

Aus dem
Hertie Institut für klinische Hirnforschung

**In vitro Effekte von Riluzol als potentielle Präzisionstherapie
für Patient:innen mit KCNA2 Varianten mit
biophysikalischem Funktionsverlust**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Over, Lorenz

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Lerche
2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Antkowiak

Tag der Disputation: 13.10.2025

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Einführende Worte	7
1.2	Elektrophysiologie	7
1.2.1	Ionen, Membranpotentiale und Aktionspotentiale	7
1.2.2	Ionenkanäle	9
1.2.3	Whole-cell patch-clamp Technik	14
1.2.4	Mikroelektrodenarray Technik	15
1.3	Medikamente und Toxine	17
1.3.1	Riluzol	17
1.3.2	BmK86-P1	19
1.4	Epilepsie	20
1.4.1	Allgemeines	20
1.4.2	Kanalopathie-bedingte Epilepsien	21
1.5	Wissenschaftliche Fragestellungen	22
2	Materialien und Methoden	24
2.1	Molekulare und zellbiologische Methoden	24
2.1.1	Zellkulturen	24
2.1.2	Gentransfer	25
2.2	Elektrophysiologie	25
2.2.1	Whole-cell patch-clamp Experimente	25
2.2.2	Mikroelektrodenarray Experimente	33
2.2.3	Methodische Grundlagen für die Auswertung der Rohdaten	33
2.2.4	Methodische Grundlagen für die statistische Auswertung der Ergebnisse	35
3	Ergebnisse	38
3.1	Ionenströme in CHO-Zellen, whole-cell patch-clamp Messungen	38
3.1.1	Stromdichte des Kaliumstroms in CHO-Zellen	39
3.1.2	Inaktivierungs-Zeitkonstante τ des Kaliumstroms in CHO-Zellen	42
3.2	Ionenströme in Neuronen, whole-cell patch-clamp Messungen	45
3.2.1	Stromdichte des Gesamtkaliumstroms in Neuronen	45
3.2.2	Stromdichte des Gesamtnatriumstroms in Neuronen	47
3.3	Neuronale Eigenschaften, whole-cell patch-clamp Messungen	49
3.3.1	Eingangswiderstand	50

3.3.2	Ruhepotential	51
3.3.3	Anzahl der Aktionspotentiale	53
3.3.4	Aktionspotential-Schwelle	58
3.4	Netzwerk-Effekte, Mikroelektrodenarray Messungen	61
3.4.1	Anzahl der Spikes	61
3.4.2	Anzahl der Bursts pro Minute	63
3.4.3	Burstdauer	65
3.4.4	Anzahl der Spikes pro Burst	66
3.4.5	Burst Spike-Frequenz	69
3.4.6	Anzahl der Netzwerk-Bursts	69
3.4.7	Netzwerk-Burst-Dauer	72
3.4.8	Anzahl der Spikes pro Netzwerk-Burst	73
3.4.9	Netzwerk-Burst Spike-Frequenz	75
3.5	Experimente mit BmK86-P1, Ionenströme in CHO-Zellen, whole-cell patch-clamp Messungen	76
3.5.1	Amplitude des Kaliumstroms in CHO-Zellen	76
4	Diskussion	79
5	Zusammenfassung	92
5.1	Zusammenfassung (deutsch)	92
5.2	Abstract (english)	93
6	Literatur	94
7	Erklärung zum Eigenanteil	100
8	Danksagung	101

Abbildungsverzeichnis

1	Übersicht der Visualisierungen der Stimuli der verwendeten Protokolle.	30
2	Exemplarische Rohdaten der Messungen des Kaliumstroms, in CHO-Zellen.	39
3	Kaliumstromdichte (bei +30 mV) in CHO-Zellen.	41
4	Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ des Kaliumstroms (bei +70 mV) in ms in CHO-Zellen.	43
5	Kaliumstromdichte (bei +30 mV) und Natriumstromdichte (bei -20 mV) in pA/pF in Neuronen.	46
6	Exemplarische Rohdaten der Messungen des Gesamtnatriumstroms, P405L (LOF, <i>KCNA2</i>), in Neuronen.	48
7	Eingangswiderstände in $M\Omega$ in Neuronen.	50
8	Ruhemembranpotential in mV in Neuronen.	52
9	Exemplarische Rohdaten der Messungen der Anzahl der Aktionspotentiale in Neuronen.	54
10	Kontrollmessungen der Anzahl der Aktionspotentiale nach Strominjektion in Neuronen.	55
11	Anzahl der Aktionspotentiale nach Applikation von Riluzol, in Neuronen.	56
12	Exemplarische Rohdaten der Messungen der Aktionspotential-Schwelle, P405L (LOF, <i>KCNA2</i>), in Neuronen.	59
13	Aktionspotential-Schwelle in nA in Neuronen.	60
14	Spikeanzahl innerhalb von 10 Minuten.	62
15	Burstanzahl pro Minuten.	64
16	Burstdauern in s.	66
17	Spikeanzahl pro Burst.	67
18	Spike-Frequenzen innerhalb der Bursts in Hz.	69
19	Anzahl der Netzwerk-Bursts innerhalb von 10 Minuten.	70
20	Netzwerk-Burst-Dauern in s.	72
21	Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst.	73
22	Spike-Frequenzen innerhalb der Netzwerk-Bursts in Hz.	75
23	Exemplarische Rohdaten der Messungen der Kaliumströme bei den Ex- perimenten mit BmK86-P1, <i>KCNA2</i> WT, in CHO-Zellen.	76
24	Amplituden des Kaliumstroms (bei +30 mV), Experimente mit BmK86- P1, in CHO-Zellen.	77

Abkürzungsverzeichnis

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AP	Aktionspotential
ASM	Anfallssuppressives Medikament
CHO	Chinese Hamster Ovary
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRE	drug-resistant epilepsy
EEG	Elektroenzephalografie
EGTA	Ethylene glycol tetra-acetic acid
EMA	European Medicines Agency
EZ-L	Extrazellulär-Lösung
FKS	Fetales Kälberserum
GOF	Gain-of-Function
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Säure
INaP	Persistierender Natriumstrom
LFP	Lokale Feldpotentiale
LOF	Loss-of-Function
MEA	Mikroelektrodenarrays
NB	Netzwerk-Burst
PDL	Poly-D-Lysin
PEI	Polyethylenimine
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
P405L	P405L (LOF, <i>KCNA2</i>)
RLZ	Riluzol
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

1	Ionenverteilung zwischen intra- und extrazellulärem Milieu	8
2	Kontrollmessungen der Stromdichte des Kaliumstroms in pA/pF, +30 mV, in CHO-Zellen.	40
3	Normierte Stromdichte des Kaliumstroms, +30 mV, in CHO-Zellen, 2, 5 und 10 μ M Riluzol.	42
4	Kontrollmessungen der Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ des Kaliumstroms in ms, +70 mV, in CHO-Zellen.	44
5	Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ des Kaliumstroms in ms, +70 mV, CHO-Zellen, 2, 5 und 10 μ M Riluzol.	44
6	Kontrollmessungen der Stromdichte des Gesamtkaliumstroms in pA/pF, +30 mV, in Neuronen.	45
7	Normierte Stromdichte des Gesamtkaliumstroms, +30 mV, Neuronen, 2 und 10 μ M Riluzol.	47
8	Kontrollmessungen der Stromdichte des Gesamtnatriumstroms in pA/pF, -20 mV, in Neuronen.	49
9	Normierte Stromdichte des Gesamtnatriumstroms, -20 mV, Neuronen, 2 und 10 μ M Riluzol.	49
10	Kontrollmessungen der Eingangswiderstände in $M\Omega$ in Neuronen.	51
11	Eingangswiderstände in $M\Omega$, Neuronen, 2 und 10 μ M Riluzol.	51
12	Kontrollmessungen der Ruhemembranpotentiale in mV in Neuronen.	53
13	Ruhemembranpotentiale in mV, Neuronen, 2 μ M Riluzol.	53
14	Kontrollmessungen der Anzahl der Aktionspotentiale nach Strominjektion in Neuronen.	57
15	Anzahl der Aktionspotentiale bei einer Strominjektion von 0,2 nA in Neuronen, 2 und 10 μ M Riluzol.	58
16	Kontrollmessungen der Aktionspotential-Schwelle in nA in Neuronen.	60
17	Aktionspotential-Schwelle in nA, Neuronen, 2 μ M Riluzol.	61
18	Kontrollmessungen der Anzahl der Spikes.	62
19	Anzahl der Spikes innerhalb von 10 Minuten, 0,2, 2 und 5 μ M Riluzol.	63
20	Kontrollmessungen der Burstanzahl pro Minute.	65
21	Burstanzahl pro Minute, 0,2, 2 und 5 μ M Riluzol.	65
22	Kontrollmessungen der Burstdauern in s.	66
23	Kontrollmessungen der Spikeanzahl pro Burst.	68
24	Spikeanzahl pro Burst, 0,2, 2 und 5 μ M Riluzol.	68
25	Kontrollmessungen der Spike-Frequenzen innerhalb der Bursts in Hz.	69

26	Kontrollmessungen der Anzahl der Netzwerk-Bursts innerhalb von 10 Minuten.	71
27	Anzahl der Netzwerk-Bursts innerhalb von 10 Minuten, 0,2, 2 und 5 μ M Riluzol.	71
28	Kontrollmessungen der Netzwerk-Burst-Dauern in s.	72
29	Kontrollmessungen der Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst.	74
30	Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst, 0,2, 2 und 5 μ M Riluzol.	74
31	Kontrollmessungen der Spike-Frequenzen innerhalb der Netzwerk-Bursts in Hz.	75
32	Normierte Amplituden des Kaliumstroms bei 30 mV, 3 μ M BmK86-P1.	78

1 Einleitung

1.1 Einführende Worte

„Mit der so genannten heiligen Krankheit verhält es sich folgendermaßen: Um nichts halte ich sie für göttlicher als die anderen Krankheiten oder für heiliger, sondern sie hat eine natürliche Ursache wie die übrigen Krankheiten, aus der sie entsteht.“ (übersetzt aus „Corpus Hippocraticum“, Hippokrates von Kos). Hippokrates hat mit dieser zum damaligen Zeitpunkt sehr fortschrittlichen Annahme eine wichtige Entwicklung in der Medizin angestoßen. Krankheiten haben Ursachen und Kenntnisse über diese und die zugrundeliegenden Pathophysiologien von Erkrankungen ermöglichen deren Therapie. Durch Fortschritte in der naturwissenschaftlichen und medizinischen Forschung ist es mittlerweile möglich auch für seltene genetisch bedingte Erkrankungen die genaue Ursache zu finden und beispielsweise die exakte Mutation und deren Auswirkungen zu erforschen, die zur Entstehung der Krankheit führen. Diese neuen Möglichkeiten führen dazu, dass präzisionsmedizinische Therapieansätze entwickelt werden können.

Dies könnte auch im Falle einer seltenen Form der Epilepsie zukünftig eine Rolle spielen, bei der die Epilepsie aufgrund eines Funktionsverlustes eines Kaliumkanals durch Varianten im *KCNA2*-Gen verursacht wird (Loss-of-Function (LOF) Mutationen des *KCNA2*-Gens). Eine epileptische Enzephalopathie aufgrund von *KCNA2*-Funktionsverlust-Varianten ist eine schwere Entwicklungsstörung, die einen großen Einfluss auf das Leben betroffener Patient:innen und deren Familien nimmt. Momentan gibt es noch keine kausale Therapie und die Entwicklung potentieller Therapieansätze ist durch die Seltenheit der Erkrankung, das relativ geringe öffentliche Interesse und die nicht ausreichenden in der Forschung eingesetzten Ressourcen limitiert. Du et al. (University of Queensland) haben durch eine in silico Studie die Hypothese aufgestellt, dass Inhibitoren des persistierenden Natriumstroms, wie z.B. Riluzol, bei Verlustvarianten des D-Typ-Kaliumstroms (z.B. *KCNA2*-LOF Mutationen) einen potentiellen Therapieansatz darstellen könnten (Du, Vegh & Reutens, 2020), was in meinem Promotionsprojekt zu prüfen ist. Neue Erkenntnisse über die in vitro Effekte von Riluzol als potentielle Präzisionstherapie für Patient:innen mit *KCNA2* LOF Varianten, könnten im Folgenden zu einer klinischen Translation führen und betroffenen Patient:innen konkret helfen.

1.2 Elektrophysiologie

1.2.1 Ionen, Membranpotentiale und Aktionspotentiale

Im menschlichen Körper spielen verschiedene Ionen eine entscheidende Rolle, da sie essenzielle Funktionen wahrnehmen und für die Elektrophysiologie von großer Bedeutung sind. Die Konzentrationsunterschiede der Ionen zwischen dem Inneren und dem Äußeren

ren der Zelle sowie ihre Permeabilität durch die Zellmembran sind entscheidend für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials und die Entstehung von Aktionspotentialen. Intra- und extrazelluläre Konzentrationen der verschiedenen Ionen sind von immenser Bedeutung für die elektrophysiologische Prozesse im menschlichen Körper (Brandes, Lang & Schmidt, 2019). Im Folgenden findet sich eine Übersicht mit den intra- und extrazellulären Konzentrationen der wichtigsten Ionen (Tabelle 1).

	intrazellulär [mM]	extrazellulär [mM]
Na ⁺	10 - 15	130 - 150
K ⁺	140 - 155	3,5 - 4,5
Ca ²⁺	etwa $0,5 \times 10^{-7}$	1 (frei) - 2,5 (gesamt)
Mg ²⁺	1 (frei) - 9 (gesamt)	0,7 (frei) - 0,9 (gesamt)
Cl ⁻	4 - 20	100 - 130
HCO ₃ ⁻	5 - 15	20 - 30
makromolekulare Anionen	130 - 155	4 - 10

Tabelle 1: Ionenverteilung zwischen intra- und extrazellulärem Milieu (Behrends et al., 2017).

Mit Hilfe der Nernst-Gleichung kann das Gleichgewichtspotential für jede Art von Ion berechnet werden. Bei diesem Nernstpotential sind der Ionengradient und die Membranspannung im Gleichgewicht. Das Ruhemembranpotential einer Zelle ergibt sich aus der Summe der Gleichgewichtspotentiale der einzelnen Ionen. Bei Neuronen liegt es bei etwa -70 mV, während es bei Skelett- und Herzmuskelzellen etwa -80 bis -90 mV beträgt. Für das Ruhemembranpotential sind vor allem zwei Elemente verantwortlich. Einerseits die Natrium-Kalium-Pumpen und andererseits verschiedene Ionenkanäle. Das Ruhemembranpotential der meisten Zellen im menschlichen Körper wird dabei überwiegend durch die Kaliumleitfähigkeit bestimmt, die in Ruhe relativ zu anderen Ionenleitfähigkeiten hoch ist, weshalb sich das Ruhemembranpotential in der Nähe des Kaliumgleichgewichtspotentials befindet. Da die Gleichgewichtspotentiale der Ionensorten vom gesamten Ruhemembranpotential abweichen, kommt es zu Ionenbewegungen, falls diese durch z.B. geöffnete Kanäle zugelassen werden. Diese Ionenverschiebungen und damit Ladungsverschiebungen können, wenn sie ausgelöst durch einen eintreffenden Reiz eine gewisse Schwelle erreichen, zur plötzlichen Öffnung weiterer spannungsgesteuerter Kanäle führen und auf diesem Weg ein Aktionspotential auslösen. Bei diesem kommt es zum massiven Einstrom von Kationen in die Zelle herein, was in einer kurzzeitigen Änderung des Membranpotentials resultiert. Aktionspotentiale dienen der Reizweiterleitung entlang von Axonen, um anschließend an Synapsen den Reiz auf andere erregbare Zellen zu übertragen (Brandes et al., 2019). Im Folgenden soll die Entstehung und der Ablauf eines Aktionspotentials vereinfacht dargestellt werden (I bis V), weshalb v.a. auf

die sehr entscheidenden Ionen Natrium und Kalium eingegangen wird. Das Durchlaufen eines Aktionspotentials kann man in fünf Phasen einteilen. Zu Beginn (I) kommt es durch einen ankommenden Reiz zur Anhebung des Membranpotentials. Wenn dieses ein gewisses Schwellenpotential (ca. -50 mV) erreicht, wird ein Aktionspotential ausgelöst. Dabei gilt das Alles-oder-nichts-Prinzip. Ankommende Reize müssen zum Erreichen des Schwellenpotentials führen. Unterschwellige Reize führen lediglich zu einer vorübergehenden Änderung des Membranpotentials mit anschließender Rückkehr zum Ruhemembranpotential. Bei einem Übertreten des Schwellenpotentials (II) kommt es zur Öffnung spannungsgesteuerter Natriumkanäle, die zum massiven und schnellen Einstrom von Natrium-Ionen in die Zelle führt. Dies resultiert in der Depolarisation mit einem Membranpotential von ca. $+30$ mV. Noch bevor dieses Maximum erreicht wird, beginnen sich die Natriumkanäle zu schließen und spannungsgesteuerte Kaliumkanäle öffnen sich (III). Ausstrom von Kalium-Ionen aus der Zelle heraus führt zur Repolarisation in Richtung des Ruhemembranpotentials. Durch das Absinken des Membranpotentials schließen sich die Kaliumkanäle und die Natriumkanäle öffnen sich wieder. Das Schließen der Kaliumkanäle geschieht jedoch langsamer als bei Natriumkanälen, weshalb das Membranpotential für eine kurze Zeit unter das eigentliche Ruhemembranpotential fällt und es somit zur Hyperpolarisation kommt (IV). Nach jedem Aktionspotential durchläuft das Axon eine gewisse Refraktärzeit (V), die durch die Zeitspanne der Wiederaktivierung von spannungsgesteuerten Natriumkanälen definiert ist. In dieser Zeit ist die Zelle zunächst gar nicht erregbar (absolute Refraktärzeit) und mit zunehmender Anzahl wieder aktivierbarer Natriumkanäle erneut erregbar, jedoch mit einem erhöhten Schwellenpotential (relative Refraktärzeit) (Brandes et al., 2019). Verschiedene Parameter wie das Schwellenpotential, die Aktionspotentialamplitude, Aktivierungs- und Inaktivierungszeiten sowie Regenerationszeiten sind entscheidend für die Erregbarkeit neuronaler Prozesse und können zur Entstehung von Epilepsien beitragen. Aktionspotentiale haben je nach Zelltyp unterschiedliche Auswirkungen und können beispielsweise zu verstärkter Freisetzung von Neurotransmittern oder gesteigerter motorischer Aktivität führen (Brandes et al., 2019; Abdul Kadir, Stacey & Barrett-Jolley, 2018).

1.2.2 Ionenkanäle

Im menschlichen Körper finden sich eine Vielzahl verschiedener Ionenkanäle. Sie unterscheiden sich dabei unter anderem in Selektivität bzw. Spezifität für entsprechende Ionen und in der Leitfähigkeit (Brandes et al., 2019; Vacher, Mohapatra & Trimmer, 2008). Strukturell gesehen sind Ionenkanäle röhrenförmige Proteinkomplexe mit einer zentralen Pore, die als Transmembranproteine intra- und extrazellulären Raum verbinden. Einteilen kann man die Ionenkanäle anhand ihrer Ionenspezifität (durch Porengröße und Ladung definiert) und ihres Öffnungsmechanismus. Im Folgenden besonders relevant

sind die spannungsgesteuerten Ionenkanäle, die in Abhängigkeit vom Membranpotential geöffnet werden. Des Weiteren gibt es chemisch gesteuerte Ionenkanäle (Öffnung durch Bindung eines spezifischen Liganden), mechanisch gesteuerte Ionenkanäle (Öffnung in Abhängigkeit der mechanischen Spannung an der Zelloberfläche), thermisch gesteuerte Ionenkanäle (Öffnung in Abhängigkeit von der Temperatur) und weitere Arten von Ionenkanälen. Wenige Ionenkanäle sind unselektiv und erlauben den Durchtritt vieler verschiedener Ionensorten. Die meisten Ionenkanäle sind spezifisch für einzelne Ionensorten (Brandes et al., 2019; Vacher et al., 2008).

Spannungsgesteuerte Kationenkanäle Spannungsgesteuerte Kationenkanäle öffnen in Abhängigkeit vom Membranpotential und erlauben den Durchtritt von Kationen, also positiv geladenen Ionen. Sie sind besonders relevant für die Entstehung und den Ablauf von Aktionspotentialen. Spannungsgesteuerte Natrium-, Kalium- und Calciumkanäle haben dabei einen zumindest schematisch ähnlichen Aufbau. Diese Kanäle bestehen aus vier Domänen, die je eine α -Untereinheit bilden. Jede Domäne besteht aus sechs hydrophoben Transmembransegmenten (S1-S6) sowie intrazellulärem N- und C-Terminus. Die S4-Segmente tragen dabei jeweils positive Ladungen und dienen als Spannungssensoren, da sie durch die Änderung des Membranpotentials verschoben werden und somit die Öffnung der Pore ermöglichen. Diese Konformationsänderung wird durch den S4-S5-Linker auf die Segmente S5 und S6 übertragen, welche gemeinsam die Pore mit dem Selektivitätsfilter und dem Kanaltor bilden (Brandes et al., 2019; Vacher et al., 2008). Neben den α -Untereinheiten finden sich häufig akzessorische β -Untereinheiten, die modulierenden Einfluss auf die Kanalfunktion nehmen können.

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle Spannungsgesteuerte Natriumkanäle sind besonders wichtig für die Initiierung und die depolarisierende Phase von Aktionspotentialen. Anders als spannungsgesteuerte Kaliumkanäle sind spannungsgesteuerte Natriumkanäle eigenständig codierte Proteine. Dieses Protein codiert entsprechend für vier Untereinheiten, die jeweils sechs Transmembransegmente enthalten (Vacher et al., 2008). Im Gegensatz zu spannungsgesteuerten Natriumkanälen sind spannungsgesteuerte Kaliumkanäle nämlich Tetramere aus vier eigenständig codierten Untereinheiten, die jeweils sechs Transmembransegmente enthalten (Rudy et al., 2009). Zum momentanen Zeitpunkt sind neun verschiedene spannungsgesteuerte Natriumkanäle bekannt und werden als $\text{Na}_v1.1$ bis $\text{Na}_v1.9$ bezeichnet. Im Laufe neuronaler Prozesse durchlaufen spannungsgesteuerte Natriumkanäle drei Funktionszustände (aktiviert offen, inaktiviert geschlossen, aktivierbar geschlossen), welche die Refraktärzeit begründen. Die Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle wird durch eine spezifische Struktur vermittelt, die auf der zytoplasmatischen Schleife zwischen Domäne drei und vier der α -Untereinheit liegt. Diese Region enthält das sogenannte IFM-Motiv (Isoleucin-Phenylalanin-Methionin), das

wie ein Inaktivierungspartikel wirkt. Nach der Aktivierung des Kanals und der Öffnung der Pore führt eine Konformationsänderung dazu, dass dieser Partikel die Pore von der Innenseite blockiert (Goldin, 2003). Wie bei allen spannungsgesteuerten Kationenkanälen wird die Pore auch bei spannungsgesteuerten Natriumkanälen von den Segmenten S5 und S6 und der S5-S6-Porenschleife gebildet. Die Porendomäne beinhaltet dabei auch das Selektivitätsfiltermotiv aus den Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Lysin, Alanin (DEKA) (Dudev & Lim, 2014). Die Funktion dieses Motivs besteht in der hochselektiven Leitung von bis auf ein H_2O -Molekül dehydratisierten Na^+ -Ionen (Catterall, 2012; Roux, 2017). Der Großteil des Stroms durch spannungsgesteuerte Natriumkanäle ist transient. Jedoch gibt es auch einen Bruchteil spannungsgesteuerter Natriumströme, die persistieren und eine immense Bedeutung im Subschwellenbereich haben.

Persistierender und transientser Natriumstrom Der Großteil des Natriumstroms besteht aus einem transienten Einwärtsstrom, der nach Überschreiten eines gewissen Schwellenpotentials (alles-oder-nichts-Prinzip) die Zellmembran depolarisiert und im Laufe der Abfolge eines Aktionspotentials drei Funktionszustände durchläuft. So können spannungsgesteuerte Natriumkanäle aktivierbar geschlossen, offen und inaktiviert geschlossen vorliegen. Nach der schnellen Inaktivierung des transienten Natriumstroms persistiert jedoch ein kleiner Teil des Natriumstroms. Dieser persistierende Natriumstrom (INaP), der durch dieselben Kanalproteine wie der transiente Natriumstrom fließt, macht unter 1% der Spitzenamplitude des Einwärtsnatriumstroms aus (Crill, 1996). Trotz dieses geringen Anteils hat er allerdings starken Einfluss auf die Feuereigenschaften der Neurone (Ceballos, Roque & Leao, 2017; Kuo, Lee, Zhang & Heckman, 2006; van Drongelen et al., 2006). Dies liegt daran, dass dieser Strom im Subschwellenpotentialbereich aktiviert wird, insbesondere bei Membranpotentialen, die etwa 10 mV negativer sind als die für die Aktivierung des transienten Natriumstroms erforderlichen Potentiale. Dies tritt auf, wenn der Eingangswiderstand der Neuronen hoch ist (Crill, 1996). Somit kann der persistierende Natriumstrom leichte Erregungen bis zum Bereich des Schwellenpotentials verstärken und durch die Aktivierung transientser Natriumströme die Entstehung von Aktionspotentialen ermöglichen. Besonders interessant ist dabei die Rolle des persistierenden Natriumstroms an den Initialsegmenten von Axonen und kann dort somit vor allem wiederholtes Feuern erleichtern (Kuo et al., 2006; Shvartsman et al., 2021).

Bis heute ist der genaue Entstehungsmechanismus des persistierenden Natriumstroms nicht final geklärt. Es bestanden bzw. bestehen drei verbreitete Hypothesen (Crill, 1996): Die „Window-current-Hypothese“ besagt, dass der persistierende Natriumstrom durch eine geringfügige Überlappung der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik im Hodgkin-Huxley-Modell entsteht (Hodgkin & Huxley, 1952). Alternative Gating-Mechanismen derselben Kanäle können mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit den persistierenden Na-

triumstrom ermöglichen (Kiss, 2008). Transienter und persistierender Natriumstrom werden durch unterschiedliche Kanäle erzeugt (mittlerweile veraltete Hypothese). Allerdings findet sich der persistierende Natriumstrom in allen Isoformen der verschiedenen Kanäle und folgt nicht den mathematischen Vorhersagen der "Window-current-Hypothese". Somit ist die zweitgenannte Hypothese die zum jetzigen Zeitpunkt anerkannteste und wahrscheinlichste (Wengert & Patel, 2021). Alternative Gating-Mechanismen, die den persistierenden Strom ermöglichen, können durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Dazu gehören längere Öffnungszeiten, verringerte Inaktivierung und Veränderungen in der Spannungssteuerung von Aktivierung oder Inaktivierung (Kiss, 2008). Verschiedene akzessorische β -Untereinheiten können ebenfalls Einfluss auf die Entstehung des persistierenden Natriumstroms nehmen (Aman et al., 2009). In vielen pathologischen Prozessen ist der persistierende Natriumstrom involviert. Unter anderem im Bereich der Epilepsie spielt er eine Rolle und einige anfallssuppressive Medikamente (ASMs) wirken teilweise über die Hemmung des persistierenden Natriumstroms (Stafstrom, 2007; Wengert & Patel, 2021). So ist der persistierende Natriumstrom entscheidend an der Entstehung sogenannter Bursts beteiligt, die als wiederholte Abfolge bzw. summiertes Auftreten vieler Spikes eine erhöhte neuronale Erregung repräsentieren (van Drongelen et al., 2006).

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Bei den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen sind bisher die Familien K_{V1} - K_{V12} bekannt. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass spannungsgesteuerte Kaliumkanäle während der Depolarisation der Membran über einem gewissen Schwellenpotential öffnen (Aktivierung) und bei der Repolarisation der Zellmembran wieder schließen (Deaktivierung). Eine maßgebliche Funktion von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen in Neuronen ist die Repolarisation im Laufe des Aktionspotentials (Brandes et al., 2019; Rudy et al., 2009). Damit tragen sie dazu bei, dass sich das Membranpotential wieder in Richtung des Ruhemembranpotentials bewegt. Zusätzlich sind spannungsgesteuerte Kaliumkanäle auch an der Hyperpolarisation und der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen ermöglichen spannungsgesteuerte Kaliumkanäle im geöffneten Zustand einen Ausstrom von Kaliumionen aus der Zelle (Brandes et al., 2019; Rudy et al., 2009).

