

**Untersuchung der physiologischen Rolle von Kv7.2-
Kanälen und der pathophysiologischen Mechanismen
von Kv7.2-Kanaldefizienz im Gehirn der Maus
(*Mus musculus*, Linnaeus 1758)**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
– Dr. rer. nat. –
des Departments Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Vu Thao Quyen Le

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. D. ISBRANDT
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. E. KRANZ
Tag der Disputation: 27. Februar 2009

Hamburg, den 10. Februar 2009



Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Zusammenfassung.....	VI
Abstract.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Epilepsie und Ionenkanalfehlfunktionen	1
1.2. Die Kv7/KCNQ-Kaliumkanalfamilie	3
1.3. Neonatale Anfälle und ihre Behandlung.....	7
1.4. Konditionelles transgenes Mausmodell mit M-Kanal-Suppression	9
1.5. Zielsetzung.....	11
2. Material.....	12
2.1. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	12
2.2. Lösungen und Medien.....	12
2.3. Verwendete Kits.....	14
2.4. Mauslinien.....	14
2.5. Verwendete Antikörper.....	15
2.5.1. Primärantikörper.....	15
2.5.2. Sekundärantikörper	16
2.6. Verwendete Oligonukleotide	16
3. Methoden.....	17
3.1. Molekularbiologische Methoden	17
3.1.1. Isolation genomischer DNA aus Mäuseschwänzen	17
3.1.2. Isolation genomischer DNA aus Mäuseohrlochstanzen.....	17
3.1.3. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	17
3.1.4. Genotypisierung mittels PCR.....	18
3.1.5. TaqMan-PCR	19
3.1.6. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	21
3.1.7. Isolation von RNA aus Hirngewebe.....	21
3.1.8. Bestimmung der RNA-Konzentration.....	21
3.1.9. Synthese doppelsträngiger cDNA von Gesamt-RNA	22
3.1.10. Aufreinigung doppelsträngiger cDNA	23
3.1.11. Synthese Biotin-markierter cRNA	23
3.1.12. Aufreinigung und Quantifizierung der Biotin-markierten cRNA	23
3.1.13. Fragmentierung der cRNA für Sondenpräparation	24
3.1.14. Affymetrix GeneChip Prozessierung	24

3.1.15.	Analyse der Affymetrix-Daten	25
3.2.	Histologische Untersuchungen	25
3.2.1.	Perfusionsfixierung	25
3.2.2.	Herstellung von Vibratomschnitten	25
3.2.3.	Nissl-Färbung mit Kresylviolett	26
3.2.4.	Immunhistochemischer Nachweis mittels ABC-Technik	26
3.3.	Proteinbiochemische Methoden	27
3.3.1.	Zytokin-Antikörper-Arrays	27
3.4.	Elektrophysiologische Experimente	28
3.4.1.	Elektrophysiologische Ableitungen an Gehirnschnitten	28
3.4.2.	Elektrophysiologische <i>in vivo</i> Ableitung in neonatalen Mäusen	29
3.5.	Verhaltensexperimente	30
3.5.1.	Messung der Basalaktivität	30
3.5.2.	<i>Open field</i> -Versuch	31
3.5.3.	Behandlung der Mäuse	31
4.	Ergebnisse	32
4.1.	Vergleichende Transkriptomanalyse	32
4.2.	Datenvalidierung	37
4.2.1.	TaqMan-Assays	37
4.2.2.	Immunhistochemie	39
4.2.3.	Zytokin-Antikörper-Arrays	42
4.3.	Quantifizierung von Interneuronen	47
4.4.	Neonatale Netzwerkaktivität im Kortex und Hippocampus	57
4.5.	Pharmakologische Therapie der M-Kanaldefizienz im Mausmodell	66
5.	Diskussion	84
5.1.	Molekularbiologische und proteinbiochemische Charakterisierung des M-Stromdefizienten Mausmodells	84
5.2.	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Charakterisierung neonataler Netzwerke	88
5.3.	Pharmakologische Behandlung neonataler Übererregbarkeit	92
5.4.	Ausblick	95
6.	Literaturverzeichnis	96
7.	Anhang	107

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro- (1×10^{-6})
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
Ap4	Aquaporin 4
ATP	Adenosin-Triphosphat
BFNC	<i>benign familial neonatal convulsions</i>
BFNIS	benigne familiäre neonatale infantile Anfälle
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Bum	Bumetanid
c	<i>concentration</i>
CA1/ CA3	<i>Cornu Ammonis</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalovirus
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxaline-2,3-Dion
CRG-2	<i>cytokine responsive genes-2</i>
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
CSD	<i>current source density</i>
CT	<i>threshold cycle</i>
CTACK	<i>cutaneous T cell-attracting chemokine</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
Dox	Doxyzyklin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
f.c.	<i>final concentration</i>
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
Gal	Galanin
GDP	<i>giant depolarizing potentials</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GO	<i>gene ontology</i>
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	human

h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSD	<i>honest significant difference</i>
Hz	Hertz
IFN β 1	Interferon β 1
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>
IGFBP-5	<i>insulin-like growth factor-binding protein-5</i>
IL	Interleukin
k	Kilo- (1×10^3)
kb	Kilobasenpaare
KCC2	<i>chloride potassium symporter 2</i>
l	Liter
M	Molar (Mol pro Liter)
m	Milli- (1×10^{-3})
min	Minute
MIP-1 γ	<i>macrophage inflammatory protein-related protein-1γ</i>
MIP-3 α	<i>macrophage inflammatory protein-3α</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
n	Nano- (1×10^{-9})
NF κ B1	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NKCC1	<i>Na-K-2Cl-Cotransporter 1</i>
NpY	Neuropeptid Y
p	Piko- (1×10^{-12})
PBS	<i>phosphate-buffered-saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDS	<i>paraoxysmal depolarisation shifts</i>
PF-4	<i>platelet factor-4</i>
PFA	Para-Formaldehyd
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
Ptgs	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase
r	Rezeptor
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
RGS4	<i>regulator of G protein signaling</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SMEI	<i>severe myoclonic epilepsy of infancy</i>
Syp	Synaptophysin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TARC	<i>thymus and activation-regulated chemokine</i>
TCA-3	<i>T-cell activation-3</i>
TECK	<i>thymus-expressed chemokine</i>
tg	Transgen
TIMP-1	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase-1</i>
TLE	Temporallappenepilepsie
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thrombopoieti

TRE	<i>tetracycline response element</i>
tRNA	<i>transfer-Ribonukleinsäure</i>
tTA	Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator
U	Unit
üN	über Nacht
V	Volt
v	Volumen
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Abkürzungen für Aminosäuren

A Alanin (Ala)	G Glycin (Gly)	M Methionin (Met)	S Serin (Ser)
C Cystein (Cys)	H Histidin (His)	N Asparagin (Asn)	T Threonin (Thr)
D Asparaginsäure (Asp)	I Isoleucin (Ile)	P Prolin (Pro)	V Valin (Val)
E Glutaminsäure (Glu)	K Lysin (Lys)	Q Glutamin (Gln)	W Tryptophan (Trp)
F Phenylalanin (Phe)	L Leucin (Leu)	R Arginin (Arg)	Y Tyrosin (Tyr)

Abkürzungen für Nukleotide

A Adenin	C Cytosin	G Guanin	T Thymin
-----------------	------------------	-----------------	-----------------

Zusammenfassung

Mutationen in den humanen *KCNQ2*- und *KCNQ3*-Genen, welche für M-Kanaluntereinheiten (Kv7.2 und Kv7.3) kodieren, sind mit einer benignen Form von Epilepsie bei Neugeborenen (BFNC) assoziiert. In unserem Labor wurde ein transgenes Mausmodell generiert, das neuronenspezifisch und induzierbar eine dominant-negative Kv7.2-Untereinheit exprimiert. Die Suppression des M-Stroms führte zu neuronaler und Netzwerk-Übererregbarkeit, Verhaltenshyperaktivität, spontanen Anfällen und morphologischen Veränderungen, die sich in Dispersion und Displazierung von CA1-Pyramidenzellen zeigten¹. Tetrazyklin-kontrollierte Restriktion der Transgenexpression deckte eine kritische Periode für die Expression funktioneller Kv7.2-Kanalunterheiten während der neonatalen Hirnentwicklung auf.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung dieses Mausmodells mit molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden zeigte, dass der Verlust funktioneller M-Kanäle im Hippocampus mit einer verstärkten Immunantwort assoziiert war, was sich in einer erhöhten Zahl aktivierter Mikroglia und einer deutlichen Astrogliose zeigte. Die sich im Epilepsiephänotyp widerspiegelnde Störung des Gleichgewichts zwischen synaptischer Inhibition und Exzitation war nicht durch einen Verlust an GABAergen hippocampalen Interneuronen verursacht. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die Netzwerkaktivität neonataler Kontrollmäuse und M-Kanal-defizienter Mäuse (P5-7) *in vivo* gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass während der Entwicklung im Kortex *Spindle Bursts* im β -Frequenzbereich das dominierende Muster elektrischer Aktivität waren. Die Amplitude und die Häufigkeit dieser β -Oszillationen waren in den transgenen Mäusen in den oberflächlichen Schichten des Kortex stark erhöht. Die dominierende Aktivität im Hippocampus neonataler Mäuse waren *Sharp Waves*, die unregelmäßig in CA1-Stratum radiatum zu detektieren waren. Das übererregbare Netzwerk der epileptischen Mäuse konnte durch Verringerung der intrazellulären Chlorid-Konzentration mit Hilfe des NKCC1-

Antagonisten Bumetanid in akuten *in vivo* Messungen vermindert werden. Die chronische Behandlung mit Bumetanid während der kritischen neonatalen Periode verhinderte sowohl die morphologischen Veränderungen und Inflammation des Hippocampus als auch die Verhaltenshyperaktivität und könnte daher eine aussichtsreiche Behandlungsalternative für neonatale Epilepsie insgesamt darstellen.

Abstract

Mutations in the human genes *KCNQ2* and *KCNQ3*, encoding the M-channel subunits Kv7.2 and Kv7.3, are associated with benign familial neonatal epilepsy (BFNC). We developed a transgenic mouse model that allows the neuron-specific expression of a dominant-negative Kv7.2-subunit controlled by the Tet-off system. The resulting loss of functional M-current leads to neuronal and network hyperexcitability, behavioural hyperactivity, and spontaneous seizures. Morphologically, M-current suppression leads to displacement and dispersion of CA1 pyramidal cells. Tet-off-mediated restriction of transgene expression uncovered a critical role for M-channel function during neonatal brain development. Molecular biological characterization in hippocampal tissue showed that neonatal M-current suppression in this model was accompanied by an increase immune response which was evidenced by an increase in activated microglia and astrogliosis. The altered balance between synaptic inhibition and excitation, which causes seizures and chronic epilepsy, was not caused by a reduction in the number of specific GABAergic interneurons.

For the first time, the present study shows the analysis of *in vivo* network activity from neonatal control and mutant mice (P5-7). We show that spindle bursts in the β frequency range are the predominant electrical activity pattern in the developing cortex. These β oscillations were increased in amplitude and occurrence within the superficial cortical layers of mutant mice. Recordings from the hippocampus showed irregular occurring patterns of sharp wave activity in the CA1 area of neonatal mice. Pharmacological approaches lowering the intracellular concentration of chloride by selectively blocking the chloride transporter NKCC1 with the drug bumetanide proved to be successful. In acute *in vivo* recordings, treatment with bumetanide led to attenuation of cortical network activity in mutant animals. Furthermore, chronic treatment of mutant animals with bumetanide during the neonatal period prevented hippocampal morphological changes and the development of an epileptic phenotype as seen in untreated mutant animals. By identifying the physiological basis

underlying the pathology in neonatal M-channel-deficient mice and by successfully treating these mice with bumetanide, we have shown that NKCC1 has a great potential to be a therapeutic target for the treatment of neonatal epilepsies.

1. Einleitung

Das menschliche Gehirn ist ein komplexes Netzwerk, das aus mehr als 100 Milliarden miteinander interagierenden Neuronen besteht, die sich über Nervenfortsätze, elektrische Impulse sowie erregende als auch hemmende chemische Botenstoffe mitteilen. Die Aktivität eines Neurons hängt einerseits von der Fähigkeit, das Membranpotential aufrechtzuerhalten, andererseits von einem Gleichgewicht zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Übertragung an den Synapsen ab. Störungen in diesen Funktionen können zu abnormalen Entladungen der Neurone im Gehirn führen, welche sich in Krampfanfällen oder Epilepsie äußern können.

1.1. Epilepsie und Ionenkanalfunktionsstörungen

Das Wort Epilepsie leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet „Ergriffen werden“ oder „Gepackt werden“. Epilepsie ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen mit einer kumulativen Lebenszeit-Inzidenz von 3 %^{2, 3} und einer Prävalenz von 0,5-1 % in der Gesamtbevölkerung. Die Diskrepanz zwischen Lebenszeit-Inzidenz und Prävalenz spiegelt die transiente Natur des Zustands in vielen Patienten wider. Krampfanfälle und Epilepsie sind klinische Phänomene, die sowohl physiologisch als auch klinisch definiert werden können. Physiologisch betrachtet beschreibt Epilepsie die gelegentlichen, plötzlichen, exzessiven und lokalen Entladungen der grauen Substanz⁴. Klinisch werden epileptische Anfälle als periodische, krampfartige, stereotype Störungen von Bewusstsein, Verhalten, Emotionen, Motorfunktionen, Wahrnehmung oder Empfindung beschrieben, die entweder einzeln oder in Kombination auftreten. Epilepsie ist ein Zustand, in welchem Anfälle spontan wiederkehren⁵. Das klinische Ereignis wird von charakteristischen Veränderungen im Elektroenzephalogramm (EEG), den „Scharfen Wellen“ (*Sharp Waves*, d.h. den epileptischen Entladungen), begleitet. Diese können oberflächlich von der Kopfhaut mit EEG-Elektroden

aufgezeichnet, bisweilen jedoch nur mit Tiefenelektroden exakt lokalisiert werden. Ein epileptischer Anfall entsteht durch plötzliche, zeitlich begrenzte wenige Sekunden bis Minuten dauernde Synchronisation und Rhythmisierung des Entladungsverhaltens eines Neuronenverbunds. Die Frequenz der Anfälle ist von Patient zu Patient sehr unterschiedlich und reicht von nur einem einzelnen Anfall im Leben bis zu mehreren 100 Anfällen pro Tag. Die epileptischen Anfälle werden einerseits nach ihrem topologischen Ursprung in fokale oder generalisierte Anfälle⁶ eingeteilt, andererseits ursächlich in symptomatische (hier liegt eine zugrunde liegende Hirnschädigung vor) und in idiopathische Anfälle (hier gibt es eine genetische Prädisposition)⁷.

Mutationen in über 70 Genen sind mit Epilepsie assoziiert. Viele dieser Gene verändern die normale Funktion spannungsabhängiger transmembraner Ströme (zum Beispiel I_{Na} , I_{Ca} , I_K), die eine wesentliche Rolle bei der Regulation neuronaler Erregbarkeit spielen. Zum einen sind diese spannungsabhängigen Ströme an der Generierung von Aktionspotentialen, dem physiologischen Quantum der Informationsübertragung im Nervensystem beteiligt. Zum anderen kann ihre Fehlfunktion zu pathologisch verlängerten Entladungen (*Bursts*) und paroxysmalen Depolarisationen (*paraoxysmal depolarisation shifts*) führen.

Die spannungsabhängigen Natrium-Einwärtsströme (I_{Na}) und Calciumströme (I_{Ca}) wirken durch Depolarisation erregend. Mutationen können die Funktion dieser Kanäle beeinflussen, in dem sie zum Beispiel die Stromkinetik verändern und so zu erhöhter Erregbarkeit führen können. Mutationen in den Genen für die Natriumkanaluntereinheiten SCN1A und SCN2A können zu autosomal dominanter generalisierter Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus (GEFS+)⁸⁻¹⁰, *severe myoclonic epilepsy of infancy* (SMEI)¹¹ und benignen familiären neonatalen infantilen Anfällen (BFNIS) führen. Mutationen von *Ca_v2.1* in Mensch und Maus reduzieren Calciumströme und können zu einem *Absence Seizure*-Phänotypen beitragen^{12, 13}. Außerdem ist in chronisch epileptischem Gewebe sowohl im Tiermodell¹⁴, als auch im Gyrus dentatus von Patienten mit Temporallappenepilepsie (TLE)^{15, 16} eine erhöhte Dichte der Calciumströme ($Ca_v3.1-3.3$) gefunden worden, die mit großer Wahrscheinlichkeit zum Phänotypen bei idiopathischer generalisierter Epilepsie beiträgt¹⁷.

Im Gegensatz zu Natrium- und Calciumströmen sind Kaliumströme (I_K), unter anderem gebildet durch Kanäle der Kv-Familie, für die Repolarisation zuständig und wirken damit erregungsdämpfend. Sie sind wichtige Regulatoren des Ruhemembranpotentials und modulieren die Erregbarkeit elektrisch aktiver Zellen wie Nerven- oder Herzmuskelzellen. In Kv1.1-Kanälen wurden Epilepsie-assoziierte Kaliumkanalfehlfunktionen gefunden, die den

Zusammenbau der Untereinheiten, die subzelluläre Lokalisation und die Kinetik des Kanals beeinflussen und somit die Stromamplitude reduzieren. Dies kann zu partieller TLE, episodischer Ataxie, Neuromyotonie oder Myokymie führen. Mäuse ohne Kv1.1-Kanal zeigen sowohl limbische Anfälle^{18, 19} als auch Neuromyotonie²⁰. Ein weiteres Beispiel für ein Mausmodell, in dem der Verlust von Kaliumkanälen mit einem Epilepsiephänotyp assoziiert ist, ist die Kv3.2 *knock out*-Maus. Kv3.2-Kanäle werden vorwiegend in einer Teilgruppe von schnell feuernenden, kortikalen Interneuronen exprimiert²¹ und besitzen schnelle Deaktivierungsraten, die *Burst*-Entladungen mit hoher Frequenz (*high-frequency-bursting*) erleichtern²². Der Verlust dieser Kanäle beeinträchtigt die Fähigkeit der Interneurone, hohe Aktionspotentialraten aufrechtzuerhalten und reduziert damit die von diesen Zellen ausgeübte Inhibition im Kortex, was in den *knock out*-Mäusen zu spontanen Krampfanfällen führt²³.

Der vor allem modulatorisch wirksame Kaliumstrom I_m , welcher im Fokus dieser Arbeit steht, spielt trotz vergleichsweise niedriger somatischer Kanal- beziehungsweise Stromdichte eine bedeutende Rolle. Da er im Bereich des Ruhemembranpotentials aktiv oder aktivierbar ist, erlaubt er eine Feinmodulation der zellulären Erregbarkeit. I_m ist ein unter anderem durch muskarinische Azetylcholinrezeptoren modulierter Kaliumauswärtsstrom und wird von Kv7/M-Kanälen vermittelt. Der M-Strom wird langsam bei Spannungen positiv von -60 mV aktiviert, inaktiviert nicht und ist sensitiv für intrazelluläre ATP-, Calcium- und PIP₂-Konzentrationen²⁴⁻²⁶. Über den Kaliumauswärtsstrom wirkt er hyperpolarisierend und damit dämpfend. Er spielt eine wichtige Rolle in der Regulation neuronaler Aktivität, indem er durch Repolarisation der Ausbildung von Aktionspotentialen entgegenwirkt^{27, 28}. Eine pharmakologische Blockade in akuten Hirnschnitten der Ratte verursacht eine lang anhaltende, plateauartige Depolarisation von CA1-Pyramidenzellen, die zu spontanen Entladungen führen kann²⁹.

1.2. Die Kv7/KCNQ-Kaliumkanalfamilie

Die Kv7-Familie³⁰ (auch KCNQ) besteht aus den fünf Mitgliedern Kv7.1, Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 und Kv7.5, die durch *KCNQ1-5* kodiert werden. Kv7-Proteine besitzen die typische α -Untereinheitentopologie spannungsabhängiger Kaliumkanäle mit sechs Transmembran-Domänen (S1-S6). Eine einzelne Porenschleife zwischen S5 und S6 enthält den aus den drei Aminosäuren GYG bestehenden Selektivitätsfilter (Abb. 1). Dadurch weisen die Kanäle eine hohe Selektivität für K⁺-Ionen auf³¹. Die vierte Transmembran-Domäne (S4) ist durch Arginine positiv geladen und fungiert als Spannungssensor. Sie reagiert auf das

Membranpotential und steuert somit Aktivierung und Deaktivierung der Kanäle. Sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen intrazellulär. Der C-Terminus von Kv7-Kanälen ist im Vergleich zu anderen Kaliumkanälen relativ lang und enthält eine konservierte *Assembly*-Domäne, welche die Kv7-Kanalzusammensetzung bestimmt³²⁻³⁵. Es werden einerseits Homo- andererseits durch Kombination von Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 oder Kv7.5 Heterotetramere gebildet. Die Coexpression von Kv7.2- und Kv7.3-Untereinheiten zeigt eine wesentlich höhere Oberflächenexpression³⁴ und größere Ströme³⁶⁻³⁸ als die Expression einer Untereinheit allein. Darüber hinaus vermittelt ein IQ-Motiv (Isoleucin- und Glutaminreiche Domäne im C-Terminus) die Bindung eines Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexes und wirkt so modulatorisch auf Kv7.2/7.3-Kanäle³⁹.

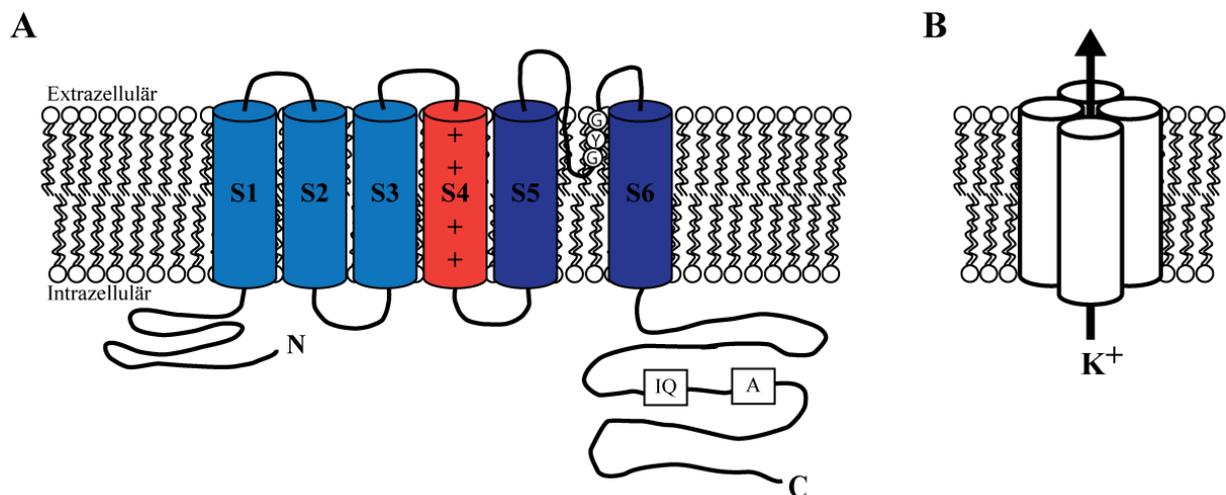


Abb. 1: Vereinfachtes Topologie-Modell einer Kv7-Kanaluntereinheit und eines Kv7-Kanals

(A) Eine spannungsabhängige α -Untereinheit der Kv7-Kanäle wird aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) geformt, wobei S4 mit positiv geladenen Aminosäuren als Spannungssensor fungiert (rot). Zwischen S5 und S6 befindet sich die Porendomäne mit den Aminosäuren GYG als Selektivitätsfilter. Der lange N- und C-Terminus des Proteins sind intrazellulär lokalisiert. Der C-Terminus enthält eine an der Tetramerisierung beteiligte *Assembly*-Domäne und ein Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexe bindendes IQ-Motiv. (B) Ein funktioneller Kanal wird durch die Zusammenlagerung von vier Kv7-Untereinheiten gebildet und ist überwiegend selektiv für Kaliumionen.

Kv7.1 kann im Herzen mit der β -Untereinheit KCNE1 assoziieren und repolarisiert kardiale Aktionspotentiale^{40, 41}. Abhängig von der Schwere des Funktionsverlusts führen Mutationen in einer der beiden Untereinheiten zu kardialer Arrhythmie im dominant vererbten *Long-QT*-Syndrom (Romano-Ward-Syndrom) oder bei einem schwereren Funktionsverlust zum Jervell-

Lange-Nielsen-Syndrom, bei welchem kardiale Arrhythmie mit erblich bedingter Taubheit verbunden ist (siehe Tabelle 1).

Mutationen in *KCNQ2/3* finden sich bei benignen familiären Neugeborenenkrämpfen (*benign familial neonatal convulsions*, BFNC⁴²), die mit einer Inzidenz von ca. 1:100000 auftreten. Dabei handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Form von Epilepsie. Sie ist durch kurze fokale und generalisierte tonische oder klonische Anfälle gekennzeichnet, meist begleitet von typischen Symptomen wie Tachykardie und Apnoephasen⁴³. Die Krämpfe treten als unprovizierte Anfälle in den ersten Lebensstagen der Neugeborenen mit unterschiedlicher Semiologie und häufig in *Clustern* auf. Die Dauer der Anfälle variiert von wenigen Sekunden bis zu einigen Minuten. Die Anfälle sistieren meistens spontan nach einigen Wochen bis Monaten. In seltenen Fällen treten als Folge leichte Entwicklungsverzögerungen mit Störungen im Lernverhalten bis hin zu epileptischer Enzephalopathie und mentaler Retardierung auf⁴⁴. Das spätere Risiko, ein Anfallsleiden, meist in Form generalisierter tonisch-klonischer Anfälle, zu entwickeln, ist im Vergleich zur Normalbevölkerung um den Faktor fünf erhöht⁴³.

Tab. 1: Expressionsmuster der *KCNQ*-Gene und assoziierte Krankheiten der Kv-Ionenkanalfamilie

Kanal	Expression	Funktion	Erbgang	Krankheit
Kv7.1	Herz, Cochlea, Darm, Magen, Pankreas	Repolarisation des kardialen Aktionspotentials, K ⁺ -Recycling in der Stria vascularis, Chloridsekretion im Darm	dominant	Kardiale Arrhythmie (Romano-Ward-Syndrom ⁴⁵)
			rezessiv	Kardiale Arrhythmie mit kongenitaler Taubheit (Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom ³²)
Kv7.2	Gehirn, Ganglien, Rückenmark	M-Strom, Modulation der neuronalen Erregbarkeit	dominant	Neonatale Epilepsie (BFNC ^{42, 46-48})
Kv7.3	Gehirn, Ganglien, Rückenmark	M-Strom, Modulation der neuronalen Erregbarkeit	dominant	Neonatale Epilepsie (BFNC ^{49, 50})
Kv7.4	Cochlea, Gehirn, Ganglien	I _{K,n}	dominant	Hereditäre Taubheit ⁵¹
Kv7.5	Gehirn, Ganglien, Skelettmuskulatur	Putativer M-Strom		

Es sind verschiedene Mutationen in *KCNQ2* und *KCNQ3* beschrieben worden, die zu einer Haploinsuffizienz des Ionenkanals führen^{42, 44, 46-50, 52-63}. Ein Überblick über die meisten bekannten Mutationen ist in Abb. 2 dargestellt. Auffällig ist die Häufung der bekannten Mutationen im Bereich der Porenregion und des C-Terminus. Mutationen der Porenregion können zur Verminderung der Einzelkanalleitfähigkeit führen, während Mutationen im C-Terminus die Tetramerisierung der Untereinheiten stören und dadurch die Dichte funktioneller Kanäle vermindern können^{33, 35, 64}. In beiden Fällen resultiert aus den Mutationen eine Reduktion der Stromamplitude.

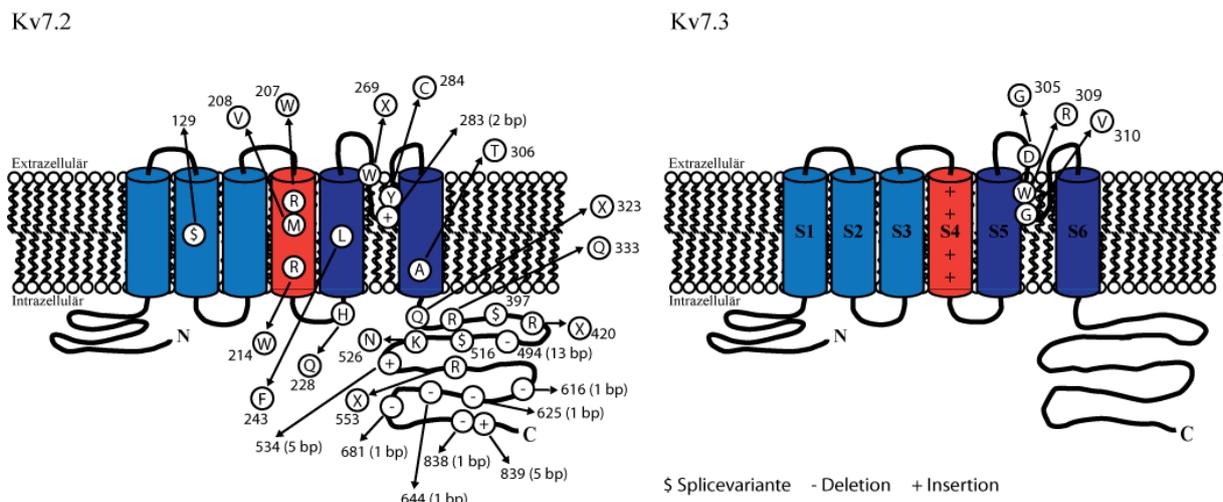


Abb. 2: Zusammenfassung von Mutationen in Kv7.2 und Kv7.3

Es ist ein Überblick über die meisten derzeit bekannten BFNC-Mutationen dargestellt. Viele dieser Mutationen liegen in der Porenschleife und im C-Terminus und führen zur Reduktion der Stromamplitude des M-Stroms.

Die verschiedenen Mitglieder der Kv7-Familie verfügen über unterschiedliche Expressionsmuster (siehe Tab. 1). Kv7.1 wird in Herzmuskeln⁴⁵, Lunge, Nieren, Leber sowie im Innenohr und Gastrointestinaltrakt⁶⁵ gefunden. Kv7.2 wird im Kleinhirnkortex, in Stammganglien, Amygdala, exzitatorischen pyramidalen Neuronen der mittleren Schichten des Neokortex, der hippocampalen Formation^{24, 66-68}, sympathischen Ganglienzellen des Ganglion cervicale superior³⁶ und peripheren Nerven detektiert. Die *KCNQ2*- und *KCNQ3*-Genexpression überlappen zum großen Teil. Kv7.4 wird hauptsächlich in den äußeren Haarzellen des Innenohres und des Vestibularapparats^{51, 69}, Kv7.5 in der Skelettmuskulatur und dem zentralen Nervensystem^{64, 70} exprimiert. Durch die zell- beziehungsweise gewebespezifische Expression der Kv7.1-, Kv7.4- und Kv7.5-Untereinheiten ist eine

Kompensation der durch *KCNQ2/3*-Mutationen verursachten Einschränkung der M-Kanalfunktion nur bedingt möglich.

1.3. Neonatale Anfälle und ihre Behandlung

Anfälle sind die häufigsten neurologischen Notfälle bei Neugeborenen und tauchen in dieser Zeit häufiger als in jeder anderen Zeit des Lebens auf. Die geschätzte Prävalenz für neonatale Anfälle liegt bei 2-3 auf 1000 Termingeburten und 10-15 auf 1000 Frühgeburten⁷¹⁻⁷³. Die Anfälle im unreifen Gehirn, welche neonatale Anfälle, infantile Krämpfe und fieberinduzierte Anfälle einschließen, unterscheiden sich von denen im erwachsenen Gehirn. Die klinische Diagnose ist nicht zuverlässig, weil oft eine schlechte Korrelation zwischen elektroenzephalographischem und klinischem Krankheitsbild der neonatalen Anfälle besteht⁷⁴. Anfälle bei Erwachsenen werden meist mit konventionellen antikonvulsiven Medikamenten, wie Barbiturate und Benzodiazepine, behandelt, welche die GABA_A-Rezeptor-vermittelten Chloridströme erhöhen. Diese werden auch bei Kindern verwendet. Allerdings unterscheidet sich die Chloridkonzentration in kindlichen Neuronen von der in Erwachsenen. Das intrazelluläre Niveau von Chlorid ist in den unreifen neonatalen Neuronen im Vergleich zu reifen adulten Neuronen etwa um 20-40 mM höher. Die neuronale Chlorid-Homöostase wird durch Chlorid-Transporter und Kanäle aufrechterhalten⁷⁵ (Abb. 3). Reife neuronale Neurone haben eine niedrige intrazelluläre Chloridkonzentration, die aus der hohen Expression des K⁺-Cl⁻-Cotransporters KCC2 resultiert. KCC2 transportiert Chlorid aus der Zelle, indem es den elektrochemischen Gradienten von Kalium nutzt. Niedrige intrazelluläre Chloridkonzentrationen erlauben dem reifen Neuron als Antwort auf Aktivierung der Chloridkanäle zu hyperpolarisieren, wie zum Beispiel auf den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter GABA im Gehirn^{75, 76}. Neonaten reichern Cl⁻ durch die Aktion des Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporters (NKCC1, der durch *SLC12A2* kodiert wird) an⁷⁷. Das *SLC12A2* mRNA-Expressionsniveau ist während der frühen postnatalen Tage hoch und nimmt während der postnatalen Entwicklung ab. Die mRNA-Expression von *KCC2* zeigt das entgegengesetzte Expressionsmuster⁷⁸⁻⁸⁰. Die entwicklungsabhängige Hochregulation der KCC2-Expression scheint kritisch für den Wechsel von exzitatorischer zu schneller inhibitorischer GABA-Wirkung^{76, 81} (Abb. 3).

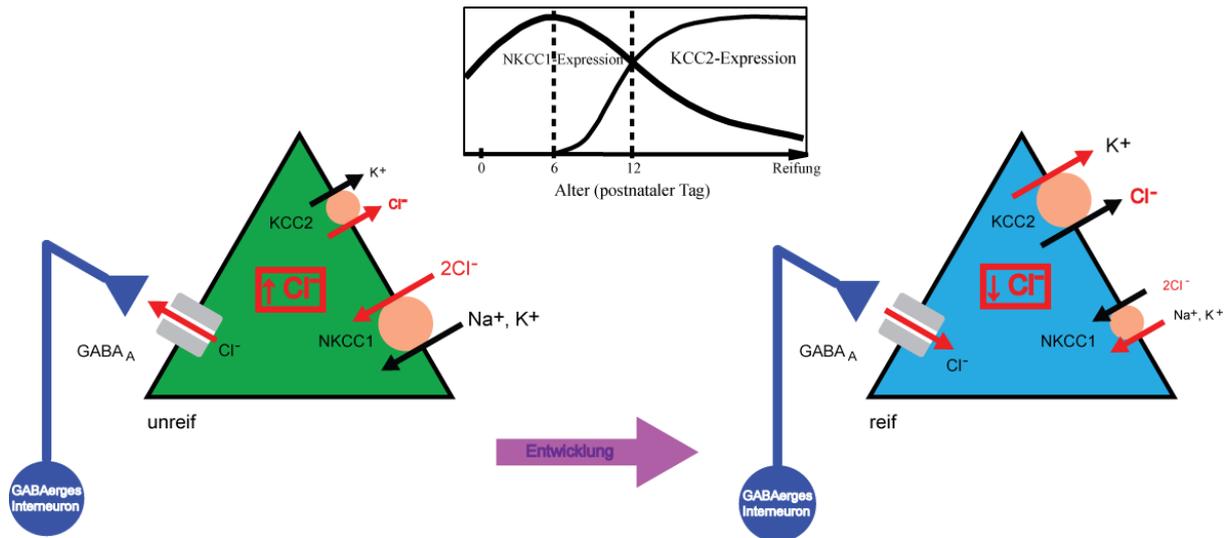


Abb. 3: Entwicklungsabhängige Veränderung der GABA-Wirkung

In unreifen Neuronen (links) erhöht die starke Expression des NKCC1-Cotransporters, der Chlorid, Natrium und Kalium ins Neuron befördert, die intrazelluläre Chloridkonzentration, so dass GABA exzitatorisch wirkt. Der Gegenspieler KCC2, der Chlorid und Kalium aus der Zelle exportiert, ist dagegen nur schwach exprimiert. Während der Entwicklung nimmt die Expression von NKCC1 ab und die von KCC2 zu. In reifen Neuronen (rechts) führt dies zur Verringerung der intrazellulären Chloridkonzentration und macht GABA inhibitorisch. Zusätzlich ist der Verlauf der Expressionsänderung von NKCC1 und KCC2 in Ratten dargestellt. (modifiziert nach Ben-Ari⁸²)

Konventionelle antiepileptische Medikamente verstärken die Wirkung der GABA_A-Rezeptoren, indem sie den Einstrom von Chlorid erhöhen und so die übererregbaren Neurone hyperpolarisieren. Nimmt man jedoch an, dass GABA_A-Rezeptoren im sich entwickelnden Gehirn entgegengesetzt agieren, dann ist die Verwendung solcher Medikamente problematisch. Sie führen so zu einer Beeinträchtigung der Gehirnentwicklung und neurologischen Problemen⁸³. Barbiturate und Benzodiazepine produzieren in Neonaten ein Phänomen, das „elektroklinische Dissoziation“ genannt wird. Dabei werden die sichtbaren klinischen Anfälle inhibiert. Die im EEG dokumentierbare kortikale Aktivität ist jedoch entweder nicht verändert oder sogar verstärkt^{84, 85}. Aus diesem Grund sind andere Strategien notwendig, um die neonatale Anfallsbehandlung zu verbessern.

1.4. Konditionelles transgenes Mausmodell mit M-Kanal-Suppression

Mutationen in *KCNQ2* und *KCNQ3* führen im Menschen zur neonatalen Epilepsie BFNC. Um die zellulären und molekularen Mechanismen der neuronalen Übererregbarkeit bei Epilepsie aufklären zu können, muss ein großer Teil der Untersuchungen an geeigneten Tiermodellen vorgenommen werden, da der Zugang zu menschlichem Gewebe beschränkt ist. Tiermodelle sollten die Symptome beziehungsweise die Pathogenese der zu untersuchenden Krankheit widerspiegeln, um die Befunde später auf den Menschen übertragen zu können. Watanabe *et al.* haben *KCNQ2* in einem Mausmodell genetisch ausgeschaltet, um die Beziehung zwischen *KCNQ2* und Epilepsie zu untersuchen⁸⁶. Homozygote *KCNQ-Knock out*-Tiere starben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt in Folge einer Lungenreifungsstörung.

Um die Konsequenzen von M-Kanaldefizienz auf zellulärer, Netzwerk- und Verhaltensebene untersuchen zu können, wurde in unserem Labor ein transgenes Mausmodell entwickelt, in dem der M-Strom im Gehirn sowohl räumlich als auch zeitlich kontrolliert unterdrückt werden kann. Mit Hilfe des *Tet-off*-Systems wird eine Kv7.2-Untereinheit mit dominant negativer Porenmutation exprimiert. Dabei bilden die mutierten Untereinheiten mit den nativen Untereinheiten Kanäle aus, die nicht funktionell sind. Das *Tet-off*-System⁸⁷ benötigt zwei regulatorische Elemente, die in das Genom von zwei Mauslinien stabil integriert sind (Abb. 4). In der Promotor-Linie befindet sich der Tetrazyklin-sensitive Transaktivator (tTA) unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, in diesem Fall des Prion-Promotors⁸⁸. Dadurch wird tTA nur im Gehirn exprimiert. Der Transaktivator besteht aus dem Tet-Repressor des *E. coli* Tn10 Tetrazyklin-Resistenzoperons und dem C-Terminus des Proteins 16 des Herpes Simplex-Virus, welcher als starker Transaktivator fungiert. Die zweite Mauslinie (Responderlinie) trägt das Plasmid mit der mutierten humanen *KCNQ2*-Sequenz (*hKCNQ2-G279S*). Die dominant-negative Mutation liegt im Selektivitätsfilter der Porendomäne, so dass die Leitfähigkeit des Kanals gestört ist. Die Transkription des mutierten *hKCNQ2-G279S*-Gens wird von dem Tetrazyklin-responsiven Element (TRE) kontrolliert. Dies besteht aus sieben Tetrazyklin-Repressor-Bindestellen (TetO₇) und einem minimalen Cytomegalovirus (CMV)-Promotor. Durch die Kreuzung von Promotorlinie und Responderlinie können beide regulatorischen Elemente in doppelt transgenen Mäusen vorhanden sein. In der Abwesenheit von Tetrazyklin oder seinem Derivat Doxozyklin bindet der Tetrazyklin-sensitive Transaktivator an das Tetrazyklin-responsive Element und erlaubt

die Transkription des *hKCNQ2-G279S*-Transgens. Das oral applizierte Doxyzyklin bindet an tTA, verhindert durch eine Konformationsänderung die Bindung an das Tetrazyklin-responsive Element und damit die Transkription des Zielgens.

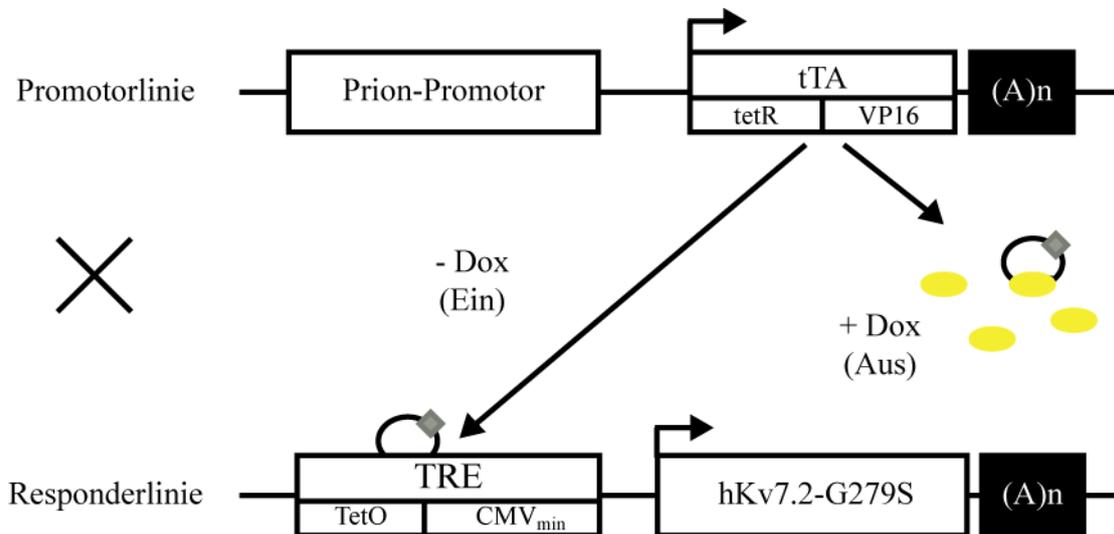


Abb. 4: Schematische Darstellung des *Tet-off*-Systems

Die regulatorischen Elemente des *Tet-off*-Systems sind für die Herstellung von M-Kanal-defizienten Mäusen in zwei transgenen Mauslinien integriert. Die Promotorlinie exprimiert unter der Kontrolle des Prionpromotors gehirnspezifisch den Tetrazyklin-sensitiven Transaktivator (tTA). In das Genom der Responderlinie ist die mutierte humane Kanal-Untereinheit (hKv7.2-G279S) unter der Kontrolle des Tetrazyklin-responsiven Elements (TRE) integriert. Durch Kreuzung der beiden Linien sind beide regulativen Elemente in doppelt transgenen Tieren vorhanden. Durch die orale Gabe des Tetrazyklin-Derivats Doxyzyklin (Dox) wird die Bindung des tTA an TRE durch Konformationsänderung und damit auch die Expression des Transgens *hKCNQ2-G279S* verhindert. In Abwesenheit von Doxyzyklin bindet der Transaktivator an das Tetrazyklin-responsive Element und ermöglicht die Expression des Transgens im Gehirn.

So konnten zwei lebensfähige Mauslinien ohne M-Strom im Gehirn (P-M2 und P-M2/1) erzeugt werden. Bei der P-M2-Mauslinie wurde das Transgen X-chromosomal vererbt. Die P-M2/1-Mäuse gaben das Transgen autosomal weiter und wiesen eine höhere Expressionsstärke des Transgens auf. Die adulten M-Kanal-defizienten Mäuse beider Linien zeigten einen epileptischen Phänotyp mit spontanen partiellen und gelegentlich auch generalisierten tonisch-klonischen Anfällen. Außerdem wiesen die Tiere Veränderungen in der Hippocampus-Morphologie (Hippocampus-Übersicht, Seite 107 Abb. 34), eine Verhaltenshyperaktivität, die stereotypes Kreisen beinhaltete, und kognitive Defizite auf. Elektrophysiologische Veränderungen zeigten sich in hippocampalen CA1-Pyramidenzellen,

die sich in erhöhter Erregbarkeit, reduzierter Spike-Frequenz-Adaptation, verminderter Nachhyperpolarisation (mAHPs) und verringerter intrinsischer unterschwelliger Theta-Resonanz äußerten¹.

