittelwert ± SEM: -52,4 ± 2,7 mV, n=5) im Vergleich zu R297Q-transduzierten kortikalen Neuronen (-65,8 ± 1,5, n=4) (*p<0,05). Ein deutlicher Unterschied zwischen den berechneten IR zeigte sich nicht (p>0,05). Signifikante Unterschiede von RMP und IR zwischen der ersten (1), zweiten (2) und dritten (3) Kontrollmessung K_v1.2 WT- bzw. R297Q-transduzierter

Neurone zeigten sich nicht (Abbildung 15). Damit ist die Voraussetzung zur Überprüfung der Toxinwirkung aufgrund der Stabilität der Messungen ohne Toxin gegeben. Als statistisches Mittel wurde eine Einfaktor-ANOVA mit Messwiederholungen (eng. Repeated Measures, kurz: RM) verwendet.

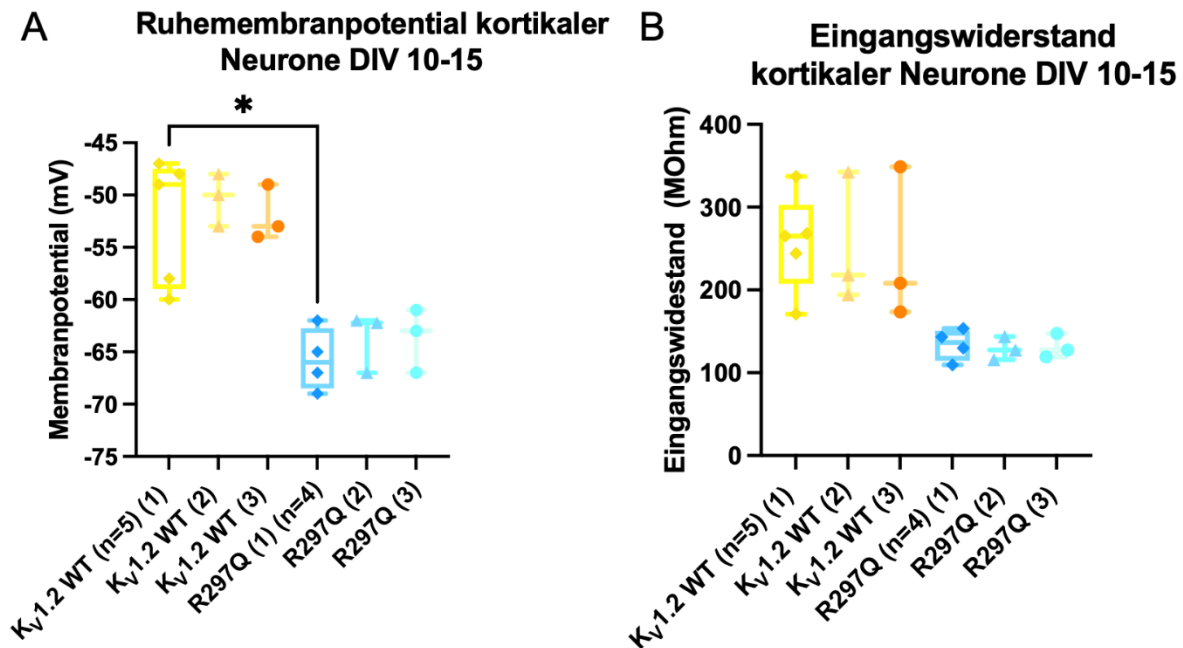


Abbildung 15: RMPs (A) und IRs (B) kortikaler Kv1.2 WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone (DIV10-15).

Zu sehen sind Box-Dot-Plot-Diagramme zu den gemessenen RMPs (A) ($*p < 0,05$) und berechneten IRs (B) ($p > 0,05$) bei Kv1.2 WT-transduzierten Neuronen ($n=5$) im Vergleich zur R297Q-Variante ($n=4$) an DIV 10-15 (jeweils 1. Messung). Zwischen den prä und post Toxin-Messungen (2 und 3) der RMPs und IRs Kv1.2 WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$). Als statistischer Test wurde eine Einfaktor-ANOVA mit RM durchgeführt.

3.2.2. Analyse der Erregbarkeit primärer muriner kortikaler Kv1.2 WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone

Um die Stabilität der Neurone bei wiederholter Aufzeichnung der Patch Clamp-Messprotokolle im Rahmen einer Patch Clamp-Messung zu untersuchen, wurden alle Patch Clamp-Protokolle nacheinander aufgezeichnet (=1. Messung) und zweimal im Abstand von jeweils 5 Minuten wiederholt (=2. und 3. Messung). Hierbei wurde kein Toxin in die Extrazellulärlösung pipettiert. Die Durchführung der Experimente ist in Abbildung 14 dargestellt. Ausgewertet wurde die Anzahl an Aktionspotentialen, die bei wiederholten Strominjektionen aufgezeichnet wurden.

Bei der Analyse der Erregbarkeit primärer kortikaler muriner Neurone an DIV 10-15 zeigte sich ohne Zugabe von Kv1.2-Kanalblockern eine signifikant verminderte Anzahl

der Aktionspotentiale bei R297Q-transduzierten Neuronen ($AUC \pm SD: 125 \pm 75, n=4$) im Vergleich zu Neuronen mit $K_v1.2$ WT-Überexpression ($2.981 \pm 393, n=4$) in der ersten Messung (prä Toxin-Messung) (** $p<0,01$). Signifikante Unterschiede in der Anzahl der aufgezeichneten APs zwischen der ersten (1), zweiten (2) und dritten (3) Kontrollmessung $K_v1.2$ WT- (2.981 ± 393 (1) bzw. 2.933 ± 451 (2) bzw. 2.771 ± 450 (3)) bzw. R297Q-transduzierter Neurone (125 ± 75 (1) bzw. 154 ± 57 (2) bzw. 125 ± 51 (3)) zeigten sich nicht ($p>0,05$). Damit ist die Voraussetzung zur Überprüfung der Toxinwirkung aufgrund der Stabilität der Messungen ohne Toxin gegeben. Als statistischer Test wurde eine Einfaktor-ANOVA mit Messwiederholungen (RM) der ermittelten AUCs aller Kurven durchgeführt (Abbildung 16).

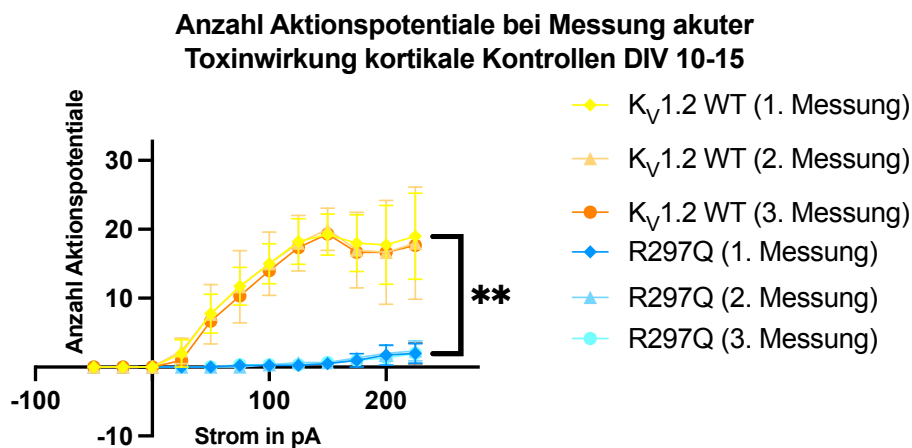


Abbildung 16: Anzahl Aktionspotentiale kortikaler $K_v1.2$ WT/R297Q-transduzierter Neurone ($n=4$) an DIV 10-15.

Zu sehen sind Input-Output-Kurven der Aktionspotentiale von $K_v1.2$ WT- ($n=4$) im Vergleich zu R297Q-transduzierten kortikalen Neuronen ($n=4$) an DIV 10-15. Zwischen der jeweils ersten Messung wurden im Vergleich zu Neuronen mit $K_v1.2$ WT-Überexpression bei der R297Q-Variante signifikant weniger Aktionspotentiale aufgezeichnet (** $p<0,01$). Für die statistische Auswertung wurde jeweils die AUC aller Kurven berechnet und mittels Einfaktor-ANOVA mit RM verglichen.

3.2.3. Analyse von Ruhemembranpotential und Erregbarkeit in primären murinen kortikalen $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierten Neuronen unmittelbar nach Gabe von Conotoxin κM -RIIIJ

3.2.3.1. Analyse von RMP und IR muriner kortikaler $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone während Gabe von Conotoxin κM -RIIIJ

Um die Auswirkungen der Toxine auf das RMP und den IR der Neurone untersuchen zu können, wurde, wie ausführlich in 2.5.4.2. beschrieben, zuerst eine prä Toxin-Messung (1) durchgeführt. Danach wurden insgesamt zweimal 75 nM κM -RIIIJ in die

Petrischale pipettiert. Die Messprotokolle (post Toxin-Messung (2) und (3)) wurden zwischen den einzelnen Toxingaben jeweils einmal wiederholt. Die Durchführung der Experimente ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

Neurone mit $K_v1.2$ WT-Überexpression wurden als Kontrollbedingung für Neurone mit R297Q-Expression verwendet, um kurzfristige Effekte der Toxine auf RMP und IR zu untersuchen. Unmittelbar nach der ersten (1. post Toxin-Messung: Mittelwert \pm SEM: $-57,4 \pm 1,8$ mV bzw. $-63,8 \pm 1,9$) bzw. zweiten Gabe von 75 nM Conotoxin κ M-R111J (2. post Toxin-Messung: $-56,5 \pm 1,4$ bzw. $-64,3 \pm 3,5$) konnten keine signifikanten Veränderungen des RMP verglichen mit unbehandelten $K_v1.2$ WT- ($-53,7 \pm 1,9$, $n=5$) und R297Q-transduzierten kortikalen Neuronen ($-62,6 \pm 1,5$, $n=5$) ermittelt werden ($p>0,05$). Beim RMP $K_v1.2$ WT-transduzierter Neurone zeigte sich unmittelbar nach Gabe von Conotoxin κ M-R111J ein nicht statistisch signifikant hyperpolarisierteres RMP ($p>0,05$) (Abbildung 17).

Nach Blockade der $K_v1.2$ WT-Kanäle mit 75 (228 ± 51 MOhm) bzw. 150 nM Conotoxin κ M-R111J (263 ± 64) konnte keine signifikante Veränderung des IR, verglichen mit unbehandelten $K_v1.2$ WT-transduzierten Neuronen (236 ± 33), gezeigt werden. Zwischen der ersten (1. post Toxin-Messung) und der zweiten Gabe von 75 nM Conotoxin κ M-R111J (2. post Toxin-Messung), wurde ein deutlich höheres IR berechnet ($*p<0,05$). Erneut zeigten sich unmittelbar nach der ersten (1. post Toxin-Messung: 98 ± 27) bzw. zweiten Gabe von 75 nM Conotoxin κ M-R111J (2. post Toxin-Messung: 110 ± 47) keine signifikanten Veränderungen des IR verglichen mit unbehandelten R297Q-transduzierten kortikalen Neuronen (108 ± 16) ($p>0,05$). Als statistischer Test wurde jeweils eine Einfaktor-ANOVA mit RM verwendet.

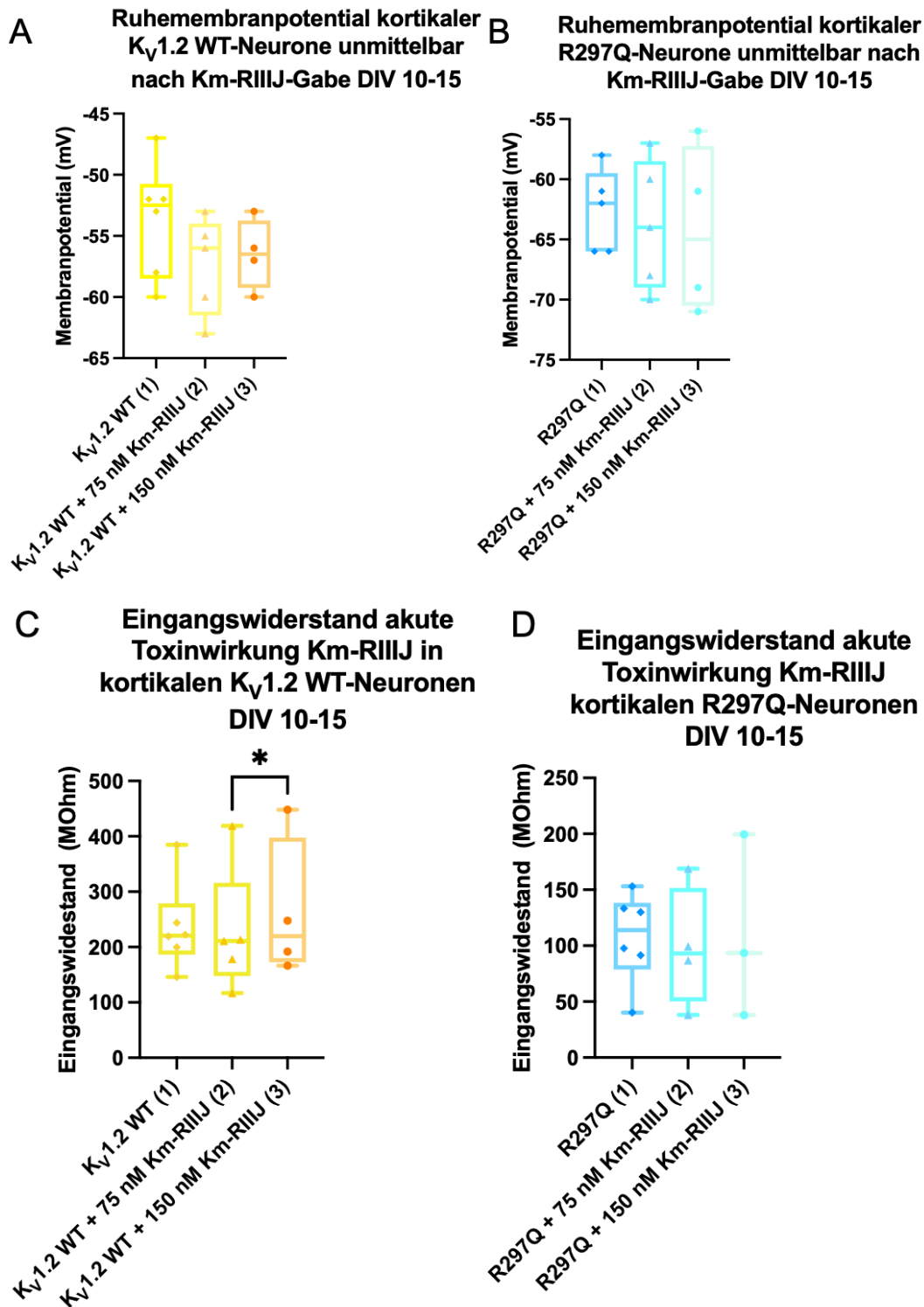


Abbildung 17: RMPs und IRs kortikaler $K_v1.2$ WT/R297Q-transduzierter Neurone unmittelbar nach Gabe von Conotoxin κ M-RIIIJ (DIV 10-15).

Zu sehen sind Box-Dot-Plot-Diagramme der gemessenen RMPs (A) und IRs (C) von $K_v1.2$ WT-transduzierten kortikalen Neuronen ($n=5$) im Vergleich zur R297Q-Variante (B) und (D) ($n=5$). Zwischen den einzelnen Messungen $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone zeigten sich in den gemessenen RMPs, sowie der berechneten IRs R297Q-transduzierter Neurone, unmittelbar nach Gabe von 75 nM (2) bzw. 150 nM Conotoxin κ M-RIIIJ (3) keine signifikanten Unterschiede ($p>0,05$). Zwischen der Gabe von 75 (2) und 150 nM Conotoxin κ M-RIIIJ (3), wurde ein signifikanter Anstieg des IR berechnet (* $p<0,05$). Als statistischer Test wurde jeweils eine Einfaktor-ANOVA mit RM durchgeführt.

3.2.3.2. Analyse der neuronalen Erregbarkeit muriner kortikaler $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone während Gabe von Conotoxin κ M-R111J

Wie in 2.5.4.2. beschrieben, wurde, um die Auswirkungen der Toxine auf die Anzahl der Aktionspotentiale untersuchen zu können, zuerst eine prä Toxin-Messung (1) durchgeführt. Daraufhin wurden 75 nM Conotoxin κ M-R111J insgesamt zweimal in die Petrischale pipettiert. Die Messprotokolle 1. und 2. (post Toxin-Messung) wurden zwischen den einzelnen Toxingaben jeweils einmal wiederholt. Ausgewertet wurde die Anzahl der Aktionspotentiale, die bei wiederholten Strominjektionen generiert werden konnten.

Um kurzfristige Effekte der Toxine auf die neuronale Erregbarkeit zu untersuchen, wurden Neurone mit $K_v1.2$ WT-Überexpression als Kontrollbedingung für Neurone mit R297Q-Expression verwendet. Bereits nach Blockade der $K_v1.2$ WT-Kanäle mit 75 nM Conotoxin κ M-R111J (AUC \pm SD: 1.103 ± 305) zeigte sich die Zahl der APs etwas erhöht verglichen mit unbehandelten $K_v1.2$ WT-transduzierten Neuronen (1.017 ± 270). Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 18 A). Zwischen der ersten (1. post Toxin-Messung: 1.103 ± 305) und der zweiten Gabe von 75 nM Conotoxin κ M-R111J (2. post Toxin-Messung: 1.709 ± 331), wurde eine signifikante Zunahme der APs aufgezeichnet (** $p < 0,01$). Wie zu erwarten, war nach der Blockade der $K_v1.2$ WT-Kanäle (1.017 ± 270) mit insgesamt 150 nM Conotoxin κ M-R111J (1.709 ± 331) die Zahl der APs deutlich höher (* $p < 0,05$).

Nach Blockade der R297Q-transduzierten kortikalen Neurone mit 75 nM (675 ± 393) war die Anzahl der APs, verglichen mit unbehandelten R297Q-transduzierten Neuronen (490 ± 236 , $n=5$), bereits signifikant höher (* $p < 0,05$) (Abbildung 18 B). Zwischen der ersten (1. post Toxin-Messung: 675 ± 393) und der zweiten Gabe von 75 nM Conotoxin κ M-R111J (2. post Toxin-Messung: 1.063 ± 455), wurde erneut eine signifikante Zunahme der APs aufgezeichnet (* $p < 0,05$). Auch hier war, wie erwartet, nach der Blockade der R297Q-Kanäle (490 ± 236) mit insgesamt 150 nM Conotoxin κ M-R111J (1.063 ± 455) die Zahl der APs signifikant höher (** $p < 0,01$). Als statistischer Test wurde eine Einfaktor-ANOVA mit Messwiederholungen der ermittelten AUCs aller Kurven durchgeführt.