Im Gegensatz zu spannungsgesteuerten Natriumkanälen, sind spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Tetramere aus vier eigenständig codierten Untereinheiten, die jeweils sechs Transmembransegmente enthalten (Rudy et al., 2009). Dabei finden sich Homo- und Heterotetramere, was die Bildung zahlreicher Isoformen ermöglicht und entsprechende Auswirkungen auf z.B. die Inaktivierungszeit der Kanäle hat. Allerdings können dabei nur Heterotetramere aus α -Untereinheiten innerhalb einer K_V -Familie (K_{V1} - K_{V12}) gebildet werden. Die Selektivität der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle für Kaliumionen

wird durch den Selektivitätsfilter sichergestellt. Dieser befindet sich im aufsteigenden Teil der Porenschleife, die zwischen dem S5- und S6-Segment liegt. Charakteristisch für den Selektivitätsfilter ist dabei die Aminosäurenabfolge Threonin-Valin-Glycin-Tyrosin-Glycin (TVGYG). Dabei stellt das Motiv GYG den engsten Teil der Pore dar und ermöglicht die Selektivität für Kaliumionen. Die Sauerstoffatome der Carbonylgruppen dieser Aminosäuren der vier Untereinheiten bilden vier Bindungsstellen für die Kaliumionen und ersetzen die Sauerstoffatome der Hydrathülle, die die Kaliumionen in Lösung umgibt, sodass die Kaliumionen diese Engstelle ohne Hydrathülle passieren können (Doyle et al., 1998). Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle zeigen dabei eine bis zu 1000-fach höhere Präferenz für Kaliumionen im Vergleich zu anderen Kationen (Kim & Nimigean, 2016).

K_V1-Familie Die K_V1-Familie gehört zu den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen, ist im Körper weit verbreitet und nimmt eine wichtige Rolle in verschiedensten Erregungsprozessen ein. Sie gehört dabei zur schnell-aktivierenden Subfamilie innerhalb der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle, da ihre Kanäle schneller und bei niedrigeren Potentialen aktivieren als die Kanäle vieler anderer K_V-Subfamilien. In der Regel bilden sie Heteromultimere aus verschiedenen K_V1-Untereinheiten, was Einfluss auf z.B. ihre Kinetik nehmen kann (in aller Regel ist mindestens eine K_V1.1- oder K_V1.2-Untereinheit enthalten). Je nach genauer Zusammensetzung können Kaliumkanäle der K_V1-Familie verzögerte Gleichrichterkanäle (D-Strom) oder schnelle A-Typ-Kanäle (A-Strom) bilden (Rudy et al., 2009). Zusätzlich gibt es akzessorische β -Untereinheiten, die mit den α -Untereinheiten über die T1-Domänen assoziieren können und Einfluss auf z.B. die Kinetik nehmen können (Rudy et al., 2009). Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Inaktivierungskinetik. A-Typ-Ströme mit N-Typ-Inaktivierung und D-Typ-Ströme mit C-Typ-Inaktivierung (Xiao et al., 2021). Die N-Typ-Inaktivierung wird durch die zytoplasmatische N-terminale Sequenz mancher K_V-Untereinheiten (z.B. K_V1.4) gewährleistet, welche als Peptid die Kanalpore verschließen kann (Kim & Nimigean, 2016). Die C-Typ-Inaktivierung beschreibt eine zeitabhängige Konformitätsänderung, die die äußere Öffnung der Pore verschließt (Poren-Kollaps) und durch Aminosäuren-Sequenzen der P-Domäne und S6 und durch extrazelluläre Ionen beeinflusst werden kann (Kurata & Fedida, 2006). Die C-Typ-Inaktivierung ist dabei in der Regel deutlich langsamer als die N-Typ-Inaktivierung. Die genauen Zeitkonstanten beider Inaktivierungsmechanismen hängen allerdings neben der genauen Kanalzusammensetzung auch von weiteren Faktoren, wie z.B. der extra- und intrazellulären Umgebung ab. Als verzögerte Gleichrichter (engl.: „delayed rectifier“) bezeichnet man also Kanäle, die ausschließlich die langsame C-Typ-Inaktivierung durchführen können (Rudy et al., 2009).

K_V1.1: K_V1.1-Untereinheiten werden durch das *KCNA1*-Gen codiert und sind schnell aktivierende verzögerte Gleichrichterkanäle in heterologen Expressionssystemen, die v.a.

zum D-Kaliumstrom beitragen (Rudy et al., 2009). Mutationen, die zu Funktionseinschränkungen der $K_V1.1$ -Untereinheiten führen (LOF Mutationen), können beispielsweise episodische Ataxien auslösen, bei welchen Patient:innen schon im Kleinkindalter Symptome in Form von episodischem Schwindel mit Stand- und Gangunsicherheit haben können (Robbins & Tempel, 2012).

$K_V1.2$: $K_V1.2$ -Untereinheiten werden durch das *KCNA2*-Gen codiert und sind schnell aktivierende verzögerte Gleichrichterkanäle in heterologen Expressionssystemen, die v.a. zum D-Kaliumstrom beitragen (Rudy et al., 2009). Im Vergleich zu anderen K_V1 -Subtypen besitzt $K_V1.2$ eine besonders langsame Kinetik (Rudy et al., 2009). Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, die $K_V1.2$ -Untereinheiten besitzen, sind weit verbreitet exprimiert im zentralen und peripheren Nervensystem (Trimmer, 2015). In besonders hoher Dichte finden sich $K_V1.2$ -Kanäle im distalen Axoninitialsegment (AIS) und in den juxtaparanodalen Regionen, die benachbart zu den Ranvierschen Schnürringen liegen (Trimmer, 2015). Im Bereich unterhalb des Schwellenpotentials macht der $K_V1.2$ -Strom einen großen Teil des Gesamtkaliumstroms aus und hat somit eine sehr relevante Rolle in der Regulierung der Feuerschwelle und des wiederholten Feuerns inne (Higgs & Spain, 2011). Außerdem wird bei $K_V1.2$ -Kanälen eine sogenannte Präpuls-Potenzierung beschrieben, die dazu führt, dass $K_V1.2$ -Kanäle durch vorhergehende Erregungen leichter aktiviert werden können und somit ihre Aktivität bei wiederholten Depolarisierungen gesteigert wird. Diese Eigenschaft, die spezifisch für die $K_V1.2$ -Untereinheit ist, bleibt auch bei Heteromeren, die nur einzelne $K_V1.2$ -Untereinheiten enthalten, erhalten (Baronas et al., 2015).

$K_V1.4$: $K_V1.4$ -Untereinheiten werden durch das *KCNA4*-Gen codiert und sind schnell aktivierende und schnell-inaktivierende Kaliumkanäle, die in heterologen Expressionssystemen exprimiert werden und durch ihre Kinetik v.a. zum A-Typ-Kaliumstrom beitragen (Rudy et al., 2009).

1.2.3 Whole-cell patch-clamp Technik

Die patch-clamp Technik hat ihre Ursprünge bereits im 20. Jahrhundert und hat bis heute eine sehr hohe Relevanz in der Elektrophysiologie. Die patch-clamp Technik ist eine hochpräzise elektrophysiologische Methode, um die elektrischen Aktivitäten von Zellen auf molekularer Ebene zu erforschen. Bereits in den 1940er Jahren entwickelten Kenneth Cole und George Marmont das Konzept der Spannungsklemme (Cole, 1949). Dieses Verfahren wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann weiterentwickelt (Neher & Sakmann, 1976), die für ihre Arbeit auf dem Gebiet der Zellphysiologie im Jahr 1991 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet wurden.

Das grundlegende Prinzip der Voltage-clamp Technik besteht darin, eine konstante Spannung über die Zellmembran aufrechtzuerhalten, die durch einen Rückkopplungskreislauf gesteuert wird (Molleman, 2003). Dabei wird der „Netto-Strom“ gemessen und anschlie-

ßend durch den patch-clamp Verstärker ausgeglichen, um die Spannung auf dem festgelegten Niveau zu halten. Elektroden werden verwendet, um die elektrischen Ereignisse auf Zellebene zu messen und sind mit dem patch-clamp Verstärker verbunden. Ein Verstärker dient als Strom-Spannung-Konverter, während der Rückkopplungsverstärker den „Netto-Strom“ ermittelt, indem er die festgelegte Spannung (Kommandospannung) mit der von der Pipettenelektrode gemessenen Spannung vergleicht und die Differenz als „Netto-Strom“ berechnet. Mit verschiedenen Protokollen, die das Haltepotential variieren und zeitlich steuern, können elektrophysiologische Eigenschaften von Ionenkanälen und Membranen untersucht werden. Neben der Voltage-clamp Technik gibt es auch die Current-clamp Technik, bei der die Reaktion der Kanäle auf festgelegte Ströme beobachtet wird, was es z.B. ermöglicht, Aktionspotentiale auszulösen und zu untersuchen (Molleman, 2003). Es lassen sich verschiedene Konfigurationen unterscheiden. Zunächst wird bei allen angestrebten Konfigurationen die „Cell-attached-Konfiguration“ erreicht, bei der die Pipette lediglich an die Zellmembran angesaugt ist, ohne die Zelle zu eröffnen (Molleman, 2003). Dabei geht die Pipette nach einfachem Aufsetzen durch einen anschließenden leichten Sog von einem niederohmigen Widerstand am Pipettenrand zu einem Gigaohm-Seal über. Nun sind vor allem Messungen von einzelnen Kanälen möglich, die sich im Bereich („Patch“) unterhalb der Pipettenöffnung befinden. Im hier vorliegenden Projekt wurden die patch-clamp Messungen in der „whole-cell-Konfiguration“ durchgeführt. Für diese muss die Zelle von der „Cell-attached-Konfiguration“ ausgehend im Bereich unterhalb der Pipettenöffnung eröffnet werden, was durch einen weiteren Sog oder einen Spannungsimpuls möglich ist (Molleman, 2003).

1.2.4 Mikroelektrodenarray Technik

Mikroelektrodenarrays (auch Multielektrodenarrays, MEAs) ermöglichen die Erfassung der Aktivität ganzer Neuronennetzwerke. Im Gegensatz zur patch-clamp Technik auf der Mikroebene, bei der nur die elektrophysiologischen Eigenschaften einer einzelnen Zelle gemessen werden, erlauben MEAs die Untersuchung von Neuronenpopulationen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Zellen bei MEAs nicht beschädigt bzw. zerstört werden, was wiederholte und längere Untersuchungen ermöglicht. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, verschiedene Neuronen gleichzeitig zu messen und zu stimulieren und dabei auch Signale aus der Entfernung zu erfassen (Obien, Deligkaris, Bullmann, Bakkum & Frey, 2015). Die MEA-Technologie erlaubt simultane, längerfristige und nicht-invasive Messungen von lokalen Feldpotentialen und extrazellulären Aktionspotentialen in Neuronenpopulationen auf Millisekunden-Ebene. Die gemessenen Werte hängen dabei vom Ausmaß der elektrophysiologischen Aktivität und Entfernung zwischen Aufnahmeelektrode und Quelle ab. Ein Nachteil ist, dass intrazelluläre Messungen nicht durchgeführt werden können und die Methode Subschwellepotentiale einzelner Zellen nicht erfassen

kann (Spira & Hai, 2013).

Strukturell bestehen MEAs aus einer Platte mit zahlreichen Elektroden, auf denen Gewebe oder Zellen kultiviert werden können. Die funktionelle Struktur von MEAs wird hauptsächlich von drei Komponenten bestimmt: den Zellen, dem Raum zwischen den Zellen und der Oberfläche des Substrats der MEAs, sowie den Elektroden und anderen Gerätekomponenten wie Verstärkern (Spira & Hai, 2013). Die Lücke zwischen Zelle und Substratoberfläche ist mit einer ionischen Lösung gefüllt. Durch die Lücke zwischen Zelle und Substratoberfläche wird ein Widerstand erzeugt, der auch als Seal-Widerstand bezeichnet wird und die gemessenen Potenziale beeinflusst. Sowohl die Elektroden als auch die Membran werden durch entsprechende Widerstände und Kapazitäten charakterisiert (Spira & Hai, 2013). Wie bereits erwähnt, ermöglicht die MEA-Technologie die Messung von Lokalen Feldpotentialen und extrazellulären Aktionspotentialen. Lokale Feldpotentiale (LFP) innerhalb von Neuronennetzwerken entstehen durch die summierte und synchrone elektrische Aktivität verschiedener einzelner Zellen. Es handelt sich dabei um extrazelluläre Signale, da sie durch kurzzeitige Ungleichgewichte der Ionenkonzentrationen im Extrazellulärraum entstehen, die auf der elektrischen Aktivität der verschiedenen Zellen beruhen. Durch die Konzentrationsunterschiede der Ionen entsteht automatisch ein Potential, welches ein lokales elektrisches Feld hervorruft. LFPs können lediglich durch Elektroden in ihrer Nähe, also lokal, aufgezeichnet werden. Extrazelluläre Aktionspotentiale werden meist nach Herausfiltern der LFPs analysiert und spiegeln die extrazellulären Effekte der Aktionspotentiale der Zellen des Netzwerks wider. Konkret bedeutet dies zunächst einen negativen Spike (Natriumeinstrom in die Zelle) und anschließend eine positive Auslenkung (Kaliumausstrom aus der Zelle) im Extrazellulärraum (Obien et al., 2015). Intrazelluläre Aktionspotentiale können nur durch andere Methoden, v.a. durch die patch-clamp Technik, gemessen werden (Obien et al., 2015). Im Bereich der extrazellulären Aktionspotentiale gibt es Unterscheidungen zwischen Einzelspikes und Burst-Aktivitäten. Bursts sind stark ausgeprägte Signale, die beispielsweise durch die synchrone Aktivität mehrerer Neuronen oder das schnelle Feuern einzelner Zellen entstehen. Intrinsische Eigenschaften der Neuronen sowie die allgemeine Netzwerkaktivität können zur Entstehung dieser intensiven extrazellulären Signale führen (Obien et al., 2015). Wenn mehrere Elektroden in einem Well gleichzeitig Burst-Aktivitäten erkennen, spricht man von einem Netzwerk-Burst. Einzelspikes hingegen sind einzelne, nicht besonders starke extrazelluläre Aktionspotentiale.

1.3 Medikamente und Toxine

1.3.1 Riluzol

Riluzol (chemisch 2-Amino-6-trifluoromethoxybenzothiazol oder RP54274, Handelsname Rilutek) ist ein Medikament, das zur Behandlung von Amyotropher Lateralsklerose (ALS) zugelassen ist und in Deutschland seit 1996 im Handel ist. Es weist eine Vielzahl von pharmakodynamischen Wirkungen auf, darunter anti-glutamaterge, neuroprotektive, antikonvulsive, anxiolytische und anästhetische Eigenschaften. Obwohl man bereits viel über die Wirkungen von Riluzol weiß, sind einige Wirkungen nach wie vor relativ unerforscht und die genauen Mechanismen sind häufig unklar. Bellingham (University of Queensland) hat 2011 eine umfangreiche Übersichtsarbeit über die bis dahin bekannten Wirkungen von Riluzol erstellt und dabei 705 wissenschaftliche Artikel inkludiert (Bellingham, 2011). Einige dieser übersichtlich dargestellten Erkenntnisse werden im weiteren Verlauf der vorliegenden Dissertation Berücksichtigung finden. Darüberhinaus hat Bellingham in einem weiteren Projekt durch eigene elektrophysiologische Messungen die Wirkungen von Riluzol weiter charakterisiert (Bellingham, 2013).

Die European Medicines Agency (EMA) empfiehlt eine Tagesdosis von 100 mg Riluzol für Erwachsene (aufgeteilt in 50 mg alle 12 Stunden). Aktuelle Erkenntnisse deuten darauf hin, dass höhere Dosen keine signifikanten Vorteile bringen. Diese klinisch relevante Dosierung führt zu Plasmaspiegeln von 1-2 μM und zu drei- bis viermal höheren Konzentrationen im Gehirngewebe (Bellingham, 2011). Dieser Unterschied zwischen der Serum- und Gehirnkonzentration ist hauptsächlich auf die ausgezeichnete Lipidlöslichkeit von Riluzol zurückzuführen, die es dem Medikament ermöglicht, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und im Gehirngewebe zurückgehalten zu werden. Soweit bekannt wird Riluzol sowohl von Menschen als auch von Tieren gut vertragen und es kommt nur selten zu schwerwiegenden Nebenwirkungen (Bellingham, 2011).

Es sind verschiedenste Effekte von Riluzol über einen sehr großen Konzentrationsbereich bekannt (von unter 1 μM bis zu über 1 mM). Im klinisch relevanten Bereich (siehe oben: 1-2 μM Plasmakonzentration, etwas höher im Gehirn) unterdrückt Riluzol beispielsweise den persistierenden Natriumstrom, das wiederholte Feuern und die Neurotransmitterausschüttung (v.a. Glutamat) und potenziert Calcium-abhängige Kaliumströme (z.B. Ströme durch KCa1.1 -Kanäle). Bei höheren Dosierungen sind außerdem eine Unterdrückung von schnellen Natriumströmen, spannungsgesteuerten Calciumströmen (z.B. HVA- und LVA-Calciumströme) und spannungsgesteuerten Kaliumströmen (z.B. „delayed rectifier“ Kaliumströme), sowie ein unterstützender Effekt auf das neuronale Überleben und Wachstumsfaktoren, die Modulation von Tandemporen-Kaliumkanäle (z.B. Aktivierung von TRAAK und Inhibition von THIK-1) und von Liganden-abhängigen Neurotransmitter-Rezeptoren und die Potenzierung von Glutamattransportern bekannt

(Bellingham, 2011). Dies sind aber selbstverständlich nicht alle bekannten Wirkungen des Medikaments, wobei noch weitere bisher unbekannt sein könnten. Eine der vermutlich wichtigsten Wirkungen von Riluzol ist die Unterdrückung des persistierenden Natriumstroms. Je nach Literatur finden sich relevante Reduktionen dieses Stroms bei ca. 1-2 μM Riluzol-Konzentration (Urbani & Belluzzi, 2000; Zona, Siniscalchi, Mercuri & Bernardi, 1998; Müller, Draguhn & Egorov, 2024). Urbani et al. haben in Experimenten demonstriert, dass eine Konzentration von 10 μM Riluzol den persistierenden Natriumstrom nahezu komplett unterdrücken kann und dabei in der Effektivität einer TTX-Konzentration von 0,3 μM gleicht (Urbani & Belluzzi, 2000). Da dieser Strom, wie oben bereits beschrieben, sehr wichtig im Subschwellenbereich ist und oftmals pathologischen Ausprägungen bei epileptischen Erkrankungen unterliegt, besteht die Hoffnung, dass Riluzol als anfallssuppressives Medikament Verwendung finden könnte. Generell findet sich durch Riluzol eine Reduktion der neuronalen Erregbarkeit. Die Unterdrückung repetitiven Feuerns bei relativ geringen Dosen wurde durch einige Arbeitsgruppen nachgewiesen (Urbani & Belluzzi, 2000). Außerdem sind eine Reduktion der Aktionspotential-Amplitude, eine Verlängerung der Aktionspotentials-Dauer und eine Erhöhung des Schwellenpotentials bekannt. Unverändert bleiben hingegen das Ruhemembranpotential und die generelle Fähigkeit einzelne Aktionspotentiale auszubilden (Bellingham, 2011). Bei durch Bellingham durchgeführten Experimenten kam es beispielsweise zu einer Abnahme der Anzahl der Aktionspotential um ca. 80% nach der Applikation von 20 μM Riluzol. Außerdem konnte Bellingham eine Erhöhung des minimalen Stroms, um ein Aktionspotential auszulösen, um ca. 38% durch 20 μM Riluzol nachweisen (Bellingham, 2013). Es konnten auch bereits Netzwerk-Effekte von Riluzol in MEA-Experimenten dargestellt werden. Van Drongelen et al. haben zeigen können, dass 20 μM Riluzol in ihren Experimenten die Netzwerk-Aktivität (Bursts pro Sekunde) mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung komplett aufheben kann (van Drongelen et al., 2006). Suresh et al. konnten diesen Effekt in ihren Experimenten mit einer Riluzol-Konzentration von 20 μM ebenfalls demonstrieren (Suresh et al., 2016). Die letzten genannten Wirkungen bzw. Effekte von Riluzol lassen sich alle der sogenannten use-dependent Blockade zuordnen: stärkerer hemmender Effekt von Riluzol auf Natriumkanäle, die vermehrt aktiv sind (wie z.B. bei repetitiven Aktionspotentialen). Für das hier vorliegende Projekt war ein von Xu et al. beschriebener Effekt Hypothesen-bildend. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass Riluzol bei relativ hohen Dosen (signifikante Erhöhung der Inaktivierungszeit von 28,9 +/- 3,9 ms auf 623 +/- 47,6 ms durch Riluzol-Konzentration von 100 μM) einen verlangsamenden Effekt auf die Inaktivierung von $K_{\text{V}}1.4$ -Kaliumkanälen hat, was dazu führen könnte, dass aus einem Kalium-A-Typ-Strom ein Kalium-D-Typ-Strom wird und somit der Verlust von $K_{\text{V}}1.2$ -Strömen kompensiert werden könnte (Xu, Enyeart & Enyeart, 2001). Im Bereich

der antikonvulsiven und anfallssuppressive Wirkungen spielen auch die antiglutamatergen Effekte von Riluzol eine große Rolle. Bekanntermaßen kommt es zu reduzierter Ausschüttung des exzitatorischen Transmitters Glutamat, geringeren Wirkungen von Riluzol auf ionotrope Glutamat-Rezeptoren (z.B. durch eine PKC-Inhibition) und eine beschleunigte Entfernung des Transmitters aus dem Extrazellulärraum durch eine erhöhte Aktivität und eine erhöhte Expression der Glutamattransporter (Dall'Igna, Bobermin, Souza & Quincozes-Santos, 2013; Fumagalli, Funicello, Rauen, Gobbi & Mennini, 2008; Noh, Hwang, Shin & Koh, 2000). Im klinisch relevanten Bereich spielt dabei die reduzierte Ausschüttung von Glutamat die wichtigste Rolle (Bellingham, 2011; Lazarevic, Yang, Ivanova, Fejtova & Svenningsson, 2018). Das mögliche therapeutische Potential von Riluzol bei *KCNA1*-assoziierten episodischen Ataxien wurde in der Literatur bereits angesprochen (Lauxmann et al., 2021).

1.3.2 BmK86-P1

Eine weitere theoretische Grundlage, die das Verständnis für die Struktur spannungsgesteuerter Kaliumkanäle und möglicher pharmakologischer Einflussfaktoren erhöhen soll, wird im Folgenden aufgeführt. Thermisch verarbeitete Skorpione (in diesem Fall *Buthus martensii*) finden seit jeher Verwendung in der Traditionellen Chinesischen Medizin und werden zur Behandlung verschiedener Krankheiten eingesetzt. Lange Zeit war wenig über die genauen Wirkungsmechanismen bekannt, die aber in vielen Fällen zu einer Linderung der Symptomatik führten. Mit der Zeit und durch den Fortschritt in der medizinischen und naturwissenschaftlichen Forschung konnten zunehmend für die Wirkungen verantwortliche Peptide, Toxine und Strukturen gefunden werden. 2021 konnte eine Arbeitsgruppe aus Wuhan, China, ein neues Peptid entdecken, das strukturell dem Peptid BmK86 (Mao et al., 2007) stark ähnelt und den Namen BmK86-P1 trägt (Qin et al., 2021). BmK86-P1 ist im Vergleich zu BmK86 N-terminal um 6 Aminosäuren verkürzt, welche zunächst als Signalpeptid für BmK86 verstanden wurden (Wang, Umetsu, Gao, Ohki & Zhu, 2015). Weitere Analysen konnten allerdings zeigen, dass dieser N-terminale Rest Einfluss auf die pharmakologischen Eigenschaften des Toxins nimmt (Qin et al., 2021). Anders als das N-terminale Ende ist das C-terminale Ende sehr konserviert und begründet gemeinsam mit der durch sechs konservierte Cysteine entstehende Struktur (Cystein-stabilisierte α -Helix und β -Faltblatt) des Peptids die Spezifität für die Bindung an spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Qin et al., 2021). Daraus geht hervor, dass neben BmK86-P1 noch viele weitere N-terminal modifizierte Toxine mit den gleichen oben genannten konservierten Strukturen pharmakologischen Einfluss auf spannungsgesteuerte Kaliumkanäle nehmen können, was eine zusätzliche Therapiehoffnung für K_V1 -Kanalbedingte Ataxien und Epilepsien bedeutet. Pharmakologisch betrachtet ist BmK86-P1 ein hochpotenter und selektiver Inhibitor des humanen $K_V1.2$ -Kanals mit einem IC_{50} von

28,5 ± 6,3 nM. Auf andere Untereinheiten spannungsgesteuerter Kaliumkanäle nimmt das Peptid nur deutlich geringeren Einfluss. Qin et al. haben in ihren Experimenten mit 1 µM BmK86-P1 eine Hemmung der K_V1.2-Ströme um ca. 90% und der K_V1.1-Ströme um ca. 5% zeigen können (Qin et al., 2021). Durch weitere Analysen konnte die Arbeitsgruppe aus Wuhan außerdem demonstrieren, dass die Porenregion des Kanals und dabei v.a. drei Aminosäuren (Gln³⁵⁷, Val³⁸¹ und Thr³⁸³) für die Bindungsstelle verantwortlich sind. Neben der Turret-Region der Pore ist dabei in erster Linie die Filter-Region die entscheidende Struktur (Qin et al., 2021). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass zwei Aminosäuren des Peptids (Lys¹⁹ und Ile²¹) die Schlüsselreste sind, die die Interaktion mit der Porenregion des Kaliumkanals erlauben (Qin et al., 2021). Durch Unterschiede in der Porenregion zwischen K_V1.1- und K_V1.2-Kanälen begründet sich auch die unterschiedlich starke Inhibition des Stroms durch das Toxin BmK86-P1.

1.4 Epilepsie

1.4.1 Allgemeines

Epilepsie ist ein Sammelbegriff für verschiedene Funktionsstörungen des Gehirns, die allesamt auf einem pathologischen Gleichgewicht zwischen Erregungsbildung und Erregungsbegrenzung in Neuronenverbänden des zentralen Nervensystems basieren (Vera-González, 2022). Ursache dafür können z.B. strukturelle, genetische oder metabolische Bedingungen bzw. Veränderungen sein (Vera-González, 2022). Dabei muss zwischen einem epileptischen Anfall (isoliertes Ereignis, ca. 10% Lebenszeitprävalenz) und einer manifesten Epilepsie unterschieden werden, die durch spontan wieder auftretende Anfälle definiert ist (ca. 1-2% Lebenszeitprävalenz) (Falco-Walter, 2020; Pack, 2019). Darüberhinaus kann bei einem typischen klinischen Bild und einem spezifischen EEG-Befund auch die Diagnose eines Epilepsiesyndroms gestellt werden (Pack, 2019). Außerdem kann zwischen fokalen und generalisierten Anfällen unterschieden werden, die in ihrem Ausbreitungsbereich innerhalb des Gehirns variieren (Pack, 2019). Weltweit sind circa 70 Millionen Menschen von einer epileptischen Erkrankung betroffen (Löscher, Potschka, Sisodiya & Vezzani, 2020).

Obwohl mittlerweile über 20 verschiedene anfallssuppressive Arzneimittel zur Verfügung stehen, sind circa 30% der Fälle refraktär gegenüber einer pharmakologischen Therapie, was bedeutet, dass Anfallsfreiheit weder durch einzelne noch durch miteinander kombinierte anfallssuppressive Medikamente hergestellt werden kann (Löscher et al., 2020). In diesen Fällen spricht man von therapierefraktären Epilepsien bzw. von drug-resistant epilepsies (DREs). Therapierefraktäre Epilepsien stellen eine große Herausforderung dar, da sie mit deutlich erhöhtem Risiko für vorzeitigen Tod, Verletzungen, psychosozialen Funktionsstörungen und einer verminderten Lebensqualität verbunden sind. Aus diesen

Gründen kommt der Entwicklung neuer Therapieoptionen für therapierefraktäre Formen der Epilepsie eine immense Bedeutung zu (Löscher et al., 2020). Epileptische Enzephalopathien, wie sie auch bei *KCNA2* LOF Mutationen auftreten, umfassen ein heterogenes Krankheitsspektrum, bei dem es zu Defiziten im Bereich der Kognition, Verhaltensproblemen, psychiatrischen Auffälligkeiten und epileptischen Anfällen kommt, weshalb diese Krankheitsbilder einen starken Einfluss auf das Leben betroffener Patient:innen nehmen (Scheffer & Liao, 2020).