Mit Hilfe des *Tet-off*-Systems konnte die Transgenexpression und damit das M-Strom-Defizit während der neonatalen Wochen unterdrückt werden. Dadurch konnten die morphologischen Veränderungen im Hippocampus, die Verhaltenshyperaktivität verhindert sowie die häufig auftretenden Anfälle vermindert werden. Während der neonatalen Phase scheint daher die Expression des funktionellen M-Stroms von kritischer Bedeutung zu sein.

1.5. Zielsetzung

Das Mausmodell, in dem der M-Kanal durch Expression einer neuronal spezifischen, induzierbaren, dominant-negativen, humanen Kv7.2-G279S-Untereinheit supprimiert wird, sollte helfen, die Pathomechanismen der M-Kanaldefizienz aufzuklären. Mit Hilfe der Affymetrix GeneChip Technologie sollten Transkriptomanalysen durchgeführt werden. Dabei sollten Gene gefunden werden, die während der Epileptogenese und der chronischen Phase differentiell reguliert werden. So sollten mögliche neue Angriffspunkte für die Behandlung von Epilepsie identifiziert werden. Für die vergleichenden Analysen des Transkriptoms sollte der Hippocampus verwendet werden, da dieser am stärksten sowohl durch morphologische als auch elektrophysiologische Veränderungen betroffen ist. Potentielle Kandidatengene sollten anschließend durch weitere Methoden auf RNA- und Proteinebene verifiziert werden.

Wie mit Hilfe des *Tet-off*-Systems gezeigt werden konnte, ist das Vorhandensein des erregungsdämpfenden M-Stroms während der neonatalen Phase für die normale Hirnentwicklung wichtig. Da bislang nur wenig über die neonatale Netzwerkaktivität im Kortex und Hippocampus bekannt ist, sollten im Rahmen dieser Arbeit Techniken zur Ableitung elektrischer Aktivität entwickelt werden, um so einerseits die normale Netzwerkaktivität in neonatalen Mäusen untersuchen zu können und andererseits Vergleiche zwischen Kontrollmäusen und M-Kanal-defizienten Mäusen anstellen zu können.

Basierend auf den Ergebnissen der Transkriptomanalysen sowie der Befunde aus den physiologischen Experimenten sollte abschließend untersucht werden, ob durch gezielte pharmakologische Interventionen der Phänotyp der transgenen Mäuse, d.h. die morphologischen Veränderungen im Hippocampus, das hyperaktive Verhalten der Mäuse oder die Frequenz von Krampfanfällen positiv beeinflusst werden könnten.

2. Material

2.1. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien in Analysequalität von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich und Merck bezogen.

Der Molekulargewichtsstandard wurde bei der Firma Bioline gekauft. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG synthetisiert.

2.2. Lösungen und Medien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Medien wurden mit bidestilliertem Wasser (H₂O bidest.) hergestellt, das über eine Reinstwasseranlage (Bi-Dest 2304, GFL) aufbereitet wurde. Bei Bedarf wurden die Lösungen bei 120 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert oder durch einen Filter von 0,22 µm sterilfiltriert.

Anästhesie-Lösung	1,2 ml	Ketanest [10 %]
	0,8 ml	Rompun [2 %]
	8 ml	NaCl [0,9 %]
Blockierlösung	10 %	Pferdeserum
	0,2 %	BSA
	1 %	Triton
	in PBS	
Carrierlösung 1	1 %	Pferdeserum
	0,2 %	BSA
	0,25 %	Triton
	in PBS	
Carrierlösung 2	0,3 %	Triton
	in PBS	

Extrazellulär-Lösung (ACSF)	125	mM	NaCl
	1,25	mM	NaHPO ₄
	2,5	mM	KCl
	2	mM	CaCl ₂
	2	mM	MgCl ₂
	25	mM	Glukose
	25	mM	NaHCO ₃
			Für Messungen im Stromklemmen-Modus: zusätzlich 10 µM CNQX, 10 µM Bicucullin
			Für Messungen im Spannungsklemmen-Modus: zusätzlich 0,5 µM Tetrodotoxin
Fragmentierungspuffer (5x)	200	mM	Tris-Acetat, pH 8,1
	500	mM	Kaliumacetat
	150	mM	Magnesiumacetat
Intrazellulär-Lösung	140	mM	KMeSO ₃
	10	mM	HEPES
	10	mM	Phosphokreatin
	2	mM	Na-ATP
	0,4	mM	Na-GTP
	2	mM	MgCl ₂
			pH 7,3
Kresylviolettlösung	9	g/l	Kresylviolett
	10	%	Ethanol
			In H ₂ O bidest., unter Rühren auf ~ 50 °C erhitzt, vor Gebrauch filtriert.
Ohrlochstanzen-Lysispuffer	50	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	100	mM	NaCl
	0,2	%	Nonidet P-40
	0,2	%	Tween 20
	1	mM	EDTA
	0,1	mg/ml	Proteinase K
PBS (20x)	3	M	NaCl
	161	mM	Na ₂ HPO ₄
	39	mM	KH ₂ PO ₄
PCR-Puffer (10x)	0,2	M	Tris-HCl, pH 7,9
	0,5	M	KCl
Probenpuffer (10x)	0,02	g	Bromphenolblau
	0,02	g	Xylencyanol
	5	ml	Glycerin
	1,7	ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
			add 10 ml H ₂ O bidest.

Saccharose-Lösung	85	mM	NaCl
	1,25	mM	NaHPO ₄
	2,5	mM	KCl
	0,5	mM	CaCl ₂
	4	mM	MgCl ₂
	25	mM	Glukose
	75	mM	Saccharose
	25	mM	NaHCO ₃
TAE-Puffer (50 x)	2	M	Tris
	0,5	M	Eisessig
	50	mM	EDTA
	autoklavieren		

2.3. Verwendete Kits

<i>BioArray High Yield RNA Transcription and Labeling Kit</i>	Enzo Life Sciences
<i>DirectPCR Lysis Reagent (Tail)</i>	Peqlab Biotechnologie
<i>Invisorb Spin Tissue Mini Kit</i>	Invitek
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
<i>SuperScript Choice System</i>	Invitrogen
<i>TaqMan Gene Expression Master Mix</i>	Applied Biosystems
TRIZOL Reagent	Invitrogen
VECTASTAIN ABC (Standard) Kit	VECTOR Laboratories

2.4. Mauslinien

C57BL6	Charles River
tg(Prnp-tTA)	Promotormauslinie mit Tetrazyklin- beziehungsweise Doxyzyklin kontrolliertem Transaktivator unter der Kontrolle des Prion-Protein-Promotors ⁸⁸

tg(Tre-M2)	Transgene Mauslinie mit X-chromosomal integriertem Antwort-Plasmid mit dominant-negativem <i>hKCNQ2-G279S</i> -Transgen ¹
tg(Tre-M2/1)	Transgene Mauslinie mit autosomal integriertem Antwort-Plasmid mit dominant-negativem <i>hKCNQ2-G279S</i> Transgen
tg(Prnp-tTA, Tre-M2)	Doppelt transgene Mauslinie aus der Kreuzung von Prnp-tTA x Tre-M2, mit funktionellem <i>Tet-off</i> -System ¹
tg(Prnp-tTA, Tre-M2/1)	Doppelt transgene Mauslinie aus der Kreuzung von Prnp-tTA x Tre-M2/1, mit funktionellem <i>Tet-off</i> -System

Die Züchtung der verschiedenen aufgeführten Mauslinien wurde in der Institut zugehörigen Tierhaltung durchgeführt.

2.5. Verwendete Antikörper

2.5.1. Primärantikörper

anti- <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> (GFAP)	1:1000 für Immunhistochemie Monoklonaler Antikörper hergestellt in Mäusen (Chemicon)
Biotinyliertes <i>Griffonia simplicifolia</i> Lectin/Isolectin B4	10 µg/500 µl (Vector Laboratories)
anti-Calbindin D-28K	1:1000 für Immunhistochemie Monoklonaler Antikörper hergestellt in Mäusen (Swant)
anti-Calretinin	1:2000 für Immunhistochemie Polyklonaler Antikörper hergestellt in Kaninchen (Swant)
anti-c-fos	1:200 für Immunhistochemie Polyklonaler Antikörper hergestellt in Ziegen (Santa Cruz Biotechnologie)
anti-Parvalbumin	1:2000 für Immunhistochemie Monoklonaler Antikörper hergestellt in Mäusen, Klon Parv-19 (Sigma)

anti-Somatostatin	1:200 für Immunhistochemie Polyklonaler Antikörper hergestellt in Kaninchen (Chemicon)
-------------------	--

2.5.2. Sekundärantikörper

anti-Kaninchen biotinyliert	1:1000 für Immunhistochemie (VECTOR Laboratories)
-----------------------------	--

anti-Maus biotinyliert	1:1000 für Immunhistochemie (VECTOR Laboratories)
------------------------	--

anti-Ziege biotinyliert	1:1000 für Immunhistochemie (VECTOR Laboratories)
-------------------------	--

2.6. Verwendete Oligonukleotide

ae1-FW	5' - ACG CGA TGC CCT CCA TAG - 3'
--------	-----------------------------------

ae1-RV2	5' - AAT TCG AGA CCG GAT CCT TTC T - 3'
---------	---

ae1-TaqMan-Probe	5' - FAM-TCC CAG CAA GTT CT-TAMRA - 3'
------------------	--

hKCNQ2-8c	5' - ACA TGC TGT CCC GAA TTA AG - 3'
-----------	--------------------------------------

hKCNQ2-3nc	5' - GCA CGG GGT ACA GAG GTC GGA GTC - 3'
------------	---

mSyp-1c	5' - TCA GGA CTC AAC ACC TCG GTG G - 3'
---------	---

mSyp-2nc	5' - AAC ACG AAC CAT AGG TTG CCA A - 3'
----------	---

mSyp TaqMan-Probe	5' - FAM-TTT GGC TTC CTG AAC CTG GTG CTC TG-TAMRA- 3'
-------------------	---

tTA-3c	5' - ATG AGG TCG GAA TCG AAG - 3'
--------	-----------------------------------

tTA-4nc	5' - TTT CTG TAG GCC GTG TAC - 3'
---------	-----------------------------------

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle molekularbiologischen Methoden nach „Molecular Cloning“⁸⁹ durchgeführt.

3.1.1. Isolation genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

Genomische DNA aus Schwänzen wurde mit dem Invisorb *Spin Tissue Mini Kit* nach Herstellerangaben gewonnen. Die DNA wurde mit 50 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert. Alternativ wurden die Mäuseschwänze nach Anleitung des Herstellers mit dem *Direct PCR Lysis Reagent (Tail)* lysiert. Nach Hitzebehandlung wurden die Lysate direkt in PCR-Reaktionen eingesetzt.

3.1.2. Isolation genomischer DNA aus Mäuseohrlochstanzen

Zur Isolation genomischer DNA wurden 50 µl Ohrlochstanzen-Lysispuffer auf die Stanzen gegeben und üN bei 55 °C unter Schütteln lysiert.

3.1.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Abschnitten erfolgte mit der Polymerasekettenreaktion⁹⁰ (*polymerase chain reaction*, PCR). Die Reaktionsansätze umfassten ein Volumen von 50 µl und setzten sich folgendermaßen zusammen:

Komponenten	Endkonzentration oder Menge
DNA	x ng
Sinn-Oligonukleotide	50 pMol
Antisinn-Oligonukleotide	50 pMol
Nukleotide (dNTPs)	0,4 mM
Magnesiumchlorid	10 mM
PCR-Puffer (10x)	5 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	2,5 U

Mit Hilfe der Wallace-Regel erfolgte die Berechnung der Schmelztemperatur:

$$T_m = 4 \times \text{Anzahl (G + C)} + 2 \times \text{Anzahl (A + T)}$$

Unterschieden sich die beiden Temperaturen, so wurde bei der niedrigeren Temperatur gearbeitet.

Zum Amplifizieren von GC-reichen DNA-Fragmenten wurden DMSO (5% (v/v) *f.c.*) und/oder Betain (1M *f.c.*) hinzugefügt.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermoblock (DNA Engine PTC-200, MJ Research) nach folgendem Basisprogramm durchgeführt:

Eingangsdennaturierung	95 °C	5 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 s	
Hybridisierung	55 °C	45 s	
Synthese	72 °C	1 min/kb	
Abschlussynthese	72 °C	5 min	

Zur Amplifikation von schwer zu amplifizierenden DNA-Fragmenten wurde eine *touchdown*-PCR durchgeführt. Dabei wurde die Spezifität der Primer-Bindung durch zyklusweise Annäherung der Hybridisierungstemperatur, die über der zu erwartenden Schmelztemperatur lag, an die zu erwartenden Schmelztemperatur des Primers (T_m) erniedrigt. So konnten Primer-Dimere und Artefakte verringert werden, es vermehrte sich vorzugsweise das gewünschte Amplikon.

3.1.4. Genotypisierung mittels PCR

Zur Genotypisierung der doppelt transgenen Mäuse *tghKCNQ2-G279S* mit dem *Tet-off*-System wurde eine *Duplex-touchdown*-PCR durchgeführt. Der Nachweis der Transgene wurde mit Oligonukleotiden durchgeführt, wobei die Sequenz so gewählt wurde, dass das entsprechende Transgen selektiv amplifiziert wurde und keine PCR-Produkte auf der genomischen DNA generiert wurden. Für *tghKCNQ2-G279S* wurde das Primerpaar

hKCNQ2-8c/hKCNQ2-3nc und für das *Tet-off*-System tTA-3c/tTA-4nc verwendet. Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Eingangsdennaturierung	95 °C	5 min	} 5 Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 s	
Hybridisierung	60-1 °C/Zyklus	1 min	
Synthese	72 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	} 25 Zyklen
Hybridisierung	55 °C	1 min	
Synthese	72 °C	1 min	
Abschluss-synthese	72 °C	5 min	

Für die PCR wurden 2 µl der genomischen DNA in einer 50 µl-Reaktion als Template verwendet. 10 µl des PCR-Produkts wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Für das Primerpaar hKCNQ2-8c/hKCNQ2-3nc wurde eine Fragmentgröße von 818 bp und für tTA-3c/tTA-4nc eine von 270 bp erwartet.

3.1.5. TaqMan-PCR

Das Sequenz-Detektionssystem von Applied Biosystems ist ein Assay, bei dem Amplifikation und Nachweis des PCR-Produkts simultan möglich sind. Dabei wird die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase zur Detektion der sequenzspezifischen Amplifikation ausgenutzt. In der TaqMan-PCR wird eine spezielle sequenzspezifische fluorogene Sonde eingesetzt. Sie besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff trägt. Zusätzlich ist es durch ein Phosphatrest blockiert, um eine Extension des 3'-Endes während der PCR zu vermeiden. Durch die räumliche Nähe des Quenchers zum Reporter-Farbstoff wird bei Anregung mit spezifischer Wellenlänge die Fluoreszenz durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern sequenzspezifisch am Matrizen-Strang. Während der Synthesephase trifft die *Taq*-Polymerase auf die Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase aktiviert und die Sonde hydrolysiert wird. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Der Anstieg der Fluoreszenz ist der Anreicherung an Amplifikat somit direkt proportional.

Zur Quantifizierung wurde eine relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode durchgeführt. Die unterschiedliche Expression wurde als n-fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wertes angegeben. Die CT-Werte (*threshold cycle* = "Schwellenwert-Zyklus") wurden

hierbei voneinander abgezogen (ΔCT), die beiden ΔCT -Werte der einzelnen Gruppen voneinander subtrahiert ($\Delta\Delta CT$ -Wert) und in die folgende Gleichung eingesetzt:

$$n\text{-fache Expression (Gruppe A zu Gruppe B)} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Als Referenz-Gen wurde das neuronale Haushaltsgen Maus-Synaptophysin (*mSyp*) gewählt, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen und einen relativen Mengen-Vergleich durchzuführen. Zusätzlich wurde eine externe Kontrolle verwendet. Diese externe Kontrolle war das Gen-Transkript *ae1* aus dem Organismus *Zea mays* L. Sie wurde der reversen Transkription (RT) zur Herstellung der Matrizen-cDNA hinzugefügt, um die unterschiedlichen Effizienzen der RT ausgleichen zu können.

Die TaqMan-PCR mit von Applied Biosystems vorgefertigten Assays wurde mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

Komponenten	Menge
cDNA	1 μ l
TaqMan-Mix (2x)	10 μ l
Assay-Mix (20x)	1 μ l
DEPC-H ₂ O	add 20 μ l

Für den Nachweis von *mSyp* wurde eine TaqMan-PCR mit optimierter PCR-Zusammensetzung durchgeführt:

Komponenten	Menge
cDNA	1 μ l
TaqMan-Mix (2x)	7 μ l
mSyp-1c (10 pmol)	0,6 μ l
mSyp-2nc (10 pmol)	0,6 μ l
TaqMan-Sonde (20x)	2 μ l
DEPC-H ₂ O	add 20 μ l

Für die externe Kontrolle *ae1* wurde die TaqMan-PCR wie folgt durchgeführt:

Komponenten	Menge
cDNA	1 μ l
TaqMan-Mix (2x)	10 μ l
ae1 FW (30 μ M)	0,2 μ l
ae1 RV2 (30 μ M)	0,6 μ l
TaqMan-Sonde (10 μ M)	0,2 μ l
DEPC-H ₂ O	add 20 μ l

Jede Reaktion wurde als Triplet durchgeföhrt, um Pipettierfehler auszugleichen. Die TaqMan-PCR-Reaktion wurde in einem ABI PRISM 7900 HT Thermocycler (Applied Biosystems) durchgeföhrt. Dabei wurde das Standard-PCR-Program verwendet:

Enzym-Aktivierung/Deaktivierung	50 °C	2 min	} 40 Zyklen
Eingangsdennaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	15 s	
Synthese	60 °C	1 min	

CT-Werte des Amplifikationsplots wurden mit der SDS 2.0 Software (Applied Biosystems) bestimmt.

3.1.6. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäuren wurden mit dem entsprechenden Volumen Probenpuffer (10x) versetzt und je nach erwarteter Größe auf einem 0,6-2,0 %igen Agarose-Gel mit 0,006 % Ethidiumbromid (10 mg/ml) in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenstandard diente Hyperladder I. Die Lage der DNA-Fragmente im Gel wurde mit Ethidiumbromid, das mit doppelsträngiger DNA interkaliert, auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.1.7. Isolation von RNA aus Hirngewebe

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus Hirngewebe wurde das kommerzielle Reagenz TRIzol nach Herstellerangaben verwendet. Diese Methode basiert auf einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation mit monophasischer Phenol- und Guanidin-Isothiocyanat-Lösung. Dabei hilft TRIzol die Integrität der RNA während des Homogenisierens des Gewebes zu erhalten und gleichzeitig Zellen und Zellkomponenten aufzuschließen. Die Zugabe von Chloroform und eine anschließende Zentrifugation führten zur Auftrennung des Gemisches in wässrige und organische Phase. Die RNA in der wässrigen Phase wurde durch Fällung mit Isopropanol und anschließender Zentrifugation isoliert.

Zur Erhöhung der Reinheit der RNA wurde diese, falls notwendig, mit Hilfe des RNeasy Mini Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.1.8. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe des RNA 6000 Nano Lab Chips nach Anleitung des Herstellers bestimmt, das auf dem Prinzip einer miniaturisierten Kapillarelektrophorese (*Lab-on-a-chip*-Verfahren) basierte. In einem Minichip, welcher aus

einem Netzwerk untereinander verbundener Kanäle bestand, wurde eine spannungsinduzierte Größentrennung von RNA-Fragmenten nach Molekulargewicht vorgenommen. Die Erfassung der RNA-Fragmente erfolgte mittels einer laserinduzierten Fluoreszenzdetektion. Die Stärke der gemessenen Fluoreszenz korrelierte mit der Menge an RNA einer bestimmten Größe in einer Probe. Aus den Daten wurde für jede Probe ein Elektropherogramm erstellt.

3.1.9. Synthese doppelsträngiger cDNA von Gesamt-RNA

Ausgehend von Gesamt-RNA wurde für die Herstellung doppelsträngiger cDNA das *SuperScript Choice System* verwendet. Für die Synthese des ersten Stranges der cDNA wurde mit Hilfe von Oligo(dT)-Primern rRNA, tRNA und mRNA in folgenden Schritten revers transkribiert:

	Reagenzien	Volumen	Finale Konzentration oder Menge
1: Primer Hybridisierung Inkubation bei 70 °C für 10 min Anzentrifugieren und auf Eis	DEPC-H ₂ O T7-Oligo(dT)-Primer (50 µM) RNA	Endvolumen von 20 µl 2 µl 5 bis 20 µg	100 pmol 5 bis 20 µg
2: Temperaturanpassung Dazugeben und gut mischen Inkubation bei 42 °C für 2 min	5x Erststrangpuffer 0,1 M DTT 10 mM dNTP Mix	4 µl 2 µl 1 µl	1x 10 mM DTT je 500 µM
3: Erststrangsynthese Dazugeben und gut mischen Inkubation bei 42 °C für 1 h	SuperScript II RT (200 U/µl)	1 bis 3 µl	200 U bis 1000 U
Endvolumen		20 µl	

Für die Synthese des zweiten Strangs der cDNA wurde die Erststrangreaktion auf Eis platziert und kurz zentrifugiert. Zur Erststrangsynthese-Reaktion wurde die folgende Zweitstrang-Reaktionskomposition zugefügt:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration oder Menge
DEPC-H ₂ O	91 µl	
5x Zweitstrang-Reaktionspuffer	30 µl	1x
10 mM dNTP Mix	3 µl	je 200 µM
10 U/µl <i>E. coli</i> DNA Ligase	1 µl	10 U
10 U/µl <i>E. coli</i> DNA Polymerase	4 µl	40 U
2 U/µl <i>E. coli</i> RNase H	1 µl	2 U
Endvolumen	150 µl	

Durch vorsichtiges Antippen wurde der Inhalt gemischt, kurz zentrifugiert und bei 16 °C für 2 h inkubiert. Anschließend wurden 2 µl [10 U] T4 DNA Polymerase dazugegeben und erneut

bei 16 °C für 5 min inkubiert. Zum Abschluss wurden 10 µl 0,5 M EDTA zugefügt, um die Reaktion zu stoppen.

3.1.10. Aufreinigung doppelsträngiger cDNA

Um doppelsträngige cDNA aufzureinigen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde die cDNA-Lösung mit der gleichen Menge Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (50:49:1) versetzt und kurz mit einem Vortexer gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 12000 rpm für 2 min. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reagiergefäß überführt und die DNA durch Ethanol-Präzipitation gewonnen, indem zur Fällung der DNA 0,5-faches Volumen 7,5 M Na-Acetat und 2,5-faches Volumen -20 °C-kalter Ethanol hinzugefügt, gevortext und bei 12000 x g bei RT 20 min zentrifugiert wurde. Zum Waschen wurde das Pellet zweimal mit 500 µl 80 %igem Ethanol (-20 °C) bei 12000 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in H₂O gelöst.

3.1.11. Synthese Biotin-markierter cRNA

Für die Generierung der biotin-markierten cRNA-Sonden wurde das Enzo *BioArray High Yield RNA Transcription and Labeling Kit* wie folgt verwendet:

Reagenzien	Volumen
Matrizen-cDNA	10 bis 3,3 µl
H ₂ O	Endvolumen von 40 µl
10x HY Reaktionspuffer	4 µl
10x Biotin-markierte Ribonukleotide	4 µl
10x DTT	4 µl
10x RNase-Inhibitormix	4 µl
20x T7 RNA Polymerase	2 µl
Endvolumen	40 µl

Die Reagenzien wurden vorsichtig gemischt und anzentrifugiert. Anschließend wurden die Reagenzgefäße bei 37 °C für 4 bis 5 h inkubiert, wobei die Reaktion alle 30-45 min vorsichtig gemischt wurde.

3.1.12. Aufreinigung und Quantifizierung der Biotin-markierten cRNA

Es ist notwendig, nicht inkorporierte dNTPs zu entfernen, so dass die Konzentration und Reinheit der cRNA bei 260 nm Absorption bestimmt werden kann.

Die cRNA-Ausbeute wurde photometrisch bestimmt. Es wurde die Konvention verwendet, dass 1 Absorptionseinheit bei 260 nm 40 µg/ml RNA entspricht. Die Absorption bei 260 nm und 280 nm wurde überprüft, um die Konzentration der Proben sowie die Reinheit zu überprüfen. Die A_{260}/A_{280} Ratio sollte für reine RNA um 2 liegen.

Zur Quantifizierung der aus Gesamt-RNA generierten cRNA muss eine angepasste Ausbeute berechnet werden, um die Übertragung von unmarkierter RNA auszugleichen. Unter Annahme einer 100 %igen Übertragung wurde folgende Formel zur Bestimmung der Ausbeute verwendet:

$$\text{Angepasste cRNA Ausbeute} = \text{RNA}_m - (\text{Gesamt-RNA}_i)(y)$$

RNA_m = Menge an cRNA gemessen nach der *in vitro* Transkription (µg)

Gesamt-RNA_i = Ausgangsmenge an Gesamt-RNA (µg)

y = Fraktion der cDNA Reaktion verwendet in *in vitro* Transkription

Die unfragmentierten Proben wurden mittels Gelelektrophorese auf Ausbeute und Größenverteilung der markierten Transkripte überprüft.

3.1.13. Fragmentierung der cRNA für Sondenpräparation

Um optimale Assay-Sensitivität zu erreichen, ist Fragmentierung der cRNA-Sonde vor der Hybridisierung auf die GeneChip Probe Assays ein notwendiger Schritt. Die Fragmentierungsreaktion wurde wie folgend durchgeführt:

Komponenten	Volumen
20 µg cRNA	1 bis 21 µl
5x Fragmentierungspuffer	8 µl
RNase-freies H ₂ O	auf 40 µl

Der Reaktionsansatz wurde bei 94 °C für 35 min inkubiert und anschließend auf Eis gelagert.

3.1.14. Affymetrix GeneChip Prozessierung

Das Hybridisieren der Sonden sowie das Waschen, Färben und Scannen der Affymetrix GeneChips (*Murine Genome U74 Set* und *Mouse Expression Sets 430*) wurden von der *Integrated Functional Genomics* (IFG) in Münster durchgeführt. Auch die grundlegende Datenanalyse, die das Erstellen der Reportdateien und die Datenspeicherung beinhaltet, wurde dort ausgeführt.

3.1.15. Analyse der Affymetrix-Daten

Für die Auswertung der Affymetrix-Daten wurde das Programm ArrayAssist (Stratagene) verwendet. Die Daten wurden in das Programm importiert und mit Hilfe des RMA (*Robust Multi-Array Average*)-Algorithmus^{91, 92} normalisiert. Unterschiede in der Genexpression zwischen den einzelnen Gruppen wurden für jedes Probeset mittels t-Test-Statistik und anschließendem *post hoc* Bonferroni-Test überprüft. Für die signifikant hoch- und herunterregulierten Gene wurden mit Hilfe des Programms in der GO (*Gene Ontology*)-Datenbank nach signifikanten GO-Begriffen gesucht.

3.2. Histologische Untersuchungen

3.2.1. Perfusionsfixierung

Vor der kardialen Perfusion wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion einer Anästhesie-Lösung (1 µl/1 g Körpergewicht) anästhesiert. Es wurde eine Thoraktomie durchgeführt, bevor der rechte Vorhof perforiert wurde, um eine Druckentlastung im Kreislauf zu ermöglichen. Erleichtert wurde die Perfusion durch den Einsatz einer Pumpe, die eine gleichmäßige Flussrate des Fixans von 11 ml/min gewährleistete. Über den linken Herzventrikel wurde die Maus mit einem Venofix (25G) (Braun) zuerst mit PBS solange entblutet, bis kein Blutaustritt aus dem rechten Vorhof mehr zu erkennen war. So wurde das Gefäßsystem von für das Experiment hinderlichen Blutbestandteilen gereinigt. Anschließend wurden für die Immunhistochemie und Nissl-Färbung die Tiere mit 4 %iger Paraformaldehydlösung (Roti Histol, Roth) fixiert. Unmittelbar nach der Perfusion wurde die Maus dekapitiert, das Gehirn präpariert, in der Fixierlösung nachfixiert und bis zur weiteren Bearbeitung in PBS bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.2. Herstellung von Vibratomschnitten

Von den perfundierten Gehirnen wurden mit dem Vibratom (VT1000S, Leica) 35-50 µm Schnitte angefertigt. Die Schneidekammer des Vibratoms wurde mit PBS gefüllt und das Gehirn auf die Vorrichtung geklebt und geschnitten. Die Schnitte wurden flottierend in einer mit PBS gefüllten 24-Loch-Platte aufgefangen. Alle nachfolgenden Inkubationsschritte wurden ebenfalls an flottierenden Schnitten vorgenommen.

3.2.3. Nissl-Färbung mit Kresylviolett

Bei der Nissl-Färbung werden durch den Anilinfarbstoff Kresylviolett die Nisslkörperchen in Nervenzellen violett angefärbt. Dabei werden Gebiete mit rauhem endoplasmatischen Reticulum sowie mit freien Ribosomen aufgrund ihrer Basophilie angefärbt. In Nervenzellen sind diese Organellen schollenartig angeordnet und werden daher als Nissl-Substanz oder Nissl-Schollen bezeichnet.

Für die Färbung wurden die Schnitte μ N bei 37 °C auf Objektträger getrocknet. Dann wurden sie in 70 % Ethanol inkubiert und mit H₂O gespült. Die Schnitte wurden zirka 5 min in Kresylviolettlösung gefärbt. Die Differenzierung der Schnitte erfolgte in 100 % Ethanol mit 1 % Essigsäure, wobei der überschüssige Farbstoff ausgewaschen wurde. Anschließend wurden die Präparate 2x in 100 % Ethanol gespült, danach 2x 4 min in Butanol sowie mindestens 3x für 5 min in Xylol eingestellt und dann mit Eukitt (Kindler GmbH) eingedeckt. Alternativ wurden die Schnitte mit *NeuroTrace Fluorescent Nissl Stains* (Molecular Probes) nach Angaben des Herstellers gefärbt.

3.2.4. Immunhistochemischer Nachweis mittels ABC-Technik

Mit Hilfe der Immunhistochemie lässt sich das Verteilungsmuster von Proteinen im Gewebeschnitt darstellen. Das Prinzip beruht darauf, dass zunächst ein primärer Antikörper, der gegen eine Antigen determinante des darzustellenden Proteins gerichtet ist, angelagert wird. In einem zweiten Schritt wird ein biotinylierter Ig-Antikörper (sekundärer Antikörper) angekoppelt. Die entsprechenden Antigen/Antikörper-Komplexe können dann mittels der ABC-Technik (*Avidin-Biotin-Complex-Methode*) detektiert werden. Bei dieser Technik macht man sich die außergewöhnlich hohe Affinität (10^{-15} M) des Avidins zu dem Vitamin Biotin zunutze. Die Bindung ist praktisch irreversibel. Aufgrund der vier potentiellen Biotin-Bindungsstellen des Avidinmoleküls kann eine Verstärkung des Signals erreicht werden. Der sekundäre Antikörper ist durch seine Biotinmarkierung in der Lage, präformierte Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe zu binden und schafft somit eine Verbindung (Brückenantikörper) zwischen diesem Komplex und dem an das nachzuweisende Protein gebundenen primären Antikörper. Das Enzym Peroxidase bildet mit seinem Substrat Wasserstoffperoxid (H₂O₂) einen Komplex, wobei Diaminobenzidin (DAB) als elektronenspendendes Chromogen fungiert und in einen unlöslichen Farbstoff umgesetzt wird. Dazu wurden fixierte Vibratomschnitte 4x für 5 min mit PBS gewaschen. Mit 1 % Natriumborhydrid in PBS wurden die Schnitte für die Antikörper durchlässig gemacht. Nach

mindestens vier Waschschritten von 5 min folgte eine Inkubation von 30 min in 0,3 %iger H_2O_2 -Lösung, um endogene Peroxidasen zu hemmen. Erneutem Waschen schloss sich eine 30-minütige Inkubation in Blockierlösung an. Nach vier Waschschritten für 5 min mit PBS wurden die Schnitte μ N bei RT in der Carrierlösung 1 und den entsprechenden primären Antikörper auf einem Schüttler inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde 4x 5 min mit PBS herausgewaschen. Die Inkubation des sekundären Antikörpers wurde für 3 h bei RT in der Carrierlösung 2 durchgeführt. Durch 4x Waschen für jeweils 5 min wurde überschüssiger Antikörper entfernt. Die Schnitte wurden dann in der ABC-Lösung für 2 h inkubiert, die nach Herstellerangaben 30 min eher vorbereitet wurde, damit sich der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex bilden konnte. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden drei Waschschrritte mit Tris-Puffer (pH 7,6) durchgeführt, um einen optimalen pH für die DAB-Reaktion zu erreichen. Für die DAB-Reaktion wurde die Substratlösung mit Hilfe des *Fast 3,3'-Diaminobenzidine Tablets Sets* (Sigma) angesetzt. Die Schnitte wurden in der Substratlösung inkubiert, bis sich ein deutlich sichtbares, braunes Präzipitat entwickelt hatte. Die Reaktion wurde durch häufiges Waschen mit PBS gestoppt. Nach Aufziehen und Trocknen der Schnitte auf *SuperFrost Plus* Objektträger wurden die Schnitte in einer Alkoholreihe dehydriert (50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 2x 100 % Ethanol, 2x Histol). Abschließend wurden die Schnitte eingedeckelt und mikroskopisch untersucht.

Für die Quantifizierung von Zellen wurde zur statistischen Auswertung ein ANOVA-Test mit anschließendem *Turkey honest significant difference (HSD)-post hoc* Test durchgeführt.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Zytokin-Antikörper-Arrays

Um das Proteinexpressionsprofil verschiedener Zytokine zu untersuchen, wurden die kommerziell erwerblichen RayBio Maus-Zytokin-Antikörper-Arrays 3.1. (RayBiotech) verwendet, mit denen 62 Maus-Zytokine gleichzeitig detektiert werden können. Dieses System bietet eine hohe Sensitivität bis in den pg/ml Bereich bei gleichzeitiger breiter Detektionsweite bis 100000 pg/ml. Das System detektiert nur sekretierte Zytokine und reflektiert so den aktiven Zytokinlevel.

Das Gewebe wurde mit 500 μ l 1x Zelllysispuffer homogenisiert und dann zentrifugiert, um die Proteine zu extrahieren. Die Antikörper-Array-Membranen wurden für 30 min in

Blockierlösung bei RT blockiert. 500 µg Protein in 1 ml 1x Blockierlösung wurden üN mit den Membranen inkubiert. Nach dreimal Waschen für je 5 min mit 1x Waschpuffer I wurde zweimal mit 1x Waschpuffer II bei RT gewaschen. Biotin-gekoppelte Anti-Zytokin-Antikörper wurden mit 1x Blockierlösung gemischt und darin wurden die Membranen für 2 h bei RT inkubiert. Erneut wurde dreimal 5 min mit Waschlösung I und zweimal mit Waschlösung II gewaschen. Darauf wurden die Membranen 2 h bei RT in HRP-konjugierten Streptavidin-Antikörper geschüttelt. Die Membranen wurden wieder mit Waschlösung I und II gewaschen. Zur Detektion wurden je 500 µl 1x Detektionspuffer A und B auf der Membran 1 min inkubiert und die Signale mit einem Film detektiert. Durch den Vergleich der Signalintensitäten mit Hilfe von Densitometrie (ImageJ) können relative Expressionslevels der Zytokine bestimmt werden. Zur statistischen Auswertung wurde ein ANOVA-Test mit anschließendem *Turkey honest significant difference (HSD)-post hoc* Test durchgeführt.

3.4. Elektrophysiologische Experimente

3.4.1. Elektrophysiologische Ableitungen an Gehirnschnitten

Neonatale Tiere (P6-8) wurden dekapitiert, die Gehirne rasch explantiert und in eisgekühlter und Carbogen-begaster Saccharose-Lösung für 1-2 min heruntergekühlt. Mit Hilfe eines Vibratoms (Leica VT1200s) wurden koronale Schnitte in 250 µm Dicke angefertigt und in begaster Saccharose-Lösung bei 33 °C für mindestens 30 min inkubiert. Es wurden immer jeweils ein Kontrolltier und ein transgenes Tier aus dem gleichen Wurf kurz hintereinander präpariert und alternierend für Messungen verwendet.

Für die Patchklemmen-Messungen wurden die Gehirnschnitte in eine kontinuierlich mit ACSF auf Raumtemperatur (18-22 °C) perfundierte Messkammer überführt. Die Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus wurden mit Hilfe eines Differentialinterferenzkontrastes mit einem aufrechten Mikroskop (Zeiss Axioskop) durch ihre charakteristische Lage und Form identifiziert. Pipetten aus Borosilikatglas mit einem Widerstand von 2,5-4 MΩ wurden am Messtag präpariert. Die Patchklemmen-Messungen erfolgten über Silberchlorid-Elektroden mit einem EPC9-Patchklemmen-Verstärker (HEKA Elektronik) im Ganzzell-Modus.

Nach Etablierung einer stabilen Messkonfiguration mit Zugangswiderständen unter 20 MΩ wurde das Ruhemembranpotential bestimmt. Für die Messungen im Stromklemmen-Modus

wurden die Neuronen vor Anwendung der Messprotokolle durch Strominjektion auf -60 mV geklemmt. Durch Membranpotential-Veränderungen bei Injektionen von 5, 0, -5, -10 und -15 pA wurde der Eingangswiderstand des Neurons berechnet. Anschließend wurden die durch Strominjektionen über 600 ms von 0-80 pA in 10 mV-Schritten ausgelösten Aktionspotentiale quantifiziert. Im Spannungsklemmen-Modus wurden die Zellen auf -25 mV gehalten und für 1 s auf Potentiale von -35 bis -65 mV geklemmt. In einigen Fällen wurde der hyperpolarisierende Puls auf -45 mV alle 15 s wiederholt und dabei der selektive Kv7/M-Kanalblocker XE991 in einer Konzentration von 10 µM eingewaschen.

3.4.2. Elektrophysiologische *in vivo* Ableitung in neonatalen Mäusen

Die im Folgenden beschriebenen Operations- und Ableitmethoden wurden von der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Nr. 46/07).

Die Operation der Mäuse wurde unter Isofluran-Allgemeinanästhesie durchgeführt. Für die Ableitungen von lokal anästhesierten, Kopf-fixierten Mäusen wurden Tiere im Alter von P5-7 verwendet. Der Schädel der mit Isofluran anästhesierten Maus wurde durch einen sagitalen Hautschnitt freigelegt, die Knochenhaut durch kurze Behandlung mit 17,5 % H₂O₂-Lösung denaturiert und entfernt, anschließend mit 0,9 % isotonischer NaCl-Lösung gespült und mit Druckluft getrocknet. Die Operationswunden wurden mit dem langwirkenden Lokalanästhetikum Bubivacain behandelt. Als nächstes wurde ein Loch über das Zerebellum mit einem Zahnarztbohrer gebohrt. Ein Silberdraht wurde in das Zerebellum inseriert und diente sowohl als Erdungs- als auch Referenzelektrode. Der Silberdraht wurde mit Zahnzement fixiert. Um die Maus in den Ohrenhalter des Stereotakts einspannen zu können, wurde ein Metallröhrchen quer zur Körperachse der Maus mit Zahnzement fixiert. Zusätzlich wurde zur Stabilisierung der Präparation ein Rahmen aus Zahnzement auf dem Rand des Schädels angelegt. Als nächstes wurde die Maus im Stereotakts so befestigt, dass der Schädel in einer horizontalen Ebene ausgerichtet war. Ein zweites Loch wurde über dem Hippocampus gebohrt (etwa 1,1 mm posterior zu Bregma und 1,7 mm lateral zur Mittellinie). Das dritte Loch befand sich über dem visuellen Kortex V1 (etwa 2,42 mm posterior zu Bregma und 1,8 mm lateral zur Mittellinie).

Während der gesamten Dauer des Ableitprozesses wurde die Körpertemperatur mit Hilfe eines Heizkissens bei etwa 37 °C gehalten. Die Ableitungen wurden mit zwei linearen 16-Kanal-Silicon Probes für akute Ableitungen (Neuronexus Technologies, Ann Arbor, MI)

durchgeführt. Der vertikale Abstand zwischen den Ableitelektroden betrug 50 oder 100 μm . Die *Silicon Probe* wurde in den Hippocampus entlang der CA1-CA3/Gyrus dentatus-Achse eingeführt. Eine zweite *Silicon Probe* wurde in die visuelle Kortexregion V1 eingeführt. Die *Silicon Probes* wurden mit einem 1x Vorverstärker (*Headstage*) und einem digitalen Datenaquisitionsgerät (Digital Lynx, Neuralynx Inc.) verbunden, der die analogen Signale um das 15-fache amplifizierte, digital filterte (1-5000 Hz Bandpass) und als 16-Bit Integer mit einer Samplingrate von 32552 Hz digitalisierte. Mit Hilfe eines Piezosummers unter dem Thorax der Maus wurden die Bewegungen detektiert. Die Probe wurde mindestens 5-10 min an ihrer Ableitstelle belassen, bevor Daten aufgezeichnet wurden. Am Ende des Experiments wurde die Ableitstelle mit Elektroden gekennzeichnet, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI markierten wurden.

Nach der Ableitung wurden die Mäuse mit der Anästhesie-Lösung betäubt und transkardial mit PBS und 4 % PFA perfundiert. Die Gehirne wurden mindestens 1 Tag in 4 % PFA nachfixiert. Nach der Fixierung wurden die Gehirne in 50 μm koronale Schnitte mit einem Vibratom geschnitten. Die Lage der Sonde wurde durch Begutachten von seriellen Fluoreszenz-Nissl-gefärbten Schnitten bestimmt.

3.5. Verhaltensexperimente

3.5.1. Messung der Basalaktivität

Die Aktivität der Mäuse wurde in ihrem Heimatkäfig vom Typ 2 unter normalen Haltungsbedingungen im Tierstall über mehrere Tage gemessen. Dazu wurde mit einem MOUSE-E-MOTION-Datenlogger (INFRA E Motion) die Aktivität quantitativ als Gesamtbewegung über den Zeitraum ermittelt. Der Messwert ist ein Maß für die Veränderung des räumlichen Aufenthalts. Die Bewegungsdetektion erfolgt mittels der von dem Tier abgegebenen Wärmestrahlung im Infrarotbereich. Die Daten wurden mit dem entsprechenden Programm (Mouse-E-Motion-Excel Add-Ins) ausgelesen und analysiert. Zur statistischen Auswertung wurde ein ANOVA-Test mit anschließendem *Turkey honest significant difference* (HSD)-*post hoc* Test durchgeführt.

3.5.2. *Open field*-Versuch

Die Mäuse wurden in eine für sie fremde Umgebung (*Open field*) gesetzt, um ihre motorische Aktivität und ihr Explorationsverhalten zu untersuchen. Jeweils 4 Mäuse wurden parallel in vier *Open field*-Apparaturen während der 12-stündigen Dunkelphase bei angeschaltetem Licht getestet. Das in den Versuchen verwendete *Open field* (50 cm x 50 cm x 50 cm) besaß Infrarotsensoren, die die Aktivität der Mäuse erfassten (ActiMot, TSE Systems). Nach 5 min Adaptationszeit in den Apparaturen folgte eine 15-minütige Messung der Aktivität der Mäuse. Die TSE Systems Software zeichnete anhand der Infrarotsensoren Parameter wie Laufmuster, zurückgelegte Wegstrecke, Verhältnis Bewegung/Ruhe und Aufenthalt im Zentrum auf. Zur statistischen Auswertung wurde ein ANOVA-Test mit anschließendem *Turkey honest significant difference* (HSD)-*post hoc* Test durchgeführt.

3.5.3. Behandlung der Mäuse

Die im Folgenden beschriebenen pharmakologischen Behandlungen wurden von der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Nr. 46/07).

Die Mäuse wurden einmal beziehungsweise zweimal am Tag von P0-14 subkutan gespritzt. Die erste Gruppe waren doppelt transgene P-M2 Tiere, welche Bumetanid in einer Konzentration von 0,2 mg/kg erhielten. Die zweite Gruppe bestand aus einfach transgenen P-M2 Tieren, die ebenfalls 0,2 mg/kg Bumetanid injiziert bekamen. Die dritte und vierte Gruppe waren jeweils doppelt und einfach transgene Mäuse, denen das gleiche Volumen des Vehikels gespritzt wurde.

4. Ergebnisse

Das transgene Mausmodell, in dem eine dominant-negative hKv7.2-Untereinheit konditionell im Gehirn exprimiert wird und zur Suppression des M-Stroms führt¹, kann als Modell für chronische Epilepsie verwendet werden. In dieser Arbeit wurde dieses Modell genutzt, um molekularbiologische, proteinbiochemische, physiologische sowie pharmakologische Untersuchungen während der Epileptogenese und der chronischen Epilepsie durchzuführen.

