

Charakterisierung und pharmakologische
Behandlung der M-Strom-defizienten
Maus (*Mus musculus*, Linnaeus 1758) *KCNQ2*^{Nmf134}
als Modell neonataler Epilepsien

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie der
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von Daniel Milkereit
aus Neumünster

Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. D. ISBRANDT
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Priv. Doz. Dr. S. HOFFMEISTER-ULLERICH
Tag der Disputation: 19. April 2013

Hamburg, den 04. April 2013



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Zusammenfassung

Die Ionenkanaluntereinheiten $K_V7.2$ und $K_V7.3$ bilden heteromere, spannungsabhängige Kaliumkanäle, die im Gehirn den sogenannten M-Strom vermitteln. Wird dieser hyperpolarisierende, auch bei Ruhemembranpotentialen aktive Strom durch Mutationen der entsprechenden Gene *KCNQ2* und *KCNQ3* beeinträchtigt, kann es im Menschen zur Ausbildung neonataler Epilepsien kommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das *KCNQ2^{Nmf134}*-Mausmodell untersucht, in dem eine chemisch induzierte Punktmutation für den Aminosäureaustausch von Valin 182 durch Methionin verantwortlich ist. Homozygote *KCNQ2^{V182M/V182M}*-Mäuse zeigten spontane Krampfanfälle, die zu einer stark erhöhten Letalität führten. Des Weiteren wiesen sie ein reduziertes Körpergewicht bei ebenfalls reduzierter Körpergröße auf.

Die biophysikalische Charakterisierung des spannungsabhängigen Öffnungsverhaltens heteromerer $K_V7.2^{V182M}/K_V7.3$ -Kanäle mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in *Xenopus laevis*-Oocyten zeigte eine Verschiebung der Aktivierung in Richtung positiverer Membranpotentiale.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden war die zelluläre Erregbarkeit hippocampaler CA1-Neurone von *KCNQ2^{V182M/+}*- und *KCNQ2^{V182M/V182M}*-Mäusen erhöht. Spannungsklemme-Experimente zeigten auch hier eine Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit hippocampaler M-Kanäle.

Die Übererregbarkeit auf zellulärer Ebene war auf Netzwerkebene mit einer erhöhten hippocampalen Aktivität in *in vivo*-Ableitungen neonataler *KCNQ2^{V182M/V182M}*-Mäuse assoziiert. In Verhaltenstests zeigten adulte *KCNQ2^{V182M/+}*- und *KCNQ2^{V182M/V182M}*-Tiere eine erhöhte lokomotorische Aktivität und eine Beeinträchtigung des hippocampusabhängigen Arbeitsgedächtnisses.

Die postnatale Behandlung mit dem selektiven M-Kanal-Öffner Retigabin beeinflusste sowohl die Überlebensrate, als auch die Gewichtsentwicklung homozygoter *KCNQ2^{V182M/V182M}*-Tiere positiv. Durch den NKCC1-Blocker Bumetanid ließ sich ebenfalls die Letalität reduzieren, das Auftreten beobachteter spontaner Krampfanfälle in der Neonatalperiode konnte im Trend reduziert werden. Die Gewichtsentwicklung blieb jedoch unbeeinflusst. Die durch die Mutation *KCNQ2^{V182M}* erhöhte Bewegungsaktivität in adulten Mäusen konnte darüber hinaus durch die neonatale Behandlung mit Bumetanid verhindert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern die erste umfassende Charakterisierung des *KCNQ2^{Nmf134}*-Mausmodells auf zellulärer, Netzwerk- und Verhaltensebene. Darüber hinaus geben sie Hinweise auf die Rolle von M-Kanälen in der neonatalen Entwicklung des Gehirns und mögliche neue Behandlungsstrategien neonataler Epilepsien.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Epilepsien	6
1.2	Neuronale Zellverbände und Netzwerkaktivität	8
1.3	Ionenkanäle	9
1.3.1	Spannungsabhängige K_V7 -Kaliumkanäle	10
1.4	Vorhandene Tiermodelle für Epilepsien	12
1.5	Aktuelle Behandlungsoptionen neonataler Epilepsien	14
1.6	Ziel der Arbeit	15
2	Material	16
2.1	Mauslinien	16
2.2	Puffer und Lösungen	16
2.3	Chemikalien und Substanzen	17
2.4	Kits, Enzyme	19
2.5	Antikörper	19
2.6	Oligonukleotide und Plasmide	19
2.7	Verbrauchsmittel	20
2.8	Geräte	21
2.9	Software	22
3	Methoden	23
3.1	Mauszucht	23
3.2	Molekularbiologische Methoden	23
3.2.1	Genotypisierung der verwendeten Mäuse	23
3.2.1.1	Lyse der Biopsien	23
3.2.1.2	Genotypisierungs-PCR mit TaqMan [®] -Sonden	24
3.2.2	Erzeugung von cRNA zur Injektion in <i>Xenopus laevis</i> -Oocyten	24
3.2.2.1	Linearisierung der Plasmide	24
3.2.2.2	cRNA-Synthese	24
3.2.2.3	Bestimmung der cRNA-Konzentration	25
3.2.3	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR	25
3.2.3.1	RNA-Isolierung	25
3.2.3.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	26
3.2.3.3	Reverse Transkription	26

3.2.3.4	<i>Real Time-PCR</i>	26
3.3	Biochemische Methoden	26
3.3.1	Färbung von Hirnschnitten	26
3.3.1.1	Perfusion von Mäusen	27
3.3.1.2	Anfertigung von Hirnschnitten	27
3.3.1.3	Nissl-Färbung	27
3.3.1.4	Antikörperfärbung mit DAB	27
3.4	Elektrophysiologische Methoden	28
3.4.1	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in <i>Xenopus laevis</i> -Oocyten	28
3.4.1.1	Injektion von cRNA	28
3.4.1.2	Elektrophysiologische Messungen	29
3.4.2	Elektrophysiologie in Hirnschnitten	29
3.4.2.1	Präparation von Hirnschnitten aus der Maus für die Elektrophysiologie	30
3.4.2.2	Spannungsklemme-Analyse	30
3.4.2.3	Stromklemme-Analyse	30
3.4.3	Telemetrische ECoG-Ableitungen adulter Mäuse	31
3.4.4	<i>In vivo</i> -Ableitungen mit Tiefenelektroden in neonatalen Mäusen	32
3.5	Verhaltensanalytische Methoden	33
3.5.1	<i>Elevated Plus Maze</i>	33
3.5.2	<i>Grip Strength-Test</i>	34
3.5.3	<i>Rotarod</i>	34
3.5.4	<i>Y Maze (Spontaneous Alternation)</i>	34
3.5.5	<i>Water Maze</i>	34
3.5.6	<i>One-Trial Spatial Learning-Test</i>	35
3.5.7	<i>Contextual Fear Conditioning</i>	36
3.5.8	<i>Open Field</i>	36
3.6	Pharmakologische Behandlung von Mäusen	37
3.6.1	Postnatale Behandlung von Mäusen der Linie <i>KCNQ2^{Nmf134}</i>	37
3.6.2	Kombinierte prä- und postnatale Behandlung von Mäusen der Linie <i>KCNQ2^{Nmf134}</i>	37
3.7	Analytische Methoden	37
3.7.1	Dokumentation von Körpergewicht und -größe der verwendeten Versuchstiere	37
3.7.2	Analyse der Überlebensrate verwendeter Versuchstiere	38
3.7.3	Analyse der Häufigkeit beobachteter Krampfanfälle	38
3.8	Statistische Methoden	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Die Mutation <i>KCNQ2^{V182M}</i> führte zu einer gestörten Entwicklung und erhöhter Mortalität im Mausmodell	40

4.2	Die erhöhte Sterblichkeit homozygoter <i>KCNQ2</i> ^{V182M/V182M} -Mäuse war auf letale Krampfanfälle zurückzuführen	42
4.3	K _V 7.2/7.3 vermittelte Ströme wurden durch die Mutation <i>KCNQ2</i> ^{V182M} beeinträchtigt	43
4.4	CA1-Neuronen von mutierten Mäusen der Linie <i>KCNQ2</i> ^{Nmf134} zeigten geringere M-Strom-Amplituden und eine erhöhte Erregbarkeit	45
4.5	Die Gehirne mutierter <i>KCNQ2</i> ^{V182M/V182M} -Mäuse zeigten weder morphologische noch histologische Veränderungen	47
4.6	Die Expression des mutierten Allels war im Gehirn von heterozygoten <i>KCNQ2</i> ^{V182M/+} -Mäusen geringer als die des Wildtyp-Allels	49
4.7	Das Verhalten von heterozygot mutierten <i>KCNQ2</i> ^{V182M/+} -Mäusen zeigte Veränderungen	50
4.8	Das Verhalten von heterozygot und homozygot mutierten CD1- <i>KCNQ2</i> ^{Nmf134} -Mäusen zeigte ebenfalls deutliche Veränderungen	54
4.9	Die Netzwerkaktivität im Hippocampus von <i>KCNQ2</i> ^{V182M/V182M} -Mäusen war erhöht	57
4.10	Retigabin führte zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit von heteromeren K _V 7.2/7.3-Kanälen	59
4.11	In CA1-Neuronen von <i>KCNQ2</i> ^{Nmf134} -Mäusen bewirkte Retigabin eine erhöhte M-Strom-Amplitude und eine reduzierte Erregbarkeit	61
4.12	Die neonatale Behandlung mit Retigabin beeinflusste die Überlebensrate und den Entwicklungsphänotyp homozygoter <i>KCNQ2</i> ^{V182M/V182M} -Mäuse positiv, Bumetanid hatte Einfluss auf das Überleben	64
4.13	Die zusätzliche pränatale Behandlung von <i>KCNQ2</i> ^{V182M/V182M} -Mäusen mit Retigabin brachte keinen klar erkennbaren Nutzen	71
4.14	Die neonatale Behandlung mit Bumetanid führte zu einem verminderten Auftreten von neonatalen Krampfanfällen in homozygoten <i>KCNQ2</i> ^{V182M/V182M} -Mäusen	75
4.15	Die Behandlung mit Bumetanid hatte positive Auswirkungen auf den Verhaltensphänotyp	76
5	Diskussion	80
5.1	Die Mauslinie <i>KCNQ2</i> ^{Nmf134} als Tiermodell für neonatale Epilepsien	80
5.1.1	Leitungseigenschaften heteromerer K _V 7.2/K _V 7.3-Kanäle und die Mutation <i>KCNQ2</i> ^{V182M}	81
5.1.2	M-Strom im Gehirn von <i>KCNQ2</i> ^{Nmf134} -Mäusen	82
5.1.3	Krampfanfälle und Entwicklungsdefizit durch die Mutation <i>KCNQ2</i> ^{V182M}	85
5.1.4	Netzwerkaktivität und Verhalten	87
5.2	Behandlung neonataler Epilepsien - Retigabin oder Bumetanid?	89
5.2.1	Behandlung mit Retigabin	89
5.2.2	Behandlung mit Bumetanid	90
5.3	Ausblick	91

1 Einleitung

1.1 Epilepsien

Epilepsien umfassen ein breites Spektrum verschiedener krampfassoziierter Syndrome und Erkrankungen [39]. Bei allen handelt es sich um eine chronische Störung der Hirnfunktion, die wie folgt definiert wird: „Ein epileptischer Anfall ist das vorübergehende Auftreten von krankhaften Befunden und/oder Symptomen aufgrund einer pathologisch exzessiven oder synchronen neuronalen Aktivität im Gehirn. Epilepsie ist eine Störung des Gehirns, die durch eine dauerhafte Neigung zur Entwicklung epileptischer Anfälle sowie durch die neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Konsequenzen dieses Zustands gekennzeichnet ist. Die Definition einer Epilepsie setzt das Auftreten mindestens eines epileptischen Anfalls voraus.“ [43]. Vereinzelt auftretende Krampfanfälle, von denen bis zu 10% der Weltbevölkerung betroffen sind, werden nicht automatisch als Epilepsie bezeichnet, wenn nicht eine weiterhin bestehende Prävalenz für erneut auftretende Krampfanfälle gegeben ist. Von akuten epileptischen Erkrankungen betroffen sind weltweit etwa 0,5-2% aller Menschen. Das entspricht laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) einer Gesamtzahl von rund 50 Millionen [147].

Dabei spielen die Umstände, unter denen eine Epilepsie entstehen kann, eine entscheidende Rolle. So werden grundsätzlich idiopathische von symptomatischen Epilepsien unterschieden, neben solchen, die sich keiner Kategorie zuordnen lassen und als kryptogen bezeichnet werden [39]. Bei den idiopathischen, die etwa 60% aller Epilepsien umfassen [33], ist keine äußerliche Ursache für die Erkrankung auszumachen. In diesen Fällen sind genetische Defekte oder Dispositionen für die Ausbildung der Epilepsie verantwortlich. Symptomatische Epilepsien sind hingegen auf ein schädigendes Ereignis oder eine ursächliche Erkrankung zurückzuführen. So können verschiedenste Schädigungen des Gehirns Ursache für die Ausbildung einer sogenannten sekundären Epilepsie sein [147]. Beispiele hierfür sind zum Einen mechanische Einflüsse wie Schädel-Hirn-Traumata oder auch größere Tumore, sowie durch Sauerstoffmangel bedingte Schädigungen, die z.B. in Neugeborenen durch Komplikationen bei der Geburt oder durch einen Schlaganfall ausgelöst werden können. Weitere Ursachen sind Infektionen oder Entzündungen z.B. der Hirnhäute [5], oder andere Erkrankungen wie Alzheimer oder Multiple Sklerose [103, 131].

Eine Herausforderung stellt, aufgrund der vielfältigen Ursachen und Ausprägungen, die Unterscheidung und Klassifizierung epileptischer Erkrankungen dar. Grundlage für die Diagnose und Einordnung der jeweiligen Erkrankung bilden hauptsächlich die 1981 und 1989 von der *International League Against Epilepsy* (ILEA) veröffentlichten Empfehlungen [7, 100]. Neue Erkenntnisse und ein erweitertes Krankheitsspektrum haben die ILAE jedoch dazu veranlasst im letzten Jahrzehnt einige Verbesserungs- und Erweiterungsvorschläge auszuarbeiten [39, 15]. Die-

se werden jedoch weiterhin kritisch diskutiert [16, 102].

Grundsätzlich wird zwischen einzelnen Krampfanfällen, dem sich daraus ergebenden epileptischen Syndrom, und einer eventuell zugrunde liegenden Krankheit unterschieden [39]. Wichtige Kriterien zur Beurteilung sind hierbei die Unterscheidung in selbstlimitierende und anhaltende und in lokale bzw. fokale und primär oder sekundär generalisierte Anfälle. Ein weiteres Kriterium ist der Zeitpunkt des Auftretens des ersten Krampfanfalls. Die Lokalisation des betroffenen Hirnareals ist ebenfalls sowohl in diagnostischer, als auch therapeutischer Hinsicht von Bedeutung [40]. Außerdem kann es Auslösefaktoren wie z.B. optische oder akustische Reize und generelle Ursachen wie genetische Dispositionen oder zugrundeliegende Erkrankungen und Ereignisse geben [66].

Die Beschreibung und das Verständnis epileptischer Erkrankungen im sich entwickelnden Gehirn stellt eine besondere Herausforderung dar [13]. Neonatale Krampfanfälle sind oft ein Hinweis auf eine gestörte Entwicklung des Gehirns, welche unterschiedliche Ursachen haben kann. Dabei können sowohl genetische Dispositionen, als auch prä- oder postnatale Ereignisse eine Rolle spielen [118]. Außerdem sind neonatale Krampfanfälle oft auch ein Hinweis auf spätere Fehlentwicklungen oder Störungen [31]. Die Wahrscheinlichkeit einen Krampf zu erleiden, ist in der Neonatalperiode weit größer als in anderen Lebensphasen [124]. Die Zahlen reichen dabei von 1,8-3,5 Fällen auf 1000 Neugeborene nach einem normalen Schwangerschaftsverlauf, bis zu 58-132 Fällen auf 1000 Frühgeborene [134]. Dabei sind auch die Diagnose- und Definitionskriterien von Bedeutung, da es sowohl klinisch relevante Anfälle gibt, die elektroneutral sind, also keine Auffälligkeiten im Elektroenzephalogramm (EEG) zeigen, als auch im EEG sichtbare abnormale Neuronenaktivität, die zu keinen erkennbaren krampfähnlichen Symptomen führt [47]. Neonatale Krampfanfälle sind häufig auch Symptom und/oder Ursache einer allgemeinen Enzephalopathie [32].

Liegen der Entstehung von epileptischen Erkrankungen stets pathologische Veränderungen zugrunde, muss auch berücksichtigt werden, dass ein fortschreitendes Auftreten von Krampfanfällen eine Reihe weiterer pathologischer Veränderungen mit sich bringen kann [127, 133]. Durch die Überbelastung einer ständig erhöhten Aktivität können Nervenzellen in entscheidendem Maße absterben [54]. Dadurch wiederum können eine Reihe zellulärer Veränderungen oder auch inflammatorischer Prozesse initiiert werden, die das Krankheitsbild verschärfen und zur Epileptogenese beitragen [46].

So ist eine Epilepsie nicht nur Ausdruck einer krankhaften Störung, sondern kann diese auch massiv verstärken und selbst in fortschreitenden neurodegenerativen Prozessen zum Auslöser weiterer Symptome werden. Gerade in der Entwicklung befindliche Nervensysteme können dadurch massiv gestört werden; weitere Fehlentwicklungen sind die Folge. Eine pharmakologische Kontrolle der epileptischen Aktivität ist daher wichtig und gerade bei neonatalen Epilepsien von besonderer Bedeutung [17]. Im schlimmsten Fall kann es, wenn ein akuter Krampfanfall nicht von selbst endet und nicht behandelt werden kann, zu einem Auftreten des sogenannten *Status Epilepticus* kommen. Dabei führt ein per Definition mindestens fünf Minuten dauernder generalisierter Krampfanfall möglicherweise zu einer dauerhaften Schädigung des Gehirns oder sogar zum Tode [84, 46]. Folgen einer unbehandelten Epilepsie im Kindesalter können aber auch

allgemeine Entwicklungsdefizite und kognitive Störungen sein [107, 17]. Das Risiko, wiederkehrende Krampfanfälle im Erwachsenenalter oder sogar einen tödlichen Anfall zu erleiden, kann ebenfalls stark erhöht sein [1]. Es gibt aber auch krampfassozierte Erkrankungen im Neugeborenenalter wie die *Benign Familial Neonatal Convulsions* (BFNC), die weniger dauerhaften Schaden anzurichten scheinen als andere Epilepsien [112, 111].

Grundsätzlich ist allen epileptischen Krampfanfällen gemein, dass sie Ausdruck einer abnormal synchronen Aktivität großer Gruppen von Nervenzellen sind [149, 90]. Die Aktivität einzelner Zellen ist dabei vermutlich stark erhöht. Neben einer erhöhten neuronalen Aktivität werden jedoch auch Änderungen in der synaptischen Plastizität und gliale Fehlfunktionen vermutet [130, 36]. Sowohl im Menschen, als auch im Tiermodell kann es zu morphologischen Veränderungen ganzer Hirnareale, etwa einer Dispersion neuronaler Populationen oder astrozytären Gliosen im Rahmen einer hippocampalen Sklerose kommen [83, 105]. Ob es im Einzelfall aber tatsächlich zu einer Schädigung kommt ist von vielen Faktoren abhängig und kann nicht universell beantwortet werden.

1.2 Neuronale Zellverbände und Netzwerkaktivität

Krampfanfälle entstehen durch pathologisch erhöhte und/oder abnormal synchrone Neuronenaktivität. Eine kontrollierte Synchronität ist aber auch im nicht epileptischen Gehirn von entscheidender Bedeutung. So ist das Gehirn kein loses Netzwerk einzelner Neurone, die mit ihren zufällig vernetzten, benachbarten Zellen kommunizieren, sondern vielmehr ein koordiniertes Netzwerk unterschiedlicher Substrukturen, die über gerichtete axonale Leitungsbahnen miteinander kommunizieren. Grundlage dieser Organisationsstruktur ist die Fähigkeit neuronaler Zellverbände, integrativ einzelne Signale in einem synchronisierten Aktivitätsmuster aufeinander abzustimmen [26].

Synchrone Aktivität von Neuronen kann in Form des lokalen Feldpotentials detektiert werden. So erzeugt jede elektrische Aktivität in Form von Potentialänderungen über Zellmembranen ein elektrisches Feld. Daher haben an jedem extrazellulären Punkt des Gehirns alle umliegenden, elektrisch aktiven Zellen, Einfluss auf das jeweilige lokale Feldpotential. Änderungen in diesem Potential geben Aufschluss über die Synchronität der umgebenden Neuronenaktivitäten. Dabei können verschiedene Aktivitätsmuster wie z.B. einzelne synchrone Entladungen oder Oszillationen beschrieben werden. Die beobachteten Oszillationen können sich dabei in Amplitude, Frequenz und Länge unterscheiden und sich überlagern [25].

Zu abnormaler Synchronität und Übererregbarkeit kann es vor allem dann kommen, wenn das Gleichgewicht aus inhibitorischen und exzitatorischen Faktoren im Gehirn gestört ist. Dabei spielen verschiedene Neurotransmittersysteme an chemischen Synapsen eine wichtige Rolle. Die wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter sind Glutamat und Acetylcholin, die bedeutendsten inhibitorischen Transmitter sind Gammaaminobuttersäure (GABA) und Glyzin [64].

Durch Neurotransmitter wird an der postsynaptischen Membran die Leitfähigkeit von Ionenkanälen verändert. Exzitatorische Transmitter erhöhen so meist die Leitfähigkeit von Kationen wie Na^+ - oder Ca^{2+} -Ionen. Dadurch kommt es zu einem örtlichen Einstrom dieser Ionen, deren

Konzentration außerhalb der Zelle weit höher ist als im Inneren. Durch den Einstrom positiv geladener Teilchen kommt es zu einer lokalen Depolarisation. Rezeptoren inhibitorischer Neurotransmitter wie z.B. die GABA_A-Rezeptoren erhöhen die Chloridionenleitfähigkeit, so dass negative Ladungen in die Zelle strömen. Eine lokale Hyperpolarisation ist die Folge. Durch Neurotransmitter ausgelöste Kaliumströme haben ebenfalls einen hyperpolarisierenden Effekt [64].

Lokale De- oder Hyperpolarisationen können sich über spannungsabhängige Ionenkanäle ausbreiten und sich gegenseitig verstärken oder abmildern. Die Aktivität an vielen Synapsen ergibt ein Gesamtbild eingehender Reize, das über die Dendriten und das Soma am Axoninitialsegment integriert wird. Wird hier durch eine ausreichend starke Depolarisierung ein Schwellenpotential überschritten, kommt es zur Auslösung eines sogenannten Aktionspotentials [8].

Grundlage aller Reizleitung ist der Potentialaufbau über Zellmembranen und der kontrollierte Fluss geladener Ionen über diese Membranen. Ionen-Ströme werden von Ionenkanälen vermittelt. Genetische Defekte, die zu Epilepsien führen, betreffen daher häufig Gene von Ionenkanälen. Dabei können sowohl einzelne, aber auch mehrere Gene kausale Mutationen oder genetische Prävalenzen aufweisen.

1.3 Ionenkanäle

Da biologische Membranen für Ionen undurchlässig sind, erfolgt ihr Transport über entsprechende integrale Membranproteine, die als Ionenkanäle oder Transporter bezeichnet werden. Proteine, die einen passiven Transport entlang des Gefälles eines elektrochemischen Gradienten durch eine Ionen-selektive Pore vermitteln, werden als Kanäle bezeichnet. Aktive Transportproteine, die einen Transport entgegen dieser Gradienten bewirken, und so dazu beitragen diese aufrecht zu erhalten, werden als Pumpen bezeichnet [44]. Ionenkanäle zeichnen sich allgemein durch eine hohe Selektivität und eine hohe Transportrate aus. Erreicht wird eine Kombination dieser Eigenschaften zum einen durch den energetischen Vorteil der Wasserstoffbrückenbindungen von Ionen zum Selektivitätsfilter des Kanals im Vergleich zu der sie umgebenden Hydrathülle. Dadurch werden Durchflussraten von 10^6 bis 10^8 Ionen pro Sekunde erreicht. Zum anderen muss der Ionenradius für eine Ausbildung dieser Bindungen genau zu dem der Kanalpore passen, wodurch eine nahezu fehlerfreie Selektivität gewährleistet wird [48].

Grundsätzlich werden Ionenkanäle nach der Art der Ionen, die sie leiten, und ihrem Aktivierungsmechanismus unterschieden. Die wichtigsten Kanäle leiten selektiv entweder Natrium-, Kalium-, Chlorid-, oder Calciumionen. Aber auch weniger selektive Kanäle, die beispielsweise einen Transport aller Kationen erlauben, sind bekannt [3].

Aktiviert werden Ionenkanäle entweder durch Änderungen des Membranpotentials, dann spricht man von spannungsabhängigen Kanälen, oder durch Bindung eines spezifischen Liganden, meist eines Neurotransmitters. In diesem Falle handelt es sich um einen ligandengesteuerten Ionenkanal. Außerdem gibt es Kanäle, die auf mechanische Reize, Licht oder Temperaturänderungen reagieren [64].

Gemein ist allen Ionenkanälen neben einer Pore und dem Selektivitätsfilter eine Reihe von

Transmembrandomänen, die den Kanal in der Zellmembran verankern. Die Zahl der Transmembrandomänen variiert dabei von zwei bis 24 [64]. Außerdem werden viele Kanäle, insbesondere Kaliumkanäle, aus vier Untereinheiten zusammengesetzt, die dann jeweils vier bis sechs Transmembrandomänen besitzen und eine zentrale Pore bilden. Die N- und C-Termini der Kanaluntereinheiten können sich sowohl intra-, als auch extrazellulär befinden und sind vor allem für die Kanalassemblierung und die Wechselwirkung mit anderen Molekülen von Bedeutung [123].

1.3.1 Spannungsabhängige K_v7 -Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind neben der Repolarisierung elektrisch aktiver Zellen, vor allem für die Formgebung von Aktionspotentialen und die Regulierung von neuronaler Aktivität verantwortlich [137, 140, 14]. Sie machen mit rund 70 Genen den größten Anteil der Ionenkanäle aus. Weiter unterschieden werden Kaliumkanäle nach der Art ihres Aktivierungsmechanismus [51]. Bei den K_v -Kanälen handelt es sich um spannungsabhängige Ionenkanäle. Darüber hinaus gibt es Kanäle, die über Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration oder G-Protein-gekoppelte Signalkaskaden aktiviert werden [51]. Allen Kanälen gemeinsam ist außerdem ein Inaktivierungsmechanismus, bei dem die Kanalpore verschlossen werden kann. Aus dem inaktiven Zustand kann der Kanal dann wieder in den geschlossenen, aktivierbaren Zustand übergehen. Für Ionenkanäle können also die drei Zustände geschlossen, offen und inaktiviert beschrieben werden [6].

Funktionale spannungsabhängige Kaliumkanäle sind aus vier α -Untereinheiten aufgebaut [58]. Bei einigen Kanälen können darüber hinaus β -Untereinheiten mit dem Kanal assoziiert sein, die in der Regel regulatorische Funktionen haben. Die α -Untereinheiten bestehen aus jeweils sechs Transmembrandomänen und weisen intrazelluläre N- und C-Termini auf. Zwischen den Transmembrandomänen fünf und sechs, die die Kanalpore bilden, befindet sich außerdem die sogenannte Porenschleife. Die Porenschleifen von vier α -Untereinheiten bilden im assemblierten Kanal den Selektivitätsfilter [48]. Transmembrandomäne vier enthält bis zu sechs positiv geladene Aminosäuren und weist daher eine positive Nettoladung auf. Ihre relative Position ist dadurch vom umgebenden elektrischen Feld und somit spannungsabhängig. Sie wird auch als Spannungssensor bezeichnet und erzeugt durch ihre Bewegung innerhalb der Membran eine Konformationsänderung des Kanals [60]. Die intrazellulären N- und C-Termini sind vor allem für die Interaktion mit anderen Kanaluntereinheiten und Interaktionspartnern von Bedeutung [122, 123].

Fünf der spannungsabhängigen Kaliumkanäle gehören zur Familie der K_v7 -Kanäle und werden durch die Gene *KCNQ1-5* kodiert. Bei ihnen handelt es sich um langsam aktivierende, nicht inaktivierende Kaliumkanäle, die bereits bei einem Ruhemembranpotential zwischen -60 und -70 mV eine gewisse Offenwahrscheinlichkeit aufweisen [24]. Dabei tragen sie in erster Linie nicht zur Repolarisierung der Membran nach Aktionspotentialen, sondern vielmehr zu deren Formgebung und der zellulären Aktivitätsmodulation bei. Die verschiedenen Untereinheiten werden in unterschiedlichsten Geweben exprimiert. Für vier Untereinheiten wurden bereits Mutationen beschrieben, die mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert sind [59].

Gen	Expression	Erkrankungen	Vererbung
KCNQ1	Herz, Innenohr, Darm, Niere	Long-QT-Syndrom (LQT1), Romano-Ward-Syndrom (RWS), Jervell und Lange-Nielsen Syndrom (JLNS), Familiäre Atrielle Fibrillation (AFTB1)	Dominant Dominant Rezessiv Dominant
KCNQ2	Gehirn, Ganglien, Rückenmark	Neugeborenenepilepsie (BFNC)	Dominant
KCNQ3	Gehirn, Ganglien, Rückenmark	Neugeborenenepilepsie (BFNC)	Dominant
KCNQ4	Innenohr, Gehirn, Ganglien	Autosomal dominante Form der Taub- heit (DFNA2)	Dominant
KCNQ5	Gehirn, Ganglien, Muskel	nicht bekannt	

Tabelle 1.1: Expressionsmuster und assoziierte Erkrankungen von KCNQ-Kanälen. Modifiziert nach Jentsch [59].

$K_V7.1$ wird vor allem im Herzmuskel exprimiert und kann bei einer durch Mutationen eingeschränkten Funktion dafür sorgen, dass das sogenannte QT-Intervall bei der Erregungsleitung am Herzen abnormal verlängert ist (Tab. 1.1) [56]. Dadurch kommt es zu Herzrhythmusstörungen und in einigen Fällen auch zum plötzlichen Herztod. Besondere Formen des *Long-QT-Syndroms* sind das Romano-Ward- und das Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom. Beim Romano-Ward-Syndrom kommt es zusätzlich zu den kardialen Symptome zu einem Hörverlust, da *KCNQ1* auch im Innenohr exprimiert wird [119]. $K_V7.1$ assoziiert außerdem mit verschiedenen β -Untereinheiten, so dass Mutationen in diesen Untereinheiten zu ähnlichen Symptomen führen [28].

KCNQ2 und *KCNQ3* werden vorwiegend im Gehirn exprimiert, besonders im Hippocampus und im Cortex. Ihre Expressionsprofile zeigen großflächige Überschneidungen. Da heteromere Kanäle aus je zwei $K_V7.2$ - und $K_V7.3$ -Untereinheiten weit bessere Leitungseigenschaften als die entsprechenden homomeren Kanäle aufweisen [59], wird vermutet, dass vor allem heteromere Kanäle den K_V7 -assoziierten M-Strom leiten [132]. Seinen Namen erlangte der sogenannte M-Strom durch die Tatsache, dass er durch muskarinische Acetylcholinrezeptoren inhibiert werden kann [23]. Mechanistisch bewirkt die Aktivierung des muskarinischen Acetylcholinrezeptors eine Verringerung der membranständigen PIP_2 -Konzentration. PIP_2 wiederum wirkt aktivierend auf M-Kanäle [55, 24]. M-Kanäle werden in unterschiedlichen neuronalen Zelltypen, vor allem im Bereich des Axoninitialsegmentes exprimiert, wo sie an der Kontrolle der neuronalen Aktivität maßgeblich beteiligt sind, sowie an den sogenannten Ranvierschen Schnürringen [101, 35]. Da der M-Strom auch bei Membranpotentialen im Ruhebereich aktiv ist, hat er eine hyperpolarisierende und somit inhibitorische Wirkung auf das Feuerverhalten von hippocampalen Neuronen [24]. Mutationen in *KCNQ2* und *KCNQ3* können zu einer Form der neonatalen Epilepsie, den sogenannten *Benign Familial Neonatal Convulsions* (BFNC) führen, aber auch zu epileptischen Enzephalopathien im Neugeborenenalter, sowie weiteren Epilepsieformen im Erwachsenenalter

[18, 94]. Von $K_V7.2$ sind dabei weitaus mehr kausale Mutationen bekannt als von $K_V7.3$ [59].

Mittlerweile gibt es Hinweise, dass die ebenfalls im Gehirn exprimierte Kanaluntereinheit $K_V7.5$ zur Ausbildung des M-Stroms beitragen kann [136, 120]. $K_V7.4$ hingegen wird im Innenohr exprimiert. Mutationen führen in diesem Fall zu einer Form von Hörverlust [95, 92].

1.4 Vorhandene Tiermodelle für Epilepsien

Bei den meisten Tiermodellen, die bisher in der Epilepsieforschung Verwendung finden, werden in Mäusen oder Ratten durch Gabe bestimmter Substanzen chemisch Krampfanfälle erzeugt [47, 135]. Durch die Möglichkeit der kontrollierten Epileptogenese haben diese Modelle den Vorteil einer klar definierten epileptogenen Periode, in der gezielt Untersuchungen durchgeführt werden können. Dadurch, dass die Epilepsien erzeugenden Umstände aber relativ artifiziell und nicht mit denen vergleichbar sind, unter denen sich im Menschen Epileptogenese vollzieht, haben diese Modelle auch Limitationen [80]. Zum Einsatz kommen in induzierten Modellen unter anderem Pilocarpin, Kainat oder Pentetrazol (PTZ). Ebenso wird eine chronische intrakranielle Stimulation (*Kindling*) eingesetzt.

Ein weiteres Problem bei Modellen für neonatale Epilepsien ist der nur begrenzt mögliche Vergleich neuronaler Entwicklungsstufen in Neugeborenen von Nagern und Menschen. So entspricht der Entwicklungsstand einer 11-13 Tage alten Maus oder Ratte in etwa dem eines neugeborenen Säuglings [47]. Da sämtliche Entwicklungen des Nervensystems eine hohe Dynamik aufweisen, können Altersunterschiede von Tagen oder sogar Stunden im Tiermodell entscheidende Unterschiede bedeuten.

Genetisch bedingte Epilepsien in Tiermodellen können so, zumindest in Hinblick auf die Erforschung der Epileptogenese idiopathischer Epilepsien, einen entscheidenden Vorteil haben. Verantwortlich sind in den meisten Modellen, wie auch für viele im Menschen beobachtete Epilepsien, Mutationen oder genetische Veränderungen in Genen, die für Ionenkanäle kodieren. In Natriumkanälen sind es meist sogenannte *gain of function*-Mutationen, die eine stärkere Leitfähigkeit bzw. eine verminderte Inaktivierung der entsprechenden Kanäle bewirken und so zu einer Übererregbarkeit von Nervenzellen führen [27]. In Kaliumkanälen sind dagegen häufig *loss of function*-Mutationen oder *Gen-knock out's* für die Ausprägung einer Epilepsie verantwortlich. Durch sie geht in der Regel ein Teil der inhibitorischen und modulatorischen Aktivität in Nervenzellen verloren [20].

Für die Ionenkanäle der K_V7 -Familie existieren verschiedene Mausmodelle. Watanabe *et al.* beschrieben 2000 erstmals, dass homozygote *KCNQ2 knock out*-Mäuse kurz nach der Geburt an einem Lungendefekt versterben. Heterozygote Tiere zeigen eine geringere *KCNQ2*-Expression und eine erhöhte Sensitivität auf PTZ-induzierte Krampfanfälle [144]. Ein weiteres *KCNQ2*-Mausmodell stammt aus dem Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA und wurde 2003 publiziert [152]. Dabei handelt es sich um eine aus einem chemisch induzierten Mutagenese-Screen hervorgegangene Linie mit dem Namen *Szt1*, bei der eine 300 kb-Deletion auf Chromosom 2 vorliegt. Eines der drei von der Deletion betroffenen Gene ist *KCNQ2*. Der Phänotyp dieser Mäuse ist mit dem des *KCNQ2-knock out's* vergleichbar [152]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Tie-

re der *Szt1*-Linie stärker auf das an M-Kanälen wirkende Prokonvulsivum Linopirdine, und schwächer auf das ebenfalls M-Kanäle beeinflussende Antikonvulsivum Retigabin reagieren als Wildtyp-Kontrollen [99]. Ebenso konnten in elektrophysiologischen Messungen in Hirnschnitten eine durch die *Szt1*-Deletion ursächliche Verringerung des M-Stroms in hippocampalen Neuronen festgestellt und die veränderte Pharmakosensitivität verifiziert werden [98].

Ein weiteres Modell für eine M-Kanal-Defizienz wurde 2005 von Peters *et al.* beschrieben. Ein dominant negatives Transgen kann in diesem Modell über ein sogenanntes *Tet-Off*-Expressionssystem kontrolliert exprimiert werden. Eine Expression unter dem Prionpromoter in den ersten beiden Lebenswochen resultiert in einer sehr starken Reduktion des M-Stromes in einem Teil der hippocampalen CA1-Neuronen. Drastische morphologische Veränderungen des Hippocampus, spontane Krampfanfälle und Hyperaktivität sind die Folge [105].

Weitere M-Kanal-defiziente Mausmodelle wurden 2008 erstmals veröffentlicht [129, 97]. Bei diesen handelt es sich um Punktmutationen von *KCNQ2* und *KCNQ3*, die zuvor in Familien mit BFNC nachgewiesen werden konnten [128, 29] und dann über einen *knock in* in das Genom von B6 und FVB-Mauslinien eingebracht wurden. Beide Mutationen hatten bereits in Zwei-Elektroden-Spannungsklemme-Experimenten in *Xenopus laevis*-Oocyten für geringere Stromamplituden gesorgt [121]. Des Weiteren führen beide Mutationen im Mausmodell homozygot zu spontanen wiederkehrenden Krampfanfällen, die Ursache für eine erhöhte Sterblichkeit sind. Außerdem konnte ein verringertes Körpergewicht festgestellt werden. In elektrophysiologischen Messungen in Hirnschnitten wurde auch in diesen Tieren eine verringerte M-Strom-Amplitude in hippocampalen CA1-Neuronen gemessen. Morphologische Veränderungen durch wiederkehrende Krampfanfälle konnten allerdings nicht beobachtet werden [129].

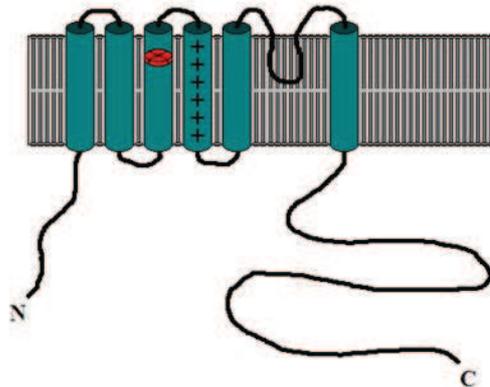


Abbildung 1.1: Struktur einer $K_V7.2$ -Kanaluntereinheit mit der Mutation $KCNQ2^{V182M}$. In rot ist die ungefähre Position der Mutation in Transmembrandomäne drei markiert.

Bereits 2003 wurde durch das Jackson Lab eine weitere Maus publiziert, die ebenfalls über einen chemisch induzierten Mutagenese-Screen erzeugt worden war und sowohl homo-, als auch heterozygot eine verringerte Krampfschwelle aufwies [41]. Es stellte sich heraus, dass auch diese Linie eine Punktmutation im *KCNQ2*-Gen aufweist. Allerdings liegt diese Mutation im Bereich der Transmembrandomäne drei und führt zum Austausch der Aminosäure Valin 182 durch Methionin (Abb. 1.1). Kearney *et al.* verwendeten die $KCNQ2^{V182M}$ oder auch $KCNQ2^{Nmf134}$

genannte Linie, um sie heterozygot mit der Natriumkanalmutante *SCN2A*^{Q54} zu kreuzen. Mäusen, die sowohl heterozygot für die *KCNQ2*^{V182M}-, als auch die *SCN2A*^{Q54}-Mutation sind, zeigen spontane Krampfanfälle und sterben ausnahmslos in den ersten sieben Lebenswochen [67].

1.5 Aktuelle Behandlungsoptionen neonataler Epilepsien

Generell stehen für die Behandlung von Epilepsien unterschiedliche Ansätze zur Verfügung [33]. Die pharmakologische Behandlung stellt dabei die wichtigste Möglichkeit dar, während in besonders schweren oder therapieresistenten Fällen auch eine operative Behandlung zu Verbesserungen führen kann [77]. Hier wird allerdings ein grundlegendes Problem bei der Behandlung von Epilepsien deutlich. Durch die große Vielfalt der Krankheitsbilder und das eingeschränkte Wissen, sowohl über die genauen Vorgänge der Epileptogenese, als auch von den exakten pharmakologischen Wirkmechanismen der meisten eingesetzten Substanzen, ist der Einsatz einer präzisen, individuellen Therapiekombination nur begrenzt möglich [70, 21]. Rund 30 % der behandelten Patienten reagieren dabei auf keines der verfügbaren Medikamente [147]. Darüber hinaus zeigen sich bei sehr vielen der pharmakologisch behandelten Patienten eine Reihe von Nebenwirkungen [104]. Ebenso ist die Ausbildung von Pharmakoresistenzen ein nicht zu unterschätzendes Problem, das auch durch Kombinationstherapien nur eingeschränkt umgangen werden kann [73].

Eine der wichtigsten Substanzen ist bis heute Phenobarbital, das bereits 1912 die seit Mitte des 19. Jahrhunderts eingesetzten Bromide ablöste [33, 22]. Mittlerweile kommen aber auch weitere Barbiturate zum Einsatz. Daneben zählen noch Hydantoinderivate wie Phenytoin zu den klassischen, für eine Dauertherapie zugelassenen Pharmaka. Ihre Wirkung beruht auf der Inaktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle, während Phenobarbital eine Aktivierung von GABA-Rezeptoren bewirkt [21]. Benzodiazepine werden aufgrund ihres hohen Abhängigkeitspotentials nur zur Akuttherapie eingesetzt und wirken ebenfalls über Beeinflussung von GABA-Rezeptoren [74, 21]. Um epileptischen Anfällen vorzubeugen werden heute jedoch hauptsächlich Valproinsäure und Carbamazepin verwendet. Valproat verstärkt ebenfalls die Wirkung von GABA [33]. In den letzten dreißig Jahren sind eine Reihe neuer Antiepileptika auf den Markt gekommen, die unterschiedlichste Wirkmechanismen aufweisen [33]. Weitere wichtige Wirkmechanismen beeinflussen dabei etwa Calciumkanäle oder die Aktivität des synaptischen Proteins SV2A [21]. Eine signifikante Verbesserung durch neu eingeführte Medikamente konnte für einen großen Teil der behandelten Patienten in den meisten Studien nicht dargelegt werden. Es besteht folglich weiterhin großer Bedarf an wirksamen, nebenwirkungsarmen Antiepileptika. Ein weiteres, kürzlich für die ergänzende Therapie von Epilepsien im Erwachsenenalter zugelassenes Medikament ist Trobalt[®], dessen Wirkstoff Retigabin ein selektiver Öffner von spannungsabhängigen K_v7-Kaliumkanälen ist [124, 117]. Eine diskutierte Sichtweise bei der Behandlung von Epilepsien ist auch, dass es sich bei allen aktuell zur Verfügung stehenden Pharmaka lediglich um Antikonvulsiva und nicht um Antiepileptika handelt, und demnach nur Symptome und nicht der fortschreitende Krankheitsprozess behandelt werden [70].

Die Behandlung von Neugeborenenepilepsien gestaltet sich weit schwieriger. So wird mit Phenobarbital hauptsächlich ein Medikament der „alten Generation“ verwendet. Verlässliche Stu-

dien zur Wirksamkeit in Neugeborenen gibt es bisher kaum, etwa 70 % der Anfälle lassen sich mit Phenobarbital aber unterbrechen [148, 31]. Die Wirksamkeit bei subklinischen, im EEG aber sichtbaren Anfällen ist mit 43 % jedoch weit geringer. Ergänzend werden bisher meist weitere Medikamente der alten Generation wie Phenytoin oder Benzodiazepine verwendet [134]. Bei kindlichen Epilepsien kommen viele Substanzen der mittleren Generation zum Einsatz, z.B. Valproat oder Carbamazepin. Eine weitere Substanz, deren potenzieller Nutzen besonders für Neugeborene aktuell diskutiert wird, ist Bumetanid [138, 61]. Bumetanid ist ein sogenanntes Schleifendiuretikum, das bereits für die Behandlung von Ödemen, Nierenerkrankungen und Herzinsuffizienz zugelassen ist und durch die Blockierung der NKCC1-Ionenpumpe die intrazelluläre Chlorid-Ionen-Konzentration beeinflusst [52]. Diese ist im sich entwickelnden Gehirn Neugeborener im Vergleich zum adulten Gehirn erhöht, da sich das Expressionsmuster Chlorid leitender Carrier während der Entwicklung verändert [38]. Dadurch kann aber auch die Wirkung von Barbituraten und Benzodiazepinen, die die GABA-Rezeptoraktivität verändern, nicht mit der im Gehirn Erwachsener gleichgesetzt werden.

Die Behandlung von Epilepsie bei Kindern und Neugeborenen ist auch deshalb schwierig, weil neben der akuten Wirksamkeit auf eine möglichst ungestörte weitere Entwicklung und Ausreifung Rücksicht genommen werden muss. So verhindert eine aktuelle Standardtherapie meist nicht die Ausbildung von geistigen Entwicklungsdefiziten und kognitiven Störungen [124]. Ein ambitioniertes Ziel bleibt also die Beeinflussung der Epileptogenese zu einem möglichst frühen Zeitpunkt [141].

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mausmodell [41] grundlegend zu charakterisieren. Dafür sollten zunächst die biophysikalischen Auswirkungen der Mutation $KCNQ2^{V182M}$ auf die Leitungseigenschaften heteromerer $K_V7.2/7.3$ -Kaliumkanäle untersucht werden. Anschließend sollten die Effekte der Mutation auf die elektrophysiologischen Eigenschaften hippocampaler CA1-Neuronen in Hirnschnitten von $KCNQ2^{V182M/+}$ - und $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen ermittelt werden.

Im Falle von Auffälligkeiten in der elektrophysiologischen *in vitro*-Charakterisierung sollte die Netzwerkaktivität neonataler $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere untersucht werden, und die Auswirkungen der Mutation $KCNQ2^{V182M}$ auf das Verhalten von Mäusen bestimmt werden.

Falls sich in dem $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mausmodell ein epileptischer Phänotyp beschreiben ließe, sollte im Folgenden durch die postnatale Behandlung mit dem selektiven M-Kanal-Öffner Retigabin und dem NKCC1-Chloridpumpen-Inhibitor Bumetanid versucht werden eine Milderung des Phänotyps aufzuzeigen. Die postnatale Behandlung sollte dann um eine pränatale Behandlung ergänzt werden, um einen möglichen Behandlungserfolg zu maximieren. Der Behandlungseffekt sollte durch Protokollieren der Mortalitätsrate, der Gewichtsentwicklung, sowie der Untersuchung des Einflusses auf das Verhalten adulter Tiere qualitativ dokumentiert werden.

2 Material

2.1 Mauslinien

C57BL/6J-*Kcnq2^{Nmf134}*/J; Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA

C57BL/6J; Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, USA

CD-1[®]; Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, USA

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wurden die verwendeten Linien in der vorliegenden Arbeit teilweise mit *KCNQ2^{Nmf134}*, B6 und CD1 abgekürzt.

2.2 Puffer und Lösungen

Für alle selbst angesetzten Puffer auf Wasserbasis wurde Wasser verwendet, das durch eine Reinstwasseranlage filtriert wurde.