1.4.2 Kanalopathie-bedingte Epilepsien

Viele verschiedene Formen der Epilepsie und der epileptischen Enzephalopathien werden durch Veränderungen von Ionenkanälen hervorgerufen (Oyler et al., 2018). Ionenkanäle tragen im physiologischen Bereich zur Erregungsentstehung, Erregungsausbreitung und Erregungsbegrenzung bei (Brandes et al., 2019). So können z.B. Mutationen in Genen, die für Ionenkanäle codieren, große Auswirkungen auf Erregungseigenschaften im ZNS nehmen. Im Bereich der Kanalopathie-bedingten epileptischen Erkrankungen besteht die Hoffnung, durch präzisionsmedizinische Ansätze auf Grundlage der Kenntnis der genauen Pathomechanismen, vielen Patient:innen helfen zu können.

***KCNA2*-Varianten** Es sind verschiedene Mutationen im *KCNA2*-Gen bekannt, die zur Entwicklung pathologischer Erscheinungsbilder führen können. Dabei gibt es solche mit Funktionsverlust (Loss-of-Function), Funktionsgewinn (Gain-of-Function) und einer Kombination aus Funktionsverlust und -gewinn (Masnada et al., 2017; Syrbe et al., 2015). Die Hauptunterschiede im Phänotyp dieser drei möglichen Funktionsveränderungen sind folgende (Masnada et al., 2017): Fokale (LOF) gegenüber generalisierten (Gain-of-Function (GOF)) Anfällen; deutlich schwerwiegendere Ausprägungen bei GOF, im Vergleich mildere Symptomatik bei LOF; sehr früh einsetzende Phänotypen bei Patienten mit kombinierter GOF + LOF. In den meisten entdeckten *KCNA2*-Mutationen sind hoch konservierte und funktionell wichtige Proteinregionen betroffen (z.B. N-Terminus, Spannungssensor, Porenregion) (Masnada et al., 2017). Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass bei jeder Art von Funktionsveränderung jeweils eine Mutation mit einem auffällig homogenen Phänotyp auftritt (LOF: P405L, GOF: R297Q, GOF + LOF: T374A). Zwei Drittel aller bisher gemeldeter Patient:innen mit *KCNA2*-Enzephalopathie besitzen eine dieser drei Mutationen (Masnada et al., 2017). Aufgrund dieser Tatsache habe ich in meinen Experimenten auch in allen Fällen die Loss-of-Function Variante P405L verwendet, die exemplarisch für Loss-of-Function Varianten von *KCNA2* steht. In der Dissertation verwende ich die folgenden Ausdrücke für die genannte Mutation: „P405L (LOF, *KCNA2*)“ bzw. „P405L“. Für von GOF-Mutationen des *KCNA2*-Gens betroffene Patient:innen konnte bereits eine präzisionsmedizinische Therapie gefunden werden.

Der relativ spezifische K_V1 -Kanalblocker 4-Aminopyridin führte *in vitro* und *in vivo* zu einer Antagonisierung der GOF-Effekte und damit zu einer Linderung der Symptomatik (Hedrich et al., 2021).

1.5 Wissenschaftliche Fragestellungen

Du et al. (University of Queensland) haben durch eine *in silico* Studie die Hypothese aufgestellt, dass Inhibitoren des persistierenden Natriumstroms, wie z.B. Riluzol, bei Loss-of-Function (LOF) Varianten des D-Typ-Kaliumstroms (z.B. *KCNA2*) einen potentiellen Therapieansatz für betroffene Patient:innen darstellen könnten (Du et al., 2020). Dabei konnten sie in ihrem *in silico* Modell zeigen, dass v.a. der Ansatz der Inhibierung des persistierenden Natriumstroms effektiv zu sein scheint, da eine Reduktion des persistierenden Natriumstroms um 25% die Anfallsschwelle auf normale Werte verändern konnte. Dies könnte laut Du et al. durch eine Konzentration von ca. 1 μM Riluzol gelingen, was innerhalb der klinisch verwendeten Konzentration von Riluzol liegen würde (siehe 1.3.1 „Riluzol“). Xu et al. konnten außerdem bereits zeigen, dass Riluzol bei relativ hohen Dosen einen verlangsamenden Effekt auf die Inaktivierung von $K_V1.4$ -Kaliumkanälen hat, was dazu führen könnte, dass aus einem Kalium-A-Typ-Strom ein Kalium-D-Typ-Strom wird und somit der Verlust von $K_V1.2$ -Strömen kompensiert werden könnte (Xu et al., 2001). Auch diese Eigenschaft von Riluzol wird von Du et al. unterstützend für den Einsatz von Riluzol im Rahmen von Loss-of-Function (LOF) Varianten des D-Typ-Kaliumstroms (z.B. bei *KCNA2* LOF Mutationen) genannt.

In der hier vorliegenden Doktorarbeit habe ich *in vitro* Effekte von Riluzol als potentielle Präzisionstherapie für Patienten mit *KCNA2* Loss-of-Function Varianten untersucht, um einen möglichen therapeutischen Ansatz für betroffene Patient:innen zu finden (from-bench-to bedside). Strukturell lassen sich die durchgeführten Experimente dabei drei verschiedenen Ebenen zuordnen: Ionenströme, neuronale Eigenschaften und Netzwerk-Effekte. Diesen drei verschiedenen Ebenen entspricht deshalb auch der Aufbau des Ergebnisteils. Dabei habe ich insgesamt drei Hauptfragestellungen verfolgt:

- Um eine mögliche direkte Wirkung von Riluzol auf *KCNA2* bzw. den Gesamtkaliumstrom in Neuronen zu untersuchen, wurden Experimente mit *KCNA2* WT und P405L (LOF, *KCNA2*) in CHO-Zellen und Neuronen durchgeführt.
- Der von Xu et al. nachgewiesene Effekt von Riluzol auf die Inaktivierungskinetiken des Kaliumstroms (siehe oben bzw. 1.3.1 „Riluzol“) könnte bereits für geringere Dosierungen von Riluzol gelten, weshalb die Inaktivierungskinetiken von *KCNA2* WT + *KCNA4* WT (Kotransfektion) und *KCNA4* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) (Kotransfektion) in CHO-Zellen gemessen wurden.
- Die aus der Literatur bekannte use-dependent Natrium-Kanal-Blockade und damit

auch Aktionspotential-Blockade (Urbani & Belluzzi, 2000; Bellingham, 2011) sollte unter der Bedingung einer vorhandenen *KCNA2*-LOF-Mutation und sowohl für Einzelzellen, als auch für Netzwerkeffekte untersucht werden.

Außerdem habe ich in einem Nebenexperiment mit dem Toxin BmK86-P1 dessen Wirkungen auf Ionenkanäle, bestehend aus $K_V1.1$ - und $K_V1.2$ -Untereinheiten (homo- und heterozygot) untersucht. Hierbei handelt es sich um einen hochpotenten und selektiven Inhibitor des humanen $K_V1.2$ -Kanals mit einem IC_{50} von $28,5 \pm 6,3$ nM (Qin et al., 2021). Von Interesse war dabei die Wirkung von BmK86-P1 auf die Kombination aus verschiedenen K_V1 -Subtypen (in meinen Experimenten $K_V1.2$ und $K_V1.1$), mit der Hypothese/Fragestellung, dass/ob die Selektivität auf $K_V1.2$ -Kanäle beschränkt bleibt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Molekulare und zellbiologische Methoden

2.1.1 Zellkulturen

CHO-Zellen Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen bezeichnet eine immortalisierte Zelllinie aus den Ovarien des chinesischen Zwerghamsters. Diese Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ in einem F-12-Medium (Gibco) kultiviert, das mit 10% fötalem Kälberserum (Pan BioTech) angereichert war. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen für die Weiterkultivierung passagiert und in Petrischalen mit einem Durchmesser von 35 mm ausgesät, um sie für Experimente vorzubereiten. Die Transfektion der Zellen erfolgte am Tag nach der Aussaat. Vor der Transfektion wurde sichergestellt, dass die Zellen mindestens zu 50% konfluent waren. Für die Durchführung der whole-cell patch-clamp Experimente wurden die CHO-Zellen mit Accutase (Pan BioTech) abgelöst und in Petrischalen mit einem Durchmesser von 35 mm gegeben. CHO-Zellen eignen sich besonders gut für die heterologe Expression und die Untersuchung von Kaliumkanälen, da sie keine eigenen endogenen Kaliumkanäle besitzen (Yu & Kerchner, 1998).

Neuronen Die Tierprotokolle für kortikale Neuronen-Kulturen von Mäusen wurden von der örtlichen Kommission für Tierschutz und Tiernutzung (Regierungspräsidium Tübingen, Tübingen, Deutschland) genehmigt. Schwangere Weibchen wurden 18 Tage nach Befruchtung mit CO₂ erstickt und zervikal disloziert. Die Embryonen wurden schnell entnommen und sofort geköpft. Unter Verwendung von mikrochirurgischen Präparationsmethoden wurde der Kortex unter einem Seziernikroskop isoliert. Die Gewebe wurden dreimal mit Magnesium- und Kalzium-freier HBSS (PAA Laboratories GmbH) bei 4°C gewaschen, bevor sie 15 Minuten lang mit 2,5% Trypsin (Biochrom) behandelt wurden. Anschließend wurde das Gewebe in DMEM (Gibco) mit fötalem Kälberserum, L-Glutamin (Pan BioTech) und Penicillin/Streptomycin (Biochrom) gespült, um die Trypsinreaktion zu blockieren. Einzelne Neuronen wurden durch mechanische Dissoziation mit Hilfe einer Pipette und eines Zellsiebs (Becton Dickinson) gewonnen. Die dissoziierten Neuronen wurden auf Deckgläsern mit einem Durchmesser von 13 mm in 24-Well-Kulturplatten plattiert (150000 Neuronen pro Well), die jeweils mit 500 µL DMEM, ergänzt mit fötalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin, gefüllt wurden. Die Deckgläser wurden vor der Embryopräparation mit Poly-D-Lysin (PDL) (Sigma-Aldrich) beschichtet. Nach sechs Stunden, in denen die Neuronen auf den Deckgläsern in 5% CO₂-befeuchteter Atmosphäre bei 37°C anwachsen konnten, wurde das Kulturmedium durch Neurobasal-Kulturmedium (Gibco), ergänzt mit B-27-Supplement (Thermo Fisher Scientific), Glutamin und Penicillin/Streptomycin ersetzt. Alle 2 bis 3 Tage

wurde das Medium gewechselt. Das Prozedere für die Kultivierung der Neurone auf Mikroelektrodenarrays (MEA)-Platten (siehe 2.2.2 „Mikroelektrodenarray Experimente“) war identisch. Neben der Beschichtung mit PDL wurden die MEA-Platten lediglich zusätzlich noch mit Laminin vorbehandelt. Die Transduktion erfolgte für die Platten beider Messmethoden identisch. Whole-cell patch-clamp Messungen wurden ab Tag 10 der Kultivierung und MEA-Messungen wurden an Tag 14 der Kultivierung durchgeführt.

2.1.2 Gentransfer

Transiente Zelltransfektion in CHO-Zellen Um die Transfektion durchzuführen, wurden 250 μL Optimem (Thermo Fisher Scientific) zusammen mit PEI (Thermo Fisher Scientific) und entsprechender Desoxyribonukleinsäure (DNA) (cDNA in Plasmiden) kombiniert. Das Verhältnis von DNA zu Polyethylenimine (PEI) sollte 1:3 betragen, was 2 μg DNA zu 6 μL PEI entspricht. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde diese Mischung auf die Zielzellen gegeben. Wenn mehrere verschiedene DNAs transfiziert werden sollten, war darauf zu achten, dass von jeder DNA 2 μg und entsprechend 1:3 PEI verwendet wurden (für zwei verschiedene DNAs ergab sich somit eine Gesamtmenge von 4 μg DNA und 12 μL PEI). Nach weiteren 20-24 Stunden Inkubation in einem Inkubator hatten die Zellen die gewünschte DNA exprimiert und waren bereit für whole-cell patch-clamp Messungen. Durch Verwendung von fluoreszierenden Markern, die sich auf dem gleichen Plasmid befanden, konnte sichergestellt werden, dass die Transfektion erfolgreich verlaufen ist und nur Zellen gemessen wurden, die die entsprechende DNA exprimieren. Bei Kotransfektionen wurde darauf geachtet, dass Zellen gemessen wurden, bei denen die Intensität der unterschiedlichen fluoreszierenden Markern ähnlich ausgeprägt war.

Transduktion in Neuronen Wenige Tage (1-3 Tage) nach dem Ausplattieren der Neuronenkulturen wurde die gewünschte DNA (cDNA in Plasmiden) durch virale Transduktion in die Neuronen der Kultur eingebracht. Durch Verwendung von fluoreszierenden Markern, die sich auf dem gleichen Plasmid befanden, konnte sichergestellt werden, dass die Transduktion erfolgreich verlaufen ist und nur Zellen gemessen wurden, die die entsprechende DNA exprimieren. Die Transduktion wurde dabei identisch für die Neuronenkulturen für die MEA-Experimente und für die Neuronenkulturen für die whole-cell patch-clamp Experimente durchgeführt.

2.2 Elektrophysiologie

2.2.1 Whole-cell patch-clamp Experimente

Generelles experimentelles Vorgehen Im folgenden Abschnitt soll das generelle experimentelle Vorgehen bei Experimenten mit der whole-cell patch-clamp Technik be-

schrieben werden. Auf die konkrete Vorgehensweise, der durch mich durchgeführten Experimente, wird an weiterer Stelle eingegangen (siehe 2.2.1 „Whole-cell patch-clamp Experimente“).

Die Kombination aus Messelektrode, umgeben von einer feinen Glaspipette und gefüllt mit einer Ionen-Puffer-Lösung, die dem intrazellulären Milieu ähnelt, spielt eine entscheidende Rolle in experimentellen Untersuchungen der Zellmembran und ihrer Ionenkanäle, da die Messelektrode die elektrische Signalaufnahme gewährleistet, die Ionen-Puffer-Lösung physiologische Bedingungen sicherstellt und die Glaspipette die mechanische Interaktion mit der Zellmembran ermöglicht. Unter mikroskopischer Kontrolle wird die Glaspipette mitsamt der Elektrode an die Zellmembran herangeführt. Durch vorsichtiges senkrechtes Aufsetzen auf die Zellmembran und anschließenden leichten Sog, der einen Unterdruck zwischen Glaspipettenöffnung und Zellmembran erzeugt, entsteht ein sehr hoher Widerstand der Pipettenöffnung von mehr als einem Giga-Ohm. Dieser Zustand wird als „Gigaseal“ bezeichnet und markiert den Übergang zur „Cell-attached“-Konfiguration. Nach einer kurzen Wartezeit von ca. 10 Sekunden können im weiteren Verlauf nun die verschiedenen weiteren in der Einleitung genannten Konfiguration erreicht werden. Die in unseren Experimenten vorliegende whole-cell-Konfiguration entsteht durch einen weiteren applizierten leichten Sog, der dazu führt, dass der kleine Membranbereich unterhalb der Pipettenöffnung („Patch“) eingesaugt und damit eine direkte Verbindung der Elektrode zum Intrazellulärbereich geschaffen wird. Um genaue Messungen des Ionenstroms durch die in der Zellmembran exprimierten Ionenkanäle durchzuführen, müssen zwei wesentliche Bedingungen erfüllt sein. Erstens ist eine präzise Kontrolle des Membranpotentials unerlässlich, und zweitens muss der zu messende Strom von anderen Strömen getrennt werden, die den Rückkopplungsverstärker beeinflussen. Dies erfordert die Unterscheidung zwischen den Ionenströmen, die die Ionenkanäle passieren, und kapazitiv bedingten transienten Strömen oder Leckströmen.

Um die erste genannte Bedingung zu ermöglichen, muss auf Folgendes geachtet werden: Zunächst müssen Offset-Spannungen ausgeglichen werden, die bei Voltage-clamp-Messungen zu Abweichungen zwischen dem festgelegten Pipettenpotential und dem tatsächlichen Wert am Membranfleck (Cell-Attached) bzw. dem angelegten Transmembranpotential (Ganzzelleableitung) führen. Den wesentlichen Anteil an den Offset-Spannung haben Elektrodenpotentiale und Diffusionsspannungen (Liquid-Junction). Diffusionsspannungen entstehen immer dann, wenn zwei unterschiedliche Ionenlösungen aufeinandertreffen, da dann ein Potential zwischen beiden Lösungen aufgrund der unterschiedlichen Ionenzusammensetzung in deren Grenzbereich auftritt. Um diese Offset-Spannungen zu kompensieren, wird im Voltage-clamp-Modus ein Nullpunktabgleich vorgenommen, bei dem die Glaspipette in die Badlösung eintaucht und die Steuerspan-

nung so angepasst wird, dass der gemessene Strom auf 0 pA eingestellt wird. Weiterhin muss der Serienwiderstand kompensiert werden, der u.a. aus dem Pipettenwiderstand und dem Access-Widerstand (u.a. Reste des eingerissenen Membranstücks) besteht. Der Serienwiderstand wurde regelmäßig überwacht und zu etwa 85% kompensiert. Der Serienwiderstand sollte minimal sein, da er in Kombination mit der Membrankapazität die Geschwindigkeit dynamischer Umladeprozesse begrenzt und mit der Parallelschaltung aus Membranwiderstand und -kapazität einen unerwünschten Spannungsteiler bildet. Der Serienwiderstand sollte maximal doppelt bis dreimal so groß sein wie der ursprüngliche Pipettenwiderstand und außerdem deutlich kleiner sein als der Membranwiderstand. Um den Serienwiderstand möglichst klein zu halten können einerseits konstruktive Maßnahmen getroffen werden (große, niederohmige Pipette) und andererseits elektronische Kompensationsverfahren angewendet werden, die zeitlich erst nach der Kompensation der verschiedenen Kapazitäten erfolgen. In meinen Experimenten wurde der Serienwiderstand zu 85% kompensiert. Durch den Serienwiderstand entsteht ein Spannungsfehler, weil der Serienwiderstand (R_s) einen Spannungsabfall (ΔU) verursacht, wenn ein Strom (I) durch den Widerstand fließt. Nach dem Ohm'schen Gesetz gilt: $\Delta U = R_s \cdot I$. Dieser Spannungsfehler führt dazu, dass die tatsächliche Spannung an der Zellmembran (V_m) von der eingestellten Spannung (V_{command}) abweicht: $V_m = V_{\text{command}} - \Delta U$. Für Messungen im physiologischen Spannungsbereich wird üblicherweise ein maximal tolerierbarer Spannungsfehler von 5 mV akzeptiert, um die Genauigkeit der Messungen zu gewährleisten.

Um die zweite genannte Bedingung zu ermöglichen, muss auf Folgendes geachtet werden: Der gemessene Strom enthält neben dem Strom, der Ionenkanäle durchfließt, auch sogenannte Leckströme, die u.a. durch den unzureichenden Giga-Seal, die Ionenpermeabilität durch die Membran oder durch Beteiligung anderer unspezifischer Membranproteine entstehen können. Grundsätzlich kann man deshalb sagen, dass die Leckströme umso kleiner werden, je höher der Seal-Widerstand ist, also je stärker die Pipette an die Membran angesaugt ist. Zusätzlich müssen kapazitive Ströme subtrahiert werden, die entstehen, wenn sich die Spannung ändert, was durch biologische Membranen (langsamer transiente Ströme) und die Glaspipettenränder (schnelle transiente Ströme) verursacht wird. Elektrisch gesehen werden durch die beiden genannten Faktoren zwei Kondensatoren widergespiegelt. Einige der in unseren Experimenten verwendeten Protokolle enthielten die Möglichkeit der Subtraktion der Leckströme und der kapazitiven Ströme. Vor jedem Testpuls wurden hyperpolarisierende Vorpulse von einem Haltepotential ausgehend appliziert. Diese Vorpulse haben genau die Form der Testpulse - allerdings mit geringerer Amplitude und entgegengesetzter Ausrichtung (die Vorpulse gehen ins Negative, wenn die Testpulse ins Positive gehen). Durch diese Vorpulse wurden keine Kanäle geöffnet.

Die Leckströme hängen linear von der Spannung ab, sodass die Summe der während der Vorpulse auftretenden Ströme den Leckströmen entsprechen, die während der Testpulse auftreten (Bsp.: bei einem Testpuls von -100 mV auf -60 mV 4 Vorpulse von -100 mV auf -110 mV). Die gemittelten und skalierten Vorpuls-Ströme werden von den gemessenen Testpuls-Strömen abgezogen. Dies sorgt also für das Trennen der Leck-Ströme von den Strömen, die Ionenkanäle durchflossen haben. Die Kompensation der Pipettenkapazität erfolgt nach der Bildung des Giga-Seals und erfordert eine Schaltung mit schneller Zeitkonstante, um das Pipettenpotential bei Änderungen der Steuerspannung schnell einzustellen. Dies ist entscheidend, da eine nicht kompensierte Pipettenkapazität zu einer fehlerhaften Serienwiderstandskompensation führen würde, was zu inkorrekten Widerstandswerten führen könnte. Die Kompensation der Membrankapazität erfolgt während der Serienwiderstandskompensation.

Setup Das nachfolgend beschriebene Setup, an dem ich die whole-cell patch-clamp Messungen durchgeführt habe, ist seit vielen Jahren innerhalb der Arbeitsgruppe etabliert und in Verwendung. Die Messungen wurden mittels eines digitalen Verstärkers (Axopatch 200B Verstärker von Axon Instruments) vorgenommen, der die kontinuierliche Aufzeichnung von Einzelelektroden in der „whole-cell-Konfiguration“ ermöglichte. Der Vorverstärker wurde auf einem motorisierten Mini-Manipulator montiert und an einem invertierten Stereomikroskop (Axio Vert.A1 von Zeiss) befestigt, welches die Visualisierung der Zellen ermöglichte. Das gesamte experimentelle Setup wurde auf einem luftgefederten Tisch aus massivem Granit positioniert. Dadurch konnte die Federung der für die Messungen wesentlichen Bestandteile gewährleistet werden. Um das Setup herum wurde ein Faraday-Käfig installiert und sämtliche metallischen Teile in der Nähe des Vorverstärkers wurden mittels des virtuellen Erdungseingangs des Verstärkers geerdet. In sämtlichen Versuchskonfigurationen erfolgte die Digitalisierung der Signale des Voltage-Clamp-Verstärkers mithilfe eines entsprechenden Digitalisierers (Digidata 1550B Digitalisierer von Axon Instruments). Dieser Digitalisierer wurde mit einem Computer verbunden. Auf diese Weise konnten die Experimente über die Datenerhebungssoftware Clampex 11 (pCLAMP Software Suite, Molecular Devices) gesteuert werden, die auf einem Windows-basierten Betriebssystem ausgeführt wurde.

Glaselektroden Glas-Mikroelektroden wurden mit Hilfe eines horizontalen Pullers (Sutter P97 von Sutter Instrument Company) mit Filamenten aus dünnwandigen Glaspipetten (0,86 x 1,50 x 80 mm, von Science Products) gezogen. Die Widerstände der „whole-cell patch-clamp-Elektroden“ betragen für CHO-Zellen ca. zwischen 2 und 5 M Ω und für Neurone ca. zwischen 4 und 7 M Ω .

Reagenzien und Lösungen Für „whole-cell“-Aufnahmen an CHO-Zellen enthielt die (intrazelluläre) Pipettenlösung (in mM): 90 KF, 10 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 11 EGTA, 10 HEPES und 2 Na₂ATP. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von KOH auf ungefähr pH = 7,4 ausgeglichen. Die Osmolarität betrug ca. 300 mOsm/kg und wurde mit D-Mannose eingestellt. Die Badlösung (extrazellulär) für Messungen an CHO-Zellen enthielt (in mM): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 HEPES und 10 Glucose. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von NaOH auf ungefähr pH = 7,4 ausgeglichen (pH-Meter von Mettler-Toledo GmbH). Die Osmolarität betrug ca. 300 mOsm/kg und wurde mit D-Mannose eingestellt (Osmometer von Löser Messtechnik). Es wurde darauf geachtet, dass die Osmolarität der Badlösung circa 5-10 mOsm/kg höher lag, als die der Pipettenlösung. Für „whole-cell“-Aufnahmen an Neuronen enthielt die (intrazelluläre) Pipettenlösung (in mM): 140 K-gluconic acid, 1 CaCl₂, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 10 HEPES und 4 Na₂ATP. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von KOH auf ungefähr pH = 7,2 ausgeglichen. Die Osmolarität betrug ca. 300 mOsm/kg und wurde mit D-Mannose eingestellt. Die Badlösung (extrazellulär) für Messungen an Neuronen enthielt (in mM): 140 NaCl, 4,2 KCl, 1,1 CaCl₂, 1 MgSO₄, 0,5 Na₂HPO₄, 0,45 NaH₂PO₄, 5 HEPES und 10 Glucose. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von NaOH auf ungefähr pH = 7,4 ausgeglichen. Die Osmolarität betrug ca. 300 mOsm/kg und wurde mit D-Mannose eingestellt. Es wurde darauf geachtet, dass die Osmolarität der Badlösung circa 5-10 mOsm/kg höher lag, als die der Pipettenlösung. Bei der Einstellung des pH-Wertes wurde darauf geachtet möglichst wenig Puffersubstanz zu benötigen, da dies besonders im Falle von KOH und der intrazellulären Flüssigkeit dazu führen kann, dass eine signifikante Menge an K⁺ durch KOH zugeführt werden kann (dies könnte z.B. das Kaliumgleichgewichtspotential verschieben).

Whole-cell patch-clamp Protokolle Für die in dieser Thesis dargestellten Ergebnisse wurden 6 verschiedene whole-cell patch-clamp Protokolle verwendet, die nachfolgend charakterisiert werden sollen (Abb. 1). Zu Beginn nenne ich jeweils die Parameter, die durch das nachfolgend beschriebene Protokoll erhoben wurden.

- Kalium-Stromdichte und Inaktivierungs-Zeitkonstante τ des Kaliumstroms (in CHO-Zellen) (Abb. 1a): Voltage-Clamp, vor Beginn des Stimulus Haltepotential von -80 mV, Testpuls auf -80 mV für 2000 ms, dieser Testpuls steigert sich nach jedem Durchgang um +10 mV (16 Durchgänge, bis ein Testpuls von +70 mV erreicht wird). Nachfolgend nach jedem Durchgang Puls von -120 mV für 500 ms. Es handelt sich hierbei also um ein klassisches Protokoll, um eine Strom-Spannungs-Beziehung zu messen.
- Natrium-Stromdichte und Kalium-Stromdichte (in Neuronen) (Abb. 1b): Voltage-Clamp, vor Beginn des Stimulus Haltepotential von -70 mV, Testpuls auf -60 mV für 4500 ms, dieser Testpuls steigert sich nach jedem Durchgang um +10 mV (11 Durchgänge, bis ein Testpuls von +40 mV erreicht wird). Es handelt sich hierbei also

um ein klassisches Protokoll, um eine Strom-Spannungs-Beziehung zu messen.