4.1. Vergleichende Transkriptomanalyse

Microarray-Experimente ermöglichen die gleichzeitige Untersuchung einer großen Anzahl von Transkripten. Mit Hilfe der Affymetrix GeneChips wurden Transkriptomanalysen durchgeführt, um zum einen Gene zu finden, welche durch die Expression des *hKCNQ2-G279S*-Transgens und der daraus resultierenden Epilepsie beeinflusst werden und damit als Angriffspunkte für neue Medikamente dienen können. Zum anderen wurden solche Gene gesucht, welche für mögliche Kompensationsmechanismen von Bedeutung sind. Um differentiell regulierte Gene während der Epileptogenese und der chronischen Phase zu untersuchen, wurden Hippocampus-Gewebeproben verwendet, die aus jeweils 5 doppelt transgenen Mutanten mit X-chromosomal integriertem Transgen (P-M2) beziehungsweise autosomal integriertem Transgen (P-M2/1) und 5 einfach transgenen Kontrollen entnommen wurden. Für die Untersuchung der Epileptogenese wurden die Hippocampi aus 14 Tage (P14) alten Mäusen und für die chronische Phase aus adulten Mäusen (älter als 5 Monate) entnommen. Die Biotin-markierten Sonden jedes Tieres wurden auf je einem Array-Set hybridisiert.

Zur Analyse der Microarrays wurde das Softwareprogramm ArrayAssist (Stratagene) verwendet. Dazu wurden die nach Imageanalyse erhaltenen Affymetrix GeneChip *probe array files* (CEL- und CHP-Files) importiert und unter der Verwendung des RMA (*robust*

multi-array average)-Algorithmus, der eine robuste Methode zur Normalisierung von Multi-Chip-Analysen darstellt^{91, 92}, normalisiert. Für eine statistische Auswertung wurden 5 Chips der Gruppe zusammengefasst. Unterschiede in der Genexpression zwischen P-M2-Mutanten, P-M2/1-Mutanten und P-M2-Kontrollen wurden für jedes Probeset mittels t-Test-Statistik und anschließendem *post hoc* Bonferroni-Test überprüft.

In Abb. 5 sind die Fluoreszenzintensitäten der Genexpressionsanalysen zwischen den Mutantengruppen P-M2 (Abb. 5 A und C) und P-M2/1 (Abb. 5 B und D) und der Kontrollgruppe zu den zwei verschiedenen Zeitpunkten Epileptogenese (Abb. 5 A und B) und chronische Phase (Abb. 5 C und D) graphisch in einem Scatterplot dargestellt. Es wurden die absoluten Fluoreszenzwerte aller detektierten Transkripte gegeneinander aufgetragen. Jeder Punkt repräsentiert jeweils ein detektiertes Transkript. Die rote Linie stellt den Bereich dar, bei dem die Fluoreszenzwerte der beiden Proben gleich groß waren und somit kein Unterschied in der Expression des Transkripts zwischen den Mutantengruppen und der Kontrollgruppe vorhanden war. Die Punkte, welche oberhalb der roten Linie liegen, sind Transkripte, die in den Mutanten hochreguliert sind und die, die unterhalb der roten Linie liegen, repräsentierten herunterregulierte Transkripte. Es war zu erkennen, dass bei den adulten Tieren in Abb. 5 C und D mit dem *Murine Genome U74 Set* weniger differentiell exprimierte Transkripte zu detektieren waren als bei den P14 alten Tieren mit dem *Mouse Expression Set 430* (Abb. 5 A und B). Außerdem waren bei den P-M2/1-Mutanten mehr Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zu den P-M2-Mutanten zu finden.

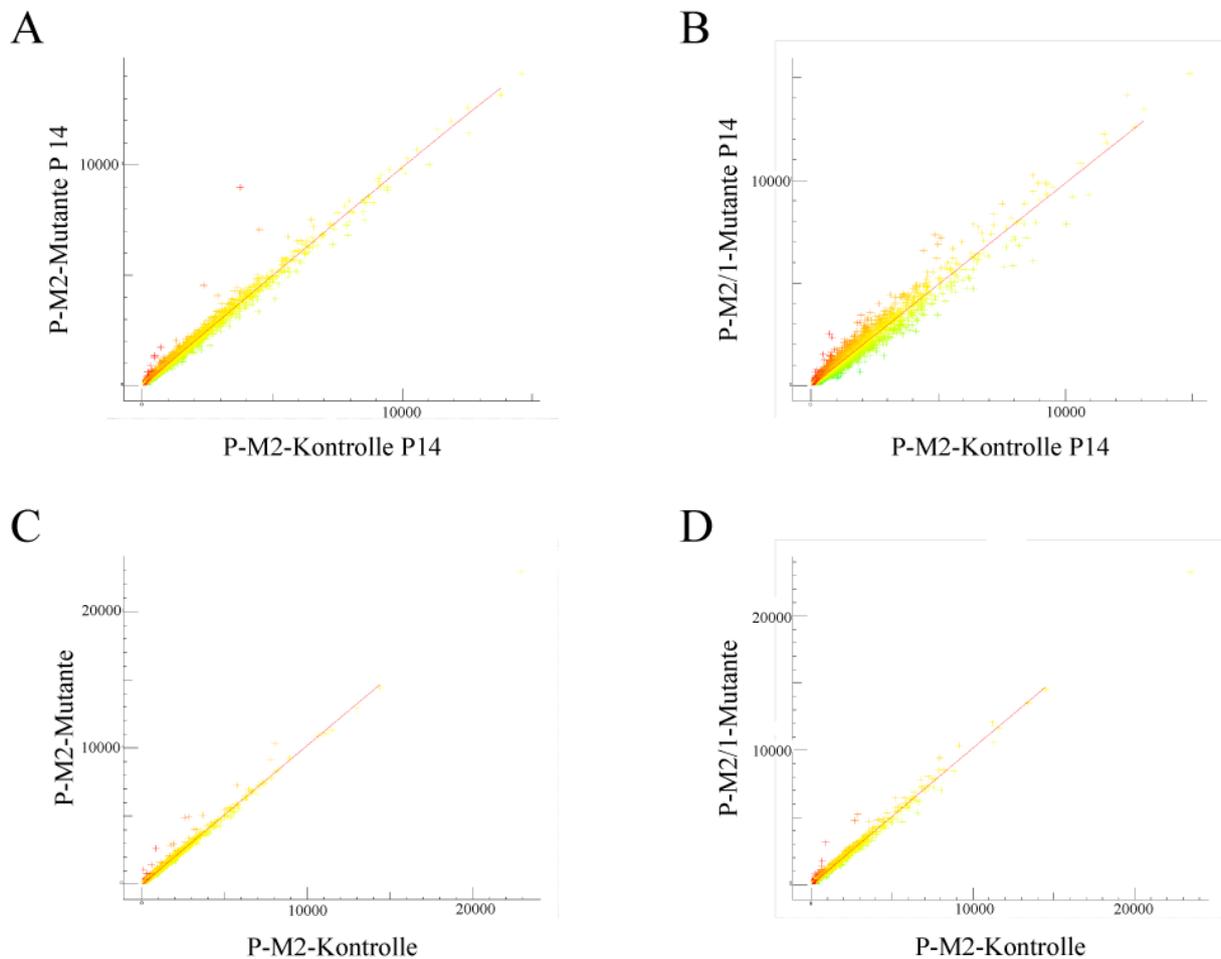


Abb. 5: Graphische Darstellung der Affymetrix-Genexpressionsanalysen während Epileptogenese und chronischer Phase

Die Abbildung zeigt die Gegenüberstellung der Fluoreszenzprofile der P-M2-Mutanten (A und C) und P-M2/1-Mutanten (B und D) gegen die der P-M2-Kontrollen in einem Scatterplot. In (A) und (B) sind die Unterschiede der Expression während der Epileptogenese und in (C) und (D) die während der chronischen Phase dargestellt. Die Achsenbeschriftungen bezeichnen die absoluten Fluoreszenzintensitäten. Die Punkte, die auf der roten Linie liegen, besitzen die gleichen Fluoreszenzwerte, während abweichende Punkte um so größere Unterschiede in der Fluoreszenzintensität aufweisen, je weiter sie sich von der roten Linie befinden. Punkte oberhalb der roten Linie waren hochreguliert, darunter liegende Punkte herunterreguliert. (jeweils 5 Tiere)

Die Expressionsprofile der zwei Mutantengruppen wurden mit der Kontrollgruppe in den zwei Zeitstadien Epileptogenese und chronische Phase verglichen. In Abb. 6 sind die Zahlen der differentiell regulierten Transkripte der Genexpressionsanalysen dargestellt. Es wurden dabei ausschließlich solche Transkripte berücksichtigt, die sich in ihrer Expression zwischen Mutanten und Kontrolle signifikant unterschieden. Als signifikant verändert galt die Expression eines Transkripts, wenn eine Expressionsänderung von mindestens 1,5-fach für

hochregulierte beziehungsweise herunterregulierte Transkripte vorlag. Die Analyse der Unterschiede in der Genexpression während der Epileptogenese zeigte, dass im Vergleich von P14 alten P-M2-Mutanten mit P-M2-Kontrollen insgesamt 62 Transkripte signifikant differentiell reguliert waren. Davon waren 56 Transkripte hoch- und 6 Transkripte herunterreguliert. Bei der Gegenüberstellung der P14 alten P-M2/1-Mutanten und der P-M2-Kontrollen waren insgesamt 347 Transkripte differentiell reguliert. Davon wurden 181 Transkripte hoch- und 166 herunterreguliert.

Der Vergleich der Expressionsprofile der adulten P-M2- beziehungsweise P-M2/1-Mutanten und Kontrollen konnten für P-M2-Mutanten insgesamt 17 beziehungsweise 65 bei P-M2/1-Mutanten differentiell exprimierte Transkripte identifiziert werden. Bei der P-M2-Gruppe waren alle 17 Transkripte hochreguliert. Bei der P-M2/1-Gruppe waren insgesamt 50 Transkripte hochreguliert im Vergleich zu den Kontrollen und 14 Transkripte lagen herunterreguliert vor.

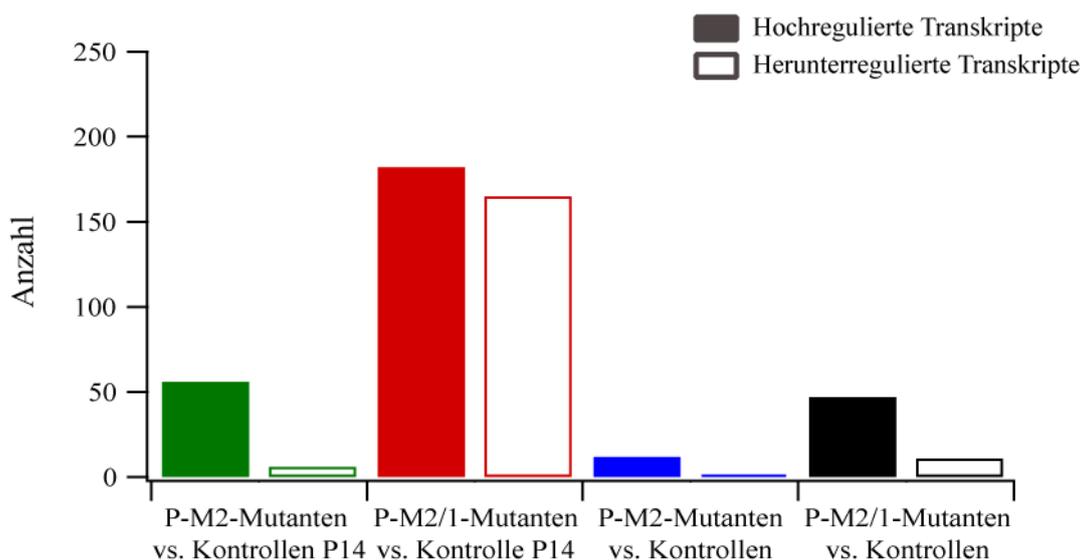


Abb. 6: Vergleich der hoch- und herunterregulierten Transkripte der Affymetrix-Genexpressionsanalysen während Epileptogenese und chronischer Phase

Die Abbildung zeigt die Anzahl an Transkripten, die nach t-Test-Statistik und anschließendem *post hoc* Bonferroni-Test signifikant waren. Es wurden die Genexpressionen der Mutantengruppen P-M2 und P-M2/1 mit der Genexpression der Kontrollgruppe zu den zwei Zeitstadien Epileptogenese (P14) und chronischer Phase verglichen. P-M2/1-Mutanten wiesen mehr differentiell regulierte Transkripte als P-M2-Mutanten auf und es wurden während der Epileptogenese mit dem *Mouse Expression Set 430* mehr differentiell regulierte Transkripte gefunden als während der chronischen Phase mit dem *Murine Genome U74 Set*. (jeweils 5 Tiere)

Mit Hilfe des Programms Babelomics wurde unter den differentiell regulierten Transkripten in der GO (*Gene Ontology*)-Datenbank nach signifikanten GO-Begriffen gesucht. Die GO-Datenbank bietet drei strukturierte und standardisierte Vokabeln (Ontologien), die die Funktion von Genprodukten beschreiben: die molekulare Funktion, der biologische Prozess und die Lokalisation des Genprodukts. Die Nutzung der GO-Datenbank bot den Vorteil, dass die Terme in eine hierarchische Beziehung zueinander gesetzt wurden. Die gefundenen, signifikanten GO-Begriffe und die entsprechende Genanzahl sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Zusammenfassung aller signifikanten GO-Begriffen der differentiell exprimierten Transkripte

Gruppen	GO-Begriffe	Anzahl der Transkripte
P-M2-Mutanten P14	„intermediäre Filament-basierte Prozesse“	2
	„extrazellulärer Raum“	15
P-M2/1-Mutanten P14	„Entwicklung eines multizellularen Organismus“	50
	„Entwicklung anatomischer Strukturen“	51
	„Antwort auf einen biotischen Stimulus“	12
	„Prozesse zellulärer Entwicklung“	46
	„Antwort auf eine Störung der zellulären Homöostase“	24
	„Verhalten auf interne Lage und externe Bedingungen“	12
	„Zellproliferation“	19
	„Prozesse zum Transport einer Zelle oder zum Aufrechterhalten der spezifischen Lage“	11
	„Antwort auf einen chemischen Stimulus“	10
	„Regulierung der messbaren Merkmale, wie Größe, Masse, Form“	16
	„Organisation der zellulären Teile und Biogenese“	16
	„Zirkulation des Blutes“	6
P-M2-Mutanten	„Antwort auf einen anorganischen Substanzstimulus“	2
	„Antwort auf einen Toxinstimulus“	2
P-M2/1-Mutanten	„Prozesse der Immunantwort“	17
	„Antigenprozessierung und Präsentation“	8
	„Abwehrantwort“	11
	„MHC-Proteinkomplex“	6

Die Analyse der Genexpression der zwei Mauslinien zeigte, dass bei den P-M2-Mutanten weniger differentiell regulierte Transkripte zu finden waren als bei den P-M2/1-Mutanten. Insgesamt war die Anzahl der signifikant differentiell regulierten Gene relativ niedrig. Die Verwendung von Gewebe kann zu einer Maskierung von Änderungen führen, welche nur in

einer kleinen Subpopulation von Zellen auftreten. Auffällig war, dass während der chronischen Epilepsie und auch schon während der Epileptogenese Transkripte gefunden wurden, die in der Immunantwort eine Rolle spielen. Zusätzlich wurden auch Gene gefunden, die in anderen Epilepsie-Modellen als differentiell reguliert detektiert wurden (zum Beispiel Aquaporin 4, Galanin, Neuropeptid Y). Eine Liste aller differentiell regulierten Transkripte ist im Anhang aufgeführt (siehe Seite 107).

4.2. Datenvalidierung

Eine unabhängige Überprüfung der Affymetrix-Daten war notwendig, um technische Probleme wie zum Beispiel fehlerhafte Amplifikation des Probenmaterials, Kreuzhybridisierungen oder Normalisierungsfehler auszuschließen. Hinzu kam, dass es bisher keinen generellen Konsens zur Datenanalyse gibt. Weiterhin konnte auch das experimentelle Design die Aussagekraft von Chipanalysen beeinflussen.

4.2.1. TaqMan-Assays

Zur Validierung der Chipdaten wurden vier verschiedene Gene mit unterschiedlichen Expressionsstärken aus den Affymetrix-Daten ausgewählt und ihre mRNA-Expression mit Hilfe von TaqMan-Assays getestet. In Abb. 7 sind die Expressionsänderungen der TaqMan-Assays im Verhältnis zu Synatophysin und die Expressionsänderungen aus den Affymetrix-Analysen für die Gene Aquaporin 4 (*Ap4*), Galanin (*Gal*), Neuropeptid Y (*NpY*) und *regulator of G protein signaling* (*RGS4*) aufgeführt. In den P14 alten und adulten P-M2- und P-M2/1-Mutanten zeigten sich für *Ap4* die gleiche Tendenz und auch eine ähnliche Expressionsänderung in den TaqMan-Assays und Affymetrix-Analysen. Für das Gen Galanin zeigte sich in den TaqMan-Assays bei den adulten P-M2- und P-M2/1-Mutanten die gleiche Tendenz und Stärke in der Expressionsänderung. Für die P14 alten P-M2- und P-M2/1-Mutanten war die gleiche Richtung der Expressionsänderung zu finden, allerdings war die Änderung bei den TaqMan-Assays deutlich stärker. Die Expressionsänderung für *NpY* während der Epileptogenese und in der chronischen Phase von den P-M2- und P-M2/1-Mutanten in den TaqMan-Assays lag im vergleichbaren Bereich zu den Affymetrix-Analysen. Für *RGS4* war bei allen Mutantengruppen außer bei den adulten P-M2/1-Mutanten die gleiche Tendenz und vergleichbare Stärke in der Genexpressionsänderung zu detektieren.

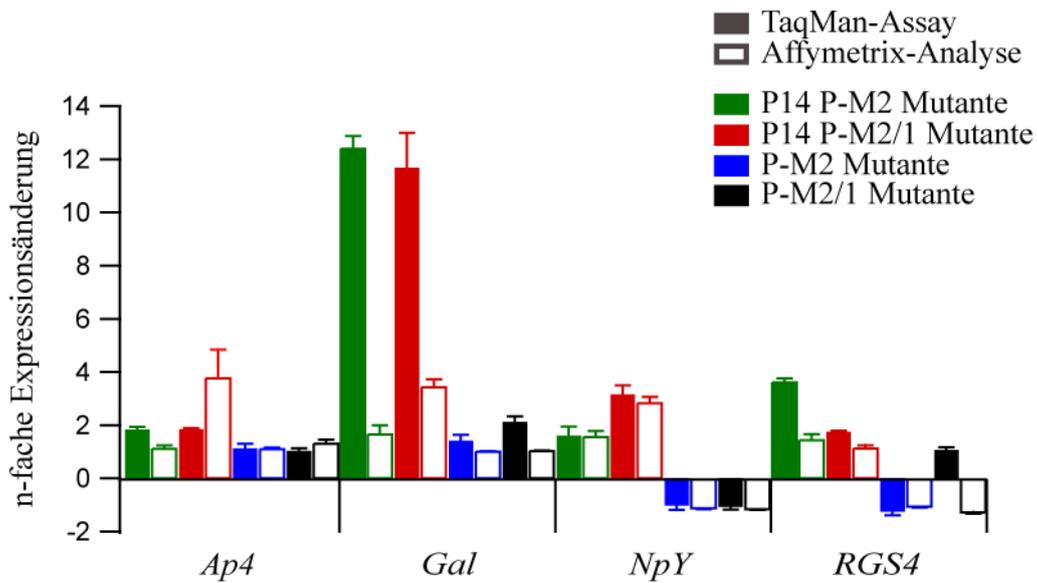


Abb. 7: Vergleich der Expressionsänderung zwischen Affymetrix-Analyse und TaqMan-Assay

Die Werte der Expressionsänderung für die Gene Aquaporin 4 (*Ap4*), Galanin (*Gal*), Neuropeptid Y (*NpY*) und *regulator of G protein signaling* (*RGS4*) aus der Affymetrix-Analyse sind vergleichend mit den Werten der Expressionsänderung aus den TaqMan-Assays graphisch dargestellt. Fehlerbalken zeigen SEM. (je 3 Tiere pro Gruppe)

Da in den Affymetrix-Analysen eine Reihe von Transkripten gefunden wurde, die in der Immunantwort eine Rolle spielen, wurden 10 TaqMan-Assays für Inflammationsgene und Gene, die in der Neurodegeneration eine Rolle spielen, durchgeführt. Die Expressionsänderung der Gene Interleukin-6 (*IL-6*), Interleukin-1-Rezeptor Typ 1 (*IL1r1*), *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1* (*NFκB1*), Interleukin-1α (*IL-1α*), Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 1 (*Ptgs1*), Interleukin-1-Rezeptor Typ 2 (*IL1r2*), Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2 (*Ptgs2*), Tumor-Nekrose-Faktor α (*TNFα*), Interleukin-1β (*IL-1β*) und Interferon β1 (*IFNβ1*) wurden mit Hilfe von TaqMan-Assays bestimmt. Wie in Abb. 8 dargestellt, wurden in den TaqMan-Assays allerdings nur ähnlich schwache Expressionsänderungen wie in den Array-Analysen für die ausgesuchten Gene gefunden. Ausnahmen bildeten *IL-1α*, *Ptgs2* bei den P-M2-Mutanten sowie *Ptgs1*, *IL-1r2*, *TNFα* bei den P-M2/1-Mutanten und *IL-1β* bei beiden Mutantengruppen. Die Expressionsänderung dieser Gene lag oberhalb eines 1,5-fachen Wertes.

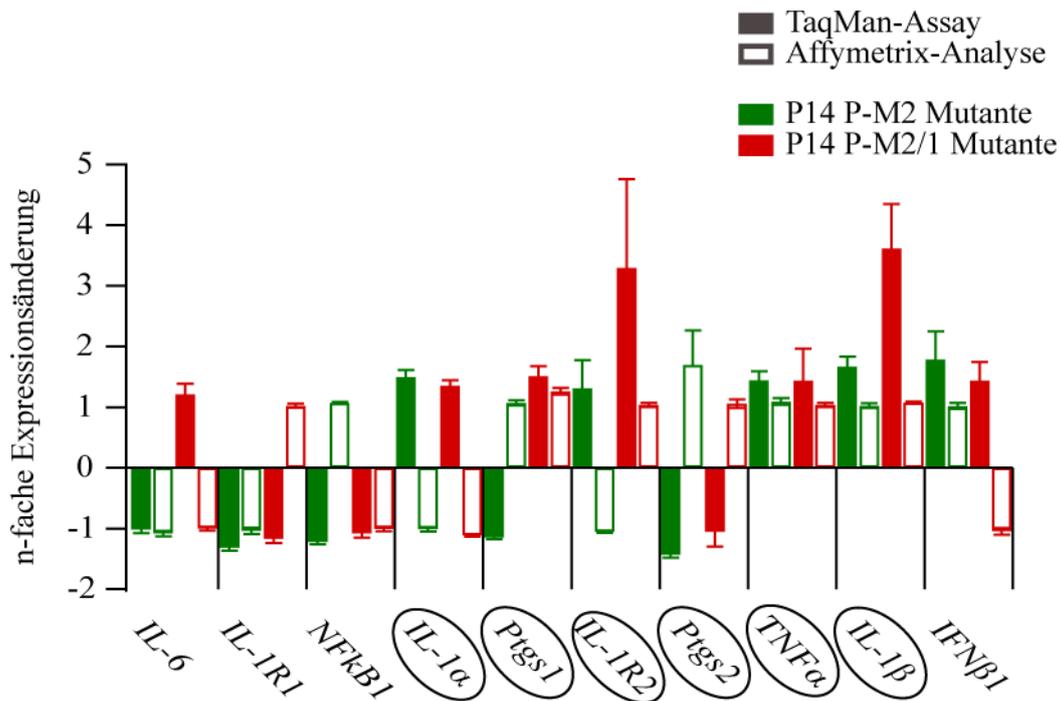


Abb. 8: Expressionsänderung ausgewählter Transkripte ermittelt mit TaqMan-Assay und Affymetrix-Analyse

Die Expressionsänderungen der Zytokine Interleukin-1 (*IL-1*), Interleukin-1-Rezeptor Type 1 (*IL-1r1*), *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1* (*NFκB1*), Interleukin-1α (*IL-1α*), Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 1 (*Ptgs1*), Interleukin-1-Rezeptor Typ 2 (*IL-1r2*), Prostaglandin-Endoperoxide-Synthase 2 (*Ptgs2*), Tumor-Nekrose-Faktor α (*TNFα*), Interleukin-1β (*IL-1β*), Interferon β1 (*IFNβ1*) wurden mit Hilfe von TaqMan-Assays bestimmt. Im Vergleich dazu sind die ermittelten Expressionsänderungen der Affymetrix-Analyse aufgezeichnet. Die markierten Gene wiesen entweder in den P-M2-, P-M2/1-Mutanten oder beiden eine höhere Expressionsänderung als 1,5-fach auf. Fehlerbalken zeigen SEM. (je 5 Tiere pro Gruppe)

4.2.2. Immunhistochemie

Weil Änderungen auf mRNA-Level nicht zwangsläufig mit einer entsprechenden Proteinänderung einher gehen⁹³, wurde überprüft, ob sich eine differentielle Regulation der Immunantwort auch auf Proteinebene widerspiegelt. Dafür wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Exemplarisch wurde die Proteinexpression des Intermediärfilaments GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), das in der Expressionsanalyse in beiden mutanten Linien als hochreguliert gefunden wurde, in Hirnschnitten analysiert. Eine stark vermehrte Expression von GFAP ist charakteristisch für eine Astrogliose, einem reaktiven Zustand der Astrozyten des Zentralnervensystems, bei dem diese hypertroph und in einigen Fällen auch hyperplastisch werden (sogenannte reaktive Astrozyten). Astrogliose tritt meist in Verbindung mit pathologischen Veränderungen wie Neurotoxizität, viralen Infektionen,

neurodegenerativen Krankheiten wie zum Beispiel Alzheimer-Krankheit, Multipler Sklerose, Traumata auf. Die Astrogliose ist ein sehr früher und empfindlicher Marker für eine neuropathologische Veränderung und kann schon zu einem Zeitpunkt auftreten, an dem noch keine histologisch sichtbare Pathologie zu erkennen ist. Koronale Hirnschnitte von 5 Tieren pro Gruppe wurden histochemisch mit der ABC-Methode gefärbt. Abb. 9 zeigt, dass konform zu den Array-Daten nur eine geringe Reaktivität für GFAP in den Schnitten adulter Kontrolltiere (Abb. 9 A) zu finden war. Sowohl bei adulten Mutanten (Abb. 9 B) als auch bei jungen P14 alten Mutanten (Abb. 9 C) konnte Astrogliose festgestellt werden. Bei den adulten Mutanten war GFAP-Immunreaktivität im gesamten Hippocampus zu detektieren. Bei P14 alten Schnitten war diese noch nicht so stark ausgeprägt, sondern beschränkte sich auf die hippocampale Fissur. Die Astrogliose ließ sich nicht nur in der chronischen Phase der Epilepsie nachweisen, sondern war schon während der frühen Epileptogenese zu detektieren.

Hinweisend für fortgeschrittene Astrogliose sind zusätzlich aktivierte Mikroglia. Diese Glia spielen in der Pathogenese einer Reihe von neurodegenerativen Zuständen wie Alzheimer-Krankheit oder Multipler Sklerose eine Rolle. Als Teil des angeborenen Immunsystems können Mikroglia das zentrale Nervensystem gegen Schädigungen schützen, können aber auch neurotoxische Substanzen produzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde Mikroglia durch ihre Reaktivität mit *Gifforia simplicifolia* Isolectin B4 nachgewiesen. Isolectin wurde schon lange genutzt, um Makrophagen und Mikroglia nachzuweisen und war stark bei ihrer Aktivierung erhöht. Es reagiert mit den α -Galaktosidresten assoziierter Membranglycoproteine. Abb. 10 zeigt Isolectin B4-vermittelte Färbung von aktivierten Mikroglia in koronalen Schnitten von 14 Tage alten P-M2-Mutanten, adulten P-M2-Mutanten und adulten P-M2-Kontrollen. Eine positive Färbung für Isolectin B4 konnte nur in der CA1-Region und im Gyrus dentatus des Hippocampus adulter Mutanten (Abb. 10 B) festgestellt werden. Sowohl in den adulten Kontrolltieren (Abb. 10 A) als auch in den jungen P14 Mutanten (Abb. 10 C) war eine Färbung mit Isolectin B4 nicht zu finden. Eine Aktivierung der Mikroglia war also erst während der chronischen Epilepsie zu detektieren und nicht schon während der Epileptogenese. In diesem Epilepsiemausmodell trat die Astrogliose also schon vor der Aktivierung der Mikroglia ein.

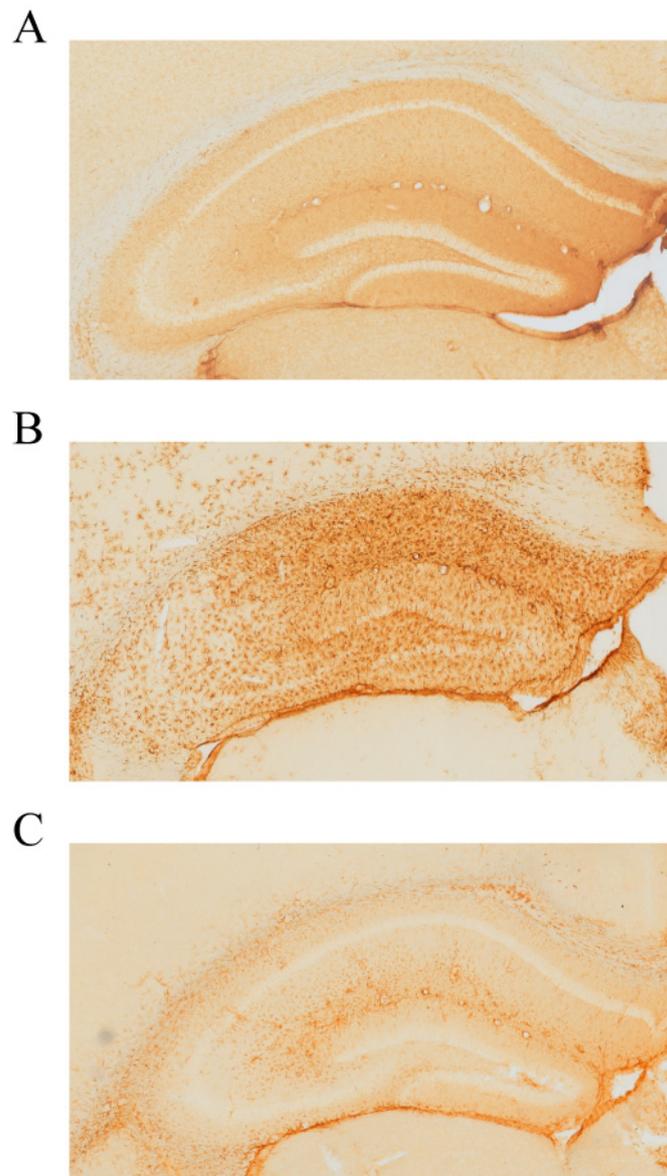


Abb. 9: Immunhistochemischer Nachweis von GFAP

Dargestellt sind Abbildungen des Nachweises von dem *glial fibrillary acid protein* (GFAP) mit Hilfe eines anti-GFAP-Antikörpers in koronalen Schnitten von adulten P-M2-Kontrollen (A), adulten P-M2-Mutanten (B) und P14 alten P-M2-Mutanten (C). In den adulten P-M2-Mutanten (n=5) ist eine starke Immunreaktivität im gesamten Hippocampus zu sehen. In den P14 alten P-M2-Mutanten (n=5) sind schon GFAP-positive Zellen zu finden, allerdings nur im Bereich der hippocampalen Fissur. In den adulten P-M2-Kontrollen (n=5) war kaum eine Färbung zu detektieren.

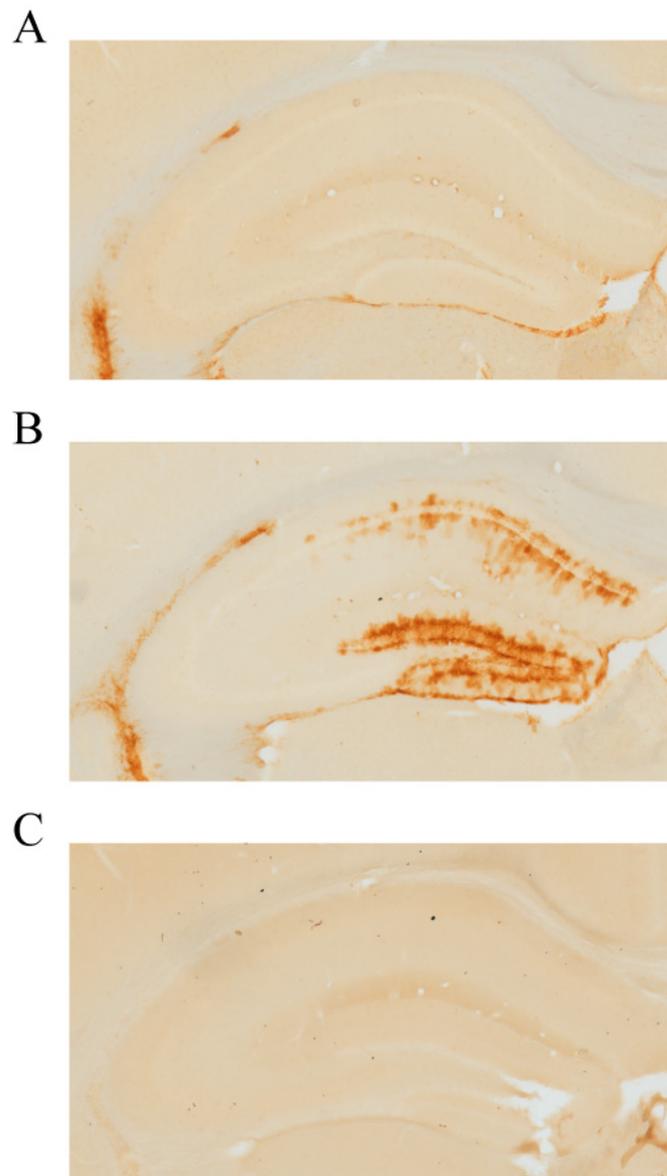


Abb. 10: Isolectin B4-vermittelte Färbung aktivierter Mikroglia

Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen von koronalen Hirnschnitten von adulten P-M2-Kontrollen (A), adulten P-M2-Mutanten (B) und P14 alten P-M2-Mutanten (C). Färbung mit Isolectin B4, einem Marker für aktivierte Mikroglia, ist nur im Hippocampus von adulten P-M2-Mutanten (n=5) in der CA1-Region und im Gyrus dentatus zu detektieren. In den P14 alten Tieren (n=5) ist noch kein Isolectin B4 zu sehen. Ebenfalls ist in den P-M2-Kontrollen (n=5) keine Färbung zu detektieren.

4.2.3. Zytokin-Antikörper-Arrays

Um die Immunantwort in den Mutanten weiter zu untersuchen und auch auf Proteinebene zu verifizieren, wurden Zytokin-Antikörper-Arrays verwendet, die eine parallele Bestimmung multipler Zytokine mit einer einzigen Gewebeprobe erlauben. In dieser Arbeit wurden Zytokin-Antikörper-Arrays verwendet, die 62 unterschiedliche Zytokine und andere Proteine

in einem Experiment in Hippocampuslysaten detektieren können. In Abb. 11 A-G sind die belichteten Filme der Zytokin-Antikörper-Arrays dargestellt. Die Signalintensitäten wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ bestimmt. Die Lokalisation der Zytokine auf dem Array ist in Abb. 11 H zu finden.

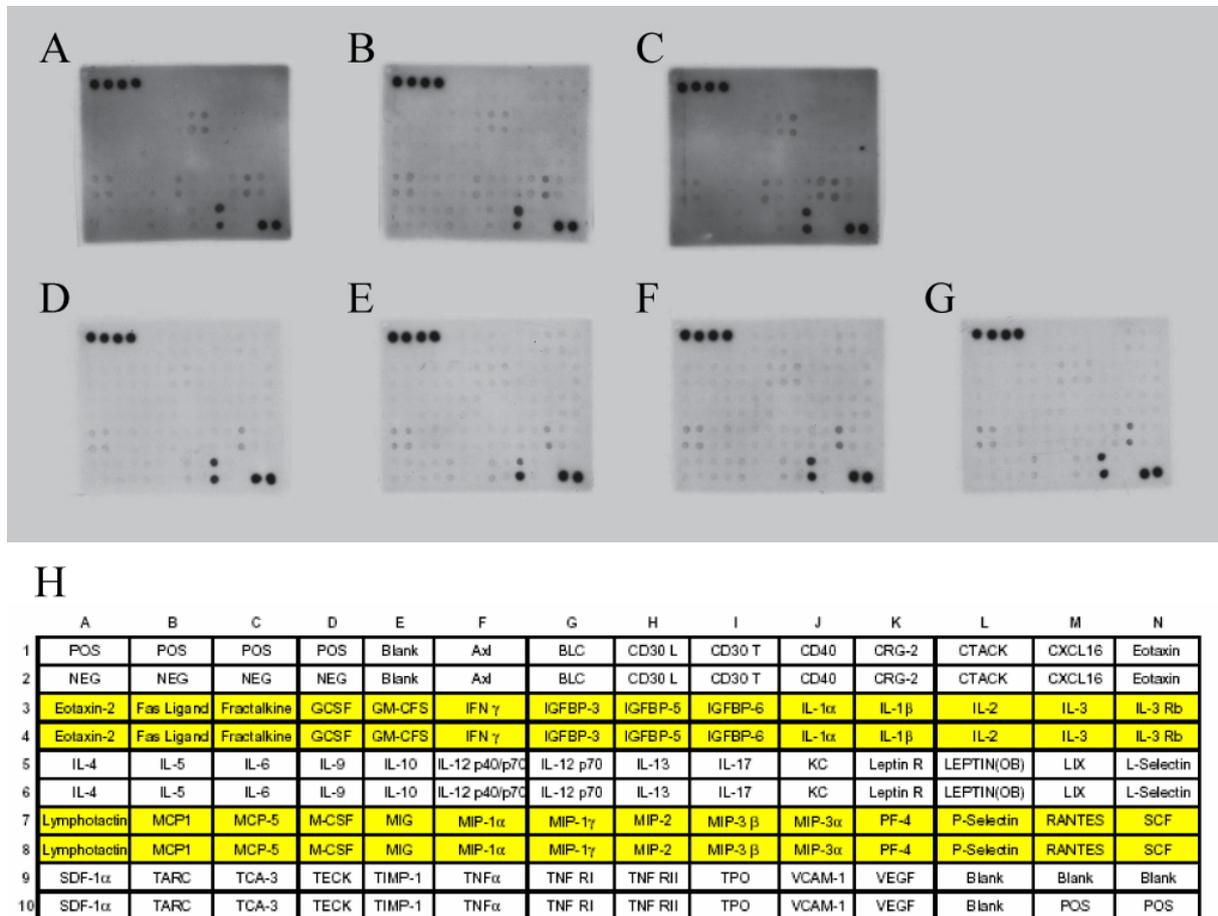


Abb. 11: Zytokin-Antikörper-Arrays zur Bestimmung der differentiellen Expression zwischen Mutanten und Kontrollen

Dargestellt sind die belichteten Filme der Zytokin-Antikörper-Arrays, die mit Proteinlysat einer P-M2-Kontrolle (A), P-M2-Mutante (B und C), P-M2/1-Kontrolle (D) und P-M2/1-Mutante (E-G) inkubiert wurden. Die Lokalisation der Zytokine auf dem Zytokin-Antikörper-Array ist in (H) dargestellt.

Die Zytokine und andere Proteine, deren negative oder positive Expressionsänderung höher als 1,5 war, sind in Abb. 12 dargestellt. Bei den P-M2-Mutanten war VEGF (*vascular endothelial growth factor*) mit einer Expressionsänderung von 11,3 besonders stark herunterreguliert. VEGF stimuliert die Migration von Monozyten und Makrophagen. Außerdem war IGFBP-5 (*insulin-like growth factor-binding protein-5*) 3,1-fach

herunterreguliert. IGFBP-5 verstärkt den Effekt von IGF-I (*insulin-like growth factor-I*), der unter anderem die Zellen vor Apoptose schützt⁹⁴. TNF α , TECK und RANTES zeigten in den P-M2-Mutanten eine Expressionsänderung von 1,7 bis 1,9. Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) ist ein inflammatorisches Zytokin. Niedrige Levels von TNF α fördern die Umgestaltung und das Ersetzen von verletztem und altem Gewebe. TECK (*thymus-expressed chemokine*, auch CCL25) spielt eine Rolle in der Entwicklung von T-Zellen⁹⁵. RANTES (*regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*, auch CCL5) ist ein Chemokin, das chemotaktisch auf T-Zellen, Eosinophile und Basophile wirkt und eine aktivierende Rolle in der Rekrutierung von Leukozyten an Entzündungsherden spielt.

Bei den hochregulierten Proteinen war TARC (*thymus and activation-regulated chemokine*, auch CCL17) mit einer Expressionsänderung von 13,5 besonders stark hochreguliert. TARC ist ein Chemokin, das speziell an T-Zellen bindet und Chemotaxis induziert. Auch MIP-3 α (*macrophage inflammatory protein-3 α* , auch CCL20) zeigte eine Expressionssteigerung von 3,4. MIP-3 α ist ein Chemokin, das an der Bildung und Funktion von mukosalen lymphoiden Geweben durch die Chemoattraktion von Lymphozyten und dendritischen Zellen beteiligt ist⁹⁶. CTACK, MIP-1 γ und PF-4 waren Proteine, die eine Expressionssteigerung zwischen 1,7 und 2,1 zeigten. Das Zytokin CTACK (*cutaneous T cell-attracting chemokine*, auch CCL27) spielt eine Rolle in der T-Zell-vermittelten Inflammation der Haut^{97,98}. MIP-1 γ (*macrophage inflammatory protein-related protein-1*, auch CCL9) wird von Follikel-assoziierten Epithelien sekretiert und zieht dendritische Zellen an, die das Zelloberflächenmolekül CD11b und den Chemokinrezeptor CCR1 besitzen⁹⁹. MIP-1 γ wird konstitutiv von Makrophagen und myeloiden Zellen exprimiert⁹⁹. PF-4 (*platelet factor-4*, auch CXCL4) ist ein Zytokin, das von α -Körnerzellen der aktivierten Thrombozyten während der Thrombozytenaggregation freigesetzt wird. Es fördert die Blutgerinnung durch die Schwächung von Heparin-ähnlichen Molekülen, weshalb ihm eine Rolle in der Wundheilung und Inflammation zugesprochen wird⁹⁹. PF-4 ist chemotaktisch für Neutrophile, Fibroblasten und Monozyten.

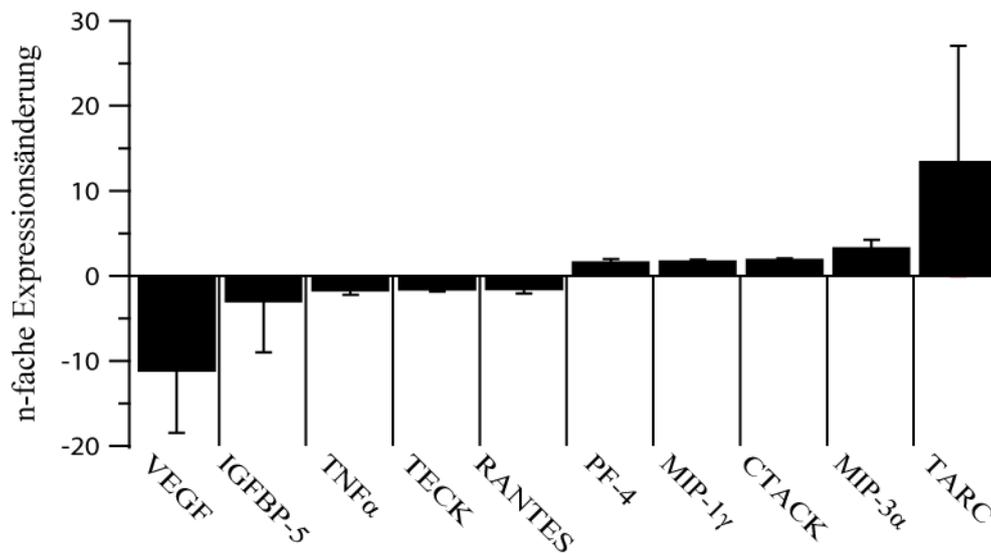


Abb. 12: Mit Zytokin-Antikörper-Arrays detektierte differentiell regulierte Zytokine in P-M2-Mutanten

Dargestellt sind Zytokine der Antikörper-Arrays mit einer mindestens 1,5-fachen Expressionsänderung in den P-M2-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen. Fehlerbalken zeigen SEM.