Anästhesie-Lösung 1,2 ml Ketanest (10 %), 0,8 ml Xylazin (2 %), 8 ml NaCl-Lösung (0,9 %)

ACSF 125 mM NaCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 2,5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 25 mM Glukose, 25 mM NaHCO₃ (als extra 10x Stocklösung angesetzt), begast mit Carbogen

Blockierlösung 10 % Pferdeserum, 0,2 % BSA, 1 % Triton X-100 in 1x PBS

Ethanol-Eisessig 96 % Ethanol + 1 Tropfen Eisessig pro 10 ml

Gentamycin (OR1)-Lösung 75 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 5 mM Natrium Pyrovat, 50 µg/ml Gentamycin, pH 7,5 (eingestellt mit NaOH)

Intrazellulärlösung 120 mM KMeSO₄, 20 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0,2 mM EGTA, pH 7,3 (eingestellt mit KOH), + 4 mM ATP, 0,3 mM GTP, 14 mM Phosphocreatin

Kaliumchlorid-Lösung 3 M KCl

Kresylviolett-Lösung 4,5 g Kresylviolett + 45 ml abs. Ethanol, 30 min stehen, 450 ml ddH₂O zugeben, rühren und erhitzen (ca. 50 °C), filtrieren

Natriumborhydrid-Lösung 1x PBS + 1 % Natriumborhydrid

ND96-Lösung 91 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 5 mM NaOH, pH 7,4 (eingestellt mit NaOH)

Ohrlysispuffer 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 0,2 % NP-40, 0,2 % Tween 20, 1 mM EDTA, 0,1 mg/ml Proteinase K

OR2-Lösung 82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,5 (eingestellt mit NaOH)

PBS (20x) 3 mM NaCl, 161 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 39 mM KH₂PO₄, pH 7,4

Saccharose-Lösung 85 mM NaCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 2,5 mM KCl, 0,5 mM CaCl₂, 4 mM MgCl₂, 25 mM Glukose, 75 mM Saccharose, 25 mM NaHCO₃ (als extra 10xStocklösung angesetzt), begast mit Carbogen

Träger-Lösung 1 % Pferdeserum, 0,2 % BSA, 0,25 % Triton X-100 in 1x PBS

Wasserstoffperoxid-Lösung 1x PBS + 0,3 % H₂O₂

2.3 Chemikalien und Substanzen

Adenosintriphosphat, Natriumsalz; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Augengel, Vidisic; Bausch & Lomb GmbH, Berlin

Betaisadona; Mundipharma GmbH, Limburg

Bovines Serumalbumin (BSA); PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Bumetanid, Burinex[®] 2mg/4ml; LEO Pharmaceutical Products, Ballerup, Dänemark

Bupivacain, Bupicain; Monico, Italien

Buprenorphin, Temgesic[®]; Essex Pharma GmbH, München

Butanol, p.a.; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Calciumchlorid-dihydrat, Cellpure[®]; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Carbogen, 95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid; TMG GmbH, Krefeld

Carprofen, Rimadyl[®]; Zoetis, Madison, USA

(2-Hydroxypropyl)- β -**Cyclodextrin**; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Ethylendiamintetraessigsäure (**EDTA**), p.a.; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Chloroform, Rotipuran[®], p.a.; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure (**EGTA**), p.a.; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Enrofloxacin, Baytril[®]; Bayer AG, Leverkusen

Essigsäure, 100%, Rotipuran[®] p.a.; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Ethanol, 99%, vergällt mit 1% Methylethylketon; Th. Geyer Hamburg GmbH & Co. KG, Renningen

Gentamycin-Lösung, 50mg/ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Glukose, Cellpure[®]; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Guanosintriphosphat, Natriumsalz; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

HEPES, Cellpure[®]; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Roti[®]-**Histofix**, 4,5% Paraformaldehyd-Lösung; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Roti[®]-**Histokitt**; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Roti[®]-**Histol**; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isofluoran, Forene[®]; Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Isopropanol, 2-Propanol, Rotipur[®], p.a.; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid, Cellpure[®]; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄), p.a.; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydroxid (KOH); Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliummethylsulfonat (KMeSO₃); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ketamin-hydrochlorid, Ketamin Gräub; Albrecht GmbH, Aulendorf
Kohlendioxid (CO₂); Wonsak Kohlensäureservice GmbH, Hamburg
Kresylviolett-acetat; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid-hexahydrat (MgCl₂ x 6H₂O), Cellpure[®]; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mineralöl; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumborhydrid (NaBH); Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid, Cellpure[®] und p.a.; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid-Lösung, Braun Injektionslösung 0,9%; B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat (NaH₂PO₄ x 2H₂O), p.a.; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃), Cellpure[®]; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na₂HPO₄ x 2H₂O), p.a.; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH), p.a.; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumpyruvat; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nonidet P-40; Roche Giagnostics GmbH, Mannheim
Pferdeserum; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphocreatin, di-Tris-Salz; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinase K; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Retigabin; ChemPacific, Baltimore, USA
Salzsäure (HCl), 37%, p.a.; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sauerstoff, medizinisch; TMG GmbH, Krefeld
D(+)-Saccharose, Cellpure[®] und p.a.; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tetrodotoxin-citrat (TTX); Abcam plc, Cambridge, UK
Tris-Puffer, pH 7,5, 1M; AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizol[®]; Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tween[®]-20; AppliChem GmbH, Darmstadt
Wasser, Aqua ad injectabilia Braun; B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Wasserstoffperoxid (H₂O₂)-Lösung, 30%; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
XE-991-dihydrochlorid; Abcam plc, Cambridge, UK
Xylazin-hydrochlorid, Sedaxylan; WDT, Garbsen

Zahnzement, Grip[®] Cement; The L.D. Caulk Division Dentsply International Inc., Milford, USA

2.4 Kits, Enzyme

DirectPCR-Tail, Lysisreagenz; Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

FastDigest-Puffer; Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

FastDigest NheI; Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Maxima[®] Probe/ROX qPCR Master Mix (2x); Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

mMessage mMachine[®] T7 Kit, Ambion[®]; Life Technologies GmbH, Darmstadt

Nucleospin[®] Extract II-Kit; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

RNA 6000 Nano Kit; Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen

SIGMAFAST[™] 3,3'-Diaminobenzidine tablets; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

SuperScript[®] II Reverse Transcriptase, Invitrogen; Life Technologies GmbH, Darmstadt

Vectastain ABC Elite Kit; Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

2.5 Antikörper

Primärantikörper

α-GFAP-Antikörper, Maus; Millipore, Merck KGaA, Darmstadt

α-cFos-Antikörper, Ziege; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA

Isolectin B4, *Griffonia simplicifolia*, biotinyliert, 10 μg/500 μl; Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

Sekundärantikörper

α-Maus-Antikörper, biotinyliert; Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

α-Ziege-Antikörper, biotinyliert; Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

2.6 Oligonukleotide und Plasmide

Die Herstellung aller verwendeten Primer wurde bei der Eurofins MWG GmbH in Ebersberg in Auftrag gegeben. Die Synthese der MGB-Sonden erfolgte durch die Life Technologies GmbH, Darmstadt.

TaqMan-Sonden

Sonde *KCNQ2*⁺-Allel: 5'-FAM-CCATTGCTgTGCTGG-Q-MGB-3'

Sonde *KCNQ2*^{V182M}-Allel: 5'-VIC-CCATTGCTaTGCTGG-Q-MGB-3'
 Sonde mSy: 5'FAM-TTTGGCTTCCTGAACCTGGTGCTCTG-3'

Primer

Nmf134-1c: 5'-GCCTGTCTCCCACAGATATCATG-3'
 Nmf134-1nc: 5'-CGCAGATGTGGCAAAGACAT-3'
 mSy: 5'-TCAGGACTCAACACCTCGGTGG-3'
 mSy: 5'-AACACGAACCATAGGTTGCCAA-3'

Vektoren

pGem-He-Juel-mQ2-V182M
 pGem-He-Juel-mQ2
 pGem-He-Juel-mQ3

2.7 Verbrauchsmittel

32-well-Platten; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Butterfly-Kanülen; B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Deckgläser, 24x50mm; Carl Roth GmbH % Co. KG, Karlsruhe
Froot Loops[®]; Kellogg GmbH, Bremen
Glaskapillaren, Glass Replacement 3.5 nanoltr.; World Precision Instruments, Sarasota, USA
Glaskapillaren, Thinw W/fil 1,5mm 41N; World Precision Instruments, Sarasota, USA
Glaskapillaren, GC 150 F-10; Harvard Apparatus, Holliston, USA
Glaskapillaren, GB 150 TF-10; Science Products GmbH, Hofheim
Kanülen, Sterican[®]; B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Klebefolie, optisch klar; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Objektträger, Menzel Gläser Superfrost Ultra Plus[®], Thermo Scientific; Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
96-well Multiply[®] **PCR-Platten**; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Perfusionsschläuche; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Petrischalen; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Rasierklingen, Gillette[®]; Procter & Gamble Germany GmbH, Schwalbach am Taunus
Reagiergefäß, 1,5ml; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Rollrandgläser; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sekundenkleber, Pattex[®] Ultra Gel; Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf
Spritzen, Omnifix[®]F, 1ml; B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Tupfer, Raucotupf Stieltupfer; Lohmann & Rauscher GmbH \$ Co. KG, Neuwied
Wundklemmen, Reflex7; CellPoint Scientific Inc., Gaithersburg, USA

2.8 Geräte

AD-Wandler, ITC-16 Computer Interface; Instrutech Corporation, Longmont, USA

Aquisitionssystem, Digital Lynx SX; Neuralynx, Bozeman, USA

Badcontroller; Luigs und Neumann Feinmechanik + Elektrotechnik GmbH, Ratingen

Binokular; Carl Zeiss AG, Oberkochen

Drei-Achsen-Manipulator; Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG

vertikaler **Elektrodenpuller**

Elektroden, A1x16-3mm-50-703-A16; NeuroNexus Technologies Inc., Ann Arbor, USA

Empfängerplatte für Telemetrie, RPC-1; Data Science International (DSI), St. Paul, USA

Fotokamera, PEN E-P1, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

Grip Strength Meter, TSE Systems GmbH, Bad Homburg

Injektor, Nanoliter 2000, World Precision Instruments, Sarasota, USA

Isofluranverdampfer, NarkoVet®; Eickemeyer Medizintechnik für Tierärzte KG, Tuttlingen

Lampe, TH4-200; Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

Kaltlichtleuchte; Schott AG, Mainz

Matrix, Data Exchange Matrix; Data Science International (DSI), St. Paul, USA

Mikroliterspritzen; ILS Innovative Labor Systeme GmbH, Stützerbach

Mikromanipulatoren; Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG

Mikromanipulatoren; Luigs und Neumann Feinmechanik + Elektrotechnik GmbH, Ratingen

Mikroskop, BX51WI, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

Mikroskop, Axio; Carl Zeiss AG, Oberkochen

OP-Besteck; World Precision Instruments, Sarasota, USA

Perfusionspumpe, Perimax; Spetec GmbH, Erding

Pipetten; Eppendorf AG, Hamburg

Puller, P-97, Sutter Instrument Company, Novato, USA

Pumpe, IP High Precision Multichannel Pump, Ismatec; IDEX Health & Science GmbH, Wertheim

Realtimercycler, ABI 7900HT; Life Technologies GmbH, Darmstadt

Stereotakt; David Kopf Instruments, Tujunga, USA

Stereotakt, Digital Lab Standard; Stoelting Company, Wood Dale, USA

Steuereinheit, SM5-9; Luigs und Neumann Feinmechanik + Elektrotechnik GmbH, Ratingen

Tastenfeld, SM-5; Luigs und Neumann Feinmechanik + Elektrotechnik GmbH, Ratingen

Temperatur Controller, ATC1000; World Precision Instruments, Sarasota, USA

Thermocycler, GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems®; Life Technologies GmbH, Darmstadt

Thermoschüttler, HTM 130; HLC by Ditabis AG, Pforzheim

Transmitter für Telemetrie, ETA-F10; Data Science International (DSI), St. Paul, USA

UV-Lampe, X-Cite®, Series 120 Q; EXFO, Hampshire, UK

Verstärker, double patch clamp EPC 10 USB; HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz

Verstärker, Turbo Tec-03; npi electronic GmbH, Tamm

Vibratom, VT 1200S; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Vibratom, VT 1000S; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

(Infrarot-) **Videokamera**, ; ABUS August Bremicker Söhne KG, Wetter

Waage, CP4202S-OCE; Sartorius AG, Göttingen

Wasserbad, Haake DC10 mit Haake 6P, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Wasserfilteranlage, membraPure OPTIPREP, membraPure GmbH, Hennigsdorf/Berlin

Zahnarztbohrer; NSK Europe GmbH, Eschborn

Zentrifuge, Centrifuge 5424; Eppendorf AG, Hamburg

Zentrifuge, Centrifuge 5804R; Eppendorf AG, Hamburg

2.9 Software

Ethovision; Noldus Information Technology B.V., Wageningen, Niederlande

Fitmaster; HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz

Matlab; MathWorks, Ismaningen

Prism5.02; GraphPad Software Inc., La Jolla, USA

Pulse; HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz

Pulsefit; HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz

Patchmaster; HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz

Statistica; Statsoft (Europe) GmbH, Hamburg

The Observer; Noldus Information Technology B.V., Wageningen, Niederlande

3 Methoden

3.1 Mauszucht

Die Zucht der verwendeten Mauslinien erfolgte in der Versuchstierhaltung des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg unter pathogenfreien Bedingungen bei 23 ± 1 °C und 50 % relativer Luftfeuchtigkeit. Für die Behandlungsstudien wurde die Zucht der Tiere in der Etagentierhaltung von mir selbst vorgenommen. Futter und Wasser standen den Tieren in unbegrenzter Menge zur Verfügung. In der Etagenhaltung herrschte ein invertierter Tag-Nacht-Zyklus vor. Alle Tierexperimente wurden genehmigt von der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg (Gen.-Nr.: G07/046).

Zum Einsatz kamen vorwiegend Tiere der im Jackson Lab erworbenen Linie C57BL/6J-*Kcnq2*^{Nmf134}/J, die durch einen chemisch induzierten Mutagenese-Screen der Inzuchtlinie C57BL/6J erzeugt wurde [41]. Nach einem Embryotransfer wurde die Zucht der Linie mit C57BL/6J-Tieren von Charles River weitergeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden Daten von Tieren ausgewertet, die aus den Folgegenerationen der nach dem Embryotransfer einfach rückgekreuzten Tiere stammten.

Die Mutation *KCNQ2*^{V182M} wurde außerdem in die Auszuchtlinie CD-1[®] eingekreuzt. Für Experimente wurden Nachkommen von dreifach rückgekreuzten Tieren verwendet. Dabei handelte es sich also um Mäuse mit einem chimären Hintergrund aus C57BL/6J und CD-1[®].

Aus Gründen der Lesbarkeit wurden die Linien im folgenden Text mit *KCNQ2*^{Nmf134} und CD1-*KCNQ2*^{Nmf134} beschrieben.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Genotypisierung der verwendeten Mäuse

Für die Genotypisierung der verwendeten Mäuse wurde den Tieren eine Gewebebiopsie entnommen. Bei jüngeren Tieren bis zu einem Alter von etwa sechs Wochen war dies eine Schwanzbiopsie, bei älteren Tieren eine Ohrbiopsie. Die Biopsieentnahme wurde mit Hilfe einer kleinen OP-Schere oder eines Ohrlochstanzers durchgeführt.

3.2.1.1 Lyse der Biopsien

Je nach Art der Biopsie wurde das Gewebe mit 50-100 µl Lysispuffer versetzt und über Nacht bei 54 °C im Heizblock inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte bei Verwendung des Schwanzlysispuffers eine thermische Inaktivierung der Proteinase K bei 85 °C für 45 min.

3.2.1.2 Genotypisierungs-PCR mit TaqMan[®]-Sonden

Die lysierten Gewebeprobe wurden dann in einer PCR-Reaktion als Template eingesetzt. Die Grundlage hierfür bildete das 1974 von Sanger entwickelte Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction* (PCR)) mit einer thermostabilen Polymerase [115, 113]. Darüber hinaus wurden sogenannte MGB-Sonden eingesetzt, die bei erfolgreicher DNA-Synthese einen Fluoreszenzfarbstoff freisetzen [34]. Die Reaktion fand in einem fertigen Reaktionsmix von Fermentas statt, der nach Herstellerangaben verwendet wurde. Die verwendeten Primer stammten von MWG. 24 µl des Reaktionsmix wurde dann zusammen mit je 1 µl des lysierten Gewebes in eine 96-well-Platte pipettiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde die PCR-Reaktion in einem Thermocycler durchgeführt. Dabei wurde folgendes Protokoll verwendet:

Enzymaktivierung	50 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	10 min
Zyklus x40	95 °C	15 s
	60 °C	1 min
Ende der Reaktion	4 °C	

Die Analyse der Fluoreszenzsignalintensitäten erfolgte dann in einem Real-Time-Cycler von ABI. Es wurden Einfachbestimmungen durchgeführt. Alle in Experimenten verwendeten Mäuse wurden aber erneut biopsiert und genotypisiert, um den korrekten Genotyp sicherzustellen.

3.2.2 Erzeugung von cRNA zur Injektion in *Xenopus laevis*-Oocyten

3.2.2.1 Linearisierung der Plasmide

Um cRNA zur Injektion in Oocyten herzustellen, wurden die verwendeten Vektoren (pGem-He-Juel-mQ2-V182M, pGem-He-Juel-mQ2, pGem-He-Juel-mQ3) zunächst linearisiert. Dabei setzte sich der Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

Plasmid-DNA	7 µg
Fast Digest Puffer	5 µl
Wasser	81 µl
Fast Digest NheI	2 µl

Nach einer Inkubation von 15 min bei 37 °C wurde die linearisierte DNA mit Hilfe eines RNase-freien Nucleospin-Kits aufgereinigt. Dabei wurde zu jedem Ansatz 200 µl NF-Puffer hinzugegeben und weiter nach Angaben des Herstellers verfahren. Eluiert wurde dann in je 30 µl RNase-freiem Wasser.

3.2.2.2 cRNA-Synthese

Für die cRNA-Synthese wurde das mMessage mMachine[®] T7 Kit von Ambion verwendet. Grundlage für das Reaktionsprinzip bildete die 1987 von Milligan *et al.* veröffentlichte Methode

[89]. Um dann aus der linearisierten DNA cRNA zu synthetisieren, wurde je 1 µg der DNA in folgendem Reaktionsansatz verwendet:

linearisierte Plasmid-DNA	1 µg/6 µl
2xNTP/CAP	10 µl
10xPuffer	2 µl
Enzymmix	2 µl

Die Reaktionsansätze wurden zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von je 1 µl DNase wurde erneut für 15 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die RNA durch Zugabe von 30 µl Wasser und 30 µl Lithiumchlorid 30 min bei –20 °C gefällt. Die ausgefallene RNA wurde dann bei 13 000 g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Nachdem die RNA-Pellets getrocknet waren, wurden sie in je 20 µl Wasser resuspendiert.

3.2.2.3 Bestimmung der cRNA-Konzentration

Um die Menge an zu injizierender RNA kontrollieren zu können, wurde eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Dabei wurden jeweils 1:50 und 1:100 Verdünnungen der resuspendierten cRNA mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Chips nach Herstellerangaben analysiert. Die cRNA-Lösungen wurden daraufhin auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und in 3 µl-Aliquots bei –80 °C gelagert.

3.2.3 Quantitative *Real-Time*-PCR

Um einen Eindruck von dem Expressionsverhalten des mutierten *KCNQ2^{V182M}*-Gens zu erhalten, wurde in heterozygoten Tieren der Linie *KCNQ2^{Nmf134}* eine quantitative Bestimmung der entsprechenden mRNA-Konzentrationen im Gehirn vorgenommen. Dazu wurde das Gehirn von zwei heterozygoten Tieren im Alter von 76 d auf Eis präpariert und der Hippocampus, der Cortex und das Resthirn in je 1 ml Trizol homogenisiert, um dann bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert zu werden. Als Kontrolle dienten zwei Wildtypiere der Mauslinie MHCA-Ich-SND2 im Alter von 62 d.

3.2.3.1 RNA-Isolierung

Um die RNA aus dem homogenisierten Gewebe zu extrahieren wurden die in Trizol befindlichen Proben bei 12 000 g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde ein fünftel des eingesetzten Trizol-Volumens, also 0,2 ml, an Chloroform hinzugegeben. Nach Schütteln der Proben und erneuter Inkubation bei Raumtemperatur für 2-3 min, wurde erneut bei 12 000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die im Überstand befindliche, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt. Daraufhin wurde die RNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol gefällt und durch 10 min Zentrifugation bei Raumtemperatur und 12 000 g pelletiert. Nach Waschen des

Pellets mit 1 ml 75 %igem Ethanol wurde es bei 7500 g und 4 °C für 10 min wieder abzentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt und das Pellet getrocknet war, wurde es in RNase-freiem Wasser resuspendiert und die RNA-Lösung bei -80 °C gelagert.

3.2.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA-Lösungen wurde in 1:100-Verdünnungen mit Hilfe eines Agilent 6000-Chips nach Herstellerangaben bestimmt und auf 500 ng/µl eingestellt.

3.2.3.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wurde mit dem SuperScriptTM II Reverse Transcriptase-Kit von Invitrogen/Life Technologies durchgeführt. Dazu wurden 10 µl RNA-Lösung (5 µg RNA) mit je 1 µl T7-Oligo(dT)-Primer- (50 µM) und einer 10 nM dNTP-Lösung versetzt. Der Reaktionsansatz wurde daraufhin 5 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurden 4 µl 5xPuffer und 2 µl 0,1 M DTT hinzugefügt und erneut 2 min bei 25 °C inkubiert. Dann wurden 1 µl Reverse Transkriptase und 1 µl Wasser hinzugefügt und 15 min bei 70 °C inkubiert. Die 1:2 mit Wasser verdünnten cDNA enthaltenen Ansätze wurden dann als Template bei der folgenden PCR eingesetzt.

3.2.3.4 Real Time-PCR

Das Pipettierschema und das Temperaturprotokoll waren identisch mit dem der Genotypisierungs-PCR. Zusätzlich wurden Reaktionen jeder untersuchten Probe mit Primern (m-Sypc, m-Sypnc) und einer Sonde (m-Syp-Sonde) durchgeführt, die an murines Synaptophysin binden. Sämtliche Analysen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt.

Der Software des ABI 7900HT, in dem die Reaktion durchgeführt wurde, wurden die sogenannten Ct-Werte für alle untersuchten wells entnommen. Alle Doppelwerte wurden gemittelt. Daraufhin wurde für jede Fraktion, jedes der zwei Kontroll-Tiere, der Ct-Wert von Synaptophysin von dem jeweils entsprechenden für das *KCNQ2*⁺-Allel subtrahiert, und so der Δ Ct-Wert gebildet. Bei den *KCNQ2*^{V182M/+}-Tieren wurden außerdem Δ Ct-Werte für das mutierte Allel ermittelt. Die Δ Ct-Werte der beiden Kontrolltiere wurden wiederum gemittelt, so dass für jedes Hirnareal ein Wert vorlag. Diese wurden dann von den Δ Ct-Werte der beiden *KCNQ2*^{V182M/+}-Tiere abgezogen und so die $\Delta\Delta$ Ct-Werte ermittelt. Die Werte der beiden *KCNQ2*^{V182M/+}-Tiere wurden dann auch gemittelt. Statistisch verglichen wurden für jedes Hirnareal jeweils die Werte der unterschiedlichen Allele untereinander. Verwendet wurde dabei ein studentischer Ttest.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Färbung von Hirnschnitten

Um feststellen zu können ob die Mutation *KCNQ2*^{V182M} sich negativ auf die Morphologie des Gehirns von Mäusen auswirkt, wurden Hirnschnitte perfundierter *KCNQ2*^{Nmf134}-Mäuse mit unterschiedlichen Methoden angefärbt.

3.3.1.1 Perfusion von Mäusen

Um die Gehirne der untersuchten Mäuse zu konservieren, bzw. die morphologischen und histologischen Strukturen zu fixieren, wurden die Tiere modifiziert nach Peters *et al.* [105] mit 4%iger PFA-Lösung perfundiert. Dazu wurde die Maus zunächst mit einem Ketamin/Rompun-Gemisch betäubt. Nachdem die Wirksamkeit des Betäubungsmittels durch Prüfen des Zwischenzehenreflexes sichergestellt worden war, wurde die Maus auf einer Styroporplatte in Rückenlage fixiert. Dann wurde das Herz freipräpariert und mit Hilfe einer Perfusionspumpe und einer Kanüle 1x PBS in die linke Herzkammer gepumpt. Über den perforierten rechten Vorhof konnten Blut und Puffer abfließen. Nachdem das Herzkreislaufsystem weitgehend von Blut befreit war, wurde 4%ige PFA-Lösung in das Herz geleitet. Nachdem etwa 50-100 ml PFA-Lösung durchgelaufen waren, war die Fixierung abgeschlossen. Das Gehirn wurde nun aus dem Schädel präpariert und bis zur weiteren Verwendung in 4%iger PFA-Lösung bei 4°C aufbewahrt.

3.3.1.2 Anfertigung von Hirnschnitten

Bevor die perfundierten Maushirne geschnitten wurden, wurden sie mehrfach mit 1x PBS gewaschen. Dann wurden mit Hilfe einer Rasierklinge der äußere dorsale und der äußere ventrale Teil des Gehirns entfernt. Danach wurde das Gehirn mit der dorsalen Seite auf den Vibratomtisch mit Sekundenkleber aufgeklebt, um im Vibratom coronale Schnitte mit einer Dicke von 50 µm anzufertigen. Die Schnitte wurden in einer mit 1x PBS befüllten 24-well Platte aufgefangen.

3.3.1.3 Nissl-Färbung

Für die Nissl-Färbung wurden die Schnitte zunächst auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Dann wurden sie für mehrere Stunden in 70% Ethanol aufbewahrt.

Zu Beginn der Färbung wurden die Objektträger mit den Schnitten dann für 5 min in Kresylviolett-Lösung getaucht. Zur Differenzierung wurde dann eine 96%ige Ethanol-Eisessig-Lösung verwendet in die mehrmals kurz eingetaucht wurde. Dann folgte eine Inkubation in 96% Ethanol von 4 min. Dann folgten zwei Waschschrte mit Butanol für je 4 min. Waren die Schnitte danach noch zu dunkel, wurden alle Schritte ab dem Ethanol-Eisessig-Gemisch wiederholt. Dann folgten drei weitere Waschschrte von je 5 min Länge mit Histol.

Anschließend wurden die Schnitte auf den Objektträger mit Histofix unter Deckgläsern konserviert.

3.3.1.4 Antikörperfärbung mit DAB

Die Antikörperfärbungen wurden nicht auf Objektträgern sondern schwimmend in 24-well-Platten durchgeführt. Dabei wurde modifiziert nach den Herstellerangaben des Vectastain ABC Elite Kits vorgegangen. Zunächst wurden die Schnitte aus dem 1x PBS für 10 min in eine 1%ige Natriumborhydrid (in 1x PBS)-Lösung überführt. Darauf folgten vier Waschschrte von jeweils 5 min in 1x PBS. Dann wurden die Schnitte für 30 min in 0,3% H₂O₂ in 1x PBS inkubiert. Nachdem erneut vier Mal für 5 min in 1x PBS gewaschen wurde, wurden die Schnitte für 30 min

in einer Blockierlösung inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht. Die verwendeten Antikörper und Isolectin wurden wie folgt in Träger-Lösung verdünnt:

α -GFAP-Antikörper	Verdünnung 1:1000
α -cFos-Antikörper	Verdünnung 1:200
Isolectin	Verdünnung 1:25

Am nächsten Tag wurde erneut vier Mal mit 1x PBS für mindestens 5 min gewaschen. Dann folgte für 3h bei Raumtemperatur die Inkubation in dem entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper. Für die Färbung mit Isolectin entfiel dieser Schritt, da bereits biotinyliertes Isolectin verwendet wurde. Die Sekundärantikörper wurden in folgenden Konzentrationen, verdünnt in 1x PBS +0,5 % TritonX100, eingesetzt:

α -Maus-Antikörper (biotinyliert)	Verdünnung 1:1000
α -Ziege-Antikörper (biotinyliert)	Verdünnung 1:1000

Auch danach wurde vier Mal für mindestens 5 min in PBS gewaschen. Danach wurde ein ABC-Elite-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Dazu wurde rechtzeitig der Reaktionsmix aus Lösung A und B hergestellt, in dem die Schnitte dann für 2 h inkubiert wurden. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit PBS wurde noch drei Mal in Tris-Puffer(pH7,5) gewaschen. Jeweils etwa 5 min.

Jetzt wurden die Schnitte mit der Substratlösung versetzt, die zuvor durch Auflösen der Tabletten aus dem SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine-Kit nach Angaben des Herstellers hergestellt worden war. Innerhalb einiger Minuten bildete sich ein braunes Präzipitat. Die Reaktion wurde durch Überführen der Schnitte in 1x PBS gestoppt, bevor das Signal zu stark wurde. Optional wurden der Substratlösung Nickel-Ionen zugesetzt um ein schwarzes Präzipitat zu erzeugen. Abschließend wurde noch sechs Mal für mindestens 5 min in PBS gewaschen. Dann wurden die Schnitte auf Objektträger gezogen und über Nacht bei 37 °C getrocknet.

Am nächsten Morgen wurden die Schnitte nacheinander für je drei Minuten in 50 %, 70 %, 90 %, 95 % und 100 % Ethanol dehydriert. Je 5 min in 100 % Ethanol und zwei Mal in Histol folgten. Dann wurden die Schnitte in Histofix unter Deckgläsern fixiert.

3.4 Elektrophysiologische Methoden

3.4.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in *Xenopus laevis*-Oocyten

Die verwendeten *Xenopus laevis*-Oocyten, sowie alle für die Oocyten-Experimente verwendeten Lösungen und Geräte, wurden mir von Robert Bähring und Vera Junkereit im Institut für Physiologie am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg zur Verfügung gestellt.

3.4.1.1 Injektion von cRNA

Die Oocyten wurden in Gentamycin-Lösung aufbewahrt und selektiert. Verwendet wurden ausschließlich Oocyten im Stadium V-VI.

Die Injektion der cRNA erfolgte mit Hilfe von selbstgezogenen Injektionsnadeln in OR2-Lösung. Dabei wurde ein vertikaler Glaselektrodenpuller verwendet. Die Injektionsnadeln wurden dann für 4 h bei 200 °C hitzesterilisiert. Daraufhin wurden die gebackenen Nadeln mit Hilfe einer Spritze etwa 1 cm mit Mineralöl gefüllt. Eingespannt in den Injektor wurde die cRNA-Lösung in die Nadel eingesogen. Dabei wurden etwa 6-10 µl einer verdünnten cRNA-Lösung verwendet, die insgesamt 194 ng/µl cRNA enthielt. Die Anteile der einzelnen cRNAs variierten je nach Verhältnis der verwendeten Kanaluntereinheiten. Injiziert wurden dann in jede Oocyte 50 nl dieser Lösung. Das entsprach einer Gesamtmenge von 9,7 ng cRNA/Oocyte. Nach der Injektion wurden die Zellen wieder in Gentamycin-Lösung überführt und für 72 h bei 16 °C inkubiert.

3.4.1.2 Elektrophysiologische Messungen

Die elektrophysiologischen Messungen in Oocyten wurden bei Raumtemperatur in ND96-Lösung modifiziert nach Barghaan und Bähring [9] durchgeführt. Für die Messungen unter Retigabinbedingungen wurden 10 µM RTG in die Badlösung appliziert. Die Messelektroden hatten einen Widerstand von 0,5-2,0 MΩ und waren mit 3 M KCl befüllt. Die Zellen wurden auf ein Haltepotential von -100 mV geklemmt und nacheinander unterschiedlich großen Spannungssprüngen ausgesetzt. Auf den jeweiligen Aktivierungspuls folgte ein Puls von -30 mV. Ausgewertet wurden jeweils die Stromamplituden während des Aktivierungs- und des Schlusspulses. Auf letztere wurde ein Boltzmann-Fit angewendet und die Werte der einzelnen Zellen auf das jeweilige Maximum des Fits normiert. Aus diesen lassen sich Rückschlüssen auf das Öffnungsverhalten der Kanäle ziehen, da es sich bei den M-Kanälen um nicht inaktivierende Ionenkanäle handelt, die auch nach Beendigung des Aktivierungspulses noch geöffnet sind.

Verwendet wurde ein Verstärker des Typs Turbo Tec-03 von npi electronic, ein AD-Wandler des Typs ITC-16 Computer Interface der Instrutech Corporation, sowie ein Computer mit der Software Pulse 8.80 der Firma HEKA Elektronik.

Die statistische Analyse wurde mit Prism5 durchgeführt. Dabei wurde für den Vergleich der Stromamplituden unter Normalbedingungen ein 2-Wege-ANOVA-Test mit Messwiederholung und anschließender posthoc-Analyse nach Bonferroni durchgeführt. Die V_{50} -Werte, die ebenfalls den Fits zu entnehmen waren, wurden mit einem 1-Wege-ANOVA-Test und anschließender posthoc-Analyse nach Newman-Keuls ausgewertet. Der statistische Vergleich der Amplituden unter Retigabinbedingungen mit denen unter Normalbedingungen wurde durch einen ungepaarten Ttest für Werte mit stabiler Varianz für alle Aktivierungspulse einzeln durchgeführt. Der erlangte Wert wurde dann mit der Gesamtzahl aller Pulse, also dreizehn, multipliziert.

3.4.2 Elektrophysiologie in Hirnschnitten

Die elektrophysiologischen Messungen in Hirnschnitten wurden an Mäusen durchgeführt, die 11-14 d alt waren. Dabei wurden jeweils möglichst gleich alte Kontrollen verwendet. Die Messungen wurden modifiziert nach Neu *et al.* [93] mit entsprechenden M-Kanal-aktivierenden Spannungsprotokollen durchgeführt.

3.4.2.1 Präparation von Hirnschnitten aus der Maus für die Elektrophysiologie

Für die Präparation der Gehirne wurden die Tiere mit 4% Isofluran betäubt und durch Dekapitieren getötet. Dann wurde auf eisgekühlter Sucroselösung möglichst schnell das frische Gehirn aus dem Schädel präpariert und in eiskalte, Carbogen-begaste Sucroselösung überführt. Auf Eis wurde dann sowohl der äußere ventrale, als auch der äußere dorsale Teil des Gehirns mit einer Rasierklinge entfernt. Der mediale Teil des Gehirns wurde dann dorsal mit Sekundenkleber auf den Vibratortisch aufgeklebt. Von ventraler Seite beginnend wurden in eiskalter Sucroselösung Schnitte von 250 μm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden dann für mindestens 30 min in Carbogen-begaster Sucrose- oder ACSF-Lösung bei 33°C inkubiert.

3.4.2.2 Spannungsklemme-Analyse

Nach ausreichender Inkubation wurden die Schnitte in die Messkammer überführt. Diese wurde mit Carbogen-begastem ACSF bei Raumtemperatur perfundiert. Die Badlösung enthielt außerdem 0,5 μM Tetrodotoxin (TTX) und optional 10 μM Retigabin (RTG). Die Zellen wurden unter Normalbedingungen auf ein Membranpotential von -80 mV geklemmt und Spannungsänderungen auf -70 mV bis 20 mV ausgesetzt, bevor ein Schlusspuls von -30 mV angelegt wurde. Unter Retigabinbedingungen wurde das gesamte Protokoll um -10 mV verschoben. Dementsprechend wurden die Zellen zu Beginn auf -90 mV geklemmt. Verwendet wurden ausschließlich Messelektroden mit einem Widerstand von 3-5 $\text{M}\Omega$, die mit Intrazellulärlösung befüllt worden waren. Nachdem das Protokoll einmal durchlaufen war, wurde der Badlösung 10 μM XE991 hinzugefügt und das Protokoll erneut durchgeführt.

Für die Auswertung wurden dann die Ströme, die unter Zugabe von 10 μM XE991 aufgenommen worden waren, von denen, die ohne XE991 aufgenommen worden waren, subtrahiert. In den isolierten M-Strömen wurden dann auch hier die Amplitude zum Ende des Aktivierungspulses, sowie die Amplitude zu Beginn des Schlusspulses ausgewertet. Erstere dienten der Bestimmung der absoluten Stromamplituden, während letztere, durch die Verwendung von Boltzmann-Fits, zur Analyse des Öffnungsverhaltens herangezogen wurden. Für die Fits wurde folgende Gleichung nach Boltzmann verwendet:

$$f(x) = a + \frac{b}{(1 + \exp(\frac{v-x}{s}))}$$

Statistisch wurden die absoluten Amplituden ohne RTG wieder mit einem 2-Wege-ANOVA-Test mit Messwiederholung und anschließender posthoc-Analyse nach Bonferroni verglichen. Die Amplituden ohne RTG wurden dann mittels ungepaartem Ttest für Werte mit konstanter Varianz mit den entsprechenden Werten unter Retigabinbedingungen verglichen. Die errechneten p-Werte wurden dann mit der Anzahl der Messpunkte ($n=6$) multipliziert.

3.4.2.3 Stromklemme-Analyse

Mit der Stromklemme-Analyse sollte die Erregbarkeit von CA1-Neuronen untersucht werden. Dazu wurde der Badlösung kein TTX hinzugesetzt, um die Entstehung von Aktionspotentia-

len zu ermöglichen. Außerdem wurden der Badlösung 10 μ M Bicuculline, ein GABA-Rezeptor-Blocker, und 10 μ M CNQX, ein AMPA-Rezeptor-Blocker zugesetzt. Die Messungen wurden sowohl unter Normal-, als auch Retigabinbedingungen durchgeführt. Unter Normalbedingungen wurden Strompulse von 10-100 pA injiziert, unter Retigabinbedingungen waren die Stromamplituden mit 20-200 pA doppelt so hoch.

Ausgewertet wurde dann die jeweilige Anzahl ausgelöster Aktionspotentiale pro Stromstärke. Außerdem wurde das Ruhemembranpotential ohne Strominjektion gemessen und ein weiteres Protokoll zur Bestimmung des Eingangswiderstands verwendet. Dabei wurden für je 500 ms Ströme von -15-5 pA injiziert und die mittleren Membranpotentiale bestimmt um den jeweiligen Widerstand der Zellmembran zu berechnen.

Statistisch wurde die Anzahl der Aktionspotentiale pro Stromstärke mit einem 2-Wege-ANOVA-Test mit anschließender posthoc-Analyse nach Bonferroni mit dem Programm Prism5 ausgewertet. Das Ruhemembranpotential und der Eingangswiderstand wurden mit einem 1-Wege-ANOVA-Test mit anschließender posthoc-Analyse nach Newman-Keuls analysiert. Bei allen Analysen wurden jeweils die verschiedenen Genotypen bei gleichen Bedingungen verglichen (mit oder ohne RTG).

Die Stromklemme-Messungen wurden zum Teil durchgeführt von PD Dr. Axel Neu.

3.4.3 Telemetrische ECoG-Ableitungen adulter Mäuse

Um spontan auftretende Krampfanfälle elektrophysiologisch detektieren zu können, wurde modifiziert nach Peters *et al.* [105], adulten Mäusen eine epidurale Elektrode über dem primären somatosensorischen Cortex appliziert. Diese war, wie die Referenzelektrode, die sich über dem Cerebellum befand, mit einem unter dem Rückenfell platzierten Transponder verbunden. Die Maus wurde nach der Operation in ihren Käfig zurückgesetzt und das EEG-Signal über eine unter dem Käfig befindliche Empfängerplatte für mehrere Tage aufgezeichnet.

Für die Operation wurden die Mäuse zunächst mit 4% Isofluran betäubt. Sobald die Maus betäubt war, wurden ihr 0,05 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin, ein Schmerzmittel aus der Gruppe der Opiate, intraperitoneal injiziert. Diese Injektion erfolgte 30 min vor Durchführung des ersten Hautschnittes. Im weiteren Verlauf wurden der Maus außerdem 5 mg/kg Körpergewicht Carprofen, ein lang wirksames Schmerzmittel, sowie 7,5 mg/kg Körpergewicht des Antibiotikums Enrofloxacin subkutan verabreicht.

Die Maus wurde im Folgenden in einem Stereotakten fixiert. Im Stereotakten wurde die Maus dauerhaft über eine Atemmaske mit ca. 1,5-2% Isofluran (in 100% Sauerstoff) in Narkose gehalten. Außerdem wurde über eine rektale Temperatursonde die Körpertemperatur überwacht und bei Bedarf über eine Wärmematte reguliert. Schädel und Rücken wurden rasiert, auf die Augen wurde Augengel aufgetragen um eine Austrocknung zu vermeiden. Am Rücken wurde nach Desinfektion der Haut ein Schnitt gesetzt und durch stumpfe Präparation eine Hauttasche freigelegt, die den Transponder aufnehmen konnte. Dann wurde ein weiterer Hautschnitt sagittal über dem Schädel durchgeführt und ein Kanal unter Haut durch stumpfe Präparation von der Hauttasche im Rücken bis zu dem Schnitt in der Kopfhaut geöffnet. Dann wurde der desinfizierte

Transponder in die Hauttasche auf dem Rücken gelegt und die beiden Kabel durch den Kanal zum Kopf geführt. Die Wunde auf dem Rücken konnte dann durch Wundklammern geschlossen werden.

Die Knochenhaut auf dem Schädel wurde dann mittels einer 17,5%igen H_2O_2 -Lösung kurz denaturiert und mit einem Tupfer verdrängt, danach wurde mit 0,9% NaCl-Lösung gespült. Nachdem der Schädelknochen etwas aufgeraut worden war, wurde mit dem Stereotaxen die Elektrodenposition ($-2,0$ mm anterior Lambda, $1,8$ mm rechts von Mittellinie) bestimmt. Hier wurde mit Hilfe eines Zahnarztbohrers ein Loch in den Schädelknochen gebohrt ohne die Hirnhäute zu verletzen. Der abisolierte Elektrodendraht wurde in das Loch im Schädel geklemmt und durch Zahnzement in seiner Position fixiert. Für die Applikation der Referenzelektrode (ca. $3,0$ mm anterior zu Bregma, $2,0$ mm links der Mittellinie) wurde analog vorgegangen. Nun konnte auch der Schnitt über dem Schädel mit Wundklammern verschlossen werden.

Nach der Operation wurde die Maus in einem durch eine Heizmatte angewärmten Käfig beobachtet. In der folgenden Regenerationszeit von etwa fünf Tagen und der darauf folgenden Aufzeichnungsphase wurde der Zustand der Maus täglich überprüft.

3.4.4 *In vivo*-Ableitungen mit Tiefenelektroden in neonatalen Mäusen

Bei dieser Methode wurde mit Hilfe von Mehrkanal-Tiefenelektroden die Aktivität in Cortex und Hippocampus von neonatalen Mäusen im Alter von sechs bis sieben Tagen aufgezeichnet. Es wurde modifiziert nach Le [78] vorgegangen. Dazu wurden die Mäuse analog zu den bereits beschriebenen Operationen unter Isofluorannarkose in einem Stereotaxen fixiert. Die Körpertemperatur wurde durch ein Heizkissen konstant bei $33,5^\circ\text{C}$ gehalten. Zur Analgesie wurden den Tieren 30 min vor Beginn der Operation subkutan $0,05$ mg/g Körpergewicht Buprenorphin injiziert. Der Schnitt über dem Schädel und das Entfernen der Knochenhaut erfolgte wie zuvor beschrieben. Das lang wirksame Lokalanästhetikum Bupivacain wurde auf die Wundränder aufgetragen. Daraufhin wurde über dem Cerebellum mit einem Zahnarztbohrer ein Loch in den Schädel gebohrt und ein Silberdraht, der als Referenzelektrode und Erdungskabel diente, in das Loch geklemmt und mit Zahnzement fixiert. Um das Tier später im Stereotaxen des Ableitstandes fixieren zu können, wurde eine Metallkanüle ebenfalls mit Zahnzement quer über dem hinteren Bereich des Schädels fixiert. Dann wurden zwei weitere Löcher in den Schädel gebohrt, in die später die Ableitelektroden eingeführt wurden (1. Elektrode: $1,1$ mm posterior zu Bregma, $1,7$ mm lateral zur Mittellinie; 2. Elektrode: $2,42$ mm posterior zu Bregma, $1,8$ mm lateral zur Mittellinie). Verwendet wurden 16-Kanal-Silizium-Elektroden. Eingeführt wurden sie entlang der CA1-CA3/Gyrus dentatus-Achse, bzw. in die visuelle Cortexregion V1. Aufgezeichnet wurden die Signale über einen Vorverstärker an einem Datenaquisitionsgerät mit einer Samplingrate von 32 kHz. Die Signale wurden außerdem digital gefiltert (Bandpass 1 - 9000 Hz). Bewegungen der Maus wurden über ein Piezoelement erfasst. Bevor die Aquisition begann, wurde eine Äquilibrierungsphase von 20 bis 30 min abgewartet.

Nach Beendigung der Aufzeichnung wurde die Elektrodenposition mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DiI markiert und das Gehirn der Maus über Nacht in Paraformaldehydlösung fixiert.

Später wurden 50 μm dicke Schnitte in einem Vibratom angefertigt und Fluoreszenz-Nissl gefärbt um die Elektrodenposition unter einem Fluoreszenzmikroskop überprüfen zu können.

Die *in vivo*-Ableitungen wurden durchgeführt von Dr. Walid Fazeli. Die Analyse der Daten wurde gemeinsam von Stephan Marguet, PhD und mir durchgeführt. Ausgewertet wurden ausschließlich Daten männlicher Mäuse.

3.5 Verhaltensanalytische Methoden

Die Verhaltensexperimente wurden in einem benachbarten Raum der Etagentierhaltung durchgeführt. Die Tests wurden während der Dunkelphase durchgeführt, während der die Tiere aktiv waren. Der Raum wurde durch Rotlicht beleuchtet. Alle verwendeten Apparaturen wurden nach jedem Versuchslauf mit Seifenlauge und 70%igem Ethanol gereinigt, um Irritationen der folgenden Mäuse zu minimieren. Außerdem wurde versucht die Stressbelastung für die Tiere möglichst gering zu halten. Die Untersuchung der behandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ - und $KCNQ2^{+/+}$ -Mäuse, der $CD1-KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäuse, sowie die initiale Analyse der Daten wurden durchgeführt von Dr. Fabio Morellini, Robin Hinsch und Kolja Meier. Die Untersuchung der unbehandelten heterozygoten Tiere wurde von mir selbst durchgeführt. Für die Untersuchungen mit heterozygoten Tieren wurden jeweils drei männliche und drei weibliche Tiere pro Genotyp verwendet. Bei den getesteten CD1-Tieren handelte es sich ausschließlich um männliche Mäuse, während bei den behandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren beide Geschlechter verwendet wurden.

Statistisch analysiert wurden die Daten der heterozygoten und Wildtyp $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäuse meist mit einem studentischen Ttest. Bei Analyse der *Rotarod*- und *Contextual Fear Conditioning*-Daten wurde eine 2-way-ANOVA-Analyse mit Messwiederholung durchgeführt. Die Daten der Analysen in denen drei Genotypen verglichen wurden, wurden mit Hilfe von 2-way-ANOVA-Analysen untersucht. Zusätzlich wurden stets posthoc-Analysen nach Newman-Keuls oder Bonferroni verwendet.

3.5.1 Elevated Plus Maze

Im *Elevated Plus Maze*, modifiziert nach Jakovcevski *et al.* [57], sollte die Aktivität und die Risikobereitschaft bzw. Neugier oder Angst der Tiere untersucht werden. Verwendet wurde ein Aufbau, bei dem sich in etwa 75 cm Höhe je zwei offene und geschlossene Arme (30x5 cm, Wandhöhe der geschlossenen Arme 15 cm, Kantenhöhe der offenen Arme 2 mm) gegenüberlagern. In der Mitte befand sich eine 5x5 cm große Plattform, auf der die untersuchten Tiere zu Beginn des Experiments mit Blick auf einen offenen Arm abgesetzt wurden. Das Verhalten der Mäuse wurde dann im Dunkeln hinter einem Vorhang für 5 min von einer Infrarotkamera aufgezeichnet und mit Hilfe der Software *The Observer* der Firma Noldus analysiert. Detektiert wurde die Zeit bis zum ersten Betreten eines offenen Armes, sowie die Anzahl der Eintritte in offene oder geschlossene Arme.

3.5.2 *Grip Strenght-Test*

Die Griffstärke der untersuchten Tiere wurde mit Hilfe eines *GripStrenghtMeter's* nach Morellini und Schachner [91] analysiert. Dabei wurden die Tiere am Schwanz angehoben und griffen dann an eine horizontale Haltestange. Das Gerät maß dann die maximale Kraft mit der sich die Mäuse noch an der Stange hielten, wenn man sie nach hinten von der Apparatur wegzog. Durchgeführt wurden drei Testläufe in denen jede Maus jeweils dreimal getestet wurde. Aus den jeweils höchsten Werten pro Durchlauf wurden die Mittelwerte gebildet.