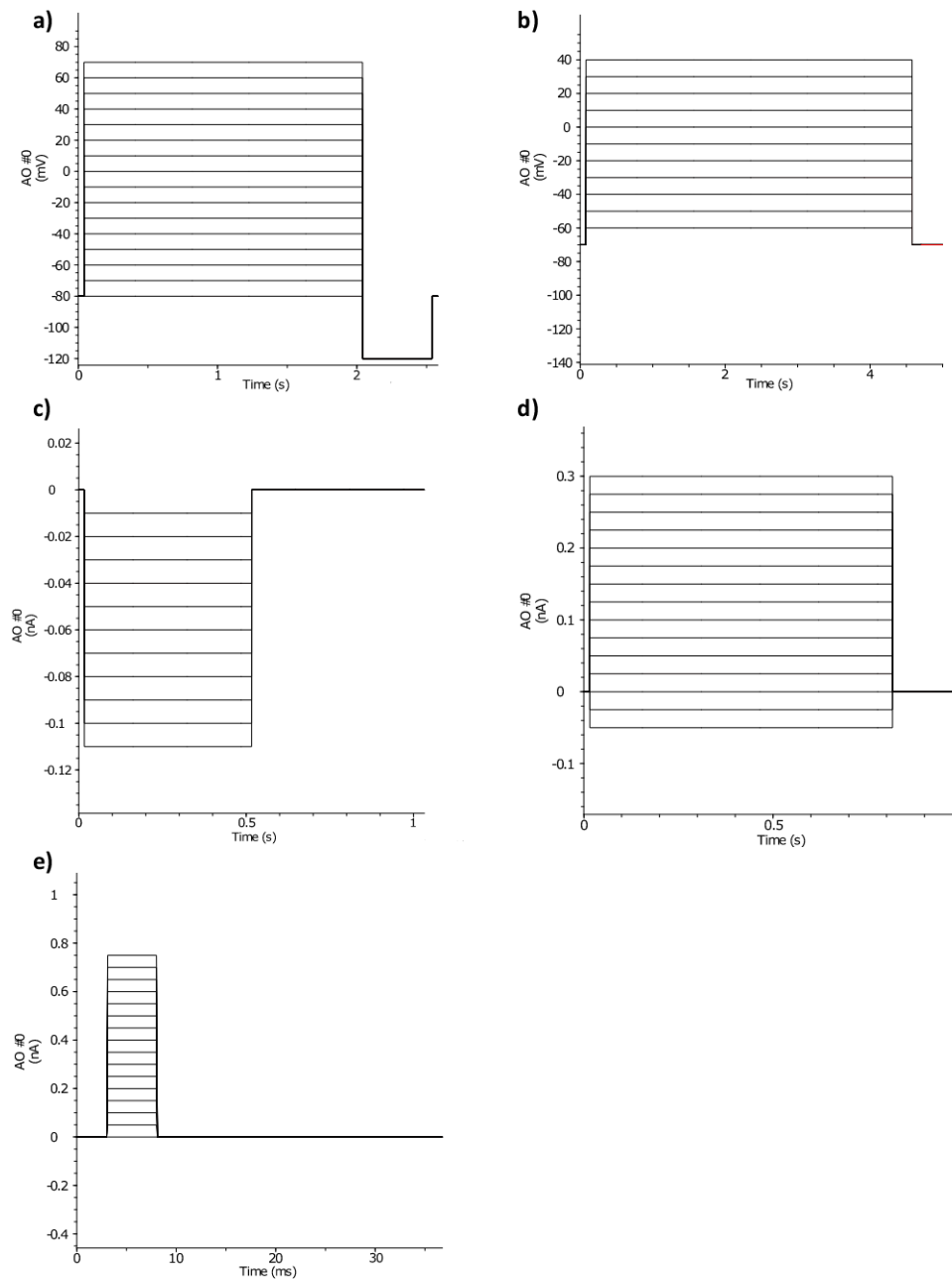


Abbildung 1: **Übersicht der Visualisierungen der Stimuli der verwendeten Protokolle.**

a) Protokoll für die Kalium-Stromdichte und Inaktivierungs-Zeitkonstante τ des Kaliumstroms (Riluzol, CHO-Zellen). b) Protokoll für die Natrium-Stromdichte und Kalium-Stromdichte (Riluzol, Neurone). c) Protokoll für den Eingangswiderstand (Riluzol, Neurone). d) Protokoll für die Aktionspotential-Anzahl (Riluzol, Neurone). e) Protokoll für die Aktionspotential-Schwelle (Riluzol, Neurone). f) Protokoll für den Kaliumstrom (BmK86-P1, CHO-Zellen).

- Eingangswiderstand (in Neuronen) (Abb. 1c): Current-Clamp, Testpuls auf $-0,01$ nA für 500 ms, dieser Testpuls verändert sich nach jedem Durchgang um $-0,01$ nA (11 Durchgänge, bis ein Testpuls von $-0,11$ nA erreicht wird).
- Aktionspotential-Anzahl (in Neuronen) (Abb. 1d): Current-Clamp, Testpuls auf $-0,05$ nA für 800 ms, dieser Testpuls verändert sich nach jedem Durchgang um $+0,025$ nA (15 Durchgänge, bis ein Testpuls von $+0,30$ nA erreicht wird).
- Aktionspotential-Schwelle (in Neuronen) (Abb. 1e): Current-Clamp, Testpuls auf 0 nA für 5 ms, dieser Testpuls verändert sich nach jedem Durchgang um $+0,05$ nA (16 Durchgänge, bis ein Testpuls von $+0,75$ nA erreicht wird).
- Kaliumstrom (Experimente mit BmK86-P1, in CHO-Zellen): Voltage-Clamp, vor Beginn des Stimulus Haltepotential von -80 mV, Testpuls auf -80 mV für 2000 ms, dieser Testpuls steigert sich nach jedem Durchgang um $+10$ mV (16 Durchgänge, bis ein Testpuls von $+70$ mV erreicht wird). Nachfolgend nach jedem Durchgang zunächst Puls von -120 mV für 500 ms und dann Puls von -80 mV für 10 ms. Es handelt sich hierbei also um ein klassisches Protokoll, um eine Strom-Spannungs-Beziehung zu messen, das dem ersten vorgestellten Protokoll stark ähnelt (siehe deshalb Abb. 1a).

Experimentelle Durchführung der Messungen in CHO-Zellen mit Riluzol Die Zellen befanden sich in einer Petrischale mit einem Durchmesser von 35 mm, welche mittels Pipette mit 2 mL Extrazellulär-Lösung befüllt wurde. Nach dem erfolgreichen Eröffnen einer Zelle und der darauffolgenden Kompensation wurde das verwendete Protokoll gestartet. Nach der Beendigung dieses Durchlaufs wurde 1 μ L der Extrazellulär-Lösung mit einer Pipette direkt in die Badlösung appliziert und das Protokoll erneut gestartet, was dem Ziel der Darstellung lediglich mechanischer Effekte dient. Daraufhin wurde Riluzol in der entsprechenden Dosierung ($0,4$ μ L, 1 μ L oder 2 μ L für 2 μ M, 5 μ M oder 10 μ M) mittels Pipette in die Badlösung gegeben und das Protokoll nach 30 s Wartezeit gestartet. In den durchgeführten Experimenten wurde darauf geachtet, Riluzol-Konzentrationen zu verwenden, die den ungefähren Riluzol-Konzentrationen entsprechen, die im menschlichen Körper bei den zugelassenen Dosierungen erreicht werden (Bellingham, 2011) (siehe 1.3.1 „Riluzol“). Vier und acht Minuten nach Riluzol-Applikation wurde das Protokoll jeweils erneut begonnen, um einen gewissen zeitlichen Verlauf der beobachteten Effekte darstellen zu können. Die Messungen an CHO-Zellen wurden mit einem Tiefpassfilter mit 2 kHz gefiltert und die Abtastrate betrug 10 kHz. Die Daten wurden anschließend auf einem PC gespeichert.

Experimentelle Durchführung der Messungen in Neuronen mit Riluzol Die Messungen fanden an Tag 10 bis 13 nach dem Ausplattieren der kortikalen Neuronen-Kulturen statt. Die Zellen befanden sich in einer Petrischale mit einem Durchmesser von 35 mm, welche mittels Pipette mit 2 mL Extrazellulär-Lösung befüllt wurde. Nach dem

erfolgreichen Eröffnen einer Zelle und der darauffolgenden Kompensation wurden nacheinander die verwendeten Protokolle gestartet. Nach der Beendigung dieses Durchlaufs wurde Riluzol in der entsprechenden Dosierung (0,4 μL oder 2 μL für 2 μM oder 10 μM - siehe oben für Hinweise zur Auswahl der Konzentration) mittels Pipette in die Badlösung gegeben und die Protokolle nach 30 s Wartezeit erneut gestartet. Während der Experimente an Neuronen wurde entsprechend von Voltage- in Current-Clamp-Modus gewechselt. Dabei konnte das Ruhemembranpotential am Setup abgelesen werden. Die Messungen an Neuronen wurden mit einem Tiefpassfilter mit 1 kHz gefiltert und die Abtastrate betrug 10 kHz. Die Daten wurden anschließend auf einem PC gespeichert.

Limitationen der Messungen des Gesamtnatriumstroms in Neuronen Da ich bei den Messungen keine Kaliumkanalblocker verwendet habe, kann dies die Messungen des Gesamtnatriumstroms limitieren. Dies liegt an der Tatsache, dass die Kaliumströme den Effekt der Natriumkanäle überlagern oder verzerren könnten. Eine weitere wichtige Limitation der Messungen des Gesamtnatriumstroms in Neuronen sind die sogenannten space-clamp Artefakte, welche eine der Hauptursachen für die begrenzte Genauigkeit bei der Messung von Natriumströmen in komplexen, verzweigten Neuronen darstellen (Spruston, Jaffe, Williams & Johnston, 1993). Aufgrund dieser verzweigten Struktur und einer daraus resultierenden inhomogenen Spannungsverteilung in der Zelle entsteht das Problem, dass das Membranpotential an der Pipette möglicherweise nicht die gesamte Zelle richtig widerspiegelt. Natriumströme ändern aufgrund der schnellen Aktivierung und Inaktivierung der Natriumkanäle die Spannung der Membran schnell, was die genannte Herausforderung zusätzlich erschwert. Dies bedeutet, dass Messungen der Natriumströme in Neuronen besonders anfällig für space-clamp Artefakte sind. Somit können die Messergebnisse des Gesamtnatriumstroms in Neuronen in meinen Experimenten lediglich als Annäherung an die tatsächlichen Natriumströme angesehen werden.

Experimentelle Durchführung der Messungen an CHO-Zellen mit BmK86-P1 Die Zellen befanden sich in einer Petrischale mit einem Durchmesser von 35 mm, welche mittels Pipette mit 1 mL Extrazellulär-Lösung befüllt wurde. Nach dem erfolgreichen Eröffnen einer Zelle und der darauffolgenden Kompensation wurde das verwendete Protokoll gestartet. Nach der Beendigung dieses Durchlaufs wurden 500 μL der Extrazellulär-Lösung mit einer Pipette direkt in die Badlösung appliziert, und das Protokoll nach 30 s Wartezeit erneut gestartet, was dem Ziel der Darstellung lediglich mechanischer Effekte dient. Das Protokoll wurde insgesamt 5-mal gestartet, um einen gewissen zeitlichen Verlauf der beobachteten Effekte darstellen zu können (5 Zeitpunkte: nach 0, 3, 6, 9 und 12 Minuten). Daraufhin wurde BmK86-P1 in der entsprechenden Dosierung (6 μL für 3 μM) in Extrazellulär-Lösung gegeben, sodass die Kombination aus Toxin und Extrazellulär-Lösung 500 μL ergab. Diese wurde vermischt und anschließend mit-

tels Pipette in die Badlösung gegeben und das Protokoll nach 30 s Wartezeit gestartet. Das Protokoll wurde insgesamt 5-mal gestartet, um einen gewissen zeitlichen Verlauf der beobachteten Effekte darstellen zu können (5 Zeitpunkte: nach 0, 3, 6, 9 und 12 Minuten). Die Messungen an CHO-Zellen wurden mit einem Tiefpassfilter mit 2 kHz gefiltert und die Abtastrate betrug 10 kHz. Die Daten wurden anschließend auf einem PC gespeichert. In den Experimenten wurde BmK86-P1 verwendet, das von Dr. Hubert Kalbacher (Universität Tübingen) komplett künstlich synthetisiert wurde.

2.2.2 Mikroelektrodenarray Experimente

Durchführung der MEA-Messungen an kortikalen Neuronenkulturen mit Riluzol Zur Erfassung der spontanen Netzwerkaktivität wurden 24-Well MEA-Platten (Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland) verwendet. Jede Vertiefung enthielt 12 Goldelektroden (in 4x4-Gitterstruktur) und einer internen Referenzelektrode. Die Aufzeichnungselektroden hatten 100 μm Durchmesser und 700 μm Abstand zueinander. Die kortikalen Neuronen wurden einem etablierten Protokoll (siehe 2.1.1 „Zellkulturen, Neuronen“) entsprechend auf den 24-Well MEA-Platten kultiviert. Nach 1-3 Tagen wurden sie transduziert und es wurden in regelmäßigen Abständen Medienwechsel durchgeführt. Pro Platte gab es 4 verschiedene Bedingungen: Kontroll-Wells ohne Transduktion und jeweils Wells mit Neuronen transduziert mit DNA (cDNA in Plasmiden): GFP, *KCNA2*-WT und P405L (LOF, *KCNA2*). Die MEA-Messungen fanden am Tag 14 statt. Ein Messdurchlauf dauerte jeweils 10 Minuten, die Temperatur betrug 37 °C und die Riluzolkonzentration wurde nach und nach aufgestockt, um Veränderungen innerhalb der einzelnen Wells wahrnehmen zu können (0,2 μM , 2 μM , 5 μM). In den durchgeführten Experimenten wurde darauf geachtet Riluzol-Konzentrationen zu verwenden, die den ungefähren Riluzol-Konzentrationen entsprechen, die im menschlichen Körper durch die zugelassene Dosierung erreicht werden (Bellingham, 2011) (siehe 1.3.1 „Riluzol“). Aufgrund von testweisen Vorversuchen konnte man davon ausgehen, dass für die MEA-Messungen geringere Riluzolkonzentrationen sinnvoll sind. Darin begründet sich die Wahl der anderen Dosierungen im Vergleich zu den whole-cell patch-clamp Messungen. Außerdem wurde darauf geachtet, dass bei jeder Platte mindestens ein (teilweise mehr als ein) Well jeder Bedingung als Kontrolle ohne Riluzol-Applikation verblieb.

2.2.3 Methodische Grundlagen für die Auswertung der Rohdaten

Whole-cell patch-clamp Messungen Die whole-cell patch-clamp Rohdaten wurden mit der Software Clampfit 11 (pCLAMP Software Suite, Molecular devices) und Microsoft Excel (Microsoft Corporation) nach innerhalb der Arbeitsgruppe etabliertem Vorgehen ausgewertet.

- Kalium-Stromdichte (Riluzol, CHO-Zellen): Die Amplitude des Kaliumstroms bei +

30 mV wurde ermittelt und anschließend durch die bei der Kompensation abgelesene Membrankapazität geteilt, um die Stromdichte des Kaliumstroms zu erhalten.

- Inaktivierungs-Zeitkonstante τ des Kaliumstroms (Riluzol, CHO-Zellen): Die Inaktivierungs-Zeitkonstante τ des Kaliumstroms wurde mittels Anpassung einer einfachen Exponentialfunktion bestimmt (ausgehend von der Spitze der Amplitude des Kaliumstroms bis 0,5 Sekunden der Aufzeichnung). Die ermittelten Werte entsprechen den Messungen bei einer Spannung von + 70 mV. Formel der einfachen Exponentialfunktion (Standardformel aus Clampfit 11 (pCLAMP Software Suite, Molecular devices)), Die Anpassung löst die Amplitude A_1 ; die Inaktivierungs-Zeitkonstante τ_1 und den konstanten y-Offset C:

$$f(t) = A_1^{-t/\tau_1} + C$$

- Stromdichte des Gesamtnatriumstroms (Riluzol, Neurone): Die Amplitude des Gesamtnatriumstroms bei - 20 mV wurde ermittelt und anschließend durch die bei der Kompensation abgelesenen Membrankapazität geteilt, um die Stromdichte des Gesamtnatriumstroms zu erhalten. Aufgrund der fehlenden Kaliumkanalblocker und der space-clamp Artefakte (siehe 2.2.1 Unterkapitel „Limitationen der Messungen des Gesamtnatriumstroms in Neuronen“) dienen die Ergebnisse lediglich als Annäherung an den tatsächlichen Natriumstrom.
- Stromdichte des Gesamtkaliumstroms (Riluzol, Neurone): Die Amplitude des Gesamtkaliumstroms bei + 30 mV wurde ermittelt und anschließend durch die bei der Kompensation abgelesenen Membrankapazität geteilt, um die Stromdichte des Gesamtkaliumstroms zu erhalten.
- Eingangswiderstand (Riluzol, Neurone): Die Ermittlung des Eingangswiderstand basiert auf dem Ohm'schen Gesetz $R = \Delta U / \Delta I$. Die injizierte Stromstärke (ΔI : -0,01 nA für 500 ms, dieser Testpuls verändert sich nach jedem Durchgang um -0,01 nA (11 Durchgänge, bis -0,11 nA als Testpuls erreicht wird)) führte in meinen Experimenten zu einer resultierenden Spannungsänderung (ΔU : Differenz der Spannung unmittelbar vor Beginn bzw. vor Ende des jeweiligen Strompulses - die entsprechenden Zeitpunkte wurden von mir manuell per Cursor eingestellt). Auf Grundlage der 11 einzelnen Kombinationen aus zusammengehörendem ΔU und ΔI wurde mit Microsoft Excel (Microsoft Corporation) eine Regeressionsgerade erstellt, deren Steigung den Wert für den Eingangswiderstand darstellt.
- Ruhemembranpotential (Riluzol, Neuronen): Während der Experimente an Neuronen wurde entsprechend von Voltage- in Current-Clamp-Modus gewechselt. Dabei konnte das Ruhemembranpotential am Setup abgelesen werden.
- Aktionspotential-Anzahl (Riluzol, Neurone): Die Anzahl der Aktionspotentiale für je

den entsprechenden Stromimpuls wurde mit dem Programm Clampfit 11 (pCLAMP Software Suite, Molecular devices) ermittelt. Dabei wurde die Detektionsschwelle manuell auf 0 mV eingestellt. Das Programm hat anschließend alle Spitzen detektiert, die diese Schwelle überschritten haben. Für die Auswertung wurden die Messungen der Stromimpulse von -0,05 nA bis 0,2 nA verwendet.

- Aktionspotential-Schwelle (Riluzol, Neurone): Es wurde visuell ermittelt bei welchem Strompuls erstmals ein Aktionspotential ausgelöst wurde.
- Kaliumstrom (BmK86-P1, CHO-Zellen): Die Amplitude des Kaliumstroms bei + 30 mV wurde ermittelt.

MEA-Messungen Das Rohsignal wurde mit einer Abtastrate von 10 kHz aufgenommen und dann durch zwei Filter bearbeitet: Ein Tiefpass-Butterworth-Filter vierter Ordnung mit einer Grenzfrequenz von 3500 Hz und ein Hochpass-Butterworth-Filter zweiter Ordnung mit einer Grenzfrequenz von 100 Hz. Die Spike-Erkennung erfolgte über die Rauschschwellenmethode der Multi-well Analyzer Software (Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland). Für jede Aufzeichnung wurde der eingebettete Algorithmus so eingestellt, dass ein Schwellenwert verwendet wurde, der auf das ± 5 -fache der Standardabweichung von 50 verschiedenen 100-ms-Segmenten der Rohdaten festgelegt wurde. Für die Identifizierung von Bursts und Netzwerk-Bursts kam der Burst-Erkennungsalgorithmus der Multi-well Analyzer Software zum Einsatz. Dieser Algorithmus wurde so eingestellt, dass er ein Burst erkannte, wenn mindestens 4 Spikes auftraten, deren Abstände (Interspike-Intervalle) maximal 50 ms betragen. Zwischen den Bursts musste ein Mindestabstand (Interburst-Intervall) von 100 ms bestehen. Wenn ein Burst in mehr als 6 Kanälen gleichzeitig auftrat, wurde er als Netzwerk-Burst klassifiziert. Für die Offline-Datenanalyse wurde die Multi-well Analyzer Software verwendet und Spike- und Bursting-Parameter wurden mit der Software extrahiert. Die weitere Analyse zur Definition der Netzwerkaktivität wurde mit von Mitgliedern der Arbeitsgruppe geschriebenen und innerhalb der Arbeitsgruppe etablierten Skripten in Python unter Verwendung der Open-Source-Software Jupyter Notebook durchgeführt. Die Dauer von Bursts und Netzwerk-Bursts wurde definiert als die Zeitdauer zwischen dem ersten und dem letzten Spike, der zu einem Burst bzw. Netzwerkburst gehörte. Die Spike-Frequenz von Bursts und Netzwerkbursts wurde als die Frequenz der Spikes innerhalb von Bursts bzw. Netzwerk-Bursts definiert.

2.2.4 Methodische Grundlagen für die statistische Auswertung der Ergebnisse

Sofern nicht anders genannt wurden je nach Anzahl der Variablen 2-way-ANOVAs oder 1-way-ANOVAs mit dem Programm GraphPad Prism 10.0.3 (GraphPad Software) durch-

geführt (Wortwahl im Ergebnisteil: bei 2-way-ANOVAs Haupt- und Interaktionseffekte, F-Wert). Die Haupt- und Interaktionseffekte einer 2-way-ANOVA zeigen, ob die einzelnen unabhängigen Variablen bzw. deren Kombination einen signifikanten Einfluss auf die abhängige Variable haben (quantifiziert durch den F-Wert). Anschließend wurde als Post-hoc-Test jeweils der Bonferroni-Test/die Bonferroni-Korrektur angewendet (Wortwahl im Ergebnisteil: paarweise Vergleiche, t-Wert). Bei den paarweisen Vergleichen (Bonferroni-Test) wird untersucht, welche Gruppen sich statistisch signifikant voneinander unterscheiden (quantifiziert durch den t-Wert) (Backhaus, Erichson, Plinke & Weiber, 2016). Das statistische Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Das Signifikanzniveau ($p \leq 0,05$) legt fest, dass man bereit ist, mit einer Wahrscheinlichkeit von maximal 5% einen Fehler 1. Art zu akzeptieren. Ein Fehler 1. Art bedeutet, die Nullhypothese abzulehnen, obwohl sie eigentlich korrekt ist. Die Nullhypothese (H_0) ist die Annahme, dass es keinen Effekt oder Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen gibt. Das Programm GraphPad Prism 10.0.3 (GraphPad Software) wurde auch zur Erstellung der Diagramme verwendet. Die Diagramme, die den Effekt von Riluzol bzw. Bmk86-P1 zeigen, stellen sofern nicht anders gekennzeichnet den Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts („standard error of the mean“, SEM) dar. Die Diagramme, die den Effekt der Transfektions-/Transduktionsbedingung zeigen, werden sofern nicht anders gekennzeichnet als Box-Dot-Plot mit minimalem und maximalem Wert dargestellt (Ausnahme ist die Darstellung der Kontrollmessungen der Anzahl der Aktionspotentiale). Sofern Signifikanzniveaus in den Abbildungen oder Tabellen durch Sternchen gekennzeichnet werden, bedeuten diese folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$. I.d.R. beziehen sich diese dann auf den Effekt von Riluzol (also auf Vergleiche innerhalb einer Transfektions-/Transduktionsbedingung - Ausnahme: Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol). Die Darstellungen der Rohdaten habe ich mit dem Programm Inkscape 1.4 (Inkscape) erstellt und dafür aus Clampfit 11 (pCLAMP Software Suite, Molecular devices) entnommen. Nach Auswertung der Rohdaten wurden vereinzelt einzelne Daten exkludiert. Dies lag dann z.B. an Artefakten, die die Messungen überlagert haben. Im Rahmen der eigentlichen statistischen Analyse wurden keine Ausreißertests durchgeführt, da dies potentiell zu einer selektiven Datenbereinigung und damit zu einer Verzerrung der Ergebnisse hätte führen können.

Ergänzungen zur Auswertung der MEA-Messungen Die Effekte von Riluzol werden nur bei den Parametern der MEA-Messungen dargestellt, die eine absolute Anzahl an z.B. Spikes zeigen. Dies liegt daran, dass die Applikation von Riluzol mit steigender Konzentration regelmäßig die Aktivität ganzer Wells komplett unterdrückt hat. In Fällen, in denen nach Applikation von Riluzol keine Aktivität für den jeweiligen Parameter

registrierbar war und es somit mit der Wirkung von Riluzol theoretisch erklärt werden konnte, wurde der Wert 0 eingefügt. Dies macht allerdings nur bei Parametern Sinn, die eine absolute Anzahl zeigen. Aber auch unabhängig von Riluzol (z.B. vor der Applikation oder bei Kontroll-Wells ohne jegliche Applikation) haben manche Wells keine Ergebnisse für den jeweiligen Parameter geliefert. In diesen Fällen wurde das entsprechende Well für alle Messwiederholungen exkludiert. Die statistische Auswertung mit dem Programm GraphPad Prism 10.0.3 (GraphPad Software) erfordert nämlich vollständige Messreihen (Begründung sowohl für komplett exkludierte Messreihen, als auch für Ergänzungen mit dem Wert 0). Da das Einfügen des Wertes 0 nur bei Parametern mit absoluter Anzahl Sinn ergibt, werden für Parameter, die z.B. eine Dauer oder Frequenz zeigen, nur die Kontrollmessungen ohne Riluzolapplikation gezeigt und somit lediglich der Effekt der verschiedenen Transduktionsbedingungen unabhängig von Riluzol dargestellt. Bei der Betrachtung der Effekte der Transduktionsbedingungen („Kontrollmessungen“) wurden die Messungen ohne Riluzol (erste Messung) von allen inkludierten Wells verwendet. Die weiteren Messungen der Kontroll-Wells, bei denen über die gesamte Dauer des Experiments kein Riluzol appliziert wurde, wurden in diesem Fall nicht inkludiert (eventuelle Effekte über die Zeit könnten potentiell verzerrend sein). Diese Kontrollmessungen über den zeitlichen Verlauf ohne Applikation von Riluzol wurden aber für den Vergleich zu den Messungen mit Applikation von Riluzol herangezogen (Messzeitpunkte waren dabei identisch für die Wells mit und ohne Applikation).

3 Ergebnisse

Kurze Erklärung zum Aufbau des Ergebnisteils Die Ergebnispräsentation erfolgt nach den drei verschiedenen Ebenen, denen sich die durchgeführten Experimente zuordnen lassen: Ionenströme, neuronale Eigenschaften und Netzwerk-Effekte. I.d.R. sind die Unterkapitel dabei einheitlich aufgebaut (Ausnahmen aufgrund einer vorteilhafteren Formatierung). Zu Beginn der jeweiligen Unterkapitel finden sich in manchen Fällen Darstellungen und Beschreibungen von Rohdaten der Messungen. I.d.R. findet sich zu Beginn der jeweiligen Unterkapitel auch eine Erklärung der Rationalen der jeweiligen Experimente bezogen auf die Wissenschaftlichen Fragestellungen. Darauf folgen die zusammengefassten Hauptergebnisse des jeweiligen Unterkapitels. Anschließend erfolgt eine graphische Darstellung der Ergebnisse in Diagrammen. Ausführlichere Erläuterungen zu den Messergebnissen und tabellarische Übersichten finden sich i.d.R. erst nach den Diagrammen.

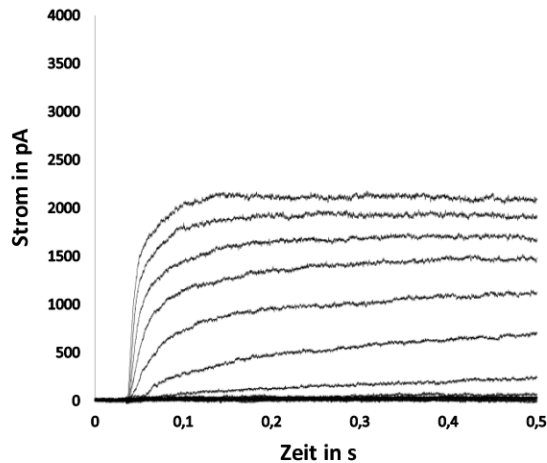
3.1 Ionenströme in CHO-Zellen, whole-cell patch-clamp Messungen

Die Messungen der Ionenströme in CHO-Zellen dienten v.a. der Untersuchung zweier verschiedener Hypothesen. Einerseits wollte ich eine mögliche direkte Wirkung von Riluzol auf *KCNA2* WT bzw. die Kotransfektion aus *KCNA2* WT und P405L (LOF, *KCNA2*) überprüfen (3.1.1). Andererseits könnte der von Xu et al. nachgewiesene Effekt von Riluzol auf die Inaktivierungskinetik des Kaliumstroms (siehe 1.3.1 „Riluzol“) bereits für geringere Dosierungen von Riluzol gelten, weshalb die Inaktivierungskinetik von *KCNA2* WT + *KCNA4* WT (Kotransfektion) und *KCNA4* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) (Kotransfektion) in CHO-Zellen gemessen wurde (3.1.2) (siehe 1.5 „Wissenschaftliche Fragestellungen“).