Wie Abb. 13 zeigt, waren in den P-M2/1-Mutanten 5 Zytokine und Proteine herunterreguliert: IFN γ , CRG-2, KC, IL-3, CD30 T. Die Expressionsänderungen lagen in einem Bereich zwischen 1,5 und 2,4. CD30 T ist ein Zellmembranprotein der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie. Dieser Rezeptor wird nur auf aktivierten T-Zellen exprimiert. CD30 T ist ein positiver Regulator von Apoptose und limitiert das Proliferationspotential von autoreaktiven CD8 Effektor-T-Zellen und schützt den Körper gegen Autoimmunität. Das auch herunterregulierte Interleukin-3 (IL-3) stimuliert die Proliferation von blutbildenden pluripotenten Stammzellen. IL-3 wird von aktivierten T-Zellen sezerniert, um das Wachstum und die Differenzierung von T-Zellen im Knochenmark bei einer Immunantwort zu unterstützen. Das Zytokin KC (auch CXCL1) wird von Makrophagen, Neutrophilen und Epithelzellen exprimiert. Es spielt eine Rolle in den Prozessen der Angiogenese, Inflammation, Wundheilung und Tumorgenese¹⁰⁰⁻¹⁰³. Das Chemokin CRG-2 (*cytokine responsive genes-2*, auch CXCL-10) wird von einer Reihe von Zelltypen als Antwort auf IFN γ sezerniert. CRG-2 besitzt eine anziehende Wirkung auf Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, natürliche Killer-Zellen und dendritische Zellen und unterstützt die T-Zell-Adhäsion an Endothelzellen^{104, 105}. IFN- γ besitzt antivirale und immunregulierende Eigenschaften¹⁰⁶.

Zu den hochregulierten Proteinen gehörte TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase-1*), das eine Expressionssteigerung von 5,9 zeigte. TIMP-1 ist ein natürlicher Inhibitor der Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die in die Degradation der extrazellulären Matrix involviert sind. Neben der Inhibitorrolle kann es die Zellproliferation unterstützen und hat eine mögliche anti-apoptotische Funktion. Thrombopoietin (TPO) war ebenfalls ein stark reguliertes Protein mit einer Expressionsänderung von 5. Es ist ein Glykoproteinhormon, das die Produktion und Differenzierung von Megakaryozyten stimuliert. TCA-3 (*T-cell activation-3*, auch CCL1), ein inflammatorisches Chemokin mit einer Expressionsänderung von 4,8 in den P-M2/1-Mutanten, wird von T-Zellen nach Aktivierung produziert¹⁰⁷. Der Faktor wird auch von Mastzellen produziert¹⁰⁸. Mit TARC wurde bei den P-M2/1-Mutanten auch ein Protein gefunden, das auch schon bei den P-M2-Mutanten gefunden wurde. Schließlich wurde auch das Zytokin Interleukin-5 (IL-5) als hochreguliertes Protein mit Änderung von 2,9 auf Expressionsebene gefunden. Es wird von T-Helfer-2-Zellen und Mastzellen produziert, stimuliert B-Zellwachstum und steigert die Immunglobulinsekretion. Außerdem ist es ein Schlüsselmediator bei der Eosinophilaktivierung.

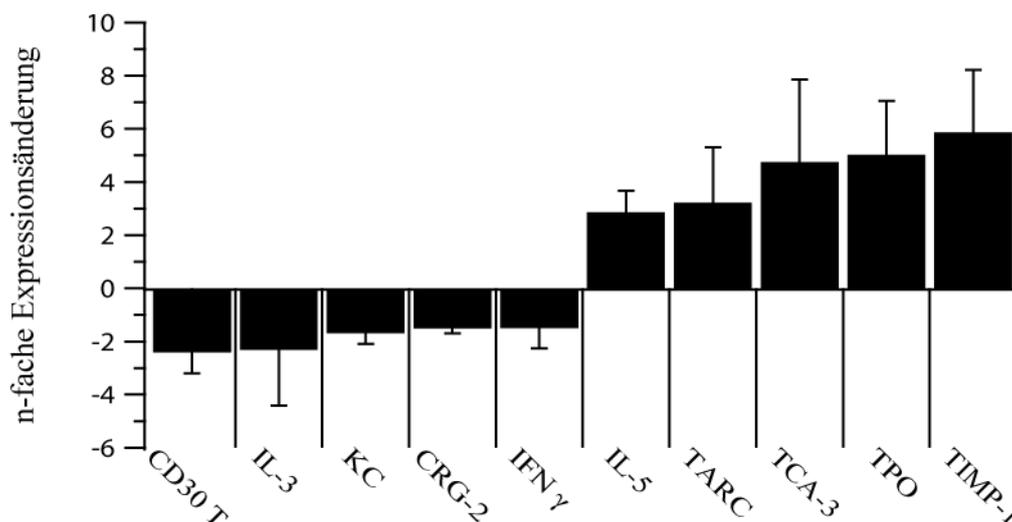


Abb. 13: Mit Zytokin-Antikörper-Arrays detektierte differentiell regulierte Zytokine in P-M2/1-Mutanten

Dargestellt sind Zytokine der Antikörper-Arrays mit einer mindestens 1,5-fachen Expressionsänderung in den P-M2/1-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen. Fehlerbalken zeigen SEM.

Die Analysen auf RNA- und Proteinebene zeigten, dass in den M-Kanal-defizienten Mäusen die Epilepsie von einer erhöhten Immunantwort begleitet wird.

4.3. Quantifizierung von Interneuronen

Epilepsie ist eine Krankheit, die durch spontan auftretende Krampfanfälle gekennzeichnet ist. Diese epileptische Aktivität kann durch eine gesteigerte Erregbarkeit einzelner Nervenzellen und/oder durch eine vermehrte synchrone Aktivität des Netzwerks ausgelöst werden. Spontane synchrone Neuronenentladungen können entstehen, wenn das Gleichgewicht zwischen Erregung und Inhibition durch eine schwächere Inhibierung gestört ist¹⁰⁹, wie zum Beispiel durch eine veränderte Interneuronenaktivität, Neurotransmitterfreisetzung oder Interneuronenanzahl. In den Affymetrix-Analysen zeigte sich, dass die Untereinheiten der GABA_A-Rezeptoren, Gabra1-3, 6, Gabrb2-3 und Gabrg1-3 in den adulten mutanten Mauslinien eine schwache Herunterregulation auf RNA-Ebene zeigten. Um zu testen, ob eine veränderte Interneuronenzahl ein möglicher Grund für den epileptischen Phänotyp dieses Mausmodells ist, wurde eine Quantifizierung von Interneuronengruppen durchgeführt.

Interneurone können anhand ihrer Morphologie, neurochemischen Markern (Calcium-bindende Proteine oder Neuropeptide) und ihren physiologischen Eigenschaften klassifiziert werden^{110, 111}. In dieser Arbeit wurden Hirnschnitte von P-M2-Kontrollmäusen und P-M2-Mutanten auf ihre Parvalbumin-, Calbindin-, Calretinin- und Somatostatin-Immunreaktivität untersucht. Das Calcium-bindende Parvalbumin ist in GABAergen Interneuronen des Nervensystems vorhanden und wird überwiegend von Chandelier-Neuronen und Korbzellen im Neokortex exprimiert. Im Hippocampus sind Parvalbumin-positive Interneurone unterteilt in Korbzellen, axo-axonische und oriens-lancunosum moleculare (OLM) Zellen. Parvalbumin-Interneuron-Verbindungen befinden sich meist um den Zellkörper der Neuronen. Die meisten Parvalbumin-positiven Interneurone feuern im Gamma-Frequenzbereich (30-80 Hz) und sind wahrscheinlich an der Generierung der Gamma-Wellen im EEG beteiligt. Calbindin ist neben Parvalbumin ein weiteres Calcium-bindendes Protein. Neurone, die Calbindin exprimieren, bilden somatodendritische Kontakte mit Pyramidenzellen. Außerdem ist Calbindin ein Marker für migrierende GABAerge Zellen. Sie innervieren andere GABAerge Neurone über mehrere Synapsen. Man nimmt an, dass Interneurone, die das Neuropeptid Somatostatin enthalten, zu der Klasse von dendritisch inhibitorischen Zellen gehören.

Es wurden jeweils 3 Tiere pro Gruppe untersucht. Die Gruppen setzten sich zusammen aus P-M2-Kontrollmäusen, P-M2-Mutanten und P-M2-Mutanten, deren Transgen durch Applikation von Doxzyklin unterdrückt wurde. Die 35 µm dicken Hirnschnitte im Bereich des Hippocampus wurden für die immunhistochemische Färbung mit vier verschiedenen

Antikörpern verwendet. Jeder sechste Schnitt von rostral nach kaudal wurde jeweils mit anti-Parvalbumin-, anti-Calbindin-, anti-Calretinin- und anti-Somatostatin-Antikörpern gefärbt. Insgesamt wurden 12 Schnitte des Hippocampus gefärbt, um einen repräsentativen Bereich des Hippocampus zu untersuchen. Die immunreaktiven Zellen für Parvalbumin, Calbindin, Calretinin sowie Somatostatin wurden durch einen für den Genotyp der Tiere verblindeten Untersucher quantifiziert. In Abb. 14 sind beispielhafte Bilder für Färbungen im Hippocampus mit den vier Antikörpern zu sehen. In Abb. 14 A sind Parvalbumin-immunreaktive Zellen in Bereich von CA1, CA3 und Gyrus dentatus zu sehen. Abb. 14 B zeigt einen Schnitt, der mit anti-Calbindin-Antikörper gefärbt wurde. Auch hier finden sich positive Zellen in CA1, CA3 und Gyrus dentatus, wobei im Bereich von CA3 weniger positive Zellen zu finden waren als in CA1. Im Gyrus dentatus waren sehr viele Zellen, die immunreaktiv für Calbindin waren, zu detektieren. Bei der Calretinin-Färbung in Abb. 14 C waren positive Zellen in CA1 und Gyrus dentatus zu sehen und auch einige wenige Zellen in CA3. Die Abb. 14 D zeigt ein Beispiel für die Immunhistochemie von Somatostatin. Somatostatin-reaktive Zellen sind in CA1 und Gyrus dentatus, aber kaum in CA3 zu finden.

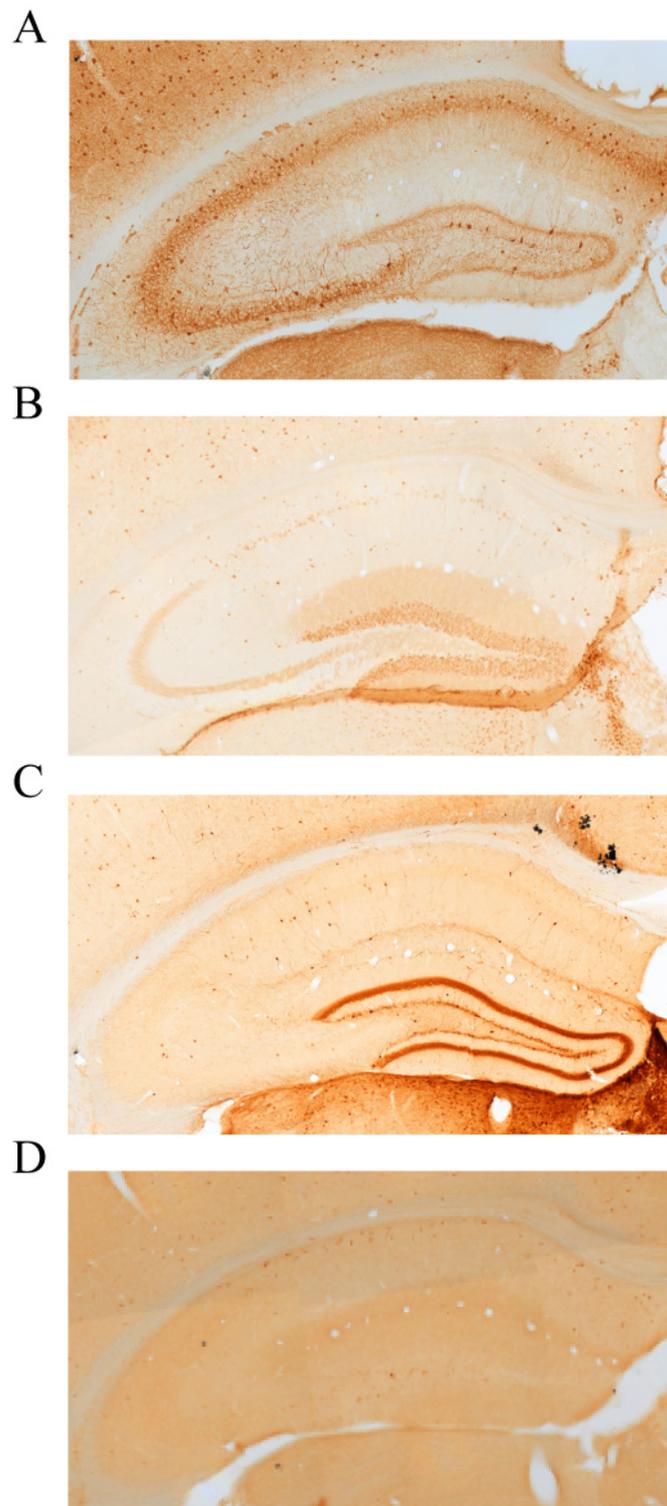


Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis von Interneurongruppen im Hippocampus

Es sind beispielhafte lichtmikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung im Hippocampus nach der DAB-Methode mit den Antikörpern gegen Parvalbumin (A), Calbindin (B), Calretinin (C) und Somatostatin (D) dargestellt.

Um einen Überblick über die Anzahl der vier Interneuronengruppen zu erhalten, wurde eine Quantifizierung im gesamten Hippocampus vorgenommen. Das Ergebnis der Quantifizierung ist in Abb. 15 dargestellt. Die Anzahl an Parvalbumin-positiven Zellen zeigte insgesamt keinen signifikanten Unterschied zwischen den P-M2-Mutanten und den Kontrollgruppen (Abb. 15 A). Für die Schnitte 8 und 9 war ein signifikanter Unterschied in der Anzahl Parvalbumin-reaktiver Interneurone zwischen den einfach transgenen Kontrollmäusen und den Mutanten zu finden, doch dieser Unterschied konnte nicht bei der Anzahl der positiven Zellen bei Mutanten, deren Transgen mit Doxyzyklin reprimiert wurde, gefunden werden. Ein ähnliches Ergebnis war bei der Quantifizierung der Calbindin-positiven Zellen zu finden (Abb. 15 B). Hier gab es keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Calbindin-Interneurone. Bei der Auszählung der Calretinin-immunreaktiven Interneurone ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Anzahl (Abb. 15 C). In der Schnittebene 11, war ein Unterschied in der Anzahl der Interneurone zwischen Mutanten auf Wasser und Mutanten auf Doxyzyklin zu finden. Auch die Auszählung Somatostatin-positiver Interneurone zeigte keine Unterschiede zwischen den Mutanten und den beiden Kontrollgruppen (Abb. 15 D), so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Gesamtzahl der vier Interneuronengruppen in den Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen nicht verändert war.

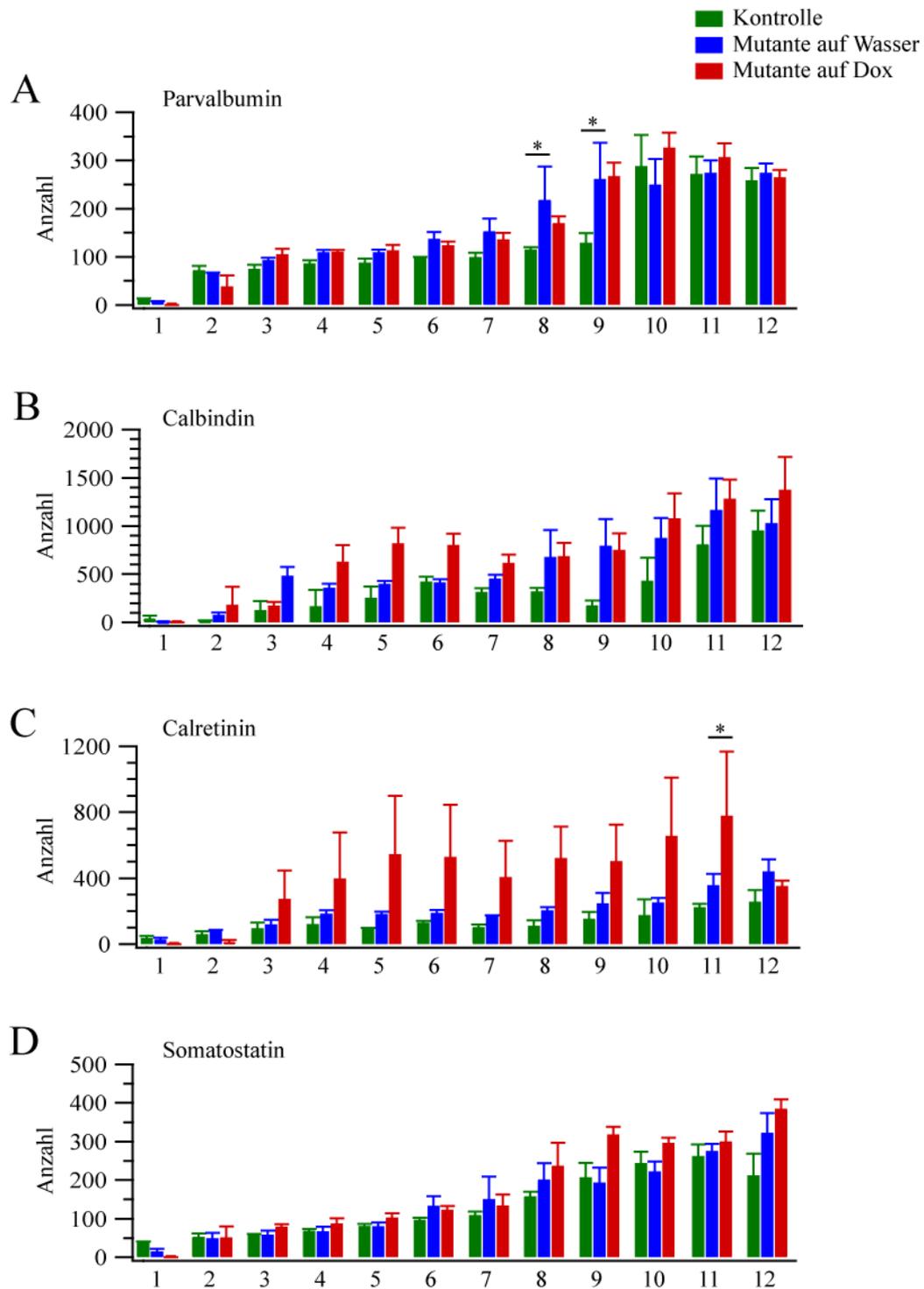


Abb. 15: Quantifizierung von Interneuronengruppen im Hippocampus

Die Abbildung zeigt die Zahlen der Quantifizierung der Interneuronen im gesamten Hippocampus von 12 Schnitten von rostral nach kaudal für die Gruppen einfach transgene P-M2-Kontrollen, P-M2-Mutanten auf Wasser und P-M2-Mutanten auf Doxyzyklin. Die Balkendiagramme zeigen die Ergebnisse für die Auszählung der positiven Zellen der immunhistochemischen Färbung nach der DAB-Methode mit anti-Parvalbumin- (A), anti-Calbindin- (B), anti-Calretinin- (C) und anti-Somatostatin-Antikörpern (D). Fehlerbalken zeigen SEM. (*: $p < 0,05$)

Um sicher zu gehen, dass Regionen-spezifische Unterschiede in der Verteilung der Interneurone im Hippocampus nicht übersehen wurden, wurden die Interneurone getrennt in CA1, CA3 und im Gyrus dentatus quantifiziert. In Abb. 16 sind die Ergebnisse der Interneuronenzählung für die CA1-Region für die Parvalbumin-, Calbindin-, Calretinin und Somatostatin-Antikörper dargestellt. In CA1 waren in allen Schnittebenen keine Unterschiede in der Zahl an Parvalbumin-positiven Interneuronen zu detektieren (Abb. 16 A). Auch die Quantifizierung der Calbindin-immunreaktiven Interneuronen zeigte keine signifikante Änderung in der Zellzahl (Abb. 16 B). In der Gesamtheit war bei der Färbung mit dem Calretinin-Antikörper kein Unterschied zwischen den Mutanten und den Kontrollgruppen zu finden, lediglich bei Schnitt 8 war ein signifikanter Unterschied zwischen den Mutanten und der Kontrollgruppe Mutante auf Doxyzyklin zu sehen (Abb. 16 C). Allerdings war diese Differenz nicht in den einfach transgenen Kontrolltieren zu detektieren. Die Somatostatin-Färbung in der CA1-Region deckte ebenfalls keine Veränderungen in der Interneuronzahl dieser Gruppe auf (Abb. 16 D).

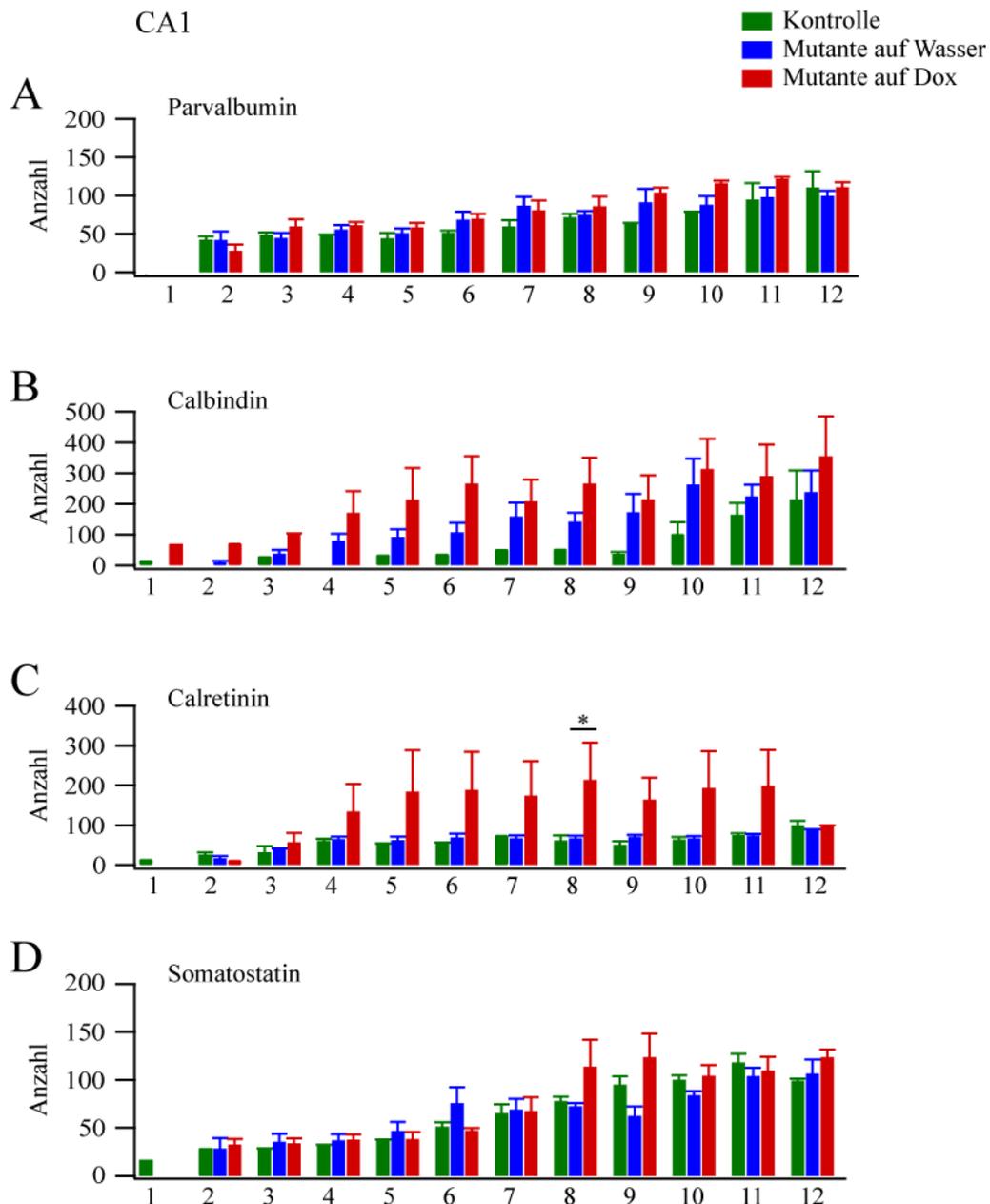


Abb. 16: Quantifizierung von Interneuronengruppen in der CA1-Region

Die Abbildung zeigt die Quantifizierung der Interneuronenanzahl in der CA1-Region von 12 Schnitten von rostral nach kaudal für die Gruppen einfach transgene P-M2-Kontrollen, P-M2-Mutanten auf Wasser und P-M2-Mutanten auf Doxyzyklin. Die Balkendiagramme zeigen die Ergebnisse für die Auszählung der positiven Zellen der immunhistochemischen Färbung nach der DAB-Methode mit anti-Parvalbumin- (A), anti-Calbindin- (B), anti-Calretinin- (C) und anti-Somatostatin-Antikörpern (D). Fehlerbalken zeigen SEM. (*: $p < 0,05$)

Ein ähnliches Ergebnis wie in CA1 wurde in der Zahl der Interneurone in der CA3-Region gefunden. Hier waren insgesamt in allen vier Interneurongruppen keine Veränderungen in der Anzahl zu erkennen (Abb. 17 A-D). Bei den Parvalbumin-markierten Interneuronen wurde zwar in Schnitt 8 eine signifikant unterschiedliche Zahl an positiven Zellen zwischen den Mutanten und den einfach transgenen Kontrollen entdeckt, doch bestand dieser Unterschied nicht zu der anderen Kontrollgruppe, den Mutanten auf Doxyzyklin (Abb. 17 A). In Schnitt 10 war ebenfalls eine höhere Anzahl an Parvalbumin-immunreaktiver Interneurone bei den Mutanten auf Doxyzyklin als den Mutanten auf Wasser zu finden, allerdings bestand diese Veränderung bei den einfach transgenen Kontrolltieren nicht. Die Quantifizierung von Calbindin-positiven Interneuronen zeigte keine Unterschiede im CA3-Bereich (Abb. 17 C). Bei der Anzahl an Interneuronen, die für Calretinin angefärbt waren, war nur beim Schnitt 11 zwischen der Mutantengruppe und den Mutanten auf Doxyzyklin eine Veränderung in der Zahl zu detektieren. Ansonsten waren keine Unterschiede zu finden. Somatostatin-immunreaktive Interneurone zeigten insgesamt keine Veränderung in der Anzahl (Abb. 17 D). In Schnitt 9 war eine signifikant divergente Zahl positiver Neurone zu finden, doch diese Veränderung war nur zwischen den Mutanten auf Wasser und den Mutanten auf Doxyzyklin zu sehen.

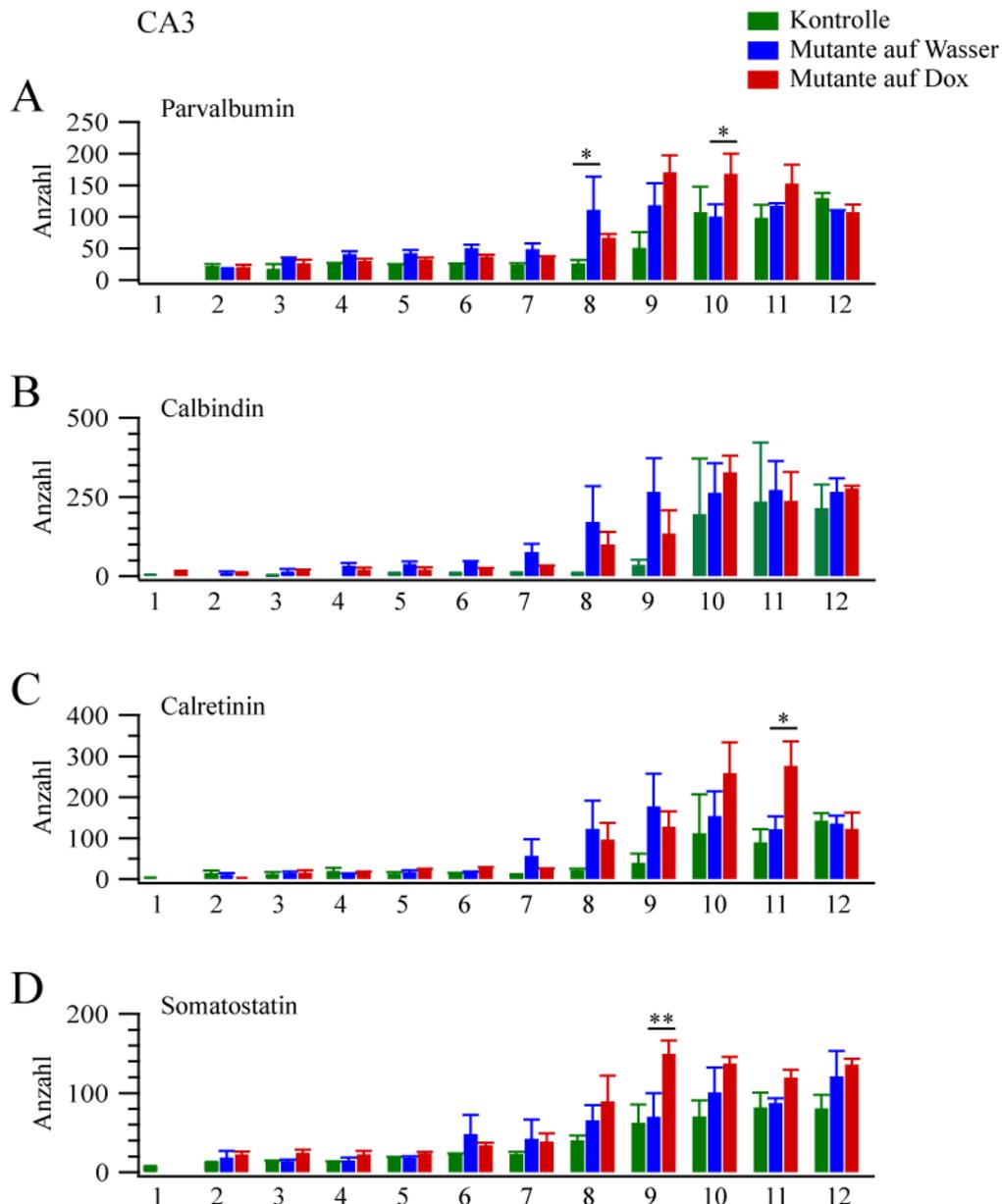


Abb. 17: Quantifizierung von Interneuronengruppen in der CA3-Region

Die Abbildung zeigt die Zahlen der Quantifizierung der Interneuronen in der CA3-Region von 12 Schnitten von rostral nach kaudal für die Gruppen einfach transgene P-M2-Kontrollen, P-M2-Mutanten auf Wasser und P-M2-Mutanten auf Doxyzyklin. Die Balkendiagramme zeigen die Ergebnisse für die Auszählung der positiven Zellen der immunhistochemischen Färbung nach der DAB-Methode mit anti-Parvalbumin- (A), anti-Calbindin- (B), anti-Calretinin- (C) und anti-Somatostatin-Antikörpern (D). Fehlerbalken zeigen SEM. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

Die Quantifizierung im Gyrus dentatus zeigte ebenfalls keine signifikanten Änderungen (Abb. 18). Bei der Parvalbumin-Quantifizierung war bei Schnitt 9 und Schnitt 11 eine Erhöhung bei den Mutanten im Vergleich zu den Mutanten, deren Transgen mit Doxyzyklin supprimiert

war, zu sehen (Abb. 18 A). Diese zeigte sich nicht bei den einfach transgenen Kontrolltieren. Bei den Calbindin-, Calretinin- und Somatostatin-immunreaktiven Interneurone waren keine Veränderungen zu finden (Abb. 18 B-D).

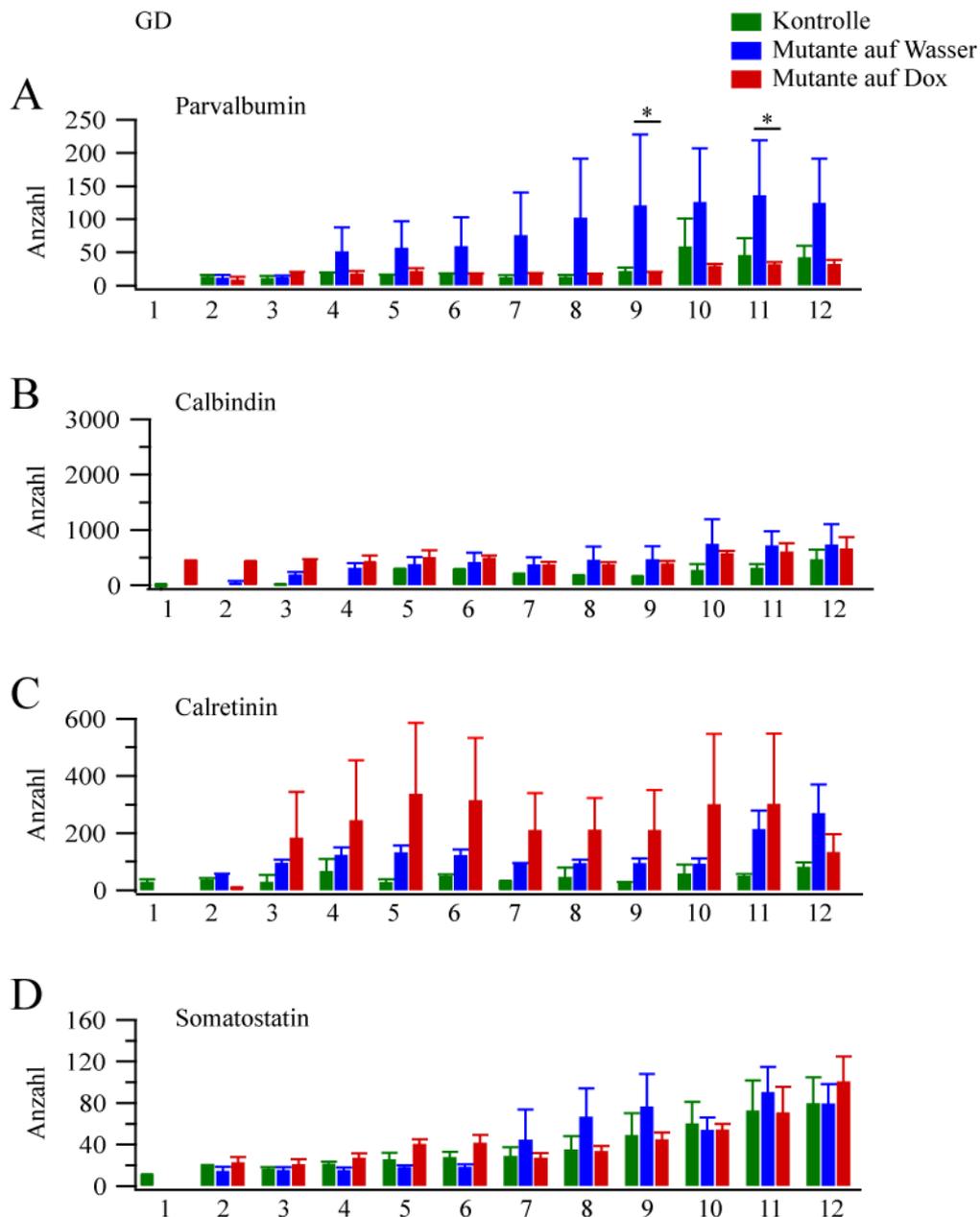


Abb. 18: Quantifizierung von Interneuronengruppen in der Gyrus dentatus-Region

Die Abbildung zeigt die Zahlen der Quantifizierung der Interneurone in der Gyrus dentatus-Region von 12 Schnitten von rostral nach kaudal für die Gruppen einfach transgene P-M2-Kontrollen, P-M2-Mutanten auf Wasser und P-M2-Mutanten auf Doxyzyklin. Die Balkendiagramme zeigen die Ergebnisse für die Auszählung der positiven Zellen der immunhistochemischen Färbung nach der DAB-Methode mit anti-Parvalbumin- (A), anti-Calbindin- (B), anti-Calretinin- (C) und anti-Somatostatin-Antikörpern (D). Fehlerbalken zeigen SEM. (*: $p < 0,05$)

Die Quantifizierungen der Subregionen des Hippocampus wiesen wie auch im gesamten Hippocampus keine signifikanten Veränderungen in der Zahl der Interneuronen-Untergruppen auf. Die Übererregbarkeit der Mutanten ließ sich demnach nicht auf eine Veränderung in der Anzahl an inhibierenden Interneuronen zurückführen.

4.4. Neonatale Netzwerkaktivität im Kortex und Hippocampus

Bereits im neonatalen Gehirn gibt es synchrone Aktivität in kortikalen Netzwerken, wobei sich die Art der Aktivität von der in reifen Netzwerken unterscheidet^{112, 113}. Sie spielt in der Reifung neuronaler Netzwerke eine wichtige Rolle. Mit Hilfe unseres Epilepsie-Mausmodells der Kv7/M-Kanaldefizienz wurde untersucht, welche Rolle diese Kanäle im sich entwickelnden Netzwerk spielen und ob spezifische, Genotyp-abhängige Unterschiede aufgedeckt werden können. Die *Tet-off*-System-vermittelte Unterdrückung des Transgens während der neonatalen Entwicklungsperiode (P0-P14) zeigte, dass die M-Kanäle eine kritische Rolle in dieser Zeit spielen. Die M-Kanäle scheinen daher ein wichtiger Faktor in der Entwicklung des neuronalen Netzwerks sowie der neonatalen Hirnentwicklung zu sein¹.

Um die pathophysiologischen Mechanismen in dieser kritischen neonatalen Periode zu untersuchen, die der M-Kanal-Defizienz assoziierten Epileptogenese zugrunde liegen, wurden Spannungsklemmen-Ableitungen von CA1-Pyramidenneuronen in akuten Hirnschnitten von P7 alten P-M2-Kontrollmäusen und P-M2-Mutanten durchgeführt (in Kooperation mit Dr. Axel Neu). Die Neurone wurden bei einem Potential von -25 mV gehalten und dann auf -45 mV für eine Sekunde hyperpolarisiert. In Abb. 19 A sind repräsentative Stromspuren dargestellt, die in einer CA1-Pyramidenzelle einer Kontrollmaus gemessen wurden. In schwarz ist die Stromspur unter Kontrollbedingung dargestellt, in grau in der Anwesenheit von 10 μ M XE991, einem spezifischen M-Kanal-Blocker. Die rote Stromspur stellt die entsprechende Differenzstromspur dar, die die charakteristischen Kinetikkomponenten des M-Stroms mit einer langsamen Relaxation und Aktivierung illustriert. In Abb. 19 B ist eine beispielhafte Spannungsklemmen-Ableitung eines CA1-Neurons einer doppelt transgenen P-M2-Mutante abgebildet. Die rote Differenzstromspur, die den M-Strom darstellt, war bei der Mutante deutlich reduziert (I_m Kontrolle $56,5 \pm 5,8$ pA, Mutante $3,1 \pm 1,3$ pA, $p < 0,001$). Diese Spannungsklemmen-Experimente zeigten, dass schon in den neonatalen Mutanten die M-Stromamplitude deutlich reduziert war (Abb. 19 C).

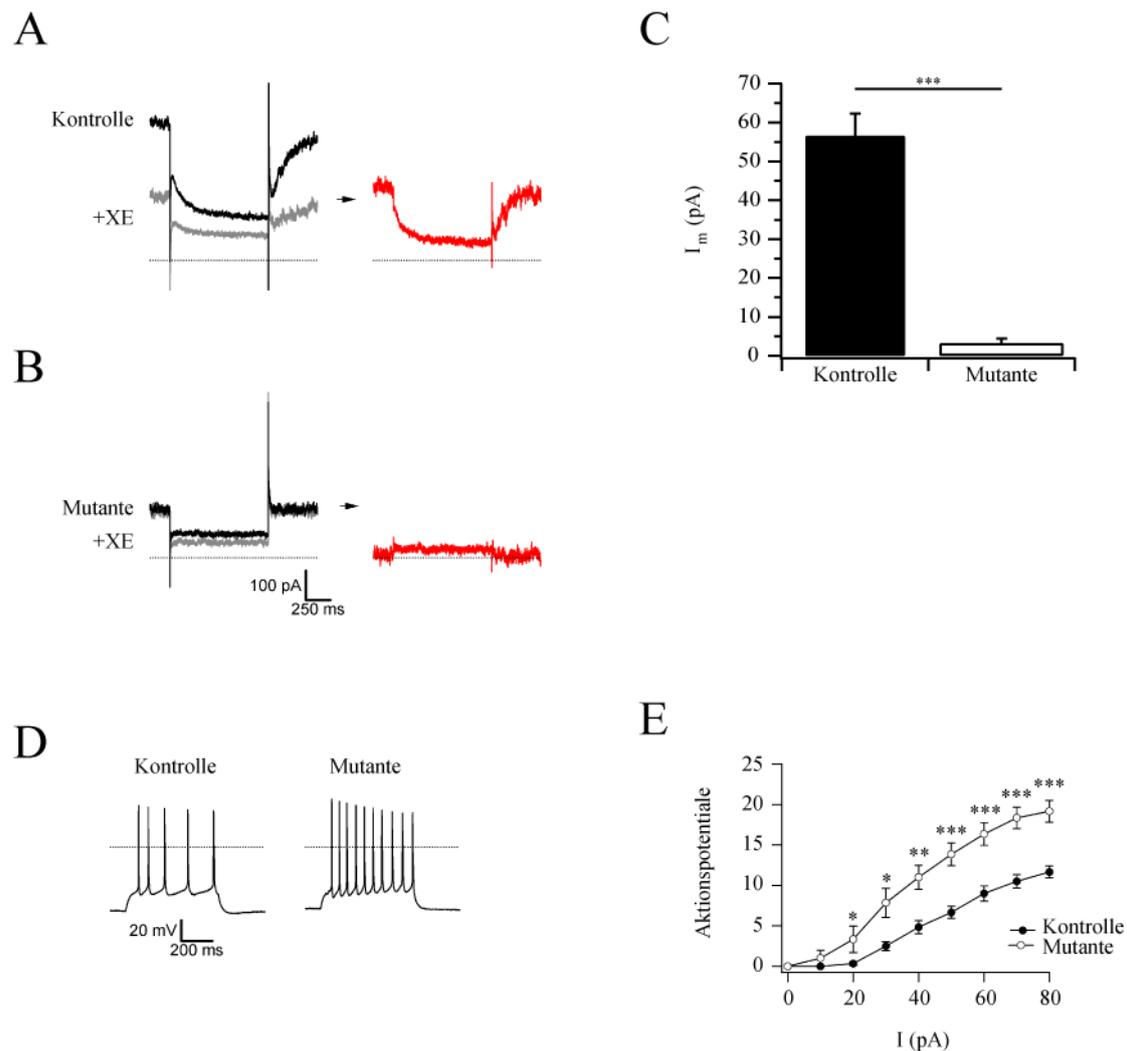


Abb. 19: Vergleich der M-Stromamplitude und des Feuerverhaltens zwischen neonatalen P-M2-Mutanten und Kontrollmäusen

Repräsentative Stromspuren der Spannungsklemmen-Ableitungen von CA1-Pyramidenzellen P7 alter P-M2-Kontrollen (**A**, n=11 Zellen aus 3 Tieren) und P-M2-Mutanten (**B**, n=19 Zellen aus 3 Tieren) unter Kontrollbedingungen (schwarz) und nach Applikation von 10 μ M XE991 (XE) (grau). Die Neurone wurden bei -25 mV gehalten und dann für 1 s auf -45 mV hyperpolarisiert. In rot ist die Spur des resultierenden Differenzstroms dargestellt, der den M-Strom repräsentiert. Die Statistik zeigt eine signifikante Verringerung des M-Stroms in den P-M2-Mutanten (**C**). (**D-E**) Strom- und Spannungsklemmen-Ableitungen von CA1-Pyramidenzellen P7 alter P-M2-Kontrollen und Mutanten. Die Zellen wurden bei einem Potential von -60 mV gehalten. Aktionspotentiale wurden durch injizierte 600 ms lange depolarisierende Pulse hervorgerufen. Es sind repräsentative Aktionspotentiale in P-M2-Kontrollen und Mutanten dargestellt, die durch 70 pA-Strom induziert wurden (**D**). Die zusammenfassende Statistik zeigt, dass die Zellen der P-M2-Mutanten bei jeder injizierten Stromstärke mit einer höheren Anzahl an Aktionspotentialen antworten (**E**) (Kontrollen n=10 Zellen aus 3 Tieren, Mutanten n=10 Zellen aus 3 Tieren). Fehlerbalken zeigen SEM. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

Der M-Strom aktiviert bereits unterhalb der Aktivierungsschwelle der spannungsabhängigen Natriumkanäle und moduliert dadurch die unterschwellige Erregbarkeit von Nervenzellen. Er scheint auch eine wichtige Rolle bei der Inhibition von Aktionspotentialen zu spielen, weshalb eine pharmakologische Suppression dieses Kanalproteins zu erhöhter neuronaler Erregbarkeit führt¹¹⁴. Um die zelluläre Erregbarkeit zu untersuchen, wurden Stromklemmen-Experimente in CA1-Pyramidenzellen von P7 alten P-M2-Kontrollmäusen und P-M2-Mutantenmäusen durchgeführt. Dazu wurden den Zellen bei einem geklemmten Haltepotential von -60 mV depolarisierende Strompulse mit unterschiedlicher Intensität für die Dauer von 600 ms injiziert. In Abb. 19 D sind die Aktionspotentiale dargestellt, die von einer Strominjektion von 70 pA ausgelöst wurden. Die CA1-Pyramidenzellen der Mutante mit dem verringerten M-Strom antworteten mit einer signifikant höheren Anzahl an Aktionspotentialen als die Kontrollzellen. Außerdem zeigten die Neurone der Kontrollen eine Spike-Frequenz-Adaptation, während diese Adaptation bei den Neuronen der Mutanten kaum vorhanden war. In Abb. 19 E ist eine graphische Darstellung der depolarisierenden Strominjektionen im Verhältnis zu der resultierenden Anzahl an Aktionspotentialen zu sehen. Die Mutanten reagierten bei jeder injizierten Strompulsstärke mit einer signifikant höheren Anzahl an Aktionspotentialen. Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass der Verlust der M-Kanal-Aktivität in neonatalen Mäusen bereits im Alter von sieben Tagen eine deutlich erhöhte neuronale Erregbarkeit verursacht.