3.5.3 *Rotarod*

Ein weiterer Test für die motorischen Fähigkeiten von Mäusen ist der *Rotarod*-Test nach Morellini und Schachner [91] mit der Apparatur von TSE. Dabei wurden die Tiere auf eine sich drehende Walze gesetzt und die Zeit gemessen, die sie sich auf der Walze halten konnten. Dabei wurden die ersten beiden Läufe für maximal 3 min bei einer konstanten Geschwindigkeit von 4 rpm absolviert. Danach wurden drei Läufe durchgeführt, bei denen die Walze kontinuierlich für 4 min von 4 auf 40 rpm beschleunigt wurde. Die Testläufe dauerten dann maximal 5 min und wurden erst nach einer Pause von etwa 50 min wiederholt. Am darauffolgenden Tag wurde ein weiterer Durchlauf mit beschleunigender Walze durchgeführt. Für jeden der vier beschleunigten Testläufe wurden die Werte der einzelnen Tiere gemittelt.

3.5.4 *Y Maze (Spontaneous Alternation)*

Dieser Test wurde angewendet um das Kurzzeit- bzw. Arbeitsgedächtnis von Mäusen zu untersuchen. Dabei kam nach Morellini und Schachner [91] eine Y-förmige Versuchsapparatur zum Einsatz, für die mit 30 cm hohen Plexiglasscheiben drei gleich große Arme von 34x5 cm Größe erzeugt wurden. Tiere die sich daran erinnern welchen Arm sie zuvor betreten haben, werden mit hoher Wahrscheinlichkeit den jeweils nächsten Arm betreten. Diese Bewegungen können als spontan bezeichnet werden, da sie nicht durch Belohnungen oder Stress gesteuert werden. Es wurde außerdem ein kontinuierliches Protokoll ohne Eingreifen des Experimentators durchgeführt, um Einflüsse durch Stress und Angst zu minimieren, die Einfluss auf das Versuchsergebnis haben können [45]. Dazu wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je ein Durchlauf mit jedem Tier durchgeführt, bei dem die Mäuse an ein Ende eines Armes gesetzt wurden und dann aufgezeichnet wurde welche Arme in 24 Armeintritten jeweils betreten worden waren. Außerdem wurde die Dauer jedes Testlaufes notiert. Dargestellt wurden dann die Mittelwerte aus beiden Läufen der durchschnittlichen Zeit pro Arm sowie der Anteil an Alternierungen pro Gesamtzahl der Armwechsel.

3.5.5 *Water Maze*

In diesem Test kann untersucht werden, wie gut sich Mäuse in einem Wasserbecken von 145 cm Durchmesser anhand von räumlichen Markierungen orientieren können und wie gut sie sich an eine zuvor erlernte Plattformposition erinnern können (durchgeführt modifiziert nach Fellini und

Morellini [42]). Dazu wurde das Becken mit weiß eingefärbtem Wasser befüllt und eine ebenfalls weiße, runde Plattform von 14 cm Durchmesser, etwa einen Zentimeter unter der Wasseroberfläche positioniert. Die Plattform war für die Tiere so nicht sichtbar. Auf der Innenseite des Beckens waren als Orientierungshilfe asymmetrisch angeordnete Markierungen angebracht. Diese Asymmetrie ist entscheidend um eine erfolgreiche Orientierung zu ermöglichen [42]. Das Becken befand sich in der Ecke eines Raumes und war auf den beiden offenen Seiten von Vorhängen umgeben. Die Helligkeit betrug auf Höhe der Wasseroberfläche 26-28 lux.

Zu Beginn wurden die Mäuse an zwei aufeinanderfolgenden Tagen an das Schwimmen und Klettern auf eine versteckte Plattform gewöhnt. Dazu wurde eine Plattform von 10 cm Durchmesser in einem kleineren, rechteckigen Becken (42,5x26,5x15,5 cm) platziert. Zwischen vier Trainingsläufen pro Tag lagen jeweils 10 min-Intervalle. Die Plattformposition wurde variiert. Waren die Tiere nach 60 s nicht auf die Plattform geklettert, wurden sie für einige Sekunden auf die Plattform gesetzt, bevor sie zurück in den Käfig entlassen wurden.

Vier Tage nach dem letzten Übungslauf wurden die ersten Lerndurchläufe im runden Becken absolviert. An Tag eins und zwei wurden jeweils vier Durchläufe in 10 min-Intervallen durchgeführt. Dabei wurden die Mäuse bei einer festgelegten Plattformposition an verschiedenen Stellen des Beckens hineingesetzt und auch aus unterschiedlichen Richtungen von der Plattform genommen. Dabei wurde die Zeit dokumentiert, die jedes Tier bis zum Auffinden der Plattform benötigte. Tiere, die nach 90 s die Plattform nicht erreicht hatten, wurden kurz auf die Plattform gesetzt, bevor sie zurück in den Käfig gebracht wurden.

An Tag drei wurden ebenfalls vier Lerndurchläufe absolviert. Allerdings wurde nach den ersten beiden Durchläufen ein zusätzlicher Testlauf absolviert, bei dem jede Maus für 60 s in dem gleichen Becken ohne Plattform schwamm. Dieser Lauf wurde durch eine Kamera aufgezeichnet. An Tag vier wurde erst ein weiterer Testlauf ohne Plattform durchgeführt, bevor erneut zwei Lerndurchläufe mit Plattform durchgeführt wurden. Die Plattformposition war dabei immer identisch.

Der fünfte Versuchstag fand dann drei Tage später statt. Hier wurde erneut ein 60 s langer Testlauf ohne Plattform absolviert. Dieser Lauf wurde ausgewertet und die Zeit bestimmt, die jede Maus in jedem der vier Quadranten, in die das Becken eingeteilt wurde, anzufinden war.

Einen Tag später, an Versuchstag sechs, wurden dann erneut zwei Lerndurchläufe mit Plattform und dann wieder ein Testlauf ohne Plattform durchgeführt. Danach wurde für weitere drei Lerndurchläufe die Plattformposition in den gegenüberliegenden Quadranten versetzt.

Am siebten Tag wurde dann nach zwei weiteren Lerndurchläufen mit neuer Plattformposition in einem letzten Testlauf ohne Plattform getestet, wie gut sich die Mäuse an die neue Plattformposition angepasst hatten.

Analysiert wurden die Testläufe mit dem Programm Ethovision der Firma Noldus.

3.5.6 *One-Trial Spatial Learning-Test*

Dieser Test, modifiziert durchgeführt nach Meier *et al.* [85], bietet die Möglichkeit das räumliche Erinnerungsvermögen unter möglichst stressarmen Bedingungen zu untersuchen. So wird

ermittelt inwieweit sich eine männliche Maus bevorzugt in einem Bereich aufhält, in dem sie zuvor Kontakt zu einem fremden Weibchen hatte. Verwendet wurde eine Arena von 50x50 cm und 40 cm hohen Wänden. Im Unterschied zu dem *Open Field*-Test war die Arena durch eine Trennwand in zwei gleich große Areale unterteilt, die durch eine Öffnung in der Trennwand miteinander verbunden waren. In beiden Bereichen befand sich ein perforiertes Becherglas aus Kunststoff. Am ersten Versuchstag wurde in eines der beiden Bechergläser ein Weibchen gesetzt, dass zuvor keinen Kontakt zu Männchen hatte. Das Männchen konnte sich dann 20 min lang frei in der Arena bewegen. Am zweiten Tag wurde der gleiche Aufbau ohne Weibchen verwendet und das Verhalten des Versuchstieres mit einer Videokamera aufgezeichnet. Analysiert wurde daraufhin mit dem Programm Ethovision der Firma Noldus die Zeit, die sich die Männchen während des Testlaufes in der Zielzone aufhielten. Als diese wurde ein Bereich von 6 cm um das Becherglas herum, in dem zuvor das Weibchen gesessen hatte, definiert.

3.5.7 Contextual Fear Conditioning

Eine weitere Möglichkeit das Langzeitgedächtnis von Nagern zu analysieren, stellt das sogenannte *Fear Conditioning* dar, bei dem die Mäuse nach Morellini und Schachner [91] einem Schmerzreiz ausgesetzt werden. Verwendet wurde dafür eine Kammer (23,5x23,5x19,5 cm) auf deren Boden sich ein Drahtgitter befand, über welches die Maus einem Elektroschock ausgesetzt werden konnte. An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Mäuse in die Kammer gesetzt. Am ersten Tag wurde dabei drei Mal ein Elektroschock (250 μ A, 1 s) nach 120, 160 und 200 s appliziert. Das Verhalten der Tiere wurde insgesamt 240 s mit einer Videokamera festgehalten. Am zweiten Tag wurden die Tiere dann erneut in die Kammer gesetzt und für 30 min gefilmt. Tiere, die sich an den unangenehmen Reiz vom Vortag erinnern und mit der veränderten Umgebung assoziieren, zeigen ein ausgeprägtes ängstliches Verhalten und verharren mit nur sehr wenigen Bewegungen in einer Art Schockstarre. Am dritten Tag wurden die Mäuse erneut für 4 min in die Kammer gesetzt und gefilmt. Normalerweise zeigen Tiere, die aufgrund der Erfahrungen des Vortages weniger ängstlich sind wieder mehr Bewegungsaktivität. Analysiert wurden mit Hilfe eines Infrarotsensors die ersten 4 min des zweiten Tages als Maß für das Langzeitgedächtnis, sowie die letzten 4 min des zweiten Tages in Hinblick auf eine einsetzende Umgewöhnung. Die 4 min am dritten Tag wurden dann als Langzeitlöschung ausgewertet.

3.5.8 Open Field

Mit diesem Test kann die Bewegungsaktivität und das Erkundungsverhalten von Nagern quantifiziert werden. Außerdem kann die Vermeidung des Zentrums als Indikator für ängstliches Verhalten interpretiert werden. Es wurde nach Meier *et al.* [85] eine Arena verwendet, die 50x50 cm groß und deren Seitenwände 40 cm hoch waren. Die Maus wurde zu Beginn des Tests in eine Ecke der Arena gesetzt und konnte sich dann 15 min frei bewegen. Die Bewegungen der Maus wurden mit Hilfe einer Videokamera aufgenommen und später mit dem Programm Ethovision der Firma Noldus analysiert. Dabei konnten unter anderem der mittlere Abstand zu den Wänden der Arena und die zurückgelegte Gesamtstrecke quantifiziert werden.

3.6 Pharmakologische Behandlung von Mäusen

3.6.1 Postnatale Behandlung von Mäusen der Linie *KCNQ2^{Nmf134}*

Tragende Weibchen wurden zwei Mal täglich nach neuen Würfen kontrolliert. 24 h nachdem ein Wurf registriert wurde, wurden die Jungtiere biopsiert und mit der Behandlung begonnen. Dabei wurden jedem Tier morgens und abends 5 µl/g Körpergewicht subkutan in die Nackenfalte gespritzt. Verwendet wurden 2 µg/µl Retigabin, gelöst in 10 %iger Cyclodextranlösung oder 0,02 µg/µl Bumetanid. Das in Phosphatpuffer vorliegende Bumetanid wurde dazu 1:25 in NaCl ad Inj. verdünnt. Insgesamt wurde den Tieren also entweder 20 mg/kg Körpergewicht Retigabin oder 0,2 mg/kg Körpergewicht Bumetanid pro Tag verabreicht. Der vehikelbehandelten Gruppe wurden analog zwei Mal täglich 5 µl/g Körpergewicht der 10 %igen Cyclodextranlösung gespritzt. Die Behandlung wurde bis zum Abend des vierzehnten Lebensstages (P14) fortgeführt.

3.6.2 Kombinierte prä- und postnatale Behandlung von Mäusen der Linie *KCNQ2^{Nmf134}*

Zusätzlich zu der postnatalen Behandlung mit Retigabin und Bumetanid wurde in einer weiteren Studie eine pränatale Behandlung durchgeführt. Für Bumetanid wurde in dieser Studie die doppelte Dosis (0,4 mg/kg Körpergewicht/Tag) verwendet. Für die pränatale Behandlung wurde trächtigen Weibchen die gleiche Dosis oral verabreicht, die auch den Jungtieren subkutan gespritzt wurde. Dazu wurden die verpaarten Weibchen morgens und abends auf sogenannte Plaques überprüft, die ein Zeichen für eine erfolgte Besamung sind. Die entsprechenden Tiere wurden daraufhin einzeln gehalten und ab dem elften Tag nach der Befruchtung behandelt. Dazu wurde den Tieren zwei Mal täglich ein *fruit loop* (Kellogg's) in den Käfig gelegt, der im Falle der retigabin- oder bumetanibehandelten Gruppen mit einer Lösung befüllt worden war, die den jeweiligen Wirkstoff enthielt. Dabei wurden entweder 1 µl/g Körpergewicht einer 10 µg/µl enthaltenen Retigabin- oder 1 µl/g Körpergewicht einer 0,2 µg/µl enthaltenen Bumetanidlösung verwendet. Da Retigabin in höherer Konzentration in wässrigen Lösungen sehr schlecht löslich ist, wurde der 10 %igen Cyclodextranlösung 0,66 mM HCl zugesetzt. Das Bumetanid wurde in diesem Fall mit Aqua ad Inj. im Verhältnis 1:2,5 verdünnt. Der vollständige Verzehr der *fruit loops* wurde überprüft, stellte nach einer kurzen Gewöhnungsphase aber kein Problem dar. Die anschließende postnatale Behandlung entsprach der bereits beschriebenen. Die *fruit loops* wurden dabei bis einschließlich P0 verwendet und ab P1 durch die Injektionen abgelöst. Der einzige Unterschied bestand nun in der erhöhten Bumetaniddosis.

3.7 Analytische Methoden

3.7.1 Dokumentation von Körpergewicht und -größe der verwendeten Versuchstiere

Das Körpergewicht wurde durch Wiegen der Tiere im Alter von 200-212 d dokumentiert. Für die Messung der Körpergröße wurden entweder bereits tote, oder durch Isofluran betäubte Tiere

auf Millimeterpapier fotografiert. Die genaue Körpergröße wurde dann auf den Fotos abgelesen. Statistisch analysiert wurde sowohl das Körpergewicht als auch die Körpergröße mit Hilfe eines 1-Wege-ANOVA-Tests mit anschließender Newman-Keuls-posthoc-Analyse. Dazu wurde das Programm Prism5 verwendet. Die Tiere aus den Behandlungsstudien wurden während der ersten vierzehn Tage morgens vor der Injektion gewogen, in den sechs Wochen danach einmal pro Woche. Die statistische Analyse dieser Daten wurde mit statistica durchgeführt. Angewendet wurde für das Gewicht an P1 von lediglich postnatal behandelten Tieren ebenfalls eine 1-Wege-ANOVA-Analyse mit anschließender posthoc-Analyse nach Newman-Keuls. Da die Behandlung erst nach der Aufnahme dieser Daten begonnen wurde, hatte sie keinen Einfluss auf das Gewicht an P1. Das Gewicht der ersten vierzehn Tage, sowie der Verlauf während der dritten bis achten Lebenswoche, wurde mit Hilfe einer 3-Wege-ANOVA-Analyse mit anschließender posthoc-analyse nach Newman-Keuls analysiert.

Die Daten der prä- und postnatalen Behandlung wurden bereits an P1 mit einem 2-Wege-ANOVA-Test analysiert, da hier bereits ein Einfluss der Behandlung untersucht wurde. Auch hier wurde anschließend eine Newman-Keuls-posthoc-Analyse durchgeführt. Die Auswertung des Gewichtsverlaufs der ersten vierzehn Tage wurde analog der postnatal behandelten Tiere durchgeführt.

3.7.2 Analyse der Überlebensrate verwendeter Versuchstiere

Für die initiale Analyse der Überlebensrate von $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäusen wurden lediglich Würfe analysiert, die spätestens an P1 registriert und biopsiert wurden. Über den Zeitraum von P0 bis P1 kann also keine Aussage hinsichtlich der genotypabhängigen Sterblichkeit gemacht werden. Für die statistische Analyse wurde sowohl für die initiale, als auch die Analyse der Daten aus den Behandlungsstudien, die Überlebensanalysefunktion des Programms Prism5 verwendet. Dabei wurde eine Darstellung nach Kaplan-Meyer und eine statistische Analyse nach Mantel-Cox (Logranktest) durchgeführt. Allerdings unterscheiden sich die Daten der lediglich postnatal von den prä- und postnatal behandelten Tieren insofern, als das in den nur postnatal behandelten Gruppen, Tiere die an P1 bereits tot waren, nicht berücksichtigt wurden. Da die Behandlung erst am ersten Tag nach der Geburt, nachdem alle Tiere eines Wurfes, auch die bereits gestorbenen, biopsiert worden waren, begonnen wurde, hatte sie keinen Einfluss auf die Sterblichkeit an P1. Die Tiere die an P1 leben, bilden also die Gesamtzahl der berücksichtigten Tiere. Die Überlebensrate an P1 hat also in allen Graphen einen Wert von 1. Das gilt nicht für die Tiere, die bereits pränatal behandelt worden waren. Hier wurden auch Tiere berücksichtigt, die bereits an P1 tot waren. Die Überlebensrate hat also an P0 einen Wert von 1 und kann an P1 schon von diesem abweichen.

3.7.3 Analyse der Häufigkeit beobachteter Krampfanfälle

Während der Behandlung von Neugeborenen Mäusen der Linie $KCNQ2^{Nmf134}$ kam es immer wieder zu spontanen Krampfanfällen von homozygot mutierten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren. Wenn diese Krämpfe auftraten während die Tiere aus dem Käfig genommen und gewogen und gespritzt

wurden, konnte ihr Auftreten dokumentiert werden. Die Gesamtzahl der aufgetretenen Krämpfe wurde in Hinblick auf das Alter der jeweiligen Tiere, sowie auf ihre Behandlung untersucht. Statistisch wurden die drei postnatal behandelten Gruppen miteinander verglichen. Dabei wurden mit einem Ttest jeweils die Anteile der *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Tiere mit registrierten Krämpfen von zwei Gruppen miteinander verglichen.

3.8 Statistische Methoden

Sämtliche statistischen Analysen der vorliegenden Arbeit wurden mit Prism5 oder Statistica durchgeführt. Zum Einsatz kamen unterschiedliche Varianten des studentischen Ttests, verschiedene ANOVA-Analysen und posthoc-Analysen nach Newman-Keuls oder Bonferroni. Werte von $p \leq 0,05$ wurden mit * als signifikant, Werte von $p \leq 0,01$ mit ** als sehr signifikant, und Werte von $p \leq 0,001$ mit *** als hoch signifikant beschrieben. Wurde ein Ttest verwendet, handelte es sich stets um eine 2-Wege-Analyse. Bei alle in dieser Arbeit angegebenen Fehlern handelt es sich um SEM (*Standard Error of the Mean*)-Werte.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe eines Mausmodells, das eine Punktmutation im Gen von *KCNQ2* trägt, die Ursachen und Behandlungsmöglichkeiten neonataler Epilepsien untersucht. Der Phänotyp dieser Mauslinie wurde im Folgenden durch verschiedene elektrophysiologische, immunhistochemische und verhaltensbiologische Methoden charakterisiert. Dabei kam neben dem ursprünglichen B6-Hintergrund auch eine weitere Hintergrundlinie zum Einsatz. Danach konnten die pathologischen Konsequenzen der M-Kanal-Defizienz mit verschiedenen pharmakologischen Behandlungsstrategien abgemildert werden.

4.1 Die Mutation *KCNQ2*^{V182M} führte zu einer gestörten Entwicklung und erhöhter Mortalität im Mausmodell

Bei der äußerlichen Betrachtung der Tiere fiel zunächst auf, dass Mäuse, die die Mutation *KCNQ2*^{V182M} homozygot tragen, in der Regel kleiner und leichter als ihre gleichaltrigen Artgenossen waren (Abb. 4.1 A). So betrug der Gewichtsunterschied einer adulten Wildtypmaus der Linie *KCNQ2*^{Nmf134}, die durchschnittlich 32,2 g wog, im Vergleich zu einer homozygot mutierten 10,5 g (Abb. 4.1 C). Homozygote *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäuse waren mit durchschnittlich 21,7 g also rund ein Drittel leichter. Heterozygote Tiere zeigten bei durchschnittlichen 30,9 g Körpergewicht keine statistisch signifikanten Abweichungen vom Normalgewicht.

Auch bei der Betrachtung der Körperlänge war bei homozygot mutierten Mäusen eine deutliche Reduktion zu erkennen. Mit einer durchschnittlichen Körperlänge von 88 cm waren sie etwa 12 % kleiner als Mäuse, die kein oder nur ein mutiertes Allel trugen (Abb. 4.1 C).

Ebenfalls nur bei homozygot mutierten Mäusen wurde eine stark erhöhte Sterblichkeitsrate festgestellt. So waren nach zehn Wochen rund 88 % der *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäuse tot, während nur 24 % der heterozygoten und Wildtyp-Mäuse gestorben waren (Abb. 4.1 D). 52 % der homozygot mutierten Tiere starben dabei bereits in den ersten drei Wochen.

Untersuchte man die Genotypverteilung bei Nachkommen heterozygot verpaarter *KCNQ2*^{V182M/+}-Mäuse am ersten Tag nach der Geburt, fiel bereits eine Abweichung von der erwarteten Mendelschen Verteilung auf. So waren statt der erwarteten 25 % *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Tiere nur 16,7 % der Jungtiere homozygot für die beschriebene Mutation (Abb. 4.1 B). Dafür machten heterozygote Tiere 57,8 % anstatt der erwarteten 50 % aus. Der Anteil der Wildtypmäuse lag mit 25,5 % im Normalbereich.

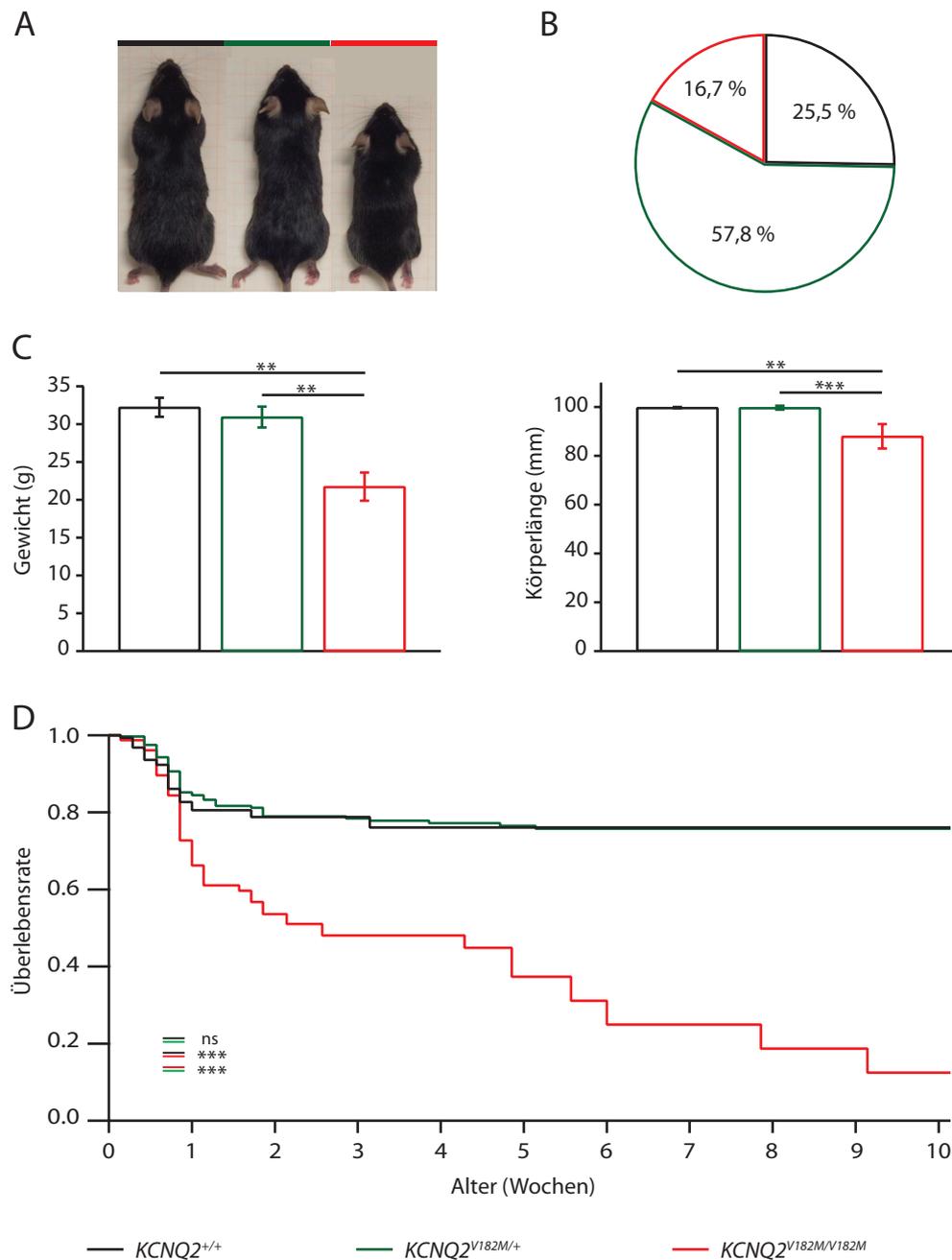


Abbildung 4.1: Phänotyp der $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäuse. Exemplarische Abbildung adulter Mäuse verschiedener Genotypen (A). Verteilung der Genotypen bei Nachkommen heterozygoter Verpaarungen ($n=204$) am Tag der Geburt (P0) (B). Gewicht und Körpergröße von Wildtyp- ($32,2 \pm 1,3$ g, $99,8 \pm 0,3$ mm, $n=4$), heterozygoten ($30,9 \pm 1,4$ g, $99,7 \pm 0,8$ mm, $n=7$), und homozygot mutierten ($21,7 \pm 1,9$ g, $88,0 \pm 1,9$ mm, $n=2$) $KCNQ2^{Nmf134}$ -Tieren (C). Darstellung der Überlebensraten von Wildtyp- ($n=156$), heterozygoten ($n=317$), und homozygot mutierten ($n=71$) $KCNQ2^{Nmf134}$ -Tieren nach Kaplan-Meier (D).

4.2 Die erhöhte Sterblichkeit homozygoter $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse war auf letale Krampfanfälle zurückzuführen

Bei homozygoten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren konnten spontane Krampfanfälle beobachtet werden. Dabei hatten einzelne Mäuse häufig auch wiederkehrende Anfälle. Die Krämpfe äußerten sich meist in sehr starken, sprungähnlichen Bewegungen von einigen Sekunden Länge, die dann in einen generalisiert erhöhten Muskeltonus übergingen. Dabei war an Vorder- und Hinterläufen deutlich ein Verkrampfen der Muskulatur zu erkennen. Dieser Krampf löste sich nach wenigen Sekunden, wenn die Maus nicht an dem Anfall verstorben war. Todesursache war demnach vermutlich die Ausbildung eines *Status Epilepticus*.

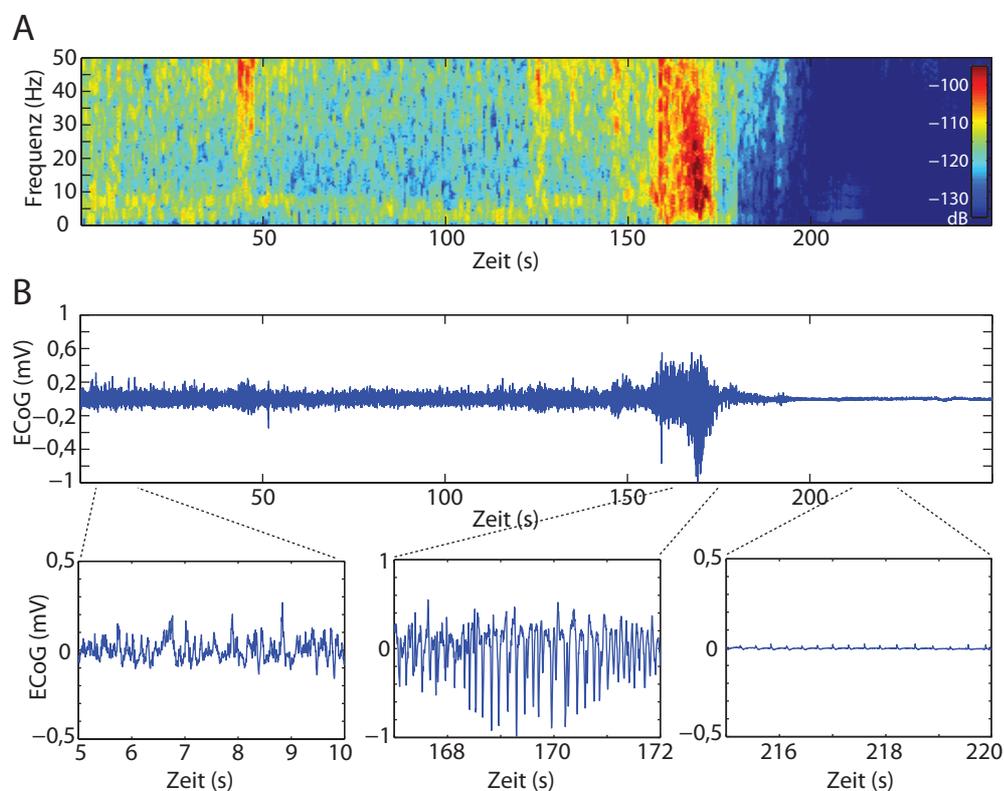


Abbildung 4.2: Neonataler Krampfanfall einer adulten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Maus. Exemplarische Abbildung eines telemetrisch aufgezeichneten Elektrocortikogramms einer adulten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Maus an P42. Dargestellt sind das Frequenzspektrum (A), sowie das Elektrocortikogramm (B) vor, während und nach einem letalen, epileptischen Krampfanfall.

Um nachweisen zu können, dass den beobachteten Krampfanfällen veränderte Aktivität im Gehirn zugrundelag, wurden telemetrisch in einzelnen adulten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen subdurale Elektrocortikogramme (ECoG) aufgenommen. Dazu wurden diesen Tieren Elektroden in den Schädelknochen implantiert, die mit einem unter dem Rückenfell befindlichen Transmitter verbunden waren. So konnten über mehrere Wochen dauerhaft Hirnstromaktivitäten des Cortex aufgezeichnet werden. Abb. 4.2 zeigt einen Ausschnitt einer solchen Aufnahme von einem

etwa sechs Wochen alten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tier. Dabei ist im Frequenzspektrum deutlich eine stark erhöhte Aktivität von rund 20s Dauer über einen breiten Frequenzbereich von etwa 5-25 Hz zu erkennen (Abb. 4.2 A). Bei der Betrachtung unterschiedlicher Teilbereiche des Elektrocortikogramms ist zu erkennen, dass vor dem Auftreten des Anfalls eine normale Hirnaktivität vorlag. Darauf folgte die beschriebene Phase stark erhöhter Aktivität, wonach dann keine Aktivität mehr detektiert werden konnte. Die Maus hatte also einen tödlichen Anfall erlitten.

4.3 $K_V7.2/7.3$ vermittelte Ströme wurden durch die Mutation $KCNQ2^{V182M}$ beeinträchtigt.

Der Phänotyp der $KCNQ2^{Nmf134}$ -Tiere ist mit der Punktmutation $KCNQ2^{V182M}$ assoziiert. Um den Einfluss der Mutation auf die grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften von M-Kanälen einschätzen zu können, wurden Zwei-Elektroden-Spannungsklemme-Messungen in *Xenopus laevis*-Oocyten durchgeführt. Um die heteromere Zusammensetzung physiologischer M-Kanäle nachzustellen, wurde cRNA von $KCNQ2$ zusammen mit der von $KCNQ3$ im Verhältnis von 1:1 in die Oocyten injiziert. Dabei wurde entweder $KCNQ2$ - oder $KCNQ2^{V182M}$ -cRNA verwendet. Um die heterozygote Situation nachzubilden, wurde $KCNQ2$ -, $KCNQ2^{V182M}$ - und $KCNQ3$ -cRNA im Verhältnis von 0,5:0,5:1, bei gleichbleibender RNA-Gesamtmenge injiziert.

Bei den Messungen wurden dann Spannungen nach dem in Abb. 4.3 A abgebildeten Protokoll angelegt, um $K_V7.2/7.3$ -vermittelte Ströme zu aktivieren. In Abb. 4.3 B sind beispielhaft gemessene Ströme für die verschiedenen cRNA-Kombinationen dargestellt. Es fiel auf, dass die Stromamplituden während des Aktivierungspulses bei Kanälen, die die mutierte $K_V7.2$ -Untereinheit enthielten, geringer ausfielen. So war bei einem Membranpotential von 0 mV bereits ein signifikanter Unterschied in der Stromamplitude zwischen $K_V7.2/7.3$ - und $K_V7.2^{V182M}/7.3$ -vermittelten Strömen messbar (Abb. 4.3 C). Bei höheren Membranpotentialen erhöhte sich diese Signifikanz weiter. Quantitativ verringerte sich die Stromamplitude bei 30 mV von $8,4 \pm 1,4 \mu\text{A}$ für den Wildtypkanal auf $4,7 \pm 0,8 \mu\text{A}$ für den mutierten Kanal. Das entspricht einem Anteil von $56 \pm 25 \%$. Die Stromamplituden der Oocyten, die sowohl den Wildtyp-, als auch den mutierten Kanal enthielten, lagen mit $7,1 \pm 1,0 \mu\text{A}$ und $84 \pm 28 \%$ des Wildtypkanals intermediär zwischen den Messwerten der für $KCNQ2$ homomeren Kanäle. Diese Unterschiede in der Stromamplitude waren, wenn auch noch nicht statistisch signifikant, bereits bei einem physiologisch relevanteren Membranpotential von -60 mV zu erkennen. Hier wies der Wildtypkanal eine Amplitude von $0,076 \pm 0,014 \mu\text{A}$ auf, während der mutierte Kanal mit einer Amplitude von $0,041 \pm 0,005 \mu\text{A}$ nur $54 \pm 25 \%$ der Wildtypamplitude erreichte.

Untersucht wurden außerdem die Stromamplituden direkt nach Beendigung des Aktivierungspulses, der sogenannten *Tail*-Ströme, die Aufschluss über das spannungsabhängige Schaltverhalten der Kanäle geben. Den normierten Strom-Spannungskurven dieser Messwerte in Abb. 4.3 D lässt sich entnehmen, dass sich die Aktivierungseigenschaften des mutierten Kanals verändert hatten. So öffneten die $K_V7.2^{V182M}/7.3$ -Kanäle, verglichen mit intakten $K_V7.2/7.3$ -Kanälen, erst verzögert bei positiveren Membranpotentialen. Die Messwerte für die $K_V7.2/7.2^{V182M}/7.3$ -

Kanäle waren auch hier intermediär einzuordnen.

Quantitativ lässt sich diese Verschiebung der Aktivierungskurve mit dem V_{50} -Wert beschreiben, der das Membranpotential angibt, bei dem genau die Hälfte der vorhandenen Kanäle geöffnet ist. Mit einem Wert von $-27,8$ mV wich das Membranpotential mit einer 50%igen Öffnungswahrscheinlichkeit des mutierten Kanals hoch signifikant von dem des Wildtyp-Kanals ab (Abb. 4.3 E). Dieser öffnete mit einem V_{50} von $-34,7$ mV rund $6,9 \pm 1,8$ mV früher. Der heteromere Kanal wies mit einem Wert von $-31,9$ mV immer noch eine im Vergleich zu dem homozygot mutierten Kanal signifikant verschobene Aktivierungskurve auf.

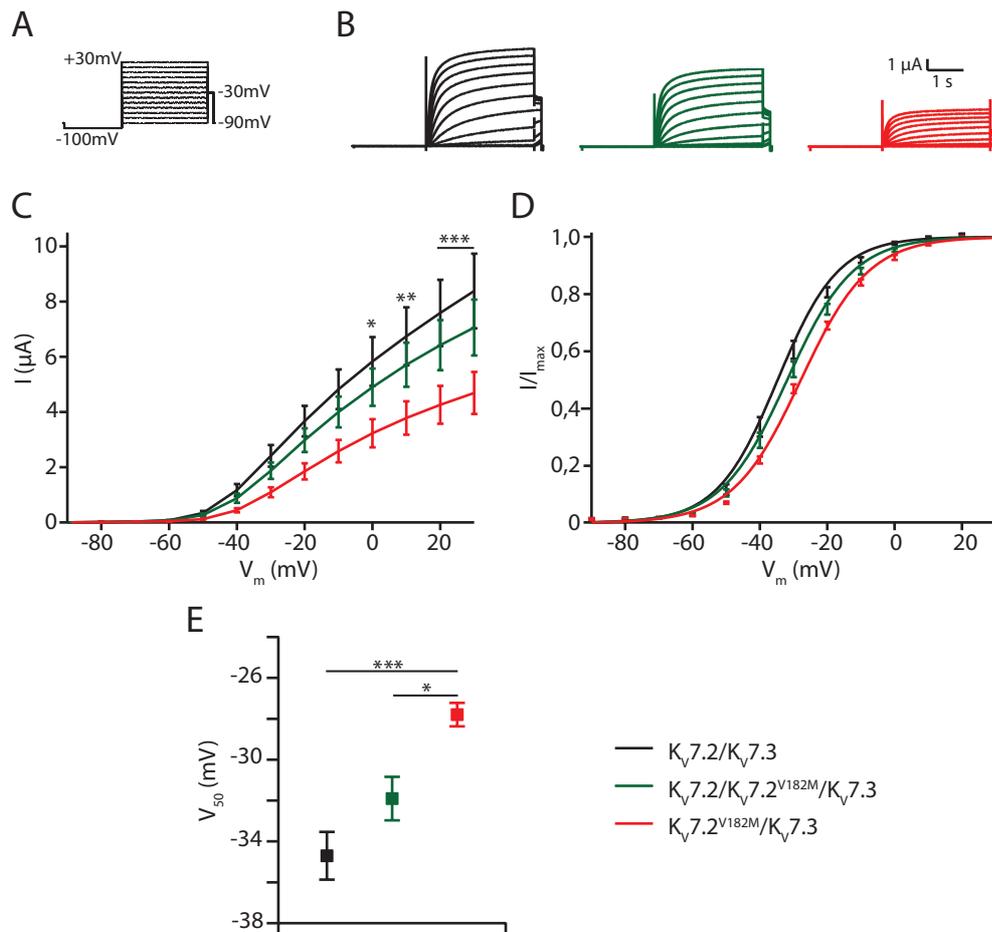


Abbildung 4.3: $K_V7.2/7.3$ vermittelte Ströme in *Xenopus laevis*-Oocyten wurden durch die Mutation $KCNQ2^{V182M}$ verändert. Mit Hilfe eines M-Kanal-aktivierenden Spannungsprotokolls (A) wurden $K_V7.2/7.3$ -vermittelte Ströme verschiedener Untereinheitenverhältnisse induziert (B). Dargestellt sind die absoluten Stromamplituden (C), sowie die normierten Strom-Spannungskurven mit dem gemittelten Fit der nicht normierten Einzelfits (D) ($n=10$ pro Gruppe). (E) zeigt die mittleren V_{50} -Werte der Einzelplots ($K_V7.2/7.3$: $-34,7 \pm 1,2$ mV, $K_V7.2/7.2^{V182M}/7.3$: $-31,9 \pm 1,1$ mV, $K_V7.2^{V182M}/7.3$: $-27,8 \pm 0,6$ mV).

4.4 CA1-Neuronen von mutierten Mäusen der Linie *KCNQ2*^{Nmf134} zeigten geringere M-Strom-Amplituden und eine erhöhte Erregbarkeit

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl die Leitfähigkeits-, als auch die Aktivierungseigenschaften von $K_V7.2/K_V7.3$ -Kanälen im heterologen Expressionssystem durch die Mutation *KCNQ2*^{V182M} beeinträchtigt wurden, sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit sich dieser Befund in den physiologischen Eigenschaften von M-Strömen im Mausgehirn widerspiegelt. Dazu wurden elektrophysiologische Messungen von CA1-Neuronen in Hirnschnitten von Mäusen der Linie *KCNQ2*^{Nmf134} durchgeführt. Mit einer Spannungsklemme wurden die Membranpotentiale der gepatchten Zellen dabei auf -80 mV geklemmt, um dann durch verschieden große Spannungsänderungen spannungsabhängige Ionenkanäle zu aktivieren (Abb. 4.4 A). Durch Zugabe von $0,5$ μ M TTX wurde dabei ein Auslösen von Aktionspotentialen verhindert. Nacheinander wurden in jeder Zelle Messungen durchgeführt, die nach Zugabe von 10 μ M XE991 wiederholt wurden. XE991 ist ein selektiver M-Kanal-Blocker, der die pharmakologische Isolierung von M-Strömen erlaubt. Ausgewertet wurden die subtrahierten Ströme $I_{XE}-I_{+XE}$ (Abb. 4.4 B). Dabei stellte sich heraus, dass die in Hirnschnitten von *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäusen gemessenen M-Strom-Amplituden bei Membranpotentialen von -30 und -40 mV signifikant kleiner waren, als die in *KCNQ2*^{+/+}-Tieren (Abb. 4.4 C). Auch hier waren sie mit einer Stromstärke bei -30 mV von 141 ± 27 pA, verglichen mit 291 ± 32 pA in Wildtyptieren um rund die Hälfte auf 49 ± 20 % reduziert. Die in heterozygoten Tieren gemessenen M-Strom-Amplituden unterschieden sich mit durchschnittlich 308 ± 15 pA statistisch nicht von den Wildtypamplituden. Auch im Hirnschnitt war bereits bei einem Membranpotential von -60 mV, wenn auch nicht statistisch signifikant, ein Trend zu niedrigeren M-Strom-Amplituden in homozygot mutierten Tieren feststellbar. Mit $9,7 \pm 7,8$ pA erreichten diese 63 ± 87 % der Wildtypamplituden ($15,4 \pm 5,6$ pA).

Wie die Analyse der normierten Strom-Spannungskurven zeigte, öffneten auch die M-Kanäle in CA1-Neuronen später, wenn sie die beschriebene Punktmutation trugen (Abb. 4.4 D). So war der V_{50} -Wert in *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäusen mit $-20,9$ mV rund $4,8 \pm 2,9$ mV positiver als der in *KCNQ2*^{+/+}-Mäusen (Abb. 4.4 E). Diese öffneten mit einem V_{50} -Wert von $-25,7$ mV signifikant früher.

Die M-Kanäle in heterozygoten *KCNQ2*^{V182M/+}-Mäusen schienen sich sogar früher als die in Wildtyptieren zu öffnen. So unterschied sich der entsprechende V_{50} -Wert von $-32,9$ mV signifikant von dem der Wildtyp- und homozygot mutierten Tiere (Abb. 4.4 E). Dies stand im Kontrast zu den im heterologen Expressionssystem erhobenen Daten.

Da der M-Strom durch seine hyperpolarisierenden Eigenschaften die neuronale Erregbarkeit beeinflusst, lag die Vermutung nahe, dass auch im vorliegenden Mausmodell die Erregbarkeit von CA1-Neuronen Veränderungen aufwies. Diese wurde im Folgenden durch die Injektion unterschiedlich starker Ströme in die gepatchten, nicht spannungsgeklemmten Zellen getestet (Abb. 4.5 C). Die Versuche wurden ohne TTX durchgeführt, so dass durch die injizierten Ströme Aktionspotentiale ausgelöst werden konnten (Abb. 4.5 A). Dabei unterschied sich die Anzahl

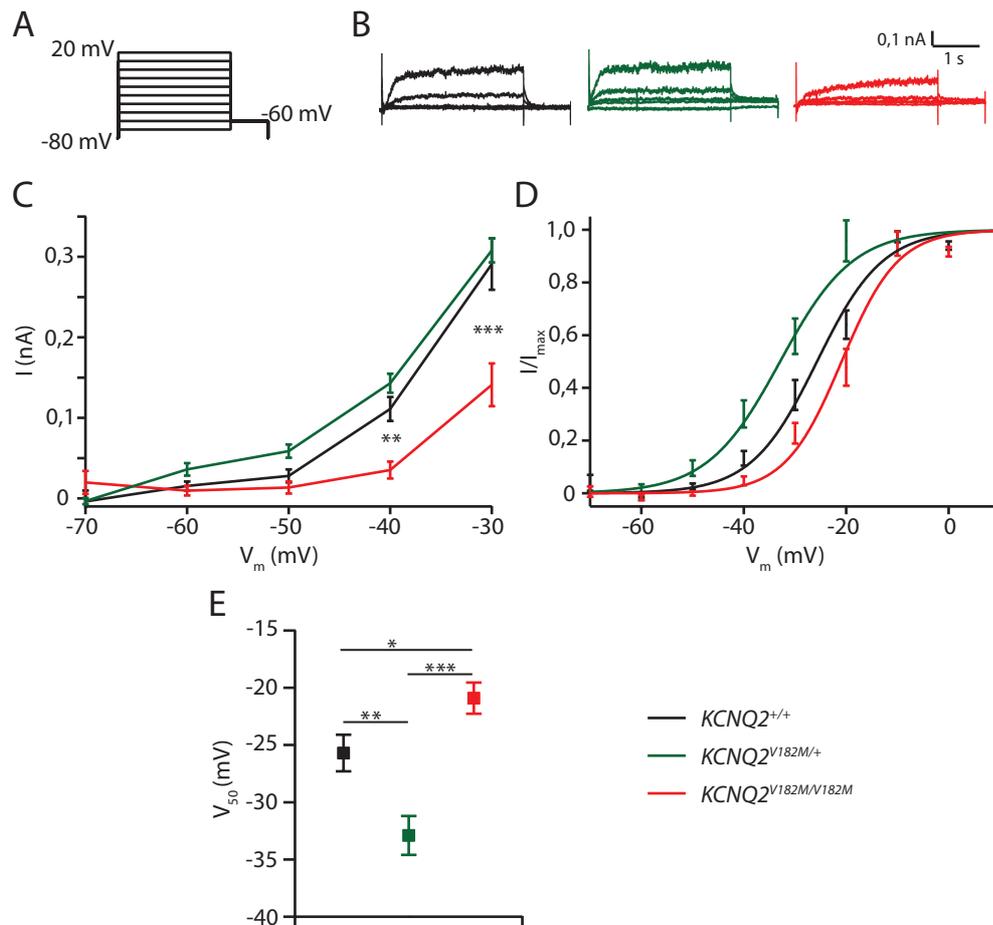


Abbildung 4.4: CA1-Neuronen von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen wiesen eine verringerte M-Strom-Amplitude auf. Mit Hilfe eines entsprechenden Spannungsprotokolls (A) wurden Ströme über die Zellmembranen von CA1-Neuronen induziert. Dargestellt sind subtrahierte Beispielspuren der drei Genotypen unter Verwendung des M-Kanal-Blockers XE991 (B). (C) zeigt die absoluten mittleren Amplituden bei verschiedenen angelegten Spannungen ($KCNQ2^{+/+}$: $n=13$ Zellen aus 4 Tieren, $KCNQ2^{V182M/+}$: $n=9/3$, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: $n=10/3$). Abgebildet sind weiterhin die normierten Strom-Spannungskurven mit dem gemittelten Fit der nicht normierten Einzelfits (D) ($n=9/3$, $9/3$, $8/3$), sowie die mittleren V_{50} -Werte der Einzelplots (E) ($KCNQ2^{+/+}$: $-25,7 \pm 1,6$ mV, $KCNQ2^{V182M/+}$: $-32,9 \pm 1,7$ mV, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: $-20,9 \pm 1,4$ mV).

der ausgelösten Aktionspotentiale abhängig vom Genotyp der gepatchten Zelle. So konnten sowohl in Zellen von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -, als auch von $KCNQ2^{V182M/+}$ -Mäusen, signifikant mehr Aktionspotentiale ausgelöst werden, als in Wildtypzellen (Abb. 4.5 B). Bei einer Stromstärke von 100 pA feuerten homozygot mutierte Zellen durchschnittlich $8,5 \pm 0,4$, heterozygote $8,4 \pm 0,7$ Aktionspotentiale. In Wildtypzellen wurden dagegen nur $6,5 \pm 0,3$ Aktionspotentiale erreicht.

Die elektrischen Eigenschaften der Zellmembranen unterschieden sich hingegen kaum. Das Ruhemembranpotential wurde durch die Mutation nicht signifikant beeinflusst und lag in allen Zellen um -62 mV (Abb. 4.5 D). Der Eingangswiderstand von CA1-Neuronen in $KCNQ2^{V182M/V182M}$ Mäusen war mit $308,5$ M Ω jedoch signifikant höher als der in $KCNQ2^{Nm134/+}$ -Tieren mit $237,8$ M Ω . Der Unterschied zu dem Eingangswiderstand von Wildtypneuronen ($260,9$ M Ω) war jedoch nicht statistisch signifikant.