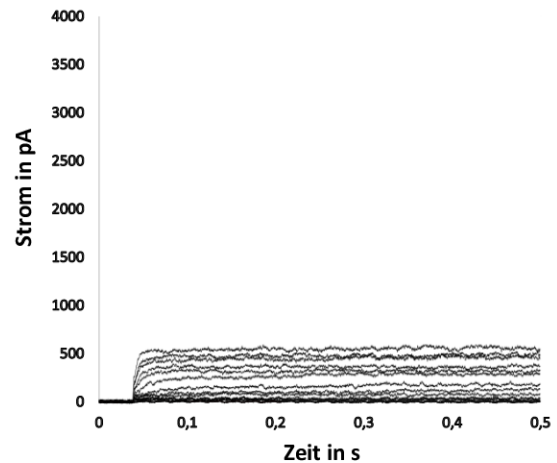
Zu Beginn der Präsentation der Ergebnisse meiner Experimente zu den Ionenströmen in CHO-Zellen möchte ich an dieser Stelle exemplarisch für jede Transfektionsbedingung die Rohdaten einer Messung des Kaliumstroms in CHO-Zellen zeigen (Abb. 2). Es ist zu sehen, dass die Kotransfektion aus *KCNA2* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) eine deutlich geringere Kaliumstromamplitude aufweist. P405L (LOF, *KCNA2*) zeigt allerdings keine Effekte bei der maximalen Höhe der Kaliumstromamplitude bei der Kotransfektion mit *KCNA4* WT im Vergleich zur Kotransfektion von *KCNA2* WT und *KCNA4* WT. In den dargestellten Rohdaten fällt auf, dass sich nach ca. 0,2 s ein Einfluss von P405L (LOF, *KCNA2*) auf die Höhe des Kaliumstroms vermuten lassen könnte (deutlich unter 1000 pA - Kotransfektion aus *KCNA2* WT und *KCNA4* WT im Vergleich dazu deutlich über 1000 pA). Auffällig sind die deutlich höheren Kaliumstromamplituden der Kotransfektionen,

die *KCNA4* WT enthalten. Darüberhinaus zeigen diese auch eine schnelle Inaktivierung des Kaliumstroms (A-Strom). Die Transfektionsbedingungen ohne *KCNA4* WT zeigen eine deutlich langsamere Inaktivierung des Kaliumstroms (D-Strom).

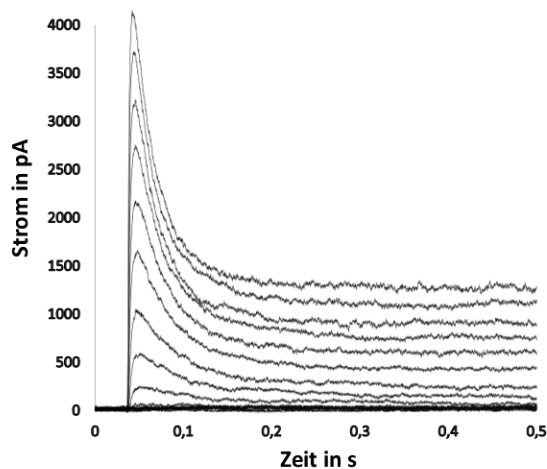
a) *KCNA2* WT



b) *KCNA2* WT + P405L



c) *KCNA2* WT + *KCNA4* WT



d) *KCNA4* WT + P405L

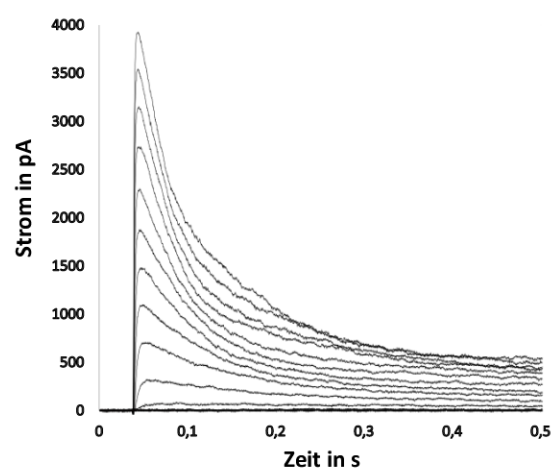


Abbildung 2: Exemplarische Rohdaten der Messungen des Kaliumstroms, in CHO-Zellen.

a) *KCNA2* WT. b) *KCNA2* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) (Kotransfektion). c) *KCNA2* WT + *KCNA4* WT (Kotransfektion). d) *KCNA4* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) (Kotransfektion).

3.1.1 Stromdichte des Kaliumstroms in CHO-Zellen

Im Folgenden wird der Einfluss von Riluzol auf die Stromdichte des Kaliumstroms bei den vier verschiedenen transfizierten Transfektionsbedingungen *KCNA2* WT, *KCNA2* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) (Kotransfektion), *KCNA2* WT + *KCNA4* WT (Kotransfektion)

und *KCNA4* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) (Kotransfektion) dargestellt. Um den Einfluss von Riluzol zu zeigen, erfolgt die Angabe als relative Änderung im Vergleich zu einer Baseline. Die Baseline für die Messung der Kontrollapplikation mit Extrazellulär-Lösung entspricht dabei der Kontrollmessung ganz ohne Applikation. Die Baseline für die weiteren Messungen mit Riluzol entspricht der Messung der Kontrollapplikation mit Extrazellulär-Lösung, da durch diese der rein mechanische Einfluss gemessen wird. Außerdem sollen die Auswirkungen der verschiedenen transfizierten Transfektionsbedingungen auf den Kaliumstrom unabhängig von Riluzol aufgezeigt werden. In diesen Fällen wird die Höhe der Stromdichte des Kaliumstroms als absoluter Wert angegeben, nicht relativ zur Baseline. Auffällig sind bei diesen Messungen v.a. die Kontrollmessungen der Bedingung *KCNA2* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) (Kotransfektion), bei denen sich statistisch signifikant geringere Stromdichte des Kaliumstroms im Vergleich zu den anderen Transfektionsbedingungen ergeben. Bei den Messungen mit Applikation von Riluzol zeigen sich keine einheitlichen bzw. deutlichen Effekte auf die Höhe der Stromdichte des Kaliumstroms (Abb. 3).

Bei den verschiedenen transfizierten Transfektionsbedingungen ergeben sich bei den Kontrollmessungen ohne Riluzol statistisch stark signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$ und $F = 24,33$) in der Höhe der Stromdichte des Kaliumstroms. Statistisch signifikante Unterschiede sind für alle paarweisen Vergleiche der einzelnen Gruppen (Post-hoc-Test) außer dem Vergleich zwischen *KCNA2* WT + *KCNA4* WT (Kotransfektion) und *KCNA4* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) (Kotransfektion) gegeben. Am stärksten ist dabei der statistisch signifikante Unterschied zwischen *KCNA2* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) (Kotransfektion) und den jeweiligen Kotransfektionen, die *KCNA4* WT enthalten (bei *KCNA4* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) $p < 0,0001$ und $t = 7,551$, bei *KCNA2* WT + *KCNA4* WT $p < 0,0001$ und $t = 6,829$) (Tabelle 2 und Abb. 3a).

	<i>KCNA2</i> WT (n = 36)	<i>KCNA2</i> WT + P405L (n = 40)	<i>KCNA2</i> WT + <i>KCNA4</i> WT (n = 32)	<i>KCNA4</i> WT + P405L (n = 32)
Kontrolle	352,92 ± 53,72	74,77 ± 9,45****	597,22 ± 80,05	652,43 ± 63,63

Tabelle 2: **Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Stromdichte des Kaliumstroms** in pA/pF, +30 mV, in CHO-Zellen, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

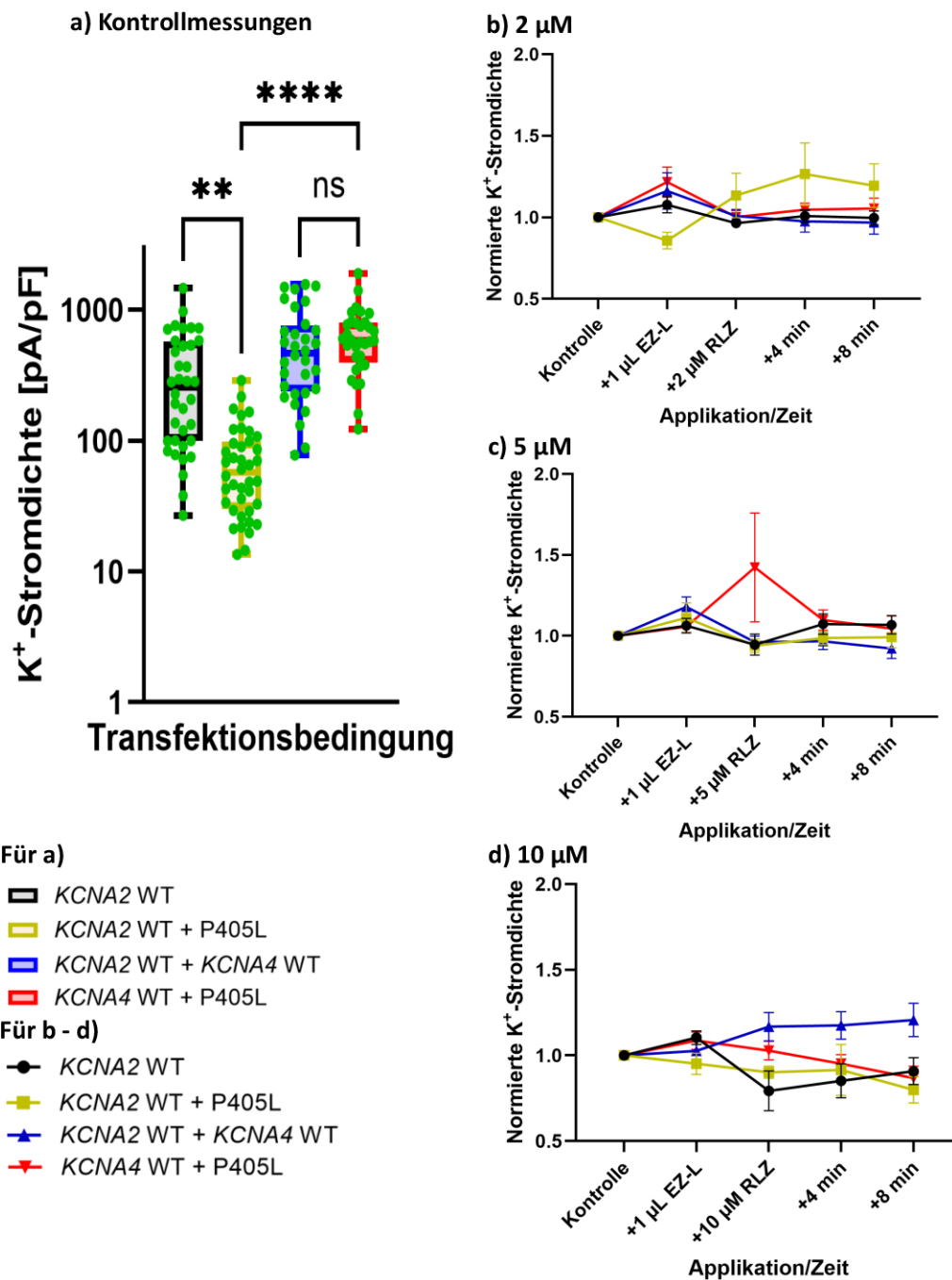


Abbildung 3: Kaliumstromdichte (bei +30 mV) in CHO-Zellen.

KCNA2 WT, *KCNA2* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) (Kotransfektion), *KCNA2* WT + *KCNA4* WT (Kotransfektion), *KCNA4* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) (Kotransfektion). Dieselben Zellen wurden dabei fünf mal nacheinander gemessen - Kontrollmessungen, nach Applikation von 1 µL Extrazellulärlösung, nach Applikation von Riluzol und 4 bzw. 8 Minuten nach Applikation von Riluzol. a) Kaliumstromdichte in pA/pF, Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (n = 32 bis n = 40). b) Normierte Kaliumstromdichte, 2 µM Riluzol (n = 11 bis n = 14). c) Normierte Kaliumstromdichte, 5 µM Riluzol (n = 11 bis n = 13). d) Normierte Kaliumstromdichte, 10 µM Riluzol (n = 10 bis n = 14), für a) 1-way ANOVA und für b-d) 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

Durch die Applikation von Riluzol kam es zu keinen wesentlichen Unterschieden der Stromdichte des Kaliumstroms. Jedoch ergaben sich vereinzelt Unterschiede in beide Richtungen (Anstieg und Abfall der Stromdichte), die teilweise auch eine statistische Signifikanz erreichten. Aufgrund fehlender systematischer Effekte von Riluzol kann man davon ausgehen, dass diese Unterschiede immer noch im Bereich der natürlichen Messschwankungen liegen (Tabelle 3 und Abb. 3b-d).

	<i>KCNA2</i> WT	<i>KCNA2</i> WT + P405L	<i>KCNA2</i> WT + <i>KCNA4</i> WT	<i>KCNA4</i> WT + P405L
+2 μ M RLZ	(n = 14)	(n = 13)	(n = 10)	(n = 11)
Kontrolle	1 \pm 0,23	1 \pm 0,16	1 \pm 0,20	1 \pm 0,14
+EZ-L	1,08 \pm 0,05	0,86 \pm 0,05	1,16 \pm 0,11	1,22 \pm 0,09
+2 μ M RLZ	0,96 \pm 0,02	1,13 \pm 0,14	1,01 \pm 0,04	1,00 \pm 0,04
+4 min	1,01 \pm 0,04	1,27 \pm 0,19	0,98 \pm 0,07	1,05 \pm 0,04
+8 min	1,00 \pm 0,04	1,19 \pm 0,13	0,97 \pm 0,07	1,06 \pm 0,06
+5 μ M RLZ	(n = 12)	(n = 13)	(n = 11)	(n = 11)
Kontrolle	1 \pm 0,33	1 \pm 0,25	1 \pm 0,28	1 \pm 0,11
+EZ-L	1,06 \pm 0,05	1,11 \pm 0,09	1,18 \pm 0,06	1,06 \pm 0,04
+5 μ M RLZ	0,95 \pm 0,06	0,94 \pm 0,04	0,96 \pm 0,04*	1,42 \pm 0,34
+4 min	1,07 \pm 0,06	0,99 \pm 0,04	0,97 \pm 0,05	1,10 \pm 0,06
+8 min	1,07 \pm 0,06	0,99 \pm 0,07	0,92 \pm 0,06	1,05 \pm 0,08
+10 μ M RLZ	(n = 10)	(n = 14)	(n = 11)	(n = 10)
Kontrolle	1 \pm 0,18	1 \pm 0,19	1 \pm 0,21	1 \pm 0,27
+EZ-L	1,10 \pm 0,04	0,95 \pm 0,06	1,03 \pm 0,07	1,09 \pm 0,05
+5 μ M RLZ	0,80 \pm 0,12	0,90 \pm 0,04	1,17 \pm 0,08	1,03 \pm 0,05
+4 min	0,85 \pm 0,10	0,92 \pm 0,15	1,18 \pm 0,08	1,95 \pm 0,05
+8 min	0,91 \pm 0,08	0,80 \pm 0,08	1,21 \pm 0,10	0,87 \pm 0,07

Tabelle 3: Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte der normierten Stromdichte des Kaliumstroms, +30 mV, in CHO-Zellen, 2, 5 und 10 μ M Riluzol, 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

3.1.2 Inaktivierungs-Zeitkonstante τ des Kaliumstroms in CHO-Zellen

Nachfolgend präsentiere ich den Einfluss von Riluzol auf die Inaktivierungs-Zeitkonstante τ des Kaliumstroms bei den zwei Bedingungen *KCNA2* WT + *KCNA4* WT und *KCNA4* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) (jeweils Kotransfektion). Die angegebene Inaktivierungs-Zeitkonstante τ des Kaliumstroms wurde mittels Anpassung einer einfachen Exponentialfunktion bestimmt (ausgehend von der Spitze der Amplitude des Kaliumstroms bis 0,5 s nach Messstart). Die angegebenen Werte entsprechen den Messungen bei einer Spannung von 70 mV. Außerdem sollen die Auswirkungen der zwei Transfektionsbedingungen auf die Inaktivierungs-Zeitkonstante τ des Kaliumstroms aufgezeigt werden.

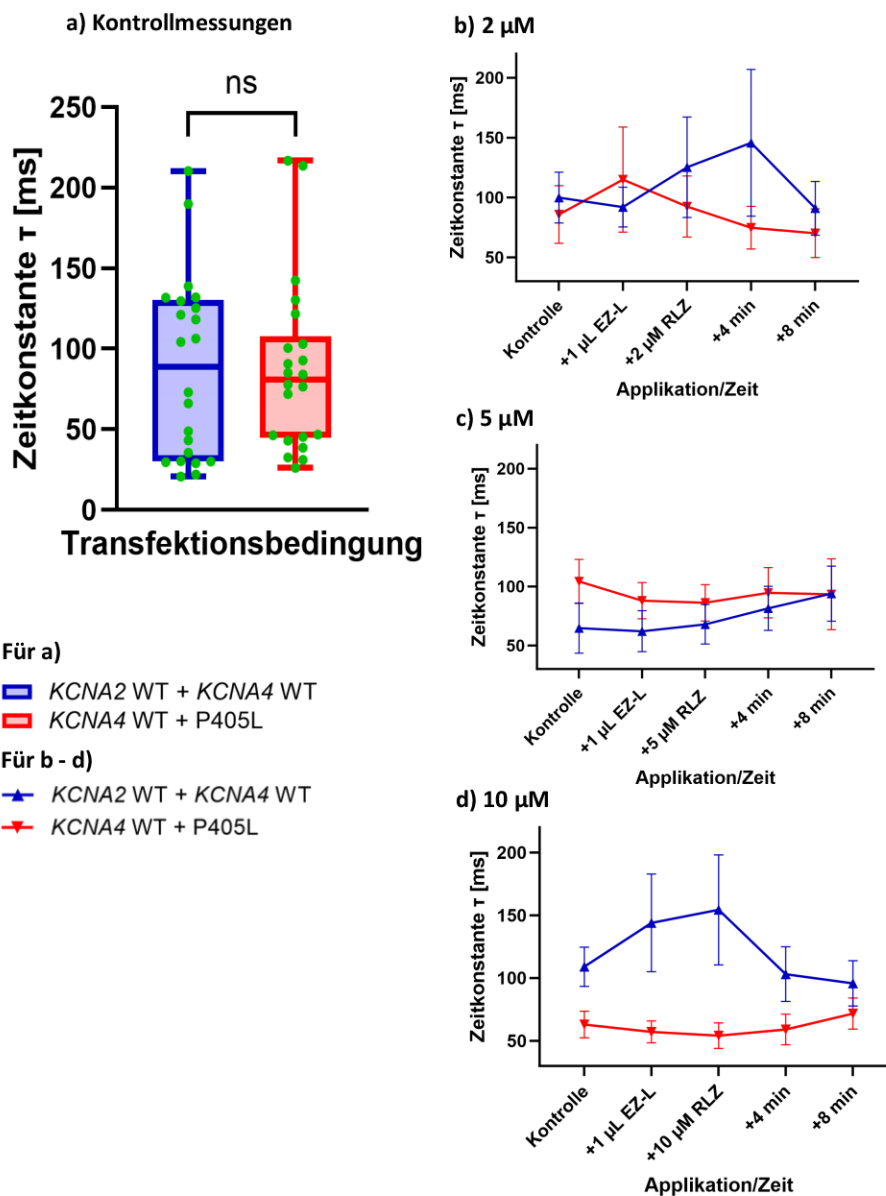


Abbildung 4: Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ des Kaliumstroms (bei +70 mV) in ms in CHO-Zellen.

KCNA2 WT + *KCNA4* WT, *KCNA4* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) (jeweils Kotransfektion). Dieselben Zellen wurden dabei fünf mal nacheinander gemessen - Kontrollmessungen, nach Applikation von 1 μ L Extrazellulärlösung, nach Applikation von Riluzol und 4 bzw. 8 Minuten nach Applikation von Riluzol. a) Inaktiv.-Zeitkonst. τ des Kaliumstroms in ms, Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (jeweils $n = 22$). b) Inaktiv.-Zeitkonst. τ des Kaliumstroms in ms, 2 μ M Riluzol (jeweils $n = 7$). c) Inaktiv.-Zeitkonst. τ des Kaliumstroms in ms, 5 μ M Riluzol (jeweils $n = 9$). d) Inaktiv.-Zeitkonst. τ des Kaliumstroms in ms, 10 μ M Riluzol (jeweils $n = 6$), für a) ungepaarter T-Test und für b-d) 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

Bei diesen Messungen lassen sich weder signifikante Unterschiede der Inaktivierungs-Zeitkonstante τ des Kaliumstroms zwischen den zwei verschiedenen Transfektionsbedin-

gungen finden, noch führt die Applikation von Riluzol zu einer systematischen Veränderung der Inaktivierungs-Zeitkonstante τ des Kaliumstroms (Abb. 4).

Für die zwei verschiedenen transfizierten Transfektionsbedingungen ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den Kontrollmessungen ohne Riluzol (in diesem Fall aufgrund der Anzahl von nur zwei Variablen ungepaarter T-Test) (Tabelle 4 und Abb. 4a).

	<i>KCNA2</i> WT + <i>KCNA4</i> WT (n = 22)	<i>KCNA4</i> WT + P405L (n = 22)
Kontrolle	88,01 ± 12,04	87,15 ± 11,30

Tabelle 4: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ des Kaliumstroms in ms, +70 mV, in CHO-Zellen, ungepaarter T-Test.

Durch die Applikation von Riluzol kam es zu keinen wesentlichen Unterschieden der Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ des Kaliumstroms. Es zeigten sich Veränderungen in beide Richtungen (Anstieg und Abfall der Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ des Kaliumstroms), die sehr vereinzelt auch eine statistische Signifikanz erreichten. Da systematische Effekte von Riluzol fehlen, beruhen diese Unterschiede vermutlich immer noch auf natürlichen Messschwankungen (Tabelle 3 und Abb. 3b-d).

	<i>KCNA2</i> WT + <i>KCNA4</i> WT (n = 7)	<i>KCNA4</i> WT + P405L (n = 7)
+2 μ M RLZ		
Kontrolle	99,87 ± 21,17	85,77 ± 24,04
+EZ-L	92,01 ± 16,63	114,88 ± 43,85
+2 μ M RLZ	125,18 ± 41,96	92,46 ± 25,43
+4 min	145,62 ± 61,29	74,80 ± 17,85
+8 min	90,98 ± 22,37	70,21 ± 20,36
+5 μ M RLZ	(n = 9)	(n = 9)
Kontrolle	64,76 ± 21,20	104,32 ± 18,69
+EZ-L	62,12 ± 17,30	88,06 ± 15,40
+5 μ M RLZ	67,97 ± 16,68	86,22 ± 15,42
+4 min	81,55 ± 18,65	94,69 ± 21,30
+8 min	94,00 ± 23,35	93,43 ± 30,02
+10 μ M RLZ	(n = 6)	(n = 6)
Kontrolle	109,05 ± 15,56	63,00 ± 10,65
+EZ-L	143,98 ± 38,86	57,20 ± 8,70
+10 μ M RLZ	154,30 ± 43,85	54,12 ± 10,08
+4 min	103,15 ± 21,77	59,02 ± 12,24
+8 min	95,78 ± 18,02	71,67 ± 12,36

Tabelle 5: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Inaktivierungs-Zeitkonstanten τ des Kaliumstroms in ms, +70 mV, CHO-Zellen, 2, 5 und 10 μ M Riluzol, 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

3.2 Ionenströme in Neuronen, whole-cell patch-clamp Messungen

Die Messungen der Ionenströme in Neuronen dienen v.a. der Untersuchung der Hypothese, dass Riluzol eine mögliche direkte Wirkung auf *KCNA2* WT bzw. die Kotransfektion aus *KCNA2* WT und P405L (LOF, *KCNA2*) und damit den Gesamtkaliumstrom in Neuronen ausüben könnte. Außerdem sollte durch die annähernde Messung des Gesamtnatriumstroms abgeschätzt werden, ob Riluzol eine deutliche Wirkung auf den tonischen Natriumstrom hat, um einen Vergleich zur use-dependent Natrium-Kanal-Blockade zu ermöglichen (siehe 1.5 „Wissenschaftliche Fragestellungen“). Abb. 5 dient dabei der gemeinsamen Darstellung der Messungen der Stromdichte des Gesamtkalium- und des Gesamtnatriumstroms.

3.2.1 Stromdichte des Gesamtkaliumstroms in Neuronen

Hier zeige ich den Einfluss von Riluzol auf die Stromdichte des Gesamtkaliumstroms bei den vier Bedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Transduktion. Die Angabe erfolgt als relative Änderung im Vergleich zu einer Baseline. Die Baseline entspricht dabei der Kontrollmessung ohne Applikation, bevor daraufhin die Applikation von Riluzol erfolgte. Außerdem sollen die Auswirkungen der verschiedenen Bedingungen auf den Gesamtkaliumstrom unabhängig von Riluzol aufgezeigt werden (Angabe der Höhe der Kaliumstromdichte als absoluter Wert, nicht relativ zu Baseline). Bei diesen Messungen lassen sich v.a. die geringere Stromdichte des Gesamtkaliumstroms für die Bedingung P405L (LOF, *KCNA2*) im Vergleich zu den anderen Bedingungen festhalten. Die Applikation von Riluzol führt zu keinem systematischen Effekt auf die Stromdichte des Gesamtkaliumstroms. Bei den Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede ($p = 0,0260$ und $F = 3,240$) für die Höhe der Stromdichte des Gesamtkaliumstroms zwischen den Bedingungen. Im paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen (Post-hoc-Test) ergibt sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Stromdichte des Gesamtkaliumstroms für den Vergleich von *KCNA2* WT und P405L (LOF, *KCNA2*) ($p = 0,0174$ und $t = 3,065$) (Tabelle 6 und Abb. 5a).

	<i>KCNA2</i> WT (n = 18)	P405L (n = 26)	GFP (n = 20)	ohne Transduktion (n = 26)
Kontrolle	384,75 ± 26,57	280,10 ± 15,86*	305,83 ± 25,60	316,91 ± 25,95

Tabelle 6: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Stromdichte des Gesamtkaliumstroms in pA/pF, +30 mV, in Neuronen, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

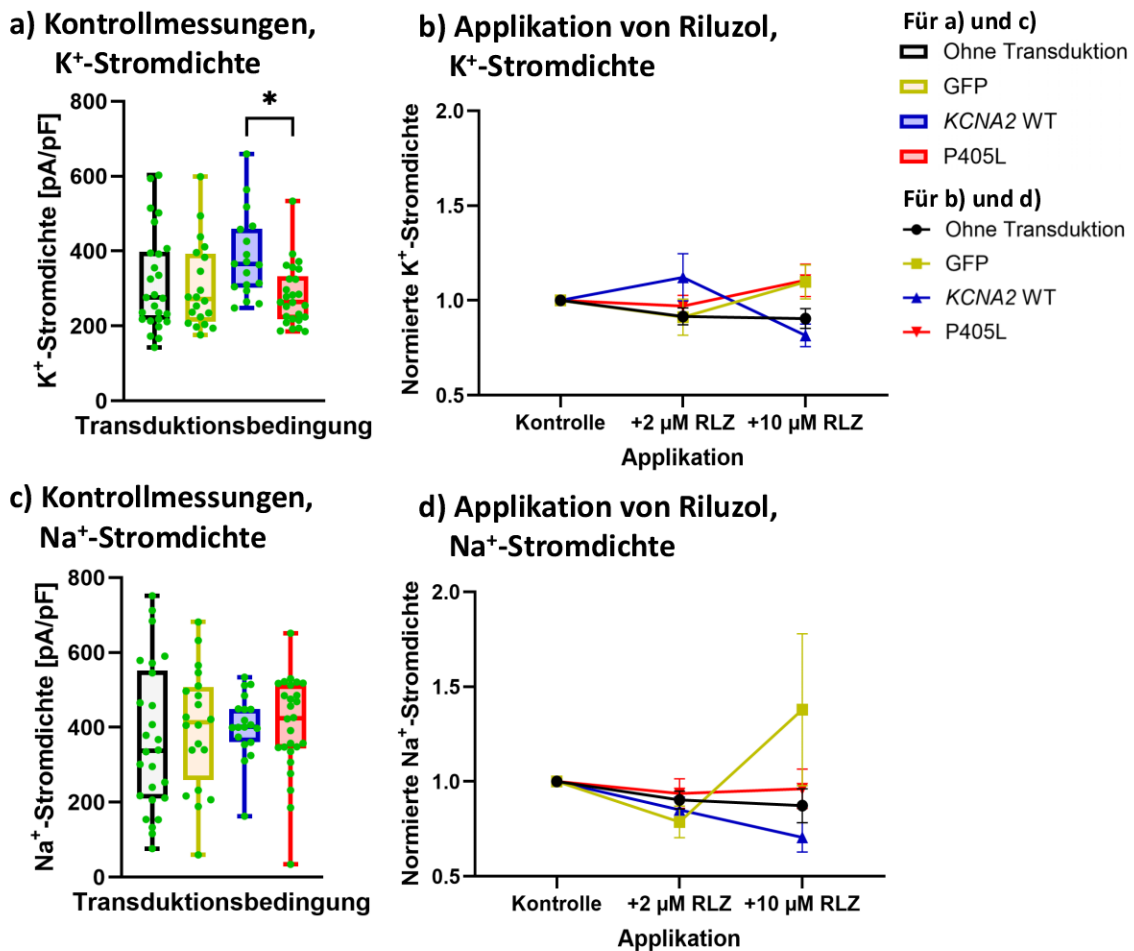


Abbildung 5: **Gemeinsame Darstellung der Kaliumstromdichte (bei +30 mV) und Natriumstromdichte (bei -20 mV) in pA/pF in Neuronen.**

KCNA2 WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP, Kontrolle ohne Transduktion. Dieselben Zellen wurden dabei 2-mal nacheinander gemessen - Kontrollmessung und nach Applikation von Riluzol. Die gemeinsame Darstellung der Effekte von 2 und 10 µM Riluzol ergibt sich aus dem gleichen Wert für die Kontrolle (Grund: Normierung). a) Kaliumstromdichte in pA/pF, Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (n = 18 bis n = 26). b) Normierte Kaliumstromdichte, 2 und 10 µM Riluzol (n = 6 bis n = 9). c) Natriumstromdichte in pA/pF, Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (n = 19 bis n = 26). d) Normierte Natriumstromdichte, 2 und 10 µM Riluzol (n = 6 bis n = 9), für a) und c) 1-way ANOVA und für b) und d) 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

Die Anwendung von Riluzol führte bei den Messungen in Neuronen zu keinen wesentlichen Veränderungen der Stromdichte des Gesamtkaliumstroms. Es traten jedoch Unterschiede in beide Richtungen auf (Erhöhung und Verringerung der Stromdichte), die teilweise statistisch signifikant waren. Da systematische Effekte von Riluzol fehlen, ist anzunehmen, dass diese Unterschiede innerhalb der natürlichen Messvariationen liegen

(Tabelle 7 und Abb. 5b).