Um zu untersuchen, ob die *in vitro* gemessene erhöhte zelluläre Erregbarkeit mit einer Zunahme an neuronaler Aktivität *in vivo* verbunden ist, wurde zunächst mittels Immunhistochemie die Expression von c-fos ermittelt. C-fos, das als Produkt eines Proto-Onkogens im Zellkern als Transkriptionsfaktor wirkt, wird in einigen Neuronen nach Depolarisation exprimiert und kann damit als Marker für die akute neuronale und synaptische Aktivität dienen¹¹⁵. Um zu überprüfen, ob in den Mutanten mit verringerter M-Kanalaktivität eine veränderte neuronale Aktivität vorhanden ist, wurden Schnitte von neonatalen Mutanten und Kontrollen für c-fos gefärbt. In Abb. 20 sind beispielhafte Färbungen des Hippocampus einer Kontrolle und einer Mutante dargestellt. Wie in Abb. 20 A zu erkennen ist, waren bei den Kontrollen (n=5) c-fos positive Zellen im Gyrus dentatus und einige wenige auch in der CA3-Region zu detektieren. In Abb. 20 B ist die Immunfärbung einer Mutante zu sehen. Bei den Mutanten (n=5) waren c-fos-positive Zellen wie in der Kontrolle in Gyrus dentatus- und

CA3-Bereich zu finden. Zusätzlich waren c-fos positive Zellen in der CA1-Region zu detektieren, in der sich bei Kontrolltieren keine Zellen für c-fos anfärbten.

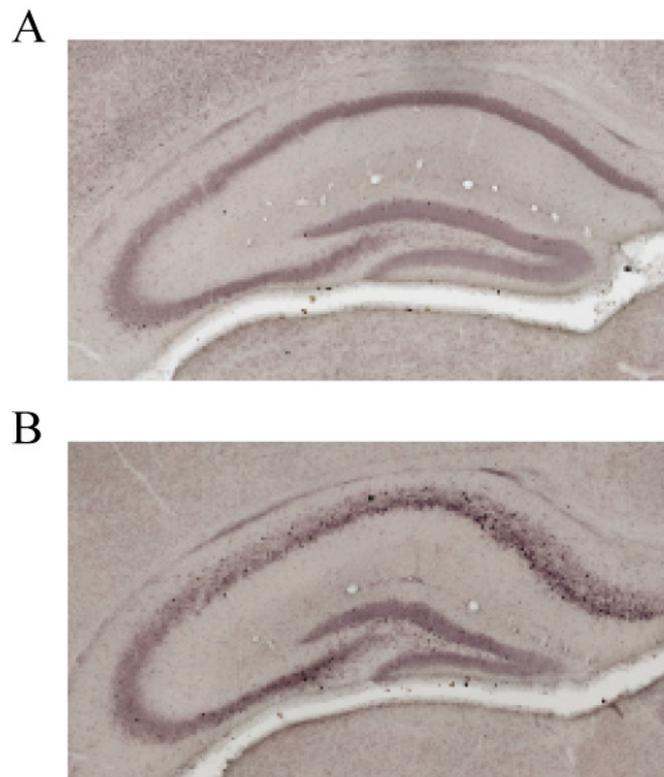


Abb. 20: Immunhistochemischer Nachweis von c-fos

Lichtmikroskopische Aufnahmen koronaler Schnitte von P14 alten P-M2-Kontrollen (A) und Mutanten (B), die immunhistochemisch nach der DAB-Methode für c-fos gefärbt sind. C-fos-positive Zellen waren in Kontrollen (n=5) und Mutanten (n=5) im CA3-Bereich und im Gyrus dentatus zu finden. Nur in der Mutante waren immunreaktive Zellen in der CA1-Region zu sehen.

Das frühe Muster korrelierter neuronaler Aktivität spielt eine wichtige Rolle in der kortikalen Entwicklung, indem es neuronale Differenzierung, Migration, Synaptogenese und die Bildung des neuronalen Netzwerks kontrolliert¹¹⁶⁻¹²². Um mögliche pathophysiologische Mechanismen der M-Kanaldefizienz während der frühen Epileptogenese aufzudecken, wurden *in vivo* Multikanalableitungen mit linearen Silikonproben gleichzeitig im visuellen Kortex und im Hippocampus von nicht anästhesierten Mäusen zwischen P5 und P7 durchgeführt. Dieses Alter wurde ausgesucht, um sicher zu stellen, dass die gemessene Aktivität im visuellen Kortex intrinsisch war, da die Tiere die Augen noch geschlossen hatten. Studien in Tiermodellen haben gezeigt, dass die neuronale Aktivität im sich entwickelnden visuellen Kortex von zwei verschiedenen, aber gleich wichtigen Mechanismen bestimmt wird:

den intrinsischen Oszillationen und dem afferenten Input. Im visuellen System wird afferenter Input von spontanen Retinawellen erzeugt, die synchronisierte Entladungen im visuellen Kortex antreiben¹²³⁻¹²⁸. Daneben existieren endogene Mechanismen der Stimulation, die intrinsische oszillatorische Muster induzieren. Zusätzlich zum visuellen Kortex wurde die Aktivität des Hippocampus mit einer *Silicon Probe* gemessen. In neonatalen Ratten wurden *Sharp Waves* in der CA1-Region des Hippocampus *in vivo* gefunden. Ihre putativen *in vitro* Korrelate sind die *giant depolarizing potentials* (GDPs), synchrone, neuronale Populationsereignisse mit großer Amplitude. Sie sind die frühesten neuronalen Muster, die bislang in neonatalen Ratten detektiert wurden¹¹².

Beispielhafte Ausschnitte einer akuten *in vivo* Ableitungen im visuellen Kortex und Hippocampus einer Kontrolle und einer Mutante werden in Abb. 21 gezeigt. Es wurden zwei 16-Kanal-*Silicon Probes* verwendet, deren Kanäle 100 μm separiert sind. Es ist zu erkennen, dass im visuellen Kortex von Kontrolltieren periodisch auftretende *Spindle Bursts* die dominierenden Feldpotentialmuster der Aktivität im unreifen visuellen Kortex waren (Abb. 21 A). *Spindle Bursts* sind 200-600 ms lange oszillatorische Entladungen, die aus einer schnellen Oszillation im α/β (8-25 Hz)-Frequenzbereich bestehen.

In den P-M2-Mutanten waren ebenfalls *Spindle Bursts* zu finden, die mit den gefundenen Oszillationen in den Kontrolltieren vergleichbar waren, doch hier besaßen die *Spindle Burst*-Oszillationen eine größere Amplitude (Abb. 21 B). Die Tiefenableitung der *Spindle Bursts* in den verschiedenen V1-Schichten zeigte eine geringe Abnahme in ihrer Amplitude zwischen oberflächlichen und tieferen Schichten. Die *Bursts* waren oft mit rhythmischen Multi-Unit-Entladungen assoziiert.

In der CA1-Region des Hippocampus von Kontrolltieren und M-Kanal-defizienten Tieren traten *Sharp Waves* sporadisch auf und wurden von Ruheperioden unterbrochen (Abb. 21). Die größten *Sharp Waves* konnten in Stratum radiatum gefunden werden. Sie sind Ausdruck der synaptischen Aktivierung der aus der CA3-Region stammenden Schaffer-Kollateralen auf den apikalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen und wiesen daher eine Phasenumkehr an der CA1-Pyramidenzellschicht auf.

Die vergrößerten Ausschnitte der *current source density* (CSD)-Analysen, die zu den abgebildeten Ableitungen gehören, zeigen die Senke-Quelle-Verteilungen der spontan auftauchenden Ereignisse (Abb. 21). *Current Sinks* (Senke) entstehen, wenn positive Ladungen aus dem extrazellulären Raum in die Zelle fließen (z.B. Natrium- und Calciumionen), was auf eine exzitatorische synaptische Aktivität hinweist. Eine *Current*

Source (Quelle) entsteht, wenn der Strom aus der Zelle in den extrazellulären Raum durch eine inaktive Membran zurückfließt (passiver „Rückkehrstrom“ oder *passive return current*)¹²⁹. In der Mutante spiegelten sich die rhythmischen Oszillationen der oberen Schichten des visuellen Kortex im CSD wider (Abb. 21 B). Die *Spindle Bursts* waren mit einer Serie von Senken in den oberen Schichten (200-400 µm) verbunden, welche die lokale synaptische Aktivierung apikaler Dendriten kortikaler Neurone widerspiegeln. Im Hippocampus zeigte das Tiefenprofil, dass die *Sharp Waves* eine Senke im Stratum radiatum besaßen und eine Quelle in der Pyramidenzellschicht induzierten und damit die Aktivierung der Schaffer-Kollateralen ausgehend von CA3-Neuronen widerspiegeln (Abb. 21 A).

Die unterste grüne Spur gibt die aufgezeichnete Bewegung des Tiers durch einen Sensor wider. Somit konnte überprüft werden, ob die gesehene Aktivität im Kortex und Hippocampus intrinsisch war oder durch Bewegung induziert wurde.

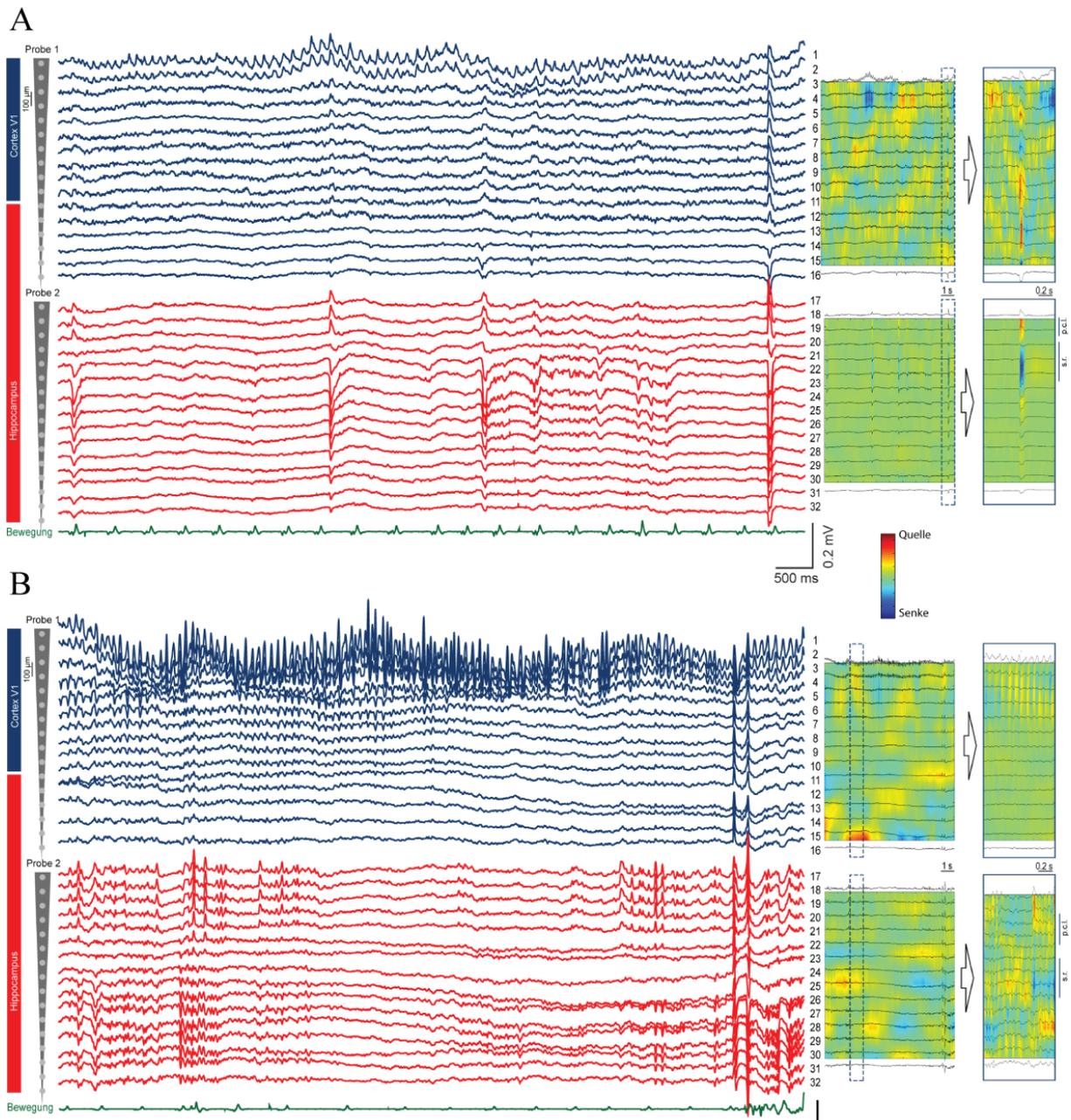


Abb. 21: Tiefenprofil-Ableitung im V1 Kortex und Hippocampus sowie korrespondierende CSD-Profil

Es sind beispielhafte Ableitungen einer akut implantierten P5 Kontrollmaus (A) und Mutante (B) dargestellt. Rechts daneben sind die dazugehörigen CSD-Profile sowie ein vergrößerter Ausschnitt abgebildet. Eine *Silicon Probe* mit 16 Kanälen befand sich im visuellen Kortex V1 und eine zweite im Hippocampus. In den oberflächlichen Schichten des Hippocampus sind *Spindle Burst*-Oszillationen im α/β -Frequenzbereich zu sehen, die in der Mutante eine größere Amplitude besitzen. Im Hippocampus werden sporadisch auftretende *Sharp Waves* beobachtet, die in der CA1-Pyramidenschicht eine Phaseninversion aufweisen. Der grüne Kanal zeichnet die Bewegung des Tiers auf.

Ein 25-minütiger Ausschnitt einer Ableitung vom Kortex eines Kontrolltiers (Abb. 25 A) und einer Mutante (Abb. 25 C) ist als farbkodiertes Zeit-Frequenz-Spektrum dargestellt. In der

Mutante traten im Vergleich zur Kontrolle häufiger *Spindle Burst*-Ereignisse auf. Die Zeit-Frequenz-Spektren der jeweils stärksten Oszillation sind für die Kanäle 1, 3 und 5, die jeweils 200 μm auseinanderliegen, vergrößert abgebildet. Es ist zu erkennen, dass die *Spindle Burst*-Oszillationen in der Kontrolle eine geringere Power besaßen und nur im obersten Kanal zu messen waren. In der Mutante dagegen war die Power der *Spindle Bursts* deutlich stärker. Zusätzlich war eine Ausbreitung in tiefere Kortexschichten auszumachen.

Im farbkodierten Powerspektrumtiefenprofil der spontanen Aktivität der gesamten Messung der Kontrollmaus und der M-Kanal-defizienten Maus aus Abb. 21 werden die einzelnen Kanäle entsprechend ihrer anatomischen Anordnung gegen die Frequenz dargestellt (Abb. 22). Das Powerspektrum der Mutante zeigte einen Peak in den oberflächlichen Schichten des Kortex bei 10-14 Hz und einen zweiten schwächeren bei 20 Hz (Abb. 22 B). Diese beiden Peaks waren in der Kontrolle nicht zu detektieren (Abb. 22 A).

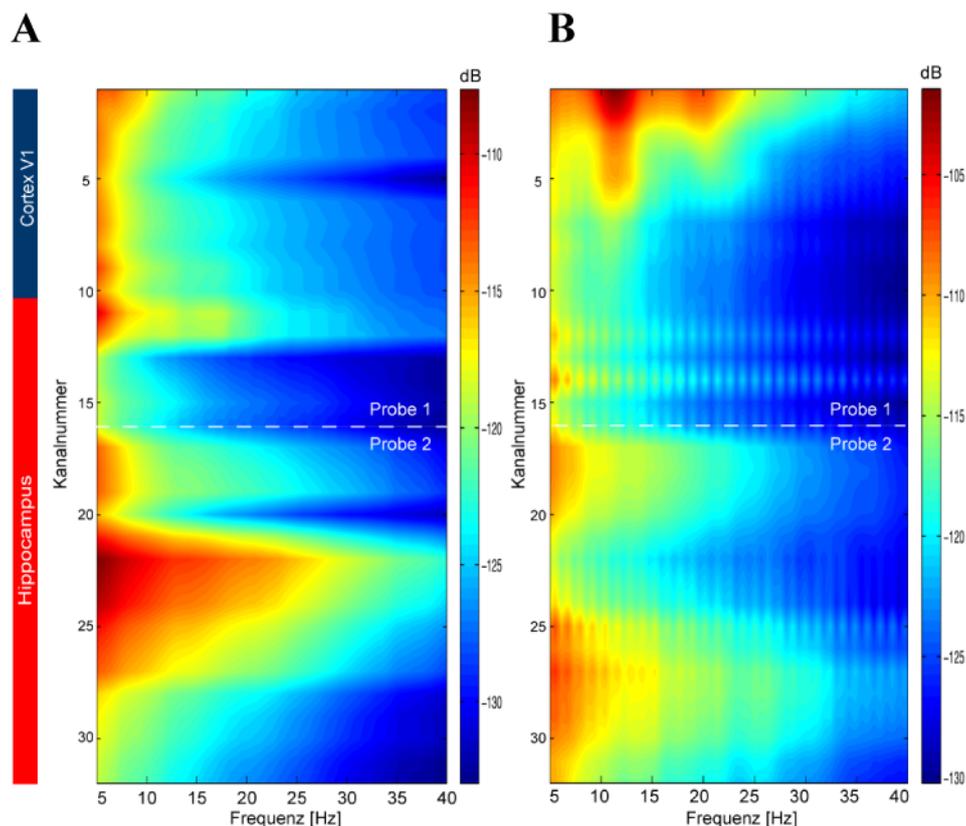


Abb. 22: Beispielhafte farbkodierte Powerspektrumtiefenprofile

Die Abbildung zeigt farbkodierte Powerspektren der mit *Silicon Probes* aufgezeichneten spontanen Aktivität im visuellen Kortex und Hippocampus einer Kontrolle (A) und Mutante (B). Dargestellt sind die Kanäle gegen die Frequenz. In der Mutante sind zwei Peaks in den oberflächlichen Kortexschichten bei 10-14 Hz und 20 Hz zu finden.

Die statistische Analyse zeigte, dass die *Spindle*-Oszillationen im visuellen Kortex von Kontrolltieren $0,29 \pm 0,1$ pro Minute auftraten (Abb. 23). Sie hatten eine Amplitude von $191,93 \pm 41,27$ mV. In den Mutanten waren die *Spindle*-Oszillationen signifikant häufiger zu finden. Sie waren $0,93 \pm 0,17$ pro Minute zu detektieren. Zusätzlich war die Amplitude der Mutanten mit $315,2 \pm 53,5$ mV im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant höher. In den Parametern Frequenz ($11,5 \pm 1,21$ Hz) und Dauer ($6,98 \pm 1,92$ s) unterschieden sie sich nicht signifikant von den Kontrollen. Bei den Kontrollen besaßen die Oszillationen eine Frequenz von $10,3 \pm 1,35$ Hz und eine Dauer von $6,23 \pm 1,42$ s.

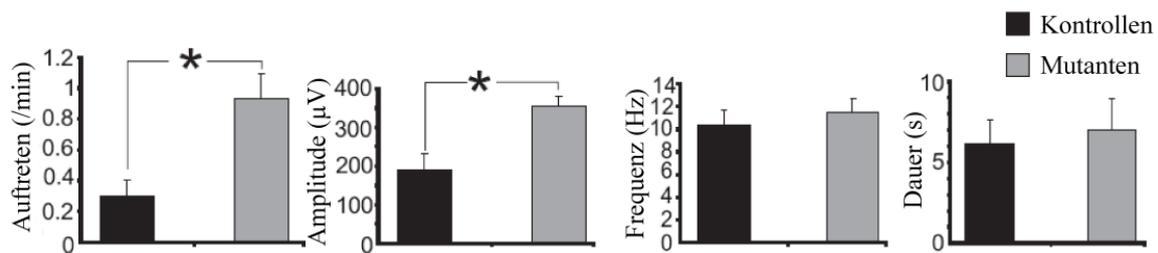


Abb. 23: Auswertung der *Spindle Burst* in V1

Die statistische Analyse zeigt, dass die V1 *Spindle Bursts* mit einer signifikant höheren Häufigkeit in den Mutanten auftreten und die Amplitude signifikant erhöht ist. Fehlerbalken zeigen SEM. (*: <0,05; Kontrolle n=7, Mutante n=9)

Um die Lokalisation der Elektroden im Gehirn der Tiere zu bestimmen, wurde nach Ende der Ableitung die Position mit DiI-markierten Elektroden gekennzeichnet. Die Tiere wurden perfundiert und die Lage der Sonden in Nissl-gefärbten seriellen Schnitten bestimmt (Abb. 24).

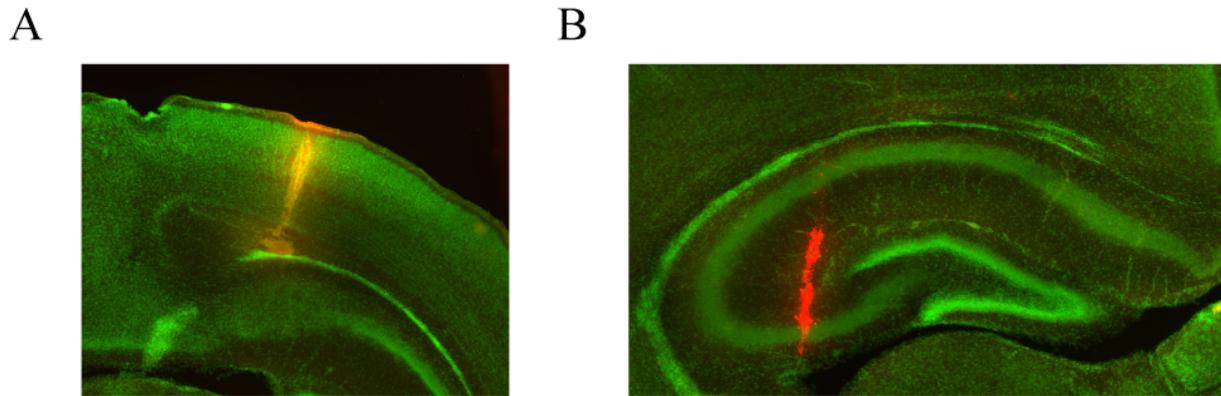


Abb. 24: Lokalisation der *Silicon Probes* im visuellen Kortex und Hippocampus
Abgebildet sind Nissl-gefärbte Schnitte nach Markierung der Ableitstelle mit DiI-Farbstoff im visuellen Kortex (A) und Hippocampus (B) zur Lokalisation der *Silicon Probes*.

4.5. Pharmakologische Therapie der M-Kanaldefizienz im Mausmodell

Die *in vitro* Messungen an akuten neonatalen Hirnschnitten haben gezeigt, dass der M-Strom wichtig für die Regulation der neuronalen Erregbarkeit im unreifen Gehirn ist. In den M-Kanal-defizienten Mäusen konnte eine erhöhte c-fos-Immunreaktivität in der CA1-Region detektiert werden, die auf eine gesteigerte neuronale Aktivität hinweist. Auch die *in vivo* Messungen deckten Veränderungen des neonatalen Netzwerks auf, die sich in höherer β -Aktivität in den oberflächlichen Schichten des visuellen Kortex widerspiegelt. Unter Verwendung des *Tet-off*-Systems konnten Peters *et al.* zeigen, dass die Expression des funktionellen M-Strom in der neonatalen Periode wichtig für die normale Entwicklung ist¹. All dies deutet auf eine kritische Rolle von Kv7-Kanälen während der neonatalen Phase bei der Hirnentwicklung in Mäusen hin.

Die neonatale Phase, in der die erhöhte Erregung in den P-M2-Mutanten zum epileptischen Phänotyp führt, überschneidet sich interessanterweise mit dem Zeitfenster, in dem GABA, der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter des adulten Gehirns, eine exzitatorische Wirkung besitzt¹³⁰. Die exzitatorische Wirkung von GABA spielt in Neonaten eine Rolle in der neuronalen Entwicklung^{82, 131}, trägt aber auch zu ihrer erhöhten Neigung zu epileptischen Anfällen und verringerter Krampfschwelle bei¹³². Barbiturate und Benzodiazepine erleichtern den Ausstrom von Cl^- entlang ihres elektrochemischen Gradienten durch die hohe $[\text{Cl}^-]_i$ der unreifen Neurone, depolarisieren und erregen die Neurone^{133, 134}. Da der erhöhten $[\text{Cl}^-]_i$ der

unreifen Neurone die starke Aktivität von NKCC1 zu Grunde liegt, könnte dieser Cotransporter ein Ziel für neue Antikonvulsiva bei neonatalen epileptischen Anfällen sein. Theoretisch könnte die Inhibierung von NKCC1 und damit die reduzierte $[Cl^-]_i$ die GABA-vermittelte Erregung verringern oder möglicherweise die GABA-Antwort sogar in eine inhibierende ändern.

Um den akuten Effekt der Inhibition von NKCC1 zu testen, wurde neonatalen P-M2-Mutanten der NKCC1-Blocker Bumetanid subkutan während den *in vivo* Ableitungen injiziert. Das farbkodierte Zeit-Frequenz-Spektrum des 25-minütigen Ausschnitts einer Ableitung vom Kortex eines Kontrolltiers zeigte keine großen Veränderungen der Netzwerkaktivität (Abb. 25 B) nach Bumetanid-Injektion im Vergleich zu vorher (Abb. 25 A). Im Gegensatz dazu konnten in der Mutante die häufig erscheinenden *Spindle Bursts* vor der Bumetanid-Injektion (Abb. 25 C) reduziert werden (Abb. 25 D). Dies war auch in den vergrößerten Zeit-Frequenz-Spektren der Kanäle 1, 3 und 5 zu erkennen.

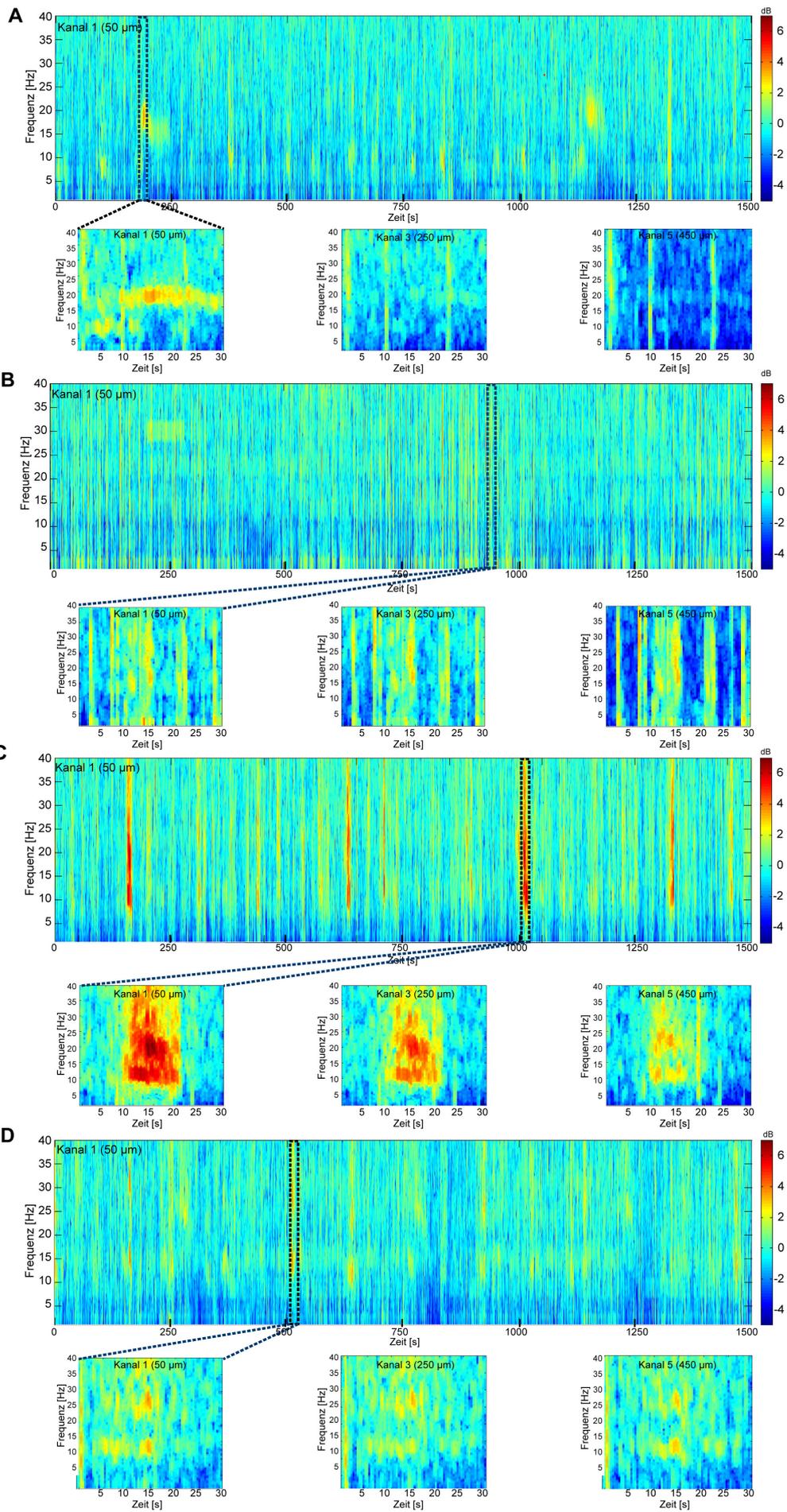


Abb. 25: Farbkodierte Powerspektren einer Kontrollmaus und einer Mutante vor und nach Bumetanid-Injektion

Die Abbildung zeigt farbkodierte Frequenz-Zeit-Powerspektren über einen Zeitraum von 25 Minuten einer Kontrolle (A) und einer Mutante (C) vor subkutaner Bumetanid-Injektion. Das Powerspektrum nach Bumetanid-Injektion zeigte keine Veränderungen in der Kontrolle (B). Dagegen führte Bumetanid in der Mutante zu einer starken Reduktion der Häufigkeit und Stärke der Spindle Burst-Ereignisse (D). Vergrößert sind die Frequenz-Zeit-Powerspektren der Kanäle 1, 3 und 5 dargestellt.

Die Auswertung in Abb. 26 zeigte, dass in akuten *in vivo* Messungen eine subkutane Injektion von 0,2 mg/kg Bumetanid die Häufigkeit des Auftretens der *Spindle Bursts* in den oberflächlichen Schichten des visuellen Kortex in den Mutantenmäusen im Alter von P5-7 verringern konnte. Es war eine deutliche Abnahme des zuvor erhöhten Auftretens und der Amplitude der *Spindle*-Oszillationen zu detektieren, so dass die Mutanten und Kontrollen nach Bumetanid-Injektion eine vergleichbare Netzwerkaktivität besaßen. Die akute, einmalige Injektion von Bumetanid war also in der Lage, die pathologischen Oszillationen im neonatalen, visuellen Kortex zu verringern.

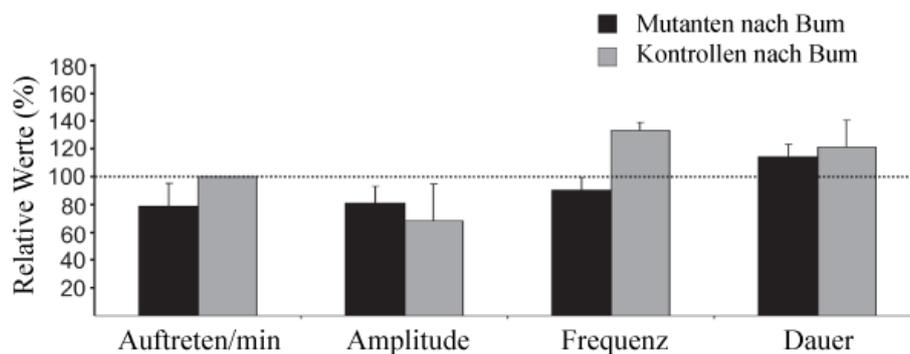


Abb. 26: Effekt von Bumetanid auf Oszillationen im visuellen Kortex V1

Die Auswertung zeigte eine Reduktion der Häufigkeit, mit der *Spindle Bursts* im visuellen Kortex von Bumetanid-injizierten Mutanten auftraten. Zusätzlich konnte die Amplitude reduziert werden. Fehlerbalken zeigen SEM.

Da die akute Behandlung der Mutanten die erhöhte Netzwerkaktivität im Kortex verhindern konnte, wurde untersucht, ob eine Bumetanid-Behandlung der P-M2-Mutanten in der kritischen neonatalen Phase einen Effekt auf die Entwicklung des Phänotyps der M-Kanaldefizienz besitzt. Dafür wurden sowohl P-M2-Mutanten (n=6) als auch Kontrollen (n=6) einmal täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen subkutan mit 0,2 mg/kg Bumetanid behandelt.

P-M2-Mutanten zeigen eine zuvor beschriebene Verhaltenshyperaktivität. Um den Effekt der Bumetanid-Behandlung auf diesen Phänotypen zu prüfen, wurde die Basalaktivität der behandelten adulten Tiere in ihren Heimatkäfigen getestet. In Abb. 27 ist sowohl in der exemplarischen 24 h-Periodenübersicht (Abb. 27 A) als auch in der statistischen Zusammenfassung (Abb. 27 B) zu erkennen, dass die Behandlung mit Bumetanid die Aktivität der hyperaktiven Mutanten (Tag $9,6 \pm 0,6$ %, Nacht $40,6 \pm 4,0$ %) auf das Niveau der behandelten Kontrolltiere (Tag $9,3 \pm 0,8$ %, Nacht $37,0 \pm 2,8$ %) verringern konnte (Tag $p=1$, Nacht $p=0,76$). Die Aktivität der beiden Gruppen war während der Lichtphase geringer als während der Dunkelphase, wie es für nachtaktive Tier zu erwarten war (Abb. 27 A und B).

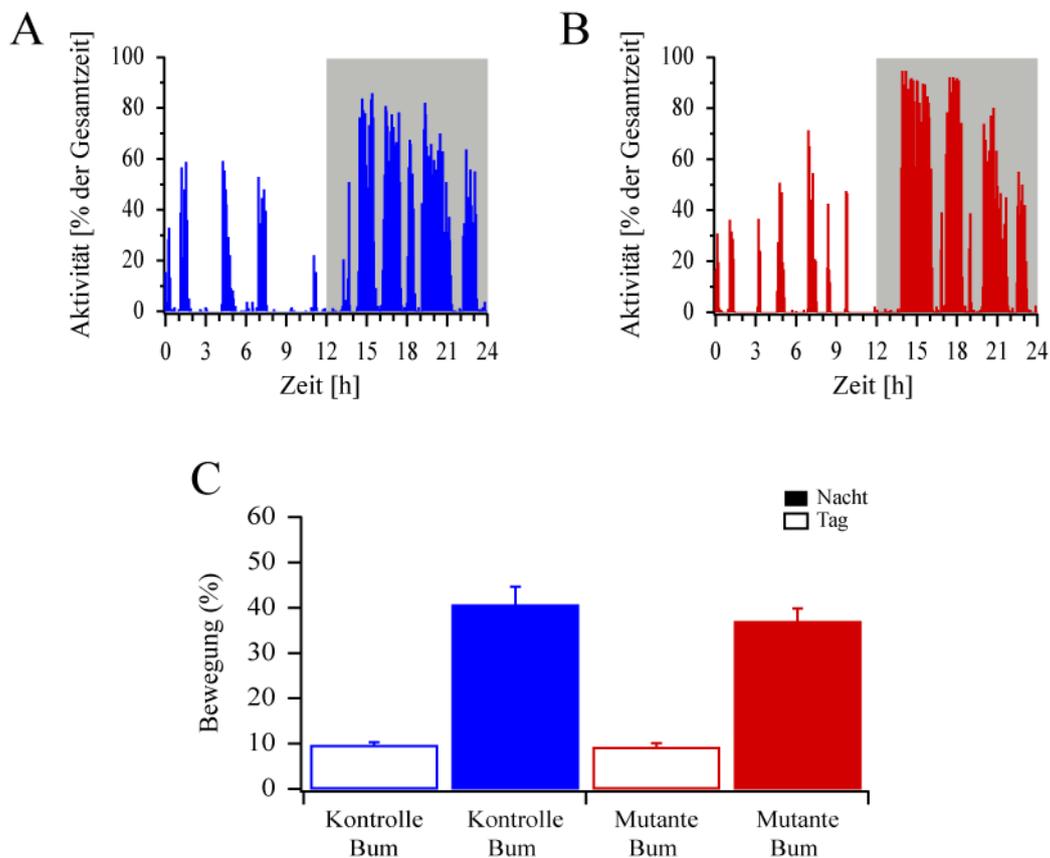


Abb. 27: Effekt einer einmal täglichen Bumetanid-Behandlung auf die Basalaktivität

Es sind exemplarische Aktivitätsmuster während einer 24 h-Periode bestehend aus 12 h Licht und 12 h Dunkelheit (grau hinterlegt) für eine Bumetanid-behandelte P-M2-Kontrolle (A) und Bumetanid-behandelte P-M2-Mutante (B) dargestellt. Die statistische Zusammenfassung der durchschnittlichen Basalaktivität während der 12 h-Intervalle ist in (C) abgebildet (Bumetanid-behandelte Kontrollen und Bumetanid-behandelte Mutanten $n=6$). Die einmal tägliche Injektion von Bumetanid verringert die Aktivität der P-M2-Mutanten auf das Niveau der behandelten Kontrollen. Fehlerbalken zeigen SEM.

Um das Erkundungs- und Vermeidungsverhalten der Mäuse zu untersuchen, wurde mit den gleichen Tieren ein *Open field*-Test durchgeführt. Mäuse vermeiden normalerweise das Betreten einer ihnen unbekannt, hell erleuchteten Freifläche, die ihnen keine Deckungsmöglichkeiten bietet. Werden sie dennoch in einer derartigen Umgebung ausgesetzt, wird sich ihre Aktivität zwischen Ängstlichkeit, Fluchtbereitschaft und Erkunden bewegen. Die Mäuse wurden für 15 Minuten mit 5 Minuten Vorlaufzeit in die *Open field*-Apparatur gesetzt, um sich an die neue Umgebung zu adaptieren. Die Parameter der zurückgelegten Wegstrecke, das Verhältnis von Bewegung zu Ruhe und die Zeit, die sich die Tiere im Zentrum aufhalten, wurden mit Hilfe eines Infrarot-Systems gemessen. Abb. 28 A und B

zeigen beispielhafte Laufmuster für eine Bumetanid-behandelte P-M2-Kontrolle und eine Mutante. Es ist zu erkennen, dass die Bumetanid-behandelten Tiere mit $106,4 \pm 14,8$ m etwas mehr liefen als die behandelten Kontrollen mit $99,0 \pm 23,4$ m, allerdings zeigte die Statistik im Vergleich (Abb. 28 C) keinen signifikanten Unterschied ($p=1$) in der zurückgelegten Strecke. Auch das Verhältnis von Bewegung zu Ruhe zeigte zwischen der Kontrollgruppe (Bewegung $66,2 \pm 5,3$ %, Ruhe $33,8 \pm 5,3$ %) und der Mutantengruppe (Bewegung $70,5 \pm 2$ %, Ruhe $29,5 \pm 2$ %) keine signifikante Differenz ($p=1$) (Abb. 28 D). Beide Mausgruppen mieden zum gleichen Grad die offene Fläche, die ihnen keine Versteckmöglichkeiten bot (Kontrollen $15 \pm 3,6$ %, Mutanten $13,3 \pm 2,8$ %). Dies spiegelte sich in der prozentualen Strecke wider, die die Tiere im Zentrum des *Open fields* zurücklegten (Abb. 28 E).

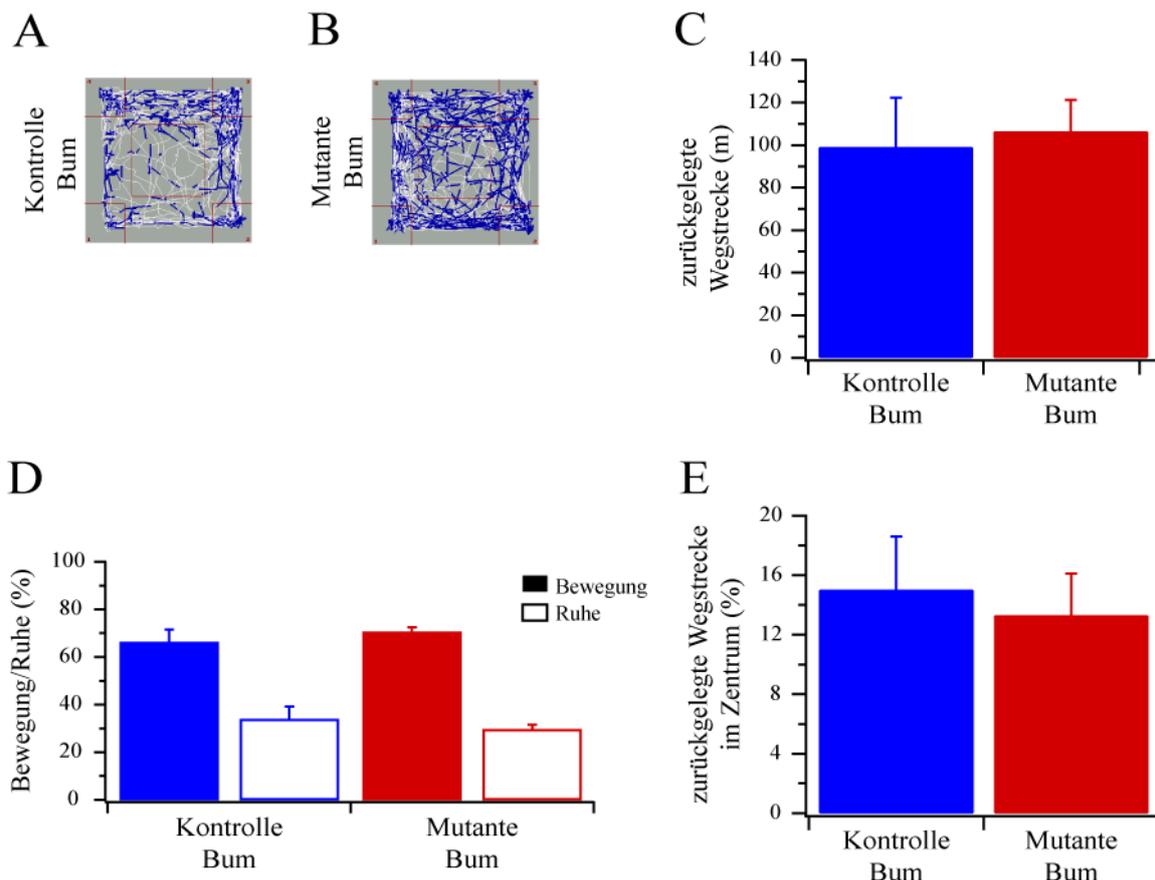


Abb. 28: Analyse des Verhaltens im *Open field*-Versuch nach einmal täglicher Bumetanid-Behandlung

Beispielhafte Aktivitätsmuster von 15 Minuten *Open field*-Experimenten von Bumetanid-behandelter Kontrolle (A) und Bumetanid-behandelter Mutante (B). Graphische Darstellung der zurückgelegten Entfernung (C), des Verhältnisses von Bewegung und Ruhe (D) und der Wegstrecke in der Mitte des *Open fields* (E) von 6 Bumetanid-behandelten Kontrollen und 6 Bumetanid-behandelten Mutanten. Die einmal tägliche Injektion von Bumetanid verringerte die ansonsten beobachtete Hyperaktivität. Fehlerbalken zeigen SEM.