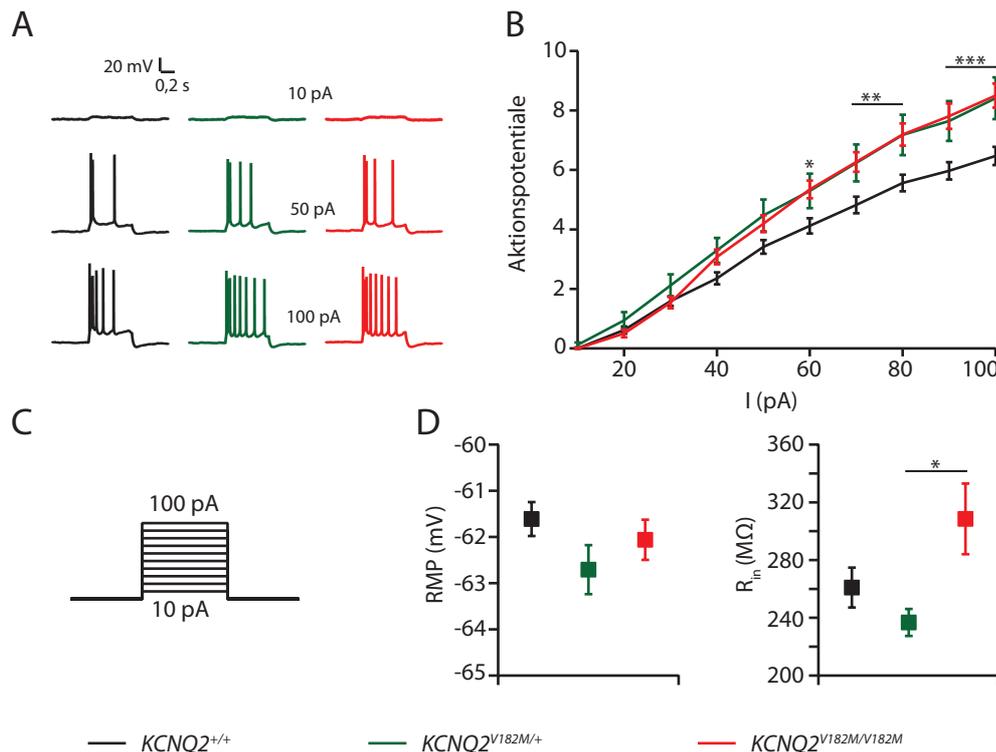


Abbildung 4.5: CA1-Neuronen von *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäusen waren übererregbar. In gepatchte CA1-Neuronen wurden Ströme unterschiedlicher Stärke injiziert (C). Gezeigt sind Beispielspuren der drei Genotypen bei unterschiedlichen Stromstärken (A), sowie die durchschnittliche Anzahl von ausgelösten Aktionspotentialen in Abhängigkeit der angelegten Stromstärke (B) (*KCNQ2*^{+/+}: n = 34 Zellen aus 9 Tieren, *KCNQ2*^{V182M/+}: n = 17/5, *KCNQ2*^{V182M/V182M}: n = 26/7). Weiterhin sind das durchschnittliche Ruhemembranpotential und der Eingangswiderstand der untersuchten Zellen angegeben (D) (*KCNQ2*^{+/+}: $-61,6 \pm 0,4$ mV, $260,9 \pm 13,9$ MΩ; *KCNQ2*^{V182M/+}: $-62,7 \pm 0,5$ mV, $237,8 \pm 9,4$ MΩ; *KCNQ2*^{V182M/V182M}: $-62,1 \pm 0,4$ mV, $308,5 \pm 24,5$ MΩ).

4.5 Die Gehirne mutierter *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäuse zeigten weder morphologische noch histologische Veränderungen

In einer dominant-negativen transgenen Mauslinie, die ebenfalls eine M-Kanal-Defizienz aufweist, kommt es zu morphologischen Veränderungen im Bereich des Hippocampus [105].

Durch eine Nissl-Färbung von Hirnschnitten aus *KCNQ2*^{V182M/V182M}- und *KCNQ2*^{V182M/+}-Mäusen sollte untersucht werden, ob auch im vorliegenden Mausmodell morphologische Abnormalitäten festgestellt werden konnten.

Wie Abb. 4.6 A jedoch zeigt, konnten keinerlei Auffälligkeiten in der Morphologie des Gehirns, und insbesondere des Hippocampus, festgestellt werden.

Darüber hinaus wurden durch Antikörperfärbungen weitere histologische Eigenschaften untersucht. So kann z.B. durch eine Antikörperfärbung des Transkriptionsfaktors cFos eine erhöhte neuronale Aktivität angezeigt werden, da cFos in besonders aktiven Neuronen hochreguliert wird [142]. In Abb. 4.6 B ist zu erkennen, dass nach Anfärben von Hirnschnitten mit einem cFos-Antikörper, sowohl in *KCNQ2*^{V182M/V182M}-, als auch in *KCNQ2*^{V182M/+}-Mäusen, vereinzelt stark angefärbte Zellen zu erkennen waren (hervorgehoben durch rote Pfeile).

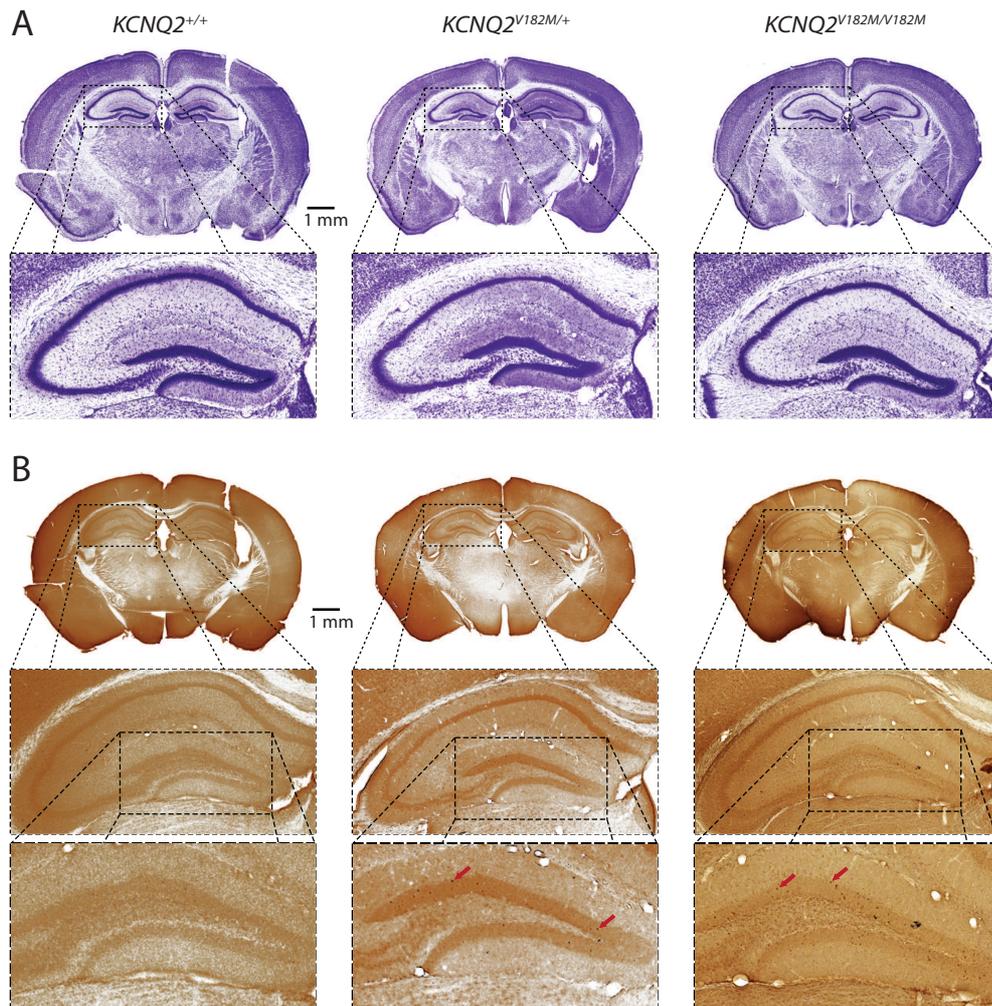


Abbildung 4.6: Die Gehirne von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen zeigten keine morphologischen Veränderungen. Abgebildet sind exemplarische coronale Hirnschnitte (50 μ m) von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ - (P38), $KCNQ2^{V182M/+}$ - (P43/P37) und $KCNQ2^{+/+}$ -Mäusen (P38), angefärbt durch eine Nisslfärbung (A), bzw. einen anti-cFos-Antikörper und anschließender DAB-Färbung (B). Vergrößert dargestellt ist jeweils der Hippocampus, in (B) zusätzlich der Gyrus dentatus. Die roten Pfeile markieren exemplarisch einzelne stark angefärbte cFos-positive Zellen.

Einen weiteren Hinweis auf eine histologische Veränderung kann eine Anfärbung von GFAP liefern. GFAP wird vor allem in aktiven Astrozyten exprimiert und kann so Hinweise auf eine reaktive Astrozytose geben [62]. Färbungen in $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäusen zeigten jedoch keine genotypabhängigen Veränderungen im Expressionsmuster von GFAP (Abb. 4.7 A). Auffällig war nur, dass in Schnitten aller drei untersuchten Genotypen relativ hohe Signalintensitäten vorlagen.

Ein Indikator für pathologische Prozesse sind außerdem aktivierte Mikroglia, die eine wichtige Funktion in Entzündungsprozessen bzw. der Immunantwort einnehmen [2]. Aktivierte Mikroglia lassen sich z.B. mit Isolectin sichtbar machen. Entsprechend angefärbte Schnitte von $KCNQ2^{V182M/+}$ - oder $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen zeigten jedoch keine erhöhten Signalintensitäten (Abb. 4.7 B).

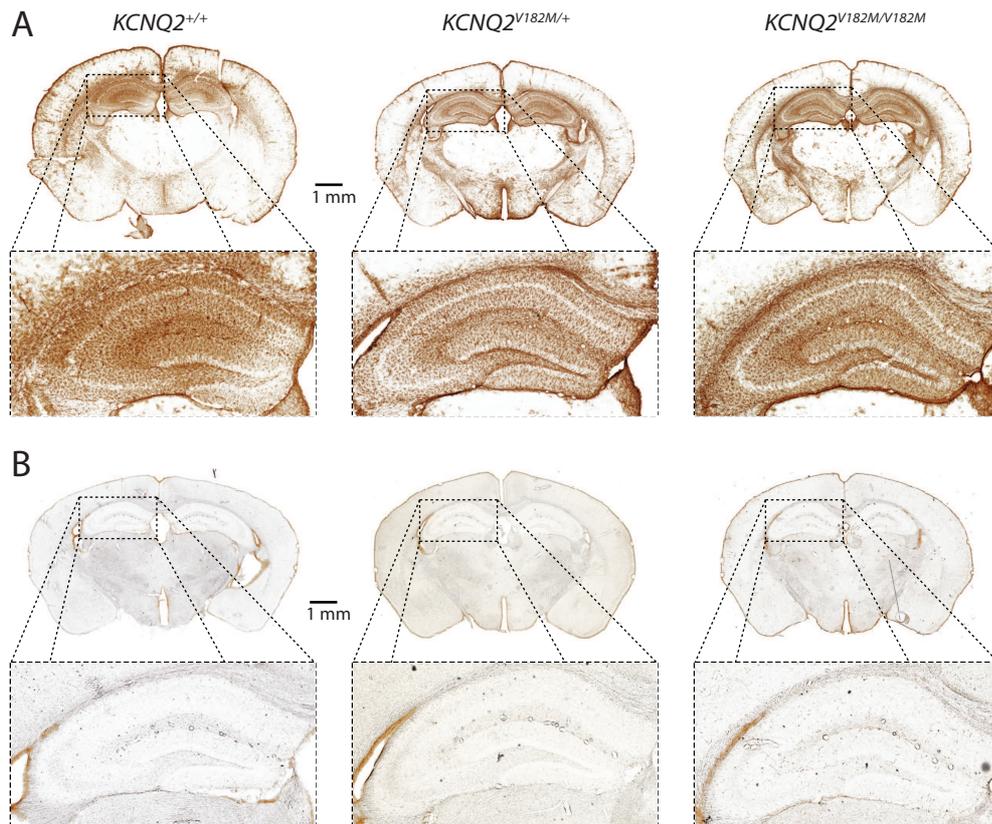


Abbildung 4.7: Die Gehirne von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen wiesen keine inflammatorischen Veränderungen auf. Abgebildet sind exemplarische coronale Hirnschnitte ($50\ \mu\text{m}$) von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ (P38), $KCNQ2^{V182M/+}$ (P37) und $KCNQ2^{+/+}$ -Mäusen (P38/P50), angefärbt durch einen GFAP-Antikörper (A) bzw. Isolectin (B) und anschließender DAB-Färbung. Vergrößert dargestellt ist jeweils der Hippocampus.

4.6 Die Expression des mutierten Allels war im Gehirn von heterozygoten $KCNQ2^{V182M/+}$ -Mäusen geringer als die des Wildtyp-Allels

Um abschätzen zu können, ob sich die relative Expression der beiden $KCNQ2$ -Allele in heterozygoten $KCNQ2^{V182M/+}$ -Mäusen durch die Mutation verändert, wurde eine quantitative *Real-Time-PCR* durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass in allen analysierten Hirnregionen das Expressionslevel des mutierten Allels im Vergleich zum Wildtypallel verringert war. Es konnte, trotz der aufgrund der geringen n -Zahl nicht erreichten statistischen Signifikanz, ein klarer Trend festgestellt werden (Abb. 4.8). Beide Allele würden bei regulärer Expression einen Wert von 0,5 erreichen müssen, um das Gesamtlevel von $KCNQ2$ -mRNA in Wildtyptieren zu erreichen. Die Expressionsniveaus der Wildtypallele befand sich auch in etwa in diesem Bereich, bzw. schienen im Cortex und Resthirn sogar über diesen hinauszugehen, während die Menge an mutierter mRNA in allen drei Hirnarealen geringer zu sein schien.

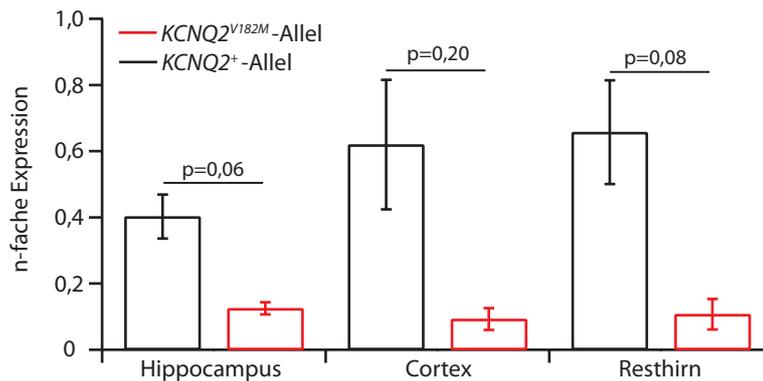


Abbildung 4.8: Expression der *KCNQ2*-Allele in heterozygoten *KCNQ2^{Nmf134}-*, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die Abbildung zeigt die relative Expression des mutierten und des Wildtypallels von *KCNQ2^{V182M/+}*-Tieren (n=2) im Vergleich zum Expressionsniveau des Wildtypallels in Wildtypmäusen (n=2) in Hippocampus, Cortex und Resthirn. Alle Signale wurden intern auf Synaptophysin normalisiert.

4.7 Das Verhalten von heterozygot mutierten *KCNQ2^{V182M/+}*-Mäusen zeigte Veränderungen

Um die Auswirkungen der Mutation *KCNQ2^{V182M}* auf das Verhalten heterozygoter *KCNQ2^{V182M/+}*-Mäuse zu untersuchen, wurden verschiedene verhaltensanalytische Experimente durchgeführt. Homozygot mutierte Tiere konnten leider nicht getestet werden, da sie aufgrund der hohen Sterblichkeit nicht in ausreichend großer Zahl zur Verfügung standen.

Untersucht werden sollte unter anderem, ob auch in dem vorliegenden Tiermodell eine abnormal erhöhte Bewegungsaktivität beobachtet werden konnte, wie dies in einem anderen M-Strom-defizienten, transgenen Mausmodell bereits beschrieben werden konnte [105]. Neben der Aktivität wurden Parameter wie Angst oder Erinnerungsvermögen, aber auch motorische Fähigkeiten untersucht.

Im *Elevated Plus Maze* kann die Neugierde oder auch ängstliches Verhalten von Nagern quantifiziert werden. Ein wichtiger Parameter ist dabei die Zeit, nach der eine Maus zum ersten Mal einen offenen, also potenziell gefährlicheren Teil der Versuchsanlage betritt. Ein anderer quantitativer Richtwert für die gleichen Eigenschaften ist die Gesamtzahl der Eintritte in einen offenen Arm im Verhältnis zur Gesamtzahl aller Eintritte.

Für beide Parameter konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden (Abb. 4.9 A). Es war allerdings ein Trend zu erkennen, nach dem heterozygot mutierte Tiere etwas später und insgesamt auch seltener einen offenen Arm betreten hatten. Signifikant verringert war in *KCNQ2^{V182M/+}*-Mäusen hingegen die Gesamtzahl der Armeintritte über den gesamten Versuchszeitraum (Abb. 4.9 A unten rechts). Dies deutete darauf hin, dass die milde M-Strom-Defizienz dieser Tiere zu einer verringerten allgemeinen Aktivität oder einer geringeren Erkundungsfreude, bzw. ängstlicherem Verhalten führte.

In den darauffolgenden Tests wurden die motorischen Fähigkeiten der Mäuse untersucht. Dabei wurden die Griffstärke im *Grip Strength*-Aufbau und die motorische Balance im sogenannten

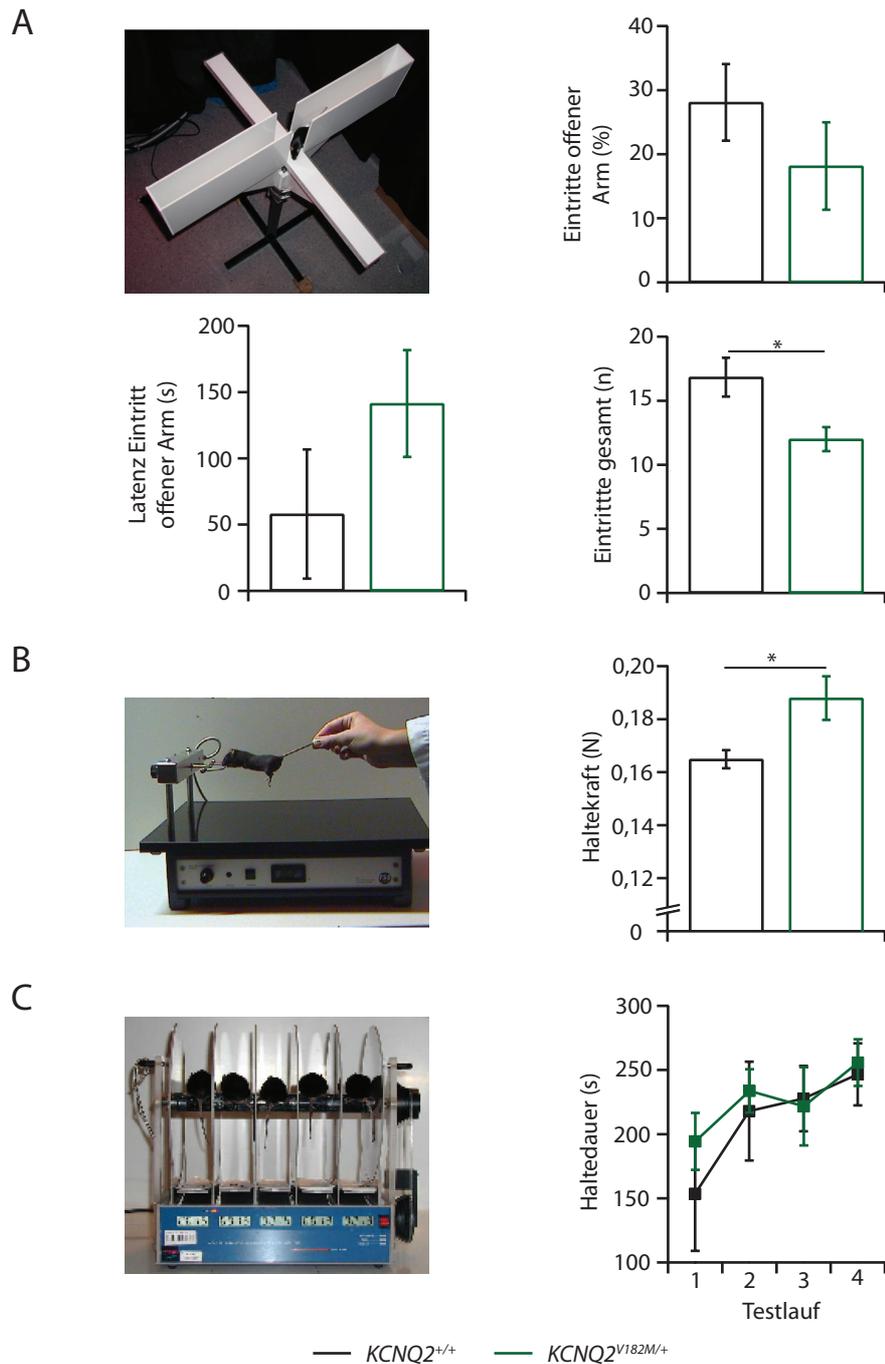


Abbildung 4.9: Erkundungsverhalten und Muskelkraft von $KCNQ2^{V182M/+}$ -Mäusen weisen Veränderungen auf. Dargestellt sind verschiedene verhaltensanalytische Untersuchungen von $KCNQ2^{V182M/+}$ - und $KCNQ2^{+/+}$ -Mäusen ($n=6$ pro Genotyp). Das Verhalten im *Elevated Plus Maze* wurde durch die prozentualen Eintritte in einen offenen Arm ($KCNQ2^{+/+}$: $28,1 \pm 6,0\%$, $KCNQ2^{V182M/+}$: $18,2 \pm 6,9\%$), die initiale Latenz bis zum Betreten eines offenen Arms ($KCNQ2^{+/+}$: 58 ± 49 s, $KCNQ2^{V182M/+}$: 141 ± 40 s), sowie die Gesamtzahl aller Armeintritte ($KCNQ2^{+/+}$: $16,8 \pm 1,5$, $KCNQ2^{V182M/+}$: $12,0 \pm 0,9$) beschrieben (A). Für den *Grip Strength-Test* ist die durchschnittliche Haltekraft in Newton angegeben (B) ($KCNQ2^{+/+}$: $0,1649 \pm 0,0035$ N, $KCNQ2^{V182M/+}$: $0,1880 \pm 0,0082$ N). In (C) sind die durchschnittlichen Haltedauern im *Rotarod* von vier Testläufen pro Genotyp dargestellt ($KCNQ2^{+/+}$: 154 ± 45 s, 218 ± 39 s, 228 ± 26 s, 247 ± 24 s; $KCNQ2^{V182M/+}$: 194 ± 22 s, 234 ± 17 s, 222 ± 30 s, 256 ± 18 s).

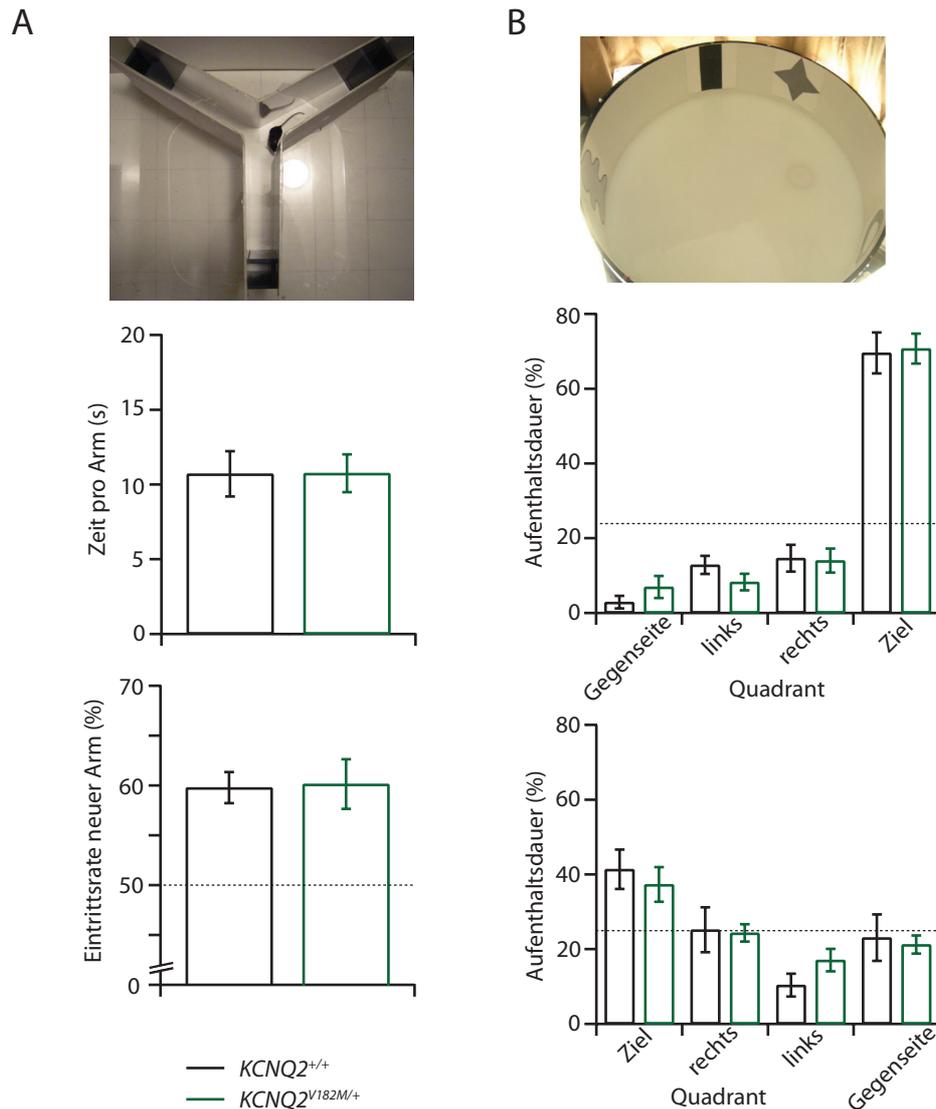


Abbildung 4.10: Das räumliche Kurz- und Langzeitgedächtnis von $KCNQ2^{V182M/+}$ -Mäusen zeigte keine Beeinträchtigungen. Dargestellt sind die Zeit pro Arm ($KCNQ2^{+/+}$: $10,7 \pm 1,5$ s, $KCNQ2^{V182M/+}$: $10,8 \pm 1,3$ s) und die Eintrittsrate in den jeweils neuen Arm ($KCNQ2^{+/+}$: $59,8 \pm 1,6$ %, $KCNQ2^{V182M/+}$: $60,1 \pm 2,5$ %) im *Y-Maze* (A), sowie die jeweilige Aufenthaltsdauer im Zielquadranten des Lern- ($KCNQ2^{+/+}$: $69,6 \pm 5,5$ %, $KCNQ2^{V182M/+}$: $70,7 \pm 4,0$ %) (B oben) und des Umlern-Testlaufes ($KCNQ2^{+/+}$: $41,4 \pm 5,3$ %, $KCNQ2^{V182M/+}$: $37,3 \pm 4,7$ %) (B unten) im *Water Maze*-Test (n= 6 pro Genotyp).

Rotarod getestet. Die Haltekraft von $KCNQ2^{V182M/+}$ -Mäusen war dabei mit 0,188 N, verglichen mit 0,165 N bei $KCNQ2^{+/+}$ -Tieren, signifikant erhöht (Abb. 4.9 B). Die Balance der Tiere im *Rotarod* wies hingegen keinen Unterschied zu der von Wildtyp-Tieren auf (Abb. 4.9 C).

Die anschließende Testreihe diente dazu, das räumliche Erinnerungsvermögen und die Lernfähigkeit einzuordnen. Im *Y-Maze* kann dafür das Arbeitsgedächtnis durch Quantifizierung der Alternierungsrate getestet werden. Die durchschnittliche Zeit, die in einem Arm verbracht wird, ist wiederum ein Maß für die Grundaktivität der Tiere. Beide Parameter waren in den verglichenen Gruppen mit einer Alternierungsrate von ca. 60 % und einer durchschnittlichen Verweildauer

pro Arm von gut 10s, statistisch identisch (Abb. 4.10 A).

Auch im *Water Maze* konnte keine Veränderung des Erinnerungsvermögens und der Lernfähigkeit festgestellt werden. Die Angabe der Aufenthaltsdauer pro Quadrant dient dabei als Maß für die räumliche Orientierung und die Fähigkeit, sich an die Position einer Plattform zu erinnern, die in den Durchläufen zuvor im Wasserbecken installiert war. Dabei wiesen sowohl die Test-, als auch die Kontrollgruppe im ersten Testlauf nach Erlernen der Plattformposition die gleichen Präferenzen für den Plattformquadranten auf (Abb. 4.10 B oben). Im anschließenden Umlernen auf eine neue Plattformposition waren ebenfalls beide Gruppen gleich erfolgreich (Abb. 4.10 B unten).

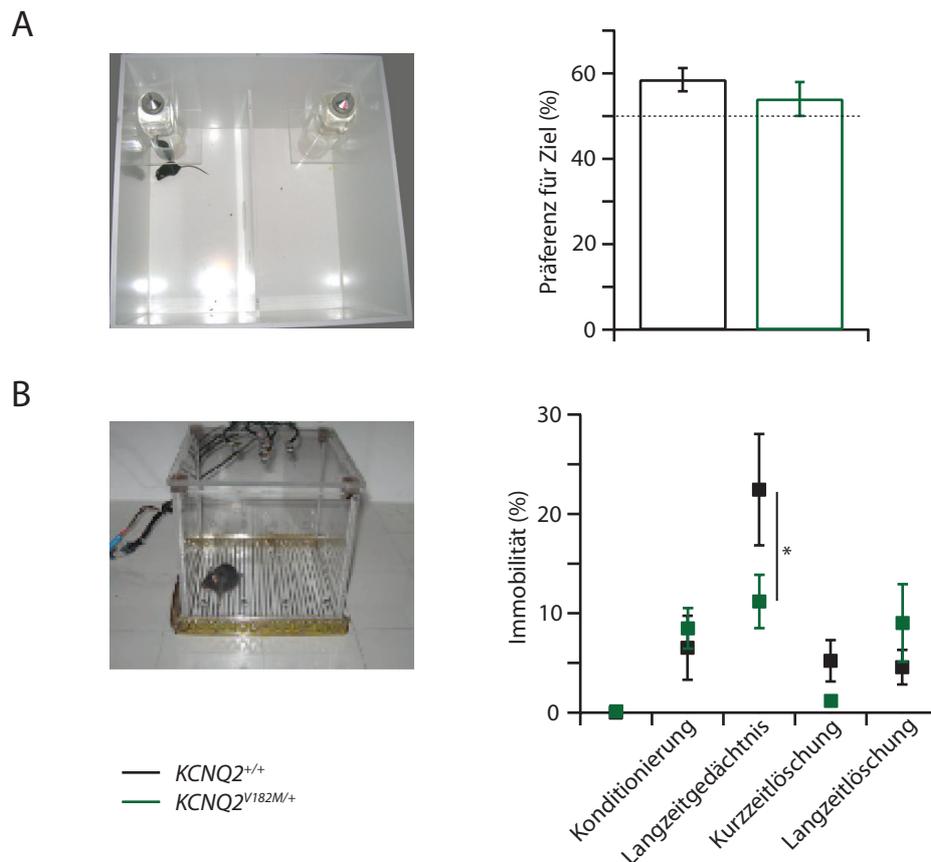


Abbildung 4.11: Das Langzeitgedächtnis für emotionale Reize von $KCNQ2^{V182M/+}$ -Mäusen zeigte Veränderungen. Dargestellt sind die Präferenz für den Zielbereich im *One-Trial-Spatial-Learning-Test* von $KCNQ2^{V182M/+}$ ($54,0 \pm 4,0\%$)- und $KCNQ2^{+/+}$ -Mäusen ($58,5 \pm 2,7\%$) (A) ($n=6$ pro Genotyp). (B) zeigt den Immobilitätsgrad heterozygoter und Wildtypmäuse in je vier Testläufen des *Foot Shock*-Versuchsaufbaus (B) ($n=6$ pro Gruppe) ($KCNQ2^{V182M/+}$: $8,5 \pm 2,1\%$, $11,2 \pm 2,7\%$, $1,2 \pm 0,5\%$, $9,0 \pm 3,9\%$; $KCNQ2^{+/+}$: $6,5 \pm 3,2\%$, $22,4 \pm 5,6\%$, $5,2 \pm 2,1\%$, $4,6 \pm 1,8\%$).

Um räumliches Lernen mit einem weiteren Reiz zu versehen, wurde der sogenannte *One Trial Spatial Learning-Test* durchgeführt. Hierbei wurde die relative Aufenthaltsdauer in dem Bereich bestimmt, in dem sich zuvor eine weitere, weibliche Maus in einem abgetrennten Areal aufgehalten hatte. Auch in diesem Test wiesen die Tiere beider Gruppen eine vergleichbare Präferenz für den Zielbereich auf (Abb. 4.11 A).

Abschließend wurde in einem *Fear Conditioning*-Versuchsaufbau das Erinnerungsvermögen

in Verbindung mit einem unangenehmen Schmerzreiz in Form eines Elektroschocks getestet. Das Langzeitgedächtnis der *KCNQ2^{V182M/+}*-Mäuse war dabei signifikant schlechter als das von *KCNQ2^{+/+}*-Mäusen (Abb. 4.11 B). So zeigten die heterozygoten Tiere durch eine mit durchschnittlichen 11 % weniger ausgeprägte Immobilität, dass sie sich im Vergleich zu den Wildtyptieren, die eine Immobilitätsrate von 22 % aufwiesen, schlechter an den einige Tage zurückliegenden Schmerzreiz erinnern konnten.

4.8 Das Verhalten von heterozygot und homozygot mutierten CD1-*KCNQ2^{Nmf134}*-Mäusen zeigte ebenfalls deutliche Veränderungen

Da die Zucht der *KCNQ2^{Nmf134}*-Tiere relativ schwierig war, und nur unter großem Aufwand höhere Tierzahlen erreicht werden konnten, wurde die Mutation *KCNQ2^{V182M}* in eine andere Linie eingekreuzt. Verwendet wurde hierfür die Auszuchtlinie CD1, da diese relativ große Würfe aufweist, um so die Effektivität der Zucht zu erhöhen. Außerdem sollte durch die Verwendung einer anderen Hintergrundlinie ein möglicher Effekt des genetischen Hintergrundes auf den Phänotyp überprüft werden. Nach dreimaligem Rückkreuzen wurde der Phänotyp der Mäuse untersucht. Auch vor dem neuen genetischen Hintergrund war ein epileptischer Phänotyp der Tiere zu erkennen. So wirkte sich auch in CD1-*KCNQ2^{Nmf134}*-Tieren die eingekreuzte Mutation negativ auf die Überlebensrate von homozygot mutierten Tieren aus (Abb. 4.12 D). Adulte Tiere ab einem Alter von vier Wochen überlebten nur zu etwa 35 % das erste Lebensjahr. Beobachtete Wildtyp- und heterozygote Tiere überlebten hingegen zu 100 %. Dabei wurden immer wieder spontane Krampfanfälle bei homozygot mutierten Tieren beobachtet.

Darüber hinaus waren CD1-*KCNQ2^{V182M/V182M}*-Tiere ebenfalls leichter und kleiner als ihre gleichaltrigen Geschwister (Abb. 4.12 A+B). In adulten Mäusen manifestierte sich dies in einem Gewichtsunterschied von gut 6 g. Bei einem durchschnittlichen Gewicht der Wildtypiere von $47,9 \pm 2,5$ g waren CD1-*KCNQ2^{V182M/V182M}*-Tiere mit durchschnittlich $41,5 \pm 2,8$ g also etwa 13 % leichter. Heterozygote Tiere wiesen mit durchschnittlich $48,2 \pm 2,2$ g Normalgewicht auf. Der negative Effekt der homozygot vorliegenden Mutation von *KCNQ2* schien also vor dem CD1-Hintergrund ähnlich stark ausgeprägt zu sein, wie vor dem B6-Hintergrund. Auch in der Körpergröße konnten Unterschiede festgestellt werden. Diese waren mit rund 15 % zwischen Wildtyp- ($110,4 \pm 1,8$ mm) und homozygot mutierten Tieren ($104,1 \pm 2,0$ mm) in etwa mit denen in Tieren mit B6-Hintergrund vergleichbar.

Um sicherzustellen, dass auch der elektrophysiologische Phänotyp von CD1-*KCNQ2^{V182M/V182M}*-Tieren mit dem von mutierten B6-Tieren vergleichbar ist, wurden erneut Stromklemme-Messungen in Hirnschnitten durchgeführt. CA1-Neuronen von Wildtyp-CD1-Tieren waren demnach bei einem applizierten Strom von 100 pA, mit durchschnittlich $4,8 \pm 0,8$ Aktionspotentialen, signifikant weniger aktiv als CA1-Neuronen von CD1-*KCNQ2^{V182M/V182M}*-Tieren mit $7,5 \pm 0,5$ Aktionspotentialen (Abb. 4.12 C). Der beobachtete Phänotyp von CD1-*KCNQ2^{Nmf134}*-Tieren war also mit dem der *KCNQ2^{Nmf134}*-Tiere vor einem B6-Hintergrund

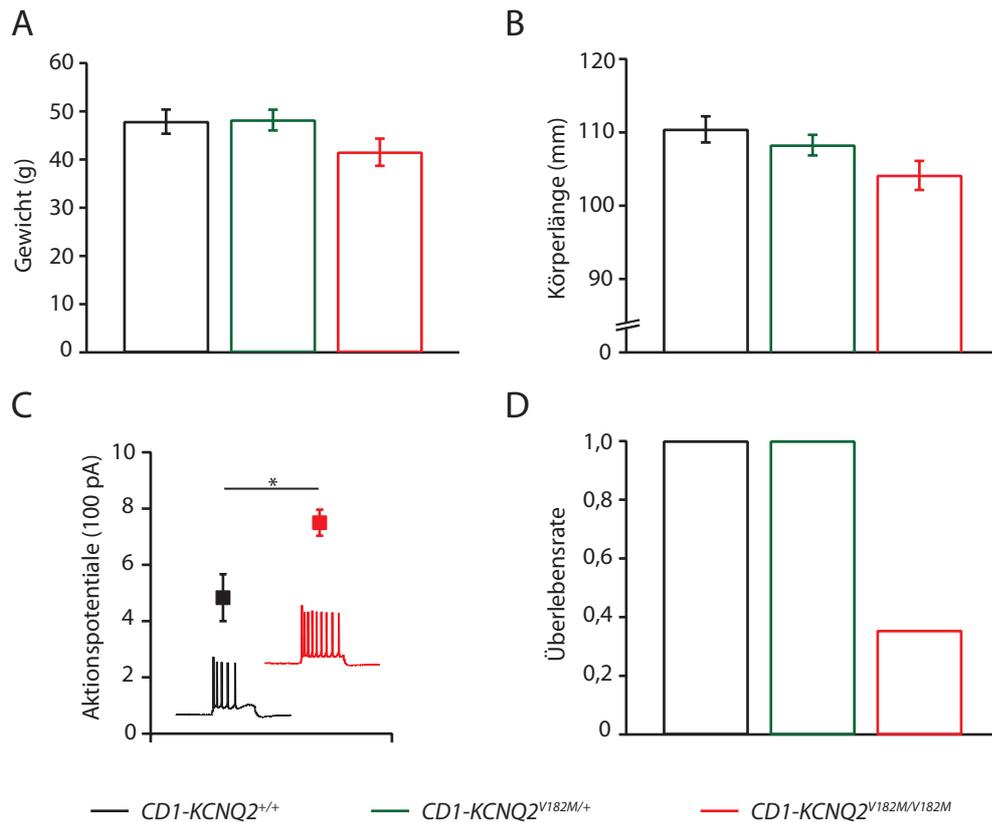


Abbildung 4.12: Phänotyp der $CD1-KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäuse. Dargestellt sind Gewicht (A) und Körpergröße (B) von Wildtyp- ($47,9 \pm 2,5$ g, $110,4 \pm 1,8$ mm, $n=5$), heterozygoten ($48,2 \pm 2,2$ g, $108,3 \pm 1,4$ mm, $n=8$), und homozygot mutierten ($41,5 \pm 2,8$ g, $104,1 \pm 2,0$ mm, $n=8$) $CD1-KCNQ2^{Nmf134}$ -Tieren. Weiterhin sind die durchschnittliche Anzahl gefeuerter Aktionspotentiale von CA1-Neuronen dargestellt, in die ein Strom von 100 pA injiziert wurde ($CD1-KCNQ2^{V182M/V182M}$: $7,5 \pm 0,5$ Aktionspotentiale, $n=8$ Zellen aus 2 Tieren; $CD1-KCNQ2^{+/+}$: $4,8 \pm 0,8$ Aktionspotentiale, $n=6/2$) (C). (D) zeigt die Überlebensrate nach etwa einem Jahr, von Tieren ab einem Alter von ca. vier Wochen aller drei Genotypen der Linie $CD1-KCNQ2^{Nmf134}$.

vergleichbar.

Da $CD1-KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere aufgrund größerer Würfe in ausreichender Zahl zur Verfügung standen, konnten Verhaltensanalysen aller drei Genotypen durchgeführt werden. So wurden in einer weiteren Versuchsreihe Tiere aller drei Genotypen analysiert. Im *Open Field*-Test machte sich dabei eine erhöhte Aktivität homozygot mutierter Tiere bemerkbar, während sich heterozygote normal verhielten (Abb. 4.13 A). Besonders in den ersten fünf Minuten des Testlaufes legten homozygot mutierte $CD1-KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere mit $31,3 \pm 3,8$ m eine hochsignifikant längere Strecke zurück als Wildtypiere mit $17,3 \pm 0,6$ m. In den zweiten fünf Minuten war dieser genotypabhängige Unterschied noch sehr signifikant.

Das im *Water Maze*-Test untersuchte räumliche Langzeitgedächtnis war hingegen nicht von den Genotypen der Linie $CD1-KCNQ2^{Nmf134}$ abhängig (Abb. 4.13 B). So war die Präferenz für den Zielquadranten von homozygot ($49,5 \pm 7,4$ %) und heterozygot mutierten Tieren ($39,2 \pm 3,3$ %) statistisch nicht von der der Wildtypiere ($49,1 \pm 5,6$ %) unterscheidbar.

Das Arbeitsgedächtnis von Tieren, die die Mutation $KCNQ2^{V182M}$ trugen, schien hingegen

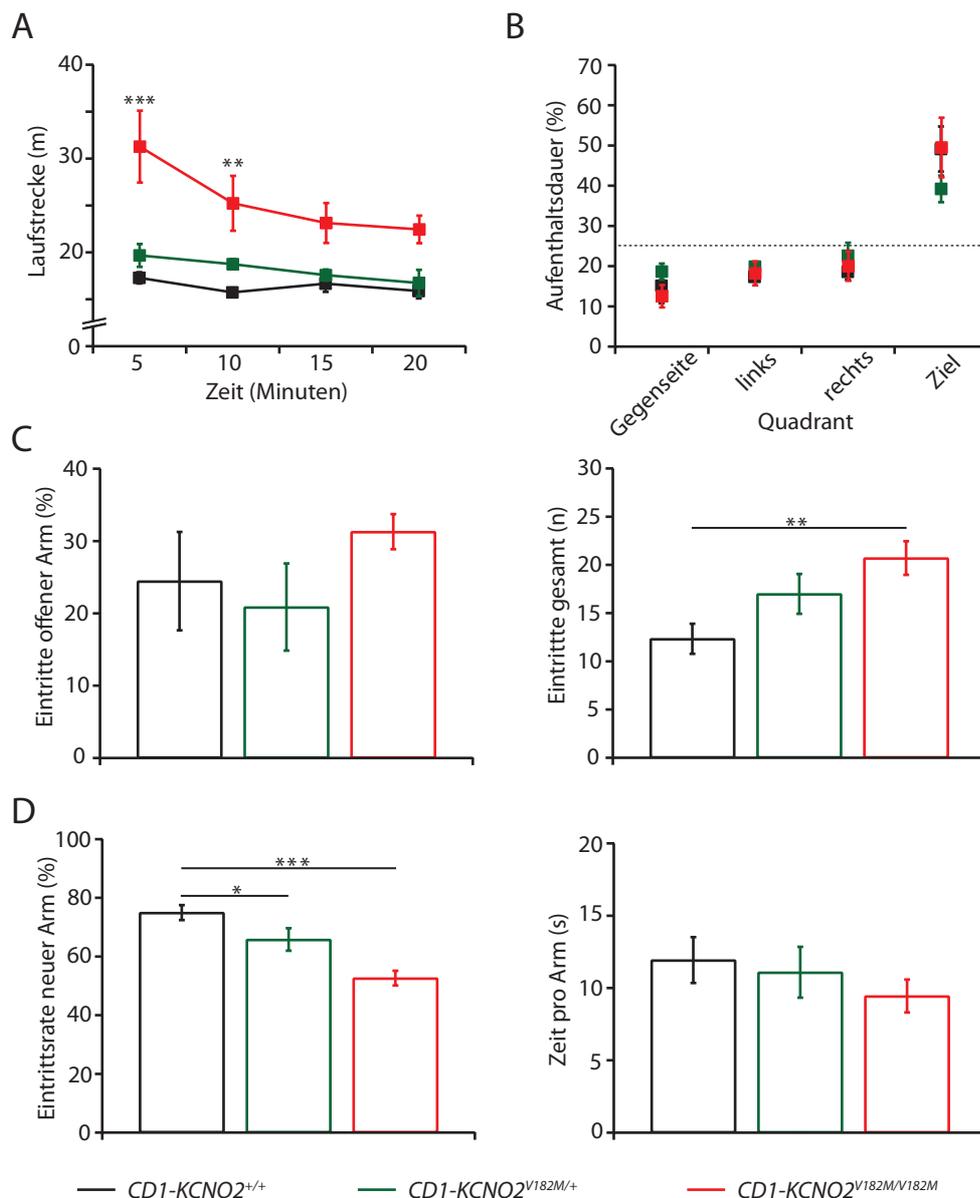


Abbildung 4.13: Aktivität, Erkundungsverhalten und Arbeitsgedächtnis von mutierten CD1-KCNQ2^{Nmf134}-Mäusen wiesen Veränderungen auf. Dargestellt sind verschiedene verhaltensanalytische Untersuchungen von CD1-KCNQ2^{Nmf134}-Tieren aller drei Genotypen (n= 6-7 pro Genotyp). (A) zeigt die zurückgelegte Strecke von CD1-KCNQ2^{+/+}-, CD1-KCNQ2^{V182M/+} und CD1-KCNQ2^{V182M/V182M}-Mäusen im *Open Field*. In (B) ist für den *Water Maze*-Test die relative Aufenthaltsdauer im Zielquadranten des Lern-Testlaufes dargestellt (CD1-KCNQ2^{+/+}: 49,1 ± 5,6 %, CD1-KCNQ2^{V182M/+}: 39,2 ± 3,3 %, CD1-KCNQ2^{V182M/V182M}: 49,5 ± 7,4 %). Das Verhalten im *Elevated Plus Maze* wurde durch die prozentualen Eintritte in einen offenen Arm (CD1-KCNQ2^{+/+}: 24,5 ± 6,8 %, CD1-KCNQ2^{V182M/+}: 20,9 ± 6,0 %, CD1-KCNQ2^{V182M/V182M}: 31,3 ± 6,0 %) und die Gesamtzahl aller Armeintritte (CD1-KCNQ2^{+/+}: 12,3 ± 1,6, CD1-KCNQ2^{V182M/+}: 17,0 ± 2,1, CD1-KCNQ2^{V182M/V182M}: 20,7 ± 1,7) beschrieben (C). Für den *Y Maze*-Test sind die Alternierungsrate (CD1-KCNQ2^{+/+}: 75,0 ± 2,6 %, CD1-KCNQ2^{V182M/+}: 65,8 ± 3,8 %, CD1-KCNQ2^{V182M/V182M}: 52,7 ± 2,5 %) und die durchschnittliche Zeit pro Arm (CD1-KCNQ2^{+/+}: 11,9 ± 1,6 s, CD1-KCNQ2^{V182M/+}: 11,1 ± 1,8 s, CD1-KCNQ2^{V182M/V182M}: 9,4 ± 1,1 s) angegeben (D).

beeinträchtigt zu sein (Abb. 4.13 D). Während alle Mäuse vergleichbar viel Zeit in einem Arm verbrachten ((Abb. 4.13 D) rechts), war die Rate, mit der homozygot mutierte $CD1-KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere den jeweils neuen Arm betraten ($52,7 \pm 2,5\%$), hoch signifikant geringer, als die der Wildtypiere ($75,0 \pm 2,6\%$) ((Abb. 4.13 D) links). Heterozygote Mäuse unterschieden sich mit $65,8 \pm 3,8\%$ immer noch signifikant von den Wildtypieren. In den vorherigen Versuchen mit Tieren mit B6-Hintergrund, war in diesem Test noch kein Unterschied für heterozygote Tiere feststellbar gewesen (Vgl. Abb. 4.10 A).