	KCNA2 WT	P405L	GFP	ohne Transduktion
	(n = 6)	(n = 9)	(n = 7)	(n = 8)
Kontrolle	1 ± 0,20	1 ± 0,06	1 ± 0,05	1 ± 0,20
+2 µM RLZ	1,12 ± 0,12	0,97 ± 0,06	0,91 ± 0,10	0,92 ± 0,04
	(n = 6)	(n = 9)	(n = 7)	(n = 8)
Kontrolle	1 ± 0,15	1 ± 0,06	1 ± 0,14	1 ± 0,11
+10 µM RLZ	0,82 ± 0,06*	1,11 ± 0,09	1,10 ± 0,09	0,91 ± 0,05

Tabelle 7: **Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der normierten Stromdichte des Gesamtkaliumstroms**, +30 mV, Neuronen, 2 und 10 µM Riluzol, 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

3.2.2 Stromdichte des Gesamtnatriumstroms in Neuronen

Außerdem zeige ich im Folgenden exemplarisch die Rohdaten von Messungen des Gesamtnatriumstroms an Nervenzellen der Bedingung P405L (LOF, *KCNA2*) um eine Vorstellung über die Wirkung von Riluzol auf die Stromdichte des Gesamtnatriumstroms in Neuronen zu ermöglichen (Abb. 6) bzw. v.a. auch die auftretenden space-clamp Artefakte zu veranschaulichen (siehe 2.1.1 Unterkapitel „Limitationen der Messungen des Gesamtnatriumstroms in Neuronen“). Die rot markierte Spur stellt den Gesamtnatriumstrom bei -20 mV dar. Diese sieht im Vergleich zur weiter ins Negative reichende Spur (Gesamtnatriumstrom bei -30 mV) glatter und regelrechter aus. Dieser Bogen/Verzerrung im Stromverlauf bei -30 mV deutet darauf hin, dass dort ein space-clamp Artefakt aufgrund eines ungleichmäßiger verteilten Membranpotentials vorliegt. Das space-clamp Artefakt ist normalerweise bei negativeren Membranpotentialen (z.B. -30 mV) deutlicher vorhanden, weil bei diesen Potentialen die elektrische Kontrolle weniger gleichmäßig ist und es mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu räumlichen Ungleichgewichten kommen kann. Bei -20 mV sind die Ströme durch die Natriumkanäle i.d.R. außerdem stabiler (Aktivierung der Natriumkanäle bei -20 mV stärker und stabiler und der Gesamtnatriumstrom somit insgesamt weniger anfällig für space-clamp Artefakte). Aus diesem Grund habe ich bei der Auswertung der Natriumströme, die Messergebnisse bei -20 mV herangezogen. Trotzdem soll an dieser Stelle erneut betont werden, dass die Ergebnisse lediglich als Annäherung an die echten Natriumströme dienen können, da keine Kaliumkanalblocker verwendet wurden und space-clamp Artefakte auftreten.

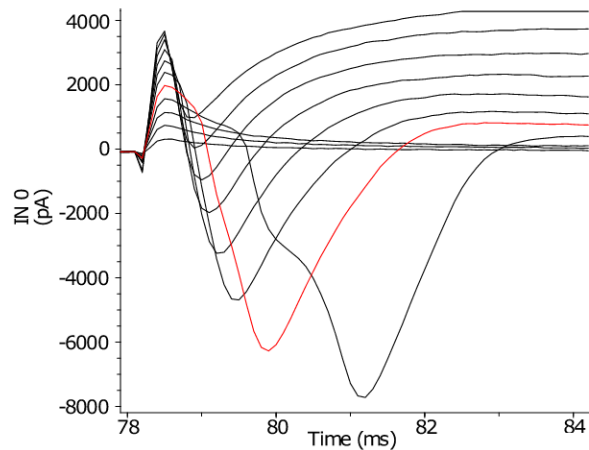
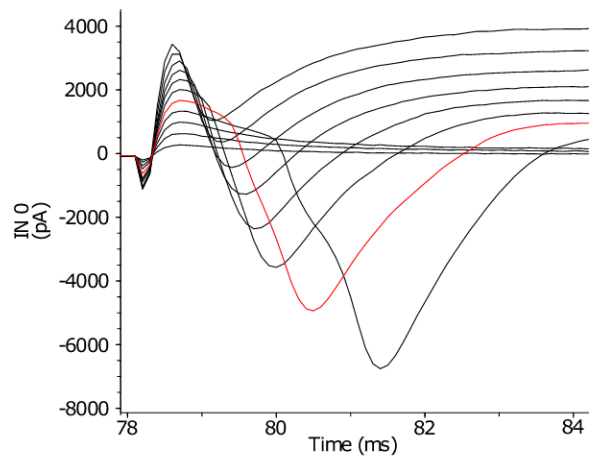
a) Kontrollmessung**b) +10 μ M**

Abbildung 6: Exemplarische Rohdaten der Messungen des Gesamtnatriumstroms, P405L (LOF, *KCNA2*), in Neuronen.

a) Kontrollmessung ohne Applikation von Riluzol. b) 10 μ M Riluzol (In Rot: Messung des Gesamtnatriumstroms bei -20 mV). Siehe Beschreibungen zu space-clamp Artefakten (siehe oben bei 3.2.2 „Stromdichte des Gesamtnatriumstroms in Neuronen“).

Im folgenden Abschnitt beschreibe ich den Einfluss von Riluzol auf die Stromdichte des Gesamtnatriumstroms bei den vier verschiedenen Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Transduktion. Um den Einfluss von Riluzol zu zeigen, erfolgt die Angabe als relative Änderung im Vergleich zu einer Baseline. Die Baseline entspricht dabei der Kontrollmessung ohne Applikation, bevor für die darauffolgende Messung die Applikation von Riluzol durchgeführt wurde. Außerdem sollen die Auswirkungen der verschiedenen Transduktionsbedingungen auf den Gesamtnatriumstrom unabhängig von Riluzol aufgezeigt werden. In diesen Fällen wird die Höhe der Stromdichte des Gesamtnatriumstroms als absoluter Wert angegeben, nicht relativ zur Baseline.

Bei den verschiedenen Transduktionsbedingungen ergeben sich bei den Kontrollmessun-

gen ohne Riluzol keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Höhe der Stromdichte des Gesamtnatriumstroms (Tabelle 8 und Abb. 5c)

	KCNA2 WT (n = 19)	P405L (n = 26)	GFP (n = 20)	ohne Transduktion (n = 26)
Kontrolle	405,54 ± 19,65	404,54 ± 25,62	399,14 ± 35,71	367,30 ± 38,45

Tabelle 8: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Stromdichte des Gesamtnatriumstroms in pA/pF, -20 mV, in Neuronen, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Die Applikation von Riluzol führt weder für 2 μM noch für 10 μM zu einer wesentlichen Veränderung der Stromdichte des Gesamtnatriumstroms. Aufgrund der bereits mehrfach genannten Limitationen dieser Messungen dienen diese jedoch lediglich als Annäherung an die echten Ergebnisse des Gesamtnatriumstroms. Somit lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass Riluzol in meinen Experimenten zu keinen systematischen Veränderungen der Stromdichte des Gesamtnatriumstroms beigetragen hat (Tabelle 9 und Abb. 5d).

	KCNA2 WT (n = 7)	P405L (n = 9)	GFP (n = 7)	ohne Transduktion (n = 8)
Kontrolle	1 ± 0,07	1 ± 0,15	1 ± 0,14	1 ± 0,18
+2 μM RLZ	0,85 ± 0,07	0,94 ± 0,08	0,79 ± 0,08**	0,90 ± 0,05
	(n = 6)	(n = 9)	(n = 7)	(n = 8)
Kontrolle	1 ± 0,13	1 ± 0,15	1 ± 0,19	1 ± 0,13
+10 μM RLZ	0,71 ± 0,08	0,96 ± 0,10	1,38 ± 0,40	0,87 ± 0,09

Tabelle 9: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der normierten Stromdichte des Gesamtnatriumstroms, -20 mV, Neuronen, 2 und 10 μM Riluzol, 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

3.3 Neuronale Eigenschaften, whole-cell patch-clamp Messungen

Die Messung der neuronalen Eigenschaften dient v.a. der Überprüfung der Hypothese, den aus der Literatur für Riluzol bekannten Effekt einer use-dependent Natrium-Kanal-Blockade unter der Bedingung einer vorhandenen KCNA2-LOF-Mutation für Einzelzellen zu untersuchen (siehe 1.5 „Wissenschaftliche Fragestellungen“). Dabei stehen die Ergebnisse der Messungen der Anzahl der Aktionspotentiale und der Aktionspotential-Schwelle im Mittelpunkt.

3.3.1 Eingangswiderstand

Im Folgenden stelle ich den Einfluss von Riluzol auf den Eingangswiderstand bei den verschiedenen Bedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Transduktion dar. Außerdem sollen die Auswirkungen der verschiedenen Transduktionsbedingungen auf die Höhe des Eingangswiderstandes aufgezeigt werden.

Bei diesen Messungen ist v.a. der geringere Eingangswiderstand für die Zellen der Bedingung P405L (LOF, *KCNA2*) im Vergleich zu den anderen Transduktionsbedingungen auffällig. Die Applikation von Riluzol führt hingegen zu keinen systematischen Veränderungen des Eingangswiderstands. Unterhalb von Abb. 7 finden sich ausführlichere Ausführungen zu den Ergebnissen der Messungen des Eingangswiderstands.

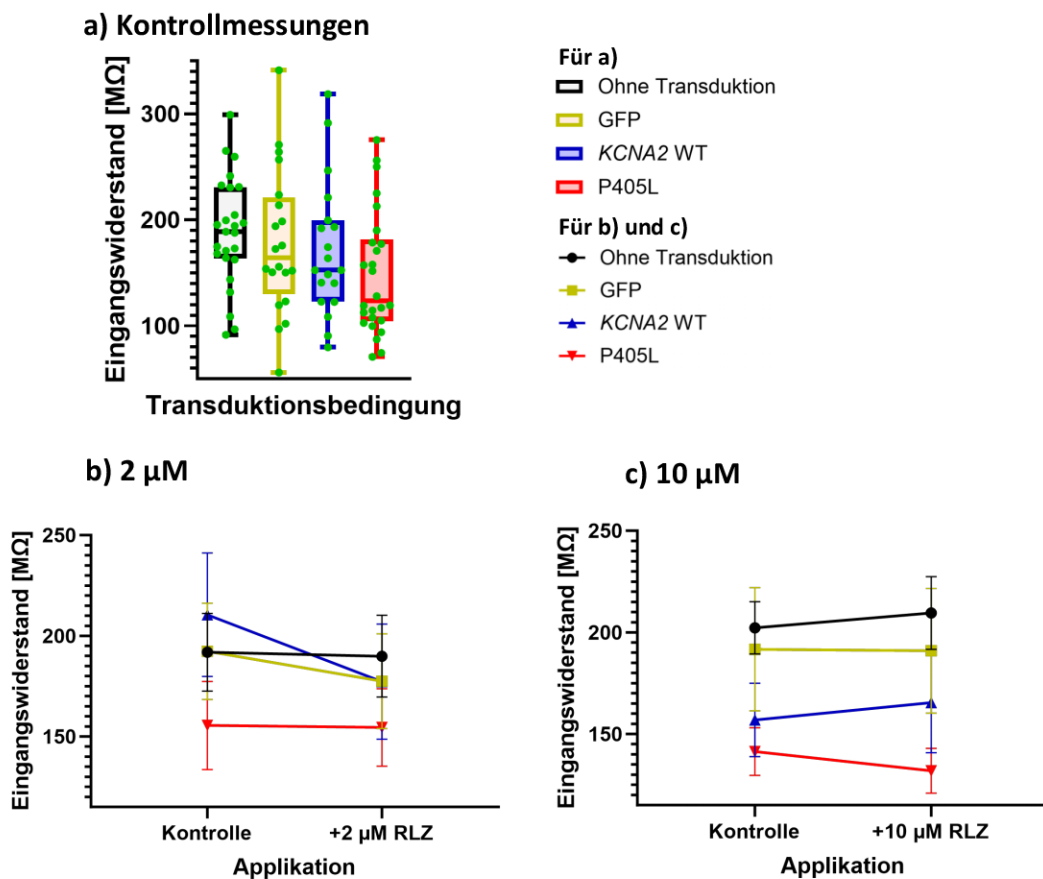


Abbildung 7: Eingangswiderstände in MΩ in Neuronen.

KCNA2 WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP, Kontrolle ohne Transduktion. Dieselben Zellen wurden dabei 2-mal nacheinander gemessen - Kontrollmessung und nach Applikation von Riluzol. a) Eingangswiderstände in MΩ, Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (n = 19 bis n = 26). b) Eingangswiderstände in MΩ, 2 μM Riluzol (n = 7 bis n = 9). c) Eingangswiderstände in MΩ, 10 μM Riluzol (n = 6 bis n = 9), für a) 1-way ANOVA und für b-c) 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Bei den verschiedenen Transduktionsbedingungen ergeben sich bei den Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Höhe des Eingangswiderstandes (Tabelle 10 und Abb. 7a).

	<i>KCNA2</i> WT (n = 19)	P405L (n = 26)	GFP (n = 20)	ohne Transduktion (n = 25)
Kontrolle	171,6 ± 14,6	148,4 ± 11,4	178,6 ± 15,4	188,5 ± 10,3

Tabelle 10: **Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Eingangswiderstände** in MΩ in Neuronen, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Die Applikation von Riluzol führte bei den Messungen des Eingangswiderstands in Neuronen zu keinen wesentlichen Veränderungen. Unterschiede in beide Richtungen konnten festgestellt werden (Anstieg und Abfall des Eingangswiderstands), die vereinzelt statistische Signifikanz erreichten. Aufgrund fehlender systematischer Effekte von Riluzol kann man davon ausgehen, dass sich diese Unterschiede innerhalb natürlicher Messschwankungen befinden (Tabelle 11 und Abb. 7b-c).

	<i>KCNA2</i> WT	P405L	GFP	ohne Transduktion
+2 μM RLZ	(n = 7)	(n = 9)	(n = 7)	(n = 8)
Kontrolle	210,5 ± 30,7	155,5 ± 21,9	192,3 ± 23,9	191,9 ± 19,3
+2 μM RLZ	177,3 ± 28,5**	154,5 ± 19,3	177,5 ± 23,5	189,9 ± 20,3
+10 μM RLZ	(n = 6)	(n = 9)	(n = 7)	(n = 7)
Kontrolle	157,0 ± 18,0	141,4 ± 11,7	191,7 ± 30,3	202,3 ± 12,9
+10 μM RLZ	165,4 ± 24,6	132,0 ± 11,0	190,9 ± 30,7	209,5 ± 17,9

Tabelle 11: **Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Eingangswiderstände** in MΩ, Neuronen, 2 und 10 μM Riluzol, 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

3.3.2 Ruhemembranpotential

Nachfolgend präsentiere ich den Einfluss von Riluzol auf das Ruhemembranpotential bei den vier verschiedenen Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Transduktion. Außerdem sollen die Auswirkungen der verschiedenen Transduktionsbedingungen auf die Höhe des Ruhemembranpotentials aufgezeigt werden. Bei diesen Messungen ist v.a. das deutlich höhere Ruhemembranpotential für die Transduktionsbedingung ohne Transduktion im Vergleich zu den anderen Transduktionsbedingungen auffällig. Die Applikation von Riluzol führt hingegen zu keinen systematischen Veränderungen bezogen auf Effekte auf das Ruhemembranpotential (Abb. 8).

Nach Abb. 8 werden die Ergebnisse der Messungen des Ruhemembranpotentials ausführlicher beschrieben.

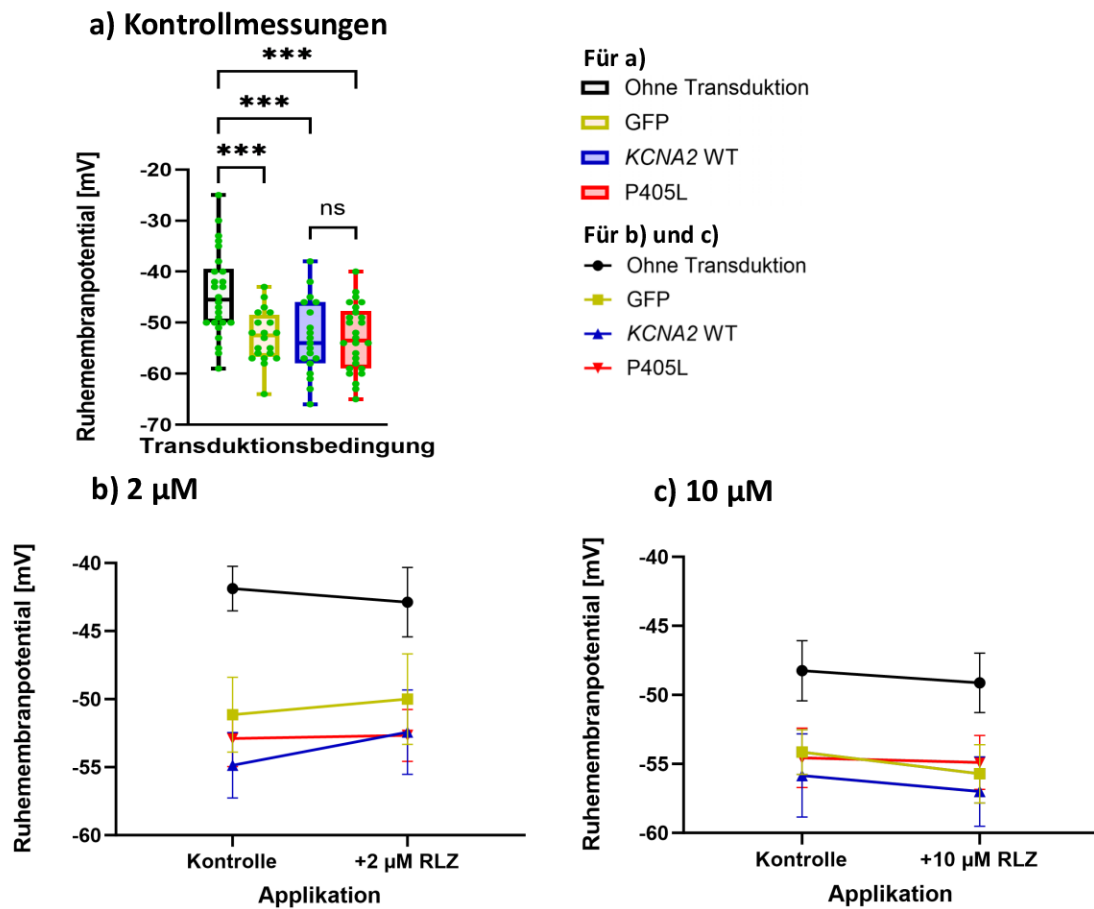


Abbildung 8: **Ruhemembranpotential in mV in Neuronen.**

KCNA2 WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP, Kontrolle ohne Transduktion. Dieselben Zellen wurden dabei 2-mal nacheinander gemessen - Kontrollmessung und nach Applikation von Riluzol. a) Ruhemembranpotential in mV, Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (n = 19 bis n = 26). b) Ruhemembranpotential in mV, 2 µM Riluzol (n = 7 bis n = 9). c) Ruhemembranpotential in mV, 10 µM Riluzol (n = 6 bis n = 9), für a) 1-way ANOVA und für b-c) 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

Zwischen den verschiedenen Transduktionsbedingungen ergeben sich bei den Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol statistisch stark signifikante Unterschiede für die Höhe des Ruhemembranpotentials ($p < 0,0001$ und $F = 9,230$). Im paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen (Post-hoc-Test) zeigt sich, dass dies am Unterschied der Transduktionsbedingung ohne Transduktion zu den anderen Transduktionsbedingungen liegt. Das Ruhemembranpotential ist dabei deutlich höher als bei den anderen Transduk-

tionsbedingungen (jeweils statistisch stark signifikante Unterschiede) (Tabelle 12 und Abb. 8a).

	KCNA2 WT (n = 19)	P405L (n = 26)	GFP (n = 20)	ohne Transduktion (n = 26)
Kontrolle	- 53,0 ± 1,7	- 53,1 ± 1,3	- 52,8 ± 1,1	- 44,4 ± 1,6****

Tabelle 12: **Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Ruhemembranpotentiale** in mV in Neuronen, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

Die Anwendung von Riluzol zeigte bei den Messungen des Ruhemembranpotentials in Neuronen keine wesentlichen Veränderungen. Es konnten Unterschiede in beide Richtungen beobachtet werden (Erhöhung und Verringerung des Ruhemembranpotentials), die sehr vereinzelt statistische Signifikanz aufweisen. Da jedoch keine systematischen Effekte von Riluzol nachgewiesen wurden, ist davon auszugehen, dass diese Unterschiede innerhalb der natürlichen Messschwankungen liegen (Tabelle 13 und Abb. 8c).

	KCNA2 WT (n = 7)	P405L (n = 9)	GFP (n = 7)	ohne Transduktion (n = 8)
+2 μ M RLZ				
Kontrolle	- 54,9 ± 2,4	- 52,9 ± 2,1	- 51,1 ± 2,8	- 41,9 ± 1,6
+2 μ M RLZ	- 52,4 ± 3,1	- 52,7 ± 1,9	- 50,0 ± 3,3	- 42,9 ± 2,6
+10 μ M RLZ				
Kontrolle	- 55,8 ± 3,0	- 54,6 ± 2,2	- 54,1 ± 1,6	- 48,3 ± 2,2
+10 μ M RLZ	- 57,0 ± 2,5	- 54,9 ± 2,0	- 55,7 ± 2,1	- 49,1 ± 2,1

Tabelle 13: **Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Ruhemembranpotentiale** in mV, Neuronen, 2 μ M Riluzol, 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

3.3.3 Anzahl der Aktionspotentiale

Zu Beginn der Ergebnisvorstellung der Anzahl der Aktionspotentiale meiner Experimente mit Riluzol möchte ich exemplarisch Rohdaten der verschiedenen Transduktionsbedingungen und für die beiden verwendeten Konzentrationen von Riluzol zeigen, um eine Vorstellung über die Wirkung von Riluzol auf die Anzahl der Aktionspotentiale zu ermöglichen (Abb. 9). Man kann erkennen, dass 10 μ M Riluzol eine stärkere Wirkung auf die Anzahl der Aktionspotentiale hat als 2 μ M Riluzol (deutlich stärkere Abnahme der Anzahl). Außerdem zeigt sich, dass bei einer Strominjektion von 0,1 nA auch schon vor der Applikation von Riluzol teilweise kein Aktionspotential erzeugt wird. Eine deutlich höhere Anzahl von Aktionspotentialen ergibt sich bei 0,2 nA.

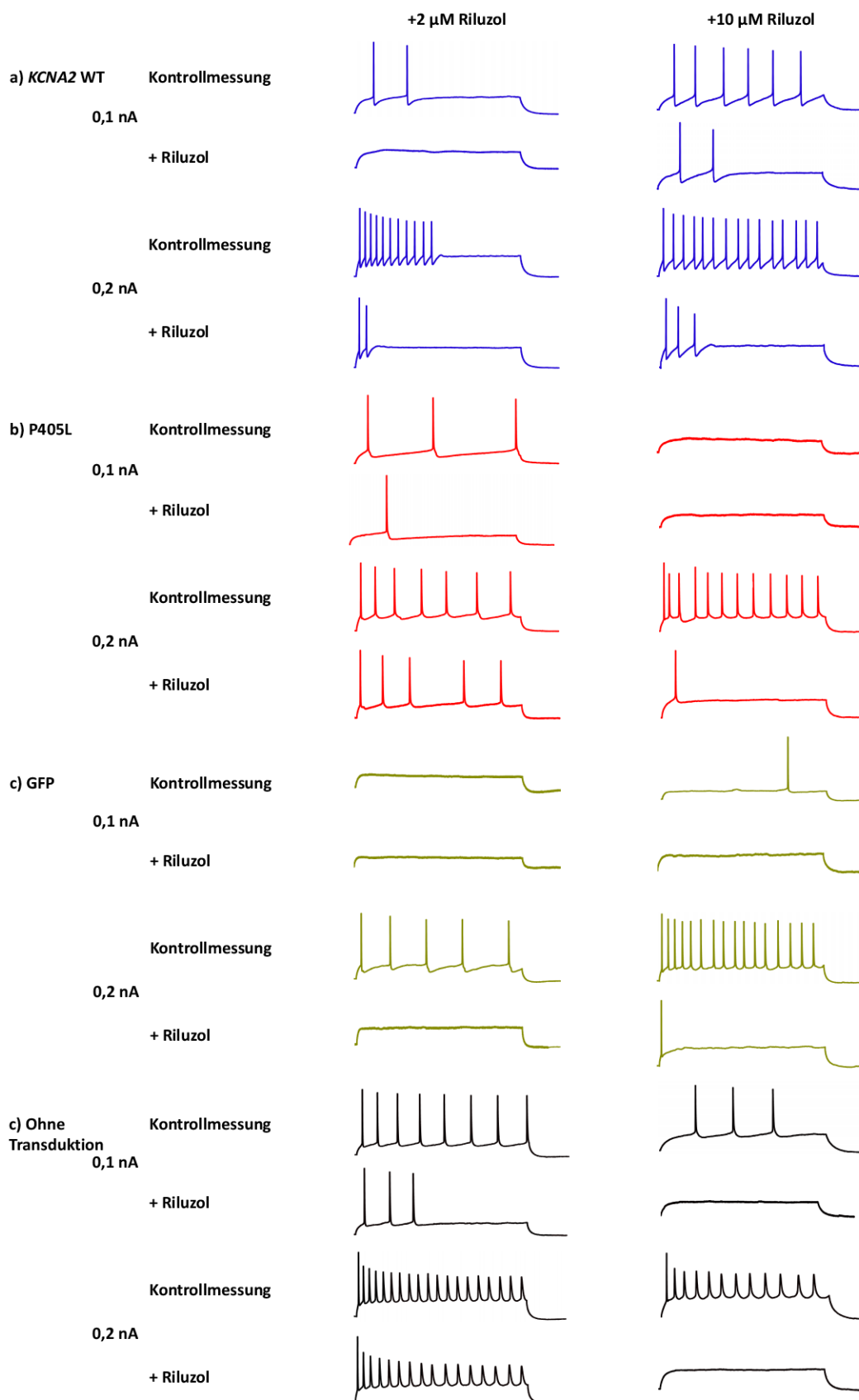


Abbildung 9: Exemplarische Rohdaten der Messungen der Anzahl der Aktionspotentiale in Neuronen.

a) *KCNA2* WT, b) P405L (LOF, *KCNA2*), c) GFP, d) Kontrolle ohne Transduktion. Kontrollmessung und Messung nach Applikation von Riluzol, jeweils bei 0,1 bzw. 0,2 nA.