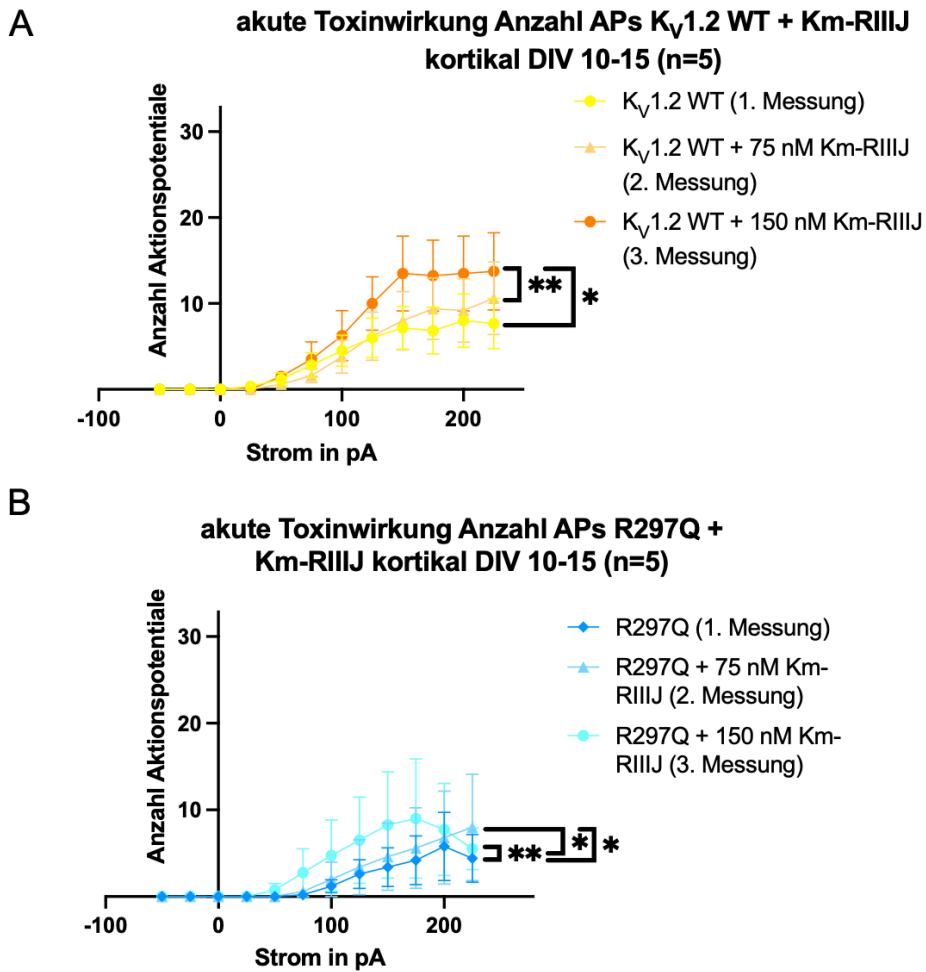


Abbildung 18: Anzahl Aktionspotentiale kortikaler $K_V1.2$ WT/R297Q-transduzierter Neurone (DIV 10-15) nach Gabe von Conotoxin $\kappa M-R111J$.

Dargestellt sind Input-Output-Kurven der aufgezeichneten Aktionspotentiale an DIV 10-15. In (A) ist eine signifikante Steigerung des Feuerungsverhaltens bei $K_V1.2$ WT-transduzierten Nervenzellen nach Gabe von 150 nM Conotoxin $\kappa M-R111J$ zu sehen (* $p < 0,05$). In (B) ist die signifikante Zunahme der AP-Anzahl R297Q-transduzierter Neurone nach Gabe von 75 nM bzw. 150 nM Conotoxin $\kappa M-R111J$ dargestellt (* $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,01$). Als statistischer Test wurde eine Einfaktor-ANOVA mit RM der ermittelten AUCs aller Kurven durchgeführt.

Eine exemplarische Darstellung der vergrößerten AUCs nach Gabe von 150 nM Conotoxin $\kappa M-R111J$ R297Q-transduzierter Neurone im Sinne einer signifikanten AP-Frequenzsteigerung ist in Tabelle 11 zu sehen.

Tabelle 11: Exemplarische Darstellung der signifikant größeren AUCs nach unmittelbarer Toxinwirkung von 150 nM Conotoxin κ M-R111J auf die Anzahl APs in transduzierten R297Q-Neuronen.

R297Q + Conotoxin κ M-R111J (kort. Neurone, n=5)

vor Toxin		nach Toxin	
Strom in pA	AUC		AUC
-50	0	→	0
-25	0	→	0
0	0	→	0
25	0	→	0
50	0	→	9,4
75	2,5	→	43,8
100	17,5	→	93,8
125	47,5	→	140,6
150	75	→	184,4
175	95	→	215,6
200	125	→	209,4
225	127,5	→	165,6

3.2.4. Analyse von Ruhemembranpotential und Erregbarkeit muriner kortikaler $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone unmittelbar nach Gabe von Tityustoxin

3.2.4.1. Analyse des Ruhemembranpotentials muriner kortikaler $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone unmittelbar nach Gabe von Tityustoxin

Wie ausführlich in 2.5.4.2. beschrieben, wurde, um die Auswirkungen der Toxine auf das RMP und den IR der Neurone untersuchen zu können, drei Wiederholungen der Patch Clamp-Messprotokolle aufgezeichnet. Jeweils nach dem 1. und 2. Messdurchlauf, wurden 10 nM TsTx in die Petrischale pipettiert. Die Durchführung der Experimente ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

Untersucht wurden, wie in 3.2.1. erläutert, RMP und IR des gepatchten Neurons. Unmittelbar nach Gabe von 10 (Mittelwert \pm SEM: $-55,2 \pm 3,6$ mV bzw. $-64,6 \pm 1,8$) bzw. 20 nM Tityustoxin (1. bzw. 2. post Toxin-Messung) ($-55,0 \pm 3,5$ bzw. $-64,0 \pm 2,4$) zeigte sich weder bei $K_v1.2$ WT- ($-54,7 \pm 2,9$) noch bei R297Q-transduzierten Neuronen ($-65,0 \pm 2,2$) eine signifikante Veränderung des RMPs (jeweils $p > 0,05$).

Ebenso konnte weder bei $K_v1.2$ WT- noch bei R297Q-transduzierten Neuronen eine signifikante Veränderung des IRs gemessen werden ($p > 0,05$) (Abbildung 19). Als statistisches Mittel wurde eine Einfaktor-ANOVA mit RM und Bonferroni-Korrektur multipler Vergleiche verwendet.

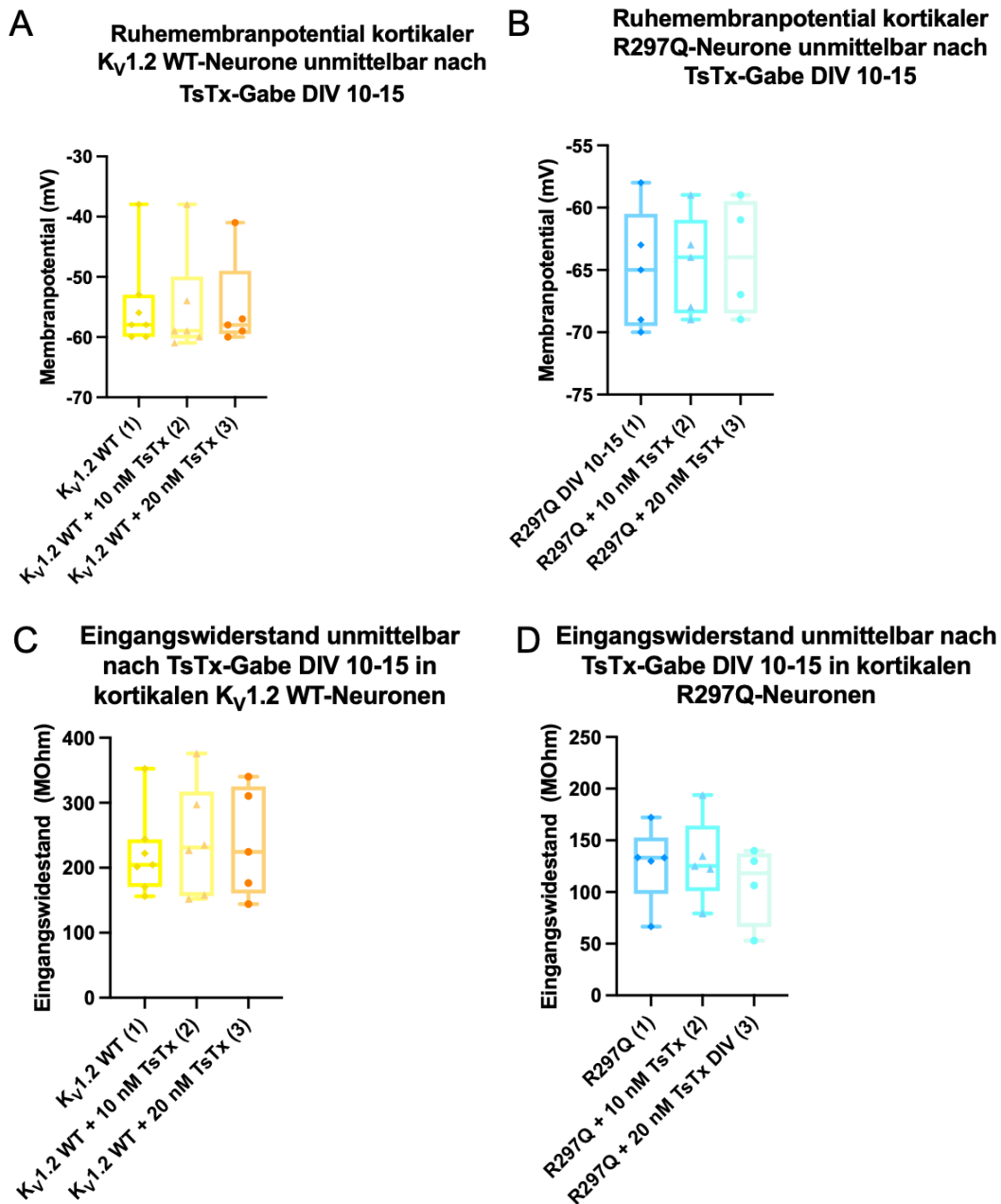


Abbildung 19: RMPs (A) und IRs (B) kortikaler Kv1.2 WT/R297Q-transduzierter Neurone nach Gabe von Tityustoxin (DIV 10-15).

Zu sehen sind Box-Dot-Plot-Diagramme der gemessenen RMPs (A) und IRs (C) von Kv1.2 WT-transduzierten kortikalen Neuronen (n=5) im Vergleich zur R297Q-Variante (B) und (D)(n=5). Zwischen den einzelnen Messungen Kv1.2 WT- (C) bzw. R297Q-transduzierter Neurone (D) zeigten sich in den berechneten IRs unmittelbar nach Gabe von 75 nM (2) bzw. 150 nM Conotoxin κM-R111J (3) keine signifikante Unterschiede ($p > 0,05$). Als statistischer Test wurde eine Einfaktor-ANOVA mit RM und Bonferroni-Korrektur multipler Vergleiche durchgeführt.

3.2.4.1. Analyse der Erregbarkeit primärer muriner kortikaler Kv1.2 WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone während akuter Gabe von Tityustoxin

Um den Effekt der Toxine auf die Anzahl der Aktionspotentiale untersuchen zu können, wurden, wie in 2.5.4.2. ausführlich erläutert, drei Wiederholungen der Patch Clamp-

Messprotokolle aufgezeichnet. Nach dem 1. und 2. Messdurchgang, wurden jeweils 10 nM TsTx in die Petrischale pipettiert. Analysiert wurde die Anzahl Aktionspotentiale, die bei wiederholten Strominjektionen aufgezeichnet werden konnten. Die Durchführung der Experimente ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

Unmittelbar nach Gabe von 10 nM Tityustoxin (1. post Toxin-Messung (2)) konnten bei $K_v1.2$ WT-transduzierten Neuronen (AUC \pm SD: 1.200 ± 352 , $n=6$) etwas mehr APs aufgezeichnet werden, verglichen mit der prä Toxin-Messung (1) der $K_v1.2$ WT-transduzierten Neurone (1.181 ± 269 , $n=6$). Der Unterschied war nicht signifikant ($p>0,05$). Verglichen mit der prä Toxin-Messung (1) $K_v1.2$ WT-transduzierter Neurone wurde unmittelbar nach Steigerung der Tityustoxin-Konzentration auf 20 nM bei $K_v1.2$ WT-transduzierten Neuronen (1.060 ± 353 , $n=5$) etwas weniger APs aufgezeichnet. Auch hier war der Unterschied nicht signifikant ($p>0,05$).

Unmittelbar nach Gabe von 20 nM Tityustoxin konnte bei R297Q-transduzierten Neuronen (41 ± 23 , $n=4$) etwas häufigere APs aufgezeichnet werden, verglichen mit unbehandelten R297Q-transduzierten Neuronen (33 ± 20 , $n=5$) bzw. nach Gabe von 10 nM Tityustoxin (33 ± 20 , $n=5$). Der Unterschied war nicht signifikant ($p>0,05$). Als statistischer Test wurde eine Einfaktor-ANOVA mit RM der ermittelten AUCs aller Kurven durchgeführt.

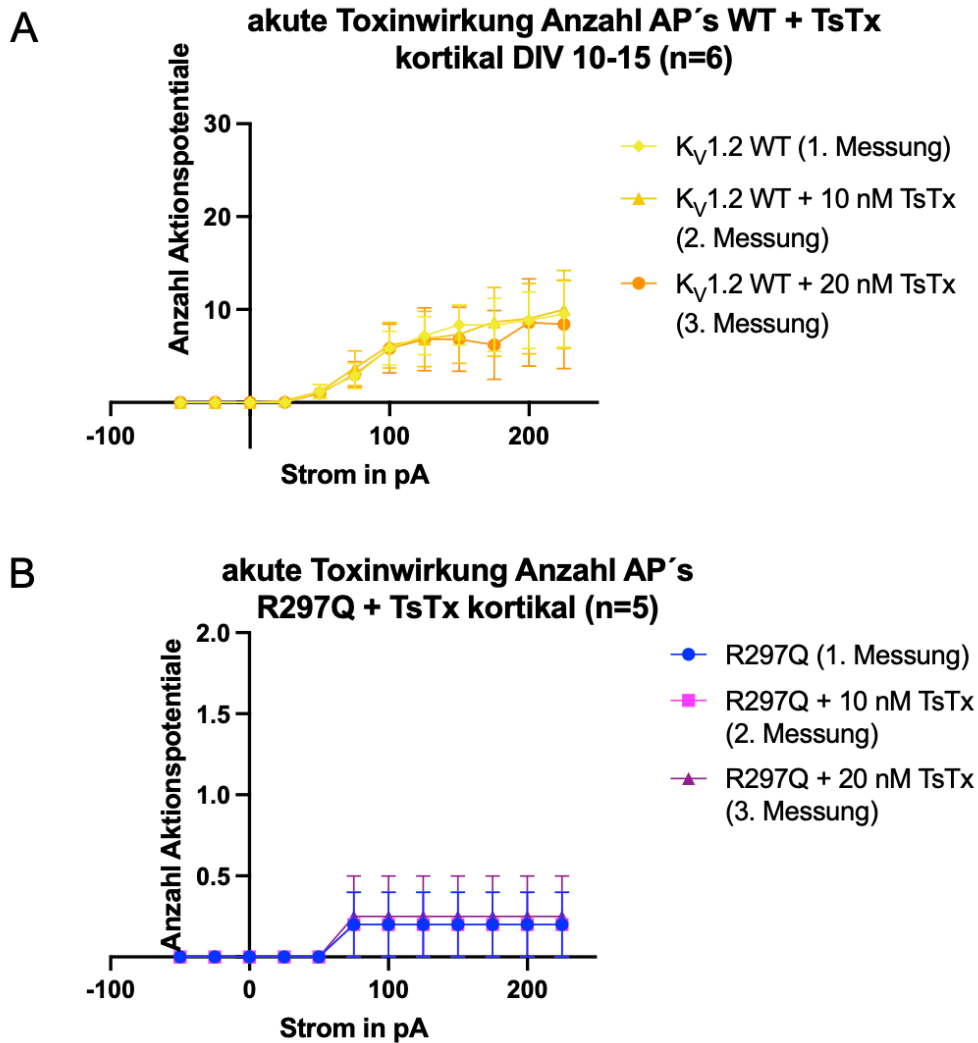


Abbildung 20: Anzahl Aktionspotentiale kortikaler $K_v1.2$ WT/R297Q-transduzierter Neurone (DIV 10-15) nach Gabe von Tityustoxin.

Zu sehen sind Input-Output-Kurven der aufgezeichneten Aktionspotentiale an DIV 10-15. Nach Gabe von 10 bzw. 20 nM TsTx zeigte sich weder bei $K_v1.2$ WT-(A), noch bei R297Q-transduzierten Neuronen (B) eine signifikante Veränderung des Feuerungsverhaltens ($p > 0,05$). In Für die statistische Auswertung wurde jeweils die AUC aller Kurven berechnet und mittels Einfaktor-ANOVA mit RM verglichen.

3.3. Untersuchung der Funktionalität der kortikaler $K_v1.2$ WT/R297Q-transduzierter Neurone

Da sich der jeweiligen $K_v1.2$ -Kanalblocker bei Neuronen nach Langzeitbehandlung nicht in der Extrazellulärlösung der Patch Clamp-Experimente befand, wird in dem folgenden Abschnitt lediglich die Funktionalität der transduzierten Neurone untersucht.

3.3.1. Ruhemembranpotential und Eingangswiderstand kortikaler muriner Neurone

In einem weiteren Schritt des Projekts wurden die Effekte der Langzeitbehandlung der transduzierten kortikalen Neurone mit den in den vorangegangenen Experimenten

untersuchten $K_v1.2$ -Kanalblockern untersucht. Bei bereits deutlichen Effekten der unmittelbaren Toxinwirkung von 75 nM Conotoxin κ M-R111J und fehlendem Effekt von 10 bzw. 20 nM Tityustoxin auf die Anzahl der aufgezeichneten APs, wurden zunächst folgende Toxinkonzentrationen als Langzeitbehandlung getestet: 75 nM Conotoxin κ M-R111J, 10 nM Tityustoxin und 100 μ M 4-AP. Dafür wurden Mauskulturen aus dem Kortex des Mausstamms C57BL/6NCrl an Tag E18, wie unter 2.4.3. im Methodenteil genauer erklärt, auf vorbehandelten Deckgläschen ausgesät. Am 4. Tag in Kultur (DIV 4) erfolgte die Transduktion mit Hilfe von Adeno-assoziierte Viren (AAV) als Träger von $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q- cDNA (AAV8-hSyn-KCNA2-WT-T2A-EGFP bzw. AAV8-hSyn-KCNA2-R297Q-T2A-EGFP). Ab DIV 4 wurde die Langzeitbehandlung mit dem jeweiligen $K_v1.2$ -Kanalblocker begonnen. Diese wurde spätestens an DIV 15 beendet. Die Patch Clamp-Messungen wurden zwischen dem 10. und 15. Tag in Kultur (DIV 10-15) durchgeführt.