In weiteren Untersuchungen wurde mit Hilfe des *Elevated Plus Maze* das Erkundungsverhalten der Tiere analysiert. In diesem Test hatten die vorhergehenden Versuche eine leichte aber signifikante Verringerung der Gesamt-Armeintritte von heterozygoten $KCNQ2^{V182M/+}$ -Tieren im Vergleich zu Wildtyp B6-Tieren gezeigt (Vgl. Abb. 4.9 A). Dies ließ auf eine verringerte Grundaktivität heterozygot mutierter Tiere schließen. In den Versuchen mit den $CD1-KCNQ2^{Nmf134}$ -Tieren zeigte sich jedoch, dass die Zahl der Gesamt-Eintritte für homozygot mutierte Tiere mit $20,7 \pm 1,7$, im Vergleich zu der von CD1-Wildtypieren ($12,3 \pm 1,6$) sehr signifikant erhöht war (Abb. 4.13 C). Die Werte der heterozygoten Tiere lagen mit $17,0 \pm 2,1$ Gesamteintritten intermediär zwischen denen der homozygoten Tiere. Sie waren damit ebenfalls, wenn auch nicht statistisch signifikant, im Vergleich zu den Wildtypieren leicht erhöht. Die Ergebnisse dieses Tests widersprachen also denen der zuvor durchgeführten Studien in B6-Tieren. Die Rate der Eintritte in einen offenen Arm war außerdem nicht genotypabhängig und ließ somit keine Schlüsse über ein verändertes Verhalten zu.

4.9 Die Netzwerkaktivität im Hippocampus von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen war erhöht

Um zu untersuchen, wie sich die erhöhte neuronale Erregbarkeit auf die neonatale Netzwerkaktivität in Hippocampus und Cortex auswirkte, wurden *in vivo*-Ableitungen in homozygot mutierten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ - und $CD1-KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren durchgeführt und mit entsprechenden Wildtyp-Kontrolltieren verglichen. Dafür wurden ebenfalls Tiere zweier Hintergründe verwendet, da aufgrund der hohen Sterblichkeit nicht genügend $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse zur Verfügung standen. In den folgenden Experimenten konnte aber kein Effekt der Hintergrundlinie auf die untersuchten Ereignissen beobachtet werden (nicht gezeigt). Daher wurden die Daten zusammengefasst ausgewertet.

Verwendet wurden lineare 16-Kanal-Siliziumelektroden mit einem Kanalabstand von $100\ \mu\text{m}$. Eine Elektrode befand sich dabei im visuellen Cortex, die andere im Hippocampus. Die verwendeten Tiere waren in einem Alter von P6-P7 und wurden im wachen Zustand abgeleitet. Da im Alter von P6/P7 die Augen noch geschlossen sind, besteht die im visuellen Cortex V1 gemessene Aktivität im Wesentlichen aus intrinsisch im Cortex generierter bzw. durch spontane Calciumwellen in der Retina getriggerte Aktivität [53].

Im Hippocampus konnten zwei charakteristische Aktivitätsmuster festgestellt werden. Zum Einen sogenannte *Sharp Waves*, die eine Phasenumkehr in der Pyramidenzellschicht von CA1

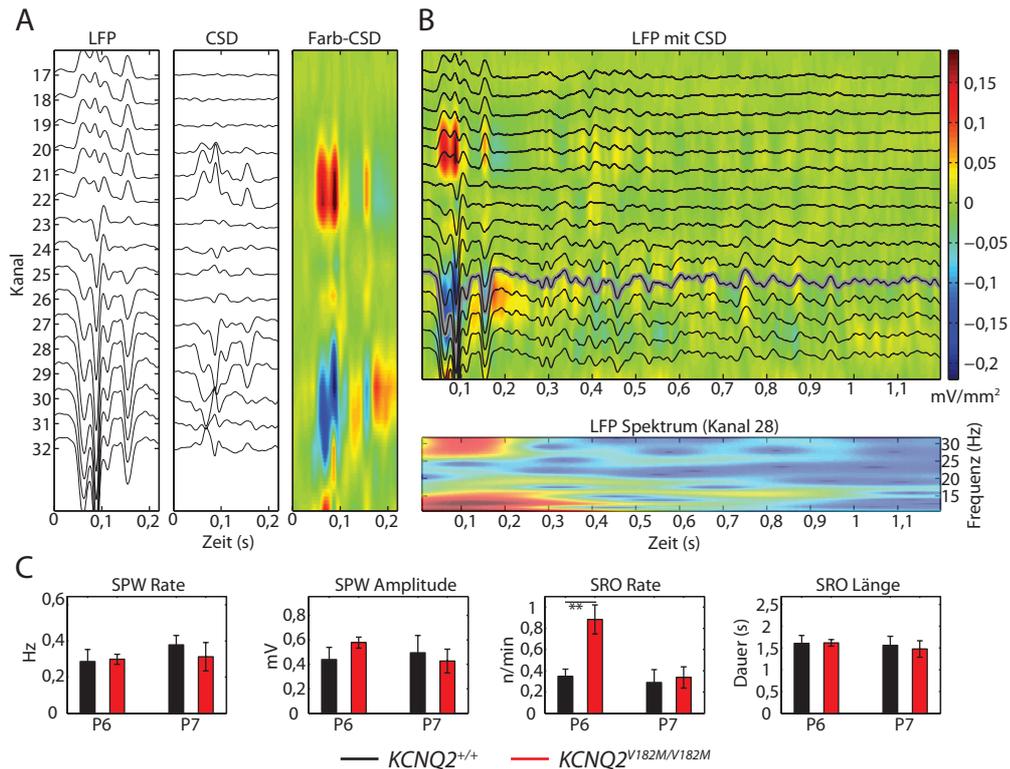


Abbildung 4.14: Für die Mutation $KCNQ2^{V182M}$ homozygote Mäuse zeigen eine erhöhte hippocampale Netzwerkaktivität. Abgebildet sind Beispiele einer *Sharp Wave* (SPW) (A) und einer *Stratum Radiatum Oscillation* (SRO) (B), jeweils in unterschiedlichen Darstellungen des lokalen Feldpotentials sowie der *Current Source Density* (CSD) eines Wildtyp-Tieres. (C) zeigt die Quantifizierung von Rate und Amplitude, bzw. Rate und Länge der detektierten Ereignisse ($KCNQ2^{+/+}$: P6 n=4, P7 n=4; $KCNQ2^{V182M/V182M}$: P6 n=5, P7 n=4).

aufwiesen (Abb. 4.14 A). Zum Anderen kurze Oszillationssequenzen von 15-30 Hz (Abb. 4.14 B) im Bereich des Stratum Radiatum. Dieser Frequenzbereich entspricht dem von Beta-Oszillationen. Ähnliche Oszillationen wurden schon als Stratum Radiatum Oszillationen (SRO) bezeichnet [87]. Beschrieben wurden vergleichbare Aktivitätsmuster vorwiegend in Ratten [79], aber auch schon in Gehirnen von Mäusen [78]. Die Analyse der Stromquellendichte (*Current-Source-Density* (CSD)) offenbarte sowohl für *Sharp Waves*, als auch für SRO's eine Stromsenke im Bereich des Stratum Radiatum. Beide Aktivitätsmuster waren genotypunabhängig sowohl in (CD1-) $KCNQ2^{V182M/V182M}$, als auch in Wildtypmäusen zu finden (Abb. 4.14 C). Die Rate und die Amplitude mit der *Sharp Waves* auftraten unterschied sich dabei nicht in Mäusen unterschiedlicher Genotypen und auch nicht in Mäusen unterschiedlichen Alters. SRO's hingegen traten in sechs Tage alten (CD1-) $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen signifikant häufiger auf, als in sechs Tage alten Wildtyptieren (Abb. 4.14 C Mitte rechts). Einen Tag später, im Alter von P7 war dieser Unterschied nicht mehr zu detektieren. Die Länge der SRO's war in allen Tieren beider Genotypen vergleichbar und altersunabhängig.

Im visuellen Cortex konnten Aktivitätsmuster detektiert werden, die ebenfalls in neonatalen Ratten und auch schon in Gehirnen neonataler Mäuse gezeigt werden konnten [68, 78]. Dabei handelte es sich um sogenannte *Spindle Burst*-Oszillationen, die in den oberen Kanälen der

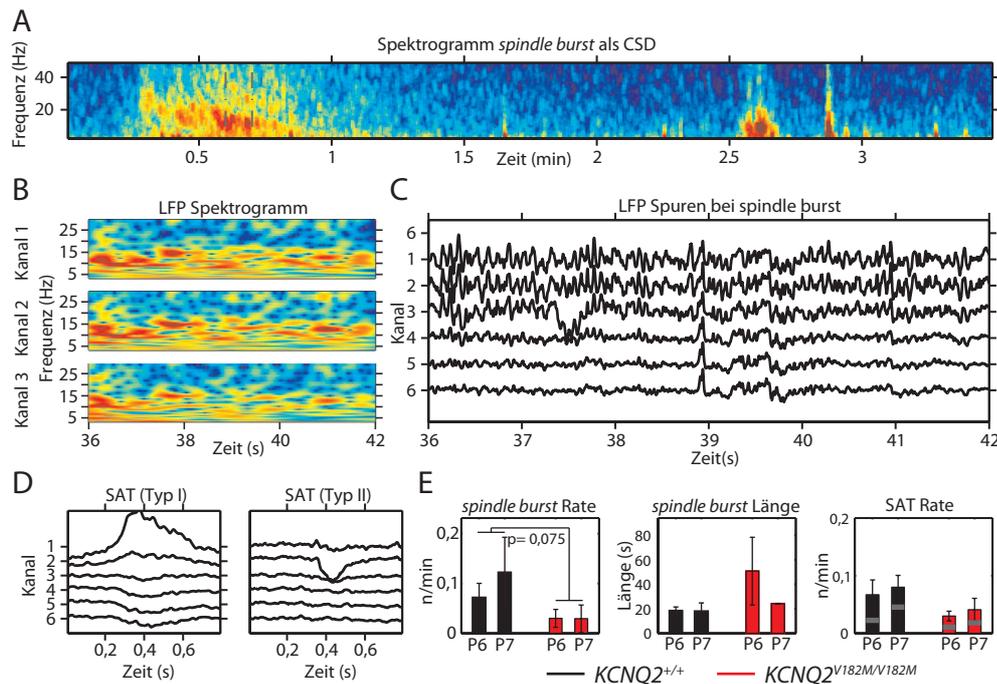


Abbildung 4.15: Für die Mutation $KCNQ2^{V182M}$ homozygote Mäuse zeigen keine signifikant veränderte cortikale Netzwerkaktivität. Abgebildet sind beispielhaft eine *Spindle Burst*-Oszillation als *Current Source Density* (CSD) (A), sowie als lokales Feldpotential im Frequenzspektrum dreier Kanäle (B) und in einfachen Spuren mehrerer Kanäle (C). (D) zeigt Beispiele von *Slow Activity Transients*-Ereignissen (SAT's), (E) die Quantifizierung aufgetretener *Spindle Burst*-Oszillation und SAT's ($KCNQ2^{+/+}$: P6 n=4, P7 n=4; $KCNQ2^{V182M/V182M}$: P6 n=5, P7 n=4). Alle Beispiele stammen aus Wildtyptieren.

Cortexelektrode aufgezeichnet wurden, also im Oberflächenbereich des Cortex zu verorten waren (Abb. 4.15 A-C). Auch diese Oszillationen wiesen Frequenzen im Beta-Bereich (10-30 HZ) auf. Die Länge der beobachteten Ereignisse lag dabei im Bereich mehrerer Sekunden (Abb. 4.15 E). Eine weitere Art elektrischer Aktivität, die auch im visuellen Cortex V1 von Ratten gezeigt werden konnte, sind die sogenannten *Slow Activity Transients* (SAT's) [125, 139]. Auch diese Aktivitätsmuster konnten in den untersuchten Gehirnen detektiert werden (Abb. 4.15 D), und auch in einem anderen Mausmodell konnten diese bereits beschrieben werden [78]. Für sämtliche im Cortex detektierten Ereignisse ließen sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen feststellen. Lediglich die Rate mit der *Spindle Bursts* auftreten, schien im Trend in (CD1-) $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren geringer zu sein.

4.10 Retigabin führte zu einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit von heteromeren $K_V7.2/7.3$ -Kanälen

Es konnte gezeigt werden, dass heteromere Ionenkanäle aus $K_V7.2$ - und $K_V7.3$ -Untereinheiten erst bei höheren Membranpotentialen geöffnet werden, wenn sie Untereinheiten welche die Mutation $KCNQ2^{V182M}$ tragen enthalten. Ein gegenläufiger Effekt, also eine Verschiebung der Ak-

tivierung zu hyperpolaren Membranpotentialen, kann durch Applikation des selektiven Kanalaktivators Retigabin erreicht werden [117].

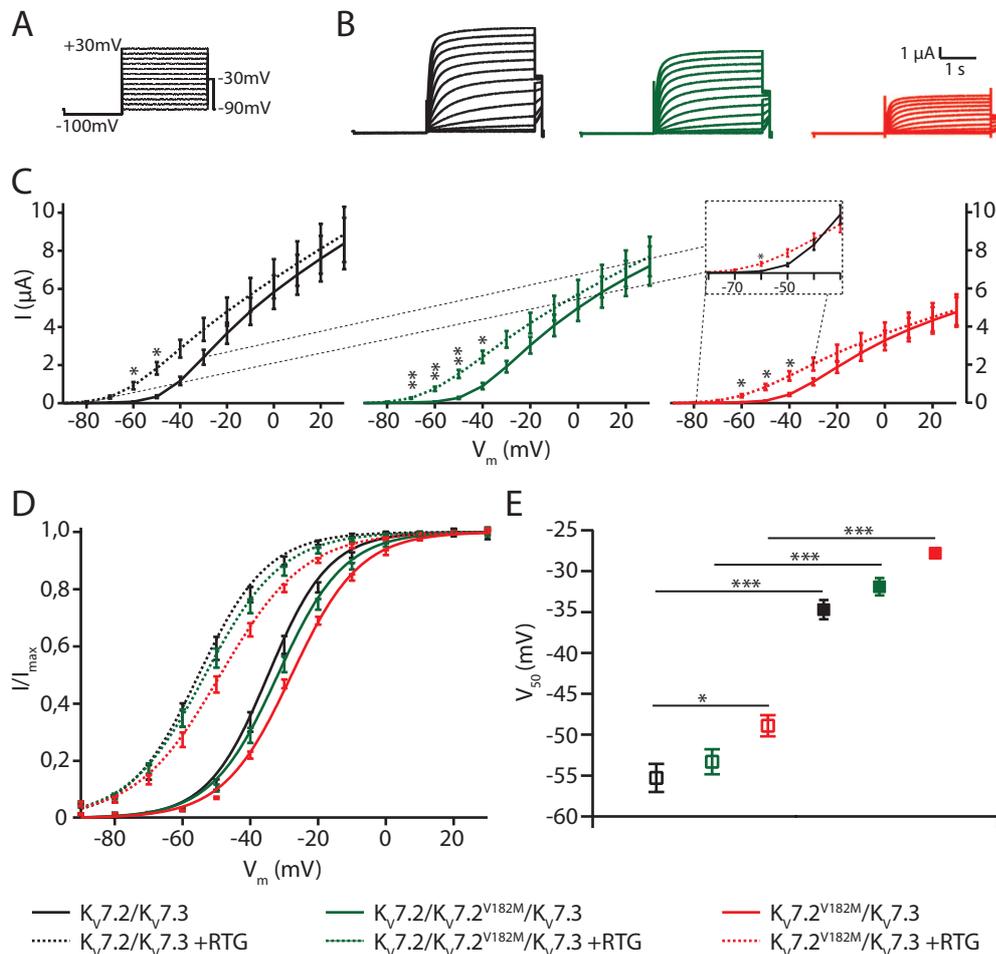


Abbildung 4.16: Die Aktivierung von K_v7.2/7.3-vermittelten Strömen in *Xenopus laevis*-Oocyten wurde durch die Zugabe von Retigabin verschoben. Unter Anwesenheit von 10 μ M Retigabin wurden mit Hilfe eines M-Kanal-aktivierenden Spannungsprotokolls (A) K_v7.2/7.3-vermittelte Ströme verschiedener Untereinheitenverhältnisse induziert (B). Dargestellt sind die absoluten Stromamplituden unter Retigabin-, sowie unter Normalbedingungen (C) (n= 10 pro Gruppe). Außerdem die normierten Strom-Spannungskurven mit dem gemittelten Fit der nicht normierten Einzelfits, ebenfalls unter Retigabin- und Normalbedingungen (D) (n=10 pro Gruppe). (E) zeigt die mittleren V₅₀-Werte der Einzelplots (K_v7.2/7.3: $-55,3 \pm 1,7$ mV, K_v7.2/7.2^{V182M}/7.3: $-53,3 \pm 1,5$ mV, K_v7.2^{V182M}/7.3: $-48,9 \pm 1,3$ mV).

Führt man also die bereits beschriebenen Messungen in Oocyten durch, denen zuvor cRNA von *KCNQ2* und *KCNQ3* injiziert wurde, kann man durch Zugabe von 10 μ M Retigabin in die Badlösung eine Öffnung der Kanäle bewirken. So wurden unter Bedingungen mit Retigabin, bei Anlegen der gleichen Spannungsprotokolle, in allen drei Kanalzusammensetzungen höhere Ströme gemessen (Abb. 4.16 B vgl. Abb 4.3 B).

Der Vergleich der unter Retigabin gemessenen Stromamplituden mit den ohne Retigabin aufgenommenen zeigte, dass die Kanäle genotypunabhängig früher öffneten, und so bei negativeren Membranpotentialen bereits höhere Stromamplituden aufwiesen (Abb. 4.16 C). So zeigte

der Wildtypkanal bei -60 und -50 mV eine signifikante Erhöhung der Stromamplitude durch Retigabin (Abb. 4.16 C links). Für den mutierten Kanal traf dies auch noch bei -40 mV zu (Abb. 4.16 C rechts). Am stärksten war der Effekt in Kanälen, die sowohl die mutierte, als auch die Wildtypform von $K_V7.2$ enthielten (Abb. 4.16 C mittig). Hier war der Anstieg der Stromamplitude bereits ab -70 mV sehr signifikant. Die absoluten Werte bei -60 mV waren mit $9,2 \pm 1,9 \mu\text{A}$ für Wildtyp-, $7,3 \pm 1,2 \mu\text{A}$ für heterozygot und $3,8 \pm 0,8 \mu\text{A}$ für homozygot mutierte Kanäle rund zehnmal so hoch wie die ohne Retigabin gemessenen ($K_V7.2/7.3$: $1212 \pm 275 \%$, $K_V7.2/7.2^{V182M}/7.3$: $1114 \pm 194 \%$, $K_V7.2^{V182M}/7.3$: $923 \pm 216 \%$). Verglich man außerdem die Stromamplituden des mutierten Kanals unter Retigabinbedingungen mit denen des Wildtypkanals unter Normalbedingungen, wurde deutlich, dass bei -60 mV die Stromamplitude des Wildtypkanals signifikant um $502 \pm 129 \%$ übertroffen wird (Abb. 4.16 C Fenster). In allen drei Graphen in Abb. 4.16 C ist jedoch auch zu erkennen, dass sich die Maximalamplituden unter Retigabinbedingungen denen ohne Retigabin annäherten. Eine Vergrößerung des Maximalstroms konnte durch Retigabin demnach nicht erreicht werden.

Da die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle bei Anwesenheit von Retigabin bereits bei niedrigeren Membranpotentialen relativ hoch war, verschob sich folglich auch die Aktivierungskurve des Kanals in Richtung negativerer Membranpotentialen (Abb. 4.16 D). So war der V_{50} in allen drei Kanalvarianten rund 20 mV kleiner, wenn man Retigabin hinzugab (Abb. 4.16 E) (Verschiebung im Vergleich zu Messungen ohne Retigabin: $K_V7.2/7.3$: $-20,6 \pm 2,9$ mV, $K_V7.2/7.2^{V182M}/7.3$: $-21,40 \pm 2,59$ mV, $K_V7.2^{V182M}/7.3$: $-21,1 \pm 1,9$ mV). Mit $-48,9$ mV war der V_{50} -Wert des homozygot mutierten Kanals aber immer noch signifikant kleiner, als der des Wildtypkanals mit $-55,3$ mV. Die Differenz von $6,4 \pm 3,0$ mV war mit der unter Normalbedingungen vergleichbar.

4.11 In CA1-Neuronen von *KCNQ2^{Nmf134}*-Mäusen bewirkte Retigabin eine erhöhte M-Strom-Amplitude und eine reduzierte Erregbarkeit

In elektrophysiologischen Untersuchungen in *Xenopus laevis*-Oocyten konnte ein Effekt von Retigabin auf den mutierten Kanal gezeigt werden. Diese Ergebnisse legten nahe, dass auch in CA1-Neuronen die reduzierten M-Strom-Amplituden wiederhergestellt werden könnten. Um dies herauszufinden, wurde auch in den bereits beschriebenen *Patchclamp*-Versuchen in CA1-Neuronen $10 \mu\text{M}$ Retigabin in die Badlösung appliziert. Danach wurde ein leicht modifiziertes Spannungsprotokoll verwendet (Abb. 4.17 A).

Die Zellen wurden auf ein Membranpotential von -90 mV geklemmt, um zu gewährleisten, dass zu Beginn alle M-Kanäle auch unter Retigabinbedingungen geschlossen waren. Die Anzahl der Pulse blieb gleich, weshalb auch der Maximalpuls 10 mV niedriger war, als in den vorherigen Messungen.

Verglichen mit den vorherigen Stromamplituden waren auch in Hirnschnitten die Amplituden unter Retigabinbedingungen erhöht (Abb. 4.17 B). So zeigten heterozygot und homozygot mutierte Zellen ab einem Aktivierungspuls von -60 mV eine signifikant erhöhte Stromamplitude,

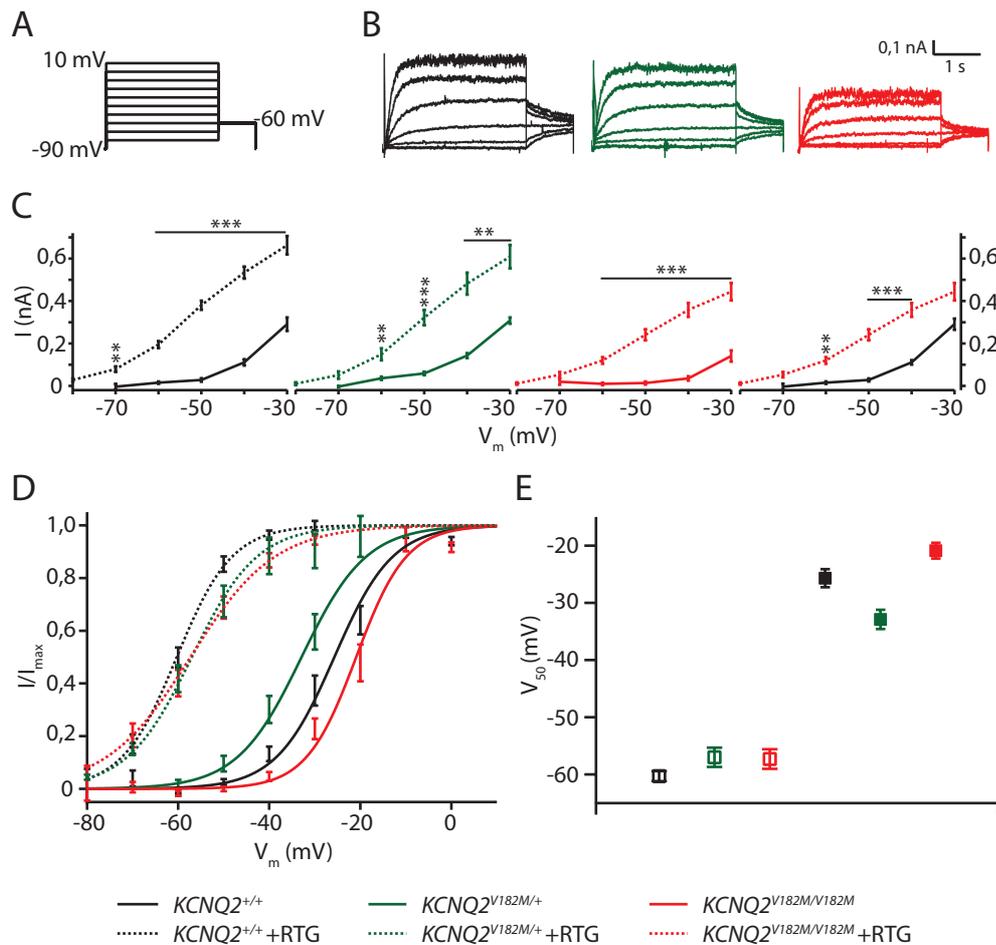


Abbildung 4.17: Die M-Strom-Aktivierung in CA1-Neuronen von Mäusen der Linie *KCNQ2^{Nmf134}* wurde durch die Zugabe von Retigabine verschoben. Unter Anwesenheit von Retigabine wurden mit Hilfe eines M-Kanal-aktivierenden Spannungsprotokolls (A) in CA1-Neuronen von Mäusen der drei Genotypen Ströme induziert (B). Dargestellt sind die absoluten Amplituden XE991-subtrahierter Ströme unter Retigabine- und Normalbedingungen (C) (*KCNQ2^{+/+}*: 8 Zellen aus 5 Tieren, *KCNQ2^{V182M/+}*: 8/3, *KCNQ2^{V182M/V182M}*: 8/4). Abgebildet sind weiterhin die normierten Strom-Spannungskurven mit dem gemittelten Fit der nicht normierten Einzelfits (D) ($n = 8/5, 7/3, 8/4$), ebenfalls unter Retigabine- und Normalbedingungen. (E) zeigt die mittleren V_{50} -Werte der Einzelplots (*KCNQ2^{+/+}*: $-60,3 \pm 0,9$ mV, *KCNQ2^{V182M/+}*: $-57,0 \pm 1,7$ mV, *KCNQ2^{V182M/V182M}*: $-57,3 \pm 1,7$ mV).

Wildtypzellen sogar schon ab -70 mV (Abb. 4.17 C). Die absoluten Amplituden (*KCNQ2^{+/+}*: $0,20 \pm 0,05$ nA, *KCNQ2^{V182M/+}*: $0,15 \pm 0,08$ nA, *KCNQ2^{V182M/V182M}*: $0,12 \pm 0,05$ nA) unterschieden sich auch hier um ein Vielfaches von den unter Normalbedingungen gemessenen (*KCNQ2^{+/+}*: 1266 ± 344 %, *KCNQ2^{V182M/+}*: 414 ± 241 %, *KCNQ2^{V182M/V182M}*: 1239 ± 544 %). Aber auch eine Annäherung der Amplituden bei weniger negativen Membranpotentialen war zu erkennen.

Außerdem war im Bereich zwischen -60 und -40 mV die M-Strom-Amplitude in mutierten Zellen unter Retigabinebedingungen signifikant höher, als in Wildtypzellen unter Normalbedingungen (Abb. 4.17 C rechts). Während die Amplitude in Zellen aus *KCNQ2^{V182M/V182M}*-Mäusen unter Retigabinebedingungen bei -60 mV 781 ± 329 % des normalen M-Stromes ausmachte, war

aufgrund der Annäherung beider Kurven bei -30 mV kein statistisch relevanter Unterschied mehr feststellbar.

Verglich man nun auch hier die normierten Strom-Spannungskurven, wurde deutlich, dass diese unter Retigabin sowohl in Zellen aus $KCNQ2^{+/+}$ -, als auch $KCNQ2^{V182M/+}$ - und $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen, stark in den negativen Bereich verschoben waren (Abb. 4.17 D). Der Unterschied betrug $-34,6 \pm 2,5$ mV für Wildtyp-, $-24,1 \pm 3,4$ mV für heterozygote und $-36,4 \pm 3,1$ mV für homozygot mutierte Zellen, und war bei allen drei Genotypen hoch signifikant (Abb. 4.17 E). Hatten die Messungen in CA1-Neuronen heterozygoter Tiere ohne Retigabin noch unerwartet negativ verschobene Strom-Spannungskurven ergeben, lagen die unter Retigabinbedingungen aufgenommenen wieder wie erwartet im Bereich zwischen denen der homozygoten Neuronen. Der V_{50} -Wert lag sogar gleichauf mit dem der homozygot mutierten Zellen.

Da die Applikation von Retigabin zuverlässig und genotypunabhängig zu einer Amplifikation des M-Stromes in CA1-Neuronen führte, war anzunehmen, dass auch die Erregbarkeit dieser Zellen durch Retigabin beeinflusst werden würde.

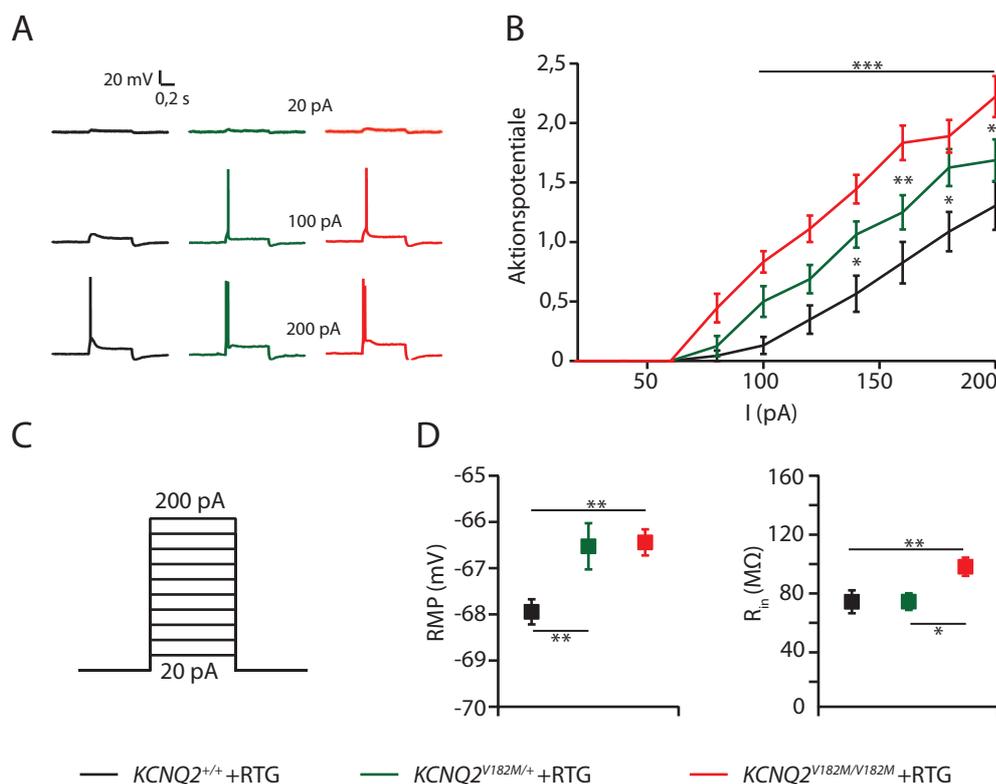


Abbildung 4.18: Retigabin reduzierte die Erregbarkeit von CA1-Neuronen in Hirnschnitten von $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäusen. In gepatchte CA1-Neuronen wurden unter Anwesenheit von Retigabin in der Badlösung Ströme unterschiedlicher Stärke injiziert (C). Gezeigt sind Beispielspuren der drei Genotypen (A) bei unterschiedlichen Stromstärken, sowie die durchschnittliche Anzahl von ausgelösten Aktionspotentialen in Abhängigkeit der angelegten Stromstärke (B) ($KCNQ2^{+/+}$: 23 Zellen aus 6 Tieren, $KCNQ2^{V182M/+}$: 16/5, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: 23/6). Weiterhin sind das durchschnittliche Ruhemembranpotential und der Eingangswiderstand der untersuchten Zellen angegeben (D) ($KCNQ2^{+/+}$: $-68,0 \pm 0,3$ mV, $74,4 \pm 7,8$ M Ω ; $KCNQ2^{V182M/+}$: $-66,5 \pm 0,5$ mV, $74,4 \pm 5,7$ M Ω ; $KCNQ2^{V182M/V182M}$: $-66,4 \pm 0,3$ mV, $98,2 \pm 6,2$ M Ω).

Es wurden unter Stromklemme-Bedingungen Messungen ohne Zugabe von TTX unter Zugabe von 10 μ M Retigabin durchgeführt. Es musste weit mehr Strom injiziert werden um Aktionspotentiale auslösen zu können, also ohne Retigabin. In dem verwendeten Protokoll wurden folglich doppelt so hohe Ströme appliziert wie in den Messungen ohne Retigabin (Abb. 4.18 C). Die Anzahl der ausgelösten Aktionspotentiale war bei allen drei Genotypen durch Retigabin stark reduziert (Abb. 4.18 A). Verglich man die Zellen der drei Genotypen jedoch untereinander, waren auch unter Retigabinbedingungen die genotypabhängigen Unterschiede in der Erregbarkeit deutlich zu erkennen (Abb. 4.18 B). So unterschied sich die Anzahl der durch Strompulse zwischen 100 und 200 pA ausgelösten Aktionspotentiale in *KCNQ2*^{+/+}- und *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäusen hoch signifikant voneinander. Durch einen Strompuls von 200 pA wurden so in Wildtyp- $1,30 \pm 0,20$, in heterozygoten $1,69 \pm 0,18$ und in homozygot mutierten Zellen durchschnittlich $2,22 \pm 0,17$ Aktionspotentiale ausgelöst.

Das Ruhemembranpotential der untersuchten Zellen war ebenfalls bei Zellen aller Genotypen stark abgesenkt (Abb. 4.18 D links vgl. Abb. 4.5 D links). Bei Neuronen aus *KCNQ2*^{+/+}-Mäusen war die retigabinabhängige Verschiebung mit rund $-6,3 \pm 0,6$ mV jedoch am stärksten (*KCNQ2*^{V182M/+}: $3,8 \pm 1,0$ mV, *KCNQ2*^{V182M/V182M}: $4,8 \pm 0,7$ mV). Unter Retigabinbedingungen unterschied sich das Ruhemembranpotential der Wildtypzellen sehr signifikant von dem heterozygoter und homozygot mutierter Zellen.

Der Eingangswiderstand wurde ebenfalls in Neuronen aller drei Genotypen durch die Zugabe von Retigabin stark abgesenkt (Abb. 4.18 D rechts vgl. Abb. 4.5 D rechts). Der von Zellen aus *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäusen war jedoch auch nach Applikation von Retigabin mit nun 74,4 M Ω am niedrigsten, und unterschied sich signifikant von dem heterozygoter und Wildtypneuronen. Mit einer Verschiebung um $210,3 \pm 30,7$ M Ω war diese für *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Neuronen damit am größten (*KCNQ2*^{+/+}: $186,5 \pm 21,6$ M Ω , *KCNQ2*^{V182M/+}: $163,3 \pm 15,1$ M Ω).

4.12 Die neonatale Behandlung mit Retigabin beeinflusste die Überlebensrate und den Entwicklungsphänotyp homozygoter *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäuse positiv, Bumetanid hatte Einfluss auf das Überleben

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Kaliumkanal $K_V7.2$ durch die Mutation *KCNQ2*^{V182M} eine spannungsverzögerte Aktivierung aufwies. Es konnte in *in vitro*-Experimenten gezeigt werden, dass sich die Leitfähigkeit des mutierten Kanals bei niedrigeren Membranpotentialen durch Applikation des selektiven M-Kanal-Öffners Retigabin wieder verbessern lässt. Dadurch wurde im Hirnschnitt die Übererregbarkeit mutierter CA1-Neuronen wieder reduziert. Um die Möglichkeit einer pharmakologischen Behandlung des beobachteten epileptischen Phänotyps zu untersuchen, wurden Behandlungsstudien durchgeführt, bei denen neugeborene Tiere der Linie *KCNQ2*^{Nmf134} postnatal von P1 bis P14 mit Retigabin behandelt wurden. Die eingesetzte Tagesdosis orientierte sich dabei an der für Patienten empfohlenen Höchstdosis von 1200mg/Tag [30]. Eingesetzt wurden 2x täglich 10 mg/kg Körpergewicht.

Als weitere, potentiell antiepileptisch wirkende Substanz wurde einer weiteren Gruppe von Tieren über den gleichen Zeitraum 2x täglich 0,1 mg/kg Körpergewicht Bumetanid injiziert. Verglichen wurden beide Gruppen mit einer vehikelbehandelten Kontrollgruppe.

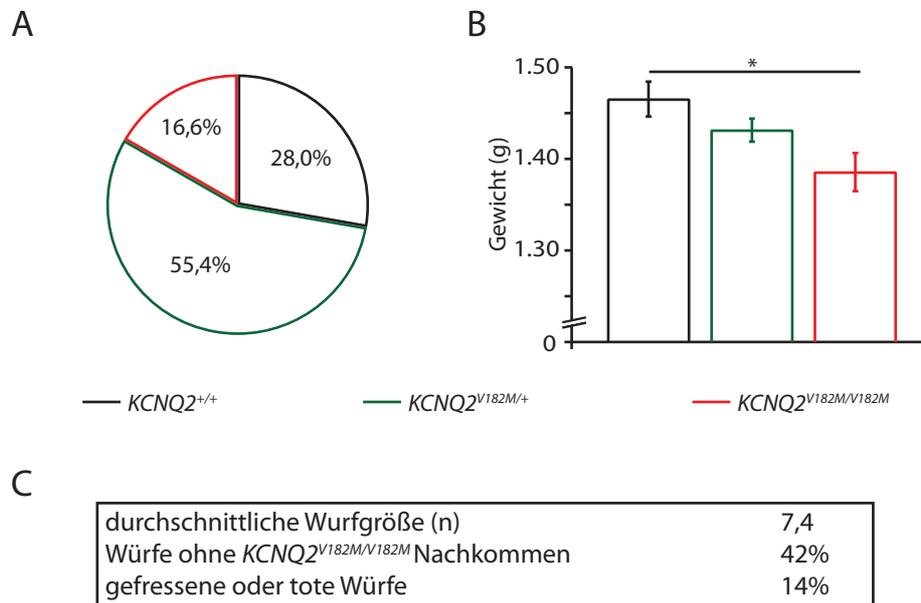


Abbildung 4.19: Nachkommen von heterozygoten Verpaarungen in der Linie $KCNQ2^{Nmf134}$ wiesen bereits einen Tag nach der Geburt einen genotypabhängigen Gewichtsunterschied auf. Dargestellt sind die Genotypverteilung der für die postnatale Behandlung eingesetzten Mäuse (A) ($n = 422$), sowie deren durchschnittliches Gewicht an P1 (B) ($KCNQ2^{+/+}$: $1,47 \pm 0,02$ g, $KCNQ2^{V182M/+}$: $1,43 \pm 0,01$ g, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: $1,39 \pm 0,02$ g). Weiterhin sind die durchschnittliche Wurfgröße ($n = 57$) und der Anteil an Würfeln angegeben, die gefressen wurden oder keine homozygot mutierten Tiere enthielten (C).

Auch die in dieser Studie untersuchten Tiere stammten aus Würfen heterozygot verpaarter $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäuse. Die Genotypverteilung innerhalb der Würfe entsprach in etwa der bereits beschriebenen (Abb. 4.19 A). Bei einer durchschnittlichen Wurfgröße von 7,4 Tieren trugen im Durchschnitt 16,6% die Mutation in beiden Allelen. Auch der Anteil an heterozygoten und Wildtyptieren variierte mit 55,4 bzw. 28,0% nur leicht. Allerdings konnte auch festgestellt werden, dass ein Teil der fehlenden Differenz von den beobachteten 16,6% zu den nach Mendel erwarteten 25% $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere darauf zurückzuführen war, dass in 42% der Würfe überhaupt keine $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere zu finden waren (Abb. 4.19 C). Außerdem waren an P1 bereits 14% aller Würfe tot.

Schon am ersten Tag nach der Geburt bestand ein genotypabhängiger Gewichtsunterschied (Abb. 4.19 B). Einen Tag alte $KCNQ2^{+/+}$ -Tiere wogen durchschnittlich 1,47 g, während $KCNQ2^{V182M/V182M}$ Tiere mit 1,39 g nur $95 \pm 3\%$ des Normalgewichts wogen. Heterozygote Mäuse lagen mit 1,43 g und $97 \pm 2\%$ dazwischen und unterschieden sich nicht statistisch relevant von einer der beiden anderen Gruppen.

Der Behandlungserfolg sollte im Folgenden an der Sterblichkeit, aber auch an der Gewichtsentwicklung der untersuchten Tiere festgestellt werden.

Die Sterblichkeit der $KCNQ2^{V182M/V182M-}$, verglichen mit $KCNQ2^{V182M/+}$ - und $KCNQ2^{+/+}$ -Tieren in der vehikelinjizierten Gruppe war deutlich erhöht (Abb. 4.20 A). Nach zwei Wochen waren so etwa 27 %, nach acht Wochen 60 % der homozygot mutierten Mäuse gestorben. Auch einige heterozygote und Wildtypiere starben in den ersten Tagen, die Überlebensrate stabilisierte sich jedoch in beiden Gruppen bei 0,92 bzw. 0,95. Statistisch unterschieden sich die Überlebensraten von $KCNQ2^{V182M/+}$ und $KCNQ2^{+/+}$ -Tieren nicht, während der Unterschied zwischen $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen und den beiden anderen Gruppen auf den Gesamtzeitraum von acht Wochen bezogen, hoch signifikant war. Auch nach den ersten zwei Wochen waren diese Unterschiede bereits statistisch feststellbar.

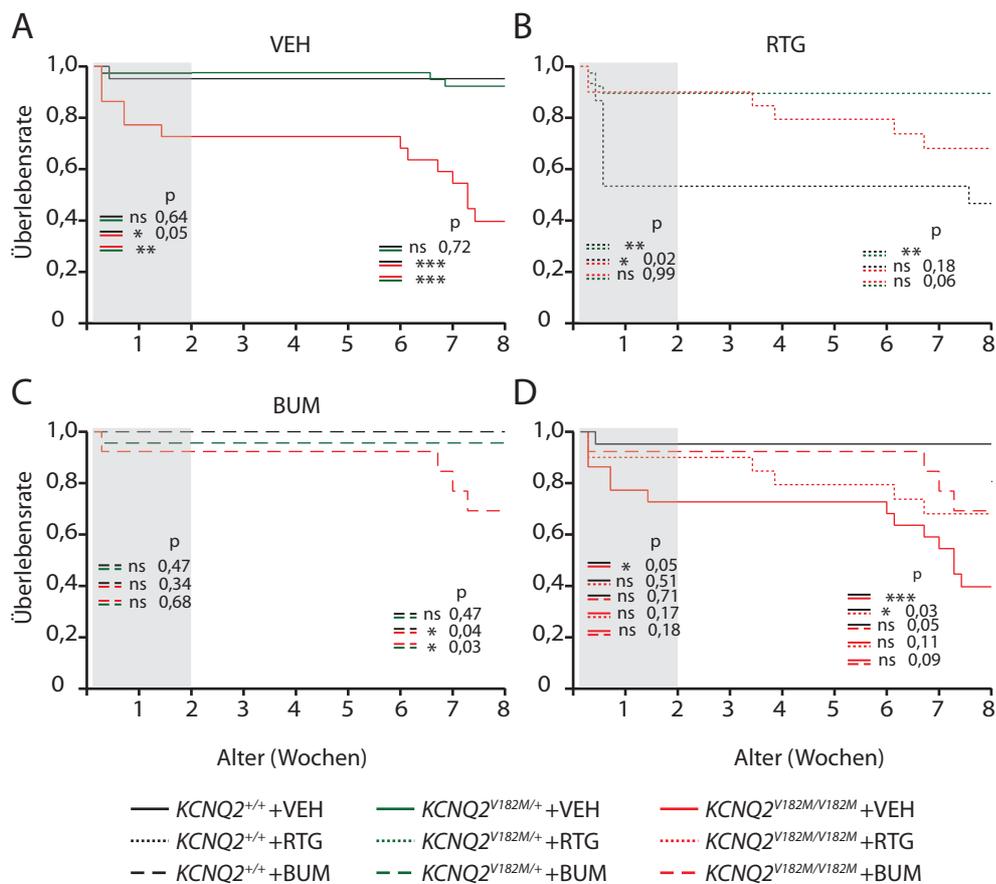


Abbildung 4.20: Die postnatale Behandlung mit Retigabin oder Bumetanid beeinflusste die Sterblichkeit von Jungtieren der Linie $KCNQ2^{Nmf134}$. Dargestellt sind die Überlebensraten nach Kaplan-Meier der vehikel- (A) ($KCNQ2^{+/+}$: n= 21, $KCNQ2^{V182M/+}$: n= 41, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: n= 22), retigabin- (B) (n= 15/39/20), und bumetanidbehandelten (C) (n= 12/23/13) Gruppen. (D) zeigt die direkte Gegenüberstellung vehikelbehandelter Wildtypiere und der unterschiedlich behandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse. Die statistischen Analysen wurden jeweils für die ersten 14 d (Behandlungszeitraum) und für den Gesamtzeitraum von 56 d durchgeführt.

Bei Betrachtung der Überlebensraten der mit Retigabin behandelten Gruppen fiel eine deutlich erhöhte Letalität von $KCNQ2^{+/+}$ -Tieren auf (Abb. 4.20 B). Bereits nach den ersten fünf Tagen waren 47 % von ihnen verstorben. Die $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse hingegen überlebten wie die heterozygoten Tiere in den ersten drei Wochen zu 90 %. Erst dann starben langsam

einzelne Tiere bis nach acht Wochen ein Niveau von rund 68 % erreicht war. Statistisch unterschieden sich die Überlebensrate von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen jedoch nicht von der von $KCNQ2^{V182M/+}$ -Tieren. Lediglich die Wildtyptiere unterschieden sich aufgrund der stark reduzierten Überlebensrate nun signifikant von den beiden anderen Gruppen.

Bumetanid hatte ebenfalls einen positiven Effekt auf die Überlebensrate von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren. So unterschieden sich alle drei mit Bumetanid behandelten Gruppen nach den ersten zwei Wochen nicht signifikant voneinander und wiesen mit 1,0 für die Wildtyp-, 0,96 für die heterozygoten, und 0,92 für die homozygot mutierten Tiere, vergleichbare Überlebensraten auf (Abb. 4.20 C).

Erst zum Ende der beobachteten Periode von acht Wochen starben etwa 31 % der $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse, während die Überlebensraten der anderen beiden Gruppen konstant blieben. Über den gesamten Zeitraum von acht Wochen gab es daher einen statistisch relevanten Unterschied zu $KCNQ2^{V182M/+}$ und $KCNQ2^{+/+}$ -Tieren, der jedoch wesentlich geringer war, als der zwischen den vehikelbehandelten Gruppen (Vgl. Abb. 4.20 A).

Verglich man nun die verschiedenen behandelten Gruppen $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse untereinander, ließ sich kein signifikanter Behandlungseffekt auf die Überlebensrate feststellen (Abb. 4.20 D). Allerdings ließen sich nach den ersten zwei Wochen weder die mit Retigabin, noch die mit Bumetanid behandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse von der vehikelbehandelten Wildtypgruppe unterscheiden. Auch über den Gesamtzeitraum fiel dieser Unterschied deutlich geringer aus, als innerhalb der vehikelbehandelten Gruppen (Vgl. Abb. 4.20 A).

Es konnte also nachgewiesen werden, dass sowohl Retigabin als auch Bumetanid einen positiven Effekt auf die Überlebensraten von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen hatten. Retigabin hatte zusätzlich einen negativen Effekt auf die Überlebensrate von $KCNQ2^{+/+}$ -Tieren.