Neben der Hyperaktivität waren morphologische Veränderungen im Hippocampus ein zweites Merkmal des Phänotyps der M-Kanal-defizienten Mäuse. In der CA1-Region war bei P-M2-Mutanten (n=5) eine Dispersion der Zellschicht zu erkennen. Zusätzlich bildete sich eine ektope Zellschicht unterhalb der CA1-Zellschicht (siehe Abb. 31 B) im Vergleich zu den Kontrollen (n=5) (siehe Abb. 31 A). Die CA1-Zellschicht der Bumetanid-behandelten Mutanten (n=5) wies keine ausgeprägte Zelldispersion auf. Auch war bei diesen Tieren keine zusätzlich ektope Zellschicht im Stratum lacunosum moleculare zu erkennen (siehe Abb. 31 C). Die einmal tägliche 14-tägige Behandlung mit Bumetanid minimierte also die morphologischen Veränderungen im Hippocampus der P-M2-Mutanten.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, war in diesem Mausmodell eine gesteigerte Immunantwort zu detektieren, die sich in einer erhöhten Astrozytenzahl im Hippocampus auszeichnete. Es ist zu erkennen, dass in den adulten Kontrolltieren (n=5) nur wenige GFAP-positive Zellen zu finden waren, wobei GFAP als Marker für Astrozyten dient (siehe Abb. 32 A). In den Mutanten (n=5) waren sehr viele GFAP-immunreaktive Zellen im gesamten Hippocampus zu finden (siehe Abb. 32 B). Im Hippocampus von Bumetanid-behandelten Mutanten (n=5) nahm die Anzahl der Astrozyten nach der Behandlung stark ab (siehe Abb. 32 C).

Die Immunantwort in den P-M2-Mutanten äußerte sich zusätzlich in der Aktivierung von Mikroglia, die durch die Färbung mit Isolectin B4 nachgewiesen werden konnte. In den adulten P-M2-Kontrollen (n=5) war im Hippocampus keine Aktivierung von Mikroglia zu beobachten (siehe Abb. 33 A). In den Mutanten (n=5) dagegen war eine intensive Färbung mit Isolectin im Bereich der CA1-Region und der Gyrus dentatus-Region zu finden (siehe Abb. 33 B). Die aktivierte Mikroglia in diesem Bereich lässt sich in den Mutanten durch die Bumetanid-Behandlung verringern, allerdings konnte die Behandlung den Nachweis aktivierter Mikroglia nicht auf Kontrollniveau reduzieren (siehe Abb. 33 C).

Aufgrund der immer noch vorhandenen, allerdings reduzierten Aktivierung des Immunsystems, die sich in der Zunahme aktivierter Mikroglia widerspiegelte, wurde getestet, ob eine Erhöhung der Bumetanid-Dosis auf zweimal täglich mit der Konzentration von 0,2 mg/kg eine weitere Verbesserung des Phänotyps bewirken würde. Für eine zweite Dosis statt einer höheren Einzeldosis sprach, dass das Bumetanid in humanen Neonaten eine

Halbwertszeit von 6-7 h besitzt¹³⁵. Der Kontrollgruppe und der Mutantengruppe wurden ab der Geburt für 14 Tage zweimal täglich Bumetanid injiziert. Zusätzliche Gruppen wurden nur mit dem Lösungsmittel (Vehikel) behandelt, um einen möglichen Effekt des täglichen Handlings auszuschließen. Zunächst wurde wieder die Basalaktivität der Mäuse in ihren Käfigen gemessen. In Abb. 29 A-D sind Beispiele für die Aktivitätsmuster einer Vehikel-behandelten Kontrolle und Mutante sowie einer Bumetanid-behandelten Kontrolle und Mutante abgebildet. Vehikel-behandelte Mutanten (n=10) wiesen besonders während der Dunkelphase eine ausgeprägte Hyperaktivität auf (Bewegung am Tag $17,2 \pm 3,5$ %, in der Nacht $49,5 \pm 3,2$ %) (Abb. 29 B und E). Auch während der Anfangszeit der Lichtphase zeigten diese Mutanten noch eine erhöhte Aktivität, wie im exemplarischen Aktivitätsmuster zu sehen ist. Die Vehikel- und Bumetanid-behandelten Kontrollen (jeweils n=10) hatten eine signifikant geringere Aktivität während der Dunkelphase (Abb. 29 A). Die Vehikel-behandelten Kontrollen bewegten sich am Tag $12,7 \pm 1,5$ % und in der Nacht $37,0 \pm 3,0$ % (Abb. 29 E). Bei den Bumetanid-behandelten Kontrollen waren es $8,9 \pm 1,4$ % Bewegung am Tag und $34,9 \pm 3,1$ % in der Nacht (Abb. 29 E). Die zweimal tägliche Behandlung der Mutanten mit Bumetanid (n=20) konnte die Aktivität während der Dunkelphase auf das Niveau der Kontrollgruppen senken ($11,4 \pm 0,7$ % am Tag und $31,9 \pm 1,8$ % in der Nacht) (Abb. 29 E). Diese Tiere verhielten sich in ihrer Basalaktivität nun wie die Vehikel-behandelten Kontrollen (Tag p=1, Nacht p=0,59).

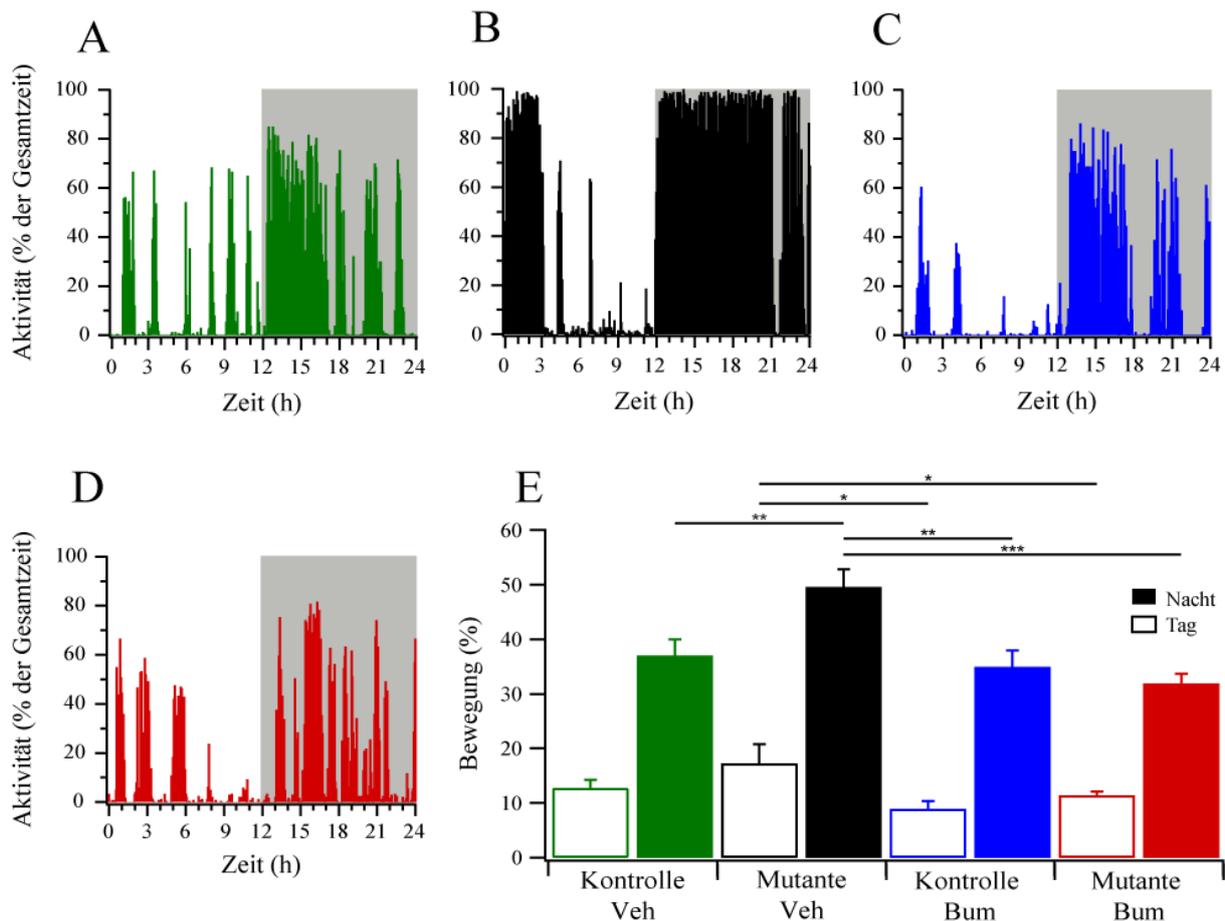


Abb. 29: Effekt von zweimal täglicher Bumetanid-Behandlung auf die Basalaktivität

Es sind exemplarische Aktivitätsmuster während einer 24 h-Periode bestehend aus 12 h Licht und 12 h Dunkelheit (grau hinterlegt) bei Vehikel-behandelten P-M2-Kontrollen (A), Vehikel-behandelten P-M2-Mutanten (B), zweimal täglich Bumetanid-behandelten Kontrollen (C) und Bumetanid-behandelten Mutanten dargestellt (D). Die statistische Zusammenfassung der durchschnittlichen Basalaktivität während der 12-h-Intervalle ist in (E) abgebildet (Vehikel-behandelte Kontrollen n=10, Vehikel-behandelte Mutanten n=10, Bumetanid-behandelte Kontrollen n=10, Bumetanid-behandelte Mutanten n=20). Die zweimal tägliche Injektion von Bumetanid verringerte die Aktivität der P-M2-Mutanten. Diese waren mit den Kontrollen vergleichbar. Fehlerbalken zeigen SEM. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

Als weiterer Verhaltenstest wurden wiederum *Open field*-Experimente durchgeführt. In Abb. 30 A-D sind Beispiele für das Laufmuster der Tiere aus den vier Gruppen dargestellt. Die Vehikel- (Abb. 30 A) und Bumetanid-behandelten Kontrollen (Abb. 30 C, jeweils n=10) bewegten sich in dem ihnen unbekanntem Gebiet meist entlang der äußeren Ränder und kreuzten das Zentrum des Feldes nur selten. Bei den Vehikel-behandelten Mutanten (Abb. 30 B, jeweils n=10) konnte die Hyperaktivität auch in diesem Versuch nachgewiesen werden. Sie zeigten ein stereotypes Verhalten, mieden nicht wie die Kontrolltiere das offene Zentrum,

sondern liefen in kreisförmigen Bahnen und kreuzten die Mitte des Feldes sehr häufig. Durch die zweimal tägliche Bumetanid-Behandlung konnte das Laufverhalten der Mutanten an das der Kontrollen angepasst werden (Abb. 30 D). In Abb. 30 E ist zu sehen, dass die Vehikel-behandelten Mutanten mit $167,5 \pm 19$ m fast doppelt so viel wie die Vehikel-behandelte Kontrollen ($90,2 \pm 15,9$ m) und die Bumetanid-behandelte Kontrollen ($72,6 \pm 4,4$ m) liefen. Die Strecke, die die Bumetanid-behandelten Tiere zurücklegten, reduzierte sich auf $94,9 \pm 7,6$ m. Das hyperaktive Verhalten der Vehikel-behandelten Mutanten spiegelte sich auch in ihrem Verhältnis von Bewegung zu Ruhe wider (Abb. 30 F). Die Vehikel-behandelten Mutanten bewegten sich $82,5 \pm 1,0$ % der Gesamtzeit und ruhten $17,5 \pm 1,0$ %. Die Vehikel-behandelten Kontrollen bewegten sich mit $71,3 \pm 4,2$ % der Zeit signifikant weniger und ruhten mit $28,7 \pm 4,2$ % mehr als die Mutanten. Die Bumetanid-behandelten Kontrollen besaßen ein Verhältnis von Bewegung zu Ruhe von $69,3 \pm 2,5$ % zu $30,8 \pm 2,6$ % der Zeit. Eine Reduktion der Aktivität konnte auch für diesen Parameter in den Bumetanid-behandelten Mutanten beobachtet werden. Die Bewegungszeit der Tiere konnte signifikant auf $74,4 \pm 1,7$ % reduziert werden und die Ruhezeit stieg auf $25,1 \pm 1,7$ % an. Wie in Abb. 30 G zu sehen ist, legten die Mutanten durch die Bumetanid-Behandlung mit $19,3 \pm 1,8$ % einen signifikant geringeren Teil der Gesamtstrecke im Zentrum als die Vehikel-behandelten Mutanten ($28,3 \pm 2,6$ %) zurück und wiesen auch bei diesem Parameter ein ähnliches Verhalten wie die Vehikel-behandelten Kontrollen ($22,3 \pm 4,5$ %) auf. Kontrollen, die mit Bumetanid behandelt wurden, fielen durch eine zusätzliche Reduktion ihrer Aktivität auf ($12,4 \pm 1,8$ %, $p=0,04$). Die zweimal tägliche Behandlung der Tiere mit $0,2$ mg/kg Bumetanid führte zu einer Verringerung der Spontanaktivität sowohl in den Kontrollen als auch den Mutanten. In den Mutanten konnte somit die Hyperaktivität durch die Behandlung unterbunden werden.

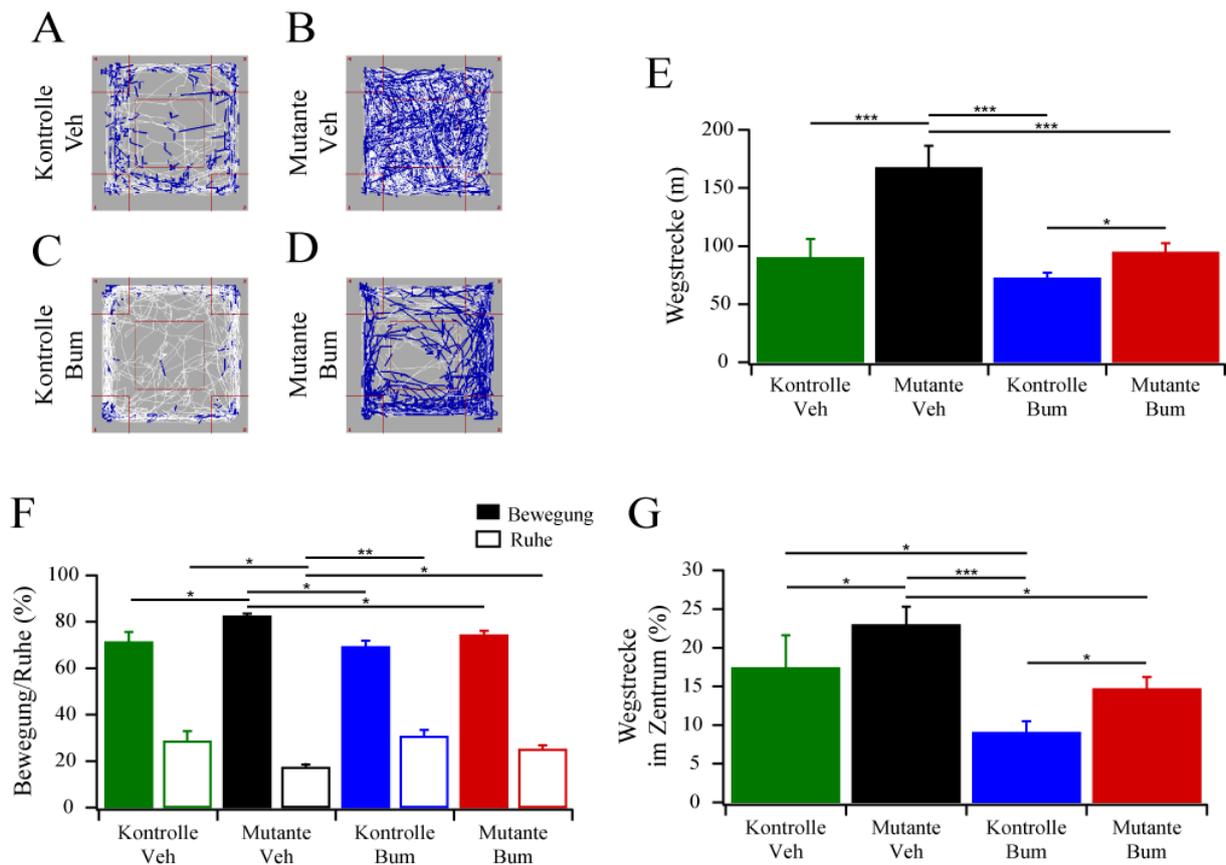


Abb. 30: Analyse des Verhaltens im *Open field*-Versuch

Beispielhafte Aktivitätsmuster von 15 Minuten *Open field*-Experimenten von Vehikel-behandelter Kontrolle (A), Vehikel-behandelter Mutante (B), zweimal täglich Bumetanid-behandelter Kontrolle (C) und Bumetanid-behandelter Mutante (D). Graphische Darstellung der zurückgelegten Entfernung (E), des Verhältnisses von Bewegung und Ruhe (F) und der Wegstrecke in der Mitte des *Open fields* (G) von 10 Vehikel-behandelten Kontrollen, 10 Vehikel-behandelten Mutanten, 10 Bumetanid-behandelten Kontrollen und 20 Bumetanid-behandelten Mutanten. Die zweimal tägliche Injektion von Bumetanid verringert die ansonsten beobachtete Hyperaktivität. Fehlerbalken zeigen SEM. (*: $P < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

Um zu untersuchen, ob die zweimal tägliche Bumetanid-Behandlung auch einen positiven Effekt auf die morphologischen Veränderungen in den Mutanten besitzt, wurden an koronalen Schnitten adulter Tiere Nissl-Färbungen durchgeführt. In Abb. 31 sind Beispiele für die Morphologie im Hippocampus aufgeführt. In Abb. 31 A ist ein Bild des Hippocampus einer Vehikel-behandelten Kontrollmaus dargestellt (n=5). Der Hippocampus in Abb. 31 B zeigt die typische Zelldispersion der CA1-Zellschicht und die darunterliegende ektope Zellschicht einer Vehikel-behandelten Mutante (n=5). Wie in Abb. 31 D zu erkennen ist, ließ sich durch die zweimal tägliche Behandlung der Mutanten mit Bumetanid (n=5) die Zelldispersion und die ektope Zellschicht in den Mutanten verhindern, so dass sie die gleiche normale Morphologie im Hippocampus besaßen wie die Kontrolltiere.

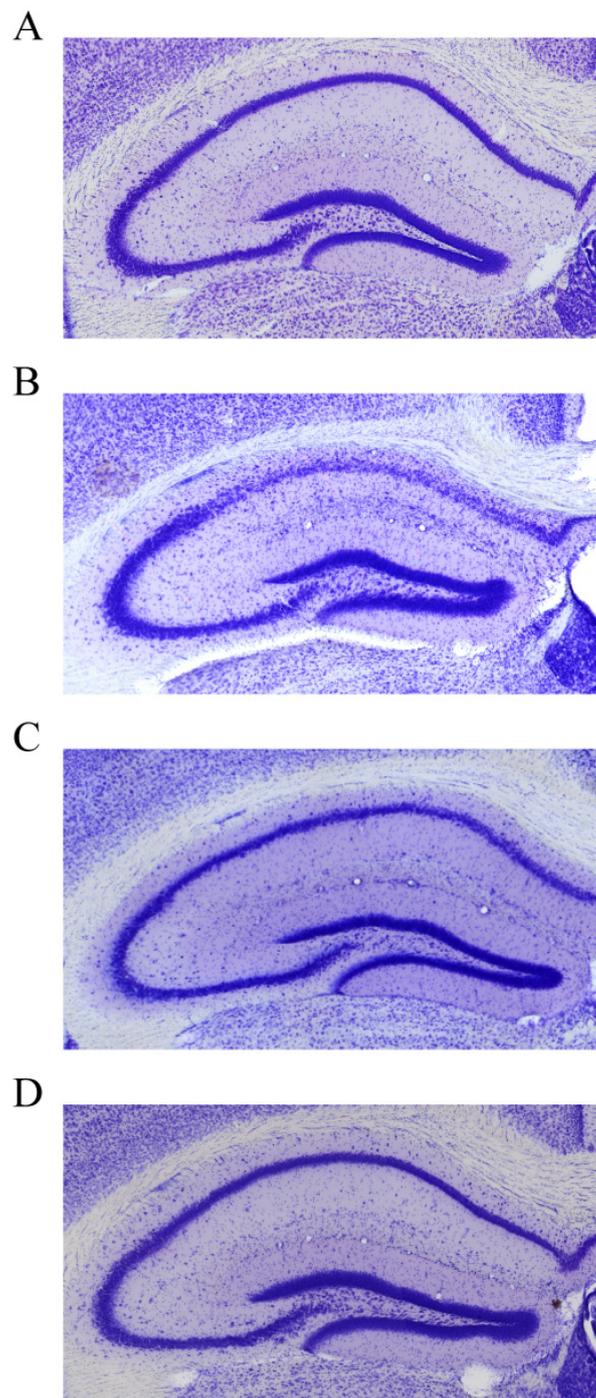
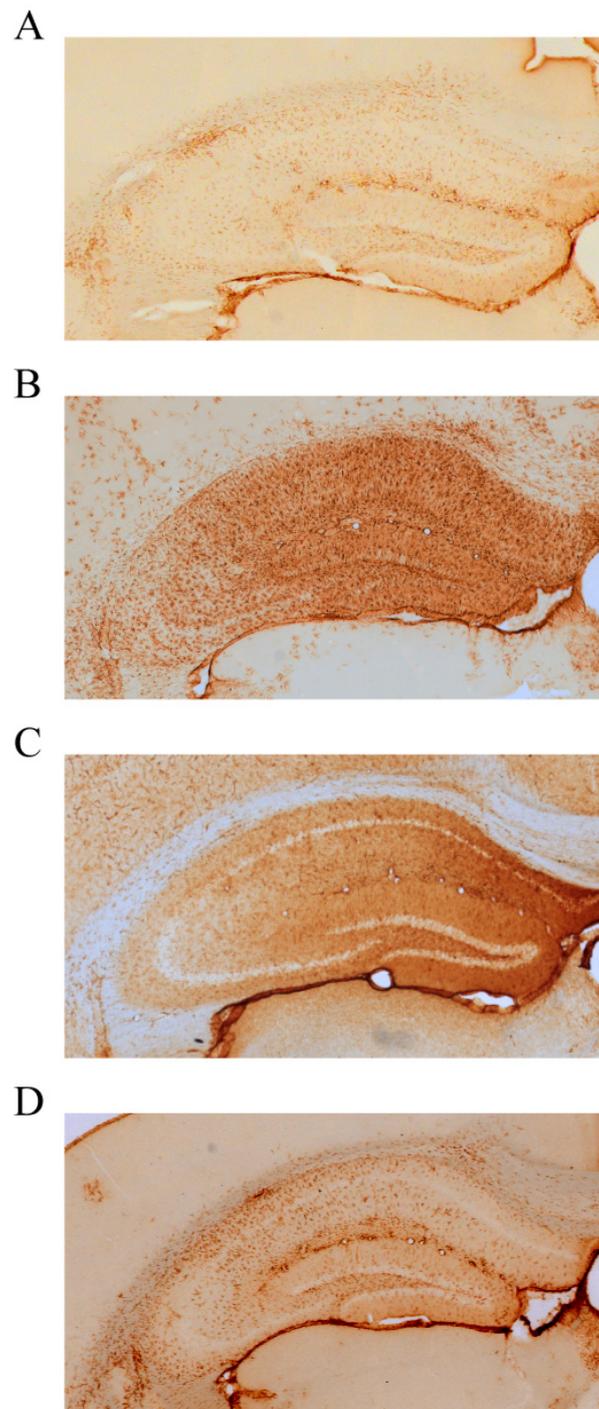


Abb. 31: Morphologische Untersuchung des Hippocampus anhand der Nissl-Färbung

Es sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen koronaler Hirnschnitte einer adulten Vehikel-behandelten Kontrolle (A), Vehikel-behandelten Mutante (B), einmal täglich Bumetanid-behandelten Mutante (C) und zweimal täglich Bumetanid-behandelten Mutante (D) abgebildet, die nach der Nissl-Färbung gefärbt wurden. Vehikel-behandelte Mutanten (n=5) wiesen im Vergleich zu den Kontrollen (n=5) eine Zelldispersion der CA1-Zellschicht sowie eine ektopische Zellschicht auf. Durch die ein- und zweimal tägliche 0,2 mg/kg Bumetanid-Behandlung konnten die morphologischen Veränderungen in den Mutanten verhindert werden (jeweils 5 Tiere).

Die erhöhte Zahl an Astrozyten in den Vehikel-behandelten Mutanten (n=5), konnte durch die zweimal tägliche Behandlung der Mutanten mit Bumetanid (n=5) ebenfalls wie bei einmal täglicher Behandlung gesenkt werden, so dass sie mit den Vehikel-behandelten Kontrollen vergleichbar war (Abb. 32).

In den Vehikel-behandelten Mutanten war eine erhöhte Anzahl aktivierter Mikroglia zu detektieren (n=5) (Abb. 33 B). Die einmal tägliche Behandlung der Mutanten könnte eine Verringerung der aktivierten Mikroglia bewirken (Abb. 33 C), allerdings war im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Kontrollen (n=5) (Abb. 33 A) noch aktivierte Mikroglia im CA1-Bereich und in der Gyrus dentatus-Region zu finden. Im Hippocampus zweimal täglich behandelte Mutanten (n=5) (Abb. 33 D) konnte die Menge aktivierter Mikroglia, die mit Isolectin B4-Färbung nachgewiesen werden konnte, vollständig reduziert werden. Durch diese zweimal tägliche Bumetanid-Behandlung konnten die Mutanten auf das Niveau der Vehikel-behandelten Kontrollen gebracht werden und somit konnte ein Dosiseffekt gezeigt werden.

**Abb. 32: Immunhistochemischer Nachweis von GFAP**

Dargestellt sind Abbildungen der Proteinexpression des *glial fibrillary acid protein* (GFAP), die mit Hilfe eines anti-GFAP-Antikörpers mit der DAB-Methode in koronalen Schnitten einer adulten Vehikel-behandelten P-M2-Kontrolle (A), Vehikel-behandelten P-M2-Mutante (B), einmal täglich Bumetanid-behandelten P-M2-Mutante (C) und zweimal täglich Bumetanid-behandelten P-M2-Mutante (D) nachgewiesen wurde. In den adulten P-M2-Mutanten (n=5) war eine starke Immunreaktivität im gesamten Hippocampus zu sehen, die in den Kontrolltieren (n=5) nicht zu finden war. In den behandelten adulten P-M2-Mutanten (n=5) verringerte das Bumetanid die Zahl der Astrozyten.

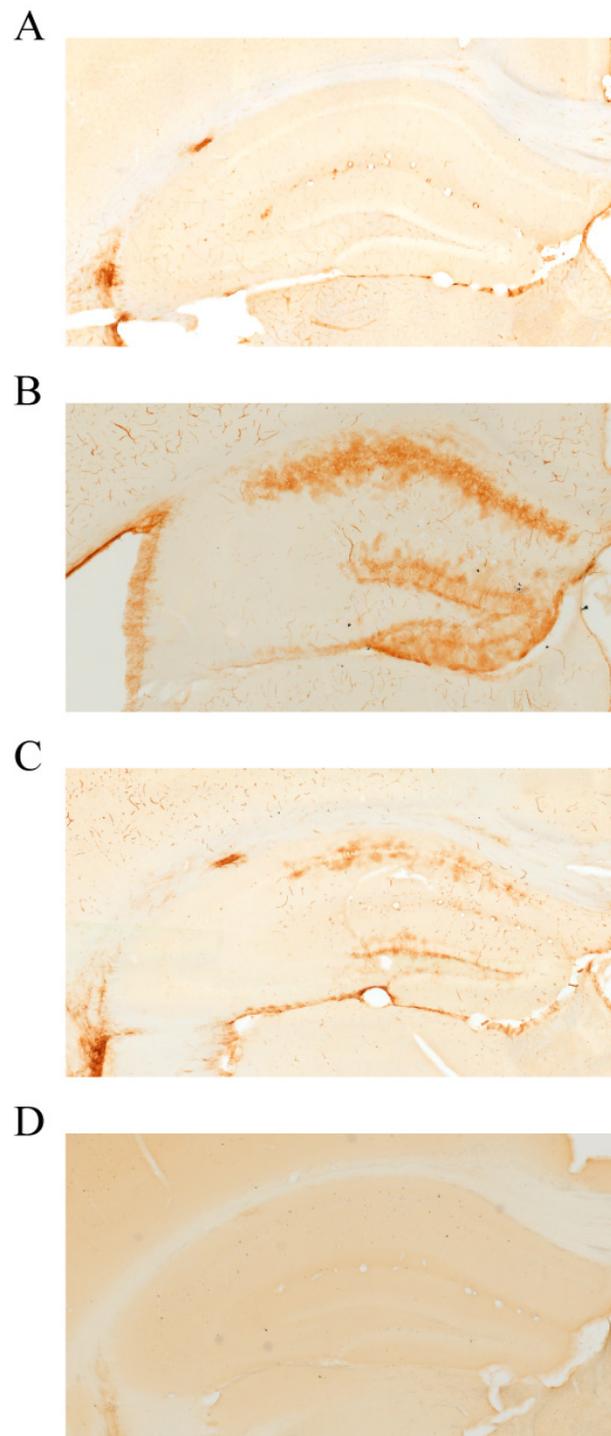


Abb. 33: Färbung für aktivierte Mikroglia mit Isolectin B4

Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen koronaler Hirnschnitten einer adulten Vehikel-behandelten P-M2-Kontrolle (**A**), Vehikel-behandelten P-M2-Mutante (**B**) und einmal (**C**) sowie zweimal (**D**) täglich Bumetanid-behandelten P-M2-Mutante. Färbung für Isolectin B4, ein Marker für aktivierte Mikroglia war im Hippocampus von adulten P-M2-Kontrollen nicht zu sehen. Adulte P-M2-Mutanten wiesen eine intensive Färbung für Isolectin B4 in der CA1-Region und im Gyrus dentatus auf. In den einmal täglich Bumetanid-behandelten Mutanten war eine Verminderung an aktivierter Mikroglia zu detektieren, während durch die zweimal tägliche Behandlung eine vollständige Unterdrückung der Aktivierung der Mikroglia erreicht werden konnte. (je 5 Tiere)

Die zweimal tägliche Behandlung der Mutanten mit 0,2 mg/kg Bumetanid konnte den Phänotypen der M-Kanal-defizienten Mäuse in allen getesteten Parametern verbessern, so dass die Bumetanid-behandelten Mutanten mit den Vehikel-behandelten Kontrollen vergleichbar waren. Zusätzlich konnte ein Dosiseffekt der Behandlung beim Nachweis aktivierter Mikroglia nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte zusammenfassend eine mit Epilepsie assoziierte verstärkte Immunantwort aufgedeckt werden, die sich in Astrogliose und einer erhöhten Zahl aktivierter Mikroglia zeigte. Messungen des neonatalen Netzwerks im Kortex und Hippocampus enthüllten *Spindle Bursts* und *Sharp Waves* als dominierende elektrische Aktivitätsmuster. M-Kanal-defiziente Neonaten zeigten ein erhöhtes Auftreten der *Spindle*-Ereignisse im Kortex, die durch akute Bumetanid-Behandlung reduziert werden konnte. Die Verringerung der intrazellulären Chlorid-Konzentration während der neonatalen Phase konnte den Phänotyp der M-Kanal-Defizienz verhindern.

5. Diskussion

5.1. Molekularbiologische und proteinbiochemische Charakterisierung des M-Strom-defizienten Mausmodells

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zur Aufklärung der Pathomechanismen von M-Kanaldefizienz beizutragen und mögliche neue Angriffspunkte für Medikamente aufzudecken. Hierzu wurde ein Mausmodell mit supprimiertem M-Strom verwendet, das einen epileptischen Phänotyp infolge transgener Expression einer *KCNQ2*-Mutation zeigt¹, um vergleichende Transkriptomanalysen durchzuführen. Mit Hilfe von Affymetrix GeneChip Arrays wurde nach Genen gesucht, die bereits während der Epileptogenese und später während der chronischen Phase der Epilepsie differentiell exprimiert waren.

Der Hippocampus der Mutanten dieses Epilepsiemodells zeigte morphologische sowie elektrophysiologische Veränderungen. Er ist auch bei TLE-Patienten häufig durch Ammonshornsklerose betroffen, die histopathologisch durch Zelluntergang im Hippocampus mit begleitender reaktiver Astrozytose gekennzeichnet ist. Daher wurden isolierte Hippocampi von fünf Kontrollmäusen und je fünf Mutanten der zwei transgenen Mauslinien P-M2 und P-M2/1 für die Analyse verwendet.

Es wurden während der Epileptogenese in den P-M2-Mutanten 62 signifikant differentiell regulierte Transkripte mit einer mindestens 1,5-fachen Expressionsänderung gefunden. In den P-M2/1-Mutanten waren 347 Transkripte differentiell reguliert. In der chronischen Epilepsie wurden bei den P-M2-Tieren 17 differentiell regulierte Transkripte und bei den P-M2/1-Tieren 56 differentiell regulierte Transkripte detektiert. Die P-M2/1-Mutanten, die das Transgen stärker exprimierten, zeigten eine höhere Anzahl differentiell exprimierter Transkripte. Die Zahl der differentiell regulierten Transkripte während der Epileptogenese war für P-M2- und P-M2/1-Mutanten höher als während der chronischen Phase. Ein Grund für die geringere Zahl, die in den adulten Tieren gefunden wurde, könnte in dem verwendeten

Array-Set liegen. Auf dem *Murine Genome U74 Set* waren anstatt der 36000 Transkripte aufgrund von Fehlern in der UniGene U74 Datenbank, die für den Aufbau des *Murine Genome U74 Set* verwendet wurde, effektiv nur 6000 bekannte Transkripte und 6000 ESTs vorhanden. Außerdem kann die höhere Zahl an differentiell regulierten Transkripten während der Epileptogenese durch mehr Veränderungen und damit mehr Unterschiede während der Entwicklung der Tiere generell und speziell während der Entwicklung und Etablierung der Epilepsie erklärt werden¹³⁶.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mausmodell mit dem genetisch suprimierten M-Strom zeigte im Vergleich zu anderen chemisch oder elektrisch induzierten Epilepsiemodellen einen milderen Phänotyp. Möglicherweise spiegeln sich die geringeren phänotypischen Veränderungen auch auf molekularer Ebene in geringeren Veränderungen wider.

In den M-Kanal-defizienten Mäusen wurden die mit Epilepsie assoziierten Gene Aquaporin 4 (*Ap4*), Galanin (*Gal*), Neuropeptid Y (*NpY*) als hochreguliert detektiert. Der im Gehirn prädominante Wasserkanal Ap4 ist nur in sklerotischen Hippocampi von Patienten mit medizinisch nicht behandelbarer TLE, aber nicht in behandelbaren Patienten erhöht¹³⁷. Die erhöhte Expression von Ap4 könnte zum Verlust der Ionen- und Wasserhomöostase in den sklerotischen Hippocampi führen. Die Reduktion der Aq4-Funktion könnte daher eine neue therapeutische Möglichkeit bieten.

Galanin, ist ein Neuropeptid, das die Freisetzung von Glutamate im Hippocampus inhibiert und damit zu den Mitgliedern der antikonvulsiven Peptidfamilie gezählt wird. Die intrahippocampale Administration von Galanin unter Bedingungen des Kindling-Epilepsiemodells zeigte antikonvulsive Effekte¹³⁸. Die erhöhte Expression von Galanin in den Mutanten könnte ein Hinweis auf einen kompensatorischen Mechanismus sein.

NpY wurde während der Epileptogenese hochreguliert und in der chronischen Phase herunterreguliert. *In vitro* wurde beobachtet, dass das Applizieren des Peptids NpY auf Hirnschnitte im Hippocampus selektiv die synaptische Erregung durch Glutamat-Freisetzung reduziert¹³⁹⁻¹⁴¹. Mit Hilfe eines Gentherapie-Ansatzes konnte in einem Rattenmodell für TLE die Progression der Anfälle reduziert werden und dieser Effekt war mit der NpY-Überexpression im Hippocampus korreliert¹⁴². Diese Daten weisen darauf hin, dass die Gentherapie eine Strategie wäre, um Anfälle zu reduzieren und bieten damit eine vielversprechende therapeutische Strategie. Der Befund, dass *NpY* während der Epileptogenese hochreguliert wurden, deutet daraufhin, dass körpereigene Mechanismen der

Epileptogenese entgegenwirken. Im Gegensatz dazu war *NpY* herunterreguliert, wenn die Epilepsie in der chronischen Phase etabliert war.

Die Immunantwort war ein prominent veränderter Prozess, der während der chronischen Phase gefunden wurde. Obwohl wenig über eine mögliche Rolle des Immunsystems und der Inflammation bei der Entstehung und Chronifizierung von Epilepsie bekannt ist, ist es wahrscheinlich, dass inflammatorische Reaktionen im Gehirn einige der molekularen und strukturellen Veränderungen vermitteln, die mit Anfallsaktivität verbunden sind. Ihre mögliche klinische Rolle deutet sich durch die teilweise Effektivität immunmodulatorischer Behandlung mittels Steroiden oder intravenöser Gabe von Immunglobulinen, in einigen besonders schweren Fällen chronischer Epilepsie an^{143, 144}.

Das im Hippocampus hochregulierte GFAP, ein wichtiges Intermediärfilament, konnte in der Immunhistochemie adulter, aber auch schon in P14 alten Schnitten von Mutanten nachgewiesen werden. GFAP ist die Hauptkomponente der glialen Narbenbildung (Gliose), bei der die Expression als Reaktion auf eine Reihe von Hirnverletzungen, von physikalischen Traumata bis Multiple Sklerose, gesteigert ist^{145, 146}. Obwohl die Gliose ein Schutzmechanismus des Körpers ist und den Heilungsprozess im Nervensystem startet, kann sie Neurodegeneration fördern. Es werden viele Moleküle von den bei reaktiver Astroglie in das Gewebe einwandernden Zellen sezerniert, welche die komplette physikalische und funktionelle Regeneration des zentralen Nervensystems behindern. Eine zelluläre Hauptkomponente der Gliose sind reaktive Astrozyten. Die Astrozyten durchlaufen nach einer Verletzung morphologische Veränderungen und synthetisieren vermehrt GFAP. GFAP erlaubt Astrozyten, mehr Zytoskelett-unterstützende Strukturen zu synthetisieren und Pseudopodia zu vergrößern. Die Astrozyten formen ein dichtes Netz ihrer Plasmamembran-Extensionen, die den leeren Raum füllen, der durch tote oder sterbende neuronale Zellen entsteht. Dieser Prozess wird Astroglie genannt.

Der zweithäufigste Zelltyp der Gliose sind die Mikroglia. Sie sind das Analog des Nervensystems zu den Makrophagen des Immunsystems. Mikroglia werden schnell um verletzte Regionen aktiviert und sezernieren Zytokine, bioaktive Lipide, Gerinnungsfaktoren und neurotrophe Faktoren. Die biologisch aktiven Moleküle, die von der Mikroglia sezerniert werden, stimulieren und rekrutieren Endothelzellen und Fibroblasten. Diese Zellen fördern Angiogenese und die Sekretion von Kollagen in den verletzten Bereichen. In der Immunhistochemie konnte aktivierte Mikroglia in den adulten Mutanten nachgewiesen werden. Die Aktivierung der Mikroglia in der CA1-Region korreliert mit den

morphologischen Veränderungen die in den Mutanten gefunden wurden. Eine Aktivierung der Mikroglia war in den neonatalen Mutanten während der Epileptogenese jedoch nicht zu finden.

Weil GFAP spezifisch in Astrozyten exprimiert wird, könnte man annehmen, dass die Astrozyten die Stressantwort initialisieren, reaktiv werden und anschließend die Mikroglia aktiviert werden. Unterstützt wird diese Annahme durch das Auffinden von aktivierter Mikroglia in Hirnschnitten adulter Mutanten in der Immunhistochemie und dem Befund, dass aktivierte Mikroglia in den jungen P14 Mäusen nicht zu finden war. Daraus lässt sich schließen, dass die Immunantwort während der Epileptogenese der P14 alten Mutanten schon begonnen hat, aber noch nicht so weit fortgeschritten ist wie in den adulten Tieren mit chronischer Epilepsie.

Die Analyse der Affymetrix-Experimente zeigte, dass die Untereinheiten der GABA_A-Rezeptoren Gabra1-3, 6, Gabrb2-3 und Gabrg1-3 in den adulten mutanten Mauslinien eine schwache Herunterregulation auf RNA-Ebene zeigten. Dies kann durch eine Abnahme der Rezeptoren pro Zelle oder der Zellzahl erklärt werden. Epilepsie ist eine Krankheit, bei der die Balance zwischen synaptischer Erregung und Inhibition gestört ist. Die Erregung kann sich ausbreiten und immer größer werdende Zellpopulationen aktivieren. Der Grund dafür kann entweder eine pathologisch erhöhte Exzitation oder eine pathologisch verminderte Inhibition sein. Bei der Inhibition spielt der Transmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) als der dominierende inhibitorische Transmitter im adulten Gehirn eine wichtige Rolle. Die Hypothese, dass fehlende GABAerge Inhibition ein Grund für Epilepsie sein könnte, wurde schon 1963 durch pharmakologisches Auslösen von Krampfanfällen durch GABA_A-Rezeptor-Antagonisten wie Penicillin, Pikrotoxin oder Bicucullin aufgestellt¹⁴⁷. Um eine mögliche Verschiebung der Balance zu mehr Exzitation durch geringere Inhibition zu überprüfen, wurde die Zahl GABAerger hippocampaler Interneurone in M-Kanal-defizienten Mutanten mit der Zahl in Kontrollen verglichen. Dabei wurden die Interneurone aufgrund ihrer chemischen Marker in vier Untergruppen (Parvalbumin-, Calbindin-, Calretinin- und Somatostatin-positive Interneurone) unterteilt.

In Zusammenhang mit Epilepsie wurde eine Verringerung der Parvalbumin-reaktiven Zellen von 70-97 % gefunden¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. In der vorliegenden Arbeit konnte in dem M-Kanal supprimierenden Mausmodell keine Veränderung in der Anzahl Parvalbumin-positiver Interneurone detektiert werden. Dies war weder in der gesamten Hippocampusformation noch bei Unterteilung in CA1-, CA3- und Gyrus dentatus-Region der Fall.

Die Zahl der Calbindin-positiven Neuronen im Hippocampus der Mutanten war ebenfalls nicht verändert. Dies steht in Einklang mit anderen Arbeiten, die zeigen konnten, dass Calbindin-positive Interneurone in der humanen CA1- und Gyrus dentatus-Region resistent gegen Zelltod sind, der durch Epilepsie ausgelöst wird¹⁵¹. Ebenfalls konnte dies in Tiermodellen beobachtet werden¹⁵²⁻¹⁵⁶.

In Zusammenhang mit Epilepsie wurde eine Reduktion der Neuronen gefunden, die für Calretinin immunpositiv sind¹⁵⁰. Eine Reduktion in dieser Interneuronen-Untergruppe konnte in dem vorliegenden Epilepsiemodell nicht nachgewiesen werden.

Dasselbe Ergebnis ergab sich auch für Somatostatin-positive Interneuronen. Hierfür sind in der Literatur allerdings Hinweise zu finden, dass Epilepsie zu einem pathologischen Verlust von Somatostatin-positiven Neuronen führt¹⁵⁷⁻¹⁶⁰.

Eine Veränderung der Interneuronenzahl und damit eine Verschiebung der Balance zu mehr Erregung, scheint daher in diesem Mausmodell kein Grund für den epileptischen Phänotyp zu sein. Die Funktion der Interneuronen kann allerdings auf verschiedenen Ebenen gestört sein. Zum Beispiel kann eine veränderte Morphologie oder molekulare Zusammensetzung postsynaptischer GABA_A-Rezeptoren zu einer unterschiedlichen Wirkung von GABAerger Inhibition führen. Interessanterweise konnte neben einer verringerten Inhibition auch eine gesteigerte Inhibition in epileptischen Gewebe gezeigt werden¹⁶¹⁻¹⁶⁴. Daher kann ohne grundlegendes Wissen der molekularen und zellulären Grundlagen der erhöhten Aktivität bei Epilepsie keine sichere Voraussage der Richtung der Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Erregung und Inhibition gemacht werden.