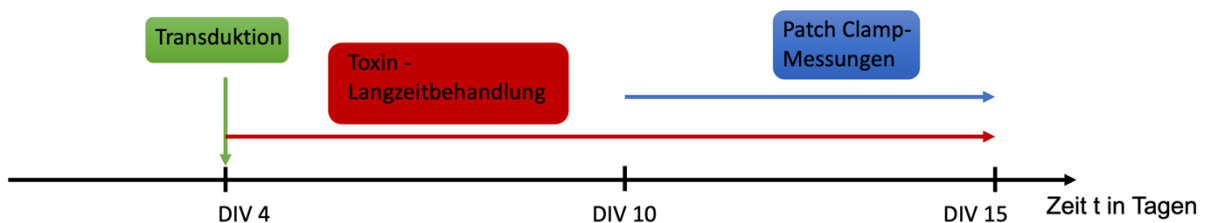


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Experimentalablaufs

Bei der Analyse der Unterschiede der RMPs der primären kortikalen murinen Neurone mittels t-Test für unabhängige Stichproben und Bonferroni-Korrektur zeigte sich eine signifikante Depolarisation des gemessenen Ruhemembranpotentials der $K_v1.2$ WT-transduzierten Neurone (Mittelwert \pm SEM: $-53,6 \pm 2,9$ mV, $n=6$) verglichen mit den RMPs der R297Q-transduzierten Neurone (DIV 10-15) ($-60,8 \pm 1,8$, $n=8$) ($*p<0,05$) (Abb. 36). Signifikante Unterschiede zwischen den gemessenen IRs zeigten sich nicht.

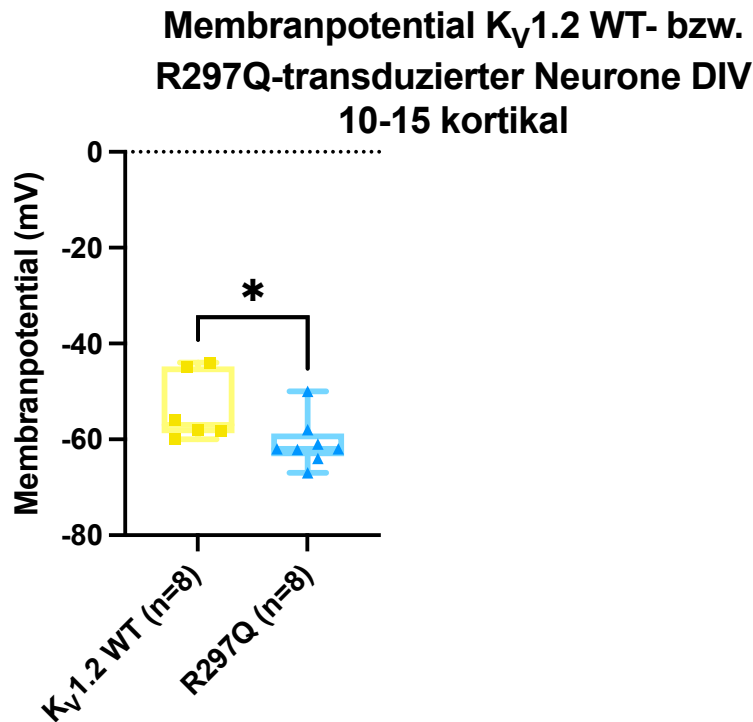


Abbildung 22: RMPs kortikaler $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone.

Dargestellt ist ein Box-Dot-Plot-Diagramm mit den RMPs kortikaler $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone. Bei der Analyse der Unterschiede der RMPs der primären kortikalen murinen Neurone mittels t-Test für unabhängige Stichproben und Bonferroni-Korrektur zeigte sich eine signifikante Hyperpolarisation der RMPs der R297Q-transduzierten Neurone (Mittelwert \pm SEM: $-60,8 \pm 1,8$, $n=8$) verglichen mit den $K_v1.2$ WT-transduzierten Neuronen ($-53,6 \pm 2,9$, $n=6$) ($*p<0,05$).

3.3.2. Erregbarkeit kortikaler muriner $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone

Analog zu 1.5.2. erfolgte die Datenanalyse der Erregbarkeit kortikaler $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter muriner Neurone durch systematisches Auszählen aller aufgezeichneten Aktionspotentiale nach verschiedenen Strominjektionen.

Verglichen mit Neuronen mit $K_v1.2$ WT-Überexpression (AUC \pm SD: 881 ± 220 , $n=8$) konnten bei Neuronen mit Expression der R297Q-Variante (340 ± 211 , $n=8$) deutlich weniger APs aufgezeichnet werden ($*p<0,05$) (Abbildung 23). Als statistisches Mittel wurden ebenfalls die AUCs aller Kurven berechnet und mittels t-Test für unabhängige Stichproben und Bonferroni-Korrektur multipler Vergleiche verglichen.

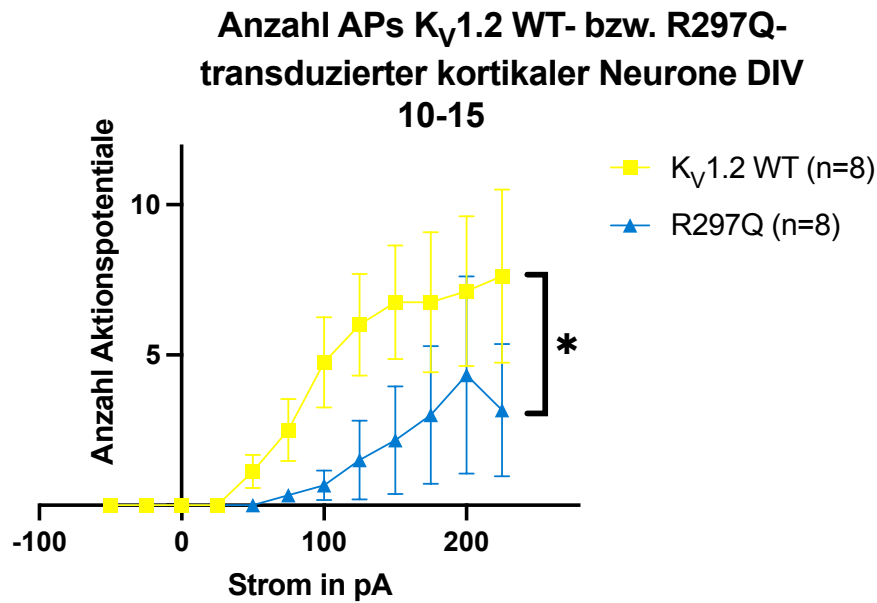


Abbildung 23: Anzahl Aktionspotentiale kortikaler $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone an DIV 10-15.

Zu sehen sind Input-Output-Kurven $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone. Es zeigte sich deutlich weniger aufgezeichnete APs R297Q-transduzierter Neurone ($AUC \pm SD: 340 \pm 211, n=8$) im Vergleich zu Neuronen mit $K_V1.2$ WT-Überexpression ($881 \pm 220, n=8$) ($*p < 0,05$). Als statistischer Test wurde ein *t*-Test für unabhängige Stichproben und Bonferroni-Korrektur multipler Vergleiche der ermittelten AUCs durchgeführt.

3.4. Sholl Analyse kortikaler muriner primärer $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone

Zuerst wurden Übersichtsbilder (20-fache Vergrößerung) aufgenommen und die Transduktionseffizienz, sowie das neuronale Wachstum mikroskopisch untersucht. Die Zellmortalität war bei unbehandelten R297Q-transduzierten Neuronen im Vergleich zur unbehandelten $K_V1.2$ WT-Kontrolle deutlich erhöht. Wie exemplarisch in den Übersichtsbildern in Abbildung 24 dargestellt, gab es eine deutliche Steigerung des Zellüberlebens nach Langzeitbehandlung der kortikalen Mausneuronenkulturen mit den jeweiligen $K_V1.2$ -Kanalblockern. Besonders deutlich wird dieser Effekt bei den behandelten R297Q-transduzierten kortikalen Neuronen.

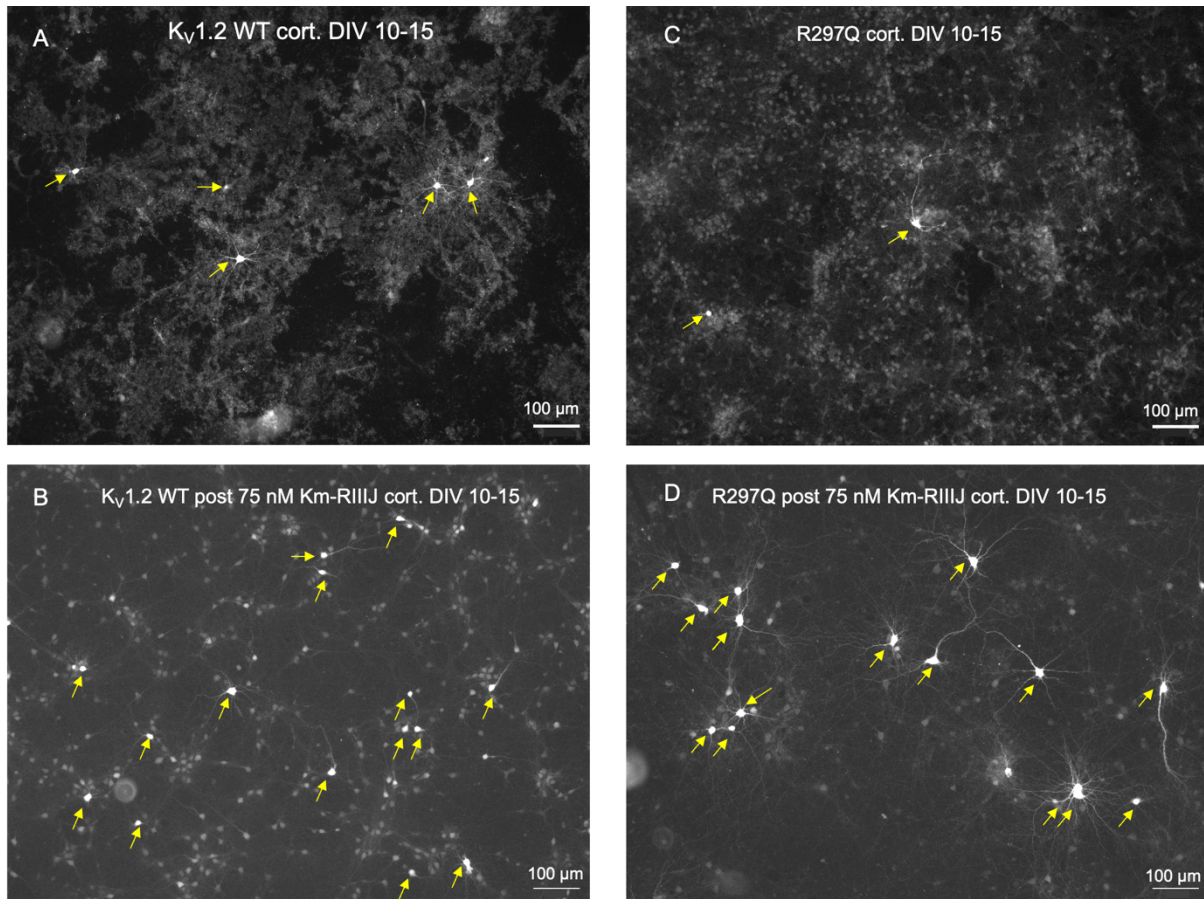


Abbildung 24: Übersichtsbilder 20-fach vergrößert von vitalen $K_v1.2$ WT/R297Q-transduzierten kortikalen Neurone.

(A) und (C) zeigen vitale, unbehandelte $K_v1.2$ WT-bzw. R297Q-transduzierte Neurone DIV 10-15. (B) und (D) zeigen das Zellüberleben von $K_v1.2$ WT/R297Q-transduzierten Neuronen nach Langzeitbehandlung mit 75 nM Conotoxin $\kappa M-R111J$. Es zeigt sich eine deutlich gesteigerte Zellmortalität der unbehandelten Neurone bei R297Q im Vergleich zu $K_v1.2$ WT. Nach Langzeitbehandlung zeigen sich in (B) und (D) ein deutlich höheres Zellüberleben beider Gruppen.

Da die Transduktionseffizienz im Kortex sehr hoch war und durch die Langzeitbehandlung mit den $K_v1.2$ -Ionenkanalblockern deutlich verbessert wurde, konnten die neuronalen Verzweigungen und Dendritenausläufer nicht mehr klar voneinander abgegrenzt werden (Abbildung 24). Deswegen konnte lediglich für $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierte kortikale Neurone (ohne Toxinbehandlung) eine Sholl Analyse durchgeführt werden.

Im Rahmen der Auswertung der Sholl Analyse rekonstruierter kortikaler Mausneurone zum Zeitpunkt DIV 10-15 konnte bei $K_v1.2$ WT- (AUC \pm SD: 13.659 \pm 361, n=7) im Vergleich zu R297Q-transduzierten Neuronen (11.919 \pm 326, n=7) eine statistisch signifikant höhere Anzahl neuronaler Verzweigungen ermittelt werden (**p<0,001) (Abb. 25). Als statistischer Test wurden die AUCs aller Kurven ermittelt und mit Hilfe eines t-Tests für unabhängige Stichproben verglichen.

Sholl Analyse $K_V1.2$ WT/R297Q-transduzierter Neurone (kort.) DIV 10-15

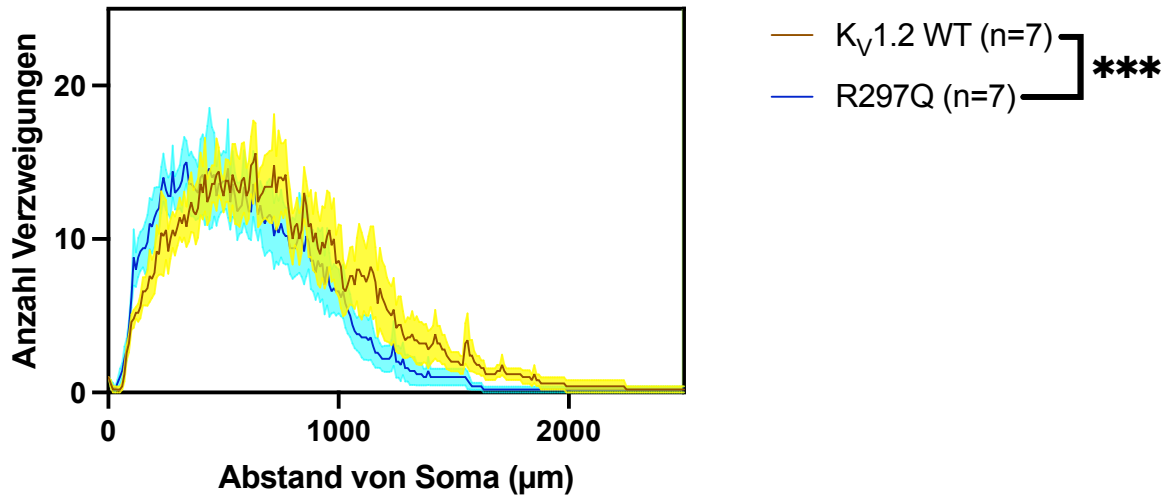


Abbildung 25: Sholl Analyse kortikaler $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter Neurone im Alter von DIV 10-15.

Gezeigt wird die Sholl Analyse $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierter kortikaler Neurone. Es konnte eine statistisch signifikant höhere Anzahl neuronaler Verzweigungen bei $K_V1.2$ WT- ($AUC \pm SD: 13.659 \pm 361$, $n=7$) im Vergleich zu R297Q-transduzierten Neuronen (11.919 ± 326 , $n=7$) beobachtet werden ($***p < 0,001$). Als statistischer Test wurden die AUCs aller Kurven ermittelt und mittels t-Tests für unabhängige Stichproben verglichen.

3.5. Sholl Analyse hippocampaler primärer GFP- bzw. $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone

Bei der Sholl Analyse sollte untersucht werden, ob sich die Anzahl der Verzweigungen der rekonstruierten transfizierten Neurone je nach $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-Variante im Vergleich zur GFP-Kontrollgruppe unterscheidet bzw. welche Effekte die untersuchten $K_V1.2$ -Kanalblocker auf die Ausbildung von neuronalen Verzweigungen haben. Hierfür wurden Mausekulturen aus dem Hippokampus des Mausstamms C57BL/6NCrl an Tag E18, wie unter 2.2.2.2. im Methodenteil genauer beschrieben, auf vorbehandelten Deckgläschen ausgesät und nach 4 Tagen in Kultur (DIV 4) mit verschiedenen Plasmiden des pcDNA3.1-Vektors transfiziert. Die Vektoren enthielten entweder die cDNA von $K_V1.2$ WT und GFP (Verbindung über pIRES-Site), bzw. cDNA von $K_V1.2$ -R297Q (GOF) und GFP oder nur GFP allein.

Da die Transduktionseffizienz im Kortex so hoch war und die neuronalen Verzweigungen und Dendritenausläufer der einzelnen Neurone nicht ausreichend voneinander abgegrenzt werden konnten, wurden als nächstes hippocampale Neurone mit GFP-

bzw. $K_v1.2$ WT- und R297Q-Kanälen transfiziert. Durch die vergleichsweise geringere Transfektionseffizienz wurde die Sholl Analyse einzelner Neurone ermöglicht.

Analog zum 3.4. wurde zuerst die Transfektionseffizienz und das neuronale Wachstum mikroskopisch untersucht. Hierfür wurden ebenfalls Übersichtsbilder aufgenommen. Eine exemplarische Darstellung von Übersichtsbildern (20-fache Vergrößerung) von GFP- bzw. $K_v1.2$ WT- oder R297Q-transfizierten hippocampalen Neuronen sowie $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone (DIV 10-14) nach Langzeitbehandlung mit 150 nM Conotoxin κ M-R111J ist in Abbildung 24 gezeigt. Zu sehen ist eine deutlich geringere Zellzahl sowie eine geringere Anzahl dendritischer Verzweigungen bei $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierten Neuronen im Vergleich zur GFP-Kontrollgruppe (jeweils DIV 10-14). Ein signifikanter Unterschied des Zellüberlebens zwischen langzeitbehandelten und unbehandelten $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierten Neuronen zeigte sich weder bei Tityustoxin, noch bei Conotoxin κ M-R111J oder 4-AP.