Über einen Zeitraum von acht Wochen wurde das Gewicht der behandelten Tiere aufgezeichnet. In den ersten zwei Wochen täglich, danach wöchentlich. Die Daten der ersten zwei Wochen beinhalten dabei sowohl männliche, als auch weibliche Tiere, da in diesem Alter keine geschlechtsabhängigen Gewichtsunterschiede festgestellt werden konnten (Analyse nicht gezeigt). Die Daten die sich auf den Zeitraum ab Beginn der dritten Lebenswoche beziehen, wurden nach Geschlecht getrennt ausgewertet.

Bereits nach sechs Tagen war der Gewichtsunterschied zwischen $KCNQ2^{V182M/V182M}$ - und $KCNQ2^{+/+}$ -Tieren hoch signifikant (Abb. 4.21 A oben). An P14 betrug das durchschnittliche Körpergewicht der untersuchten Wildtyptiere dann bereits $7,3 \pm 0,2$ g, während die homozygot mutierten Mäuse erst $4,6 \pm 0,3$ g wogen. Das entspricht einem Anteil von 64 ± 7 % des Normalgewichtes. Die Gewichtsentwicklung heterozygoter Tiere verlief bis zu einem Wert an P14 von $7,1 \pm 0,2$ g vergleichbar mit der von Wildtyptieren (97 ± 5 %).

Durch die Behandlung mit Retigabin veränderte sich die Gewichtszunahme von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren dann etwas in Richtung von $KCNQ2^{V182M/+}$ und $KCNQ2^{+/+}$ -Tieren (Abb. 4.21 A Mitte). So war der statistische Unterschied zwischen homozygot mutierten und Wildtyptieren ab P8 sehr signifikant und erst ab P9 hoch signifikant. Retigabinbehandelte $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere wogen nach vierzehn Tagen $5,9 \pm 0,3$ g ($KCNQ2^{V182M/+}$: $6,9 \pm 0,2$ g, $KCNQ2^{+/+}$: $7,2 \pm 0,3$ g). Das entsprach im Vergleich zu vehikelbehandelten Wildtyptieren einem

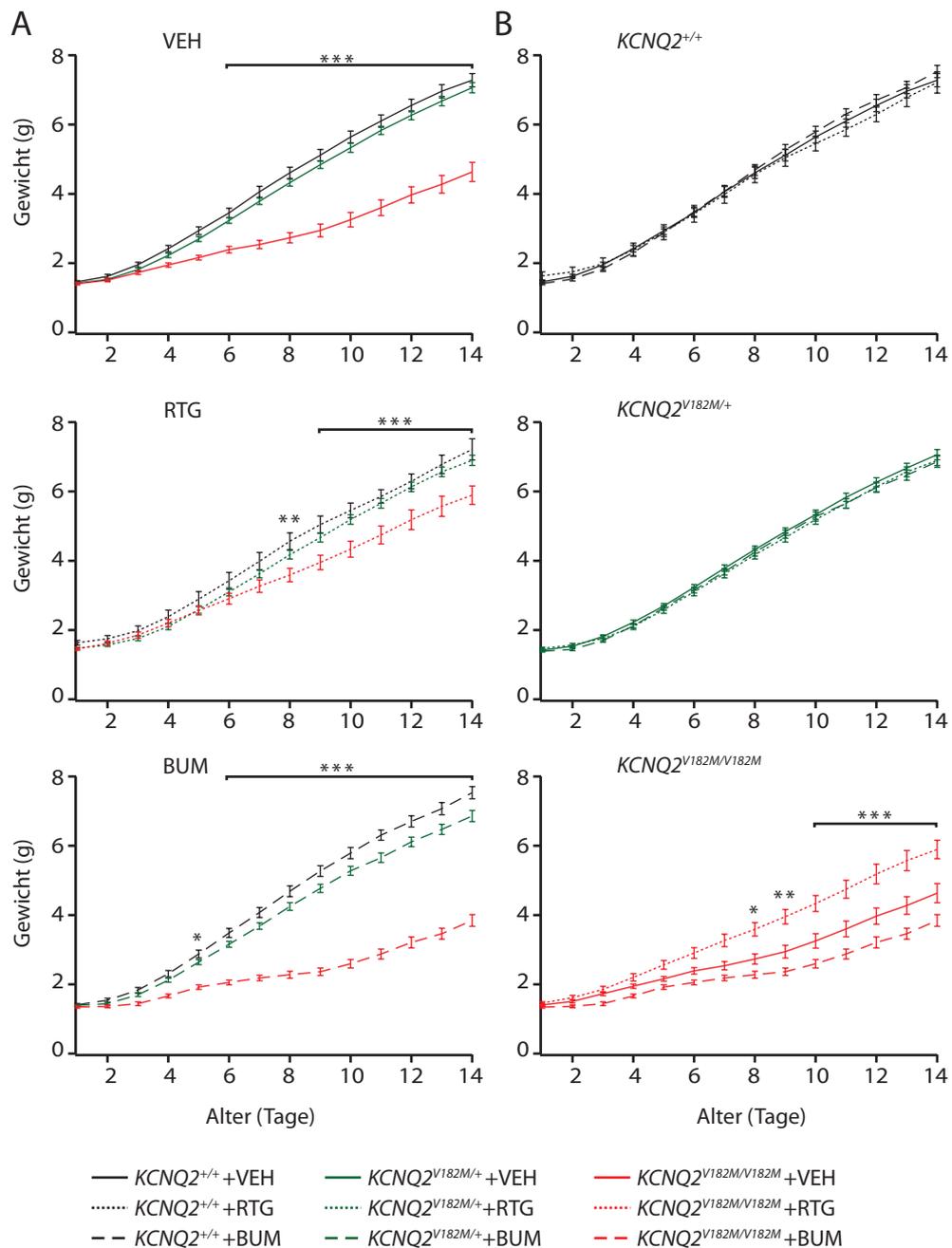


Abbildung 4.21: Die postnatale Behandlung mit Retigabin wirkte sich positiv auf die Gewichtsentwicklung in der Postnatalphase von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren aus. Dargestellt ist das durchschnittliche Körpergewicht von P1 bis P14 der unterschiedlich behandelten Gruppen nach Behandlungsart (A), bzw. Genotyp (B) getrennt (VEH ($KCNQ2^{+/+}$: n= 19, $KCNQ2^{V182M/+}$: n= 38, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: n= 16), RTG (n= 8/31/18), BUM (n= 12/22/11)). Die Asteriske beziehen sich auf den statistischen Vergleich zwischen $KCNQ2^{V182M/V182M}$ - und $KCNQ2^{+/+}$ -, bzw. vehikel- und retigabinbehandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren.

Anteil von $80 \pm 6\%$ des Normalgewichtes.

Durch die Behandlung mit Bumetanid wurde der Gewichtsunterschied dagegen sogar verstärkt (Abb. 4.21 A unten). Hier waren $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere bereits an P5 signifikant leichter als ihre Wildtypgeschwister, an P6 war der Unterschied bereits hoch signifikant. Das durchschnittliche Körpergewicht von bumetanidbehandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen betrug nach vierzehn Tagen $3,8 \pm 0,2$ g ($KCNQ2^{V182M/+}$: $6,9 \pm 0,2$ g, $KCNQ2^{+/+}$: $7,5 \pm 0,2$ g), was $51 \pm 5\%$ des Normalgewichtes entsprach.

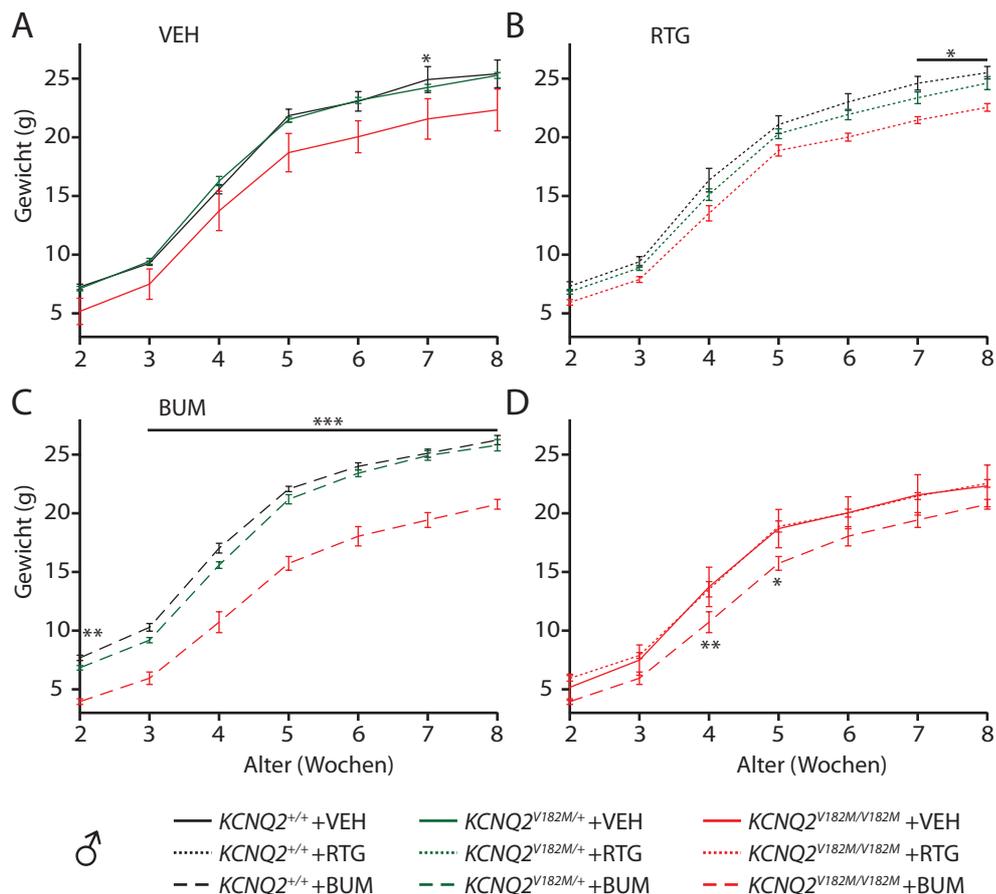


Abbildung 4.22: Die postnatale Behandlung mit Retigabin wirkte sich nicht auf die Langzeitgewichtsentwicklung von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Männchen aus. Dargestellt ist das durchschnittliche Körpergewicht von Männchen im Alter von P14 bis P56 der vehikel- (A) ($KCNQ2^{+/+}$: n= 8, $KCNQ2^{V182M/+}$: n= 14, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: n= 3), retigabin- (B) (n= 5/16/9), und bumetanidbehandelten (C) (n= 6/17/3) Gruppen. (D) zeigt die direkte Gegenüberstellung der unterschiedlich behandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere. Die Asteriske beziehen sich auf den statistischen Vergleich zwischen $KCNQ2^{V182M/V182M}$ - und $KCNQ2^{+/+}$ -, bzw. vehikel- und bumetanidbehandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren.

Verglich man die Entwicklungen von Mäusen gleichen Genotyps in Hinblick auf die unterschiedlichen Behandlungen, wurde deutlich, dass weder Retigabin noch Bumetanid die Gewichtsentwicklung von $KCNQ2^{V182M/+}$ - und $KCNQ2^{+/+}$ -Mäusen beeinflussen konnte (Abb. 4.21 B oben und Mitte). Retigabin hatte dafür bereits an P8 einen positiven Effekt auf das durchschnittliche Körpergewicht von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren, verglichen mit dem von vehikelbehandelten

$KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren (Abb. 4.21 B unten). Ab P10 war dieser Unterschied hoch signifikant. Nach 14 d waren retigabinbehandelte $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere dann $1,3 \pm 0,6$ g bzw., gemessen am Normalgewicht, etwa 17% schwerer als die Mäuse der vehikelbehandelten Kontrollgruppe.

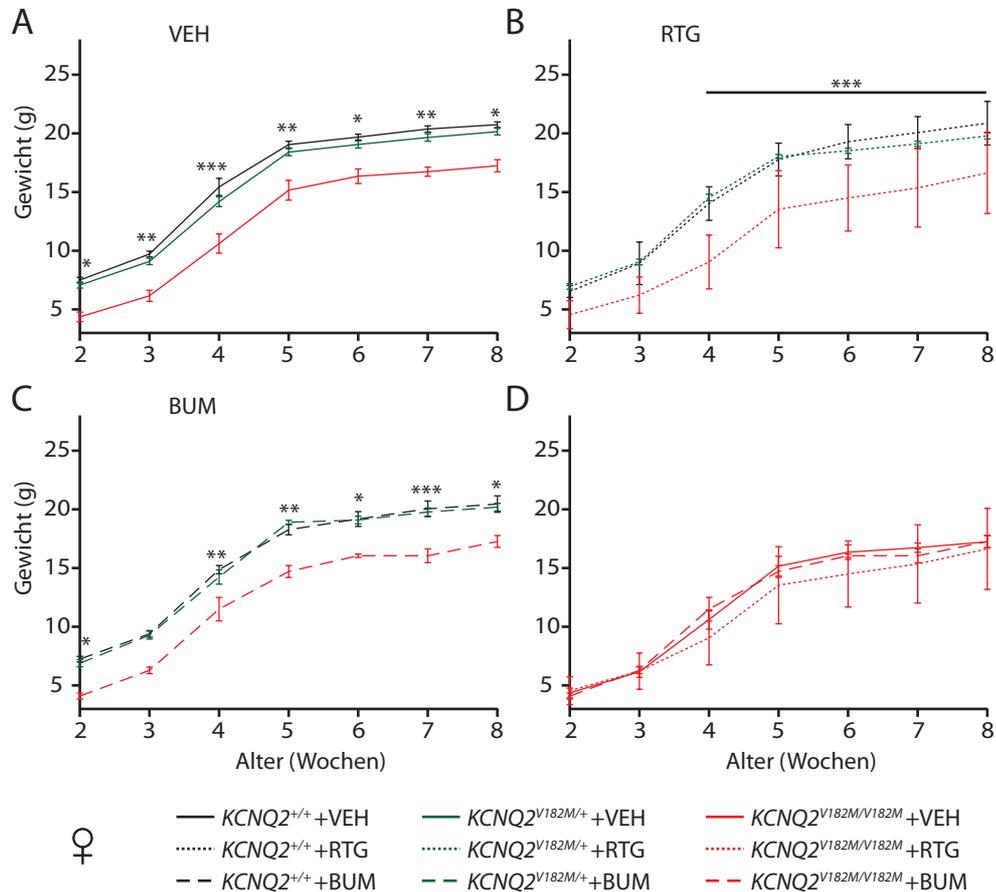


Abbildung 4.23: Die postnatale Behandlung mit Retigabin wirkte sich nicht auf die Langzeitgewichtsentwicklung von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Weibchen aus. Dargestellt ist das durchschnittliche Körpergewicht von Weibchen im Alter von P14 bis P56 der vehikel- (A) ($KCNQ2^{+/+}$: n= 4, $KCNQ2^{V182M/+}$: n= 8, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: n= 5), retigabin- (B) (n= 2/15/3), und bumetanidbehandelten (C) (n= 11/18/5) Gruppen. (D) zeigt die direkte Gegenüberstellung der unterschiedlich behandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere. Die Asteriske beziehen sich auf den statistischen Vergleich zwischen $KCNQ2^{V182M/V182M}$ - und $KCNQ2^{+/+}$ -Tieren.

Bumetanid schien dagegen sogar einen negativen Effekt zu haben. Statistisch unterschied sich das Körpergewicht von bumetanidbehandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren zwar nicht von dem vehikelbehandelter Mäuse, der Unterschied zu Geschwistern die kein mutiertes Allel trugen wurde jedoch früher manifest (Abb. 4.21 A unten).

In der Langzeitbetrachtung der Gewichtsentwicklung wurden dann die Daten von männlichen und weiblichen Jungtieren getrennt ausgewertet. Weiterhin war sowohl bei Männchen, als auch bei Weibchen ein Gewichtsdefizit von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren festzustellen (Abb. 4.22 A und 4.23 A). Bei den Weibchen fiel dieses zwar statistisch bedeutsamer aus, in seinem Verlauf ist es aber geschlechtsunabhängig.

Die Behandlung mit Retigabin zeigte keine Verbesserung dieser Entwicklung, weder bei männlichen (Abb. 4.22 B), noch bei weiblichen Tieren (Abb. 4.23 B). Lediglich der negative Effekt des Bumetanids konnte weiterhin festgestellt werden (Abb. 4.22 C und 4.23 C). Dieser war bei den Männchen signifikant, sowohl im Vergleich mit vehikelbehandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -, als auch mit bumetanidbehandelten Wildtyptieren. Bei den Weibchen war zumindest ein Trend erkennbar.

Bezüglich der Gewichtsentwicklung von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen konnte also gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Retigabin diese während des Behandlungszeitraumes positiv beeinflusste. Bumetanid hingegen hatte sogar einen leicht negativen Effekt, der sich auch über den Behandlungszeitraum hinaus noch erkennen ließ.

4.13 Die zusätzliche pränatale Behandlung von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen mit Retigabin brachte keinen klar erkennbaren Nutzen

Da bereits am Tag der Geburt die Genotypverteilung von Nachkommen aus heterozygoten Verpaarungen der Linie $KCNQ2^{Nmf134}$ verändert war und an P1 bereits genotypabhängige Gewichtsunterschiede bestanden, wurde im Folgenden ergänzend zu der bereits beschriebenen postnatalen, eine zusätzliche pränatale Behandlung mit Retigabin oder Bumetanid durchgeführt. Dabei wurde der schwangeren Mutter ab E12 der Wirkstoff oral verabreicht, bevor ab P1 die postnatale Behandlung wie zuvor durch subkutane Injektionen durchgeführt wurde. Die Bumetanidbehandlung wurde dabei mit verdoppelter Dosis (2x 0,2 µg/g Körpergewicht täglich) durchgeführt, um positive Effekte zu maximieren. Mit einer identischen Konzentration konnten bereits Tiere eines anderen Mausmodells für neonatale Epilepsien erfolgreich behandelt werden [78].

Betrachtete man zunächst die Genotypverteilung der unterschiedlich behandelten Gruppen von Jungtieren, fiel auf, dass generell ein höherer Anteil an $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren vorhanden war (Abb. 4.24 A). Die retigabinbehandelte Gruppe wies dabei den exakt gleichen Anteil von 21,2% an homozygot mutierten Tieren wie die vehikelbehandelte Gruppe auf. Allerdings war der Anteil an Wildtyptieren von 28,8% in der vehikelbehandelten Gruppe durch die Behandlung mit Retigabin auf 23,0% verringert worden.

Bumetanid wirkte sich dagegen sogar negativ auf den Anteil von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren aus. Ihr Anteil fiel durch die Behandlung auf 14,0% ab.

Der genotypabhängige Gewichtsunterschied an P1 konnte nicht mehr statistisch signifikant dargelegt werden (Abb. 4.24 B). Ein Negativtrend bei $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren war jedoch immernoch zu erkennen, und konnte durch die pränatale Behandlung mit Retigabin oder Bumetanid nicht beeinflusst werden.

Die durchschnittliche Wurfgröße wurde durch die pränatale Behandlung mit Retigabin oder Bumetanid ebenfalls nicht signifikant beeinflusst und lag zwischen 6,3 und 6,9 Jungtieren pro Wurf (Abb. 4.24 C). Der Anteil von Würfen, die keine $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere enthielten war in den retigabin- (33%) und bumetanidbehandelten (37%) Gruppen, im Vergleich zur Vehikel-

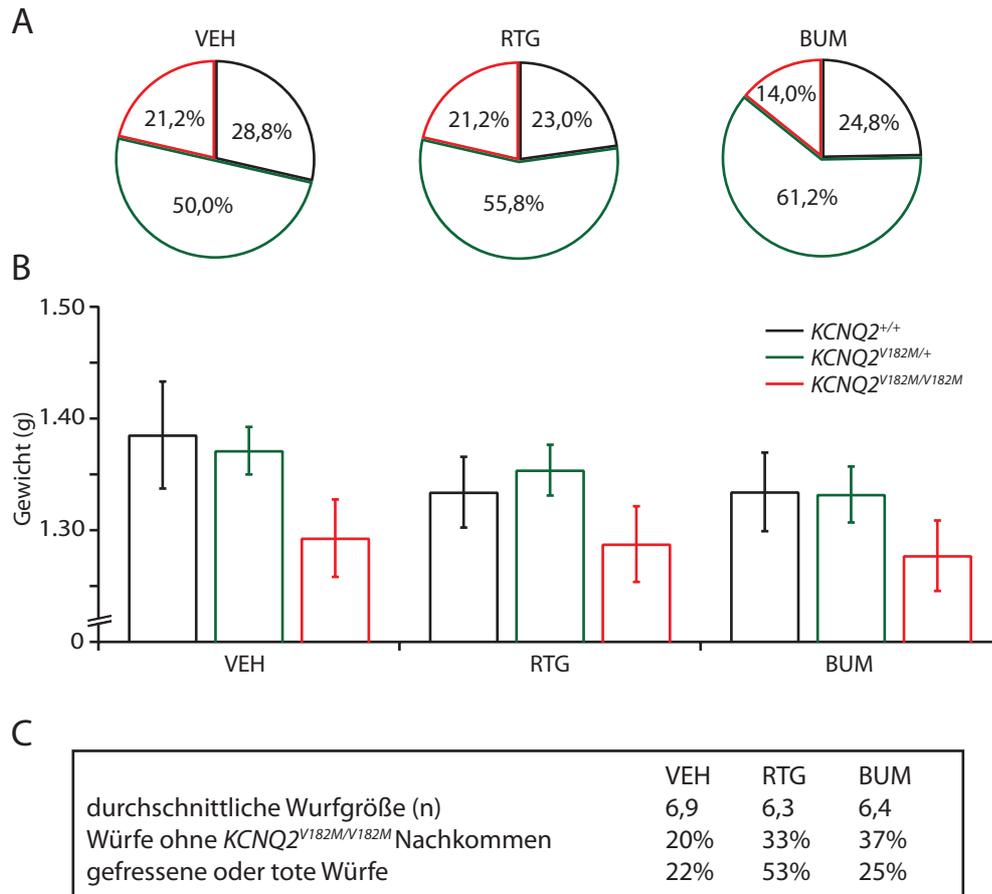


Abbildung 4.24: Die pränatale Behandlung von Nachkommen heterozygoter Verpaarungen in der Linie $KCNQ2^{Nmf134}$ hatte keinen positiven Effekt auf Genotypverteilung und Körpergewicht. Dargestellt sind die Genotypverteilung der pränatal behandelten und für die weitere postnatale Behandlung eingesetzten Mäuse (A) (VEH n=104, RTG n=113, BUM n=121), sowie deren durchschnittliches Gewicht an P1 (B), gruppiert nach Art der Behandlung (VEH ($KCNQ2^{+/+}$: 1,39 ± 0,05 g, $KCNQ2^{V182M/+}$: 1,37 ± 0,02 g, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: 1,29 ± 0,04 g), RTG (1,33 ± 0,03 g, 1,35 ± 0,02 g, 1,29 ± 0,03 g), BUM (1,33 ± 0,04 g, 1,33 ± 0,03 g, 1,28 ± 0,03 g)). Weiterhin sind die durchschnittliche Wurfgröße (n=52) und der Anteil an Würfen angegeben, die gefressen wurden oder keine homozygot mutierten Tiere enthielten (C).

gruppe (20 %) jedoch erhöht. Noch drastischer fiel der Effekt von Retigabin auf die Anzahl der Tiere aus, die an P1 bereits tot oder verschwunden waren. So waren 53 % der pränatal mit Retigabin behandelten Würfe an P1 bereits gestorben oder von der Mutter gefressen worden. Bei vehikelbehandelten Würfeln traf dies nur für 22 % zu, in der Bumetanidgruppe waren es 25 %.

Als Hauptkriterium für den Behandlungserfolg diente wieder die Überlebensrate der unterschiedlich behandelten Gruppen. So konnte in der vehikelbehandelten Kontrollgruppe erneut die erhöhte Letalität von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse gezeigt werden (Abb. 4.25 A). In dieser Studie sank die Überlebensrate homozygot mutierter Tiere sogar bis auf knapp 0,29 nach 56 d ab. Das Grundniveau der Überlebensrate von Wildtyp- und heterozygot mutierten Tieren lag jedoch auch etwas niedriger bei etwa 0,84. Nach den ersten zwei Wochen war der Unterschied zwischen Wildtyp- (0,84) und homozygot mutierten (0,48) Tieren bereits signifikant, nach Ablauf des

Gesamtzeitraumes von acht Wochen sogar hoch signifikant.

Durch die Behandlung mit Retigabin konnte der Verlauf der Überlebenskurve von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren auch hier positiv beeinflusst werden (Abb. 4.25 B). So war der Unterschied zwischen homozygot (0,50) und heterozygot (0,88) mutierten Mäusen nach acht Wochen zwar statistisch signifikant, zwischen den Kontrollgruppen war er jedoch noch hoch signifikant (Abb. 4.25 B vgl. Abb. 4.25 A). Auf die Wildtyptiere hatte die kombinierte prä- und postnatale Behandlung mit Retigabin erneut einen deutlichen negativen Effekt (0,27).

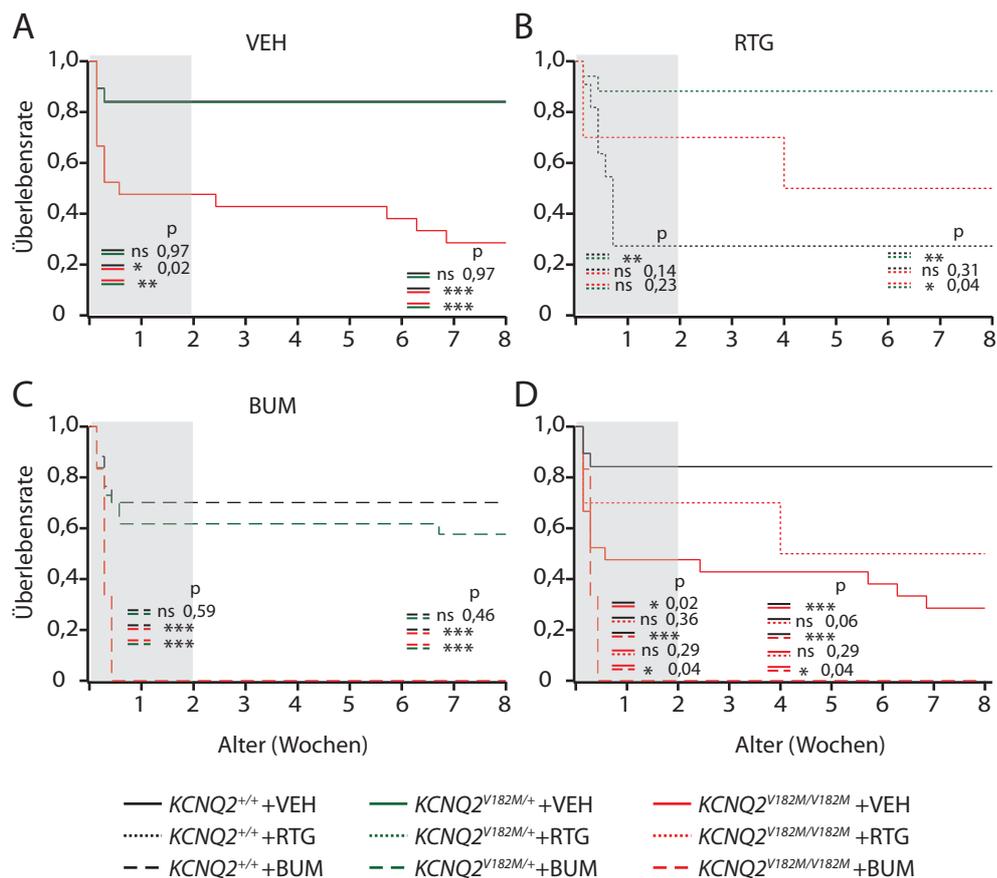


Abbildung 4.25: Die prä- und postnatale Behandlung mit Retigabin oder Bumetanid beeinflusste die Sterblichkeit von Jungtieren der Linie $KCNQ2^{Nmf134}$. Dargestellt sind die Überlebensraten nach Kaplan-Meier der vehikel- (A) ($KCNQ2^{+/+}$: n= 19, $KCNQ2^{V182M/+}$: n= 37, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: n= 21), retigabin- (B) (n= 11/17/10), und bumetanidbehandelten (C) (n= 17/37/12) Gruppen. (D) zeigt die direkte Gegenüberstellung vehikelbehandelter Wildtypiere und der unterschiedlich behandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse. Die statistischen Analysen wurden jeweils für die ersten 14 d (Behandlungszeitraum) und für den Gesamtzeitraum von 56 d durchgeführt.

Die Behandlung mit der erhöhten Dosis Bumetanid erwies sich hingegen als wenig hilfreich, da bereits nach drei Tagen alle behandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere gestorben waren (Abb. 4.25 C). Und auch auf die Gruppen der Wildtyp- (0,70) und heterozygoten (0,58) Tiere hatte die Behandlung einen leichten negativen Effekt.

Vergleich man abschließend erneut die unterschiedlich behandelten Gruppen homozygot mutierter Tiere, wurde deutlich, dass auch durch eine prä- und postnatale Behandlung mit

Retigabin kein statistisch relevanter Unterschied zwischen vehikel- und retigabinbehandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen erreicht werden konnte (Abb. 4.25 D). Lediglich der hoch signifikante Unterschied zwischen den vehikelbehandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ - und den vehikelbehandelten $KCNQ2^{+/+}$ -Mäusen konnte nach prä- und postnataler Behandlung mit Retigabin nicht mehr festgestellt werden.

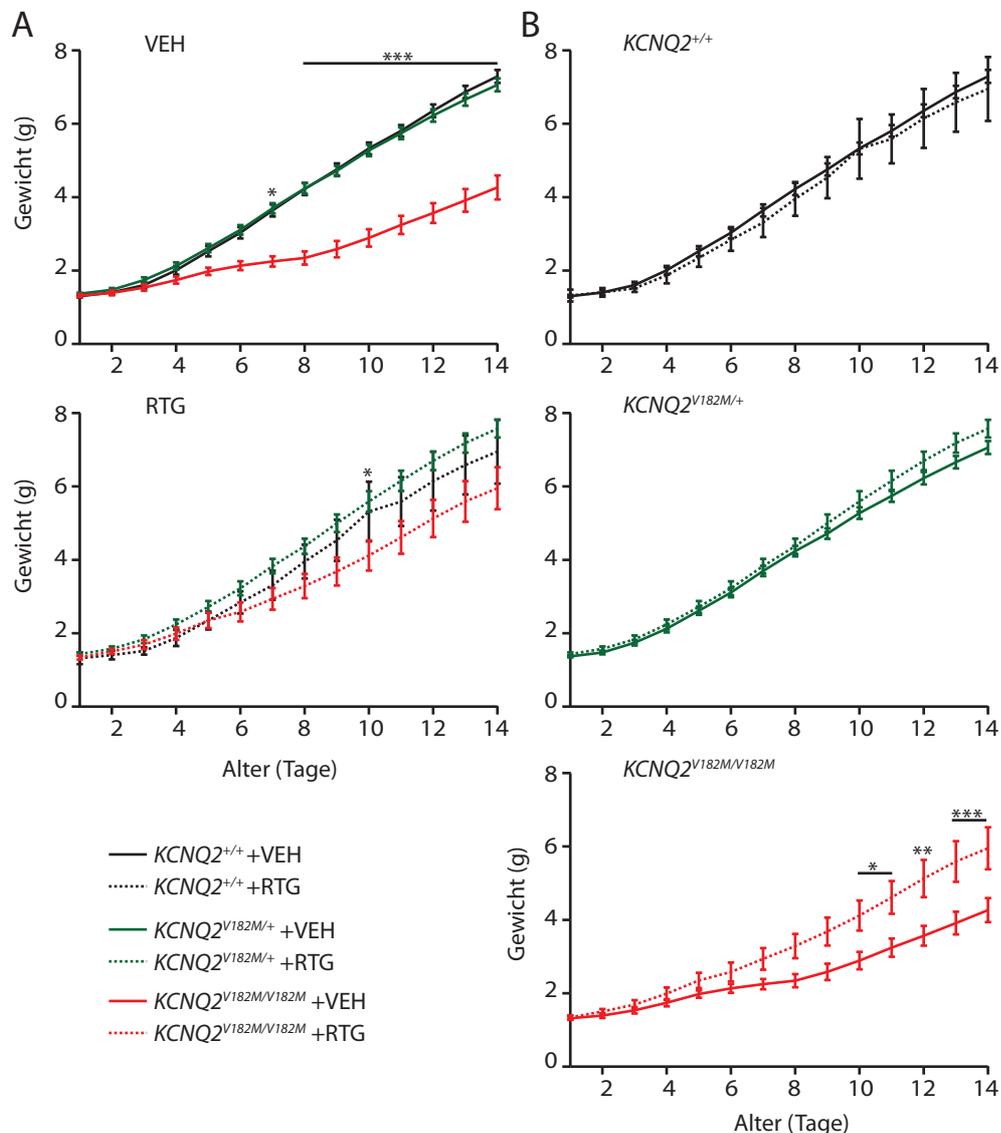


Abbildung 4.26: Die prä- und postnatale Behandlung mit Retigabin wirkte sich positiv auf die Gewichtsentwicklung von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren aus. Dargestellt ist das durchschnittliche Körpergewicht von P1 bis P14 der unterschiedlich behandelten Gruppen nach Behandlungsart (A), bzw. Genotyp (B) getrennt (VEH ($KCNQ2^{+/+}$: n= 16, $KCNQ2^{V182M/+}$: n= 25, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: n= 10), RTG (n= 3/12/7)). Die Asteriske beziehen sich auf den statistischen Vergleich zwischen $KCNQ2^{V182M/V182M}$ - und $KCNQ2^{+/+}$ -, bzw. vehikel- und retigabinbehandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren.

Es war also ein Behandlungserfolg durch Retigabin zu erkennen, ein positiver Effekt auf die Überlebensrate durch die zusätzliche pränatale Behandlung konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Ein weiteres Kriterium für den Erfolg der Behandlung war erneut die Gewichtsentwicklung in den ersten vierzehn Tagen. Allerdings konnten in der prä- und postnatalen Behandlungsstudie lediglich Daten der vehikel- und retigabinbehandelten Gruppen erhoben werden, da sämtliche bumetanidbehandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere bereits nach maximal drei Tagen verstorben waren.

In der vehikelbehandelten Gruppe konnte wie erwartet ab P7 ein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen $KCNQ2^{V182M/V182M}$ - und $KCNQ2^{+/+}$ -Tieren festgestellt werden, der sich im weiteren Verlauf statistisch manifestierte (Abb. 4.26 A oben). Mit $4,3 \pm 0,3$ g machte das durchschnittliche Körpergewicht von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen nur 58 ± 7 % des Normalgewichtes von $KCNQ2^{+/+}$ -Mäusen ($7,3 \pm 0,2$ g) aus. Durch die Behandlung mit Retigabin konnte dieses genotypabhängige Defizit auf 82 ± 10 % ($6,0 \pm 0,6$ g) des Normalgewichts vehikelbehandelter Wildtyptiere verringert werden (Abb. 4.26 A unten). Ein statistisch relevanter Unterschied zwischen den Gewichtsverläufen bestand nicht mehr.

Auch die prä- und postnatale Behandlung mit Retigabin hatte keinen Effekt auf die Gewichtsentwicklung von Wildtyp- und heterozygot mutierten Tieren (Abb. 4.26 B oben und Mitte). Die vehikel- und retigabinbehandelten Gruppen von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen unterschieden sich hingegen ab P10 signifikant (Abb. 4.26 B unten). Mit einem Gewichtszuwachs von 1,7 g und einer, gemessen am Gewicht vehikelbehandelter Wildtyptiere, relativen Steigerung von 23 %, war ein positiver Effekt auf die Gewichtsentwicklung von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen durch die prä- und postnatale Behandlung mit Retigabin also eindeutig belegbar. Dieser fiel sogar leicht größer aus, als durch die alleinige postnatale Behandlung (Vgl. Abb. 4.21).

Die Langzeitgewichtsentwicklung für die kombinierte prä- und postnatale Behandlung konnte leider nicht ausgewertet werden, da einige Gruppen, aufgrund der notwendigen Trennung nach Geschlecht, zu geringe Tierzahlen aufwiesen.

4.14 Die neonatale Behandlung mit Bumetanid führte zu einem verminderten Auftreten von neonatalen Krampfanfällen in homozygoten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen

Während der postnatalen Behandlung wurden die verwendeten Mäuse zweimal täglich aus ihrem gewohnten Umfeld genommen um ihnen den Wirkstoff injizieren zu können. Diese Stresssituation führte bei einem Teil der $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere zu einem Auftreten spontaner Krampfanfälle. Bei den beobachteten Krampfanfällen handelte es sich um tonisch-klonische Anfälle von etwa zehn bis zwanzig Sekunden Länge.

Der Zeitraum in dem diese Anfälle beobachtet wurden, erstreckte sich dabei von P9 bis P13 (Abb. 4.27 A). Die meisten Krampfanfälle wurden bei Tieren beobachtet, die zehn bzw. elf Tage alt waren.

Daraufhin wurde die Anzahl der beobachteten Krampfanfälle in Hinblick auf die jeweilige Behandlung der Tiere untersucht. So wurde deutlich, dass etwa 38 % der vehikelbehandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse mindestens einen stressinduzierten Krampfanfall erlitten hatten

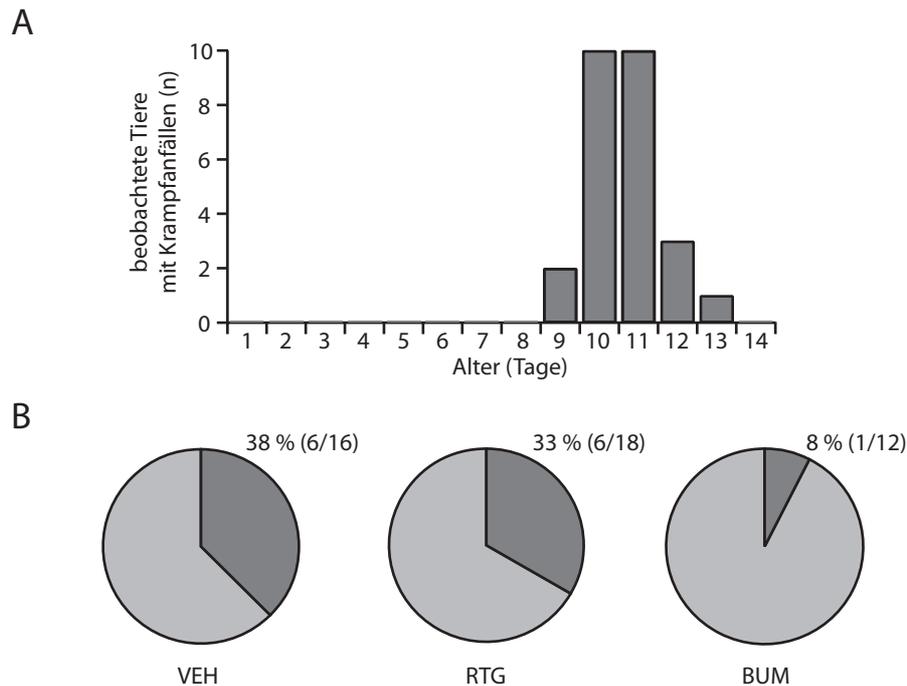


Abbildung 4.27: Die postnatale Behandlung mit Bumetanid wirkte sich positiv auf die Anzahl beobachteter Krampfanfälle von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen in der Neonatalperiode aus. Dargestellt ist die Gesamtzahl aller beobachteten Krampfanfälle von homozygot mutierten Tieren, unabhängig von Genotyp oder Behandlung (A) (n=63). (B) zeigt die prozentualen Anteile der postnatal behandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere mit Krampfanfällen nach Art der Behandlung (Anzahl der Tiere mit Krampfanfällen/Gesamtzahl der beobachteten Tiere) (Vgl. vehikel-/bumetanidbehandelte Gruppe: p=0,06).

(Abb. 4.27 B). Während der Anteil bei den retigabinbehandelten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen mit 33 % vergleichbar war, wiesen die homozygot mutierten Tiere, die mit Bumetanid behandelt wurden, eine deutlich verringerte Krampfanfallrate von 8 % auf. Der Unterschied zu den vehikelbehandelten Tieren war mit einem p-Wert von p=0,06 nur knapp nicht statistisch signifikant.

Ein positiver Trend hinsichtlich der Anzahl der stressinduzierten Krampfanfälle durch die postnatale Behandlung mit Bumetanid war demnach erkennbar.

4.15 Die Behandlung mit Bumetanid hatte positive Auswirkungen auf den Verhaltensphänotyp

Da nach den Behandlungsstudien auch $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse in größerer Zahl verfügbar waren, wurden im Folgenden Verhaltensanalysen mit adulten, homozygot mutierten und Wildtypmäusen durchgeführt. Dabei wurden Tiere aus verschiedenen behandelten Gruppen verwendet, so dass auch von der Behandlung abhängige Effekte beurteilt werden konnten. Dabei kamen sowohl nur postnatal, als auch prä- und postnatal behandelte Tiere zum Einsatz. Bei den bumetanidbehandelten Tieren handelte es sich allerdings ausschließlich um postnatal behandelte Tiere, da die kombinierte Behandlung mit erhöhter Dosis für alle $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse

letal war.

Durchgeführt wurden unter anderem der *Open Field*- und der *Y Maze*-Test. Im *Open Field* war dabei, bei behandlungsunabhängiger Betrachtung, kein genotypabhängiger Unterschied zwischen der zurückgelegten Strecke von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ - und $KCNQ2^{+/+}$ -Mäusen zu erkennen (Abb. 4.28 A).

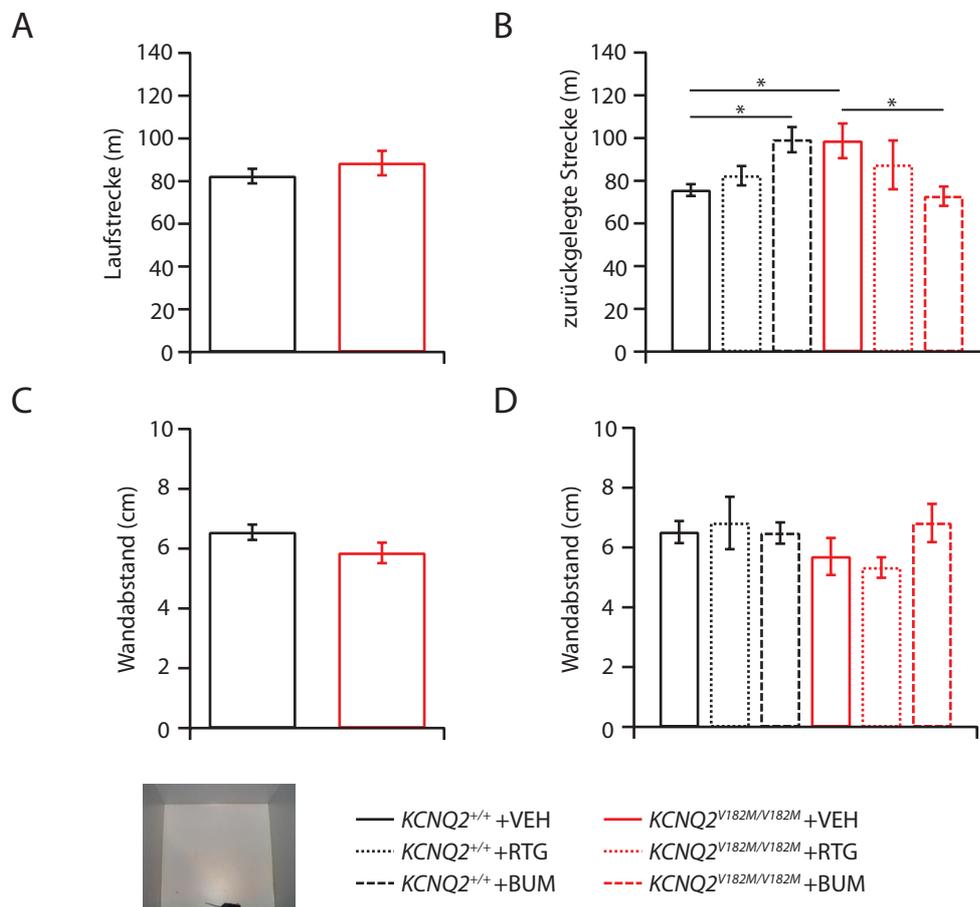


Abbildung 4.28: $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse zeigten eine erhöhte Aktivität, die durch die postnatale Behandlung mit Bumetanid verhindert wurde. Dargestellt ist die zurückgelegte Strecke behandelter $KCNQ2^{+/+}$ - (n=16) und $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse (n=12) im *Open Field*-Test (A) ($KCNQ2^{+/+}$: 82,4 ± 3,4 m, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: 88,4 ± 5,7 m). In (B) sind die Gruppen nach Art der Behandlung aufgetrennt (VEH ($KCNQ2^{+/+}$: 75,8 ± 2,8 m, n=10; $KCNQ2^{V182M/V182M}$: 98,7 ± 8,1 m, n=5), RTG ($KCNQ2^{+/+}$: 82,4 ± 4,5 m, n=2; $KCNQ2^{V182M/V182M}$: 87,4 ± 11,5 m, n=4), BUM ($KCNQ2^{+/+}$: 99,3 ± 5,9 m, n=4; $KCNQ2^{V182M/V182M}$: 72,8 ± 4,5 m, n=3)). Weiterhin dargestellt ist der durchschnittliche Wandabstand nach Genotyp ($KCNQ2^{V182M/V182M}$: 5,9 ± 0,3 cm, $KCNQ2^{+/+}$: 6,6 ± 0,3 cm) und Art der Behandlung (VEH ($KCNQ2^{+/+}$: 6,5 ± 0,4 cm, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: 5,7 ± 0,6 cm), RTG ($KCNQ2^{+/+}$: 6,8 ± 0,9 cm, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: 5,3 ± 0,3 cm), BUM ($KCNQ2^{+/+}$: 6,5 ± 0,4 cm, $KCNQ2^{V182M/V182M}$: 6,8 ± 0,6 cm)).

Löste man die beiden Gruppen jedoch nach Art der Behandlung auf, wurde zunächst deutlich, dass vehikelbehandelte $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse mit durchschnittlich 98,7 m eine signifikant längere Strecke zurückgelegt hatten als vehikelbehandelte $KCNQ2^{+/+}$ -Tiere mit 75,7 m (Abb. 4.28 B). Dieser Effekt konnte durch die Behandlung mit Bumetanid revidiert werden. So wies die bumetanidbehandelte Gruppe homozygot mutierter Tiere wieder einen mit vehikelbehandel-

ten Wildtyptieren vergleichbaren Wert von 72,8m auf. Da Bumetanid auf *KCNQ2*^{+/-}-Mäuse einen gegenteiligen Effekt zu haben schien, konnte in der Summe kein behandlungsunabhängiger Genotypeneffekt detektiert werden.