5.2. *In vitro* und *in vivo* Charakterisierung neonataler Netzwerke

Elektrophysiologische Untersuchungen adulter CA1-Pyramidenzellen M-Kanal-defizienter Mäuse haben eine Verringerung des M-Stroms und damit eine erhöhte Erregbarkeit aufgezeigt. Peters *et al.* haben gezeigt, dass die Expression des funktionellen M-Stroms auch wichtig für eine normale Hirnentwicklung ist¹. Um zu überprüfen, ob der M-Strom in neonatalen Mutanten schon reduziert ist und ob sich eine solche Reduktion in der Erregbarkeit der Neurone widerspiegelt, wurden Spannungsklemmen-Ableitungen in akuten Hirnschnitten durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der M-Strom bereits in neonatalen Mutanten reduziert ist. Die Verringerung des M-Stroms machte die CA1-Pyramidenzellen der Mutanten übererregbar. Sie antworteten auf depolarisierende Strominjektionen mit einer gesteigerten Anzahl an Aktionspotentialen. Die Suppression des M-Stroms führte in den mutanten

Neonaten demnach zu einer erhöhten zellulären Erregbarkeit *in vitro*, die mit der in adulten M-Kanal-defizienten Mäusen beschriebenen vergleichbar ist. Es konnte in der vorliegenden Arbeit außerdem gezeigt werden, dass diese von einer Zunahme der neuronalen Aktivität *in vivo* begleitet wurde, wie mit c-fos-Immunhistochemie in Schnitten von Mutanten nachgewiesen werden konnte. Die Zunahme an c-fos-positiven Zellen war besonders in der CA1-Region des Hippocampus zu finden. Dies korrelierte mit der elektrophysiologischen Übererregbarkeit und den morphologischen Veränderungen in diesem Bereich.

Von den korrelierten Aktivitätsmustern wird generell angenommen, dass sie für die richtige Entwicklung der zentralen Nervenstrukturen wichtig sind^{131, 165-167}. Weil die frühe postnatale Periode für die aktivitätsabhängige Reifung der synaptischen Verbindungen in den kortikalen Strukturen der Ratte kritisch ist¹⁶⁶⁻¹⁶⁸, ist es wichtig, die physiologischen Muster und pathologischen Veränderungen in diesen Strukturen *in vivo* aufzuklären. Um das neonatale Netzwerk in Kontrollmäusen und übererregbaren, M-Strom defizienten Mäusen zu vergleichen, wurde diese ebenfalls *in vivo* untersucht.

Das dominierende Muster elektrischer Aktivität im neonatalen Ratten-Neokortex *in vivo* sind *Spindle Bursts*^{128, 169}. Sie sind im intakten somatosensorischen und visuellen Kortex von neugeborenen Ratten *in vivo* die ersten und einzigen organisierten Netzwerkstruktur. *Spindle Bursts* sind örtlich begrenzte *Spindle*-geformte Oszillationen im Alpha-Beta-Frequenzbereich, die mit Phasen-gelockten neuronalen Feuern und Aktivierung von glutamatergen und GABAergen Synapsen assoziiert sind. *Spindle Bursts* setzen sich aus selbstorganisierenden Mustern zusammen, die auch nach Deafferenzierung des Kortex noch bestehen bleiben und durch pharmakologische Aktivierung von NMDA-Rezeptoren sogar in der Akutschnittpräparation induziert werden können¹⁷⁰.

Im visuellen System sind frühe Entwicklungsstadien durch die Anwesenheit spontaner Wellen von Aktivität in der Retina charakterisiert, bevor diese auf Licht reagieren kann. Mit Hilfe von gleichzeitigen Ableitungen der Ratten-Retina und des visuellen Kortex während der ersten postnatalen Woche *in vivo* konnte gezeigt werden, dass spontane retinale Wellen auf den sich entwickelnden visuellen Kortex übertragen werden und dort die dominierenden endogenen oszillatorischen Muster von *Spindle Bursts* auslösen¹²⁸. Das Blockieren der Ausbreitung der retinalen Aktivität oder das Entfernen der Retina konnte die Frequenz reduzieren, aber nicht die kortikalen *Spindle Bursts* vollständig verhindern.

In der Literatur ist über das *in vivo* Netzwerkstruktur neonataler Mäuse nichts beschrieben. Ein möglicher Grund ist, dass die *in vivo* Elektrophysiologie in Neonaten eine junge Methode ist.

Zum anderen sind neonatale Mäuse deutlich kleiner und schwieriger abzuleiten als neonatale Ratten. In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Netzwerkstruktur im Kortex und Hippocampus von Mäusen im Alter von 5-7 Tagen gemessen. Es konnte ein mit dem für neonatale Ratten beschriebenes vergleichbares Netzwerkstruktur gefunden werden. Die sporadisch auftretenden Netzwerkentladungen waren durch lange Ruheperioden getrennt und Multiunit-Entladungen waren mit *Spindle*-Feldoszillationen assoziiert. Das in den übererregbaren M-Kanal-defizienten Mäusen gefundene Netzwerkstruktur war mit dem der Kontrollmäuse vergleichbar. Es unterschied sich allerdings in einer häufigeren Frequenz des Auftretens und einer höheren Amplitude.

Die Netzwerkmechanismen, die der Entstehung der kortikalen *Spindle Bursts* zugrunde liegen, sind kaum aufgeklärt. Es wurden einige Muster korrelierter, neuronaler Aktivität in postnatalen, akuten Schnitten aus dem Neokortex und Hippocampus postnataler Ratten beschrieben, die einige Gemeinsamkeiten mit den *Spindle Bursts in vivo* besitzen. Zu nennen sind hier neuronale durch *Gap Junction* synchronisierte Domänen¹⁷¹⁻¹⁷³, Calcium-Wellen^{174, 175}, *Gap Junction*- und NMDA-Rezeptor-basierte cholinerge Oszillationen¹⁷⁰, *Giant-depolarizing Potentials* (GDPs) und frühe Netzwerkoszillationen, die durch glutamaterge exzitatorische GABAerge Synapsen angetrieben werden¹⁷⁶⁻¹⁸². Mit Hilfe von pharmakologischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Entstehung der *Spindle Bursts* in erster Linie auf glutamatergen Synapsen beruhen, wobei AMPA-Rezeptoren eine größere und NMDA-Rezeptoren und *Gap Junctions* eine geringere Rolle spielen. Außerdem sind GABAerge Synapsen nicht direkt an Oszillationen beteiligt, obwohl sie eine wichtige Rolle in der örtlichen Kompartimentierung durch umgebene Inhibition spielen¹⁸³. Die Blockade von GABA_A-Rezeptoren zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Frequenz der Oszillation. Daher scheinen GABAerge Interneurone eine geringe Rolle bei der Kontrolle der Frequenz der Oszillationsrhythmen zu spielen. Dies steht im Kontrast zum adulten Gehirn, wo die Hauptmuster der Aktivität signifikant durch Interneurone beeinflusst werden¹⁸⁴.

Das frühe humane EEG ist durch hohe diskontinuierliche zeitliche Organisation und durch bestimmte Aktivitätsmuster, die während der Reifung verschwinden, charakterisiert. Das charakteristische EEG-Muster von frühgeborenen Neonaten enthält transiente Perioden der rhythmischen Aktivität und periodische *Sharp Wave*-Ereignisse während bestimmter Perioden der fötalen Entwicklung^{185, 186}. In der 20. Woche der Schwangerschaft wird die Aktivität von Delta-Wellen mit 0,3-2,0 Hz dominiert¹⁸⁷. Während des 7. Monats der Schwangerschaft sind langsame Oszillationen mit schnellen Rhythmen gemischt. Die dominierenden Muster der schnellen Aktivität während dieser Periode ist ein *Delta-Brush*-Muster^{185, 186}. Die *Delta-*

Brushes bestehen aus 8-25 Hz *Spindle*-ähnlicher, rhythmischer Aktivität überlagert auf 0,3-1,5 Hz Delta-Wellen. Es gibt Hinweise, dass *Spindle Bursts* in neonatalen Ratten Homologe zu den humanen unreifen *Delta-Brushes* sind, da sowohl die *Spindle Bursts* als auch die *Delta-Brushes*, die dominierenden oszillatorischen Muster der kortikalen Aktivität sind, die während vergleichbaren Entwicklungsstadien zu finden sind¹⁸⁸. Außerdem sind beide Muster durch *Spindle*-geformte rhythmische Aktivität gekennzeichnet, die in einem ähnlichen Frequenzbereich liegt (5-25 Hz). Die *Delta-Brushes* und *Spindle Bursts* sind beides lokale Ereignisse, die die Tendenz besitzen sich auszubreiten¹¹³. Da die frühen Muster der synchronisierten kortikalen Aktivität in den neonatalen Nagetieren viele ähnliche Eigenschaften mit den *Delta-Brush*-Mustern bei humanen Frühgeborenen besitzen, eröffnet das die Möglichkeit, Hypothesen in neonatalen Nagern auszuarbeiten und diese in menschlichen Frühgeborenen oder sogar Föten *in utero* zu übertragen und zu testen.

Neben der Netzwerkaktivität im neonatalen Kortex wurde zusätzlich die Aktivität im Hippocampus *in vivo* gemessen. Es konnte in neonatalen Ratten gezeigt werden, dass hippocampale *Sharp Waves* und ihre möglichen *in vitro* Korrelate, die GDPs (synchrone, neuronale Populationsereignisse mit großer Amplitude und bislang nur in Neonaten detektiert) die frühesten bislang in Neuronen entdeckten Muster sind¹¹². Übereinstimmend mit den *in vitro* Daten wurde gezeigt, dass bei der Generierung der frühen hippocampalen *in vivo* Muster, den *Sharp Waves*^{112, 189}, auch exzitatorische Wirkung von GABA beteiligt ist¹⁹⁰. *Sharp Waves* sind Feldpotentiale mit großer Amplitude, die unregelmäßig in CA1 Stratum radiatum als Ergebnis von starker Depolarisation durch CA3 Schaffer Kollaterale auftauchen. Diese konnten sowohl in Kontrollmäusen als auch in M-Kanal-defizienten Mäusen ohne Unterschiede detektiert werden. Dieses Ergebnis weist auf einen in diesem Alter funktionellen trisynaptischen Schaltkreis im Hippocampus der Mutanten hin.

Sharp Waves sind die ersten Muster der Netzwerkaktivität, die vom Hippocampus während der Entwicklung generiert werden¹⁹¹⁻¹⁹⁵. Sie sind nicht mit rhythmischer Aktivität wie Theta oder Gamma vereinbar, weil diese von exzitatorischen hippocampalen Input abhängen¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. *Sharp Waves* dagegen folgen häufig Perioden von verringertem neuronalen Input¹⁹⁸. Die Prominenz von *Sharp Waves* während der Entwicklung untermauern die Idee, dass sie und die GDPs eine Rolle in der frühen Entwicklung besitzen^{112, 199, 200}. *Sharp Waves* zeigen eine Phasenumkehr, während Ereignisse, die im Neokortex generiert werden und passiv durch den Hippocampus weitergeleitet werden, diese nicht besitzen. Karlson *et al.*²⁰¹ sind die einzigen, die mit intrahippocampal implantierten Elektroden in P2 alten Ratten Entladungen mit

Gammafrequenz-Rhythmus gefunden haben, die von erhöhter Unit-Aktivität begleitet war. Davor wurden Gamma-Entladungen frühestens an P5 detektiert²⁰².

Die unveränderte Anzahl der *Sharp Waves* im Hippocampus von M-Kanal-defizienten Mäusen weist daraufhin, dass nicht der Hippocampus die Hirnregion ist, die ein pathologisch erhöhtes Netzwerkaktivität besitzt, sondern dass die verstärkte Erregung, die in den Mutanten zur Epilepsie führt, aus dem Kortex stammt. Die beschriebenen Veränderungen im Hippocampus sind daher mit großer Wahrscheinlichkeit eine Folge des erhöhten synaptischen Inputs, der den Hippocampus über den *Perforant Path* aus dem entorhinalen Kortex erreicht.

5.3. Pharmakologische Behandlung neonataler Übererregbarkeit

Neonatale epileptische Anfälle sind kritische Zustände, die Kinder in den ersten 28 Tagen des Lebens betreffen⁷¹, da sie auf mögliche schwere neuronale Dysfunktionen hinweisen²⁰³⁻²⁰⁵. Sowohl klinische als auch experimentelle Studien weisen darauf hin, dass neonatale Anfälle zu Langzeit-Beeinträchtigungen in der Gehirnentwicklung und in der Anfallsschwelle führen²⁰⁶⁻²¹⁰. Die Anfallsschwelle ist während der neonatalen Periode beim Menschen und bei Ratten am niedrigsten^{211, 212}.

Neonatale Anfälle sind schwierig zu behandeln. Selbst wenn das klinische Erscheinungsbild unterdrückt wird, können EEG-Aufzeichnungen weiterhin kortikale Anfallsaktivität zeigen^{84, 213}. GABA, der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter des erwachsenen Gehirns, wirkt in Neonaten depolarisierend^{82, 214} und verstärkt somit Krampfanfälle^{169, 215}. Sich entwickelnde Neurone reifen in ihrem GABA-Signaling in einer kaudal-rostralen Richtung²¹⁶. Dies würde die klinischen Beobachtungen erklären, dass GABA_A-Agonisten wie Barbiturate und Benzodiazepine die motorische Komponente der neonatalen Anfälle unterdrücken, indem sie die GABA-vermittelte Inhibition im Rückenmark und im Hirnstamm verstärken. Die EEG-Anfälle werden nicht verringert, da der exzitatorische Effekt von GABA in den rostralen Strukturen noch besteht^{84, 213, 217}.

Man könnte annehmen, dass im unreifen Gehirn, vor der physiologischen Expression von KCC2, Veränderungen der intrazellulären Chloridkonzentration durch das Diuretikum Bumetanid die Anfallsaktivität im unreifen Gehirn verhindern können. Bumetanid ist bei niedriger Konzentration (2-10 μM) ein spezifischer Inhibitor von NKCC1^{218, 219} und besitzt im erwachsenen Menschen gut etablierte pharmakokinetische und pharmakodynamische

Eigenschaften mit wenigen Nebenwirkungen¹³². Bumetanid wurde auch in gesunden und kritisch kranken Frühgeburten und Neugeborenen genutzt, um kardiale und pulmonale Krankheiten zu behandeln^{135, 220}. Das menschliche Gehirn zeigt wie das Nagerhirn ein vergleichbares Entwicklungsmuster der beiden Transporter NKCC1 und KCC2. In der 31.-41. Woche nach der Empfängnis ist die NKCC1-Expression signifikant höher als mit einem Jahr (92 Wochen nach der Empfängnis) oder älter²²¹, wobei eine etwa dreimal höhere Expression in der 35. Woche nach der Empfängnis zu finden ist. Dagegen zeigt KCC2 ein anderes Expressionsmuster. Während der gesamten fötalen und neonatalen Periode (20.-41. Woche nach Empfängnis) ist die KCC2-Expression signifikant niedriger als beim Erwachsenen. Während der 31. bis zur 41. Woche, wenn das NKCC1-Niveau am höchsten ist, entspricht die KCC2-Expression nur 2-25 % des adulten Niveaus, gefolgt von einem Anstieg während des ersten Lebensjahrs²²¹.

Neonatale Anfälle werden in den meisten Fällen mit Phenobarbital und Benzodiazepine behandelt, die die GABA_A-Rezeptor-vermittelte Leitfähigkeit steigern²²². Obwohl diese Präparate wirkungsvolle Antikonvulsiva in reifen Gehirnen sind, macht die exzitatorische GABA-Wirkung diese Antikonvulsiva in den unreifen Neuronen^{82, 214} uneffektiv^{84, 134}. Der therapeutische Effekt von Bumetanid auf neonatale Anfälle wurde in *in vivo* Experimenten in Ratten gezeigt²²¹. Allerdings wurden die EEGs in P9 alten Ratten gemessen, einem Alter, in dem die NKCC1-Aktivität schon wieder abnimmt. Deswegen sollten noch deutlichere Effekte in weniger reifen Tieren zu sehen sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden *in vivo* Messungen in P5-7 alten epileptischen Mäusen durchgeführt. Mäuse liegen in ihrer Entwicklung im Vergleich zu Ratten etwa einen Tag zurück. Es konnte eine deutliche Wirkung einer akuten subkutanen Injektion von Bumetanid in den Mutanten beobachtet werden. Das erhöhte Auftreten und die Amplitude der β -*Spindle Bursts* in den oberflächlichen Schichten des Kortex konnte durch Bumetanidgabe reduziert werden. Die pharmakologische Inhibition von NKCC1 durch Bumetanid und die daraus resultierende niedrige intrazelluläre Chloridkonzentration führen zu einer Reduktion der exzitatorischen Wirkung von GABA. Eine solche Behandlung bietet möglicherweise eine andere Möglichkeit als die Reaktivierung der Kv7-Kanalaktivität, um der erhöhten Netzwerkaktivität und Erregung gegenzusteuern.

Nachdem eine akute Injektion von Bumetanid die erhöhte *in vivo* Netzwerkaktivität im Kortex neonataler Mutanten reduzieren konnte, stellte sich die Frage, ob eine chronische Therapie mit Bumetanid einen günstigen Einfluss auf die durch M-Strom-Defizienz in

Mäusen induzierten Veränderungen haben kann. Um dies zu untersuchen, wurden die Tiere täglich mit einer subkutanen Bumetanid-Injektion behandelt. Als Zeitfenster der Behandlung wurden die ersten zwei neonatalen Wochen gewählt. Einerseits wurde gezeigt, dass das Expressionsniveau von NKCC1 nach dieser Zeit nur noch gering ist und andererseits, dass eine erhöhte Netzwerkaktivität durch verminderte M-Stromaktivität während dieser Phase zu einem epileptischen Phänotyp mit morphologischen und Verhaltensveränderungen führt. Sowohl einmal als auch zweimal tägliche Injektionen von Bumetanid konnten den verhaltenshyperaktiven Phänotypen der Mutanten verringern, ebenso wie die morphologischen Veränderungen der CA1-Region des Hippocampus. Die mit der Epilepsie einhergehende Inflammation im Gehirn der Mutanten konnte vermindert werden. Das war in der Verminderung der Astrogliose in den ein- und zweimal Bumetanid behandelten Mutanten zu erkennen. Die Anzahl der aktivierten Mikroglia war nach einmal täglicher Behandlung reduziert. Die zwei Bumetanid-Injektionen am Tag über den zweiwöchigen neonatalen Zeitraum konnten die Aktivierung der Mikroglia ganz verhindern.

Für Bumetanid wurden *in vitro* in intakten, neonatalen Hippocampi dagegen unterschiedliche Effekte gefunden, die vom Modell abhängig waren, mit dem die epileptische Aktivität ausgelöst wurde²²³. Der supprimierende Effekt von Bumetanid auf die anfalls-ähnliche Aktivität scheint vom benutzten Epilepsiemodell abhängig zu sein. Im Falle des hier verwendeten Epilepsie-Modells mit genetisch supprimiertem M-Strom zeigte Bumetanid einen deutlichen Effekt auf den Phänotypen, indem es den Wildtyp-Phänotypen auf morphologischer und Verhaltensebene wieder herstellte. Die *in vivo* Elektrophysiologie zeigte ebenfalls eine Verbesserung der pathologischen β -Oszillationen in den oberflächlichen Schichten des Kortexes. Dies zeigte, dass eine Verminderung der NKCC1-Cotransporterfunktion und damit eine Verringerung der intrazellulären Chloridkonzentration, die Netzwerkaktivität im Gehirn der Mutanten verringern und so der Entwicklung eines epileptischen Phänotyps entgegenwirken konnte.

Es konnte gezeigt werden, dass Phenobarbital in Kombination mit Bumetanid *in vitro* Anfälle, die durch eine hohe Magnesiumkonzentration induziert wurden, verhindern kann und signifikant Frequenz, Dauer und Stärke der Anfälle reduziert¹³³. Die Veränderung des Cl⁻ Transports durch Bumetanid kann eine antikonvulsive Wirkung von Phenobarbital im unreifen Gehirn ermöglichen.

Bumetanid kann ebenfalls antikonvulsive Effekte bei klinisch relevanten Dosierungen in Erwachsenen mit Epilepsie besitzen²²⁴. Subikuläre Neurone von Patienten mit Therapie-

resistenten Anfällen akkumulieren Chlorid, so dass GABA_A-Rezeptor-Aktivierung exzitatorisch ist²²⁵. Daher könnte die Inhibition von NKCC1 auch in einigen Typen von Anfällen im reifen Nervensystem zu antikonvulsiver Wirkung führen.

5.4. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Transkriptom- und Proteomanalysen gezeigt, dass eine gesteigerte Immunantwort, die sich unter anderem in Astroglie und Aktivierung von Mikroglia zeigte, mit M-Kanaldefizienz in Mäusen assoziiert war. Um diesen Befund weiter zu untersuchen, kann getestet werden, inwieweit eine Suppression des Immunsystems und der damit verbundenen Immunantwort durch einen pharmakologischen oder transgenen Ansatz die Ausbildung des Phänotyps beeinflusst.

Die Verwendung der nun etablierten *in vivo* Technik zur Messung der Netzwerkaktivität im Kortex und Hippocampus in neonatalen, murinen Gehirnen ist einerseits hilfreich bei der Aufklärung des Verlaufs der Netzwerkentwicklung in Wildtyp-Mäusen und hilft andererseits bei der Analyse der Pathogenese in M-Kanal-defizienten Mäusen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung der intrazellulären Chloridkonzentration in Neonaten durch die Verwendung des NKCC1-Antagonisten Bumetanid die pathologisch erhöhte Netzwerkaktivität in Mäusen mit supprimierten M-Strom verringern kann. Ob dieser Effekt tatsächlich ein GABA-Effekt ist, kann zum Beispiel durch die Verwendung des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Pikrotoxin überprüft werden. Die pharmakologische Wirkung eines Agonisten des NKCC1-Gegenspielers KCC2 und weiterer Substanzen, die die Netzwerkaktivität reduzieren, können nun auch auf systemneurophysiologischer Ebene untersucht werden.

Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob die adulten Bumetanid-behandelten Mutanten noch epileptische Anfälle erleiden beziehungsweise eine normale Netzwerkaktivität besitzen. Dies kann *in vivo* mit Hilfe von chronisch implantierten Multikanalelektroden untersucht werden. Auch sollte das Lernverhalten der Kontrollmäuse, die mit Bumetanid behandelt wurden, überprüft werden, um die Konsequenzen einer Bumetanid-Behandlung bei einem gesunden Gehirn und damit die therapeutische Breite abschätzen zu können.

Das verwendete Mausmodell und die in unserem Labor etablierten Techniken könnten genutzt werden, um weitere Substanzen und Mechanismen auf ihre potentielle Wirksamkeit zu testen. Beispielsweise könnte die NMDA-Rezeptoraktivität im neonatalen Gehirn manipuliert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Peters, H. C., Hu, H., Pongs, O., Storm, J. F. & Isbrandt, D. Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nat Neurosci* 8, 51-60 (2005).
2. Anderson, V. E., Hauser, W. A. & Rich, S. S. Genetic heterogeneity and epidemiology of the epilepsies. *Adv Neurol* 79, 59-73 (1999).
3. Hauser, W. A. & Kurland, L. T. The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 through 1967. *Epilepsia* 16, 1-66 (1975).
4. Jackson, J. On the anatomical, physiological and pathological investigation of epilepsies. *West Riding Lunatic Asylum Medical Reports* 3 (1873).
5. Appleton, R. & Gibbs, J. *Epilepsy in Childhood and Adolescence* (2004).
6. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 22, 489-501 (1981).
7. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 30, 389-99 (1989).
8. Escayg, A. et al. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet* 24, 343-5 (2000).
9. George, A. L., Jr. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* 115, 1990-9 (2005).
10. Barela, A. J. et al. An epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A that decreases channel excitability. *J Neurosci* 26, 2714-23 (2006).
11. Claes, L. et al. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet* 68, 1327-32 (2001).
12. Jouvenceau, A. et al. Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet* 358, 801-7 (2001).
13. Escayg, A. et al. Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet* 66, 1531-9 (2000).
14. Su, H. et al. Upregulation of a T-type Ca²⁺ channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. *J Neurosci* 22, 3645-55 (2002).
15. Beck, H. et al. Properties of a delayed rectifier potassium current in dentate granule cells isolated from the hippocampus of patients with chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 37, 892-901 (1996).
16. Beck, H., Steffens, R., Heinemann, U. & Elger, C. E. Properties of voltage-activated Ca²⁺ currents in acutely isolated human hippocampal granule cells. *J Neurophysiol* 77, 1526-37 (1997).

17. Khosravani, H. et al. Gating effects of mutations in the Cav3.2 T-type calcium channel associated with childhood absence epilepsy. *J Biol Chem* 279, 9681-4 (2004).
18. Smart, S. L. et al. Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. *Neuron* 20, 809-19 (1998).
19. Rho, J. M., Szot, P., Tempel, B. L. & Schwartzkroin, P. A. Developmental seizure susceptibility of kv1.1 potassium channel knockout mice. *Dev Neurosci* 21, 320-7 (1999).
20. Zhou, L., Zhang, C. L., Messing, A. & Chiu, S. Y. Temperature-sensitive neuromuscular transmission in Kv1.1 null mice: role of potassium channels under the myelin sheath in young nerves. *J Neurosci* 18, 7200-15 (1998).
21. Tansey, E. P., Chow, A., Rudy, B. & McBain, C. J. Developmental expression of potassium-channel subunit Kv3.2 within subpopulations of mouse hippocampal inhibitory interneurons. *Hippocampus* 12, 137-48 (2002).
22. Rudy, B. & McBain, C. J. Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends Neurosci* 24, 517-26 (2001).
23. Lau, D. et al. Impaired fast-spiking, suppressed cortical inhibition, and increased susceptibility to seizures in mice lacking Kv3.2 K⁺ channel proteins. *J Neurosci* 20, 9071-85 (2000).
24. Schroeder, B. C., Kubisch, C., Stein, V. & Jentsch, T. J. Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* 396, 687-90 (1998).
25. Wen, H. & Levitan, I. B. Calmodulin is an auxiliary subunit of KCNQ2/3 potassium channels. *J Neurosci* 22, 7991-8001 (2002).
26. Zhang, H. et al. PIP(2) activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 37, 963-75 (2003).
27. Brown, D. A. & Adams, P. R. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283, 673-6 (1980).
28. Delmas, P. & Brown, D. A. Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat Rev Neurosci* 6, 850-62 (2005).
29. Yue, C. & Yaari, Y. KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24, 4614-24 (2004).
30. Gutman, G. A. et al. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 55, 583-6 (2003).
31. Heginbotham, L., Abramson, T. & MacKinnon, R. A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* 258, 1152-5 (1992).
32. Schmitt, N. et al. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *Embo J* 19, 332-40 (2000).
33. Maljevic, S. et al. C-terminal interaction of KCNQ2 and KCNQ3 K⁺ channels. *J Physiol* 548, 353-60 (2003).
34. Schwake, M., Pusch, M., Kharkovets, T. & Jentsch, T. J. Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K⁺ channels involved in epilepsy. *J Biol Chem* 275, 13343-8 (2000).
35. Schwake, M., Jentsch, T. J. & Friedrich, T. A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO Rep* 4, 76-81 (2003).
36. Wang, W., Xia, J. & Kass, R. S. MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled Isk channel. *J Biol Chem* 273, 34069-74 (1998).
37. Yang, W. P. et al. Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *J Biol Chem* 273, 19419-23 (1998).

38. Selyanko, A. A., Hadley, J. K. & Brown, D. A. Properties of single M-type KCNQ2/KCNQ3 potassium channels expressed in mammalian cells. *J Physiol* 534, 15-24 (2001).
39. Gamper, N. & Shapiro, M. S. Calmodulin mediates Ca²⁺-dependent modulation of M-type K⁺ channels. *J Gen Physiol* 122, 17-31 (2003).
40. Barhanin, J. et al. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384, 78-80 (1996).
41. Sanguinetti, M. C. et al. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 384, 80-3 (1996).
42. Biervert, C. et al. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279, 403-6 (1998).
43. Ronen, G. M., Rosales, T. O., Connolly, M., Anderson, V. E. & Leppert, M. Seizure characteristics in chromosome 20 benign familial neonatal convulsions. *Neurology* 43, 1355-60 (1993).
44. Borgatti, R. et al. A novel mutation in KCNQ2 associated with BFNC, drug resistant epilepsy, and mental retardation. *Neurology* 63, 57-65 (2004).
45. Wang, Q. et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12, 17-23 (1996).
46. Singh, N. A. et al. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 18, 25-9 (1998).
47. Biervert, C. & Steinlein, O. K. Structural and mutational analysis of KCNQ2, the major gene locus for benign familial neonatal convulsions. *Hum Genet* 104, 234-40 (1999).
48. Lerche, H. et al. A reduced K⁺ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. *Ann Neurol* 46, 305-12 (1999).
49. Charlier, C. et al. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 18, 53-5 (1998).
50. Hirose, S. et al. A novel mutation of KCNQ3 (c.925T-->C) in a Japanese family with benign familial neonatal convulsions. *Ann Neurol* 47, 822-6 (2000).
51. Kubisch, C. et al. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96, 437-46 (1999).
52. Lee, W. L. et al. A KCNQ2 splice site mutation causing benign neonatal convulsions in a Scottish family. *Neuropediatrics* 31, 9-12 (2000).
53. Dedek, K. et al. Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12272-7 (2001).
54. Moulard, B. et al. Ion channel variation causes epilepsies. *Brain Res Brain Res Rev* 36, 275-84 (2001).
55. Coppola, G. et al. A novel KCNQ2 K⁺ channel mutation in benign neonatal convulsions and centrotemporal spikes. *Neurology* 61, 131-4 (2003).
56. Singh, N. A. et al. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain* 126, 2726-37 (2003).
57. Pereira, S. et al. Complete loss of the cytoplasmic carboxyl terminus of the KCNQ2 potassium channel: a novel mutation in a large Czech pedigree with benign neonatal convulsions or other epileptic phenotypes. *Epilepsia* 45, 384-90 (2004).
58. Tang, B. et al. A novel mutation in KCNQ2 gene causes benign familial neonatal convulsions in a Chinese family. *J Neurol Sci* 221, 31-4 (2004).
59. Claes, L. R. et al. De novo KCNQ2 mutations in patients with benign neonatal seizures. *Neurology* 63, 2155-8 (2004).

60. Bassi, M. T. et al. Functional analysis of novel KCNQ2 and KCNQ3 gene variants found in a large pedigree with benign familial neonatal convulsions (BFNC). *Neurogenetics* 6, 185-93 (2005).
61. Yalcin, O. et al. A novel missense mutation (N258S) in the KCNQ2 gene in a Turkish family afflicted with benign familial neonatal convulsions (BFNC). *Turk J Pediatr* 49, 385-9 (2007).
62. Li, H. et al. A novel mutation of KCNQ3 gene in a Chinese family with benign familial neonatal convulsions. *Epilepsy Res* 79, 1-5 (2008).
63. Sadewa, A. H. et al. Germ-line mutation of KCNQ2, p.R213W, in a Japanese family with benign familial neonatal convulsion. *Pediatr Int* 50, 167-71 (2008).
64. Lerche, C. et al. Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J Biol Chem* 275, 22395-400 (2000).
65. Bleich, M. & Warth, R. The very small-conductance K⁺ channel KvLQT1 and epithelial function. *Pflugers Arch* 440, 202-6 (2000).
66. Saganich, M. J., Machado, E. & Rudy, B. Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K⁺ channels in brain. *J Neurosci* 21, 4609-24 (2001).
67. Tinel, N., Lauritzen, I., Chouabe, C., Lazdunski, M. & Borsotto, M. The KCNQ2 potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with KCNQ3. *FEBS Lett* 438, 171-6 (1998).
68. Cooper, E. C. et al. Colocalization and coassembly of two human brain M-type potassium channel subunits that are mutated in epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4914-9 (2000).
69. Kharkovets, T. et al. KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4333-8 (2000).
70. Schroeder, B. C., Hechenberger, M., Weinreich, F., Kubisch, C. & Jentsch, T. J. KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem* 275, 24089-95 (2000).
71. Ronen, G. M., Penney, S. & Andrews, W. The epidemiology of clinical neonatal seizures in Newfoundland: a population-based study. *J Pediatr* 134, 71-5 (1999).
72. Lanska, M. J., Lanska, D. J., Baumann, R. J. & Kryscio, R. J. A population-based study of neonatal seizures in Fayette County, Kentucky. *Neurology* 45, 724-32 (1995).
73. Saliba, R. M., Annegers, J. F., Waller, D. K., Tyson, J. E. & Mizrahi, E. M. Incidence of neonatal seizures in Harris County, Texas, 1992-1994. *Am J Epidemiol* 150, 763-9 (1999).
74. Boylan, G. B. et al. Outcome of electroclinical, electrographic, and clinical seizures in the newborn infant. *Dev Med Child Neurol* 41, 819-25 (1999).
75. Payne, J. A., Rivera, C., Voipio, J. & Kaila, K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26, 199-206 (2003).
76. Rivera, C. et al. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251-5 (1999).
77. Delpire, E. Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol Sci* 15, 309-312 (2000).
78. Yamada, J. et al. Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol* 557, 829-41 (2004).

79. Plotkin, M. D., Snyder, E. Y., Hebert, S. C. & Delpire, E. Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J Neurobiol* 33, 781-95 (1997).
80. Wang, C. et al. Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 139, 59-66 (2002).
81. Clayton, G. H., Owens, G. C., Wolff, J. S. & Smith, R. L. Ontogeny of cation-Cl⁻ cotransporter expression in rat neocortex. *Brain Res Dev Brain Res* 109, 281-92 (1998).
82. Ben-Ari, Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3, 728-39 (2002).
83. Ben-Ari, Y. & Holmes, G. L. The multiple facets of gamma-aminobutyric acid dysfunction in epilepsy. *Curr Opin Neurol* 18, 141-5 (2005).
84. Connell, J., Oozeer, R., de Vries, L., Dubowitz, L. M. & Dubowitz, V. Clinical and EEG response to anticonvulsants in neonatal seizures. *Arch Dis Child* 64, 459-64 (1989).
85. Scher, M. S. Seizures in the newborn infant. Diagnosis, treatment, and outcome. *Clin Perinatol* 24, 735-72 (1997).
86. Watanabe, H. et al. Disruption of the epilepsy KCNQ2 gene results in neural hyperexcitability. *J Neurochem* 75, 28-33 (2000).
87. Gossen, M. & Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-51 (1992).
88. Tremblay, P. et al. Doxycycline control of prion protein transgene expression modulates prion disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12580-5 (1998).
89. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbour Press, New York, 1998).
90. Saiki, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91 (1988).
91. Irizarry, R. A. et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249-64 (2003).
92. Irizarry, R. A. et al. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31, e15 (2003).
93. Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K. & Gerstein, M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* 4, 117 (2003).
94. Parrizas, M., Saltiel, A. R. & LeRoith, D. Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 272, 154-61 (1997).
95. Vicari, A. P. et al. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 7, 291-301 (1997).
96. Hieshima, K. et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem* 272, 5846-53 (1997).
97. Morales, J. et al. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14470-5 (1999).
98. Homey, B. et al. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* 8, 157-65 (2002).
99. Zhao, X. et al. CCL9 is secreted by the follicle-associated epithelium and recruits dome region Peyer's patch CD11b⁺ dendritic cells. *J Immunol* 171, 2797-803 (2003).

100. Tsai, H. H. et al. The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. *Cell* 110, 373-83 (2002).
101. Devalaraja, R. M. et al. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol* 115, 234-44 (2000).
102. Haghnegahdar, H. et al. The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma. *J Leukoc Biol* 67, 53-62 (2000).
103. Owen, J. D. et al. Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins. *Int J Cancer* 73, 94-103 (1997).
104. Dufour, J. H. et al. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* 168, 3195-204 (2002).
105. Angiolillo, A. L. et al. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182, 155-62 (1995).
106. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. & Hume, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163-89 (2004).
107. Burd, P. R. et al. Cloning and characterization of a novel T cell activation gene. *J Immunol* 139, 3126-31 (1987).
108. Oh, C. K. & Metcalfe, D. D. Transcriptional regulation of the TCA3 gene in mast cells after Fc epsilon RI cross-linking. *J Immunol* 153, 325-32 (1994).
109. Noebels, J. L. The biology of epilepsy genes. *Annu Rev Neurosci* 26, 599-625 (2003).
110. DeFelipe, J. et al. Selective changes in the microorganization of the human epileptogenic neocortex revealed by parvalbumin immunoreactivity. *Cereb Cortex* 3, 39-48 (1993).
111. Ascoli, G. A. et al. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9, 557-68 (2008).
112. Leinekugel, X. et al. Correlated bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. *Science* 296, 2049-52 (2002).
113. Khazipov, R. et al. Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature* 432, 758-61 (2004).
114. Jentsch, T. J. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 1, 21-30 (2000).
115. Bullitt, E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 296, 517-30 (1990).
116. Komuro, H. & Rakic, P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260, 95-7 (1993).
117. Rakic, P. & Komuro, H. The role of receptor/channel activity in neuronal cell migration. *J Neurobiol* 26, 299-315 (1995).
118. Katz, L. C. & Shatz, C. J. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274, 1133-8 (1996).
119. Ben-Ari, Y. Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia* 42 Suppl 3, 5-7 (2001).
120. Holmes, G. L. & McCabe, B. Brain development and generation of brain pathologies. *Int Rev Neurobiol* 45, 17-41 (2001).
121. Cang, J. et al. Development of precise maps in visual cortex requires patterned spontaneous activity in the retina. *Neuron* 48, 797-809 (2005).
122. Moody, W. J. & Bosma, M. M. Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiol Rev* 85, 883-941 (2005).

123. Galli, L. & Maffei, L. Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life. *Science* 242, 90-1 (1988).
124. Meister, M., Wong, R. O., Baylor, D. A. & Shatz, C. J. Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science* 252, 939-43 (1991).
125. Mooney, R., Penn, A. A., Gallego, R. & Shatz, C. J. Thalamic relay of spontaneous retinal activity prior to vision. *Neuron* 17, 863-74 (1996).
126. Weliky, M. & Katz, L. C. Correlational structure of spontaneous neuronal activity in the developing lateral geniculate nucleus in vivo. *Science* 285, 599-604 (1999).
127. Torborg, C. L. & Feller, M. B. Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections. *Prog Neurobiol* 76, 213-35 (2005).
128. Hanganu, I. L., Ben-Ari, Y. & Khazipov, R. Retinal waves trigger spindle bursts in the neonatal rat visual cortex. *J Neurosci* 26, 6728-36 (2006).
129. Mitzdorf, U. Current source-density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena. *Physiol Rev* 65, 37-100 (1985).
130. Cherubini, E., Gaiarsa, J. L. & Ben-Ari, Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* 14, 515-9 (1991).
131. Ben-Ari, Y. Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci* 24, 353-60 (2001).
132. Staley, K. J. Wrong-way chloride transport: is it a treatable cause of some intractable seizures? *Epilepsy Curr* 6, 124-7 (2006).
133. Dzhala, V. I., Brumback, A. C. & Staley, K. J. Bumetanide enhances phenobarbital efficacy in a neonatal seizure model. *Ann Neurol* 63, 222-35 (2008).
134. Staley, K. Enhancement of the excitatory actions of GABA by barbiturates and benzodiazepines. *Neurosci Lett* 146, 105-7 (1992).
135. Lopez-Samblas, A. M., Adams, J. A., Goldberg, R. N. & Modi, M. W. The pharmacokinetics of bumetanide in the newborn infant. *Biol Neonate* 72, 265-72 (1997).
136. Elliott, R. C., Miles, M. F. & Lowenstein, D. H. Overlapping microarray profiles of dentate gyrus gene expression during development- and epilepsy-associated neurogenesis and axon outgrowth. *J Neurosci* 23, 2218-27 (2003).
137. Lee, T. S. et al. Aquaporin-4 is increased in the sclerotic hippocampus in human temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol* 108, 493-502 (2004).
138. Mazarati, A. M., Halaszi, E. & Telegdy, G. Anticonvulsive effects of galanin administered into the central nervous system upon the picrotoxin-kindled seizure syndrome in rats. *Brain Res* 589, 164-6 (1992).
139. Colmers, W. F., Lukowiak, K. & Pittman, Q. J. Neuropeptide Y reduces orthodromically evoked population spike in rat hippocampal CA1 by a possibly presynaptic mechanism. *Brain Res* 346, 404-8 (1985).
140. Colmers, W. F., Lukowiak, K. & Pittman, Q. J. Presynaptic action of neuropeptide Y in area CA1 of the rat hippocampal slice. *J Physiol* 383, 285-99 (1987).
141. Colmers, W. F., Lukowiak, K. & Pittman, Q. J. Neuropeptide Y action in the rat hippocampal slice: site and mechanism of presynaptic inhibition. *J Neurosci* 8, 3827-37 (1988).
142. Noe, F. et al. Neuropeptide Y gene therapy decreases chronic spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Brain* 131, 1506-15 (2008).
143. Villani, F. & Avanzini, G. The use of immunoglobulins in the treatment of human epilepsy. *Neurol Sci* 23 Suppl 1, S33-7 (2002).
144. Verhelst, H. et al. Steroids in intractable childhood epilepsy: clinical experience and review of the literature. *Seizure* 14, 412-21 (2005).

145. Eng, L. F. & Ghirnikar, R. S. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4, 229-37 (1994).
146. Eng, L. F., Ghirnikar, R. S. & Lee, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25, 1439-51 (2000).
147. Ajmone-Marsen, C. Acute effects of topical epileptogenic agents. *Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 299-312 (1969).
148. Best, N., Mitchell, J., Baimbridge, K. G. & Wheal, H. V. Changes in parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. *Neurosci Lett* 155, 1-6 (1993).
149. Scotti, A. L., Kalt, G., Bollag, O. & Nitsch, C. Parvalbumin disappears from GABAergic CA1 neurons of the gerbil hippocampus with seizure onset while its presence persists in the perforant path. *Brain Res* 760, 109-17 (1997).
150. van Vliet, E. A., Aronica, E., Tolner, E. A., Lopes da Silva, F. H. & Gorter, J. A. Progression of temporal lobe epilepsy in the rat is associated with immunocytochemical changes in inhibitory interneurons in specific regions of the hippocampal formation. *Exp Neurol* 187, 367-79 (2004).
151. Wittner, L. et al. Synaptic reorganization of calbindin-positive neurons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 115, 961-78 (2002).
152. Sloviter, R. S. Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J Comp Neurol* 280, 183-96 (1989).
153. Freund, T. F. et al. Pattern of neuronal death in the rat hippocampus after status epilepticus. Relationship to calcium binding protein content and ischemic vulnerability. *Brain Res Bull* 28, 27-38 (1992).
154. Houser, C. R. & Esclapez, M. Vulnerability and plasticity of the GABA system in the pilocarpine model of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsy Res* 26, 207-18 (1996).
155. Magloczky, Z., Halasz, P., Vajda, J., Czirjak, S. & Freund, T. F. Loss of Calbindin-D28K immunoreactivity from dentate granule cells in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 76, 377-85 (1997).
156. Magloczky, Z. et al. Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 96, 7-25 (2000).
157. Esclapez, M., Hirsch, J. C., Khazipov, R., Ben-Ari, Y. & Bernard, C. Operative GABAergic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons in experimental epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12151-6 (1997).
158. Tuunanen, J., Halonen, T. & Pitkanen, A. Decrease in somatostatin-immunoreactive neurons in the rat amygdaloid complex in a kindling model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 26, 315-27 (1997).
159. Cossart, R. et al. Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci* 4, 52-62 (2001).
160. Dinocourt, C., Petanjek, Z., Freund, T. F., Ben-Ari, Y. & Esclapez, M. Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *J Comp Neurol* 459, 407-25 (2003).
161. King, G. L., Dingledine, R., Giacchino, J. L. & McNamara, J. O. Abnormal neuronal excitability in hippocampal slices from kindled rats. *J Neurophysiol* 54, 1295-304 (1985).
162. Haas, K. Z., Sperber, E. F., Moshe, S. L. & Stanton, P. K. Kainic acid-induced seizures enhance dentate gyrus inhibition by downregulation of GABA(B) receptors. *J Neurosci* 16, 4250-60 (1996).