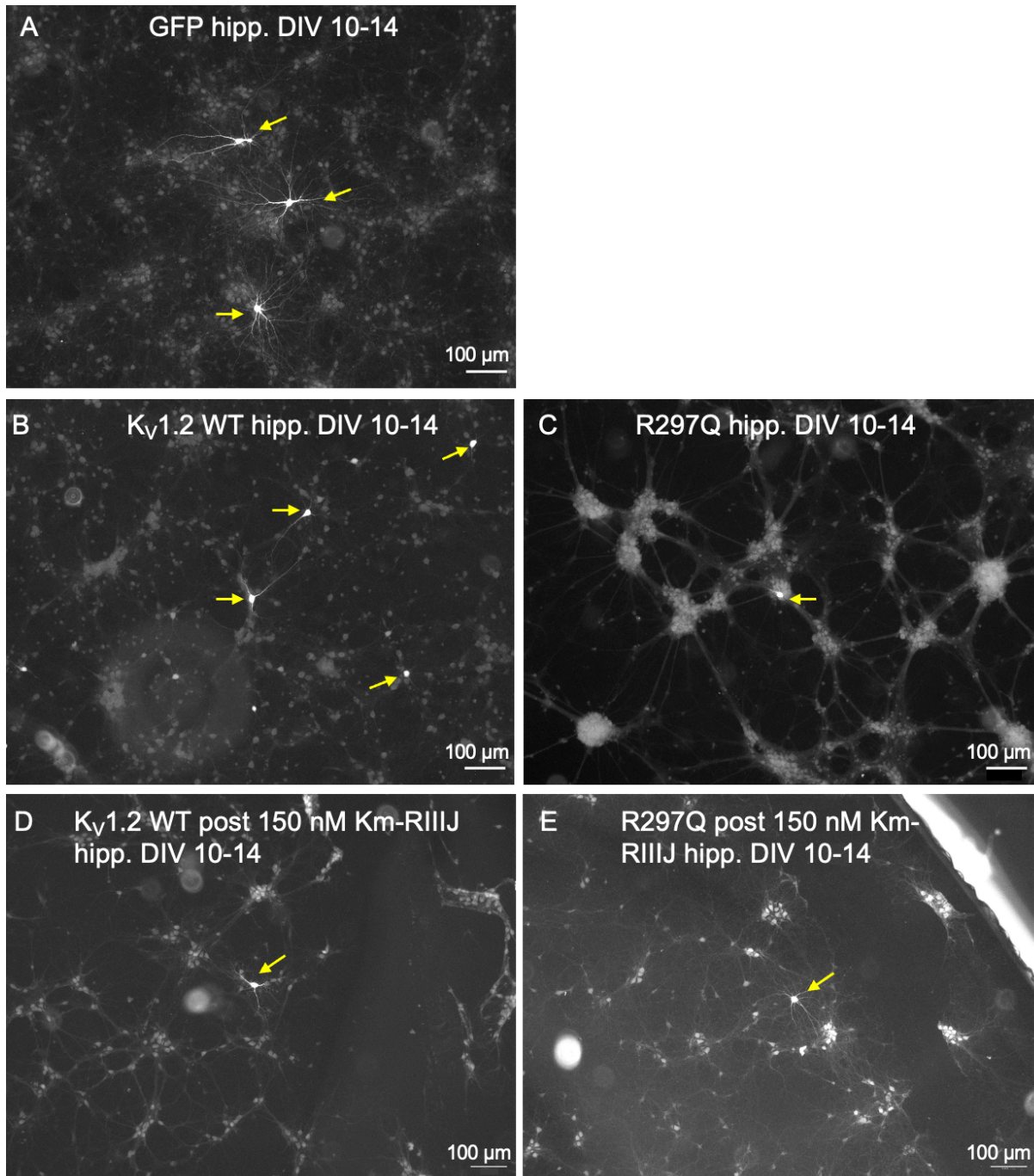


Abbildung 26: Exemplarische Darstellung von Übersichtsbildern (20-fache Vergrößerung) von GFP/Kv1.2 WT/R297Q-transfizierten hippocampalen Neuronen (DIV 10-14) mit und ohne Langzeitbehandlung mit 150 nM Conotoxin κ M-R111J.

Im Alter von DIV 10-14 konnte eine signifikant kleinere Anzahl neuronaler Verzweigungen bei Kv1.2 WT- bzw. R297Q-transfizierten Neuronen (AUC \pm SD: 19.318 ± 462 , n=7 bzw. 18.946 ± 665 , n=7) im Vergleich zur GFP-transfizierten Kontrollgruppe (AUC \pm SD: 23.925 ± 410 , n=8) beobachtet werden (jeweils ****p<0,0001). Die R297Q-Variante (18.946 ± 665 , n=7) zeigte im Vergleich zu Kv1.2 WT-transfizierten Neuronen (19.318 ± 462 , n=7) eine etwas geringere Anzahl neuro-

neraler Verzweigungen ($p > 0,05$). Als statistischer Test wurde eine Einfaktor-ANOVA der jeweiligen AUCs durchgeführt.

Sholl Analyse GFP- bzw. $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone DIV 10-14 (Hippocampus)

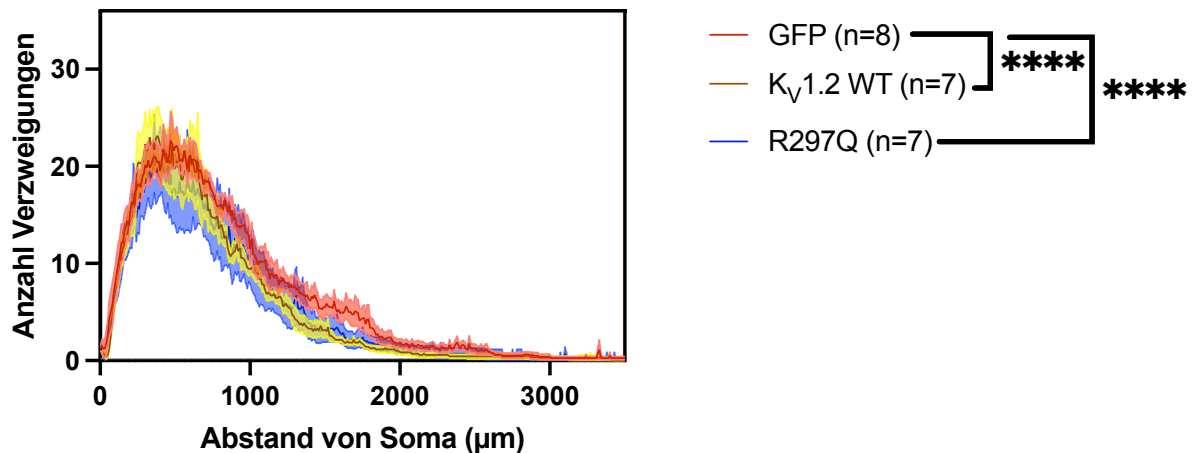


Abbildung 27: Sholl Analyse hippocampaler GFP- bzw. $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone im Alter von DIV 10-14.

Bei $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierten Neuronen ($AUC \pm SD$: 19.318 ± 462 , $n=7$ bzw. 18.946 ± 665 , $n=7$) im Vergleich zur GFP-transfizierten Kontrollgruppe (23.925 ± 410 , $n=8$) konnte eine signifikant kleinere Anzahl neuronaler Verzweigungen ermittelt werden ($****p < 0,0001$). Im Vergleich zu $K_V1.2$ WT-transfizierten Neuronen zeigte die R297Q-Variante eine etwas geringere Anzahl neuronaler Verzweigungen ($p > 0,05$). Im Rahmen der statistischen Auswertung der Daten wurden die AUCs aller Kurven berechnet und mit Hilfe einer Einfaktor-ANOVA verglichen.

3.5.1. Sholl Analyse: hippocampale neuronale murine Primärkulturen nach Langzeitbehandlung mit $K_V1.2$ -Blockern

3.5.1.1. Sholl Analyse: rekonstruierter hippocampaler GFP- bzw. $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone nach Langzeitbehandlung mit Tityustoxin

Um ggfs. signifikante Unterschiede des neuronalen Wachstums rekonstruierter hippocampaler GFP- bzw. $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Mausneurone mit bzw. ohne Langzeitbehandlung mit Tityustoxin untersuchen zu können, wurde eine Sholl Analyse durchgeführt. Hierbei wurde die Anzahl neuronaler Verzweigungen pro Abstand vom Soma (in μm) dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde eine Einfaktor-ANOVA der berechneten AUCs durchgeführt.

Im Rahmen der Datenauswertung der Sholl Analyse rekonstruierter hippocampaler $K_V1.2$ WT-transfizierter Mausneurone konnte im Alter von DIV 10-14 nach Langzeitbehandlung mit 10 nM Tityustoxin TsTx- K_α ($AUC \pm SD$: 23.229 ± 825 , $n=8$) eine hoch

signifikante Zunahme an neuronalen Verzweigungen verglichen mit unbehandelten $K_v1.2$ WT-transfizierten Neuronen (19.318 ± 462 , $n=7$) beobachtet werden (**** $p<0,0001$). Der Toxineffekt auf die Ausbildung neuronaler Verzweigungen wurde insbesondere deutlich durch den fehlenden Unterschied in der Anzahl neuronaler Verzweigungen verglichen mit der GFP-transfizierten Kontrollgruppe (23.925 ± 410 , $n=8$) ($p>0,05$) (Abbildung 30 A). Bei $K_v1.2$ WT-transfizierten Neuronen hingegen zeigte sich nach Langzeitbehandlung mit 20 nM Tityustoxin TsTx- K_α (32.526 ± 806 , $n=7$) verglichen mit unbehandelten Neuronen mit $K_v1.2$ WT-Überexpression (19.318 ± 462 , $n=7$) bzw. GFP-transfizierten Kontrollneuronen (23.925 ± 410 , $n=8$) jeweils eine signifikant größere Anzahl neuronaler Verzweigungen (**** $p<0,0001$).

An DIV 10-14 wurde trotz Langzeitbehandlung der R297Q-transfizierten Neurone mit 10 nM Tityustoxin (19.622 ± 563 , $n=7$) eine deutliche kleinere Anzahl neuronaler Verzweigungen im Vergleich zur GFP-Kontrollgruppe (23.925 ± 410 , $n=8$) ermittelt (**** $p<0,0001$) (Abb. 30 B). Ebenfalls konnte nach Langzeitbehandlung mit 10 nM Tityustoxin (19.622 ± 563 , $n=7$) im Vergleich zu den unbehandelten R297Q-transfizierten Neuronen (18.946 ± 665 , $n=7$) etwas mehr neuronale Verzweigungen beobachtet werden. Der Unterschied war nicht signifikant ($p>0,05$).

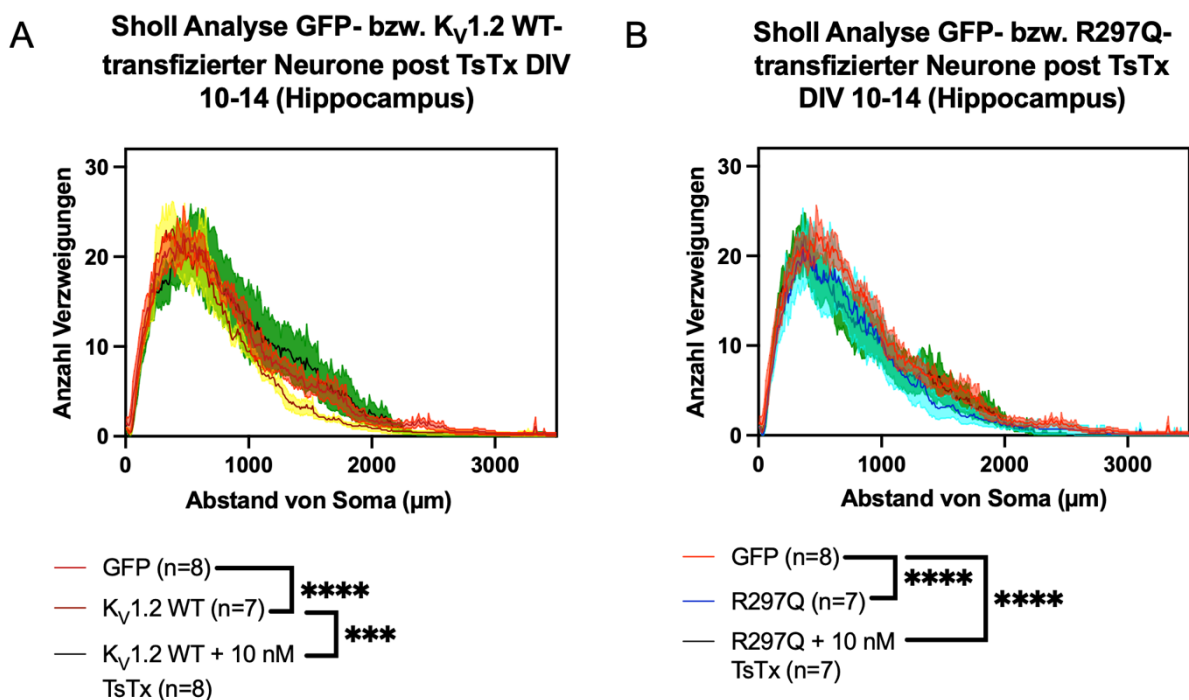


Abbildung 28: Sholl Analyse rekonstruierter hippocampaler GFP- bzw. $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone nach Langzeitbehandlung mit Tityustoxin im Alter von DIV 10-14 (A und B).

Dargestellt ist die Sholl Analyse rekonstruierter hipp. GFP- bzw. Kv1.2 WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone nach Langzeitbehandlung mit Tityustoxin. In (A) wird der hoch-signifikante Effekt des Tityustoxins auf Kv1.2 WT-transfizierte Neurone im Alter von DIV 10-14 dargestellt. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Anzahl neuronaler Verzweigungen nach Langzeitbehandlung Kv1.2 WT-transfizierter Neurone ($AUC \pm SD: 23.229 \pm 825, n=8$) verglichen mit unbehandelten ($19.318 \pm 462, n=7$) ($***p<0,001$) bzw. ein fehlender Unterschied der Anzahl neuronaler Verzweigungen verglichen mit GFP-transfizierten Kontrollneuronen ($23.925 \pm 410, n=8$) ($p>0,05$). In (B) ist die statistisch signifikant kleinere Anzahl neuronaler Verzweigungen der R297Q-transfizierten Neurone nach Langzeitbehandlung mit 10 nM TsTx-K α ($19.622 \pm 563, n=7$) verglichen mit der GFP-transfizierten Kontrollgruppe ($23.925 \pm 410, n=8$) ($****p<0,0001$), sowie der fehlende Unterschied der Anzahl neuronaler Verzweigungen verglichen mit unbehandelten R297Q-transfizierten Neuronen ($18.946 \pm 665, n=7$) dargestellt ($p>0,05$). Für die statistische Auswertung wurde eine Einfaktor-ANOVA der berechneten AUCs durchgeführt.

3.5.1.2. Sholl Analyse: rekonstruierter hippocampaler GFP- bzw. Kv1.2 WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone nach Langzeitbehandlung mit Conotoxin κ M-R111J

Eine Sholl Analyse wurde durchgeführt, um eventuell vorhandene signifikante Unterschiede des neuronalen Wachstums rekonstruierter hippocampaler primärer GFP- bzw. Kv1.2 WT- bzw. R297Q-transfizierter Mausneurone mit bzw. ohne Langzeitbehandlung mit Conotoxin κ M-R111J untersuchen zu können. Hierfür wurde die Anzahl neuronaler Verzweigungen pro Abstand vom Soma (in μ m) dargestellt. Die berechneten AUCs aller Kurven wurden mittels Einfaktor-ANOVA miteinander verglichen.

An DIV 10-14 wurde bei Kv1.2 WT-transfizierten Neuronen nach Langzeitbehandlung mit 75 bzw. 150 nM Conotoxin κ M-R111J ($33.118 \pm 546, n=7$ bzw. $30.865 \pm 651, n=7$) sowohl beim Vergleich mit unbehandelten Kv1.2 WT-transfizierten Neuronen ($19.318 \pm 462, n=7$) als auch verglichen mit der GFP-Kontrollgruppe ($23.925 \pm 410, n=8$) eine signifikant höhere Anzahl neuronaler Verzweigungen gezeigt (jeweils $****p<0,0001$) (Abbildung 31 A). Bei Kv1.2 WT-transfizierten Neuronen nach Langzeitbehandlung mit 150 nM verglichen mit denen nach 75 nM Conotoxin κ M-R111J wurden signifikant weniger neuronale Verzweigungen ermittelt ($*p<0,05$).

Ebenso konnte nach Langzeitbehandlung R297Q-transfizierter Neurone mit 75 nM Conotoxin κ M-R111J ($AUC \pm SD: 27.056 \pm 1152, n=7$) im Rahmen der Datenauswertung der Sholl Analyse rekonstruierter hippocampaler Mausneurone eine signifikant höhere Anzahl neuronaler Verzweigungen verglichen mit der GFP-transfizierten Kontrollgruppe ($23.925 \pm 410, n=8$) sowie unbehandelten R297Q-transfizierten Neuronen ($18.946 \pm 665, n=7$) ermittelt werden ($*p<0,05$ bzw. $****p<0,0001$) (Abbildung 31 B). Nach Langzeitbehandlung R297Q-transfizierter Neurone mit 150 nM

Conotoxin κ M-R111J (24.884 ± 574 , $n=7$) konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl neuronaler Verzweigungen im Vergleich zur GFP-transfizierten Kontrollgruppe (23.925 ± 410 , $n=8$) gezeigt werden ($p>0,05$). Verglichen mit unbehandelten R297Q-transfizierten Neuronen (18.946 ± 665 , $n=7$) konnte nach Langzeitbehandlung R297Q-transfizierter Neurone mit 150 nM Conotoxin κ M-R111J (24.884 ± 574 , $n=7$) erneut eine signifikant höhere Anzahl neuronaler Verzweigungen ermittelt werden ($****p<0,0001$). Bei R297Q-transfizierten Neuronen nach Langzeitbehandlung mit 150 nM verglichen mit denen nach 75 nM Conotoxin κ M-R111J wurden etwas weniger neuronale Verzweigungen ermittelt. Der Unterschied war nicht signifikant ($p>0,05$).