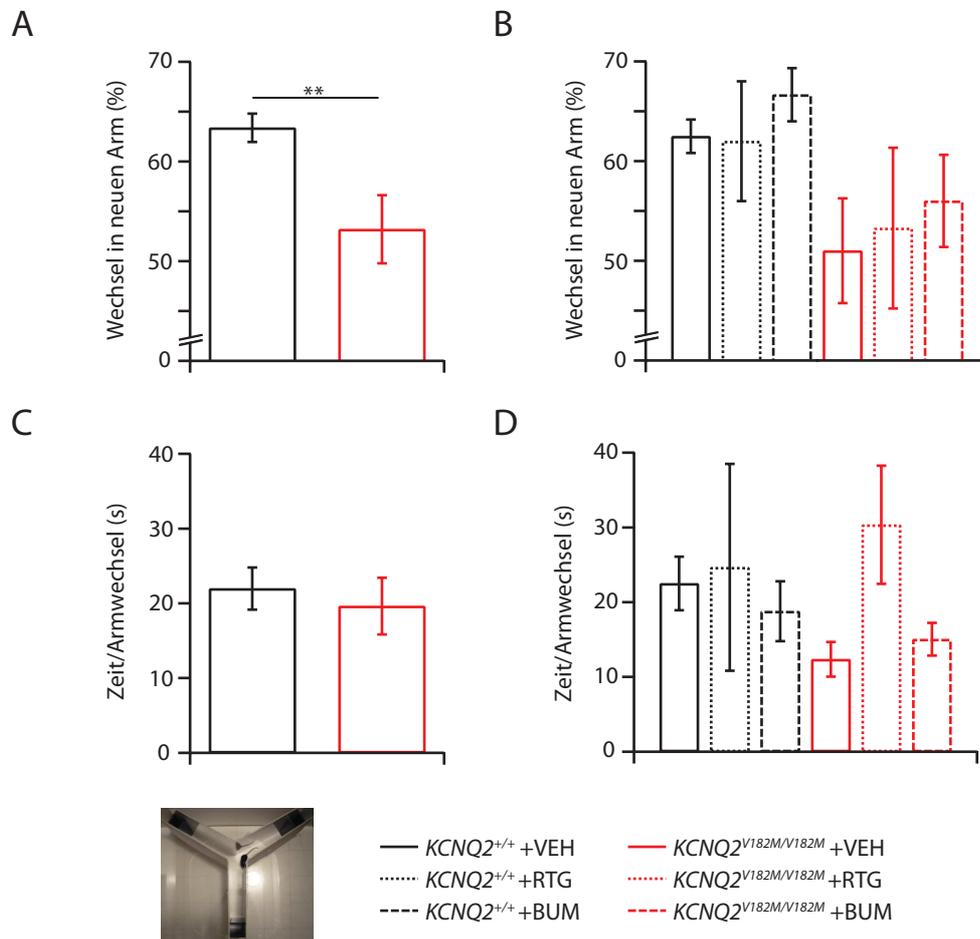


Abbildung 4.29: *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäuse zeigten ein gestörtes Arbeitsgedächtnis, das durch die postnatale Behandlung mit Retigabine oder Bumetanid nicht beeinflusst wurde. Dargestellt ist die Wechselrate in einen neuen Arm behandelter *KCNQ2*^{+/+}- (n=13) und *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäuse (n=11) im Y Maze-Test (A) (*KCNQ2*^{+/+}: 63,4 ± 1,4 %, *KCNQ2*^{V182M/V182M}: 53,2 ± 3,4 %). In (B) sind die Gruppen weiter nach Art der Behandlung aufgetrennt (VEH (*KCNQ2*^{+/+}: 65,5 ± 1,7 %, n=8; *KCNQ2*^{V182M/V182M}: 51,0 ± 5,3 %, n=4), RTG (*KCNQ2*^{+/+}: 62,0 ± 6,0 %, n=2; *KCNQ2*^{V182M/V182M}: 53,3 ± 8,1 %, n=4), BUM (*KCNQ2*^{+/+}: 66,7 ± 2,7 %, n=3; *KCNQ2*^{V182M/V182M}: 56,0 ± 4,6 %, n=3)). Weiterhin dargestellt ist die durchschnittliche Zeit pro Armwechsel nach Genotyp (*KCNQ2*^{V182M/V182M}: 5,9 ± 0,3 cm, *KCNQ2*^{+/+}: 6,6 ± 0,3 cm) und Art der Behandlung (VEH (*KCNQ2*^{+/+}: 6,5 ± 0,4 cm, *KCNQ2*^{V182M/V182M}: 5,7 ± 0,6 cm), RTG (*KCNQ2*^{+/+}: 6,8 ± 0,9 cm, *KCNQ2*^{V182M/V182M}: 5,3 ± 0,3 cm), BUM (*KCNQ2*^{+/+}: 6,5 ± 0,4 cm, *KCNQ2*^{V182M/V182M}: 6,8 ± 0,6 cm)).

Bumetanidbehandelte Wildtypmäuse legten durchschnittlich 99,3m zurück, und damit signifikant mehr als vehikelbehandelte *KCNQ2*^{+/+}-Mäuse. Die retigabinebehandelten Gruppen lagen beide mit 82,4m für die *KCNQ2*^{+/+}-, und 87,4m für die *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäuse, nicht statistisch unterscheidbar, zwischen den Werten der anderen Gruppen.

Durch die Behandlung mit Bumetanid konnte der Effekt der Mutation auf die zurückgelegte

Strecke demnach aufgehoben werden. Ein Effekt von Retigabin hingegen war nicht statistisch belegbar.

Ein weiterer Parameter für das Verhalten im *Open Field* war der durchschnittliche Wandabstand in cm. Allerdings konnte weder ein genotyp- (Abb. 4.28 C), noch ein behandlungsabhängiger (Abb. 4.28 D) Effekt festgestellt werden.

Die Ergebnisse im *Y Maze* deuteten ebenfalls auf eine Veränderung im Verhalten von *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäusen hin. So wiesen die homozygot mutierten Tiere mit rund 53% insgesamt eine sehr signifikant verschlechterte Alternierungsrate auf (Abb. 4.29 A). Ein Effekt durch die Behandlung war hingegen nicht zu erkennen (Abb. 4.29 B). Vielmehr war auch hier im Trend der negative Effekt der Mutation nachvollziehbar. Ein weiteres Kriterium für die Grundaktivität ist die durchschnittliche Zeit pro Armwechsel. Hier wiesen beide Gruppen genotypunabhängig einen ähnlichen Wert von 22,0s für Wildtyp-, und 19,6s für homozygot mutierte Tiere auf (Abb. 4.29 C). Auch die Auftrennung nach Art der Behandlung zeigte weder einen genotyp-, noch einen behandlungsabhängigen Effekt (Abb. 4.29 D).

5 Diskussion

5.1 Die Mauslinie *KCNQ2^{Nmf134}* als Tiermodell für neonatale Epilepsien

Die Grundlagenforschung im Bereich epileptischer Erkrankungen stützt sich in weiten Teilen auf Tiermodelle in denen Krampfanfälle chemisch oder elektrisch induziert werden. Dazu wird in Wildtyptieren meist ein lang anhaltender *Status Epilepticus* erzeugt, dessen Folge epileptogene Veränderungen im Gehirn sein können [135]. Der Vorteil dieser Modelle ist unter anderem, dass man den Zeitrahmen der Epileptogenese kontrollieren und in Gänze verfolgen kann. Allerdings sind die Ursachen für die Ausbildung einer Epilepsie in diesen Modellen nur begrenzt auf Epilepsien im Menschen übertragbar. Hier bieten genetische Modelle Vorteile. Ein induzierbares dominant-negatives Modell wie von Peters *et al.* veröffentlicht, verbindet dabei die genetische Komponente mit einer zeitlich kontrollierbaren Expression [105]. Dennoch könnten genetisch veränderte Mausmodelle, in denen eine konstant unter normalen Entwicklungsbedingungen exprimierte Mutation zur Ausbildung einer Epilepsie führt, weitere Erkenntnisse liefern. Dabei gibt es eine Reihe von Genen, in denen Mutationen zur Entwicklung einer Epilepsie führen können. Viele dieser Gene kodieren für Ionenkanäle.

Die *Benign Familial Neonatal Convulsions* (BFNC) stellen eine bekannte Erkrankung dar, in der verschiedene Mutationen der Gene *KCNQ2* und *KCNQ3* direkt mit der Erkrankung assoziiert sind [59]. Eine Veränderung der Kanaleigenschaften führt zu einer Veränderung im Gehirn, die wiederum zur Ausbildung einer Epilepsie führt. Eine Besonderheit der BFNC ist außerdem, dass sie im Vergleich zu den meisten anderen Epilepsien, sowohl im Neugeborenen-, Kindes- und Erwachsenenalter relativ milde Folgeerscheinungen hat. Möglich könnte in einem BFNC-assoziierten Tiermodell also nicht nur die Erforschung von epileptogenen, sondern auch die Entdeckung neuroprotektiver Mechanismen sein [129].

Ein Mausmodell für neonatale Epilepsien sollte möglichst genau die Prozesse nachbilden, die im Menschen zur Ausbildung epileptischer Erkrankungen führen. Überprüft werden konnte dies in der vorliegenden Arbeit durch eine möglichst exakte Beschreibung der beobachteten Symptomatik. Andere Mausmodelle wie die *KCNQ2-knock out*-Linie machen zwar deutlich, dass die entsprechenden Ionenkanäle lebensnotwendig sind [144], können allerdings nur heterozygot in Versuchen eingesetzt werden. Das Auftreten spontaner Krampfanfälle ist dabei ein zentrales Kriterium, das in heterozygoten *KCNQ2-knock out*-Tieren nicht erfüllt ist. Zwar zeigen heterozygote *KCNQ2-knock out*-Tiere, oder auch Tiere, die heterozygot für die *Szt1*-Deletion sind, eine geringere Krampfschwelle bei chemisch induzierten Krampfanfällen, aber keine spontane konvulsive Aktivität [144, 152]. Dadurch kommt es nicht zur endogenen Ausbildung einer Epilepsie.

Die Situation in erkrankten Menschen wird daher nur begrenzt nachgebildet. Auch für das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell gab es bisher keine Hinweise auf ein spontanes Auftreten von Krampfanfällen. Allerdings wurden heterozygote Tiere der Linie *KCNQ2^{Nmf134}* bereits mit Tieren verpaart, die heterozygot eine Mutation des Natriumkanals *SCN2A* trugen [67]. Auch die Mutation *SCN2A^{Q54}* führt heterozygot nicht zur Ausbildung spontaner Krampfanfälle. Es konnte aber ein additiver Effekt der beiden Mutationen gezeigt werden. So entwickeln Mäuse, die beide Mutationen heterozygot tragen, spontane Krampfanfälle, die mit einer 100 %igen Letalität in den ersten Lebenswochen verbunden sind [67]. In dieser Arbeit konnte erstmals ein Auftreten spontaner Krampfanfälle in homozygot mutierten *KCNQ2^{V182M/V182M}*-Tieren beschrieben werden. Andere *KCNQ2*-Mutanten, die ebenfalls spontane Krampfanfälle zeigen, sind das von Peters *et al.* publizierte dominant-negative [105], sowie das 2008 von Singh *et al.* veröffentlichte transgene Modell mit der Mutation *KCNQ2^{A306T}* [129].

5.1.1 Leitungseigenschaften heteromerer $K_V7.2/K_V7.3$ -Kanäle und die Mutation *KCNQ2^{V182M}*

Die Mutation der in dieser Arbeit untersuchten Mauslinie *KCNQ2^{Nmf134}* liegt im Codon der Aminosäure Valin 182 und sorgt dafür, dass diese aufgrund einer *missense*-Mutation durch Methionin ersetzt wird. Bei Valin 182 handelt es sich um eine sowohl innerhalb der Familie der K_V7 -Kanäle, als auch innerhalb des Tierreichs stark konservierte Aminosäure [67].

Um die Auswirkungen der Mutation *KCNQ2^{V182M}* auf die Leitungseigenschaften heteromerer $K_V7.2/K_V7.3$ -Kanäle zu charakterisieren, stellten Zwei-Elektroden-Spannungsklemme-Messungen in *Xenopus laevis*-Oocyten eine geeignete Methode dar. Hier lagen durch die Überexpression und die Größe der Zellen vergleichsweise hohe Stromamplituden vor, die zudem nicht, wie in den *Patchclamp*-Messungen in Hirnschnitten, als Differenzströme dargestellt werden mussten. So konnte gezeigt werden, dass die Mutation *KCNQ2^{V182M}* bezüglich der *KCNQ2*-Varianten sowohl homo-, als auch heteromer, eine Verringerung der Amplitude $K_V7.2/K_V7.3$ -vermittelter Ströme bewirkte. Diese wiederum war auf eine verzögerte spannungsabhängige Aktivierung der Kanäle zurückzuführen. Da sich die Mutation *KCNQ2^{V182M}* in Transmembrandomäne drei befindet, liegt sie in räumlicher Nähe der als Spannungssensor fungierenden Transmembrandomäne vier. Eine Veränderung der elektronegativen Eigenschaften in der Aminosäureseitenkette von Methionin im Vergleich zu Valin, könnte Auswirkungen auf die räumliche Orientierung der Transmembrandomäne drei im elektrischen Feld der Zellmembran haben. Dadurch könnte eine Einschränkung in der Bewegungsfreiheit des Spannungssensors bewirkt werden, welche zu einer erschwerten Aktivierung des Kanals führt. Ähnliche Effekte wurden vor allem für Mutationen innerhalb des Spannungssensors beschrieben [88].

Es konnte gezeigt werden, dass der selektive M-Kanal-Öffner Retigabin auf den mutierten Kanal einen vergleichbaren Effekt hat wie auf den Wildtypkanal. In allen Kanalzusammensetzungen wurde durch Zugabe von Retigabin eine Verschiebung des spannungsabhängigen Öffnungsverhaltens von ca. -20 mV erreicht. Die genotypabhängigen Unterschiede blieben jedoch bestehen. Die Wechselwirkung mit Retigabin und dessen Wirkmechanismus wurden durch die Mutation also

nicht beeinträchtigt. Da Retigabin im Bereich der Pore an die intrazellulären Teile der Transmembrandomänen fünf und sechs bindet und dort den offenen Kanalzustand stabilisiert, scheint dieser Befund schlüssig [75, 117, 151]. Retigabin wirkt demnach spannungsunabhängig und sorgt indirekt für eine verlangsamte Inaktivierung der Kanäle. Der eigentliche Öffnungsmechanismus wird durch Retigabin nicht beeinflusst [50].

Einzelne mutierte $K_V7.2$ -Untereinheiten scheinen keinen dominant-negativen Effekt auf die Ionenleitfähigkeit heteromerer $K_V7.2/K_V7.3$ -Kanäle zu haben. Sowohl die Amplituden, als auch die spannungsabhängigen Aktivierungskurven von Kanälen, die die mutierte und die Wildtypform von $K_V7.2$ enthalten, lagen zwischen denen der Kanäle, die nur die mutierte oder die Wildtypform enthielten. Dominant-negative Mutationen konnten aber im Zusammenhang mit K_V7 -assoziierten Enzephalopathien beschrieben werden [116].

5.1.2 M-Strom im Gehirn von $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäusen

Alle BFNC-assoziierten Mausmodelle haben gemeinsam, dass sie verringerte M-Strom-Amplituden in hippocampalen CA1-Neuronen aufweisen. Dies konnte in dieser Arbeit den Messungen in *Xenopus laevis*-Oocyten entsprechend, für $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse gezeigt werden. Die Größenordnung der M-Strom-Reduktion war mit der in Oocyten gemessenen vergleichbar. Das ist für andere Modelle nicht zwangsläufig der Fall. So sorgte die Mutation $KCNQ2^{A306T}$ in Oocyten für eine ca. 80 %ige Reduktion der Stromamplitude heteromerer $K_V7.2/K_V7.3$ -Kanäle [121], während in hippocampalen CA1-Neuronen der entsprechend homozygot mutierten Mäuse noch über 50 % Reststrom gemessen werden konnten [129].

Expressionsanalysen in heterozygoten $KCNQ2^{V182M/+}$ -Tieren hatten ergeben, dass die Expression von $KCNQ2$ in heterozygoten $KCNQ2^{V182M/+}$ -Tieren allelspezifische Unterschiede aufwies. So war die mRNA-Konzentration des mutierten Allels niedriger als die des Wildtyp-Allels. Eine Beeinträchtigung der Transkription des mutierten Allels, bzw. eine verstärkte Degradation auf mRNA-Ebene, ist daher wahrscheinlich. Eine kompensatorisch erhöhte Expression des Wildtypallels könnte zu M-Strom-Amplituden im Normalbereich führen. Solch eine Hochregulation konnte allerdings nicht zweifelsfrei festgestellt werden.

Im Hirnschnitt waren die M-Strom-Amplituden in CA1-Neuronen homozygot mutierter $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tiere wie erwartet reduziert und, wie in den Oocyten-Messungen, mit einer zu positiveren Membranpotentialen verschobenen Aktivierungskurve verbunden. Heterozygote Tiere wiesen aber M-Strom-Amplituden auf, die mit denen von Wildtyptieren vergleichbar waren. Dieses Phänomen konnte in $KCNQ2^{A306T/+}$ -Mäusen teilweise auch beobachtet werden [129]. Der unter stöchiometrisch kontrollierten Bedingungen in *Xenopus laevis*-Oocyten beobachtete intermediäre Effekt der heteromer vorliegenden Mutation war in Neuronen nicht nachzuweisen. In Hirnschnitten heterozygoter Tiere schien der M-Strom sogar bei niedrigeren Membranpotentialen aktiviert zu werden als in Wildtyptieren.

Allerdings muss das Ergebnis für die heterozygoten Tiere, insbesondere die auffällig verschobene Aktivierungskurve, dadurch relativiert werden, dass die gemessenen Differenzstromamplituden relativ klein waren und, insbesondere im Falle der heterozygoten Neuronen, eine hohe Va-

riabilität aufwiesen. Eine verschobene Aktivierungskurve der heterozygoten M-Kanäle aus dem erwarteten Bereich erscheint auch deshalb artifiziell, da Messungen unter Retigabinbedingungen wieder die erwartete intermediäre spannungsabhängige Aktivierung zeigten. Da durch Retigabin wesentlich größere M-Stromamplituden gemessen werden konnten, erscheinen die so erlangten Befunde schlüssiger. Retigabin hatte in Messungen hippocampaler CA1-Neuronen einen genotypunabhängigen Effekt, der dafür sorgte, dass die Aktivierungskurven weit in Richtung hyperpolarer Membranpotentiale verschoben waren. Dies spricht nicht für einen regulatorischen Mechanismus auf Expressionsebene, da die Anzahl der durch Retigabin aktivierbaren Kanäle in heterozygoten Neuronen gleich der in homozygot mutierten und Wildtypneuronen zu sein schien. Dennoch scheinen relevante Auswirkungen regulatorischer Mechanismen insbesondere in heterozygoten Tieren möglich. Ein mögliches Regulationsmodell, das Einfluss auf die Eigenschaften von M-Kanälen und den Effekt einer M-Kanal-Defizienz nehmen könnte wird mit der intrinsischen Plastizität beschrieben. Die sogenannte intrinsische Plastizität von Neuronen ist ein von unterschiedlichen Faktoren abhängiges Modell für die Regulation von Erregbarkeit und Feuerverhalten in Neuronen [11]. Im Gegensatz zur synaptischen Plastizität, spielen bei ihr nicht die Entstehung, sondern insbesondere die regulierte Weiterleitung von Aktionspotentialen eine zentrale Rolle. Intrinsische Plastizität reguliert die Reizleitung aus den Dendriten in das Soma, aber auch rückpropagierende Aktionspotentialen. Bei der intrazellulären Weiterleitung elektrischer Signale kommt es lokal zu starken Einströmen von Calcium-Ionen. Da im Axoninitialsegment zusammenlaufende Informationen über die Auslösung von Aktionspotentialen entscheiden, beeinflusst die intrinsische Plastizität maßgeblich das Feuerverhalten elektrisch aktiver Zellen. Veränderungen in der intrinsischen Plastizität können z.B. das Verhalten regulär feuender Neuronen beeinflussen und eine *burst*-artige Aktivität induzieren. Dieses Phänomen resultiert aus einer gestörten Nachhyperpolarisation (*After Hyperpolarisation* (AHP)) und ist charakteristisch für viele Epilepsien, aber auch andere neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer [11]. Die M-Kanäle spielen gerade für die Ausbildung einer intakten *Medium After Hyperpolarisation* (mAHP) eine entscheidende Rolle [137, 76]. Teil dieses fein abgestimmten Gleichgewichtes, insbesondere im Axoninitialsegment, ist unter anderem ein persistierender Natriumstrom (I_{NaP}). Veränderungen dieses Stromes konnten mit Veränderungen von M-Strom-Amplituden in Verbindung gebracht werden, was für einen wechselwirkenden Regulationsmechanismus spricht [153]. Mechanistisch sind Änderungen der intrinsischen Plastizität auf verschiedenen Wegen denkbar. So sind sowohl Expressions- und Aktivierungs-, aber auch Transport- und Abbauprozesse von Ionenkanälen diskutierte Mechanismen [11].

Die Spannungsklemme-Messungen in CA1-Neuronen lieferten nicht nur Belege für einen negativen Effekt der Mutation auf den hippocampalen M-Strom, sondern auch Hinweise auf eine intrazelluläre homöostatische Regulation der elektrophysiologischen Eigenschaften von CA1-Neuronen. Gegen eine Regulation und für einen dominant-negativen Effekt der Mutation $KCNQ2^{V182M}$ wiederum spricht die Tatsache, dass die Erregbarkeit von CA1-Neuronen in heterozygoten $KCNQ2^{V182M/+}$ -Tieren der von homozygot mutierten Tieren entsprach. Diese zeigten wie erwartet eine signifikant höhere Erregbarkeit als Wildtypneuronen. Darüber hinaus erscheint eine gestörte AHP möglich, was in einer *burst*-artigen Aktivität mutierter Neuronen

resultiert. Retigabin bewirkt in Neuronen aller Genotypen eine starke Reduktion der Anzahl gefeuerter Aktionspotentiale. Sobald die M-Kanäle einmal durch eine initiale Entladung aktiviert wurden, erschwert Retigabin ein Schließen der Kanäle, wodurch jedes weitere Auslösen von Aktionspotentialen verhindert wird [50]. Die erhöhte Aktivität einzelner Neurone, sowohl in homozygot, als auch heterozygot mutierten *KCNQ2^{NMf134}*-Mäusen, findet ihre Bestätigung in der immunhistochemischen Analyse der cFos-Expression. So sind in Hirnschnitten von Tieren beider Genotypen vereinzelt stark angefärbte Zellen erkennbar.

Während sich für die homozygot mutierten Neurone ein klares Bild aus verringerter M-Strom-Amplitude und erhöhter Erregbarkeit, bzw. Aktivität ergibt, lassen sich die Befunde aus heterozygoten Zellen nicht ohne weiteres einordnen. Zusätzlich zu Mechanismen auf Expressionsebene sind unterschiedliche Möglichkeiten der Einflussnahme auf die Kanal- und allgemeine elektrophysiologische Aktivität denkbar. Der bekannteste Regulationsmechanismus von M-Kanal-Aktivität ist der über muskarinische Acetylcholinrezeptoren [55]. Aktivierte ACh-Rezeptoren senken den intrazellulären Spiegel von membranassoziertem PIP₂. Da PIP₂ für eine Aktivierung der M-Kanäle notwendig ist, sinkt folglich die M-Kanal-Aktivität [71]. Eine Änderung in der Aktivierung von M-Kanälen über PIP₂ in heterozygoten Mäusen scheint also auch denkbar.

Da durch die Mutation das homöostatische Gleichgewicht gestört wird, scheint grundsätzlich das Eingreifen von regulatorischen Mechanismen möglich, die eine Überkompensation oder eine höhere Variabilität erzeugen könnten. Außerdem könnte, da die Aktivität unterschiedlicher exzitatorischer und inhibitorischer Ströme wahrscheinlich wechselwirkend reguliert wird, eine Veränderung in der Expression der beiden Allele von *KCNQ2*, oder Veränderungen in der Kanalaktivierung, Auswirkungen auf Expression und Aktivierung anderer Ionenkanäle haben. So könnte es durch die erhöhte Expression des Wildtypallels von *KCNQ2* zu einer ebenfalls erhöhten Expression von Kanälen kommen, die den persistierenden Natriumstrom vermitteln. Was unter normalen Umständen zu einem Ausgleich in der zellulären Aktivität führen würde, könnte in *KCNQ2^{V182M/+}*-Neuronen eine Übererregbarkeit trotz normaler M-Strom-Amplitude bedeuten. Durch eine erhöhte Expression mehrerer Ionenkanäle ließe sich auch der signifikant geringere Eingangswiderstand heterozygoter Zellen im Vergleich zu homozygot mutierten Neuronen erklären, der im Trend sogar leicht unter dem von Neuronen aus Wildtyptieren liegt. Neben intrazellulären homöostatischen Regulationsmechanismen sind auch Effekte der heterozygoten Expression auf unterschiedliche Zelltypen zu berücksichtigen. So konnte für CA1-Neurone eine mögliche Kompensation der M-Strom-Defizienz in heterozygoten Tieren gezeigt werden. Andere Zelltypen die z.B. Teil eines inhibitorisch wirkenden interneuronalen Netzwerkes sein könnten, sind möglicherweise nicht in der Lage ihre inhibierende Funktion aufrecht zu erhalten und erzeugen so über eine verminderte Regulation der Netzwerkaktivität eine Übererregbarkeit in CA1-Neuronen. Mögliche Zelltypen, die betroffen sein könnten sind z.B. Parvalbumin-positive Interneurone im präfrontalen Cortex [150].

5.1.3 Krampfanfälle und Entwicklungsdefizit durch die Mutation *KCNQ2*^{V182M}

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal für ein *KCNQ2*-Mausmodell eine klar eingegrenzte Neonatalperiode beschrieben werden, in der initial auftretende, spontane Krampfanfälle beobachtet wurden. Das Zeitfenster von P9-P13, in dem spontane Krampfanfälle beobachtet wurden, entspricht in etwa dem Zeitraum des letzten Schwangerschaftstrimenons bis zur Geburt im Menschen. In Säuglingen mit BFNC treten die ersten beobachteten Krampfanfälle in der ersten postnatalen Woche auf [63]. Zusätzlich zu den spontanen Krampfanfällen konnte bereits ab der Geburt der *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäuse ein Gewichtsdefizit im Vergleich zu Wildtypgeschwistern beobachtet werden, das durch eine reduzierte Gewichtszunahme innerhalb der ersten zwei Wochen fortgeführt wurde. Außerdem starb in den ersten Lebenswochen ein großer Teil der *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Tiere. Bereits an P1 war ihr Anteil geringer als nach Mendel erwartet. Diese Beobachtungen können unterschiedliche Gründe haben. Die schwächere Konstitution der homozygot mutierten Tiere kann zu einer geringeren Nahrungsaufnahme führen, da diese kompetitiv mit den Geschwistertieren erfolgt, und sich so selbst verstärken. Dabei kann auch das maternale Verhalten eine Rolle spielen, welches durch eventuell geringere Vokalisierungen der jungen *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Tiere weniger fürsorglich sein könnte. Außerdem könnten auch bereits vor P9 unbemerkte Krampfanfälle für eine erhöhte Sterberate verantwortlich sein. In Säuglingen werden subklinische Krampfanfälle beschrieben, die nur im EEG bemerkt werden können [47]. Von den in *KCNQ2*^{V182M/V182M}-Mäusen beobachteten Krampfanfällen zwischen P9 und P13 war allerdings keiner letal.

Die intrazelluläre Chlorid-Ionen-Konzentration ist in den meisten unreifen Neuronen neonataler Gehirne im Vergleich zum adulten Gehirn erhöht [12]. Dies ist auf eine neonatal veränderte Expression zweier gegenläufiger Chloridtransporter zurückzuführen. Die Expression des Chlorid-Ionen-Exporters KCC2 nimmt in dieser Phase zu, während die Expression des Chlorid-Ionen-Importers NKCC1 abnimmt [38]. Das Gleichgewichtspotential negativ geladener Chloridionen verschiebt sich somit in Richtung Ruhemembranpotential. Bindet nun der Neurotransmitter GABA an GABA_A-Rezeptoren, bei denen es sich um ligandengesteuerte Chlorid-Ionenkanäle handelt, bewirkt dies im adulten Gehirn einen hyperpolarisierenden Chlorid-Einstrom in die Zelle. Dieser inhibitorische Effekt kann durch eine erhöhte intrazelluläre Chloridkonzentration aber abgemildert oder sogar in einen depolarisierenden Auswärtsstrom umgekehrt werden. Dadurch kann es unter Umständen zu einer exzitatorischen Wirkung von GABA im neonatalen Gehirn kommen. Grundsätzlich kann es durch depolarisierende Reize aber auch zu einer sogenannten *Shunting*-Inhibition kommen [19]. Ein depolarisierender Auswärtsstrom von Chloridionen hat also nicht zwangsläufig einen exzitatorischen Effekt. Außerdem gibt es auch Hinweise darauf, dass es sich bei den Befunden zu einer neonatal erhöhten Chloridionenkonzentration um methodenbedingte Messartefakte handeln könnte [19]. Das Gleichgewicht von inhibitorischen und exzitatorischen Faktoren im neonatalen Gehirn ist in dieser Phase generell relativ instabil, wodurch das erstmalige Auftreten spontaner Krampfanfälle erklärt werden könnte.

Von Bedeutung für die zelluläre Erregbarkeit könnte außerdem das Expressionsmuster der M-Kanäle selbst sein. So gibt es Hinweise darauf, dass die postnatale Expression von *KCNQ2*

und *KCNQ3* erst innerhalb der ersten Lebenswochen ansteigt [145, 63]. Elektrophysiologische Messungen haben allerdings einen intakten M-Strom in hippocampalen CA1-Neuronen bereits in der ersten Lebenswoche dargelegt [96].

Charakteristisch für die BFNC sind die relativ milden, selbstlimitierten Krampfanfälle während der Neonatalperiode. Diesen folgen oftmals wiederkehrende Krampfanfälle im Erwachsenenalter, die einen schweren Verlauf nehmen können [111]. Auch das Erscheinungsbild der neonatal beobachteten Anfälle in *KCNQ2^{V182M/V182M}*-Mäusen unterschied sich von dem der in adulten Tieren beobachteten Krampfanfälle. Die in der Neonatalperiode beobachteten Krampfanfälle machten sich mit relativ schwachen klonischen Bewegungen der Extremitäten bemerkbar, die mit einer schnellen, unkoordinierten Laufbewegung beschrieben werden konnten. Darauf folgte eine tonische Phase in der die Maus versteifte und sich dann nach wenigen Sekunden wieder normal verhielt. Die wiederkehrenden Krampfanfälle in adulten *KCNQ2^{V182M/V182M}*-Tieren stellten sich hingegen wesentlich intensiver dar, mit sehr starken klonischen, sprungähnlichen Bewegungen. Darauf folgte ebenfalls ein generalisierter Muskeltonus. Diese Krämpfe waren häufig letal.

In heterozygoten *KCNQ2^{V182M/+}*-Tieren kam es im Gegensatz zu homozygot mutierten Tieren nicht, oder nur sehr selten, zum Auftreten spontaner Krampfanfälle. Die festgestellte Übererregbarkeit einzelner CA1-Neurone reichte hierfür möglicherweise nicht aus. Der Hippocampus und seine relativ klar abgrenzbaren Substrukturen und Zelltypen sind bereits gut beschrieben. Es ist durchaus denkbar, dass interneuronale Netzwerke die leicht erhöhte Aktivität kompensieren können. Über Mechanismen der sogenannten *Feedback*-, oder auch der *Feed Forward*-Inhibition könnte verhindert werden, dass synchrone epileptische Entladungen durch eine nur leicht erhöhte Erregbarkeit entstehen [72]. Ein residualer M-Strom, auch in anderen Zelltypen, könnte ebenfalls zur Kontrolle der Gesamtnetzwerkaktivität beitragen. Dabei liegen die heterozygoten *KCNQ2^{V182M/+}*-Tiere in etwa in dem Bereich einer 25 %igen M-Strom-Reduktion, die als Grenze für die Ausbildung spontaner Krampfanfälle postuliert worden ist [121].

Bei vielen epileptischen Erkrankungen kommt es durch fortschreitende Krampfaktivität, ähnlich wie bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, zum Absterben von Neuronen und damit einhergehenden inflammatorischen Prozessen. Für Temporallappenepilepsien (TLE) konnte das Auftreten einer sogenannte Hippocampalen Sklerose beschrieben werden [83]. Dabei kann es zu Zellverlusten und Dispersion ganzer hippocampaler Substrukturen kommen. Mit dem fortschreitenden Zelltod von Neuronen kann eine astrozytäre Gliose auftreten, in deren Verlauf sich aktivierte Astrozyten in die geschädigten Bereiche ausbreiten. Des Weiteren kann es zum Einwandern von Mikroglia kommen. Es sind auch Mutationen in *KCNQ2* bekannt, die zu einer schweren epileptischen Enzephalopathie führen, in deren Verlauf eine hippocampale Sklerose auftreten kann [146]. Für Epilepsie-Tiermodelle konnten ähnliche Phänomene beschrieben werden [105, 78].

In der vorliegenden Arbeit konnte ein vergleichbarer Effekt in *KCNQ2^{V182M/V182M}*-Tieren nicht gezeigt werden. Weder die Nissl-Färbung, noch die Anfärbung reaktiver Astrozyten oder aktivierter Mikroglia zeigten Auffälligkeiten. Diese Befunde stehen in Einklang mit dem relativ milden Verlauf der BFNC im Menschen und den Befunden aus dem ähnlichen Tiermodell der *KCNQ2^{A306T}*-Maus [129]. Eine morphologische oder histologische Veränderung der untersuchten

Gehirne kann allerdings nicht generell ausgeschlossen werden. Veränderungen auf synaptischer Ebene konnten durch die angewandten Methoden nicht detektiert werden.

Ein weiterer Effekt der Mutation $KCNQ2^{V182M}$, aber auch der Mutation $KCNQ2^{A306T}$, ist das geringere Körpergewicht und die verminderte Körpergröße homozygot mutierter Mäuse. Jüngere Untersuchungen hatten gezeigt, dass sowohl hypothalamische NPY-, als auch POMC-Neurone, M-Strom-Amplituden in relevantem Maße aufweisen. Im Falle der NPY-Neurone konnten diese durch Fasten reduziert werden, woraus eine erhöhte Aktivität der entsprechenden Zellen und eine erhöhte Nahrungsaufnahme resultierte [109]. Dabei wird die Expression von $KCNQ2$ und $KCNQ3$ reduziert. M-Ströme in POMC-Neuronen können wiederum durch Serotonin beeinflusst werden, dass an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, ähnlich dem muskarinischen Acetylcholinrezeptor bindet, und so über eine Verringerung des PIP_2 -Spiegels weniger M-Kanäle aktiviert [110]. Eine erhöhte Aktivität von POMC-Neuronen kann die Nahrungsaufnahme hemmen. Auch hier ist der M-Strom demnach Teil eines fein abgestimmten Gleichgewichtes, dass über die Aktivität unterschiedlicher Zelltypen den Energiestoffwechsel und die Nahrungsaufnahme beeinflussen kann. Eine Mutation in $KCNQ2$ könnte also durch eine verringerte M-Strom-Amplitude in POMC-Neuronen zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme führen. Dieser Effekt könnte zu einer Reduktion von Körpergewicht und -größe beitragen.

5.1.4 Netzwerkaktivität und Verhalten

Synchrone Muster der Netzwerkaktivität im Neocortex neonataler Ratten unterscheiden sich von denen in adulten Tieren und sind von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung des Gehirns [68, 79]. Intrinsische Aktivität im visuellen Cortex, die durch sogenannte retinale Wellen induziert wird, nimmt dabei eine entscheidende Funktion ein [86, 53]. Zu den charakteristischen kortikalen Aktivitätsmustern in Ratten gehören die sogenannten *Slow Activity Transients* (SAT's) [125, 139]. Diese konnten in den in dieser Arbeit untersuchten Tieren ebenfalls detektiert werden. Andere Untersuchungen im Gehirn von Mäusen hatten aber auch sogenannte *Spindle Burst*-Oszillationen gezeigt [78]. Durch eine transgen exprimierte, dominant-negative $KCNQ2$ -Untereinheit, wurde die Rate dieser *Spindle Burst*-Oszillationen stark erhöht [78]. Die in homozygoten Tieren der Linien $KCNQ2^{Nmf134}$ und $CD1-KCNQ2^{Nmf134}$ gemessenen *Spindle Burst*-Raten waren im Trend erniedrigt, erreichten aber keine statistische Signifikanz. Ursächlich für eine veränderte Rate dieser charakteristischen Oszillationen könnte ein defizienter M-Strom sein [78].

In neonatalen Ratten konnten auch charakteristische Aktivitätsmuster hippocampaler Aktivität gezeigt werden. Dazu gehören *Sharp Waves*, aber auch Stratum Radiatum Oszillationen (SRO) [79]. Letztere wurden auch schon in Mäusegehirnen detektiert [78]. In dieser Arbeit konnte in homozygot mutierten $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäusen, im Gegensatz zu dem dominant-negativen Modell, eine stark erhöhte Rate der Stratum Radiatum Oszillationen gezeigt werden. Dadurch wurden die *in vitro*-Daten dieser Arbeit bestätigt, die auf eine erhöhte Aktivität hippocampaler Neuronen hingedeutet hatten. Da im Bereich des Stratum Radiatum Stromsenken vorzufinden waren, wurde die detektierte Aktivität vermutlich aus der CA3-Region über die sogenannten

Schaffer-Kollateralen in die CA1-Region projiziert [4]. Eine erhöhte Aktivität auch in diesen vorgelagerten Regionen könnte so eine erhöhte Aktivität in CA1 erzeugen. Ein Grund dafür, weshalb dies in dem M-Kanal-defizienten Modell der dominant-negativen transgenen Mäuse nicht nachzuweisen war, könnte eine geringere Expression des Transgens in CA3 und einer dadurch im Vergleich geringeren Beeinträchtigung des M-Stroms sein.

Außerdem scheint der beobachtete Effekt der Mutation auf die hippocampale Aktivität stark altersabhängig zu sein. Das macht deutlich welcher Dynamik die Strukturen neonataler Gehirne unterliegen, und das eventuell auch die strengere Eingrenzung untersuchter Altersgruppen deutlichere Ergebnisse liefern könnte.

Eine ubiquitär manifestierte M-Kanal-Defizienz führt so im Mausmodell homozygoter $KCNQ2^{V182M/V182M}$ zu einer statistisch signifikant erhöhten Aktivität im neonatalen Hippocampus. Diese erhöhte Aktivität könnte ein Symptom der im Gehirn von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren stattfindenden Epileptogenese sein. Außerdem könnten auch hippocampusabhängige Lernprozesse von dieser veränderten Netzwerkaktivität betroffen sein.

Mit der BFNC sind häufig auch Störungen kognitiver Fähigkeiten assoziiert. Generell gehen mit Epilepsien nicht selten auch psychische Erkrankungen und Auffälligkeiten einher. Beispiele hierfür reichen von autistischen Störungen, kognitiven und psychosozialen Defiziten insbesondere bei Kindern, bis hin zu Depressionen [108, 107, 65]. Auch Formen der Hyperaktivität bei Kindern, assoziiert mit epileptischen Erkrankungen, sind bekannt [114].

Untersuchungen verschiedener epileptischer Tiermodelle haben verschiedene Auffälligkeiten gezeigt, die mit dem jeweiligen epileptischen Phänotyp einhergingen [126, 49]. Häufig waren dies jedoch Modelle in denen auch morphologische Veränderungen sichtbar waren [105, 49]. In der vorliegenden Arbeit konnten Einflüsse der Mutation $KCNQ2^{V182M}$ auf das Verhalten von Mäusen dargelegt werden. Dabei kamen unterschiedliche Hintergrundlinien zum Einsatz, da mit einem Einkreuzen der Mutation in die Linie CD1 die schlechten Zuchtergebnisse verbessert werden sollten. Homozygot mutierte Tiere mit B6-Hintergrund standen aufgrund der schlechten Ausbeute in der Zucht nicht in ausreichend großer Zahl zur Verfügung.

Die Mutation $KCNQ2^{V182M}$ schien sowohl homo-, als auch heterozygot Einfluss auf die Grundaktivität der untersuchten Tiere zu nehmen. Eindeutige Hinweise hierfür lieferten die Ergebnisse im *Open Field*. Diese Befunde wurden durch die Analyse der Eintrittsrate im *Elevated Plus Maze* bestätigt. Heterozygote Tiere zeigten dabei einen schwächeren Phänotyp, der außerdem variabler zu sein schien. Untersuchungen im dominant-negativen $KCNQ2$ -Mausmodell hatten einen sehr starken Anstieg der Aktivität gezeigt [105]. Darüber hinaus konnte eine beeinträchtigte räumliche Lernfähigkeit im *Water Maze* aufgezeigt werden [105]. Für $KCNQ2^{Nmf134}$ -Tiere konnten in dieser Arbeit keine Defizite im *Water Maze* gezeigt werden. Dennoch scheint die Punktmutation $KCNQ2^{V182M}$ heterozygot, vor allem aber homozygot das hippocampusabhängige Lernen zu beeinträchtigen. So scheinen mutierte Mäuse Defizite im Arbeitsgedächtnis aufzuweisen, da ein starker Effekt der Mutation $KCNQ2^{V182M}$ auf das Verhalten homozygot mutierter Mäuse im *Y Maze* zu erkennen war. Denkbar wäre auch, dass die erhöhte lokomotorische Aktivität der untersuchten Tiere in diesem Test für schlechtere Ergebnisse gesorgt hat.

Ein weiterer Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Lernfähigkeit von mutierten Tieren der

Linie *KCNQ2^{Nmf134}* lieferten die Untersuchungen des furchtassoziierten Lernens. Hier zeigten heterozygote Tiere Beeinträchtigungen.

Zusammenfassend konnte ein relativ milder Verhaltensphänotyp, der vor allem heterozygot für relativ variable Ergebnisse sorgte, beschrieben werden. Dabei waren sowohl die Bewegungsaktivität, als auch die Lernfähigkeit der untersuchten Tiere betroffen. Eine erhöhte lokomotorische Aktivität könnte mit einer generell erhöhten Netzwerkaktivität erklärt werden, während die Lernfähigkeit direkt in Zusammenhang mit den im Hippocampus reduzierten M-Strom-Amplituden gebracht werden könnte. Der Hippocampus ist insbesondere für das Verarbeiten von Informationen in Form von Lernprozessen von wichtiger Bedeutung [10]. Da auch in den *in vivo*-Ableitungen eine erhöhte Aktivität im Hippocampus gezeigt werden konnte, erscheint ein Defizit in hippocampusabhängigen kognitiven Leistungen schlüssig.

5.2 Behandlung neonataler Epilepsien - Retigabin oder Bumetanid?

Die ersten 14 Lebenstage konnten im Mausmodell als die Phase beschrieben werden, in der ein intakter M-Strom für eine normale Entwicklung besonders wichtig ist. M-Kanal-Defizienzvermittelte Störungen konnten durch Aufrechterhalten normaler M-Ströme in dieser Periode vermieden werden [105]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Behandlungsstudien wurden daher in dieser Periode durchgeführt, um einen möglichst großen Effekt zu erzielen. Auf den Menschen bezogen entspricht diese Entwicklungsphase in etwa dem Ende des dritten Trimenons bis zur Geburt.

5.2.1 Behandlung mit Retigabin

Da es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten Tiermodell um eine M-Kanal-defiziente Maus handelte, ist der naheliegendste Behandlungsansatz einen spezifischen M-Kanal-Aktivator wie Retigabin zu verwenden. Retigabin findet bereits Anwendung in der Behandlung epileptischer Erkrankungen in Erwachsenen als additive Therapiemöglichkeit. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften kann Retigabin uneingeschränkt die Bluthirnschranke passieren und erreicht im Gehirn Konzentrationen, die mit denen im Plasma vergleichbar sind. Bei einer täglichen Gabe von 1200 mg liegen diese etwa in einer Plasmakonzentration von 1 μM vor [50].

Ein Problem, dass ebenfalls bei der Behandlung von Epilepsien, die durch Mutationen in M-Kanälen verursacht werden, zu beachten ist, ist die Möglichkeit einer Beeinträchtigung des Wirkmechanismus. So gibt es Mutationen oder Deletionen, die die Bindemotive in M-Kanälen für Retigabin verändern und so den Effekt von Retigabin vermindern oder aufheben können [99].

Eine Wirksamkeit von Retigabin an M-Kanälen mit der Mutation *KCNQ2^{V182M}* konnte in dieser Arbeit dargelegt werden. In Hirnschnitten übertrafen die M-Strom-Amplituden homozygot mutierter CA1-Neurone bei einer Konzentration von 10 μM Retigabin sogar die ohne Retigabin gemessenen Wildtypamplituden. Da in den behandelten Mäusen aber wahrscheinlich wesentlich geringere Serumkonzentrationen erreicht wurden, wird der Effekt dort schwächer gewesen sein.

Dennoch konnte in postnatal behandelten *KCNQ2^{V182M/V182M}*-Tieren ein positiver Behand-

lungseffekt festgestellt werden. So konnte sowohl die Überlebensrate, als auch die Gewichtsentwicklung homozygot mutierter Mäuse verbessert werden. Dies erscheint schlüssig, da Retigabin universell dem Effekt der Mutation entgegenwirkt. Alle Bereiche in denen eine verringerte M-Strom-Amplitude von Bedeutung sein könnte, müssten durch die Gabe von Retigabin wieder in Richtung des Normalzustandes bewegt worden sein. Funktionen neuronaler Zelltypen, für die eine variable M-Strom-Amplitude besonders wichtig ist, werden aber weniger von Retigabin profitiert haben. Da Retigabin eine Inaktivierung des Kanals erschwert und den offenen Zustand stabilisiert, führt es wahrscheinlich zu einem konstant erhöhten M-Strom, der an Variabilität eingebüßt hat. Der Preis einer erhöhten M-Strom-Amplitude ist also ein Defizit in der bedarfsgerechten Steuerung des M-Stromes. Dies mag dazu beigetragen haben, dass keine Hinweise auf eine verringerte Krampfhäufigkeit in der Neonatalperiode von P9-P13 durch Retigabin beschrieben werden konnten. Möglicherweise war aber auch die eingesetzte Konzentration zu niedrig um deutlichere Effekte zu erzeugen. Auch Einflüsse der postnatalen Behandlung mit Retigabin auf das Verhalten adulter Mäuse konnten nicht gezeigt werden.

Durch die zusätzliche pränatale Behandlung mit Retigabin konnte der positive Effekt auf Überlebensrate und Gewichtsentwicklung nicht signifikant verbessert werden. Allerdings deutet die Tatsache, dass sehr viele retigabinbehandelte Würfe bereits an P1 tot oder nicht mehr aufzufinden waren darauf hin, dass die pränatale Behandlung der Muttertiere einen negativen Effekt auf deren Verhalten gehabt haben könnte. Dies sollte bei zukünftigen Studien beachtet werden.

5.2.2 Behandlung mit Bumetanid

Ein weiterer Behandlungsansatz bei M-Kanal-Defizienzen ist die Verminderung der Gesamtnetzwerkaktivität im Gehirn. Klassische Pharmaka aus der Familie der Barbiturate oder Benzodiazepine, die auch bei neonatalen Krampfanfällen eingesetzt werden, haben nicht immer den gewünschten Effekt [148]. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass sich die Wirkung von GABA, die durch diese Substanzen verstärkt wird, im neonatalen Gehirn von der im adulten Gehirn unterscheidet. Eine Substanz, die deshalb schon in mehreren epileptischen Tiermodellen eingesetzt wurde, ist Bumetanid. Bumetanid blockiert den in der Neonatalperiode stark aktiven Chlorid-Importer NKCC1. Durch die Blockierung wird die intrazelluläre Chloridkonzentration abgesenkt und die Wirkung von GABA wird weniger depolarisierend [82]. In Tierversuchen konnte unter anderem eine erfolgreiche Verstärkung des Effektes von Phenobarbital durch Bumetanid gezeigt werden [37]. Auch eine direkt durch Bumetanid verursachte Veränderung von neuronaler Erregbarkeit konnte beschrieben werden [82]. Im Menschen, auch für die Behandlung von Neugeborenen, wurde Bumetanid schon seit langem erfolgreich als Diuretikum eingesetzt [81]. Erste Fallstudien beschreiben eine antikonvulsive Wirkung von Bumetanid in Neugeborenen [61].

Ein Problem bei der Behandlung von Epilepsien mit Bumetanid ist die Tatsache, dass es sich bei Bumetanid um ein unter physiologischen Bedingungen stark ionisiertes Molekül handelt, dass die Bluthirnschranke kaum passieren kann. Die beobachtete Wirksamkeit könnte also entweder durch eine sehr geringe Konzentration erzeugt werden, oder die Bluthirnschranke ist

aufgrund der neuronalen Übererregbarkeit stärker durchlässig. Veränderungen der Durchlässigkeit der Bluthirnschranke konnten bereits beschrieben werden [69]. Interessant ist weiter, dass für andere Diuretika, die an Ionenkanälen wirken die nicht im Gehirn exprimiert werden, eine antikonvulsive Wirkung beobachtet werden konnte [82]. Der größte Teil des systemisch verabreichten Bumetanids reichert sich in der Niere an und ist dort für den relativ spezifischen diuretischen Effekt verantwortlich. In höheren Dosierungen kann es daher zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen. Sogenannte *Prodrugs*, also Derivate, die erst an ihrem Wirkort in eine aktive Form umgesetzt werden, könnten bei der antikonvulsiven Therapie von Vorteil sein, da sie dazu beitragen die Bluthirnschranke in höheren Konzentrationen zu überwinden [82].