Im folgenden Abschnitt zeige ich den Einfluss von Riluzol auf die Anzahl der Aktionspotentiale nach Strominjektion bei den vier verschiedenen Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Transduktion. Außerdem sollen die Auswirkungen der verschiedenen Transduktionsbedingungen auf die Anzahl der durch Strominjektion ausgelösten Aktionspotentiale aufgezeigt werden. Bei diesen Messungen ist einerseits zu betonen, dass sich bei den Kontrollmessungen eine deutlich höhere Anzahl an Aktionspotentialen bei der Transduktionsbedingung *KCNA2* WT im Vergleich zu der Bedingung P405L (LOF, *KCNA2*) finden lässt. Andererseits ist festzuhalten, dass die Applikation von Riluzol einen stark reduzierenden Effekt auf die Anzahl der Aktionspotentiale bei allen Transduktionsbedingungen hat. Dabei ist der Effekt von 10 μM Riluzol deutlich stärker als der Effekt von 2 μM Riluzol. Unterhalb von Abb. 10 und 11 finden sich ausführlichere Ausführungen zu den Ergebnissen der Messungen der Anzahl der Aktionspotentiale. Generell lassen sich viele statistisch signifikante Effekte bei den Messungen beobachten. Bei allen Messungen liegt eine hohe statistische Signifikanz für Unterschiede der Anzahl der Aktionspotentiale mit steigender Strominjektion vor. Der Einfachheit halber wird darauf im Folgenden nur noch am Rande eingegangen.

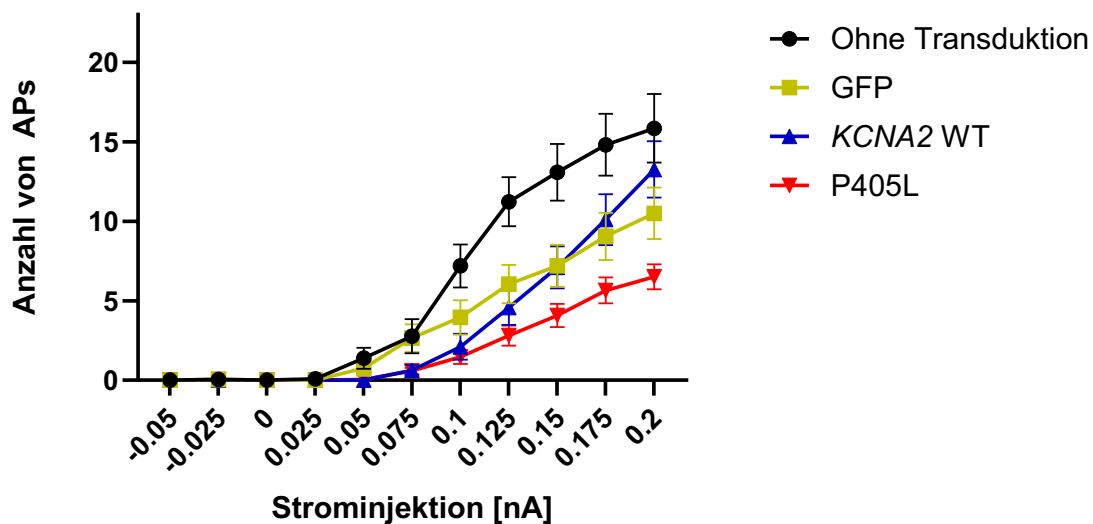


Abbildung 10: Kontrollmessungen der Anzahl der Aktionspotentiale nach Strominjektion in Neuronen.

KCNA2 WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP, Kontrolle ohne Transduktion. Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte ($n = 19$ bis $n = 26$), 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

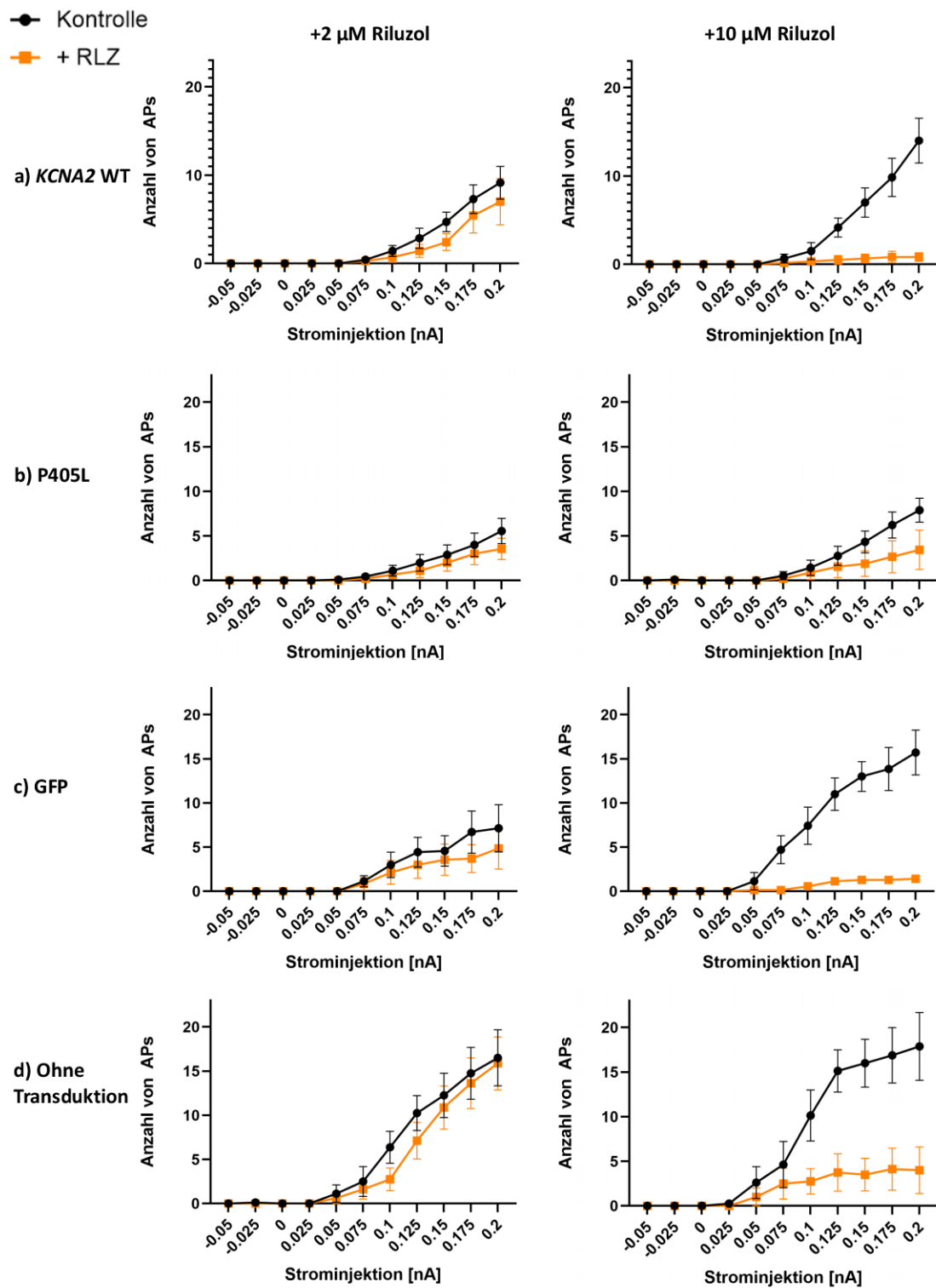


Abbildung 11: Anzahl der Aktionspotentiale nach Applikation von Riluzol, in Neuronen. Dieselben Zellen wurden dabei 2-mal nacheinander gemessen - Kontrollmessung und nach Applikation von Riluzol. Links Applikation von 2 μM RLZ und rechts Applikation von 10 μM RLZ. a) *KCNA2* WT (n = 6 bis n = 7). b) P405L (LOF, *KCNA2*) (jeweils n = 9). c) GFP (jeweils n = 7). d) Kontrolle ohne Transduktion (jeweils n = 8), 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Zunächst soll der Einfluss der verschiedenen Transduktionsbedingungen auf die Anzahl der Aktionspotentiale nach Strominjektion dargestellt werden. Bei allen Transduktionsbedingungen kommt es zu einer Zunahme der Anzahl der Aktionspotentiale im Laufe der Experimente (Tabelle 14 und Abb. 10). Bei den Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol zeigen sich statistisch stark signifikante Unterschiede für die beiden Haupteffekte der Faktoren „steigende Strominjektion“ und „Transduktionsbedingung“ und für die Interaktion dieser beiden Faktoren (Interaktion: $p < 0,0001$ und $F = 4,132$, steigende Strominjektion: $p < 0,0001$ und $F = 81,68$, Transduktionsbedingung: $p < 0,0001$ und $F = 39,42$). Beim paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen (Post-hoc-Test) fällt auf, dass sich erst ab einer Strominjektion in Höhe von 0,1 nA statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ergeben. Zunächst finden sich dabei statistisch signifikante Unterschiede nur zwischen der Transduktionsbedingung ohne Transduktion und den anderen Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT und P405L (LOF, *KCNA2*) (stärkste statistische Signifikanz zwischen P405L (LOF, *KCNA2*) und dem Zustand ohne Transduktion gegeben, z.B. $p < 0,0001$ und $t = 4,519$ bei Strominjektion von 0,1 nA). Bei Vergleichen der drei Zustände mit Transduktion untereinander finden sich ab einer Strominjektion in Höhe von 0,175 nA statistisch signifikante Unterschiede in der Anzahl der Aktionspotentiale (z.B. $p < 0,0001$ und $t = 4,900$ bei Strominjektion von 0,2 nA zwischen P405L (LOF, *KCNA2*) und *KCNA2* WT). Um eine gewisse Übersichtlichkeit zu gewährleisten, werden in der folgenden Tabelle die Anzahl der Aktionspotentiale nur für die Strominjektionen in Höhe von 0, 0,1 und 0,2 nA dargestellt (Tabelle 14).

	<i>KCNA2</i> WT (n = 19)	P405L (n = 26)	GFP (n = 20)	ohne Transduktion (n = 26)
0 nA	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0.1 nA	2,11 ± 0,81	1,46 ± 0,43	3,95 ± 1,09	7,19 0 ± 1,35
0.2 nA	13,26 ± 1,78	6,50 ± 0,79****	10,50 ± 1,62	15,85 ± 2,15

Tabelle 14: **Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Anzahl der Aktionspotentiale nach Strominjektion in Neuronen**, 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

In meinen Messungen mit Riluzol konnten zahlreiche statistisch signifikante Unterschiede nach der Applikation von Riluzol gezeigt werden (Tabelle 15 und Abb. 11). Es muss betont werden, dass 10 μ M Riluzol bei allen Bedingungen zu einem statistisch stärker signifikanten Effekt führen als 2 μ M Riluzol. Um einen übersichtlichen Zugang dazu zu ermöglichen, beschränke ich mich dabei auf die Beschreibung des Haupteffektes des Faktors „Applikation von Riluzol“, der für beide Konzentrationen von Riluzol bei allen Transduktionsbedingungen zu einem statistisch signifikanten Unterschied geführt hat:

- *KCNA2* WT: für 2 μM $p = 0,005$ und $F = 8,45$, für 10 μM $p < 0,0001$ und $F = 90,41$
- P405L (LOF, *KCNA2*): für 2 μM $p < 0,0001$ und $F = 28,33$, für 10 μM $p < 0,0001$ und $F = 41,96$
- GFP: für 2 μM $p < 0,0001$ und $F = 19,68$, für 10 μM $p < 0,0001$ und $F = 151,6$
- Ohne Transduktion: für 2 μM $p < 0,0001$ und $F = 40,91$, für 10 μM $p < 0,0001$ und $F = 63,42$

	<i>KCNA2</i> WT, 2 μM (n = 7)	<i>KCNA2</i> WT, 10 μM (n = 6)
Kontrolle	9,14 \pm 1,84	14,00 \pm 2,53
+ RLZ	7,00 \pm 2,62 ^{ns}	0,83 \pm 0,48 ^{****}
	P405L, 2 μM (n = 9)	P405L, 10 μM (n = 9)
Kontrolle	5,56 \pm 1,42	7,89 \pm 1,34
+ RLZ	3,56 \pm 1,18 ^{****}	3,44 \pm 2,19 ^{****}
	GFP, 2 μM (n = 7)	GFP, 10 μM (n = 7)
Kontrolle	7,14 \pm 2,67	15,71 \pm 2,54
+ RLZ	4,86 \pm 2,33 ^{**}	1,43 \pm 0,20 ^{****}
	ohne Transduktion, 2 μM (n = 8)	ohne Transduktion, 10 μM (n = 8)
Kontrolle	16,50 \pm 3,17	17,88 \pm 3,80
+ RLZ	15,88 \pm 3,00 ^{ns}	4,00 \pm 2,61 ^{***}

Tabelle 15: Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte der Anzahl der Aktionspotentiale bei einer Strominjektion von 0,2 nA in Neuronen, 2 und 10 μM Riluzol, 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

3.3.4 Aktionspotential-Schwelle

Zu Beginn der Präsentation der Ergebnisse meiner Experimente, die die Auswirkungen von Riluzol auf die Schwelle der Aktionspotentiale untersucht haben, möchte ich an dieser Stelle exemplarisch die Rohdaten einer Messung mit P405L (LOF, *KCNA2*) zeigen, um eine Vorstellung über die Wirkung von Riluzol auf die Aktionspotential-Schwelle zu ermöglichen (Abb. 12). Man kann sehen, dass nach der Applikation von 10 μM Riluzol das erste Aktionspotential erst bei einem Strompuls von 0,60 nA erzeugt wurde. In der Kontrollmessung an der gleichen Zelle vor Applikation von Riluzol geschah dies bereits bei einem Strompuls von 0,45 nA. Riluzol hat in diesem Fall also die Aktionspotential-Schwelle angehoben.

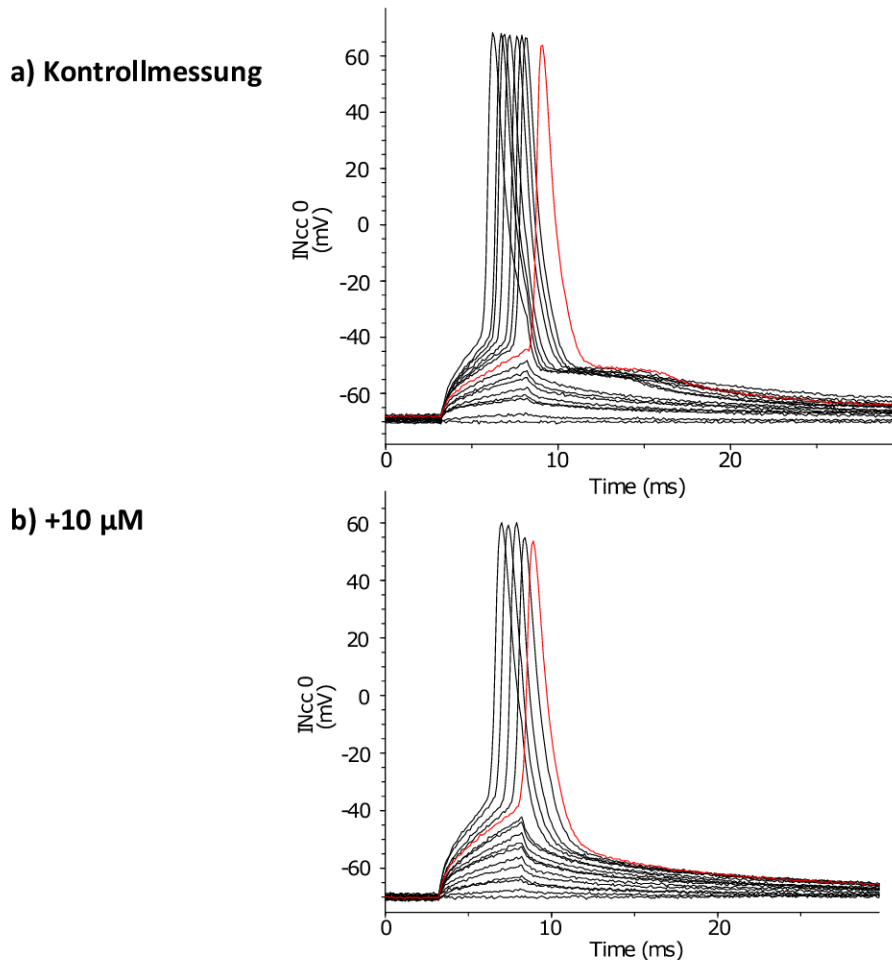


Abbildung 12: Exemplarische Rohdaten der Messungen der Aktionspotential-Schwelle, P405L (LOF, *KCNA2*), in Neuronen.

a) Kontrollmessung ohne Applikation von Riluzol (In Rot: erstes AP ausgelöst bei Strominjektion von 0,45 nA). b) 10 μ M Riluzol (In Rot: erstes AP ausgelöst bei Strominjektion von 0,60 nA).

An dieser Stelle beschreibe ich den Einfluss von Riluzol auf die Aktionspotential-Schwelle bei den vier verschiedenen Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Transduktion. Die Aktionspotential-Schwelle wird dabei durch die Angabe der Strominjektion gezeigt, die nötig war, um ein Aktionspotential auszulösen. Deshalb erfolgt die Angabe der Aktionspotential-Schwelle in nA. Außerdem vergleiche ich die Aktionspotential-Schwelle bei den verschiedenen Transduktionsbedingungen. Bei den Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol lassen sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Transduktionsbedingungen für die Aktionspotential-Schwelle finden. Andererseits fällt auf, dass die Applikation von Riluzol einen anhebenden Effekt auf die Aktionspotential-Schwelle hat. Dabei ist der Effekt erst bei einer Konzentration von 10 μ M Riluzol deutlich auszumachen (mit statistisch signifikanten Unterschieden), bei einer Applikation von 2 μ M Riluzol ist kein wirklicher Effekt festzustellen. Nach Abb. 13 werden die Ergebnisse der Messungen der Aktionspotential-Schwelle ausführlicher beschrieben.

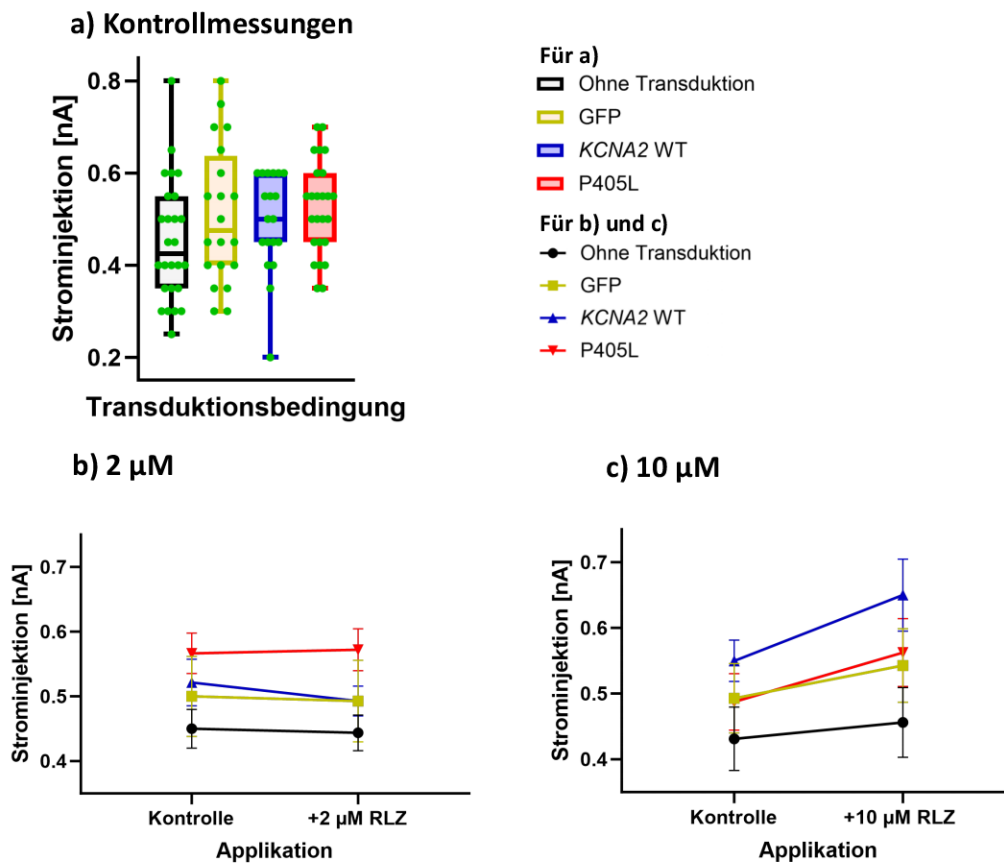


Abbildung 13: **Aktionspotential-Schwelle in nA in Neuronen.**

KCNA2 WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP, Kontrolle ohne Transduktion. Dieselben Zellen wurde dabei 2-mal nacheinander gemessen - Kontrollmessung und nach Applikation von Riluzol. a) Aktionspotential-Schwelle in nA, Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (n = 19 bis n = 26). b) Aktionspotential-Schwelle in nA, 2 μ M Riluzol (n = 7 bis n = 9). c) Aktionspotential-Schwelle in nA, 10 μ M Riluzol (n = 6 bis n = 8), für a) 1-way ANOVA und für b-c) 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Bei den Kontrollmessungen der verschiedenen Transduktionsbedingungen ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Höhe der Aktionspotential-Schwelle. Die Ergebnisse der Kontrollmessungen ohne Riluzol-Applikation lassen sich der folgenden Tabelle entnehmen (Tabelle 16 und Abb. 13a).

	<i>KCNA2</i> WT (n = 19)	P405L (n = 25)	GFP (n = 20)	ohne Transduktion (n = 26)
Kontrolle	$0,50 \pm 0,03$	$0,52 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,03$

Tabelle 16: **Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Aktionspotential-Schwelle in nA in Neuronen**, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Für eine Riluzol-Konzentration von 2 μM ergibt sich kein statistisch signifikanter Effekt (Tabelle 17 und Abb. 13b). Für eine Riluzol-Konzentration von 10 μM ergibt sich ein statistisch stark signifikanter Effekt des Haupteffektes des Faktors „Applikation von Riluzol“ auf die Aktionspotential-Schwelle ($p < 0,0001$ und $F = 25,39$). Für den Haupteffekt des Faktors „Transduktionsbedingung“ und für die Interaktion der beiden Faktoren liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Im paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen (Post-hoc-Test) findet sich ein statistisch signifikanter Effekt zwischen der Kontrollmessung und der Messung nach Applikation von 10 μM Riluzol bei *KCNA2* WT ($p = 0,0011$ und $t = 3,693$) und bei P405L (LOF, *KCNA2*) ($p = 0,0037$ und $t = 3,198$) (Tabelle 17 und Abb. 13c).

	<i>KCNA2</i> WT	P405L	GFP	ohne Transduktion
+2 μM RLZ	(n = 7)	(n = 9)	(n = 7)	(n = 8)
Kontrolle	0,52 \pm 0,04	0,57 \pm 0,03	0,50 \pm 0,50	0,45 \pm 0,03
+2 μM RLZ	0,49 \pm 0,02	0,57 \pm 0,03	0,49 \pm 0,06	0,44 \pm 0,03
+10 μM RLZ	(n = 6)	(n = 8)	(n = 7)	(n = 8)
Kontrolle	0,55 \pm 0,03	0,49 \pm 0,04	0,49 \pm 0,05	0,43 \pm 0,05
+10 μM RLZ	0,65 \pm 0,06**	0,56 \pm 0,05**	0,54 \pm 0,06	0,46 \pm 0,05

Tabelle 17: Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte der Aktionspotential-Schwelle in nA, Neuronen, 2 μM Riluzol, 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

3.4 Netzwerk-Effekte, Mikroelektrodenarray Messungen

Die Messung der Netzwerk-Effekte dient v.a. der Überprüfung der Hypothese, den aus der Literatur für Riluzol bekannten Effekt einer use-dependent Natrium-Kanal-Blockade unter der Bedingung einer vorhandenen *KCNA2*-LOF-Mutation für Zell-Netzwerke zu untersuchen (siehe 1.5 „Wissenschaftliche Fragestellungen“).

3.4.1 Anzahl der Spikes

Nachfolgend präsentiere ich den Einfluss von Riluzol auf die Spikeanzahl innerhalb von 10 Minuten bei den verschiedenen Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Transduktion. Außerdem sollen die Auswirkungen der verschiedenen Bedingungen auf die Höhe der Spikeanzahl gezeigt werden. Bei diesen Messungen fallen zum einen die durchschnittlich höhere Spikeanzahl für alle drei Transduktionsbedingungen neben *KCNA2* WT auf (statistisch allerdings nicht signifikant). Außerdem führt die Applikation von Riluzol bei allen untersuchten Bedingungen zu einer Abnahme der Spikeanzahl. Der Effekt von Riluzol nimmt dabei mit steigender Konzentration zu. Nach Abb. 14 werden die Ergebnisse der Messungen ausführlicher dargestellt.

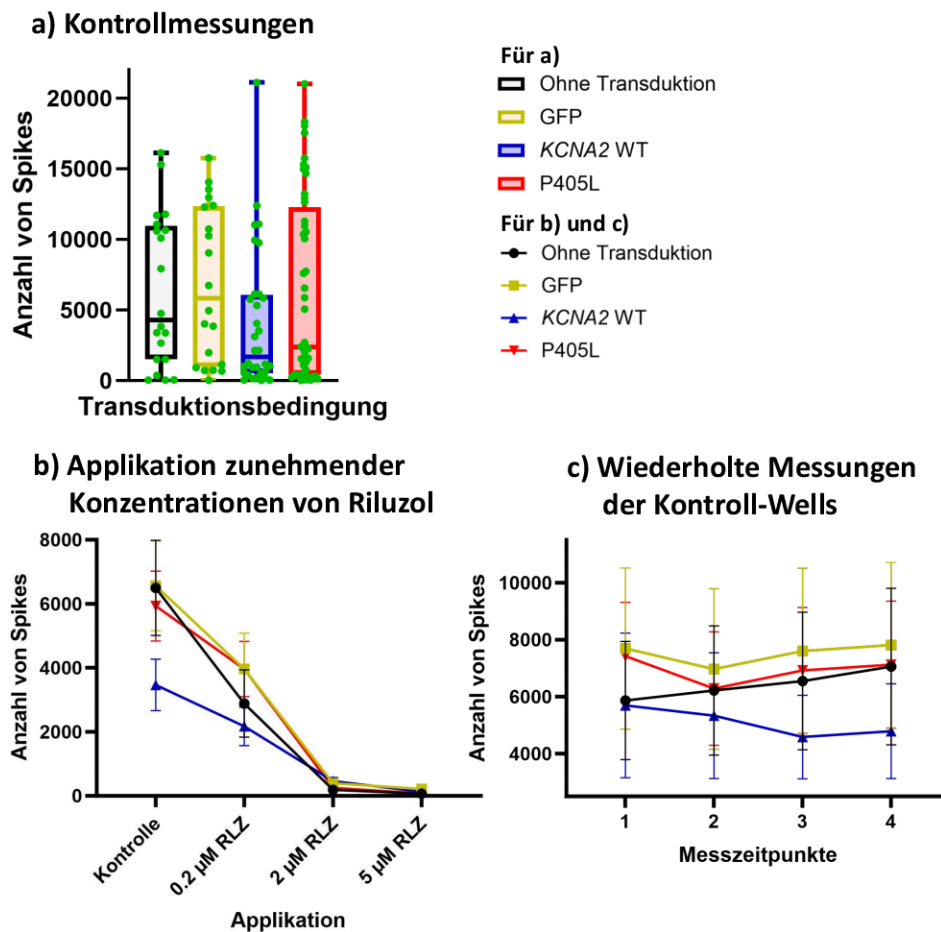


Abbildung 14: **Spikeanzahl innerhalb von 10 Minuten.**

KCNA2 WT, P405L (LOF, KCNA2), GFP, Kontrolle ohne Transduktion. Dieselben Wells wurden dabei vier mal nacheinander gemessen - Kontrollmessung und nach Applikation zunehmender Konzentrationen von Riluzol. Diese vier genannten Messzeitpunkte entsprechen auch den vier Messzeitpunkte der Kontroll-Wells (Abb. 14c) - die Messungen fanden ca. bei Minute 0, 12, 24 und 36 statt. a) Spikeanzahl, Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (ein Zeitpunkt - keine Messwiederholungen) (n = 20 bis n = 48). b) Spikeanzahl, aufsteigende Applikation von Riluzol (0,2, 2 und 5 µM) (n = 15 bis n = 36). c) Spikeanzahl, Wiederholte Messungen der Kontroll-Wells ohne Applikation von Riluzol (n = 5 bis n = 12), für a) 1-way ANOVA und für b-c) 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Bei den verschiedenen Bedingungen ergeben sich bei den Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol keine statistisch signifikanten Unterschiede der Spikeanzahl (Tabelle 18 und Abb. 14a).