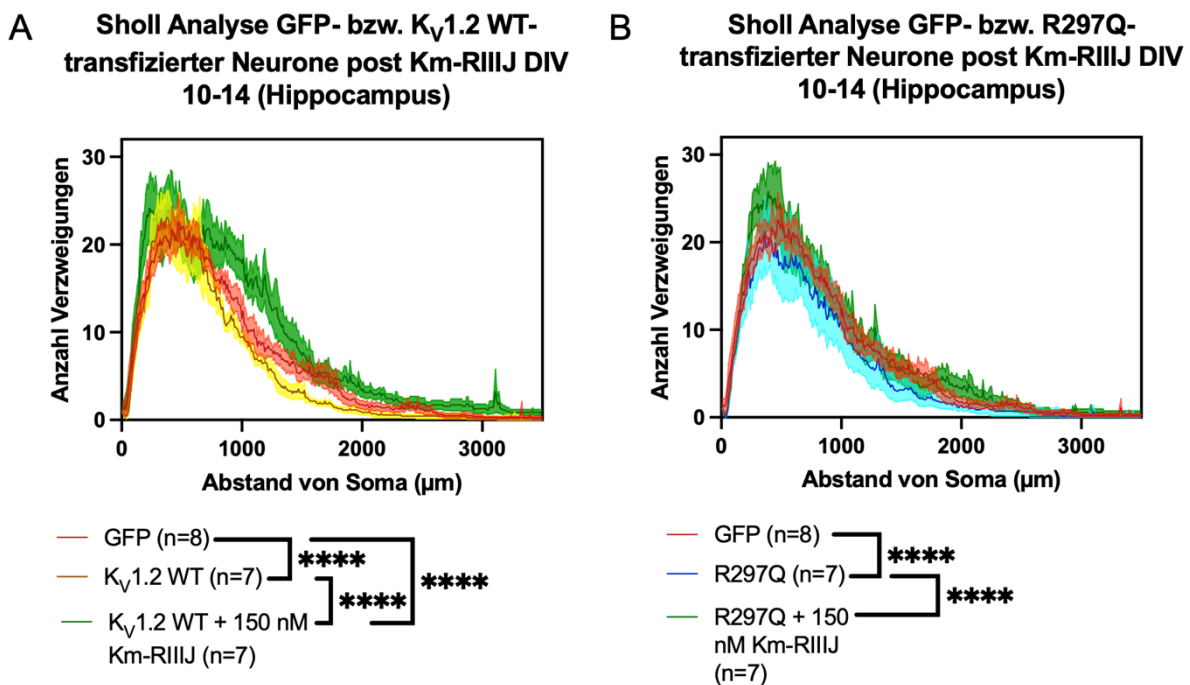


Abbildung 29: Sholl Analyse hippokampaler GFP/ $K_v1.2$ WT/R297Q-transfizierter Neurone nach Langzeit-behandlung mit Conotoxin κ M-R111J (DIV 10-14).

Gezeigt wird die Sholl Analyse rekonstruierter hipp. GFP- bzw. $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone nach Langzeitbehandlung mit Conotoxin κ M-R111J. In (A) wird der hoch-signifikante Effekt des Conotoxins κ M-R111J auf $K_v1.2$ WT-transfizierte Neurone im Alter von DIV 10-14 dargestellt. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Anzahl neuronaler Verzweigungen nach Langzeitbehandlung $K_v1.2$ WT-transfizierter Neurone ($AUC \pm SD$: 30.865 ± 651 , $n=8$) verglichen mit unbehandelten Neuronen mit $K_v1.2$ WT-Überexpression (19.318 ± 462 , $n=7$) sowie verglichen mit GFP-transfizierten Kontrollneuronen (23.925 ± 410 , $n=8$) ($****p<0,0001$). In (B) wird die deutliche Zunahme der Anzahl neuronaler Verzweigungen nach Langzeitbehandlung R297Q-transfizierten Neurone mit 150 nM Conotoxin κ M-R111J (24.884 ± 574 , $n=7$) verglichen mit unbehandelten R297Q-transfizierten Neurone (19.318 ± 462 , $n=7$) ($****p<0,0001$) bzw. ein nicht-signifikanter Unterschied der Anzahl neuronaler Verzweigungen verglichen mit GFP-transfizierten Kontrollneuronen (23.925 ± 410 , $n=8$) ($p>0,05$) gezeigt. Für die statistische Auswertung wurde eine Einfaktor-ANOVA der berechneten AUCs durchgeführt.

3.5.1.3. Sholl Analyse: hippocampale neuronale murine Primärkulturen mit 4-Aminopyridin

Um ggfs. vorhandene Unterschiede des neuronalen Wachstums rekonstruierter hippocampaler primärer GFP- bzw. Kv1.2 WT- bzw. R297Q-transfizierter Mausneurone mit bzw. ohne Langzeitbehandlung mit 4-Aminopyridin (4-AP) untersuchen zu können, wurde eine Sholl Analyse durchgeführt. Hierbei wurde die Anzahl neuronaler Verzweigungen pro Abstand vom Soma (in μm) dargestellt. Die statistische Auswertung wurde mittels Einfaktor-ANOVA der berechneten AUCs durchgeführt.

Im Alter von DIV 10-14 konnte bei Kv1.2 WT-transfizierten Neuronen nach Langzeitbehandlung mit 100 μM 4-AP (AUC \pm SD: 14.758 ± 389 , $n=7$) eine signifikant kleinere Anzahl neuronaler Verzweigungen sowohl im Vergleich zur GFP-transfizierten Kontrollgruppe (23.925 ± 410 , $n=8$), als auch verglichen mit unbehandelten Neuronen mit Kv1.2 WT-Überexpression (19.318 ± 462 , $n=7$) ermittelt werden (jeweils **** $p<0,0001$) (Abbildung 32 A).

Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei R297Q-transfizierten Neuronen nach Langzeitbehandlung mit 100 μM 4-AP (19.491 ± 551 , $n=7$) eine etwas höhere Anzahl neuronaler Verzweigungen verglichen mit unbehandelten R297Q-transfizierten Neuronen (18.946 ± 665 , $n=7$) ($p>0,05$). Der Effekt von 4-AP war jedoch nicht ausreichend groß, sodass verglichen mit der GFP-Kontrollgruppe (23.925 ± 410 , $n=8$) ($p>0,05$) bei der R297Q-Variante nach Langzeitbehandlung mit 100 μM 4-AP (18.946 ± 665 , $n=7$) eine signifikant kleinere Anzahl neuronaler Verzweigungen ermittelt wurde (**** $p<0,0001$) (Abbildung 32 B).

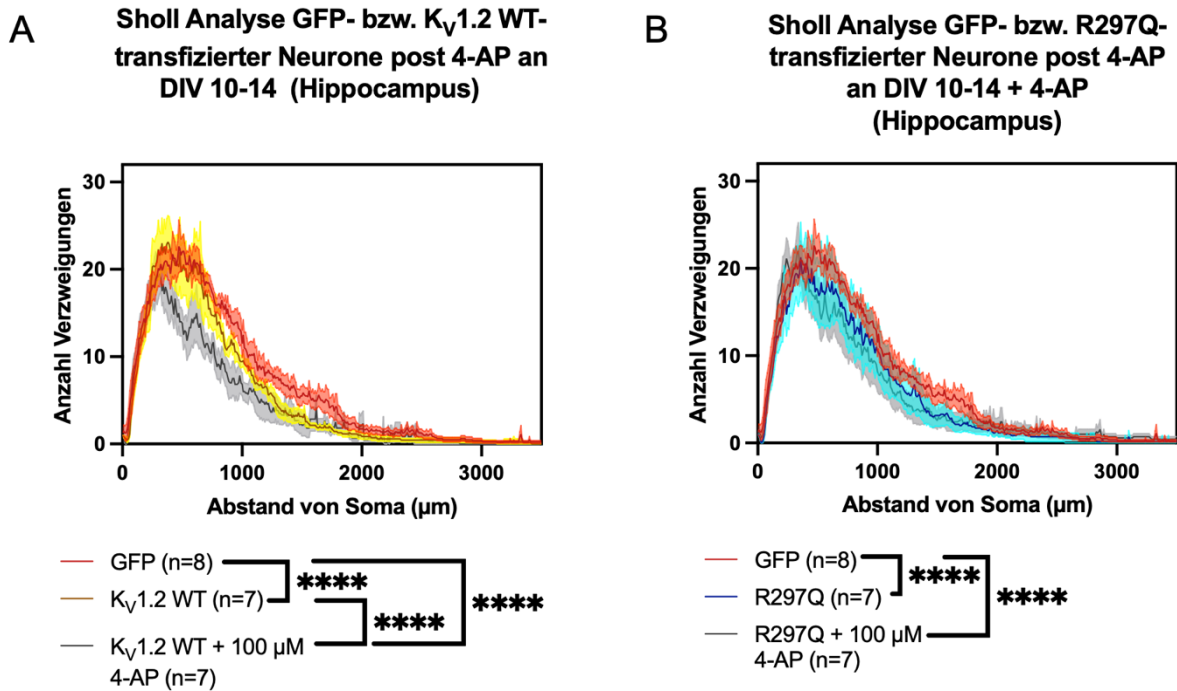


Abbildung 30: Sholl Analyse hippocampaler GFP- bzw. $K_v1.2$ WT- (A) bzw. R297Q-transfizierter Neurone (B) im Alter von DIV 10-14 nach Langzeitbehandlung mit 4-AP.

Dargestellt ist die Sholl Analyse rekonstruierter hipp. GFP- bzw. $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone nach Langzeitbehandlung mit 4-AP. (A) zeigt eine deutlich reduzierte Anzahl neuronaler Verzweigungen nach Langzeitbehandlung $K_v1.2$ WT-transfizierter Neurone (AUC \pm SD: 14.758 ± 389 , $n=8$) mit 100 μ M 4-AP verglichen mit unbehandelten Neuronen mit $K_v1.2$ WT-Überexpression (19.318 ± 462 , $n=7$) sowie verglichen mit GFP-transfizierten Kontrollneuronen (23.925 ± 410 , $n=8$) ($****p < 0,0001$). In (B) wird die Zunahme der Anzahl neuronaler Verzweigungen nach Langzeitbehandlung R297Q-transfizierter Neurone mit 100 μ M 4-AP (19.491 ± 551 , $n=7$) verglichen mit unbehandelten R297Q-transfizierten Neurone (19.318 ± 462 , $n=7$) ($p > 0,05$) bzw. die signifikant kleinere Anzahl neuronaler Verzweigungen verglichen mit GFP-transfizierten Kontrollneuronen (23.925 ± 410 , $n=8$) ($****p < 0,0001$) gezeigt. Für die statistische Auswertung wurde eine Einfaktor-ANOVA der berechneten AUCs durchgeführt.

Zusammengefasst zeigen sich sowohl bei $K_v1.2$ WT- als auch bei R297Q-transfizierten Neuronen eine signifikante Reduktion neuronaler Verzweigungen verglichen mit der GFP-Kontrollgruppe (jeweils DIV 10-14). Durch Langzeitbehandlung mit $K_v1.2$ -Blockern lassen sich diese morphologischen Veränderungen (zum Teil) antagonisieren, sodass sich die Anzahl der neuronalen Verzweigungen wieder der der GFP-Kontrollneurone annähert.

3.6. Untersuchung der Funktionalität der hippocampaler GFP/K_v1.2 WT/R297Q-transfizierter Neurone

Da sich die jeweiligen K_v1.2-Kanalblocker bei den langzeitbehandelten Neuronen nicht in der Extrazellulärlösung der Patch Clamp-Experimente befand, wird in dem folgenden Abschnitt lediglich die Funktionalität der Neurone post Expositionem untersucht.

3.6.1. Analyse von Ruhemembranpotential und Eingangswiderstand in primären murinen hippocampalen Neuronen

Um die Funktionalität der Neurone sowie die Auswirkungen der spezifischen Blockade des K_v1.2-Kanals an Neuronen zu untersuchen, wurden in einem nächsten Schritt die Ruhemembranpotentiale und Eingangswiderstände von transfizierten Neuronen nach Exposition der in CHO Zellen charakterisierten Toxinen gemessen. Hierfür wurden Mauskulturen aus dem Hippocampus des Mausstamms C57BL/6NCrl an Tag E18, wie unter 2.2.2.2. im Methodenteil genauer beschrieben, auf vorbehandelten Deckgläschen ausgesät und am 4. Tag in Kultur (DIV 4) mit verschiedenen Plasmiden des pcDNA3.1-Vektors transfiziert. Die Vektoren enthielten entweder die cDNA von K_v1.2 WT und GFP (Verbindung über pIRES-Site), bzw. cDNA von K_v1.2-R297Q (GOF) und GFP oder nur GFP allein.

Für die Untersuchung der Funktionalität wurden zunächst RMP und IR untersucht. Das RMP wurde über einen Zeitraum von 2 Minuten mit der Whole Cell Patch Clamp-Methode im Current Clamp-Modus ohne die Injektion eines Stroms unmittelbar nach Öffnen der Zelle abgeleitet. Der IR wurde aus den gemessenen Membranspannungen berechnet, die bei einer episodischen Stimulation des untersuchten Neurons mit zunehmend hyperpolarisierten Strominjektionen aufgezeichnet wurden.

Freundlicherweise hat Frau Elisabeth Brand, eine wissenschaftliche Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe, einige Messungen zum RMP der K_v1.2 WT-transfizierten Neurone durchgeführt.

Ein signifikant hyperpolarisiertes Membranpotential konnte bei der Analyse der Unterschiede der RMPs bei R297Q-transfizierten hippocampalen Mausneuronen ($-62,2 \pm 2,3$ mV, n=5) verglichen mit GFP-transfizierten Kontrollneuronen ($-51,8 \pm 3,2$, n=7) an DIV 10-14 beobachtet werden (*p<0,05) (Abbildung 31 A). Zwischen GFP- ($-51,8 \pm 3,2$, n=7) und K_v1.2 WT-transfizierten Neuronen¹ ($-54 \pm 2,8$, n=5) bestand an DIV 10-14 kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen RMPs (p>0,05). Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede der IRs K_v1.2 WT- bzw.

R297Q-transfizierter hipp. Neurone (Mittelwert \pm SEM: $313,4 \pm 25,2$, $n=5$ bzw. $235,1 \pm 42,6$, $n=5$) verglichen mit der GFP-transfizierten Kontrollneuronen ($280,9 \pm 39,8$, $n=7$) ermittelt werden (jeweils $p > 0,05$) (Abbildung 31 B). Als statistisches Mittel wurde eine Einfaktor-ANOVA durchgeführt.

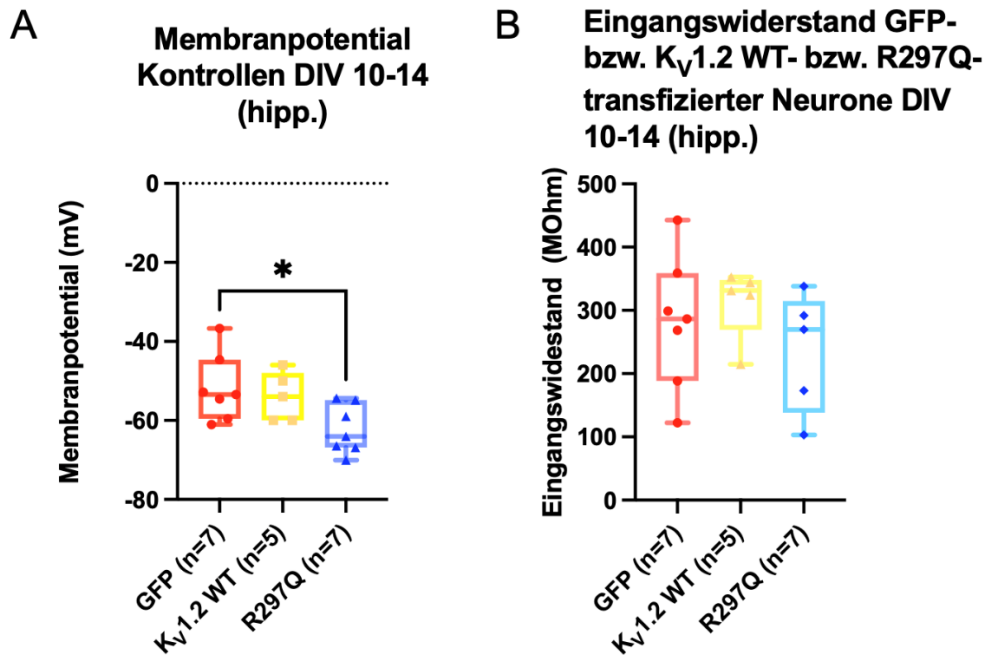


Abbildung 31: RMPs (A) und IRs (B) hippocampaler GFP- bzw. Kv1.2 WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone DIV 10-14¹.

Dargestellt sind Box-Dot-Plot-Diagramme der RMPs GFP- bzw. Kv1.2 WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone an DIV 10-14 (A). Ein signifikant hyperpolarisiertes RMP konnte bei der Analyse der Unterschiede der RMPs R297Q-transfizierter Neurone ($-62,2 \pm 2,3$, $n=5$) verglichen mit der GFP-Kontrollgruppe ($-51,8 \pm 3,2$, $n=7$) aufgezeichnet werden ($*p < 0,05$). Zwischen GFP- ($-51,8 \pm 3,2$, $n=7$) und Kv1.2 WT-transfizierten Neuronen ($-54 \pm 2,8$, $n=5$) bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den ermittelten RMPs ($p > 0,05$). Zudem konnten keine signifikanten Unterschiede der IRs (B) Kv1.2 WT- ($n=5$) bzw. R297Q-transfizierter hippocampaler Neurone ($n=5$) verglichen mit der GFP-Kontrolle ($n=7$) aufgezeichnet werden (jeweils $p > 0,05$). Als statistischer Test wurde jeweils eine Einfaktor-ANOVA durchgeführt.

3.6.2. Erregbarkeit hippocampaler GFP- bzw. Kv1.2 WT- bzw. R297Q-transfizierter muriner Neurone

Die Datenanalyse der Erregbarkeit hippocampaler GFP- bzw. Kv1.2 WT- bzw. R297Q-transfizierter muriner Neurone erfolgte durch systematisches Auszählen aller aufgezeichneten Aktionspotentiale nach verschiedenen Strominjektionen. Als statistischer

¹ Die elektrophysiologischen Messungen der Kv1.2 WT-transfizierten hippocampalen Neurone DIV 10-14 (ohne Toxinbehandlung) wurden von Frau Elisabeth Brand, einer wissenschaftlichen Mitarbeiterin der AG Lerche, durchgeführt.

Test wurden die AUCs aller Kurven berechnet und mittels Einfaktor-ANOVA verglichen.

In Abbildung 33 ist exemplarisch das Feuerungsverhalten von GFP- bzw. $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierten hippokampalen Neuronen gezeigt. In Abb. 31 D und E ist zusätzlich der Effekt der Langzeitbehandlung mit 10 nM TsTx- $K\alpha$ dargestellt.