Eine übermäßige Blockierung von NKCC1 im neonatalen Gehirn birgt die Gefahr einer gestörten Entwicklung von sowohl glutamatergen, als auch GABAergen Synapsen. In NKCC1-*knock-out*-Mäusen konnte eine gestörte Maturation dieser wechselwirkenden Verschaltungssysteme gezeigt werden, die allerdings nicht mit makroskopischen Veränderungen im Gehirn verbunden war [106, 143].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich moderate Bumetanidkonzentrationen positiv auf die Überlebensrate von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen auswirken. Bei höheren Konzentrationen überwiegt vermutlich der diuretische Effekt, und sorgt für eine Sterberate von 100 % nach wenigen Tagen. Bei fast allen bumetanidbehandelten Tieren war auch eine trockenere Haut zu bemerken, was ebenfalls auf einen Flüssigkeitsmangel hindeutete. Nichtsdestotrotz konnte neben der Überlebensrate auch die Häufigkeit beobachteter Krampfanfälle beeinflusst werden. So konnten in bumetanidbehandelten Jungtieren fast nie spontane Krampfanfälle beobachtet werden. Die Gewichtsentwicklung hingegen konnte nicht positiv beeinflusst werden. Vielmehr gab es Hinweise auf Verschlechterungen hinsichtlich des Gewichtsdefizits. Ursächlich könnte auch hier der Flüssigkeitsmangel gewesen sein.

Im Gegensatz zu der Behandlung mit Retigabin konnte für Bumetanid allerdings auch ein Effekt auf den Verhaltensphänotyp gezeigt werden. Einer erhöhten Aktivität im *Open Field* untersuchter $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse scheint so durch eine postnatale Behandlung mit Bumetanid vorgebeugt worden zu sein.

5.3 Ausblick

Der in dieser Arbeit beschriebene Phänotyp von $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäusen zeigte in weiten Teilen Analogien zum Verlauf neonataler Epilepsien im Menschen. In Hinblick auf die kaum vorhandenen Auswirkungen bezüglich der Hirnmorphologie, besonders aber auch der milden kognitiven Verhaltensphänotypen weist das $KCNQ2^{Nmf134}$ -Modell auch Parallelen zur BFNC auf. Erstmals gezeigt werden konnte ein Auftreten spontaner Krampfanfälle in einer relativ eng umgrenzten neonatalen Periode. Neben dem $KCNQ2^{A306T}$ -Modell, das einen ähnlichen Phänotyp aufweist, für das allerdings weder Verhaltensanalysen noch elektrophysiologische *in vivo*-Experimente publiziert wurden, eignet sich das in dieser Arbeit charakterisierte Modell sehr gut für pharmakologische Behandlungsstudien. Dennoch sind weitere Untersuchungen notwendig. Insbesondere in der histologischen, immunhistochemischen, aber auch PCR-basierten Expressionsanalyse kann

dieses Modell weitere Erkenntnisse liefern. Darüber hinaus kann auch die weitere Analyse von elektrophysiologischen *in vivo*-Daten das Verständnis der epileptogenen oder neuroprotektiven Vorgänge der BFNC, sowie der grundlegenden Funktionen des M-Stromes erweitern. Im Hinblick auf die Untersuchung möglicher Regulationsmechanismen intrinsischer Plastizität scheint vor allem das heterozygote Modell der *KCNQ2*^{V182M/+}-Tiere sehr interessant zu sein. Auch *in vivo*-Ableitungen der Hirnaktivität heterozygoter Tiere könnten zu neuen Erkenntnissen führen.

In Bezug auf die Behandlung neonataler Epilepsien konnte diese Arbeit dazu beitragen, mögliche neue Behandlungsmöglichkeiten besser beurteilen zu können. Eine Behandlung mit Retigabin kann vermutlich nicht alle negativen Effekte einer M-Kanal-Mutation kompensieren, wohl aber viele der Symptome stark abmildern. Insbesondere konnte der Entwicklungsphänotyp beeinflusst werden, was durch Bumetanid nicht gelang. Dennoch macht eine Behandlung mit Bumetanid in Hinblick auf die allgemeine Netzwerkaktivität in neonatalen Gehirnen durchaus Sinn. Das Auftreten von Krampfanfällen konnte durch Bumetanid beeinflusst werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Behandlung mit Pharmaka, die unterschiedliche Wirkmechanismen aufweisen, vielversprechende Ansätze liefern könnte. In zukünftigen Behandlungsstudien könnte untersucht werden, ob der beobachtete positive Effekt von Bumetanid und Retigabin additiv zu einer weiteren Verbesserung der Symptomatik in *KCNQ2*^{Nmf134}-Mäusen führen kann.

Literaturverzeichnis

- [1] N. S. Abend and C. J. Wusthoff. Neonatal Seizures and Status Epilepticus. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 29(5):441–448, 2012.
- [2] A. Aguzzi, B. a. Barres, and M. L. Bennett. Microglia: Scapegoat, Saboteur, or Something Else? *Science (New York, N.Y.)*, 339(6116):156–61, Jan. 2013.
- [3] A. Alam and Y. Jiang. Structural studies of ion selectivity in tetrameric cation channels. *The Journal of General Physiology*, 137(5):397–403, May 2011.
- [4] P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss, and J. O’Keefe. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, USA, 2007.
- [5] S. A. Antoniuk, F. Hamdar, R. D. Ducci, A. T. F. Kira, M. N. L. Cat, and C. R. Cruz. Childhood acute bacterial meningitis: risk factors for acute neurological complications and neurological sequelae. *Jornal de Pediatria*, 87(6):535–540, 2011.
- [6] R. Baehring and M. Covarrubias. Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels. *Journal of Physiology*, 589(3):461–479, 2011.
- [7] J. Bancaud, O. Henriksen, F. Rubio-Donnadieu, M. Seino, F. E. Dreifuss, and J. K. Penry. Proposal for Revised Clinical and Electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures. *Epilepsia*, 22(4):489–501, 1981.
- [8] G. Baranauskas. Ionic Channel Function in Action Potential Generation: Current Perspective. *Molecular Neurobiology*, 35(2):129–150, July 2007.
- [9] J. Barghaan and B. Robert. Dynamic Coupling of Voltage Sensor and Gate Involved in Closed-State Inactivation of Kv4.2 Channels. *Journal of General Physiology*, 133(2):205–224, 2009.
- [10] F. P. Battaglia, K. Benchenane, A. Sirota, C. M. a. Pennartz, and S. I. Wiener. The hippocampus: hub of brain network communication for memory. *Trends in cognitive sciences*, 15(7):310–318, July 2011.
- [11] H. Beck and Y. Yaari. Plasticity of intrinsic neuronal properties in CNS disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(5):357–69, May 2008.
- [12] Y. Ben-Ari. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(9):728–39, Sept. 2002.

-
- [13] Y. Ben-ari and G. L. Holmes. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *The Lancet Neurology*, 5(12):1055–63, 2006.
- [14] E. E. Benarroch. Potassium channels: Brief overview and implications in epilepsy. *Neurology*, 72(7):664–9, Mar. 2009.
- [15] A. T. Berg, S. F. Berkovic, M. J. Brodie, J. Buchhalter, J. H. Cross, W. van Emde Boas, J. Engel, J. French, T. a. Glauser, G. W. Mathern, S. L. Moshé, D. Nordli, P. Plouin, and I. E. Scheffer. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4):676–685, Apr. 2010.
- [16] A. T. Berg and I. E. Scheffer. New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. *Epilepsia*, 52(6):1058–62, June 2011.
- [17] A. T. Berg, F. A. Zelko, and S. R. Levy. Age at onset of epilepsy, pharmacoresistance, and cognitive outcomes: A prospective cohort study. *Neurology*, 79(September):1384–1391, 2012.
- [18] C. Biervert. A Potassium Channel Mutation in Neonatal Human Epilepsy. *Science*, 279(5349):403–406, Jan. 1998.
- [19] P. Bregestovski and C. Bernard. Excitatory GABA: how a correct observation may turn out to be an experimental artifact. *Frontiers in Pharmacology*, 3(65):1–8, Jan. 2012.
- [20] R. Brenner and K. Wilcox. Potassium Channelopathies of Epilepsy. *Jasper 's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 4:1–16, 2010.
- [21] M. J. Brodie, A. Covanis, A. Gil-Nagel, H. Lerche, E. Perucca, G. J. Sills, and H. S. White. Antiepileptic drug therapy: Does mechanism of action matter? *Epilepsy & Behavior*, 21(4):331–41, Aug. 2011.
- [22] M. J. Brodie and P. Kwan. Current position of phenobarbital in epilepsy and its future. *Epilepsia*, 53(Suppl.8):40–6, Dec. 2012.
- [23] D. Brown and P. Adams. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature*, 283(5748):673–676, 1980.
- [24] D. a. Brown and G. M. Passmore. Neural KCNQ (Kv7) channels. *British journal of pharmacology*, 156(8):1185–95, Apr. 2009.
- [25] G. Buzsáki, C. A. Anastassiou, and C. Koch. The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(6):407–20, June 2012.
- [26] G. Buzsaki and A. Draguhn. Neuronal Oscillations in Cortical Networks. *Science*, 304(June):1926–1929, 2004.

- [27] W. Catterall. Sodium Channel Mutations and Epilepsy. *Jasper 's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 4:1–16, 2012.
- [28] P. J. Chan, J. D. Osteen, D. Xiong, M. S. Bohnen, D. Doshi, K. J. Sampson, S. O. Marx, A. Karlin, and R. S. Kass. Characterization of KCNQ1 atrial fibrillation mutations reveals distinct dependence on KCNE1. *The Journal of general physiology*, 139(2):135–44, Mar. 2012.
- [29] C. Charlier, N. Singh, S. Ryan, and T. Lewis. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nature genetics*, 18(January):53–55, 1998.
- [30] C. J. Chu-shore and E. A. Thiele. New Drugs for Pediatric Epilepsy. *Seminars in Pediatric Neurology*, 17(4):214–223, 2010.
- [31] R. R. Clancy. Summary proceedings from the neurology group on neonatal seizures. *Pediatrics*, 117(3):23–27, Mar. 2006.
- [32] A. Covanis. Epileptic encephalopathies (including severe epilepsy syndromes). *Epilepsia*, 53(Table 1):114–126, 2012.
- [33] N. Das, M. Dhanawat, and S. K. Shrivastava. An overview on antiepileptic drugs. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 6(4):178–193, 2012.
- [34] J. B. de Kok, E. T. G. Wiegerinck, B. a. J. Giesendorf, and D. W. Swinkels. Rapid genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms Using Novel Minor Groove Binding DNA Oligonucleotides (MGB probes). *Human Mutation*, 19(5):554–9, May 2002.
- [35] J. Devaux, K. A. Kleopa, E. C. Cooper, and S. S. Scherer. KCNQ2 Is a Nodal K⁺ Channel. *The Journal of Neuroscience*, 24(5):1236–1244, 2004.
- [36] O. Devinsky, A. Vezzani, S. Najjar, N. C. D. Lanerolle, and M. A. Rogawski. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends in Neurosciences*, 36(3):174–184, 2013.
- [37] V. I. Dzhala, A. C. Brumback, and K. J. Staley. Bumetanide Enhances Phenobarbital Efficacy in a Neonatal Seizure Model. *Annals of Neurology*, 63(2):222–35, Feb. 2008.
- [38] V. I. Dzhala, D. M. Talos, D. a. Sdrulla, A. C. Brumback, G. C. Mathews, T. a. Benke, E. Delpire, F. E. Jensen, and K. J. Staley. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nature medicine*, 11(11):1205–13, Nov. 2005.
- [39] J. Engel. A Proposed Diagnostic Scheme for People with Epileptic Seizures and with Epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, 42(6):796–803, 2001.
- [40] J. Engel. Report of the ILAE Classification Core Group. *Epilepsia*, 47(9):1558–68, Sept. 2006.

- [41] J. N. M. Facility. Heritable mouse mutants from JAX NMF ENU Mutagenesis Program. *MGI Direct Data Submission*, 2003.
- [42] L. Fellini and F. Morellini. Geometric information is required for allothetic navigation in mice. *Behavioral Brain Research*, 222:380–384, 2011.
- [43] R. S. Fisher, W. van Emde Boas, W. Blume, C. Elger, P. Genton, P. Lee, and J. J. Engel. Epileptische Anfaelle und Epilepsie: Von der Internationalen Liga gegen Epilepsie (International League Against Epilepsy; ILAE) und dem Internationalen Bureau für Epilepsie (International Bureau for Epilepsy; IBE) vorgeschlagene Definitionen. *Zeitschrift für Epileptologie*, 4(18):260–264, 2005.
- [44] D. C. Gadsby. Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(5):344–52, May 2009.
- [45] R. Gerlai. A new continuous alternation task in T-maze detects hippocampal dysfunction in mice A strain comparison and lesion study. *Behavioral Brain Research*, 95:91–101, 1998.
- [46] M. Gibbons, R. Smeal, D. Takahashi, J. Vargas, and K. Wilcox. Contributions of astrocytes to epileptogenesis following status epilepticus: Opportunities for preventive therapy? *Neurochemistry International*, in press, 2012.
- [47] H. C. Glass and E. Wirrell. Controversies in Neonatal Seizure Management. *Journal of child neurology*, 24(5):591–9, May 2009.
- [48] E. Gouaux and R. Mackinnon. Principles of Selective Ion Transport in Channels and Pumps. *Science*, 310(5753):1461–5, Dec. 2005.
- [49] I. Gröticke, K. Hoffmann, and W. Löscher. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Experimental Neurology*, 207(2):329–49, Oct. 2007.
- [50] M. J. Gunthorpe, C. H. Large, and R. Sankar. The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K⁺ channel opener for the treatment of epilepsy. *Epilepsia*, 53(3):412–24, Mar. 2012.
- [51] G. A. Gutman, K. G. Chandy, S. Grissmer, M. Lazdunski, D. Mckinnon, L. A. Pardo, G. A. Robertson, B. Rudy, M. C. Sanguinetti, W. Stu, and X. Wang. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4):473–508, 2005.
- [52] C. Halstenson and G. Matzke. Bumetanide: a new loop diuretic (Bumex, Roche Laboratories). *The Annals of Pharmacotherapy*, 17(11):786–797, 1983.
- [53] I. L. Hanganu, Y. Ben-Ari, and R. Khazipov. Retinal Waves Trigger Spindle Bursts in the Neonatal Rat Visual Cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(25):6728–36, June 2006.

-
- [54] D. C. Henshall and B. S. Meldrum. Cell death and survival mechanisms after single and repeated brief seizures. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 4:1–19, 2012.
- [55] C. C. Hernandez, O. Zaika, G. P. Tolstykh, and M. S. Shapiro. Regulation of neural KCNQ channels: signalling pathways, structural motifs and functional implications. *The Journal of physiology*, 586(7):1811–21, Apr. 2008.
- [56] H. Jackson, L. Huisman, S. Saatani, and L. Arbour. Long QT syndrome. *Canadian Medical Association Journal*, 183(11):1272–1275, 2011.
- [57] M. Jakovcevski, M. Schachner, and F. Morellini. Susceptibility to the long-term anxiogenic effects of an acute stressor is mediated by the activation of the glucocorticoid receptors. *Neuropharmacology*, 61(8):1297–1305, 2011.
- [58] L. Y. Jan and Y. N. Jan. Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling. *The Journal of physiology*, 590(Pt 11):2591–9, June 2012.
- [59] T. J. Jentsch. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 1(1):21–30, Oct. 2000.
- [60] Y. Jiang, V. Ruta, J. Chen, A. Lee, and R. MacKinnon. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, 423(May):42–48, 2003.
- [61] K. T. Kahle, S. M. Barnett, K. C. Sassower, and K. J. Staley. Decreased Seizure Activity in a Human Neonate Treated With Bumetanide, an inhibitor of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) Cotransporter NKCC1. *Journal of child neurology*, 24(5):572–6, May 2009.
- [62] W. Kamphuis, C. Mamber, M. Moeton, L. Kooijman, J. A. Sluijs, A. H. P. Jansen, M. Verveer, L. R. D. Groot, V. D. Smith, S. Rangarajan, J. Rodri, M. Orre, and E. M. Hol. GFAP Isoforms in Adult Mouse Brain with a Focus on Neurogenic Astrocytes and Reactive Astroglisis in Mouse Models of Alzheimer Disease. *PLoS ONE*, 7(8):e42823, 2012.
- [63] T. Kanaumi, S. Takashima, H. Iwasaki, M. Itoh, A. Mitsudome, and S. Hirose. Developmental changes in KCNQ2 and KCNQ3 expression in human brain: Possible contribution to the age-dependent etiology of benign familial neonatal convulsions. *Brain & Development*, 30(5):362–369, May 2008.
- [64] E. Kandel, H. Schwartz, and T. Jessell. *Principles of Neural Science*, volume 4. McGraw-Hill, 2000.
- [65] A. M. Kanner, S. C. Schachter, J. J. Barry, D. C. Hersdorffer, M. Mula, M. Trimble, B. Hermann, A. E. Ettinger, D. Dunn, R. Caplan, P. Ryvlin, and F. Gilliam. Depression and epilepsy: Epidemiologic and neurobiologic perspectives that may explain their high comorbid occurrence. *Epilepsy & Behavior*, 24(2):156–68, June 2012.
- [66] D. G. Kasteleijn-nolst Trenite. Provoked and reflex seizures: Surprising or common? *Epilepsia*, 53(Suppl.4):105–113, 2012.

- [67] J. a. Kearney, Y. Yang, B. Beyer, S. K. Bergren, L. Claes, P. Dejonghe, and W. N. Frankel. Severe epilepsy resulting from genetic interaction between Scn2a and Kcnq2. *Human molecular genetics*, 15(6):1043–8, Mar. 2006.
- [68] R. Khazipov, A. Sirota, X. Leinekugel, G. L. Holmes, Y. Ben-Ari, and G. Buzsaki. Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature*, 432(December):758–761, 2004.
- [69] S. Y. Kim, M. Buckwalter, H. Soreq, A. Vezzani, and D. Kaufer. Blood-brain barrier dysfunction-induced inflammatory signaling in brain pathology and epileptogenesis. *Epilepsia*, 53(Suppl.6):37–44, Dec. 2012.
- [70] K. Kobow, S. Auvin, F. Jensen, W. Löscher, I. Mody, H. Potschka, D. Prince, A. Sierra, M. Simonato, A. Pitkänen, A. Nehlig, and J. M. Rho. Finding a better drug for epilepsy: Antiepileptogenesis targets. *Epilepsia*, 53(11):1868–76, Nov. 2012.
- [71] M. Kruse, G. Hammond, and B. Hille. Regulation of voltage-gated potassium channels by PI(4, 5)P2. *The Journal of General Physiology*, 140(2):189–205, 2012.
- [72] D. M. Kullmann. Interneuron networks in the hippocampus. *Current opinion in neurobiology*, 21(5):709–16, Oct. 2011.
- [73] P. Kwan, S. C. Schachter, and M. J. Brodie. Drug-Resistant Epilepsy. *The New England journal of medicine*, 365(10):919–26, Sept. 2011.
- [74] M. Lader. Benzodiazepine harm: how can it be reduced? *British Journal of Clinical Pharmacology*, pages 1–19, 2012.
- [75] W. Lange, J. Geissendoerfer, A. Schenzer, J. Groetzinger, G. Seebohm, T. Friedrich, and M. Schwake. Refinement of the Binding Site and Mode of Action of the Anticonvulsant Retigabine on KCNQ K⁺ Channels. *Molecular Pharmacology*, 75(2):272–280, 2009.
- [76] J. J. Lawrence, F. Saraga, J. F. Churchill, J. M. Statland, K. E. Travis, F. K. Skinner, and C. J. McBain. Somatodendritic Kv7/KCNQ/M Channels Control Interspike Interval in Hippocampal Interneurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(47):12325–12338, 2006.
- [77] S. P. Lazow, V. M. Thadani, K. L. Gilbert, R. P. Morse, K. a. Bujarski, K. Kulandaivel, R. M. Roth, R. C. Scott, D. W. Roberts, and B. C. Jobst. Outcome of frontal lobe epilepsy surgery. *Epilepsia*, 53(10):1746–1755, Oct. 2012.
- [78] V. Le. *Untersuchung der physiologischen Rolle von Kv7.2-Kanälen und der pathophysiologischen Mechanismen von Kv7.2-Kanaldefizienz im Gehirn der Maus (Mus musculus, Linnaeus 1758)*. PhD thesis, Universität Hamburg, 2009.

-
- [79] X. Leinekugel, R. Khazipov, R. Cannon, H. Hirase, Y. Ben-Ari, and G. Buzsáki. Correlated Bursts of Activity in the Neonatal Hippocampus in Vivo. *Science*, 296(5575):2049–52, June 2002.
- [80] C. T. Lombroso. Neonatal Seizures: Gaps Between the Laboratory and the Clinic. *Epilepsia*, 48(s2):83–106, Apr. 2007.
- [81] A. Lopez-Samblas, J. Adams, R. Goldberg, and M. Modi. The pharmacokinetics of bumetanide in the newborn infant. *Biology of the Neonate*, 72(5):265–72, 1997.
- [82] W. Löscher, M. Puskarjov, and K. Kaila. Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments. *Neuropharmacology*, 69:62–74, June 2013.
- [83] K. Malmgren and M. Thom. Hippocampal sclerosis-Origins and imaging. *Epilepsia*, 53(Suppl.4):19–33, Sept. 2012.
- [84] D. J. Mclauchlan and N. P. Robertson. Management of status epilepticus. *Journal of Neurology*, 259:2261–2263, 2012.
- [85] I. Meier, L. Fellini, M. Jakovcevski, M. Schachner, F. Morellini, and M. E. T. Al. Expression of the snoRNA Host Gene *gas5* in the Hippocampus Is Upregulated by Age and Psychogenic Stress and Correlates with Reduced Novelty-Induced Behavior in C57BL/6 Mice. *Hippocampus*, 20(9):1027–1036, 2010.
- [86] M. Meister, R. Wong, D. Baylor, and C. Shatz. Synchronous Bursts of Action Potentials in Ganglion Cells of the Developing Mammalian Retina. *Science*, 252(May):939–943, 1991.
- [87] A. Merseburg, A. Schlusche, S. Marguet, J. Grendel, F. Morellini, and D. Isbrandt. Suppression of HCN channel mediated I(h) in forebrain neurons impairs early postnatal development and alters hippocampal network activity in vivo. *Neuroscience Meeting PLanner. New Orleans, LA: Society for Neuroscience, 2012*, Online, pp, 2012.
- [88] F. Miceli, M. V. Soldovieri, L. Lugli, G. Bellini, P. Ambrosino, M. Migliore, E. M. del Giudice, F. Ferrari, A. Pascotto, and M. Tagliatalata. Neutralization of a unique, negatively-charged residue in the voltage sensor of Kv7.2 subunits in a sporadic case of benign familial neonatal seizures. *Neurobiology of disease*, 34(3):501–10, June 2009.
- [89] J. F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Whherell, and O. C. Uhlenbeck. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Research*, 15(21):8783–8798, 1987.
- [90] F. Moeller, M. Maneshi, F. Pittau, T. Gholipour, F. Dubeau, and J. Gotman. Functional connectivity in patients with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia*, 52(3):515–522, 2011.

- [91] F. Morellini and M. Schachner. Enhanced novelty-induced activity, reduced anxiety, delayed resynchronization to daylight reversal and weaker muscle strength in tenascin-C-deficient mice. *European Journal of Neuroscience*, 23(5):1255–1268, Mar. 2006.
- [92] K. Namba, H. Mutai, H. Kaneko, S. Hashimoto, and T. Matsunaga. In silico modeling of the pore region of a KCNQ4 missense mutant from a patient with hearing loss. *BMC Research Notes*, 5(1):145, Jan. 2012.
- [93] A. Neu, H. Neuhoff, G. Trube, S. Fehr, K. Ullrich, J. Roeper, and D. Isbrandt. Activation of GABA A Receptors by Guanidinoacetate : A Novel Pathophysiological Mechanism. *Neurobiology of Disease*, 307(11):298–307, 2002.
- [94] B. a. Neubauer, S. Waldegger, J. Heinzinger, A. Hahn, G. Kurlmann, B. Fiedler, F. Eberhard, H. Muhle, U. Stephani, S. Garkisch, O. Eeg-Olofsson, U. Müller, and T. Sander. KCNQ2 and KCNQ3 mutations contribute to different idiopathic epilepsy syndromes. *Neurology*, 71(3):177–83, July 2008.
- [95] L. Nie. Mutations of KCNQ4 Channels Associated with Nonsyndromic Progressive Sensorineural Hearing Loss. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 16(5):441–444, 2008.
- [96] M. Okada, G. Zhu, S. Hirose, K. Ito, and T. Murakami. Age-dependent modulation of hippocampal excitability by KCNQ-channels. *Epilepsy research*, 53:81–94, 2003.
- [97] J. F. Otto, N. a. Singh, E. J. Dahle, M. F. Leppert, C. M. Pappas, T. H. Pruess, K. S. Wilcox, and H. S. White. Electroconvulsive seizure thresholds and kindling acquisition rates are altered in mouse models of human KCNQ2 and KCNQ3 mutations for benign familial neonatal convulsions. *Epilepsia*, 50(7):1752–9, July 2009.
- [98] J. F. Otto, Y. Yang, W. N. Frankel, H. S. White, and K. S. Wilcox. A Spontaneous Mutation Involving Kcnq2 (Kv7.2) Reduces M-Current Density and Spike Frequency Adaptation in Mouse CA1 Neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(7):2053–9, Feb. 2006.
- [99] J. F. Otto, Y. Yang, W. N. Frankel, K. S. Wilcox, and H. S. White. Mice Carrying the Szt1 Mutation Exhibit Increased Seizure Susceptibility and Altered Sensitivity to Compounds Acting at the M-Channel. *Epilepsia*, 45(9):1009–16, Sept. 2004.
- [100] M. M.-l. Pamplona, C. M. Paris, R. J. P. Bethesda, M. S. Shizuoka, P. Wolf, E. L. Angeles, and J. Engel. Proposal for Revised Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes. *Epilepsia*, 30(4):389–399, 1989.
- [101] Z. Pan, T. Kao, Z. Horvath, J. Lemos, J.-Y. Sul, S. D. Cranstoun, V. Bennett, S. S. Scherer, and E. C. Cooper. A Common Ankyrin-G-Based Mechanism Retains KCNQ and NaV Channels at Electrically Active Domains of the Axon. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(10):2599–613, Mar. 2006.

-
- [102] C. P. Panayiotopoulos. The new ILAE report on terminology and concepts for the organization of epilepsies: Critical review and contribution. *Epilepsia*, 53(3):399–404, Mar. 2012.
- [103] D. Pandis and N. Scarmeas. Seizures in Alzheimer Disease: Clinical and Epidemiological Data. *Epilepsy Currents*, 12(5):184–187, 2012.
- [104] P. Perucca and F. G. Gilliam. Adverse effects of antiepileptic drugs. *Lancets of Neurology*, 11(September):792–802, 2012.
- [105] H. C. Peters, H. Hu, O. Pongs, J. F. Storm, and D. Isbrandt. Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nature neuroscience*, 8(1):51–60, Jan. 2005.
- [106] C. K. Pfeffer, V. Stein, D. J. Keating, H. Maier, I. Rinke, Y. Rudhard, M. Hentschke, G. M. Rune, T. J. Jentsch, and C. a. Hübner. NKCC1-Dependent GABAergic Excitation Drives Synaptic Network Maturation during Early Hippocampal Development. *The Journal of Neuroscience*, 29(11):3419–30, Mar. 2009.
- [107] K. Rantanen, K. Eriksson, and P. Nieminen. Social competence in children with epilepsy - A review. *Epilepsy & Behavior*, 24(3):295–303, July 2012.
- [108] S. J. Robinson. Childhood Epilepsy and Autism Spectrum Disorders: Psychiatric Problems, Phenotypic Expression, and Anticonvulsants. *Neuropsychology review*, 22(3):271–9, Sept. 2012.
- [109] T. a. Roepke, J. Qiu, A. W. Smith, O. K. Rønnekleiv, and M. J. Kelly. Fasting and 17β -Estradiol Differentially Modulate the M-Current in Neuropeptide Y Neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(33):11825–35, Aug. 2011.
- [110] T. a. Roepke, a. W. Smith, O. K. Rønnekleiv, and M. J. Kelly. Serotonin 5-HT_{2C} receptor-mediated inhibition of the M-current in hypothalamic POMC neurons. *American journal of physiology: Endocrinology and Metabolism*, 302(11):E1399–406, June 2012.
- [111] G. Ronen, T. Rosales, and M. Connolly. Seizure characteristics in chromosome 20 benign familial neonatal convulsions. *Neurology*, 43(7):1355–1360, 1993.
- [112] S. G. Ryan, M. Wiznitzer, C. Hollman, M. C. Torres, M. Szekeresova, and S. Schneider. Benign familial neonatal convulsions: evidence for clinical and genetic heterogeneity. *Annals of neurology*, 29(5):469–73, May 1991.
- [113] R. Saiki, D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis, and H. Erlich. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239(4839):487–491, 1988.

-
- [114] J. Salpekar and L. Foster. Comorbid Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Epilepsy. *US Pediatr Rev*, pages 27–28, 2007.
- [115] F. Sanger and a. R. Coulson. A rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3):441–448, May 1975.
- [116] E. Scheffer, P. De Jonghe, M. Weckhuysen, M. Bock, S. Maljevic, G. Schepers, G. Orhan, S. Mandelstam, A. Suls, and H. Lerche. Severe functional defects of Kv7.2 channel mutations associated with epileptic encephalopathies. *2012 Neuroscience Meeting Planner. New Orleans, LA: Society for Neuroscience, 2012. Online*, 2012.
- [117] A. Schenzer, T. Friedrich, M. Pusch, P. Saftig, T. J. Jentsch, J. Grötzinger, and M. Schwake. Molecular determinants of KCNQ (Kv7) K⁺ channel Sensitivity to the Anticonvulsant Retigabine. *The Journal of Neuroscience*, 25(20):5051–60, May 2005.
- [118] M. S. Scher. Neonatal seizure classification: a fetal perspective concerning childhood epilepsy. *Epilepsy Research*, 70S(1):41–57, Aug. 2006.
- [119] N. Schmitt, M. Schwarz, A. Peretz, I. Abitbol, B. Attali, and O. Pongs. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *The EMBO journal*, 19(3):332–40, Feb. 2000.
- [120] B. C. Schroeder, M. Hechenberger, F. Weinreich, C. Kubisch, and T. J. Jentsch. KCNQ5, a Novel Potassium Channel Broadly Expressed in Brain, Mediates M-type Currents. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(31):24089–95, Aug. 2000.
- [121] B. C. Schroeder, C. Kubisch, V. Stein, and T. J. Jentsch. Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature*, 396(6712):687–90, Dec. 1998.
- [122] M. Schwake, D. Athanasiadu, C. Beimgraben, J. Blanz, C. Beck, T. J. Jentsch, P. Saftig, and T. Friedrich. Structural Determinants of M-Type KCNQ (Kv7) K⁺ Channel Assembly. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(14):3757–66, May 2006.
- [123] B. Schwappach. An overview of trafficking and assembly of neurotransmitter receptors and ion channels (Review). *Molecular Membrane Biology*, 25(4):270–8, May 2008.
- [124] R. C. Scott and G. L. Holmes. Before Epilepsy Unfolds: Opening up the potassium door in neonatal seizures. *Nature Medicine*, 18(11):1624–1625, Nov. 2012.
- [125] A. M. H. Seelke and M. S. Blumberg. Developmental appearance and disappearance of cortical events and oscillations in infant rats. *Brain research*, 1324(February):34–42, 2010.

- [126] J. Seo, S. Jung, S.-Y. Lee, H. Yang, B. S. Kim, J. Choi, M. Bang, H.-S. Shin, and D. Jeon. Early deficits in social behavior and cortical rhythms in pilocarpine-induced mouse model of temporal lobe epilepsy. *Experimental neurology*, 241(1):38–44, Mar. 2013.
- [127] F. A. Siebzehrubl and I. Blumcke. Neurogenesis in the human hippocampus and its relevance to temporal lobe epilepsies. *Epilepsia*, 49(Suppl5):55–65, 2008.
- [128] N. Singh, C. Charlier, D. Stauffer, B. DuPont, R. Leach, R. Melis, G. Ronen, I. Bjerre, T. Quattlebaum, J. Murphy, M. McHarg, D. Gagnon, T. Rosales, A. Pfeiffer, E. Anderson, and M. Leppert. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature genetics*, 18(January):25–29, 1998.
- [129] N. a. Singh, J. F. Otto, E. J. Dahle, C. Pappas, J. D. Leslie, A. Vilaythong, J. L. Noebels, H. S. White, K. S. Wilcox, and M. F. Leppert. Mouse models of human KCNQ2 and KCNQ3 mutations for benign familial neonatal convulsions show seizures and neuronal plasticity without synaptic reorganization. *The Journal of physiology*, 586(14):3405–23, July 2008.
- [130] G. Sperk, M. Drexel, and S. Pirker. Neuronal plasticity in animal models and the epileptic human hippocampus. *Epilepsia*, 50(Suppl.12):29–31, 2009.
- [131] J. L. Sponsler and A. C. Kendrick-adey. Seizures as a manifestation of multiple sclerosis. *Epileptic Disorders*, 13(4):401–410, 2011.
- [132] A. P. Stewart, J. C. Gómez-Posada, J. McGeorge, M. J. Rouhani, A. Villarroel, R. D. Murrell-Lagnado, and J. M. Edwardson. The Kv7.2/Kv7.3 Heterotetramer Assembles with a Random Subunit Arrangement. *The Journal of biological chemistry*, 287(15):11870–7, Apr. 2012.
- [133] B. E. Swartz, C. R. Houser, U. Tomiyasu, G. O. Walsh, A. Desalles, J. R. Rich, and A. Delgado-escueta. Hippocampal Cell Loss in Posttraumatic Human Epilepsy. *Epilepsia*, 47(8):1373–1382, 2006.
- [134] J. K. Tulloch, R. R. Carr, and M. H. Ensom. A Systematic Review of the Pharmacokinetics of Antiepileptic Drugs in Neonates With Refractory Seizures. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*, 17(1), 2012.
- [135] L. Turski, C. Ikonomidou, W. Turski, Z. Bortolotto, and E. Cavalheiro. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*, 3(2):154–71, 1989.
- [136] A. V. Tzingounis, M. Heidenreich, T. Kharkovets, G. Spitzmaul, and H. S. Jensen. The KCNQ5 potassium channel mediates a component of the afterhyperpolarization current in mouse hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(22):10232–10237, 2010.

- [137] A. V. Tzingounis and R. a. Nicoll. Contribution of KCNQ2 and KCNQ3 to the medium and slow afterhyperpolarization currents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50):19974–9, Dec. 2008.
- [138] S. Vanhatalo, L. Hellström-Westas, and L. S. De Vries. Bumetanide for neonatal seizures: Based on evidence or enthusiasm? *Epilepsia*, 50(5):1292–3, May 2009.
- [139] S. Vanhatalo and K. Kaila. Development of neonatal EEG activity: from phenomenology to physiology. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 11(6):471–8, Dec. 2006.
- [140] K. Vervaeke, N. Gu, C. Agdestein, H. Hu, and J. F. Storm. Kv7/KCNQ/M-channels in rat glutamatergic hippocampal axons and their role in regulation of excitability and transmitter release. *The Journal of physiology*, 576(Pt 1):235–56, Oct. 2006.
- [141] A. Vezzani. Finding the epileptogenesis switch. *Nature medicine*, 18(11):1626–7, Nov. 2012.
- [142] C. Wallengren, S. Li, M. J. Morris, B. Jupp, and T. J. O’Brien. Aggravation of Absence Seizures by Carbamazepine in a Genetic Rat Model Does Not Induce Neuronal c-Fos Activation. *Clinical Neuropharmacology*, 28(2):60–65, 2005.
- [143] D. D. Wang and A. R. Kriegstein. Defining the role of GABA in cortical development. *The Journal of physiology*, 587(Pt 9):1873–9, May 2009.
- [144] H. Watanabe, E. Nagata, A. Kosakai, M. Nakamura, M. Yokoyama, K. Tanaka, and H. Sasai. Disruption of the Epilepsy KCNQ2 Gene Results in Neural Hyperexcitability. *Journal of Neurochemistry*, 75(1):28–33, July 2000.
- [145] Y. G. Weber, J. Geiger, K. Kämpchen, B. Landwehrmeyer, C. Sommer, and H. Lerche. Immunohistochemical analysis of KCNQ2 potassium channels in adult and developing mouse brain. *Brain research*, 1077(1):1–6, Mar. 2006.
- [146] S. Weckhuysen, S. Mandelstam, A. Suls, D. Audenaert, T. Deconinck, L. R. F. Claes, L. Deprez, K. Smets, D. Hristova, I. Yordanova, A. Jordanova, B. Ceulemans, A. Jansen, D. Hasaerts, F. Roelens, L. Lagae, S. Yendle, T. Stanley, S. E. Heron, J. C. Mulley, S. F. Berkovic, I. E. Scheffer, and P. de Jonghe. KCNQ2 encephalopathy: Emerging Phenotype of a Neonatal Epileptic Encephalopathy. *Annals of Neurology*, 71(1):15–25, Jan. 2012.
- [147] WHO. Epilepsy fact sheet No.999. *www.who.int*, fact sheet(999):1, 2012.
- [148] G. Wohlrab. Epilepsiebehandlung im Kindes- und Jugendalter : Kontinuität und Wandel Summary : Antiepileptic therapy in childhood and adolescence : stability and variability. *Epileptologie*, 20(1):25–30, 2003.
- [149] R. Wong, R. Traub, and R. Miles. Cellular basis of neuronal synchrony in epilepsy. *Advances in Neurology*, 44:583–592, 1986.

- [150] N. H. Woo and B. Lu. Regulation of Cortical Interneurons by Neurotrophins: From Development to Cognitive Disorders. *The Neuroscientist*, 12(1):43–56, 2006.
- [151] T. V. Wuttke, G. Seebohm, S. Bail, S. Maljevic, and H. Lerche. The New Anticonvulsant Retigabine Favors Voltage-Dependent Opening of the Kv7.2 (KCNQ2) Channel by Binding to Its Activation Gate. *Molecular Pharmacology*, 67(4):1009–1017, 2005.
- [152] Y. Yang. Spontaneous deletion of epilepsy gene orthologs in a mutant mouse with a low electroconvulsive threshold. *Human Molecular Genetics*, 12(9):975–984, May 2003.
- [153] C. Yue, S. Remy, H. Su, H. Beck, and Y. Yaari. Proximal persistent Na⁺ channels drive spike afterdepolarizations and associated bursting in adult CA1 pyramidal cells. *The Journal of Neuroscience*, 25(42):9707–20, 2005.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktur einer $K_V7.2$ - Kanaluntereinheit mit der Mutation $KCNQ2^{V182M}$	13
4.1	Phänotyp der $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäuse	41
4.2	Neonataler Krampfanfall einer adulten $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Maus	42
4.3	$K_V7.2/7.3$ vermittelte Ströme in <i>Xenopus laevis</i> -Oocyten wurden durch die Mutation $KCNQ2^{V182M}$ verändert	44
4.4	CA1-Neuronen von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen wiesen eine verringerte M-Strom-Amplitude auf	46
4.5	CA1-Neuronen von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen waren übererregbar	47
4.6	Die Gehirne von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen zeigten keine morphologischen Veränderungen	48
4.7	Die Gehirne von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen wiesen keine inflammatorischen Veränderungen auf	49
4.8	Expression der $KCNQ2$ -Allele in heterozygoten $KCNQ2^{Nmf134/-}$, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen	50
4.9	Erkundungsverhalten und Muskelkraft von $KCNQ2^{V182M/+}$ -Mäusen wiesen Veränderungen auf	51
4.10	Das räumliche Kurz- und Langzeitgedächtnis von $KCNQ2^{V182M/+}$ -Mäusen zeigte keine Beeinträchtigungen	52
4.11	Das Langzeitgedächtnis für emotionale Reize von $KCNQ2^{V182M/+}$ -Mäusen zeigte Veränderungen	53
4.12	Phänotyp der CD1- $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäuse	55
4.13	Aktivität, Erkundungsverhalten und Arbeitsgedächtnis von mutierten CD1- $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäusen wiesen Veränderungen auf	56
4.14	Für die Mutation $KCNQ2^{V182M}$ homozygote Mäuse zeigen eine erhöhte hippocampale Netzwerkaktivität	58
4.15	Für die Mutation $KCNQ2^{V182M}$ homozygote Mäuse zeigen keine signifikant veränderte cortikale Netzwerkaktivität	59
4.16	Die Aktivierung von $K_V7.2/7.3$ -vermittelten Strömen in <i>Xenopus laevis</i> -Oocyten wurde durch die Zugabe von Retigabin verschoben	60
4.17	Die M-Strom-Aktivierung in CA1-Neuronen von Mäusen der Linie $KCNQ2^{Nmf134}$ wurde durch die Zugabe von Retigabin verschoben	62
4.18	Retigabin reduzierte die Erregbarkeit von CA1-Neuronen in Hirnschnitten von $KCNQ2^{Nmf134}$ -Mäusen	63

4.19	Nachkommen von heterozygoten Verpaarungen in der Linie $KCNQ2^{Nmf134}$ wiesen bereits einen Tag nach der Geburt einen genotypabhängigen Gewichtsunterschied auf	65
4.20	Die postnatale Behandlung mit Retigabin oder Bumetanid beeinflusste die Sterblichkeit von Jungtieren der Linie $KCNQ2^{Nmf134}$	66
4.21	Die postnatale Behandlung mit Retigabin wirkte sich positiv auf die Gewichtsentwicklung in der Postnatalphase von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren aus	68
4.22	Die postnatale Behandlung mit Retigabin wirkte sich nicht auf die Langzeitgewichtsentwicklung von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Männchen aus	69
4.23	Die postnatale Behandlung mit Retigabin wirkte sich nicht auf die Langzeitgewichtsentwicklung von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Weibchen aus	70
4.24	Die pränatale Behandlung von Nachkommen heterozygoter Verpaarungen in der Linie $KCNQ2^{Nmf134}$ hatte keinen positiven Effekt auf Genotypverteilung und Körpergewicht	72
4.25	Die prä- und postnatale Behandlung mit Retigabin oder Bumetanid beeinflusste die Sterblichkeit von Jungtieren der Linie $KCNQ2^{Nmf134}$	73
4.26	Die prä- und postnatale Behandlung mit Retigabin wirkte sich positiv auf die Gewichtsentwicklung von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Tieren aus	74
4.27	Die postnatale Behandlung mit Bumetanid wirkte sich positiv auf die Anzahl beobachteter Krampfanfälle von $KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäusen in der Neonatalperiode aus	76
4.28	$KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse zeigten eine erhöhte Aktivität, die durch die postnatale Behandlung mit Bumetanid verhindert wurde	77
4.29	$KCNQ2^{V182M/V182M}$ -Mäuse zeigten ein gestörtes Arbeitsgedächtnis, das durch die postnatale Behandlung mit Retigabin oder Bumetanid nicht beeinflusst wurde	78

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACSF	<i>Artificial Cerebrospinal Fluid</i>
ad Inj.	für Injektionszwecke
AHP	<i>After Hyperpolarization Potential</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BFNC	<i>Benign Familial Neonatal Convulsions</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
C-Terminus	Carboxyterminus
CA1	Cornu Ammonis 1
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion
CSD	<i>Current Source Density</i>
DAB	Diaminobenzidine
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECoG	Elektrocorticogramm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)- tetraessigsäure
GABA	Gamma-aminobuttersäure
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
ILEA	International League Against Epilepsy
K _v 7	Spannungsabhängiger Kaliumkanal der Familie 7
<i>KCNQ</i>	KV7 kodierendes Gen
LFP	Lokales Feldpotential
M	Methionin
mAHP	<i>medium After Hyperpolarization Potential</i>
NPY	Neuropeptid Y
N-Terminus	Aminoterminus
NKCC1	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 1
Nmf	<i>Neuroscience Mutagenesis facility</i>
p.a.	pro analysi
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerease chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd

PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
POMC	Proopiomelanocortin
Px	Postnataler Tag x
RNA	Ribonukleinsäure
RTG	Retigabin
SAT	<i>Slow Activity Transients</i>
SCN2A	Alpha Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals vom Typ II
SPW	<i>Sharp Waves</i>
SRO	<i>Stratum Radiatum Oscillations</i>
SV2A	Synaptisches Vesikelprotein 2A
TLE	Temporallappenepilepsie
TTX	Tetrodotoxin
V	Valin
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XE991	Selektiver K _v 7 Blocker

Einheiten

%	Prozent
C	Grad Celsius
A	Ampere
d	Tag
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
l	Liter
lux	Lux
m	Meter
min	Minute
mol	Mol
Ω	Ohm
s	Sekunde
V	Volt

Präfixe

p	pico (10 ⁻¹²)
n	nano (10 ⁻⁹)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
c	centi (10 ⁻²)
k	kilo (10 ³)
M	mega (10 ⁶)
G	giga (10 ⁹)

Summary

The ionchannel subunits $K_V7.2$ and $K_V7.3$ form heteromeric voltage-gated potassium channels that mediate the so-called neuronal M current, which is a repolarizing current already active in the subthreshold membrane potential range. A disruption of normal M channel function due to mutations in the respective genes *KCNQ2* and *KCNQ3* is associated with neonatal epilepsies in humans.

In the present study the *KCNQ2^{Nmf134}* mouse model, in which a chemically induced missense mutation in *KCNQ2* causes the replacement of valine 182 by methionine, was investigated. Homozygous *KCNQ2^{V182M/V182M}* mice exhibited spontaneous seizures, resulting in a significant increase in lethality. Furthermore, the homozygous mutant mice displayed reduced body weight and size.

The biophysical properties of heteromeric wildtype and mutant $K_V7.2/K_V7.3$ channels heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes were characterized using two-electrode voltage clamp recordings. These measurements revealed a shift of voltage-dependent channel activation towards more positive membrane potentials for channels containing $K_V7.2^{V182M}$ subunits resulting in a decrease in relative current amplitudes.

In line with these results, voltage clamp experiments with hippocampal CA1 neurons from *KCNQ2^{V182M/V182M}* mice revealed a comparable shift in the open probability of hippocampal M channels. As a consequence, cellular excitability in $K_V7.2^{V182M}$ subunit-expressing mice was increased. The hyperexcitability at the cellular level was associated with increased hippocampal activity at the network level, as shown by acute *in vivo* depth recordings from neonatal *KCNQ2^{V182M/V182M}* mice. Behavioural testing of adult *KCNQ2^{V182M/+}*- and *KCNQ2^{V182M/V182M}* animals revealed increased levels of locomotor activity and an impairment of hippocampus-dependent working memory.

Postnatal treatment of homozygous *KCNQ2^{V182M/V182M}* animals with the M channel opener retigabine positively influenced survival rates and body weight development. Treatment with the NKCC1 blocker bumetanide had a similar effect on the survival rate of animals. In addition, there was a trend towards a decrease in the number of observed spontaneous neonatal seizures. While body weight development was not improved in bumetanide-treated mutants, the development of locomotor hyperactivity observed in adult *KCNQ2^{V182M/V182M}* animals was prevented.

The results of this study present the first comprehensive characterization of the *KCNQ2^{Nmf134}* mouse model at cellular, network and behavioural levels and provide further insights into the important role of K_V7/M channels in neonatal brain development as well as information on possible new treatment strategies for neonatal epilepsies.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Dirk Isbrandt sehr für die exzellente Betreuung, seinen fachlichen und persönlichen Rat, einen großen Vertrauensvorschuss und nicht zuletzt für die Möglichkeit, diese Arbeit anfertigen zu können.

Bei PD Dr. Sabine Hoffmeister-Ullerich bedanke ich mich für die Korrektur dieser Arbeit.

PD Dr. Axel Neu danke ich für die Einführung in die Geheimnisse der Elektrophysiologie und seine stets konstruktive Kritik.

Mein Dank gilt des Weiteren Dr. Fabio Morellini für die Unterstützung in verhaltensbiologischen und statistischen Fragen.

Bei PD Dr. Robert Bähring und Vera Junkereit möchte ich mich für die Bereitstellung der Oocyten für die elektrophysiologische Analyse, samt der benötigten Ausrüstung bedanken.

Dr. Walid Fazeli danke ich für die Durchführung der akuten Ableitungen in Neonaten.

Bei Stephan Marguet, PhD und Andrea Merseburg möchte ich mich für die Unterstützung bei der Datenanalyse und ihre Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen zur *in vivo*-Elektrophysiologie bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe der Experimentellen Neuropädiatrie möchte ich für eine tolle Zeit, viel Spaß, eine ertragreiche Zusammenarbeit und eine allgegenwärtige Unterstützung danken. Danke für die Bonbons, Anna!

Meiner Familie möchte ich für die andauernde Unterstützung danken, die immer dann am größten war, wenn sie benötigt wurde.

Mein besonderer Dank gilt Louisa, für ihren Beistand und ihr Verständnis in einer manchmal nicht ganz einfachen Zeit und dafür, dass es sie gibt.