163. Swanson, T. H., Sperling, M. R. & O'Connor, M. J. Strong paired pulse depression of dentate granule cells in slices from patients with temporal lobe epilepsy. *Journal of Neural Transmission* 105, 613-625 (1998).
164. Wilson, C. L. et al. Paired pulse suppression and facilitation in human epileptogenic hippocampal formation. *Epilepsy Res* 31, 211-30 (1998).
165. Ben-Ari, Y., Khazipov, R., Leinekugel, X., Caillard, O. & Gaiarsa, J. L. GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends Neurosci* 20, 523-9 (1997).
166. Reiter, H. O., Waitzman, D. M. & Stryker, M. P. Cortical activity blockade prevents ocular dominance plasticity in the kitten visual cortex. *Exp Brain Res* 65, 182-8 (1986).
167. Goodman, C. S. & Shatz, C. J. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72 Suppl, 77-98 (1993).
168. Kirkwood, A., Lee, H. K. & Bear, M. F. Co-regulation of long-term potentiation and experience-dependent synaptic plasticity in visual cortex by age and experience. *Nature* 375, 328-31 (1995).
169. Khazipov, R. et al. Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 19, 590-600 (2004).
170. Dupont, E., Hanganu, I. L., Kilb, W., Hirsch, S. & Luhmann, H. J. Rapid developmental switch in the mechanisms driving early cortical columnar networks. *Nature* 439, 79-83 (2006).
171. Kandler, K. & Katz, L. C. Neuronal coupling and uncoupling in the developing nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 5, 98-105 (1995).
172. Kandler, K. & Katz, L. C. Coordination of neuronal activity in developing visual cortex by gap junction-mediated biochemical communication. *J Neurosci* 18, 1419-27 (1998).
173. Kandler, K. & Katz, L. C. Relationship between dye coupling and spontaneous activity in developing ferret visual cortex. *Dev Neurosci* 20, 59-64 (1998).
174. Peinado, A. Traveling slow waves of neural activity: a novel form of network activity in developing neocortex. *J Neurosci* 20, RC54 (2000).
175. Peinado, A. Immature neocortical neurons exist as extensive syncytial networks linked by dendrodendritic electrical connections. *J Neurophysiol* 85, 620-9 (2001).
176. Agmon, A., Hollrigel, G. & O'Dowd, D. K. Functional GABAergic synaptic connection in neonatal mouse barrel cortex. *J Neurosci* 16, 4684-95 (1996).
177. Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R. & Gaiarsa, J. L. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416, 303-25 (1989).
178. Garaschuk, O., Hanse, E. & Konnerth, A. Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus. *J Physiol* 507 (Pt 1), 219-36 (1998).
179. Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat Neurosci* 3, 452-9 (2000).
180. Khazipov, R., Leinekugel, X., Khalilov, I., Gaiarsa, J. L. & Ben-Ari, Y. Synchronization of GABAergic interneuronal network in CA3 subfield of neonatal rat hippocampal slices. *J Physiol* 498 (Pt 3), 763-72 (1997).
181. Leinekugel, X., Khalilov, I., Ben-Ari, Y. & Khazipov, R. Giant depolarizing potentials: the septal pole of the hippocampus paces the activity of the developing intact septohippocampal complex in vitro. *J Neurosci* 18, 6349-57 (1998).
182. Leinekugel, X., Medina, I., Khalilov, I., Ben-Ari, Y. & Khazipov, R. Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18, 243-55 (1997).
183. Minlebaev, M., Ben-Ari, Y. & Khazipov, R. Network mechanisms of spindle-burst oscillations in the neonatal rat barrel cortex in vivo. *J Neurophysiol* 97, 692-700 (2007).

184. Freund, T. F. & Buzsaki, G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347-470 (1996).
185. Lamblin, M. D. et al. [Electroencephalography of the premature and term newborn. Maturational aspects and glossary]. *Neurophysiol Clin* 29, 123-219 (1999).
186. Anderson, C. M., Torres, F. & Faoro, A. The EEG of the early premature. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 60, 95-105 (1985).
187. Vanhatalo, S. et al. DC-EEG discloses prominent, very slow activity patterns during sleep in preterm infants. *Clin Neurophysiol* 113, 1822-5 (2002).
188. Clancy, B., Darlington, R. B. & Finlay, B. L. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105, 7-17 (2001).
189. Buhl, D. L. & Buzsaki, G. Developmental emergence of hippocampal fast-field "ripple" oscillations in the behaving rat pups. *Neuroscience* 134, 1423-30 (2005).
190. Sipila, S. T., Schuchmann, S., Voipio, J., Yamada, J. & Kaila, K. The cation-chloride cotransporter NKCC1 promotes sharp waves in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol* 573, 765-73 (2006).
191. Jouvet, M., Michel, F. & Courjon, J. [Electric activity of the rhinencephalon during sleep in cats.]. *C R Seances Soc Biol Fil* 153, 101-5 (1959).
192. Vanderwolf, C. H. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 26, 407-18 (1969).
193. O'Keefe, J. & Nadel, L. *The hippocampus as a cognitive map* (Oxford University Press, 1978).
194. Buzsaki, G. Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Res* 398, 242-52 (1986).
195. Suzuki, S. S. & Smith, G. K. Spontaneous EEG spikes in the normal hippocampus. I. Behavioral correlates, laminar profiles and bilateral synchrony. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 67, 348-59 (1987).
196. Bland, B. H. The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog Neurobiol* 26, 1-54 (1986).
197. Bland, B. H. & Colom, L. V. Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Prog Neurobiol* 41, 157-208 (1993).
198. Battaglia, F. P., Sutherland, G. R. & McNaughton, B. L. Hippocampal sharp wave bursts coincide with neocortical "up-state" transitions. *Learn Mem* 11, 697-704 (2004).
199. Hanse, E., Durand, G. M., Garaschuk, O. & Konnerth, A. Activity-dependent wiring of the developing hippocampal neuronal circuit. *Semin Cell Dev Biol* 8, 35-42 (1997).
200. Leinekugel, X. Developmental patterns and plasticities: the hippocampal model. *J Physiol Paris* 97, 27-37 (2003).
201. Karlsson, K. A., Mohs, E. J., di Prisco, G. V. & Blumberg, M. S. On the co-occurrence of startles and hippocampal sharp waves in newborn rats. *Hippocampus* 16, 959-65 (2006).
202. Lahtinen, H. et al. Postnatal development of rat hippocampal gamma rhythm in vivo. *J Neurophysiol* 88, 1469-74 (2002).
203. Painter, M. J., Bergman, I. & Crumrine, P. Neonatal seizures. *Pediatr Clin North Am* 33, 91-109 (1986).
204. Scher, M. S. et al. Electrographic seizures in preterm and full-term neonates: clinical correlates, associated brain lesions, and risk for neurologic sequelae. *Pediatrics* 91, 128-34 (1993).
205. Brunquell, P. J., Glennon, C. M., DiMario, F. J., Jr., Lerer, T. & Eisenfeld, L. Prediction of outcome based on clinical seizure type in newborn infants. *J Pediatr* 140, 707-12 (2002).

206. Jensen, F. E., Holmes, G. L., Lombroso, C. T., Blume, H. K. & Firkusny, I. R. Age-dependent changes in long-term seizure susceptibility and behavior after hypoxia in rats. *Epilepsia* 33, 971-80 (1992).
207. Baram, T. Z. Long-term neuroplasticity and functional consequences of single versus recurrent early-life seizures. *Ann Neurol* 54, 701-5 (2003).
208. Holmes, G. L. Effects of early seizures on later behavior and epileptogenicity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10, 101-5 (2004).
209. Swann, J. W. The impact of seizures on developing hippocampal networks. *Prog Brain Res* 147, 347-54 (2005).
210. Sanchez, R. M., Dai, W., Levada, R. E., Lippman, J. J. & Jensen, F. E. AMPA/kainate receptor-mediated downregulation of GABAergic synaptic transmission by calcineurin after seizures in the developing rat brain. *J Neurosci* 25, 3442-51 (2005).
211. Moshe, S. L. Epileptogenesis and the immature brain. *Epilepsia* 28 Suppl 1, S3-15 (1987).
212. Hauser, W. A. Epidemiology of epilepsy in children. *Neurosurg Clin N Am* 6, 419-29 (1995).
213. Painter, M. J. et al. Phenobarbital compared with phenytoin for the treatment of neonatal seizures. *N Engl J Med* 341, 485-9 (1999).
214. Owens, D. F. & Kriegstein, A. R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3, 715-27 (2002).
215. Dzhalal, V. I. & Staley, K. J. Excitatory actions of endogenously released GABA contribute to initiation of ictal epileptiform activity in the developing hippocampus. *J Neurosci* 23, 1840-6 (2003).
216. Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Jentsch, T. J. & Hubner, C. A. Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *J Comp Neurol* 468, 57-64 (2004).
217. Scher, M. S., Alvin, J., Gaus, L., Minnigh, B. & Painter, M. J. Uncoupling of EEG-clinical neonatal seizures after antiepileptic drug use. *Pediatr Neurol* 28, 277-80 (2003).
218. Isenring, P., Jacoby, S. C., Payne, J. A. & Forbush, B., 3rd. Comparison of Na-K-Cl cotransporters. NKCC1, NKCC2, and the HEK cell Na-L-Cl cotransporter. *J Biol Chem* 273, 11295-301 (1998).
219. Hannaert, P., Alvarez-Guerra, M., Pirot, D., Nazaret, C. & Garay, R. P. Rat NKCC2/NKCC1 cotransporter selectivity for loop diuretic drugs. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365, 193-9 (2002).
220. Sullivan, J. E., Witte, M. K., Yamashita, T. S., Myers, C. M. & Blumer, J. L. Pharmacokinetics of bumetanide in critically ill infants. *Clin Pharmacol Ther* 60, 405-13 (1996).
221. Dzhalal, V. I. et al. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11, 1205-13 (2005).
222. Twyman, R. E., Rogers, C. J. & Macdonald, R. L. Differential regulation of gamma-aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. *Ann Neurol* 25, 213-20 (1989).
223. Kilb, W., Sinning, A. & Luhmann, H. J. Model-specific effects of bumetanide on epileptiform activity in the in-vitro intact hippocampus of the newborn mouse. *Neuropharmacology* 53, 524-33 (2007).
224. Hesdorffer, D. C., Stables, J. P., Hauser, W. A., Annegers, J. F. & Cascino, G. Are certain diuretics also anticonvulsants? *Ann Neurol* 50, 458-62 (2001).
225. Cohen, I., Navarro, V., Clemenceau, S., Baulac, M. & Miles, R. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 298, 1418-21 (2002).

7. Anhang

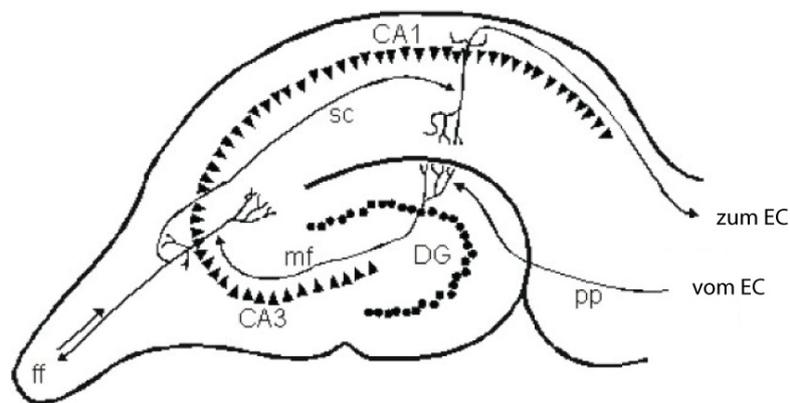


Abb. 34: Hippocampus-Übersicht

Die Abbildung zeigt eine Übersicht des hippocampalen Netzwerks mit trisynaptischem Schaltkreis. (EC = Entorhinaler Kortex, DG = Gyrus dentatus, pp = *Perforant Path*, mf = Mossfaser, sc = Schaffer Kollaterale, ff = Fimbria Fortix)

Tab. 3: In Affymetrix-Analyse signifikant regulierte Transkripte in P-14 alten P-M2-Mutanten

n-fache Expressionänderung	Gen-Symbol	Name	Affymetrix-ID
4.22	1500015O10Rik	RIKEN cDNA 1500015O10 gene	1460049_s_at
3.16	Clic6	chloride intracellular channel 6	1454866_s_at
3.01	---	---	1459737_s_at
2.93	Nptx2	neuronal pentraxin 2	1420720_at
2.91	Penk1	preproenkephalin 1	1427038_at
2.87	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	1423100_at
2.76	Gfap	glial fibrillary acidic protein	1426509_s_at
2.74	---	---	1439578_at
2.41	Lsm11	U7 snRNP-specific Sm-like protein LSM11	1453755_at
2.33	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2	1447830_s_at
2.20	Blnk	B-cell linker	1451780_at
2.19	Egr2	early growth response 2	1427682_a_at
2.19	---	---	1440142_s_at

2.12	Fosb	FBJ osteosarcoma oncogene B	1422134_at
2.11	1110014F24Rik	RIKEN cDNA 1110014F24 gene	1428781_at
2.10	Ptx3	pentaxin related gene	1418666_at
2.09	Inhba	inhibin beta-A	1422053_at
2.08	2310046G15Rik	RIKEN cDNA 2310046G15 gene	1431057_a_at
2.08	Sulf1	sulfatase 1	1438200_at
2.07	D14Ert449e	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 449, expressed	1428738_a_at
2.02	Dpm3	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 3	1452729_at
2.01	---	---	1456212_x_at
2.00	S100a10	S100 calcium binding protein A10 (calpactin)	1416762_at
1.98	---	---	1456418_at
1.96	Cd44	CD44 antigen	1434376_at
1.93	Tnfrsf12a	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	1418572_x_at
1.90	Gpr115	G protein-coupled receptor 115	1429460_at
1.90	---	---	1416630_at
1.89	MGC41689	hypothetical LOC211623	1452590_a_at
1.85	Crhbp	corticotropin releasing hormone binding protein	1436127_at
1.84	Gadd45b	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	1449773_s_at
1.84	Aqp1	aquaporin 1	1416203_at
1.81	---	---	1457717_at
1.79	Tnc	tenascin C	1416342_at
1.79	Sdc1	syndecan 1	1437279_x_at
1.77	Tieg1	TGFB inducible early growth response 1	1416029_at
1.77	Edg3	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3	1438658_a_at
1.76	---	---	1437695_at
1.75	Tmepai	transmembrane, prostate androgen induced RNA	1422706_at
1.74	Cldn2	claudin 2	1417231_at
1.71	Vim	vimentin	1456292_a_at
1.71	Calml4	calmodulin-like 4	1424713_at
1.68	Col3a1	procollagen, type III, alpha 1	1427883_a_at
1.68	Lmna	lamin A	1457670_s_at
1.66	2310057H16Rik	RIKEN cDNA 2310057H16 gene	1416431_at
1.66	Coll1a1	procollagen, type I, alpha 1	1423669_at
1.66	Gal	galanin	1460668_at
1.65	Lgals1	lectin, galactose binding, soluble 1	1455439_a_at
1.65	AI427515	expressed sequence AI427515	1433551_at
1.65	BC019776	cDNA sequence BC019776	1424356_a_at
1.61	Crh	corticotropin releasing hormone	1457984_at
1.60	2610312B22Rik	RIKEN cDNA 2610312B22 gene	1453684_s_at
1.59	Kl	klotho	1423400_at
1.57	Ptgds	prostaglandin D2 synthase (brain)	1423860_at
1.53	Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	1448136_at
1.51	Efhc1	EF-hand domain (C-terminal) containing 1	1453159_at
-1.50	4933439C20Rik	RIKEN cDNA 4933439C20 gene	1435353_a_at
-1.57		Similar to Lactase-phlorizin hydrolase precursor (Lactase-glycosylceramidase) (LOC226413), mRNA	1439479_at
-1.61	Pttg1	pituitary tumor-transforming 1	1424105_a_at
-1.63	D10Bwg1379e	DNA segment, Chr 10, Brigham & Women's Genetics 1379 expressed	1455995_at
-3.09	5730453H04Rik	RIKEN cDNA 5730453H04 gene	1435494_s_at

Tab. 4: In Affymetrix-Analyse signifikant regulierte Transkripte in P-14 alten P-M2/1-Mutanten

n-fache Expressionänderung	Gen-Symbol	Name	Affymetrix-ID
3.76	Aqp4	aquaporin 4	1425382_a_at
3.50	Gfap	glial fibrillary acidic protein	1426508_at
3.45	Gal	galanin	1460668_at
2.83	Npy	neuropeptide Y	1419127_at
2.83	2310046G15Rik	RIKEN cDNA 2310046G15 gene	1431057_a_at
2.62	Rgs4	regulator of G-protein signaling 4	1448285_at
2.55	Trh	thyrotropin releasing hormone	1418756_at
2.50	Lgals1	lectin, galactose binding, soluble 1	1455439_a_at
2.44	---	---	1440142_s_at
2.39	Eif4a1	eukaryotic translation initiation factor 4A1	1430980_a_at
2.28	Penk1	preproenkephalin 1	1427038_at
2.24	Matn2	matrilin 2	1419442_at
2.24	Glrx1	glutaredoxin 1 (thioltransferase)	1416593_at
2.21	Msn	moesin	1450379_at
2.19	Dnm1l	dynamamin 1-like	1452638_s_at
2.18	Vim	vimentin	1456292_a_at
2.17	Fdps	farnesyl diphosphate synthetase	1423418_at
2.10	---	---	1448565_at
2.09	Anp32a	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	1450407_a_at
2.09	---	---	1447745_at
2.06	---	---	1455346_at
2.04	---	Similar to differentially expressed in hematopoietic lineages precursor (LOC239192), mRNA	1437060_at
2.04	Eif2s3x	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene X-linked	1421895_at
2.03	Itih3	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 3	1449123_at
2.03	Hspcb	heat shock protein 1, beta	1416365_at
2.03	S100a10	S100 calcium binding protein A10 (calpactin)	1416762_at
2.01	Rgs5	regulator of G-protein signaling 5	1420942_s_at
2.00	Mtap2	microtubule-associated protein 2	1421327_at
1.99	Hspb6	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	1436332_at
1.98	Lrrtm2	leucine rich repeat transmembrane neuronal 2	1456637_at
1.98	Cap1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	1417462_at
1.97	Atp1a2	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	1452308_a_at
1.97	Gng2	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2 subunit	1418452_at
1.95	Asna1	arsA (bacterial) arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1	1418292_at
1.95	B930006L02Rik	RIKEN cDNA B930006L02 gene	1434374_at
1.94	Nedd4	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4	1421955_a_at
1.93	Napb	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein beta	1452444_at
1.93	Tagln3	transgelin 3	1450683_at
1.93	Ncl	nucleolin	1415773_at
1.92	---	---	1438774_s_at
1.92	Ctsb	cathepsin B	1448732_at

1.92	---	---	1441974_at
1.91	Sdbcag84	serologically defined breast cancer antigen 84	1423548_s_at
1.91	Slc6a17	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 17	1458394_at
1.91	1500011J06Rik	RIKEN cDNA 1500011J06 gene	1451640_a_at
1.90	Bzw1	basic leucine zipper and W2 domains 1	1450846_at
1.89	Acly	ATP citrate lyase	1425326_at
1.89	Dcamk11	double cortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like 1	1423125_at
1.86	Agt	angiotensinogen	1423396_at
1.86	1500001H12Rik	RIKEN cDNA 1500001H12 gene	1421349_x_at
1.85	Nqo3a2	NAD(P)H:quinone oxidoreductase type 3, polypeptide A2	1424048_a_at
1.84	Col3a1	procollagen, type III, alpha 1	1427883_a_at
1.83	Ly6g6e	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6E	1429833_at
1.83	Blmh	bleomycin hydrolase	1452101_at
1.83	Cot11	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	1436838_x_at
1.83	Vsn11	visinin-like 1	1450055_at
1.82	Hrmt112	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins methyltransferase-like 2 (S. cerevisiae)	1452787_a_at
1.82	Pde1a	phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	1449298_a_at
1.82	---	---	1436461_at
1.82	S100a6	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	1421375_a_at
1.81	Blnk	B-cell linker	1451780_at
1.81	Mki67	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67	1426817_at
1.81	Cd9	CD9 antigen	1416066_at
1.81	Ttc1	tetratricopeptide repeat domain 1	1416994_at
1.81	Epha4	Eph receptor A4	1456863_at
1.81	2410129E14Rik	RIKEN cDNA 2410129E14 gene	1449682_s_at
1.80	Cs	citrate synthase	1422577_at
1.78	Anxa6	annexin A6	1429246_a_at
1.77	Myl6	myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	1424269_a_at
1.76	Ccnb1	cyclin B1	1416076_at
1.75	1110018G07Rik	RIKEN cDNA 1110018G07 gene	1454721_at
1.75	---	---	1425467_a_at
1.75	Abca1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	1450392_at
1.74	Cdh13	cadherin 13	1454015_a_at
1.74	Spop	speckle-type POZ protein	1416525_at
1.74	Zadh1	zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 1	1451744_a_at
1.73	Col5a2	procollagen, type V, alpha 2	1422437_at
1.73	Dcamk11	double cortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like 1	1451917_a_at
1.73	Col4a1	procollagen, type IV, alpha 1	1452035_at
1.73	Epha4	Eph receptor A4	1421928_at
1.73	1500001H12Rik	RIKEN cDNA 1500001H12 gene	1421348_a_at
1.73	Snrpn	small nuclear ribonucleoprotein N	1421063_s_at
1.73	Ss18	synovial sarcoma translocation, Chromosome 18	1419361_at
1.72	6330403K07Rik	RIKEN cDNA 6330403K07 gene	1426766_at
1.71	Cct3	chaperonin subunit 3 (gamma)	1449645_s_at
1.71	Ndr3	N-myc downstream regulated gene 3	1417664_a_at
1.71	D030028O16Rik	RIKEN cDNA D030028O16 gene	1452034_at
1.71	2900027G03Rik	RIKEN cDNA 2900027G03 gene	1450080_at

1.71	Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	1460227_at
1.71	Eif3s10	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta)	1416661_at
1.70	Il6st	interleukin 6 signal transducer	1460295_s_at
1.70	Ddx46	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46	1424570_at
1.69	Syt11	synaptotagmin 11	1449264_at
1.69	2810409H07Rik	RIKEN cDNA 2810409H07 gene	1430053_a_at
1.69	---	---	1416630_at
1.68	A830010M20Rik	RIKEN cDNA A830010M20 gene	1438565_at
1.68	2210401K01Rik	RIKEN cDNA 2210401K01 gene	1427285_s_at
1.68	---	---	1459740_s_at
1.68	Gpsn2	glycoprotein, synaptic 2	1429681_a_at
1.67	Pa2g4	proliferation-associated 2G4	1423060_at
1.67	Zfp146	zinc finger protein 146	1422135_at
1.67	Chga	chromogranin A	1418149_at
1.67	S100a4	S100 calcium binding protein A4	1424542_at
1.67	Lin7c	lin 7 homolog c (C. elegans)	1449262_s_at
1.66	Ctsd	cathepsin D	1448118_a_at
1.66	Tuba7	tubulin, alpha 7	1416311_s_at
1.66	---	---	1443079_at
1.66	Sep6	septin 6	1420876_a_at
1.66	Rnf146	ring finger protein 146	1425713_a_at
1.65	---	---	1457142_at
1.64	Ppp1r3c	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	1425631_at
1.64	8430421H08Rik	RIKEN cDNA 8430421H08 gene	1453365_at
1.64	---	---	1446560_at
1.64	Cidea	cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A	1417956_at
1.64	Stip1	stress-induced phosphoprotein 1	1415909_at
1.64	C330007P06Rik	RIKEN cDNA C330007P06 gene	1454174_a_at
1.64	Cct7	chaperonin subunit 7 (eta)	1415817_s_at
1.64	Cks1	CDC28 protein kinase 1	1416698_a_at
1.63	Tra1	tumor rejection antigen gp96	1438040_a_at
1.63	Kpnb3	karyopherin (importin) beta 3	1426945_at
1.63	Rbm5	RNA binding motif protein 5	1452187_at
1.63	Als2cr3	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 3 homolog(human)	1429607_at
1.63	Prdx6	peroxiredoxin 6	1423223_a_at
1.63	Trpc4	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4	1423579_a_at
1.62	Psmc5	protease (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 5	1415740_at
1.62	Pfcp	phosphofructokinase, platelet	1430634_a_at
1.62	Gja1	gap junction membrane channel protein alpha 1	1415801_at
1.61	Scg2	secretogranin II	1450708_at
1.61	1110014F24Rik	RIKEN cDNA 1110014F24 gene	1428781_at
1.61	Cops6	COP9 (constitutive photomorphogenic) homolog, subunit 6 (Arabidopsis thaliana)	1451366_at
1.61	---	---	1437811_x_at
1.61	Rab18	RAB18, member RAS oncogene family	1420899_at
1.61	Mea1	male enhanced antigen 1	1437943_s_at
1.61	Ptn	pleiotrophin	1416211_a_at
1.61	MGC41689	hypothetical LOC211623	1452590_a_at
1.61	Lrrtm2	leucine rich repeat transmembrane neuronal 2	1455489_at

1.61	---	---	1436662_at
1.61	Dia1	diaphorase 1 (NADH)	1425329_a_at
1.61	B230106I24Rik	RIKEN cDNA B230106I24 gene	1435134_at
1.60	Col11a1	procollagen, type XI, alpha 1	1449154_at
1.60	Sepw1	selenoprotein W, muscle 1	1416521_at
1.60	Oprl1	opioid receptor-like 1	1422099_a_at
1.59	4122401K19Rik	RIKEN cDNA 4122401K19 gene	1430338_at
1.59	Cspg2	chondroitin sulfate proteoglycan 2	1421694_a_at
1.59	Pdlim1	PDZ and LIM domain 1 (elfin)	1416554_at
1.59	Pdgfra	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	1421916_at
1.59	Nupr1	nuclear protein 1	1419665_a_at
1.59	Dmp1	dentin matrix protein 1	1443746_x_at
1.59	Gna13	guanine nucleotide binding protein, alpha 13	1422556_at
1.58	6330415F13Rik	RIKEN cDNA 6330415F13 gene	1432417_a_at
1.58	---	---	1454694_a_at
1.58	Mic211	MIC2 (monoclonal Imperial Cancer Research Fund 2)-like 1	1456746_a_at
1.58	Sema3c	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	1420696_at
1.58	Casp3	caspase 3, apoptosis related cysteine protease	1426165_a_at
1.58	1700034P14Rik	RIKEN cDNA 1700034P14 gene	1430981_s_at
1.57	Lactb2	lactamase, beta 2	1425140_at
1.57	Banf1	barrier to autointegration factor 1	1421081_a_at
1.57	Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	1423754_at
1.56	---	---	1448296_x_at
1.56	Ccbl1	cysteine conjugate-beta lyase	1452678_a_at
1.56	Cd109	CD109 antigen	1425658_at
1.56	Otos	otospiralin	1426193_at
1.55	Slc7a4	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), member 4	1426068_at
1.55	9030624J02Rik	RIKEN cDNA 9030624J02 gene	1432304_a_at
1.55	Edil3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	1425622_at
1.55	Arfp2	ADP-ribosylation factor related protein 2	1438473_at
1.54	---	---	1439104_at
1.54	Col1a1	procollagen, type I, alpha 1	1423669_at
1.54	Sv2b	synaptic vesicle glycoprotein 2 b	1435687_at
1.54	Lamp2	lysosomal membrane glycoprotein 2	1416343_a_at
1.54	Hmgb2	high mobility group box 2	1452534_a_at
1.53	Racgap1	Rac GTPase-activating protein 1	1421546_a_at
1.53	Hnrpr	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	1452030_a_at
1.53	Aldoa	aldolase 1, A isoform	1434799_x_at
1.52	Dhrs1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1	1415677_at
1.52	Cfl1	cofilin 1, non-muscle	1448346_at
1.52	Vps33a	vacuolar protein sorting 33A (yeast)	1453742_at
1.52	C4	complement component 4 (within H-2S)	1418021_at
1.52	Dhrs1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1	1415677_at
1.52	Dnajc6	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6	1431216_s_at
1.52	Cd1d1	CD1d1 antigen	1449130_at
-1.50	---	15 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D930002I12 product:unclassifiable, full insert sequence	1456130_at
-1.50	Gadd45b	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	1449773_s_at

-1.50	Ier2	immediate early response 2	1416442_at
-1.51	---	---	1425898_x_at
-1.51	Clp1	cardiac lineage protein 1	1425937_a_at
-1.51	Fzd2	frizzled homolog 2 (Drosophila)	1418534_at
-1.51	A1553587 /// Ppp3r1	expressed sequence A1553587 /// protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform (calcineurin B, type I)	1450368_a_at
-1.52	6330415B21Rik	RIKEN cDNA 6330415B21 gene	1430791_at
-1.52	Gabra5	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 5	1433602_at
-1.52	Aldh1a1	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1	1416468_at
-1.52	---	---	1435589_at
-1.52	---	---	1436763_a_at
-1.52	Inha	inhibin alpha	1422728_at
-1.52	---	16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9630047A19 product:unknown EST, full insert sequence	1443855_at
-1.52	Lin7b	lin 7 homolog b (C. elegans)	1418683_at
-1.52	AA408868	expressed sequence AA408868	1417483_at
-1.52	---	---	1438068_at
-1.53	Dnaja4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	1434196_at
-1.53	Gabra1	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 1	1455766_at
-1.53	C030032C09Rik	RIKEN cDNA C030032C09 gene	1457990_at
-1.53	---	---	1428675_at
-1.53	Pop5	processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP family (S. cerevisiae)	1417972_s_at
-1.53	---	9 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D030066L21 product:unclassifiable, full insert sequence	1435846_x_at
-1.53	Ogn	osteolectin	1419663_at
-1.53	Plagl1	pleiomorphic adenoma gene-like 1	1426208_x_at
-1.53	---	---	1416965_at
-1.53	---	---	1456898_at
-1.54	---	---	1418901_at
-1.54	---	---	1436237_at
-1.54	Ddn	dendrin	1436268_at
-1.54	1700040I03Rik	RIKEN cDNA 1700040I03 gene	1429122_a_at
-1.54	Sdccag33l	serologically defined colon cancer antigen 33 like	1428026_at
-1.54	Sod3	superoxide dismutase 3, extracellular	1417633_at
-1.54	---	Adult male corpus striatum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C030023B07 product:unknown EST, full insert sequence	1460043_at
-1.54	---	---	1445479_at
-1.54	---	---	1444693_at
-1.54	Coch	coagulation factor C homolog (Limulus polyphemus)	1423285_at
-1.54	Syt14l	synaptotagmin 14-like	1434429_at
-1.54	---	---	1439750_at
-1.54	Fzd2	frizzled homolog 2 (Drosophila)	1418533_s_at
-1.54	C130038G02Rik	RIKEN cDNA C130038G02 gene	1432205_a_at
-1.54	Bcl11b	B-cell leukemia/lymphoma 11B	1450339_a_at
-1.55	Egr4	early growth response 4	1449977_at
-1.55	Matn4	matrilin 4	1418464_at
-1.55	Cbr3	carbonyl reductase 3	1427912_at
-1.55	Zfp145	zinc finger protein 145	1419874_x_at

-1.55	Btg3	B-cell translocation gene 3	1449007_at
-1.55	9030425E11Rik	RIKEN cDNA 9030425E11 gene	1448250_at
-1.56	C030027L06Rik	RIKEN cDNA C030027L06 gene	1458622_at
-1.56	---	10 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B930004G13 product:unknown EST, full insert sequence	1442561_at
-1.56	---	---	1442445_at
-1.56	Rasd2	RASD family, member 2	1427344_s_at
-1.56	Cacng2	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 2	1420596_at
-1.56	B230206N24Rik	RIKEN cDNA B230206N24 gene	1438500_at
-1.56	2900078E11Rik	RIKEN cDNA 2900078E11 gene	1429211_at
-1.56	---	---	1443805_at
-1.56	Syt7	synaptotagmin 7	1441927_at
-1.56	---	Similar to hypothetical protein FLJ10432 (LOC234374), mRNA	1435681_s_at
-1.56	---	---	1460081_at
-1.57	Klf4	Kruppel-like factor 4 (gut)	1417394_at
-1.57	---	---	1437214_at
-1.57	Arntl	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	1425099_a_at
-1.57	Wnt4	wingless-related MMTV integration site 4	1450782_at
-1.57	BC055811	cDNA sequence BC055811	1433950_at
-1.57	---	---	1458407_s_at
-1.57	Cbfa2t3h	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2, translocated to, 3 homolog (human)	1418582_at
-1.57	Cap2	CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)	1450910_at
-1.57	Zf	HCF-binding transcription factor Zhangfei	1425698_a_at
-1.57	Igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4	1437405_a_at
-1.57	E230008J23Rik	RIKEN cDNA E230008J23 gene	1439571_at
-1.57	2700061N24Rik	RIKEN cDNA 2700061N24 gene	1452621_at
-1.57	A030009H04Rik	RIKEN cDNA A030009H04 gene	1448952_at
-1.57	Moxd1	monooxygenase, DBH-like 1	1422643_at
-1.58	Lor	loricrin	1448745_s_at
-1.58	9930033H14Rik	RIKEN cDNA 9930033H14 gene	1424645_at
-1.58	Negr1	neuronal growth regulator 1	1456392_at
-1.58	Gda	guanine deaminase	1435749_at
-1.58	Rasgrf1	RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	1435614_s_at
-1.58	4933439C10Rik	RIKEN cDNA 4933439C10 gene	1452696_a_at
-1.58	Rab8b	RAB8B, member RAS oncogene family	1426799_at
-1.59	Ttc14	tetratricopeptide repeat domain 14	1426544_a_at
-1.60	---	---	1427844_a_at
-1.60	Pou3f1	POU domain, class 3, transcription factor 1	1422068_at
-1.60	---	---	1433707_at
-1.60	Itpr1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1	1460203_at
-1.61	Abhd8	abhydrolase domain containing 8	1416863_at
-1.61	Bin1	bridging integrator 1	1425532_a_at
-1.61	Klf13	Kruppel-like factor 13	1432543_a_at
-1.61	---	---	1420191_s_at
-1.61	---	---	1459746_at
-1.61	---	---	1432198_at
-1.61	1810006K23Rik	RIKEN cDNA 1810006K23 gene	1456609_at
-1.61	Prkcbp1	protein kinase C binding protein 1	1426614_at
-1.61	Fosl2	fos-like antigen 2	1437247_at

-1.62	Cntnap2	contactin associated protein-like 2	1437782_at
-1.62	---	Similar to dJ259A10.1 (ssDNA binding protein (SEB4D)) (LOC380843), mRNA	1456180_at
-1.62	---	15 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D930035P11 product:unknown EST, full insert sequence	1455324_at
-1.62	Kcnp2	Kv channel-interacting protein 2	1436275_at
-1.62	---	---	1442025_a_at
-1.63	4933432P15Rik	RIKEN cDNA 4933432P15 gene	1435694_at
-1.63	4930428B01Rik	RIKEN cDNA 4930428B01 gene	1430516_at
-1.63	Kcnp2	Kv channel-interacting protein 2	1425870_a_at
-1.64	1110033J19Rik	RIKEN cDNA 1110033J19 gene	1452730_at
-1.64	Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	1438796_at
-1.64	---	---	1441693_at
-1.64	---	Similar to Lactase-phlorizin hydrolase precursor (Lactase-glycosylceramidase) (LOC226413), mRNA	1439479_at
-1.64	Hspa1a	heat shock protein 1A	1452388_at
-1.66	Egr2	early growth response 2	1427683_at
-1.66	---	---	1456934_at
-1.66	Mlstd1	male sterility domain containing 1	1435621_at
-1.67	Car10	carbonic anhydrase 10	1424547_at
-1.67	Junb	Jun-B oncogene	1415899_at
-1.68	Htr5b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B	1422196_at
-1.68	Fmod	fibromodulin	1456084_x_at
-1.68	Mbnl2	muscleblind-like 2	1436858_at
-1.68	Frzb	frizzled-related protein	1448424_at
-1.68	Dusp6	dual specificity phosphatase 6	1415834_at
-1.68	---	---	1437707_at
-1.68	Mgat4b	mannoside acetylglucosaminyltransferase 4, isoenzyme B	1424720_at
-1.69	D16Bwg1494e	DNA segment, Chr 16, Brigham & Women's Genetics 1494 expressed	1449770_x_at
-1.69	Robo3	roundabout homolog 3 (Drosophila)	1436634_at
-1.69	9330120H11Rik	RIKEN cDNA 9330120H11 gene	1457671_at
-1.70	---	---	1447771_at
-1.71	---	---	1449980_a_at
-1.71	1110007H17Rik	RIKEN cDNA 1110007H17 gene	1435780_at
-1.72	Apeg1	aortic preferentially expressed gene 1	1448664_a_at
-1.72	Homer2	homer homolog 2 (Drosophila)	1424367_a_at
-1.73	Ssbp4	single stranded DNA binding protein 4	1449511_a_at
-1.73	---	---	1438423_at
-1.74	Cpne8	copine VIII	1431146_a_at
-1.75	Car11	carbonic anhydrase 11	1424379_at
-1.76	Nr4a2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	1447863_s_at
-1.76	Icam5	intercellular adhesion molecule 5, telencephalin	1418619_at
-1.76	Zmy1	zinc finger, MYM domain containing 1	1428052_a_at
-1.76	Nr4a1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	1416505_at
-1.78	---	hypothetical protein 9630027E11	1440177_at
-1.79	Dusp1	dual specificity phosphatase 1	1448830_at
-1.80	Cadps2	Ca ²⁺ -dependent activator protein for secretion 2	1451499_at
-1.81	Igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4	1423756_s_at
-1.82	Cbln1	cerebellin 1 precursor protein	1423287_at

-1.82	C1qtnf4	C1q and tumor necrosis factor related protein 4	1417050_at
-1.83	Fibcd1	fibrinogen C domain containing 1	1435482_at
-1.84	Nr4a2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	1450750_a_at
-1.85	Crlf1	cytokine receptor-like factor 1	1418476_at
-1.85	Nxf	bHLH-PAS type transcription factor NXF	1459372_at
-1.87	Ifi203	interferon activated gene 203	1426906_at
-1.89	Cabp1	calcium binding protein 1	1421255_a_at
-1.90	Slc12a5	solute carrier family 12, member 5	1425337_at
-1.97	Ptgds	prostaglandin D2 synthase (brain)	1423860_at
-2.04	Hspa1a /// Hspa1b	heat shock protein 1A /// heat shock protein 1B	1427127_x_at
-2.06	---	---	1443287_at
-2.06	---	---	1456174_x_at
-2.11	---	---	1440148_at
-2.12	Hspa1b	heat shock protein 1B	1427126_at
-2.14	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	1423100_at
-2.17	Arc	activity regulated cytoskeletal-associated protein	1418687_at
-2.19	Camkk2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta	1455401_at
-2.22	Itpka	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A	1424037_at
-2.43	Camkk2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta	1424475_at
-2.58	Egr3	early growth response 3	1436329_at
-2.61	5730453H04Rik	RIKEN cDNA 5730453H04 gene	1435494_s_at
-2.69	---	---	1455034_at
-2.76	---	---	1417065_at
-2.79	Rasd1	RAS, dexamethasone-induced 1	1423619_at
-2.90	Doc2b	double C2, beta	1420667_at
-3.11	---	---	1436387_at

Tab. 5: In Affymetrix-Analyse signifikant regulierte Transkripte in adulten P-M2-Mutanten

n-fache Expressionänderung	Gen-Symbol	Name	Affymetrix-ID
18.62	Ttr	transthyretin	94756_at
3.15	Gfap	glial fibrillary acidic protein	92545_f_at
2.54	Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	97890_at
2.50	Hist2h2aa1	histone 2, H2aa1	101561_at
1.98	C4	complement component 4 (within H-2S)	93023_f_at
1.89	Mt1	metallothionein 1	93573_at
1.83	Hist1h3a /// Hist1h3f /// Hist1h3g /// Hist2h3c2 /// Hist1h3c /// Hist1h3d	histone 1, H3a /// histone 1, H3f /// histone 1, H3g /// histone 2, H3c2 /// histone1, H3c /// histone1, H3d	103033_at
1.76	Mt2	metallothionein 2	93067_f_at
1.70	Sgk	serum/glucocorticoid regulated kinase	97317_at
1.63	Ptgds	prostaglandin D2 synthase (brain)	94143_at
1.56	Hist2h3c2	histone 2, H3c2	95350_at

Tab. 6: In Affymetrix-Analyse signifikant regulierte Transkripte in adulten P-M2/1-Mutanten

n-fache Expressionänderung	Gen-Symbol	Name	Affymetrix-ID
6.25	Ttr	transthyretin	95350_at
4.73	-----	11 days pregnant adult female ovary and uterus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5031412D17 product:interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3, full insert sequence	93956_at
3.89	C4	complement component 4 (within H-2S)	103033_at
3.49	Gfap	glial fibrillary acidic protein	94144_g_at
3.32	Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	100981_at
3.30	---	---	161511_f_at
2.58	B2m	beta-2 microglobulin	93088_at
2.34	Tgtp	T-cell specific GTPase	102906_at
2.33	C920025E04Rik /// H2-T23	RIKEN cDNA C920025E04 gene /// histocompatibility 2, T region locus 23	98472_at
2.30	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1	101465_at
2.28	H2-K1	histocompatibility 2, K1, K region	93120_f_at
2.26	H2-L /// H2-D1	histocompatibility 2, D region /// histocompatibility 2, D region locus 1	97541_f_at
2.22	G1p2	interferon, alpha-inducible protein	98822_at
2.15	H2-D1	histocompatibility 2, D region locus 1	97540_f_at
2.09	Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional protease 7)	102791_at
2.08	Lgals3bp	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	97507_at
2.07	AW111922	expressed sequence AW111922	96764_at
2.06	Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	160253_at
2.05	Gbp2	guanylate nucleotide binding protein 2	104597_at
2.04	Ctss	cathepsin S	98543_at
1.98	---	---	103202_at
1.97	H2-L	histocompatibility 2, D region	101886_f_at
1.97	---	---	98438_f_at
1.91	Hist2h2aa1	histone 2, H2aa1	93067_f_at
1.84	Usp18	ubiquitin specific protease 18	95024_at
1.83	Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	97317_at
1.80	Mt2	metallothionein 2	101561_at
1.80	---	---	102161_f_at
1.79	S100a6	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	92770_at
1.77	Mt1	metallothionein 1	93573_at
1.75	Zic1	Zic family member 1 (odd-paired homolog, Drosophila)	104169_at
1.74	D12Ert647e	DNA segment, Chr 12, ERATO Doi 647, expressed	93775_at
1.70	Ctsz	cathepsin Z	92633_at
1.67	---	---	92614_at
1.65	---	---	93714_f_at
1.64	2310061N23Rik	RIKEN cDNA 2310061N23 gene	92718_at
1.64	C1qa	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	98562_at
1.63	C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	96020_at
1.60	Actb	actin, beta, cytoplasmic	101578_f_at

1.59	---	Diabetic nephropathy-related gene 1 mRNA, partial sequence	100880_at
1.57	H2-Q1	histocompatibility 2, Q region locus 1	99378_f_at
1.57	Ifi1	interferon inducible protein 1	97409_at
1.56	Osmr	oncostatin M receptor	102255_at
1.55	Tyrobp	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	100397_at
1.55	---	Similar to H2-Q10 protein (LOC381094), mRNA	97173_f_at
1.53	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	93858_at
1.52	Isgf3g	interferon dependent positive acting transcription factor 3 gamma	103634_at
-1.53	Pitpnb	phosphatidylinositol transfer protein, beta	102696_s_at
-1.55	Epha7	Eph receptor A7	92906_at
-1.62	Arf3	ADP-ribosylation factor 3	96587_at
-1.67	Crlf1	cytokine receptor-like factor 1	161046_at
-1.76	---	---	98579_at
-1.81	---	---	103721_at
-1.89	Gfra2	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2	92449_at
-1.93	Btbd3	BTB (POZ) domain containing 3	95393_at
-2.02	Camk2a	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	93659_at
-2.32	---	Similar to Lactase-phlorizin hydrolase precursor (Lactase-glycosylceramidase) (LOC226413), mRNA	104018_at
-3.44	5730453H04Rik	RIKEN cDNA 5730453H04 gene	94247_at

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dirk Isbrandt für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die sehr hilfreichen Diskussionen und die exzellente Betreuung. Außerdem möchte ich mich für die Eröffnung neuer Horizonte bedanken.

Prof. Dr. Olaf Pongs danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit unter den hervorragenden Bedingungen am Institut für Neurale Signalverarbeitung am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Erhard Kranz danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Dr. Ileana Hanganu-Opatz möchte ich mich für das Einweihen in die Geheimnisse der *in vivo* Elektrophysiologie bedanken.

Dr. Axel Neu danke ich für die anregenden Gespräche und die Durchführung der *in vitro* Elektrophysiologie.

Ganz besonders möchte ich mich bei Hille Voss für die Versorgung, das Verpaaren der Mäuse und ihr offenes Ohr bedanken.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Neurale Signalverarbeitung für das nette Arbeitsklima, die stete Bereitschaft zur Unterstützung und Diskussionen bedanken.

Mein ganz spezieller Dank gilt Jacqueline Alig, Sönke Hornig, Christoph Ogradowczyk und Kathrin Sauter für die sehr schönen Jahre und das Durchleben all ihrer Hochs und Tiefs. Dafür möchte ich auch Stefan Schillemeit danken und zusätzlich für das endlose Zählen. Ronny Eichler danke ich für die Nachfolge bei der Behandlung der Mäuse.

Ich bin Dr. Alexander Schulte sehr dankbar für das Durchstehen der Zeit, in der diese Arbeit zustande kam und für seine Unterstützung bei allen Problemen.

Mein persönlicher Dank gilt meinen Eltern und meinen Schwestern, die mich in jeder Hinsicht all die Jahre unterstützt haben.