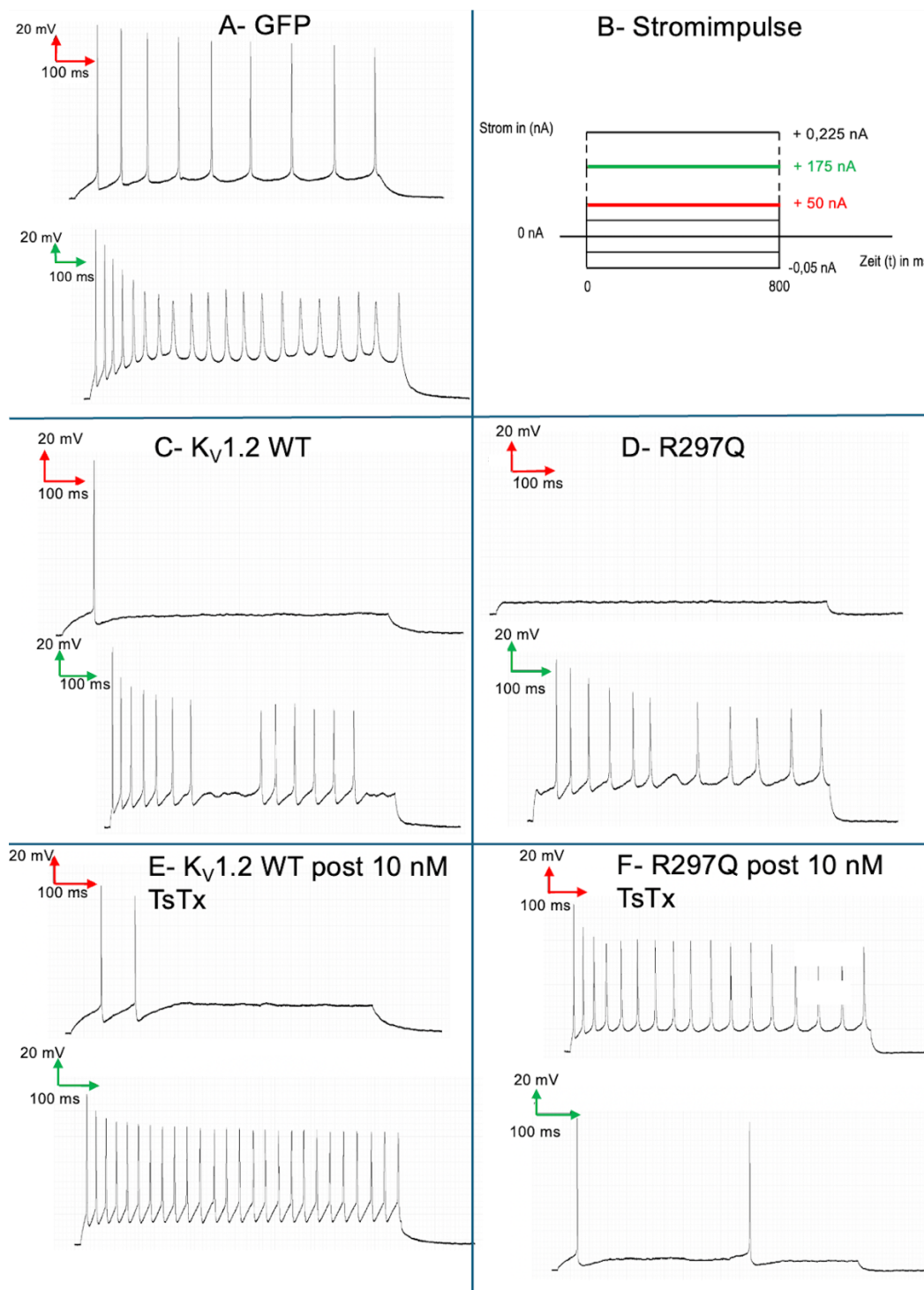


Abbildung 32: Exemplarische Darstellung des Feuerungsverhaltens GFP- bzw. $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone bei 50 bzw. 175 pA Strominjektion.

(A) zeigt die APs eines Neurons der GFP-Kontrollgruppe an DIV 10-14, (C) und (E) zeigen die APs eines K_v1.2 WT-transfizierten Neurons ohne (C) bzw. mit (E) Langzeitbehandlung mit 10 nM TsTx-K α (jeweils an DIV 10-14). (D) und (F) zeigen die APs ein R297Q-transfiziertes Neuron ohne (D) bzw. mit (F) Langzeitbehandlung mit 10 nM TsTx-K α (jeweils DIV 10-14). Aufgezeichnet wurden die APs im Current Clamp-Modus bei einem injizierten Strom von 50 (rot) bzw. 175 pA (grün) (B).

Es konnten etwas weniger APs in hippocampalen Neuronen mit K_v1.2 WT-Überexpression an DIV 10-14 (AUC \pm SD: 2.113 \pm 251, n=7) verglichen mit denen der GFP-transfizierten Kontrollneuronen (2.218 \pm 257, n=7) ausgezählt werden. Verglichen mit der R297Q-Variante (1.305 \pm 221, n=7) konnten etwas höhere AP-Frequenzen aufgezeichnet werden. Die Unterschiede waren jeweils nicht signifikant (p>0,05). Bei Neuronen mit Expression der R297Q-Variante (1693 \pm 294, n=7) im Alter von DIV 10-14 wurden im Vergleich zu GFP-transfizierten Kontrollneuronen deutlich weniger APs aufgezeichnet (*p<0,05) (Abbildung 34).

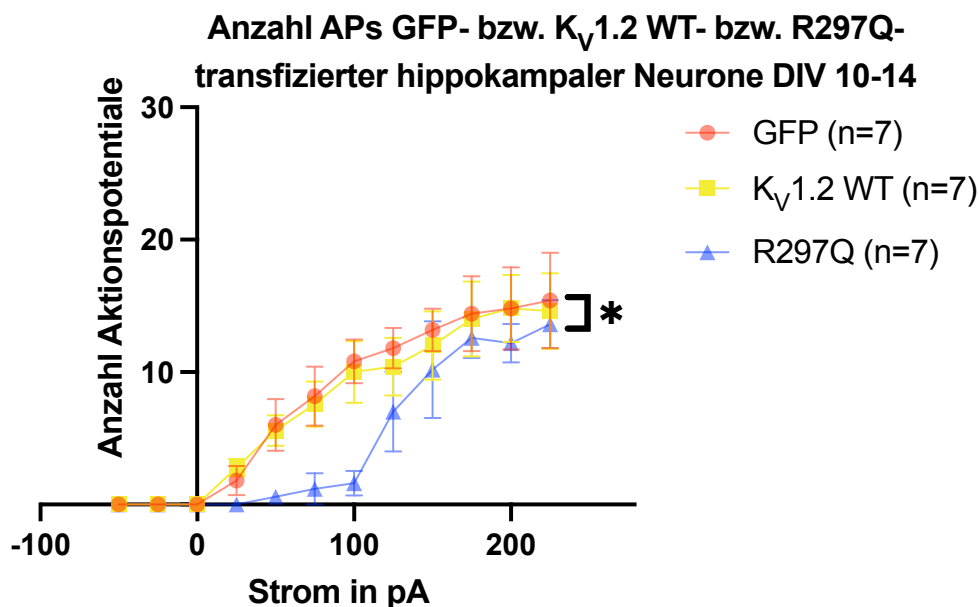


Abbildung 33: Anzahl Aktionspotentiale in Abhängigkeit vom injizierten Strom, gemessen in mit GFP- bzw. K_v1.2 WT- oder R297Q-transfizierten hippocampalen Neuronen an DIV 10-14.

Dargestellt sind Input-Output-Kurven GFP- bzw. K_v1.2 WT- bzw. R297Q-transfizierter Neurone an DIV 10-14. Es wurde eine signifikant kleinere Anzahl APs bei R297Q-transfizierter Neuronen (AUC \pm SD: 1.305 \pm 221, n=7) verglichen mit GFP-Kontrollneuronen (2.218 \pm 257, n=7) aufgezeichnet (*p<0,05). Verglichen mit K_v1.2 WT-transfizierten Neuronen (2.113 \pm 251, n=7) wurde kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der APs ermittelt (p>0,05). Als statistischer Test wurden die AUCs aller Kurven berechnet und mittels Einfaktor-ANOVA verglichen.

4. Diskussion

Ziel des Projektes war die Beantwortung folgender Fragen:

- Welche elektrophysiologischen und morphologischen Veränderungen in murinen hippokampalen und kortikalen Neuronen können bei Überexpression von WT und „gain of function“-Mutationen (GOF) in $K_v1.2$ -Kanälen durch transiente Transfektionen in CHO Zellen und gewebespezifischen murinen primären Neuronen aus dem Hippokampus und Kortex beobachtet werden?
- Machen selektive $K_v1.2$ -Ionenkanalblocker eine Intervention der ggfs. pathogenen Effekte der o.g. $K_v1.2$ -Varianten in den untersuchten Zelltypen möglich?

4.1. $K_v1.2$ -Kanalhemmung in CHO Zellen

Durch die akute Gabe von 20 nM Tityustoxin, bzw. 150 nM Conotoxin κM -RIIIJ konnte in den hier durchgeführten Experimenten 5 min nach Gabe der Toxine in die Extrazellulärlösung eine spezifische Blockade der $K_v1.2$ WT-Kanäle in CHO Zellen nachgewiesen werden. Diese selektive Hemmung der $K_v1.2$ WT-Kanäle konnte, wie in Tabelle 10 dargestellt, an weiteren Zelllinien in unabhängigen Forschungsprojekten ebenfalls beobachtet werden (Baronas et al., 2015), (Werkman et al., 1993), (Chen et al., 2010), (Cordeiro et al., 2019).

Tabelle 12: Messparameter publizierter $K_v1.2$ Kanal-Inhibitoren

Autoren	$K_v1.2$ -Kanal Inhibitor	Zelllinie	Messparameter
Baronas et al. 2015	Tityustoxin	1. Murine Fibroblasten 2. hippokampale Rattenneurone	1. Bindungsaffinität und „pre pulse activation“
Werkmann et al., 1993	Tityustoxin	Murine Fibroblasten	Bindungslokalisation (intra- vs. extrazellulär) und -spezifität
Chen et al., 2010	Conotoxin κM -RIIIJ	Xenopus Oocyten	Aminosäuresequenz ursächlich für Bindungsaffinität zu $K_v1.2$ -Kanälen
Cordeiro et al. 2019	Conotoxin κM -RIIIJ	1. HEK 293-Zellen 2. DRG-Mausneurone	1. Bindungsaffinität (IC_{50}) von homomeren vs. heteromeren K_v1 -Kanälen

			2. Bindungsaffinität zu DRG-Neuronsubklassen
--	--	--	--

Werkman beschrieb die spezifische Tityustoxin-Wirkung an $K_V1.2$ -Kanälen in murinen Fibroblasten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Tityustoxin extrazellulär an $K_V1.2$ -Kanäle bindet (Werkman et al., 1993). Baronas bestätigte die experimentelle Testung der Spezifität von Tityustoxin an $K_V1.2$ -Kanälen in Mausfibroblasten sowie in hippokampalen Rattenneuronen (Baronas et al., 2015).

Chen beschrieb die spezifische Wirkung von Conotoxin κM -R111J an $K_V1.2$ -Kanälen in *Xenopus* Oozyten. Hierbei wurde die für die hohe Bindungsaffinität von Conotoxin κM -R111J zu $K_V1.2$ Kanälen ursächliche Aminosäuresequenz identifiziert (Chen et al., 2010). In HEK293-Zellen sowie DRG-Mausneuronen charakterisierte Cordeiro das Conotoxin κM -R111J. Es konnte gezeigt werden, dass Conotoxin κM -R111J insbesondere an aus $K_V1.1/K_V1.2$ - bzw. $K_V1.6/K_V1.2$ -Heteromeren bestehenden Kaliumkanälen bindet. Des Weiteren wurde die Lokalisation der Bindung des Conotoxins an der Kanalpore beschrieben (Cordeiro et al., 2019).

Die sowohl bei 20 nM Tityustoxin, als auch bei 150 nM Conotoxin κM -R111J auftretende, spezifische Hemmung des $K_V1.2$ -Kanals konnte im Rahmen dieses Projekts in CHO Zellen bestätigt werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass 20 nM Tityustoxin und 150 nM Conotoxin κM -R111J $K_V1.1$ - und $K_V1.4$ -Homomere im Vergleich zu $K_V1.2$ -Homomere weniger potent blockierten. Dies bestätigt die o.g. Daten von Baronas und Cordeiro.

4.2. Ruhemembranpotential und Erregbarkeit in primären murinen kortikalen Neuronen während akuter Toxingabe

Vergleichend wurden 10 bzw. 20 nM Tityustoxin und 75 bzw. 150 nM Conotoxin κM -R111J an gewebespezifischen primären Neuronen des Mauskortex ED 18 auf selektive Inhibition homomerer $K_V1.2$ -Kanäle getestet.

Weder bei $K_V1.2$ WT- noch bei R297Q-transduzierten kortikalen Neuronen zeigte sich im Rahmen unserer Experimente 5 min nach Gabe von Tityustoxin eine signifikante Veränderung des RMPs oder des IR. Unerwarteterweise konnte nach Gabe von 10 nM bzw. 20 nM Tityustoxin kein Unterschied in der Anzahl der APs aufgezeichnet werden. Dies ist am ehesten auf eine zu geringe Toxinkonzentration zurückzuführen. Baronas zeigte, dass Homomere $K_V1.2$ -Kanäle durch 100 nM Tityustoxin in

Mausfibroblasten nahezu zu 100% geblockt wurden. In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass 25 nM Tityustoxin den Gesamtkaliumstrom (I_K) von kortikalen Rattenneuronen um bis zu 30% blockiert. 120 nM Tityustoxin blockierte den Gesamtkaliumstrom (I_K) in hippokampalen Rattenneuronen um mehr als 60% (Eccles et al., 1994). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die in unseren Experimenten verwendeten 10 bzw. 20 nM Tityustoxin zu gering waren, um signifikante Veränderungen des RMPs oder der neuronalen Erregung zu verursachen. Die oben zitierten Arbeiten untersuchten eine Toxin Wirkung im Bezug zur Reduktion des Gesamtkaliumstroms (I_K). In diesem Forschungsprojekt wurden die verwendeten Konzentrationen 10 bzw. 20 nM im Bezug zur AP-Frequenz untersucht, bei keine signifikante Veränderung der AP-Frequenz nachgewiesen werden konnte. Die verwendete Tityustoxin-Konzentration von 10 bzw. 20 nM war vergleichsweise niedrig, um die toxischen Effekte der $K_V1.2$ -Kanalblocker während der Langzeitbehandlung möglichst gering zu halten.

Erneut zeigte sich weder bei $K_V1.2$ WT- noch bei R297Q-transduzierten kortikalen Neuronen 5 min nach Gabe von 75 nM bzw. 150 nM Conotoxin κ M-R111J eine signifikante Veränderung des RMPs. Bei $K_V1.2$ WT-transduzierten Neuronen konnte nach Gabe von 75 bzw 150 nM Conotoxin κ M-R111J ein signifikanter Anstieg des IR ermittelt werden. Im Gegensatz hierzu zeigten sich bei R297Q-transduzierten Neuronen keine signifikanten Veränderungen des IRs nach Gabe von 75 bzw. 150 nM Conotoxin κ M-R111J. Wie erwartet, konnte unmittelbar nach Gabe von 75 bzw. 150 nM Conotoxin κ M-R111J sowohl bei $K_V1.2$ WT- als auch bei R297Q-transduzierten kortikalen Neuronen, eine signifikant höhere Anzahl APs aufgezeichnet werden. Bereits 2019 publizierte Daten zu verschiedenen Conotoxin κ M-R111J-Konzentrationen (25 bzw. 75 bzw. 1000 nM) in Ca^{2+} -Signaling-/Imaging-Experimenten an DRG-Mausneuronen konnten das Vor-kommen von $K_V1.1/K_V1.2$ -Heteromeren in DRG-Neuronen nachweisen (Cordeiro et al., 2019). Mit Hilfe von Ca^{2+} -Signaling-/Imaging-Experimenten konnten verschiedene DRG-Neurone klassifiziert und charakterisiert werden (Cordeiro et al., 2019, Giacobassi et al., 2020). Es konnte gezeigt werden, dass DRG-Neurone nach Gabe von 100 bzw. 1000 nM Conotoxin κ M-R111J eine kleinere Aktionspotentialschwelle sowie ein verstärktes Calciumsignal aufwiesen (Giacobassi et al., 2020). Die hier beschriebene AP-Frequenzsteigerung konnte in unseren Experimenten ebenfalls beobachtet werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität von Conotoxin κ M-R111J zu asymmetrischen $K_V1.2$ -

Heteromeren Kaliumkanälen ca. 100x höher ist als zu $K_V1.2$ -Homomeren Kanälen (Cordeiro et al., 2019). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass 300 nM Conotoxin $\kappa M-R111J$ den Gesamtkaliumstrom (I_K) von DRG-Neuronen um bis zu 35% durch Blockade der heteromeren $K_V1.2/K_V1.1$ - bzw. $K_V1.2/K_V1.6$ -Kanäle reduziert (Finol-Urdaneta et al., 2020). Es wurde nicht untersucht, ob die signifikanten Effekte des Conotoxins $\kappa M-R111J$ auf die neuronale Erregbarkeit noch ausgeprägter gewesen wären, wenn höhere Toxinkonzentration getestet worden wären.

4.3. Sholl Analyse primären murinen Neurone

4.3.1. Zellmortalität kortikaler und hippocampaler muriner Neuronenkulturen ohne bzw. nach Toxin-Langzeitbehandlung

Besonders deutlich zeigte sich der pathologische Einfluss durch $K_V1.2$ -Überexpression bzw. bei Expression der R297Q-Variante auf das Überleben der viral transduzierten kortikalen Neurone. Durch Langzeitbehandlung der verschiedenen untersuchten $K_V1.2$ -Kanalblocker wurde dieser Effekt therapeutisch antagonisiert. Möglicherweise lag das hier beobachtete, verstärkte Zellsterben der $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transduzierten Neurone im Sinne einer Apoptose an der deutlich stärkeren Transduktionseffizienz vermutlich einhergehend mit einer stärkeren $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-Expression (Kim and Eberwine, 2010, Li et al., 2023). Der verstärkte K^+ -Ausstrom begünstigt die Diffusion von H_2O zellauswärts. Dies führt möglicherweise zu einem Schrumpfen der betroffenen Nervenzellen. Vermutlich führt dies zu einer verstärkten Apoptose der transduzierten Neurone (Ekhterae et al., 2003, Wang, 2004, Shah et al., 2014). Wahrscheinlich war der zellauswärts gerichtete Kaliumstrom durch die überexprimierten $K_V1.2$ WT-Kanäle kleiner als der Kaliumausstrom der GOF-Variante (Syrbe et al., 2015). Dies würde die höhere Zellmortalität der R297Q-Variante erklären. Für 4-AP wurde bereits gezeigt, dass in Herzmuskelzellen eine anti-apoptotische Wirkung besteht (Ekhterae et al., 2003). Es ist möglich, dass 4-AP auch in Neuronen anti-apoptotisch wirkt. Aufgrund der Blockade der überexprimierten $K_V1.2$ -Kanäle bzw. R297Q-Variante, wäre eine anti-apoptotische chronische Wirkung von Tityus- bzw. Conotoxin $\kappa M-R111J$ in geringen Konzentrationen denkbar. Dies müsste ggfs. in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

Ebenfalls konnte ein deutlicher pathologischer Einfluss bei $K_V1.2$ -Überexpression bzw. bei Expression der R297Q-Variante auf das Überleben der hippocampalen transfizierten Neurone (DIV 10-14) beobachtet werden. Hierbei zeigte sich erneut ins-

besondere bei der R297Q-Variante eine deutliche Reduktion überlebender transfizierter Neurone. Verursacht durch die transfektionsbedingte $K_v1.2$ -Überexpression bzw. Expression der R297Q-Variante, ist der K^+ -Ausstrom verglichen mit dem K^+ -Efflux nicht-transfizierter Neuronen verstärkt. Es ist anzunehmen, dass hierdurch die Apoptose transfizierter Neurone begünstigt wird. Durch Langzeitbehandlung der verschiedenen untersuchten $K_v1.2$ -Kanalblocker wurde dieser Effekt zum Teil antagonisiert. Möglicherweise mitursächlich hierfür ist, neben der o.g. möglichen anti-apoptotischen Wirkung der untersuchten Toxine in geringen Konzentrationen, die im Verlauf nachlassende Expression der $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-Kanäle im Rahmen der transienten Transfektion (Kim and Eberwine, 2010). Mit einer quantitativen Untersuchung (z.B. Western Blot oder qPCR) der $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-Expression an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, hätte der Einfluss der Expression möglicherweise erklärt werden können. Die 11-tägige Toxinbehandlung könnte außerdem die pathologischen Effekte der $K_v1.2$ -Überexpression bzw. R297Q-Expression antagonisiert haben, sodass das neuronale Überleben bis zum Nachlassen der Expression der transfizierten Kanäle stabilisiert werden konnte. Gegebenenfalls haben die im Verlauf auftretende und zunehmende Expression von physiologischen Kaliumkanälen, sowie die lückenlose Behandlungsdauer über 11 Tage hinweg, die neuronale Mortalität positiv beeinflusst (Grosse et al., 2000).

4.3.2. Sholl Analyse primärer kortikaler und hippokampaler Neurone

Im Rahmen der Sholl Analyse konnten signifikante Unterschiede in der Anzahl neuronaler Verzweigungen ermittelt werden. Bereits bei R297Q-transduzierten kortikalen Neuronen zeigten sich deutlich weniger Verzweigungen verglichen mit $K_v1.2$ WT-transduzierten Neuronen. Auch $K_v1.2$ WT- sowie R297Q-transfizierte hippokampale Neurone zeigten an DIV 10-14 im Vergleich zu GFP-Kontrollneuronen deutlich weniger Verzweigungen pro μm Abstand vom Soma. Dieses Fehlen von neuronalen Verzweigungen und die signifikant kleinere Gesamtzelllänge (TDBL = Total Dendritic Branch Length) von $K_v1.2$ WT-transduzierten inhibitorischen Mauseuronen wurde bereits von Li untersucht und publiziert (Li et al., 2023, Li et al., 2024). Unsere Daten unterstützen Li's Hypothese, dass der verstärkte K^+ -Ausstrom eine neuronale Wachstumsretardierung verursacht (Li et al., 2024).

4.3.3. Sholl Analyse hippokampaler neuronaler muriner Primärkulturen nach Langzeitbehandlung mit K_v1.2-Kanalblockern

Nach Langzeitbehandlung mit Tityustoxin konnte bei der Sholl Analyse K_v1.2 WT-transfizierter hippokampaler Neurone (DIV 10-14) ein Angleichen an die Anzahl neuronaler Verzweigungen/ 10 µm Abstand zum Soma der GFP-Kontrollgruppe dargestellt werden. Im Vergleich zu unbehandelten K_v1.2 WT-transfizierten Neuronen zeigte sich ein signifikanter Effekt nach Langzeitbehandlung mit Tityustoxin im Sinne einer signifikant höheren Anzahl neuronaler Verzweigungen. Die Anzahl dendritischer Verzweigungen entsprach derer der GFP-Kontrollneuronen. Bei R297Q-transfizierten Neuronen zeigte sich nach Langzeitbehandlung mit Tityustoxin kein signifikanter Effekt in der Anzahl neuronaler Verzweigungen verglichen mit unbehandelten R297Q-transfizierten Neuronen. Dies lässt vermuten, dass für die R297Q-Variante ggfs. eine höhere Tityustoxin-Konzentration notwendig gewesen wäre, um das neuronale Wachstum an das der gesunden GFP-Kontrollgruppe anzugleichen.

Bei der Auswertung der Sholl Analyse von K_v1.2 WT-transfizierten hippokampalen Neuronen (DIV 10-14) nach Langzeitbehandlung mit 150 nM Conotoxin κM-R111J konnte im Vergleich zu unbehandelten K_v1.2 WT-transfizierten hippokampalen Neuronen sowie zu GFP-transfizierten Kontrollneuronen eine deutlich größere Anzahl neuronaler Verzweigungen beobachtet werden. Bereits für ω-Conotoxine, z.B. ω-MV1C und ω-Agatoxin, konnte eine signifikante Steigerung des neuronalen Dendritenwachstums in Ganglionzellen der Rattenretina gezeigt werden. Dieser Effekt erfolgte durch Blockade von Q- bzw. P-Type Calciumkanälen (Heng et al., 1999). Gegebenenfalls ist bei Conotoxin κM-R111J ebenfalls eine Wirkung auf die Kalziumkanäle denkbar, der diese deutlich größere Anzahl neuronaler Verzweigungen erklären könnte. Diese Fragestellung könnte in weiterführenden Experimenten gezielt untersucht werden. Bei der R297Q-Variante zeigten sich nach Langzeitbehandlung mit Conotoxin κM-R111J in beiden Konzentrationen jeweils ein statistisch signifikanter Effekt im Sinne einer signifikant größeren Anzahl neuronaler Verzweigungen. Hierbei zeigte sich nach Langzeitbehandlung mit 150 nM Conotoxin κM-R111J auch ein Angleichen an das Wachstum der gesunden GFP-Kontrollgruppe. Dies lässt vermuten, dass der K⁺-Ausstrom durch die Blockade der R297Q-Kanäle ausreichend reduziert werden konnte, sodass ein physiologisches Dendritenwachstum möglich war.

Bei K_v1.2 WT-transfizierten hippokampalen Neuronen (DIV 10-14) konnte nach Langzeitbehandlung mit 100 µM 4-AP im Gegensatz hierzu eine weitere signifikante

Reduktion neuronaler Verzweigungen beobachtet werden. Da 4-AP mehrere Kaliumkanalfamilien (K_V1 -, K_V3 - und K_V4 -Kanäle) blockiert (Werkman et al., 1993, Kirsch et al., 1993, Kerschbaum et al., 2002, Caballero et al., 2007), war ggfs. der inhibitorische Effekt von 4-AP auf den Gesamtkaliumstrom (I_K) sowie die intrazelluläre Kaliumkonzentration zu groß, sodass das Wachstum dieser Neurone weiter gehemmt wurde. Dass einige Kaliumkanäle eine tragende Rolle für das Zellwachstum innehaben, wurde bereits in mehreren Arbeiten gezeigt (Freedman et al., 1995, Ouadid-Ahidouch et al., 2000, Bachmann et al., 2020). Zum Beispiel $K_V1.1$ - und $K_V1.3$ Kanäle sind in diesem Zusammenhang vielfach zitiert worden (Freedman et al., 1995, Ouadid-Ahidouch et al., 2000). Gegebenenfalls ist die Wachstumsretardierung der Neurone mit $K_V1.2$ -Überexpression auf eine zu hohe Konzentration von 4-AP zurückzuführen. Nach Langzeitbehandlung mit 100 μM 4-AP konnte bei R297Q-transfizierten hippokampalen Neuronen (DIV 10-14) kein signifikanter Unterschied in der Anzahl neuronaler Verzweigungen verglichen mit unbehandelten R297Q-transfizierten Neuronen ermittelt werden. Gegebenenfalls wäre für die R297Q-Variante und den damit einhergehenden deutlich verstärkten K^+ -Efflux eine höhere 4-AP-Konzentration notwendig gewesen wäre, um das neuronale Wachstum an das der gesunden GFP-Kontrollgruppe anzugleichen.

4.4. Funktionalität der untersuchten Neurone

Da sich die $K_V1.2$ -Kanalblocker bei den Patch Clamp-Messungen der langzeitbehandelten Neurone nicht in der Extrazellulärlösung befanden, wurde bei der Auswertung das Ruhemembranpotential sowie das Feuerverhalten der unbehandelten $K_V1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierten Neurone untersucht.

Bei der Analyse des Ruhemembranpotentials kortikaler Neurone an DIV 10-15 zeigte sich eine signifikante Hyperpolarisierung des Ruhemembranpotentials von R297Q- im Vergleich zu $K_V1.2$ WT-transduzierten kortikalen Neuronen. Dies entspricht bereits publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe (Hedrich et al., 2021). Im Rahmen unserer Experimente wurde eine signifikante Reduktion der Aktionspotentialfrequenz von kortikalen R297Q- im Vergleich zu $K_V1.2$ WT-transduzierten kortikalen Neuronen beobachtet. Auch diese Ergebnisse entsprechen bereits publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe (Hedrich et al., 2021).

Bei der Analyse der RMPs primärer hippokampaler Mausneurone an DIV 10-14 zeigten sich signifikante Unterschiede im Ruhemembranpotential zwischen GFP- und

R297Q- transfizierten Neuronen. Diese Unterschiede der RMPs entsprechen bereits publizierten Daten von $K_v1.2$ WT-/ R297Q-transduzierten hippocampalen Neuronen von Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe (Hedrich et al., 2021). Ebenfalls konnte an DIV 10-14 eine signifikante Reduktion der Anzahl der aufgezeichneten Aktionspotentiale von hippocampalen Neuronen, die mit R297Q transfiziert wurden, im Vergleich zu solchen, die mit GFP oder $K_v1.2$ WT transfiziert wurden, ermittelt werden. Diese verringerte Anzahl an APs bei Neuronen mit R297Q-Expression wurde bereits von Frau Hedrich publiziert (Hedrich et al., 2021).

Im Rahmen der durchgeführten Experimente konnte nachgewiesen werden, dass die Neurone funktional waren und die aufgezeichnete Aktionspotentialfrequenz den von Hedrich publizierten Daten ähneln (Hedrich et al., 2021).

4.5. Limitationen der Arbeit

Gegebenenfalls sind einige der aufgezeigten Trends aufgrund der geringen n-Zahl nicht statistisch signifikant.

Weitere quantitative Untersuchungen, wie z.B. qPCR oder Western Blot hätten ggfs. zusätzliche Informationen zur Quantität der Expression der $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-Kanäle geben können. Hiermit wären zusätzliche Aussagen zu möglichen pathologischen Einflüssen $K_v1.2$ -Varianten bzw. eine Erklärung für ein besseres oder schlechteres Ansprechen einzelner Experimentalgruppen auf die $K_v1.2$ -Kanalblocker möglich gewesen.

4.6. Kernaussagen

Der kanalhemmende Effekt der jeweiligen Toxine auf die Neurone mit $K_v1.2$ WT-Überexpression bzw. mit R297Q-Expression war zwar häufig statistisch signifikant, jedoch nicht immer ausreichend groß, um signifikante Unterschiede zur GFP-Kontrolle aufzuheben. Dies könnte auf eine nicht ausreichende Behandlungsdauer und/oder eine nicht ausreichende Toxin-Konzentration zurückzuführen sein.

Nach den erfolgten Experimenten besteht die Möglichkeit, dass bei genetischen Variationen der $K_v1.2$ -Kanälen die Therapie durch spezifische Blockade der genetisch veränderten, epileptogen wirkenden $K_v1.2$ -Kanäle als neuer Therapieansatz in Erwägung gezogen werden kann. Die untersuchten Toxine sind möglicherweise als molekulare Grundlage für die pharmazeutische Herstellung neuer Antiepileptika verwendbar, da ein positiver Einfluss sowohl auf die Erregbarkeit als auch auf das

neuronalen Wachstum gezeigt werden konnten. Hierfür sind jedoch weitere Experimente notwendig. Außerdem bedeutet dies, dass Patienten mit epileptischen Enzephalopathien nur dann für diese Therapie in Frage kommen, wenn die eine R297Q-Variante (GOF-Variante) nachgewiesen wurde. Das bedeutet auch, dass vor Therapiebeginn eine Gensequenzierung der Patienten durchgeführt werden muss. Bei bisher unbekanntem Genvarianten muss zudem eine Charakterisierung der Kanalvariante (GOF vs. LOF vs. neutral) erfolgen.

5. Ausblick

Die untersuchten $K_v1.2$ -Kanalblocker könnten als mögliche biochemische Grundlage für die Entwicklung von Medikamenten zur Therapie für Patienten mit entwicklungsbedingten epileptischen Enzephalopathien verursacht durch bestimmte $K_v1.2$ -Kanalvarianten verwendet werden. Vorher sollten die Effekte der Toxine auf das neuronale Netzwerk hinsichtlich Zellsterblichkeit, Zellwachstum (z.B. neuronale Inselbildung) und neuronaler Kommunikation via Kalziumimaging genau analysiert werden, z.B. durch MEA-Experimente, sowie der systemische Effekt auf das Auftreten, die Anzahl und Frequenz sowie die Klinik der epileptischen Anfälle in *in vivo*-Experimenten im Tiermodell.

Um den Effekt der P405L-Variante auf Neurone besser zu verstehen, könnten ergänzende Experimente mit Cleaved Caspase 3 durchgeführt werden. Dies könnte Auskunft darüber geben, warum die P405L-transfizierten Neurone so früh versterben und welche Prozesse hier zugrunde liegen.

6. Zusammenfassung

40% der neu diagnostizierten Epilepsien sind genetisch bedingt und betreffen die Funktionalität von Ionenkanälen oder Ionentransportern. Kürzlich konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lerche zeigen, dass sogenannte „*gain of function*“ (GOF) und „*loss of function*“-Varianten (LOF) zu Veränderungen des *KCNA2*-Gens führen. Diese Genveränderungen können entwicklungsbedingte epileptische Enzephalopathien verursachen. Neue Therapieansätze werden derzeit erforscht. Ziel dieses Projektes war die Untersuchung von morphologischen Effekten an primären neuronalen Zellen der Maus durch die Gabe von selektiven $K_v1.2$ -Kanalblockern, wie dem Skorpiongift Tityustoxin (TsTx) und dem Meeresschneckengift Conotoxin κ m-R111J, sowie dem unspezifischen $K_v1.2$ -Kanalblocker 4-Aminopyridin (4-AP). Experimentell wurden CHO Zellen und primäre Mausneurone gentechnisch mit dem $K_v1.2$ Kanal (WT, GOF-Variante) verändert und elektrophysiologisch und immunhistochemisch mit den oben genannten Kaliumkanalblockern untersucht.

Vorbereitend zu den Experimenten an primären Mausneuronen, wurde die Spezifität von TsTx und Conotoxin κ m-R111J auf $K_v1.2$ -Kanäle mittels Patch Clamp-Messungen an $K_v1.2$ WT-transfizierten CHO Zellen bestätigt. Für die Analyse der akuten Toxinwirkung von 10 bzw. 20 nM TsTx und 75 bzw. 150 nM Conotoxin κ m-R111J wurden das Ruhemembranpotential (RMP) und die Area under the Curve (AUC) der aufgezeichneten Aktionspotentiale an kortikalen primären Neuronen der Maus mit (Über-)Expression von $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-Kanälen (GOF) untersucht. Die gepatchten $K_v1.2$ WT- bzw. R297Q-transfizierten hippokampalen bzw. transduzierten kortikalen Neurone wurden immunhistochemisch gefärbt, rekonstruiert und die Anzahl der Verzweigungen unter chronischer Toxingabe mittels Sholl Analyse untersucht. Eine $K_v1.2$ -Überexpression bzw. der Expression der R297Q-Variante führte zu einer signifikant geringeren Anzahl neuronaler Verzweigungen sowie zu einer erhöhten Zellmortalität. Sowohl die Anzahl der dendritischen Verzweigungen, als auch die Viabilität der murinen Nervenzellen, konnte durch chronische Toxinbehandlung mit 10 nM TsTx sowie 150 nM Conotoxin κ m-R111J zum Teil therapeutisch antagonisiert werden.

Möglicherweise stellen $K_v1.2$ -Blocker eine molekulare Grundlage für die pharmazeutische Herstellung neuer Antiepileptika für Patienten mit entwicklungsbedingten epileptischen Enzephalopathien aufgrund von $K_v1.2$ -Varianten dar.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in dem Hertie Institut für klinische Hirnforschung unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Holger Lerche durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch und Herrn Prof. Dr. Lerche. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Dr. Hedrich-Klimosch, Heidi Löffler, Nikolas Layer) von mir eigenständig durchgeführt, bis auf die Patch Clamp-Messungen der $K_v1.2$ WT-transfizierten hippokampalen Neurone durch Frau Elisabeth Brand, auf die an entsprechender Stelle hingewiesen wurde. Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch Frau Dr. Lina Maria Serna Higuera vom Institut für Biometrie eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbst verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 16.01.2025

8. Literaturverzeichnis

- ALEXOPOULOU, A. N., COUCHMAN, J. R. & WHITEFORD, J. R. 2008. The CMV early enhancer/chicken beta actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors. *BMC Cell Biol*, 9, 2.
- ALLEN, N. M., WECKHUYSSEN, S., GORMAN, K., KING, M. D. & LERCHE, H. 2020. Genetic potassium channel-associated epilepsies: Clinical review of the K(v) family. *Eur J Paediatr Neurol*, 24, 105-116.
- BACHMANN, M., Li, W., EDWARDS, M. J., AHMAD, S. A., PATEL, S., SZABO, I., GULBINS, E., 2020. Voltage-Gated Potassium Channels as Regulators of Cell Death. *Front Cell Dev Biol*, 8, 611853.
- BARONAS, V. A., MCGUINNESS, B. R., BRIGIDI, G. S., GOMM KOLISKO, R. N., VILIN, Y. Y., KIM, R. Y., LYNN, F. C., BAMJI, S. X., YANG, R. & KURATA, H. T. 2015. Use-dependent activation of neuronal Kv1.2 channel complexes. *J Neurosci*, 35, 3515-24.
- BRANDT, C. 2016. Epilepsie in Zahlen. In: EPILEPSIE, I. F. (ed.). Website Informationszentrum Epilepsie.
- BREW, H. M., HALLOWS, J. L. & TEMPEL, B. L. 2003. Hyperexcitability and reduced low threshold potassium currents in auditory neurons of mice lacking the channel subunit Kv1.1. *J Physiol*, 548, 1-20.
- CABALLERO, N. A., MELENDEZ, F. J., NINO, A. & MUNOZ-CARO, C. 2007. Molecular docking study of the binding of aminopyridines within the K⁺ channel. *J Mol Model*, 13, 579-86.
- CHEN, P., DENDORFER, A., FINOL-URDANETA, R. K., TERLAU, H. & OLIVERA, B. M. 2010. Biochemical characterization of kappaM-R111J, a Kv1.2 channel blocker: evaluation of cardioprotective effects of kappaM-conotoxins. *J Biol Chem*, 285, 14882-14889.
- CHOW, L. W. C. & LEUNG, Y. M. 2020. The versatile Kv channels in the nervous system: actions beyond action potentials. *Cell Mol Life Sci*, 77, 2473-2482.
- CORDEIRO, S., FINOL-URDANETA, R. K., KOPFER, D., MARKUSHINA, A., SONG, J., FRENCH, R. J., KOPEC, W., DE GROOT, B. L., GIACOBASSI, M. J., LEAVITT, L. S., RAGHURAMAN, S., TEICHERT, R. W., OLIVERA, B. M. & TERLAU, H. 2019. Conotoxin kappaM-R111J, a tool targeting asymmetric heteromeric Kv1 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 1059-1064.

- DOU, Y., LIN, Y., WANG, T. Y., WANG, X. Y., JIA, Y. L. & ZHAO, C. P. 2021. The CAG promoter maintains high-level transgene expression in HEK293 cells. *FEBS Open Bio*, 11, 95-104.
- ECCLES, C.U., ROGOWSKI, R. S., GU, X., ALGER, B.E., BLAUSTEIN, M. P., 1994. Tityustoxin-K alpha, from scorpion venom, blocks voltage-gated, non-inactivating potassium current in cultured central neurons. *Neuropharmacology*, 33, 1523-9.
- EKHTERAE, D., PLATOSHYN, O., ZHANG, S., REMILLARD, C., YUAN, J. X. 2003 Apoptosis repressor with caspase domain inhibits cardiomyocyte apoptosis by reducing K⁺ currents. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284, 1405-10.
- FENG, L., ZHAO, T. & KIM, J. 2015. neuTube 1.0: A New Design for Efficient Neuron Reconstruction Software Based on the SWC Format. *eNeuro*, 2.
- FINOL-URDANETA, R. K., BELOVANOVIC, A., MICIC-VICOVAC, M., KINSELLA, G. K., MCARTHUR, J. R. & AL-SABI, A. 2020. Marine Toxins Targeting Kv1 Channels: Pharmacological Tools and Therapeutic Scaffolds. *Mar Drugs*, 18.
- FISHER, R. S., ACEVEDO, C., ARZIMANOGLU, A., BOGACZ, A., CROSS, J. H., ELGER, C. E., ENGEL, J., JR., FORSGREN, L., FRENCH, J. A., GLYNN, M., HESDORFFER, D. C., LEE, B. I., MATHERN, G. W., MOSHE, S. L., PERUCCA, E., SCHEFFER, I. E., TOMSON, T., WATANABE, M. & WIEBE, S. 2014. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55, 475-82.
- FRANSEN, E. & TIGERHOLM, J. 2010. Role of A-type potassium currents in excitability, network synchronicity, and epilepsy. *Hippocampus*, 20, 877-87.
- FREEDMAN, B. D., FLEISCHMANN, B. K., PUNT, J. A., GAULTON, G., HASHIMOTO, Y., KOTLIKOFF, M. I., 1995. Identification of Kv1.1 expression by murine CD4-CD8- thymocytes. A role for voltage-dependent K⁺ channels in murine thymocyte development. *J Biol Chem*, 270, 22406-11.
- GAMPER, N., STOCKAND, J. D. & SHAPIRO, M. S. 2005. The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51, 177-85.
- GRIBKOFF, V. K. & WINQUIST, R. J. 2023. Potassium channelopathies associated with epilepsy-related syndromes and directions for therapeutic intervention. *Biochem Pharmacol*, 208, 115413.

- GROSSE, G., DRAGUHN, A., HOHNE, L., TAPP, R., VEH, R. W. & AHNERT-HILGER, G. 2000. Expression of Kv1 potassium channels in mouse hippocampal primary cultures: development and activity-dependent regulation. *J Neurosci*, 20, 1869-82.
- HEDRICH, U. B. S., LAUXMANN, S., WOLFF, M., SYNOFZIK, M., BAST, T., BINELLI, A., SERRATOSA, J. M., MARTINEZ-ULLOA, P., ALLEN, N. M., KING, M. D., GORMAN, K. M., ZEEV, B. B., TZADOK, M., WONG-KISIEL, L., MARJANOVIC, D., RUBBOLI, G., SISODIYA, S. M., LUTZ, F., ASHRAF, H. P., TORGE, K., YAN, P., BOSSELMANN, C., SCHWARZ, N., FUDALI, M. & LERCHE, H. 2021. 4-Aminopyridine is a promising treatment option for patients with gain-of-function KCNA2-encephalopathy. *Sci Transl Med*, 13, eaaz4957.
- HENG, J. E., ZURAKOWSKI, D., VORWERK, C. K., GROSSKREUTZ, C. L., DREYER, E. B., 1999. Cation channel control of neurite morphology. *Brain Res Dev Brain Res*, 113, 67-73.
- HEDRICH UBS, L. S., WOLFF M, ET AL. 2019. Effective precision therapy in KCNA2-related developmental and epileptic encephalopathy with 4-aminopyridine. *Science Translational Medicine*.
- HILLE, B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd Edition ed. Oxford University Press Academic US: Oxford University Press.
- HOMMERS, L. 2008. *Modulation der Einwärtsgleichrichtung von GIRK-Kanälen durch G-Protein Untereinheiten*. MD, Universität Würzburg.
- [HTTPS://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/GENE?DB=GENE&CMD=DETAILSSEARCH&TERM=3737](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?DB=GENE&CMD=DETAILSSEARCH&TERM=3737). 2019. *KCNA2 potassium voltage-gated channel subfamily A member 2 [Homo sapiens (human)]* [Online]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=3737>. [Accessed].
- KAPELL, H., FAZIO, L., DYCKOW, J., SCHWARZ, S., CRUZ-HERRANZ, A., MAYER, C., CAMPOS, J., D'ESTE, E., MOBIUS, W., CORDANO, C., PROBSTEL, A. K., GHARAGOZLOO, M., ZULJI, A., NARAYANAN NAIK, V., DELANK, A., CERINA, M., MUNTEFERING, T., LERMA-MARTIN, C., SONNER, J. K., SIN, J. H., DISSE, P., RYCHLIK, N., SABEUR, K., CHAVALI, M., SRIVASTAVA, R., HEIDENREICH, M., FITZGERALD, K. C., SEEBOHM, G., STADELMANN, C., HEMMER, B., PLATTEN, M., JENTSCH, T. J., ENGELHARDT, M., BUDDE, T., NAVE, K. A., CALABRESI, P. A., FRIESE, M. A., GREEN, A. J., ACUNA, C., ROWITCH, D. H., MEUTH, S. G. & SCHIRMER, L. 2023. Neuron-oligodendrocyte potassium shuttling at nodes of Ranvier protects against inflammatory demyelination. *J Clin Invest*, 133.

- KIM, T. K. & EBERWINE, J. H. 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 397, 3173-8.
- KIRSCH, G. E., SHIEH, C. C., DREWE, J. A., VENER, D. F. & BROWN, A. M. 1993. Segmental exchanges define 4-aminopyridine binding and the inner mouth of K⁺ pores. *Neuron*, 11, 503-12.
- KRUGER, J., SCHUBERT, J., KEGELE, J., LABALME, A., MAO, M., HEIGHWAY, J., SEEBOHM, G., YAN, P., KOKO, M., ASLAN-KARA, K., CAGLAYAN, H., STEINHOFF, B. J., WEBER, Y. G., KEO-KOSAL, P., BERKOVIC, S. F., HILDEBRAND, M. S., PETROU, S., KRAUSE, R., MAY, P., LESCA, G., MALJEVIC, S. & LERCHE, H. 2022. Loss-of-function variants in the KCNQ5 gene are implicated in genetic generalized epilepsies. *EBioMedicine*, 84, 104244.
- LI, K., FIGARELLA, K., SU, X., KOVALCHUK, Y., GORZOLKA, J., NEHER, J. J., MOJTAHEDI, N., CASADEI, N., HEDRICH, U. B. S. & GARASCHUK, O. 2023. Endogenous but not sensory-driven activity controls migration, morphogenesis and survival of adult-born juxtglomerular neurons in the mouse olfactory bulb. *Cell Mol Life Sci*, 80, 98.
- LI, K., SAVITSKA, D. & GARASCHUK, O. 2024. K⁺ channel-mediated retarded maturation of interneurons and its role in neurodevelopmental disorders. *Neural Regen Res*, 19, 1403-1404.
- LIU, D., REN, T. & GAO, X. 2003. Cationic transfection lipids. *Curr Med Chem*, 10, 1307-15.
- LONGO, P. A., KAVRAN, J. M., KIM, M. S. & LEAHY, D. J. 2013. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol*, 529, 227-40.
- LORINCZ, A. & NUSSER, Z. 2008. Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *J Neurosci*, 28, 14329-40.
- MASNADA, S., HEDRICH, U. B. S., GARDELLA, E., SCHUBERT, J., KAIWAR, C., KLEE, E. W., LANPHER, B. C., GAVRILOVA, R. H., SYNOFZIK, M., BAST, T., GORMAN, K., KING, M. D., ALLEN, N. M., CONROY, J., BEN ZEEV, B., TZADOK, M., KORFF, C., DUBOIS, F., RAMSEY, K., NARAYANAN, V., SERRATOSA, J. M., GIRALDEZ, B. G., HELBIG, I., MARSH, E., O'BRIEN, M., BERGQVIST, C. A., BINELLI, A., PORTER, B., ZAEYEN, E., HOROVITZ, D. D., WOLFF, M., MARJANOVIC, D., CAGLAYAN, H. S., ARSLAN, M., PENA, S. D. J., SISODIYA, S. M., BALESTRINI, S., SYRBE, S., VEGGIOTTI, P., LEMKE, J. R., MOLLER, R. S., LERCHE, H. & RUBBOLI, G. 2017. Clinical spectrum and genotype-phenotype associations of KCNA2-related encephalopathies. *Brain*, 140, 2337-2354.

- MEYER, R. 2009. Multiple Sklerose: Fampridin verbessert Gehfähigkeit. *Deutsches Ärzteblatt*.
- MITTERDORFER, J. & BEAN, B. P. 2002. Potassium currents during the action potential of hippocampal CA3 neurons. *J Neurosci*, 22, 10106-15.
- NIDAY, Z. & TZINGOUNIS, A. V. 2018. Potassium Channel Gain of Function in Epilepsy: An Unresolved Paradox. *Neuroscientist*, 24, 368-380.
- OUADID-AHIDOUCH, H., CHAUSSADE, F., ROUDBARAKI, M., SLOMIANNY, C., DEWAILLY, E., DELCOURT, P., PREVARSKAYA, N., 2000. K_v1.1 K(+) channels identification in human breast carcinoma cells: involvement in cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 278, 272-7.
- OYRER, J., MALJEVIC, S., SCHEFFER, I. E., BERKOVIC, S. F., PETROU, S. & REID, C. A. 2018. Ion Channels in Genetic Epilepsy: From Genes and Mechanisms to Disease-Targeted Therapies. *Pharmacol Rev*, 70, 142-173.
- PERKINS, K. L. 2006. Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices. *J Neurosci Methods*, 154, 1-18.
- PFÄFFLIN, M. 2011. Epidemiologie der Epilepsien. In: BETHEL, E.-Z. (ed.). Informationszentrum für Epilepsie.
- PUCK, T. T. 1958. Growth and genetics in somatic mammalian cells in vitro. *J Cell Physiol Suppl*, 52, 287-302; discussion 302-11.
- RAMA, S., ZBILI, M., FEKETE, A., TAPIA, M., BENITEZ, M. J., BOUMEDINE, N., GARRIDO, J. J. & DEBANNE, D. 2017. The role of axonal Kv1 channels in CA3 pyramidal cell excitability. *Sci Rep*, 7, 315.
- SAKMANN, B. & NEHER, E. 1984. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol*, 46, 455-72.
- SHAH, N. H., AIZENMAN, E., 2014. Voltage-gated potassium channels at the crossroads of neuronal function, ischemic tolerance, and neurodegeneration. *Transl Stroke Res*, 5, 38-58.
- SCHEFFER, I. E., BERKOVIC, S., CAPOVILLA, G., CONNOLLY, M. B., FRENCH, J., GUILHOTO, L., HIRSCH, E., JAIN, S., MATHERN, G. W., MOSHE, S. L., NORDLI, D. R., PERUCCA, E., TOMSON, T., WIEBE, S., ZHANG, Y. H. & ZUBERI, S. M. 2017. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58, 512-521.

- SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., PREIBISCH, S., RUEDEN, C., SAALFELD, S., SCHMID, B., TINEVEZ, J. Y., WHITE, D. J., HARTENSTEIN, V., ELICEIRI, K., TOMANCAK, P. & CARDONA, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9, 676-82.
- SHENG, M., LIAO, Y. J., JAN, Y. N. & JAN, L. Y. 1993. Presynaptic A-current based on heteromultimeric K⁺ channels detected in vivo. *Nature*, 365, 72-5.
- STORM, J. F. 1988. Temporal integration by a slowly inactivating K⁺ current in hippocampal neurons. *Nature*, 336, 379-81.
- SYRBE, S., HEDRICH, U. B. S., RIESCH, E., DJEMIE, T., MULLER, S., MOLLER, R. S., MAHER, B., HERNANDEZ-HERNANDEZ, L., SYNOFZIK, M., CAGLAYAN, H. S., ARSLAN, M., SERRATOSA, J. M., NOTHNAGEL, M., MAY, P., KRAUSE, R., LOFFLER, H., DETERT, K., DORN, T., VOGT, H., KRAMER, G., SCHOLS, L., MULLIS, P. E., LINNANKIVI, T., LEHESJOKI, A. E., STERBOVA, K., CRAIU, D. C., HOFFMAN-ZACHARSKA, D., KORFF, C. M., WEBER, Y. G., STEINLIN, M., GALLATI, S., BERTSCHE, A., BERNHARD, M. K., MERKENSCHLAGER, A., KIESS, W., EURO, E. R. E. S. C., GONZALEZ, M., ZUCHNER, S., PALOTIE, A., SULS, A., DE JONGHE, P., HELBIG, I., BISKUP, S., WOLFF, M., MALJEVIC, S., SCHULE, R., SISODIYA, S. M., WECKHUYSSEN, S., LERCHE, H. & LEMKE, J. R. 2015. De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy. *Nat Genet*, 47, 393-399.
- WANG, H., KUNKEL, D. D., MARTIN, T. M., SCHWARTZKROIN, P. A. & TEMPEL, B. L. 1993. Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature*, 365, 75-9.
- WANG Z., 2004. Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch.*, 448, 274-86
- WEBER, Y. G. & LERCHE, H. 2013. [Genetics of idiopathic epilepsies]. *Nervenarzt*, 84, 151-6.
- WERKMAN, T. R., GUSTAFSON, T. A., ROGOWSKI, R. S., BLAUSTEIN, M. P. & ROGAWSKI, M. A. 1993. Tityustoxin-K alpha, a structurally novel and highly potent K⁺ channel peptide toxin, interacts with the alpha-dendrotoxin binding site on the cloned Kv1.2 K⁺ channel. *Mol Pharmacol*, 44, 430-6.
- WHO. 2023. *Epilepsy* [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/epilepsy> [Accessed 08.06. 2023].
- YELLEN, G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419, 35-42.

9. Danksagung

Ganz besonders möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Herrn Prof. Dr. Johannes Schwarz und Frau Dr. Sigrid Schwarz, für ihre ausdauernde Unterstützung und ihre aufmunternden Worte danken.

Außerdem möchte ich der AG Lerche, insbesondere Herrn Prof. Dr. Holger Lerche, Frau Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch, Herrn Dr. Thomas Wuttke, Herrn Nicolas Layer und Frau Heidi Löffler, sowie dem IZKF-Promotionskolleg und Frau Dr. Lina Maria Serna Higuera vom Institut für klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie für ihre wertvollen Tipps und Unterstützung danken.

IV. Anhang10.1. Chemikalien

Name	Formel	Mol. Masse M [g/mol]	Katalognummer	Hersteller
Aceton	C_2H_3N	41,05	HN40.2	Carl Roth
Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	$C_{10}H_{12}N_5Na_2O_{13}P_3$	551,14	A2383	Sigma Aldrich
Biocytin	$C_{16}H_{28}N_4O_4S$	372,48	B4261-250MG	Sigma Aldrich
Calcium Chlorid	$CaCl_2$	147,01	C3881	Sigma Aldrich
D(+)- Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180,16	CAS 50-99-7	Carl ROTH
D- Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	182,17	A1903,0500	AppliChem Panreac
Ethanol			A1613,2500PE	AppliChem Panreac
Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)		380,35	E0396	Sigma Aldrich
Formaldehyd			CAS 50-00-0	Merck
Kalium Chlorid	KCl	74,56	A2939,1000	AppliChem Panreac
Kalium Flourid	KF	74,55	60239	Sigma Aldrich
Kalium D-gluconate	$C_6H_{11}KO_7$	243,25	EC 206-074-2	Sigma Aldrich
HEPES Puffer	$C_8H_{18}N_2O_4S$	231,31	A1069,0250	AppliChem Panreac
Magnesium Chlorid	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	203,30	131396.1210	AppliChem Panreac
Magnesiumsulfate - Heptahydrat	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,48	A301886 132	MERCK
Milchpulver			T145.2	Carl Roth
Natrium-2ATP	$C_{10}H_{13}N_5Na_2O_{13}P_3$	551,14	A2383	Sigma Aldrich
Natrium Chlorid	NaCl	58,44	27810.295	VWR Chemicals

Natrium phosphat monobasic	NaH ₂ PO ₄	119,98	S3264	Sigma Aldrich
Triton X- 100		625	CAS 9036-19-5	Sigma Aldrich

10.2. KITs

Kit	Katalognummer	Hersteller
Roche Genopure Plasmid Maxi Kit	3143422001	Sigma Aldrich

10.3. Medien

Medium	Spezifikation	Katalognummer	Hersteller
DMEM/F-12	high glucose	CAS 11330-032	Thermo Fisher Scientific
NB	Serumfrei, - L- Glutamine	CAS 21103-049	Thermo Fisher Scientific
Ham's F12	+ L- Glutamine	CAS 21765-029	Thermo Fisher Scientific
DMSO	+ L- Glutamine, + 15 nM HEPES	A3672,0250	Thermo Fisher Scientific

10.4. Lösungen für Zellkultur

Lösung	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
Accutase		A6964	Sigma Aldrich
B27 Supplement		17504-044	Thermo Fisher Scientific
DPBS (-/-)		H15-002	PAA
DPBS (+/+)		H15-001	PAA
Fetal Cow Serum (FCS)		Lot: 616	Biochrom
HBSS (-/-) no phenol red		H15-009	PAA
L- Glutamine	200mM	25030-024	Thermo Fisher Scientific
Opti-MEM		31985062	Thermo Fischer Scientific
Optifect		12579017	Thermo Fischer Scientific
Polyethylenimine		CAS 9002-98-6	Sigma Aldrich
Poly-D-Lysine (PDL)	0,1mg/ml	P6282	Sigma Aldrich
Trypsin		15090-046	Thermo Fisher Scientific