	KCNA2 WT (n = 32)	P405L (n = 48)	GFP (n = 20)	ohne Transduktion (n = 20)
Kontrolle	4021,77 ± 867,50	6304,58 ± 938,76	6843,49 ± 1231,57	6340,62 ± 1203,21

Tabelle 18: **Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Anzahl der Spikes**, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Bei den Messungen ergeben sich statistisch stark signifikante Unterschiede in der Spikeanzahl. Für den Haupteffekt des Faktors „steigende Riluzolkonzentration“ liegt ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$ und $F = 57,30$) vor. Für den Haupteffekt des Faktors „Transduktionsbedingung“ und für die Interaktion dieser beiden Faktoren liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Beim paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen (Post-hoc-Test) zeigen sich bei den Kontrollmessungen ohne Riluzolapplikation keine statistisch signifikanten Veränderungen im Laufe der Messungen (in dem Fall also ausschließlich im zeitlichen Verlauf und ohne steigende Riluzolapplikationen) (Abb. 14c). Bei allen Gruppen mit Riluzolapplikation zeigen sich statistisch signifikante Abnahmen der Anzahl der Spikes (Tabelle 19 und Abb. 14b). Für alle Transduktionsbedingungen außer *KCNA2* WT liegt dieser statistisch signifikante Effekt bereits bei einer Riluzolkonzentration von $0,2 \mu\text{M}$ vor. Generell wird der statistisch signifikante Effekt mit steigender Riluzolkonzentration stärker. Der Einfachheit halber werden in der folgenden Tabelle (Tabelle 19) nur die Messwiederholungen mit Riluzolapplikation dargestellt.

	<i>KCNA2</i> WT (n = 24)	P405L (n = 36)	GFP (n = 15)	ohne Transduktion (n = 15)
Kontrolle	3465,36 ± 802,70	5931,36 ± 1090,38	6561,66 ± 1400,02	6498,49 ± 1484,16
+0,2 μM RLZ	2172,51 ± 606,30 ^{ns}	3964,30 ± 864,48**	3961,32 ± 1123,13*	2883,61 ± 1052,12*
+2 μM RLZ	460,58 ± 110,66**	250,65 ± 82,36****	397,14 ± 124,16**	191,68 ± 59,87**
+5 μM RLZ	131,97 ± 39,51**	79,46 ± 29,97****	214,95 ± 86,90**	67,87 ± 14,94**

Tabelle 19: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Anzahl der Spikes innerhalb von 10 Minuten, 0,2, 2 und 5 μM Riluzol, 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

3.4.2 Anzahl der Bursts pro Minute

An dieser Stelle präsentiere ich den Einfluss von Riluzol auf die Burstanzahl pro Minute bei den Bedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Transduktion dar. Außerdem sollen die Auswirkungen der verschiedenen Transduktionsbedingungen auf die Höhe der Burstanzahl pro Minute aufgezeigt werden. Bei diesen Messungen fallen zum einen die höhere Burstanzahl pro Minute bei der Bedingung P405L (LOF, *KCNA2*) im Vergleich zu *KCNA2* WT auf (statistisch allerdings nicht signifikant). Zum anderen führt die Applikation von Riluzol bei allen untersuchten Bedingungen zu einer Abnahme der Burstanzahl pro Minute. Der Effekt von Riluzol nimmt dabei mit steigender Konzentration zu.

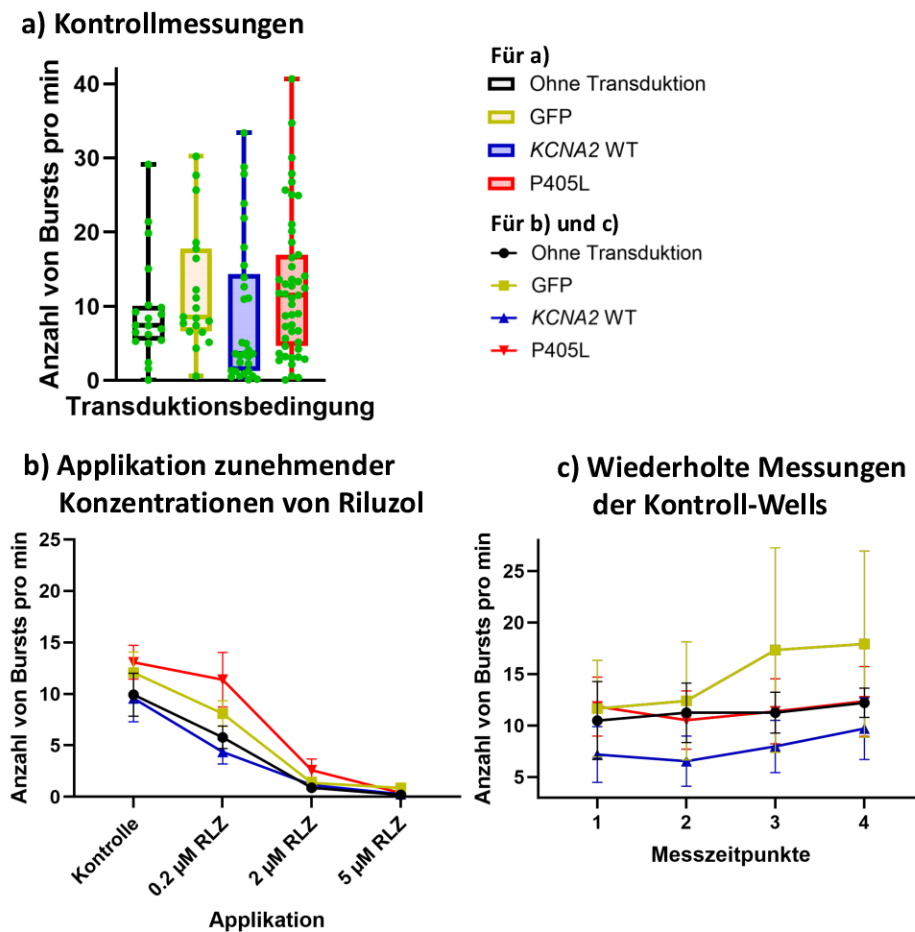


Abbildung 15: **Burstanzahl pro Minuten.**

KCNA2 WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP, Kontrolle ohne Transduktion. Dieselben Wells wurden dabei vier mal nacheinander gemessen - Kontrollmessung und nach Applikation zunehmender Konzentrationen von Riluzol. Diese vier genannten Messzeitpunkte entsprechen auch den vier Messzeitpunkte der Kontroll-Wells (Abb. 15c) - die Messungen fanden ca. bei Minute 0, 12, 24 und 36 statt. a) Burstanzahl pro Minuten, Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (ein Zeitpunkt - keine Messwiederholungen) ($n = 19$ bis $n = 47$). b) Burstanzahl pro Minuten, aufsteigende Applikation von Riluzol (0,2, 2 und 5 μM) ($n = 13$ bis $n = 35$). c) Burstanzahl pro Minuten, Wiederholte Messungen der Kontroll-Wells ohne Applikation von Riluzol ($n = 4$ bis $n = 12$), für a) 1-way ANOVA und für b-c) 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Bei den verschiedenen Transduktionsbedingungen ergeben sich bei den Kontrollmessungen ohne Riluzol keine statistisch signifikanten Unterschiede der Burstanzahl pro Minute. Die Ergebnisse der Kontrollmessungen ohne Riluzol-Applikation lassen sich der folgenden Tabelle entnehmen (Tabelle 20 und Abb. 15a).

	KCNA2 WT (n = 30)	P405L (n = 47)	GFP (n = 19)	ohne Transduktion (n = 20)
Kontrolle	8,70 ± 1,79	12,56 ± 1,40	12,26 ± 1,90	9,33 ± 1,59

Tabelle 20: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Burstanzahl pro Minute, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Bei den Messungen ergeben sich statistisch stark signifikante Unterschiede in der Burstanzahl pro Minute. Der Haupteffekt des Faktors „steigende Riluzolkonzentration“ führt zu einem statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,0001$ und $F = 52,31$). Für den Haupteffekt des Faktors „Transduktionsbedingung“ und für die Interaktion dieser beiden Faktoren liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Beim paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen (Post-hoc-Test) zeigen sich bei den Kontroll-Wells ohne Riluzolapplikation keine statistisch signifikanten Veränderungen der Burstanzahl pro Minute im Laufe der Messungen (in dem Fall also ausschließlich im zeitlichen Verlauf und ohne steigende Riluzolapplikationen) (Abb. 15c). Bei allen Gruppen mit Riluzolapplikation zeigen sich statistisch signifikante Abnahmen der Burstanzahl pro Minute im Laufe der Messungen (Tabelle 21 und Abb. 15b). Für die Transduktionsbedingung *KCNA2* WT liegt dieser statistisch signifikante Effekt schon bei einer Riluzolkonzentration von $0,2 \mu\text{M}$ vor, bei den anderen beiden Transduktionsbedingungen ist die Abnahme der Burstanzahl pro Minute ab einer Riluzolkonzentration von $2 \mu\text{M}$ statistisch signifikant. Bei allen Transduktionsbedingungen wird der statistisch signifikante Effekt mit steigender Riluzolkonzentration stärker. Der Einfachheit halber werden in der folgenden Tabelle (Tabelle 21) nur die Messwiederholungen mit Riluzolapplikation dargestellt.

	KCNA2 WT (n = 22)	P405L (n = 35)	GFP (n = 15)	ohne Transduktion (n = 13)
Kontrolle	9,47 ± 2,28	13,08 ± 1,64	12,08 ± 1,99	9,92 ± 2,09
+0,2 μM RLZ	4,37 ± 1,17**	11,39 ± 2,64 ^{ns}	8,09 ± 1,25 ^{ns}	5,78 ± 1,09 ^{ns}
+2 μM RLZ	1,15 ± 0,37**	2,60 ± 1,08****	1,36 ± 0,5***5	0,89 ± 0,35**
+5 μM RLZ	0,26 ± 0,14**	0,38 ± 0,15****	0,86 ± 0,47***	0,20 ± 0,15**

Tabelle 21: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Burstanzahl pro Minute, 0,2, 2 und $5 \mu\text{M}$ Riluzol, 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

3.4.3 Burstdauer

Nachfolgend präsentiere ich die Auswirkungen der verschiedenen Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Transduktion auf die Höhe der Burstdauer.

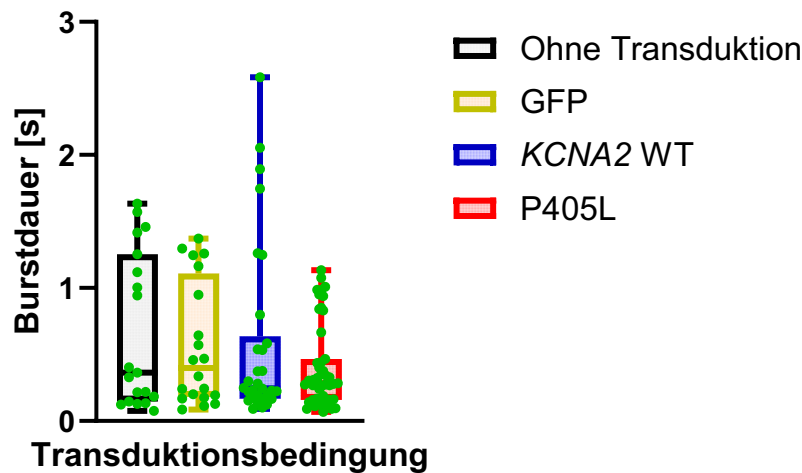


Abbildung 16: **Burstdauern in s.**
KCNA2 WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP, Kontrolle ohne Transduktion. Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (ein Zeitpunkt - keine Messwiederholungen) ($n = 19$ bis $n = 47$), 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Bei den verschiedenen Transduktionsbedingungen ergeben sich bei den Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Höhe der Burstdauer (Tabelle 22 und Abb. 16).

	<i>KCNA2</i> WT ($n = 30$)	P405L ($n = 47$)	GFP ($n = 20$)	ohne Transduktion ($n = 19$)
Kontrolle	$0,58 \pm 0,12$	$0,40 \pm 0,05$	$0,57 \pm 0,10$	$0,67 \pm 0,13$

Tabelle 22: **Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Burstdauern in s**, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

3.4.4 Anzahl der Spikes pro Burst

Im folgenden Abschnitt zeige ich den Einfluss von Riluzol auf die Spikeanzahl pro Burst bei den vier verschiedenen Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Transduktion. Außerdem sollen die Auswirkungen der verschiedenen Transduktionsbedingungen auf die Höhe der Spikeanzahl pro Burst aufgezeigt werden. Bei diesen Messungen fallen zum einen die geringere Spikeanzahl pro Burst bei der Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*) im Vergleich zu den anderen untersuchten Transduktionsbedingungen auf (statistisch allerdings nicht signifikant). Zum anderen führt die Applikation von Riluzol bei allen untersuchten Transduktionsbedingungen zu einer Abnahme der Spikeanzahl pro Burst. Der Effekt von Riluzol nimmt dabei mit steigender Konzentration zu. Nach der Abb. 17 werden die Ergebnisse der Messungen der Spikeanzahl pro Burst genauer dargestellt.

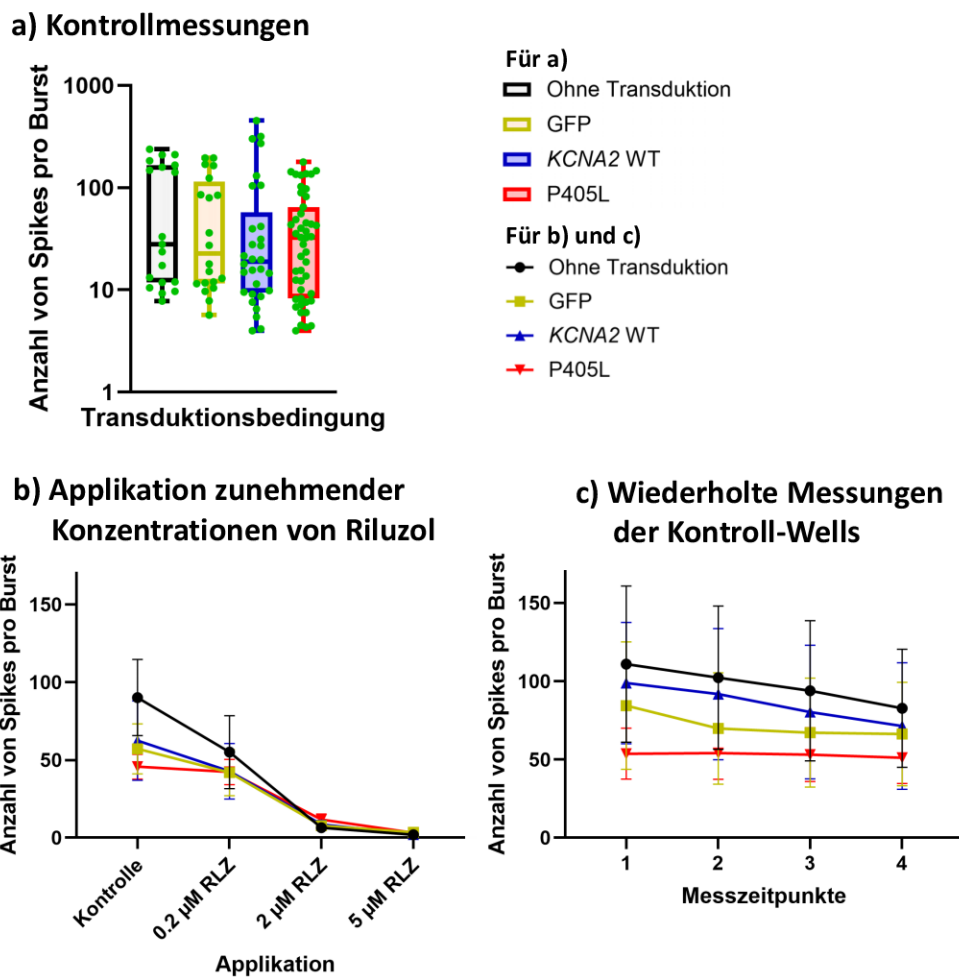


Abbildung 17: **Spikeanzahl pro Burst.**

KCNA2 WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP, Kontrolle ohne Transduktion. Dieselben Wells wurden dabei vier mal nacheinander gemessen - Kontrollmessung und nach Applikation zunehmender Konzentrationen von Riluzol. Diese vier genannten Messzeitpunkte entsprechen auch den vier Messzeitpunkte der Kontroll-Wells (Abb. 17c) - die Messungen fanden ca. bei Minute 0, 12, 24 und 36 statt. a) Spikeanzahl pro Burst, Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (ein Zeitpunkt - keine Messwiederholungen) ($n = 19$ bis $n = 47$). b) Spikeanzahl pro Burst, aufsteigende Applikation von Riluzol (0,2, 2 und 5 μM) ($n = 13$ bis $n = 35$). c) Spikeanzahl pro Burst, Wiederholte Messungen der Kontroll-Wells ohne Applikation von Riluzol ($n = 4$ bis $n = 12$), für a) 1-way ANOVA und für b-c) 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Bei den verschiedenen Transduktionsbedingungen ergeben sich bei den Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Höhe der Spikeanzahl pro Burst (Tabelle 23 und Abb. 17a).

	KCNA2 WT (n = 30)	P405L (n = 47)	GFP (n = 20)	ohne Transduktion (n = 19)
Kontrolle	68,94 ± 20,79	46,64 ± 7,07	63,92 ± 15,44	86,02 ± 20,01

Tabelle 23: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Spikeanzahl pro Burst, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Bei den Messungen ergeben sich statistisch stark signifikante Unterschiede in der Spikeanzahl pro Burst. Für den Haupteffekt des Faktors „steigende Riluzolkonzentration/zeitlicher Verlauf“ gibt es einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,0001$ und $F = 33,71$). Für den Haupteffekt des Faktors „Transduktionsbedingung“ und für die Interaktion dieser beiden Faktoren liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Beim paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen (Post-hoc-Test) zeigen sich bei den Kontrollwells ohne Riluzolapplikation keine statistisch signifikanten Veränderungen der Spikeanzahl pro Burst im Laufe der Messungen (in dem Fall also im zeitlichen Verlauf und ohne steigende Riluzolapplikationen) (Abb. 17c). Bei allen Gruppen mit Riluzolapplikation außer bei KCNA2 WT zeigen sich statistisch signifikante Abnahmen der Spikeanzahl pro Burst (Tabelle 24 und Abb. 17b). Für die Bedingungen P405L (LOF, KCNA2), GFP und für die Bedingung ohne Transduktion sind statistisch signifikante Unterschiede ab einer Riluzolkonzentration von 2 μM vorliegend. Bei allen drei Transduktionsbedingungen werden die statistisch signifikanten Unterschiede mit steigender Riluzolkonzentration stärker. Dabei sind die statistisch signifikanten Unterschiede bei der Bedingung GFP und bei der Transduktionsbedingung ohne Transduktion relativ schwach. Bei der Bedingung P405L (LOF, KCNA2) ist dieser allerdings sehr stark (z.B. $p < 0,0001$ und $t = 7,293$ für 5 μM Riluzol). Der Einfachheit halber werden in der folgenden Tabelle (Tabelle 24) nur die Messwiederholungen mit Riluzolapplikation dargestellt.

	KCNA2 WT (n = 22)	P405L (n = 35)	GFP (n = 15)	ohne Transduktion (n = 13)
Kontrolle	62,41 ± 25,55	45,63 ± 8,03	57,09 ± 16,14	90,08 ± 24,40
+0,2 μM RLZ	42,74 ± 17,82 ^{ns}	42,23 ± 8,12 ^{ns}	41,90 ± 14,85 ^{ns}	54,99 ± 23,40 ^{ns}
+2 μM RLZ	8,64 ± 2,50 ^{ns}	11,64 ± 3,64 ^{***}	7,73 ± 1,98 [*]	6,51 ± 1,80 [*]
+5 μM RLZ	2,10 ± 1,15 ^{ns}	3,20 ± 0,81 ^{****}	3,47 ± 1,33 [*]	1,93 ± 0,75 [*]

Tabelle 24: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Spikeanzahl pro Burst, 0,2, 2 und 5 μM Riluzol, für a) 1-way ANOVA und für b-c) 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

3.4.5 Burst Spike-Frequenz

An dieser Stelle beschreibe ich die Auswirkungen der verschiedenen Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Transduktion auf die Höhe der Spike-Frequenz innerhalb der Bursts. Bei diesen Messungen fallen die durchschnittlich geringeren Spike-Frequenzen innerhalb der Bursts bei der Bedingung *KCNA2* WT im Vergleich zu den anderen untersuchten Transduktionsbedingungen auf (statistisch allerdings nicht signifikant).

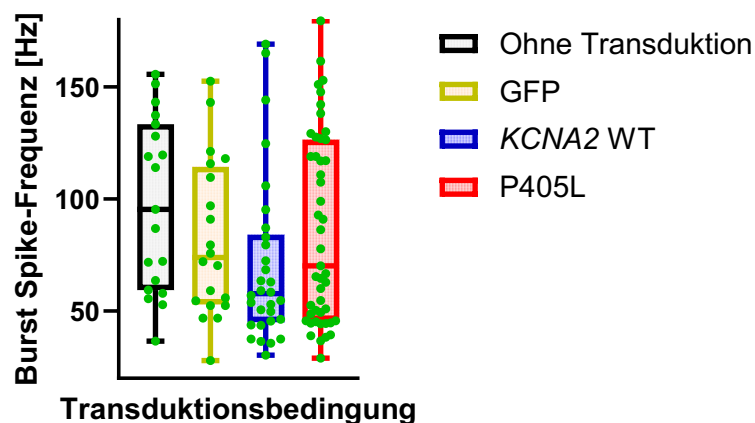


Abbildung 18: Spike-Frequenzen innerhalb der Bursts in Hz.

KCNA2 WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP, Kontrolle ohne Transduktion. Spike-Frequenzen innerhalb der Bursts in Hz, Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (ein Zeitpunkt - keine Messwiederholungen) (n = 19 bis n = 47), 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Bei den verschiedenen Transduktionsbedingungen ergeben sich bei den Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Höhe der Spike-Frequenz innerhalb der Bursts (Tabelle 25 und Abb. 18).

	<i>KCNA2</i> WT (n = 30)	P405L (n = 47)	GFP (n = 20)	ohne Transduktion (n = 19)
Kontrolle	70,50 ± 6,82	86,07 ± 6,14	82,12 ± 7,81	97,60 ± 8,80

Tabelle 25: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Spike-Frequenzen innerhalb der Bursts in Hz, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

3.4.6 Anzahl der Netzwerk-Bursts

An dieser Stelle beschreibe ich den Einfluss von Riluzol auf die Anzahl der Netzwerk-Bursts innerhalb der gesamten Aufnahmezeit von 10 Minuten bei den vier verschiedenen Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Trans-

duktion. Außerdem sollen die Auswirkungen der verschiedenen Transduktionsbedingungen auf die Anzahl der Netzwerk-Bursts gezeigt werden.

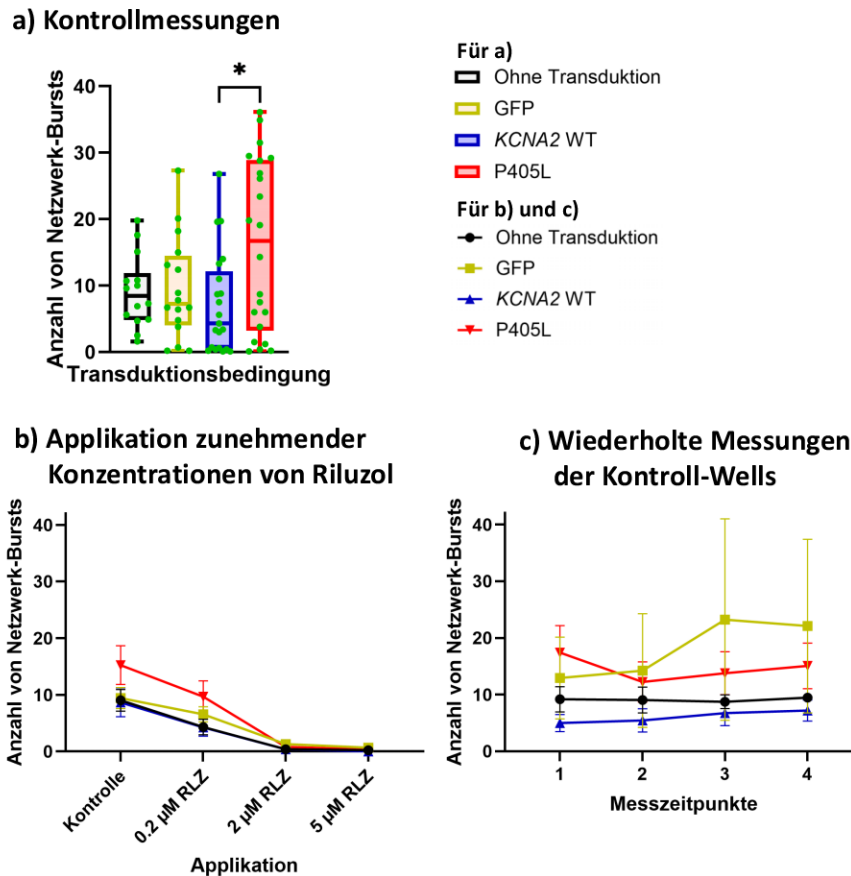


Abbildung 19: **Anzahl der Netzwerk-Bursts innerhalb von 10 Minuten.**

KCNA2 WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP, Kontrolle ohne Transduktion. Dieselben Wells wurden dabei vier mal nacheinander gemessen - Kontrollmessung und nach Applikation zunehmender Konzentrationen von Riluzol. Diese vier genannten Messzeitpunkte entsprechen auch den vier Messzeitpunkte der Kontroll-Wells (Abb. 19c) - die Messungen fanden ca. bei Minute 0, 12, 24 und 36 statt. a) Anzahl der Netzwerk-Bursts, Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (ein Zeitpunkt - keine Messwiederholungen) ($n = 14$ bis $n = 22$). b) Anzahl der Netzwerk-Bursts, aufsteigende Applikation von Riluzol (0,2, 2 und 5 µM) ($n = 10$ bis $n = 13$). c) Anzahl der Netzwerk-Bursts, Wiederholte Messungen der Kontroll-Wells ohne Applikation von Riluzol ($n = 4$ bis $n = 9$), für a) 1-way ANOVA und für b-c) 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

Bei diesen Messungen fallen zum einen die deutlich höhere Anzahl der Netzwerk-Bursts bei der Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*) im Vergleich zur Transduktionsbedingung *KCNA2* WT auf. Zum anderen führt die Applikation von Riluzol bei allen untersuchten Transduktionsbedingungen zu einer Abnahme der Anzahl der Netzwerk-Bursts. Der Effekt von Riluzol nimmt dabei mit steigender Konzentration zu.

Bei den verschiedenen Transduktionsbedingungen ergeben sich bei den Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol statistisch signifikante Unterschiede für die Höhe der Anzahl der Netzwerk-Bursts ($p = 0,0150$ und $F = 3,738$). Im paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen (Post-hoc-Test) findet sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT und P405L (LOF, *KCNA2*) ($p = 0,0143$ und $t = 3,154$) (Tabelle 26 und Abb. 19a).

	<i>KCNA2</i> WT (n = 21)	P405L (n = 22)	GFP (n = 16)	ohne Transduktion (n = 14)
Kontrolle	7,21 ± 1,68	16,14 ± 2,74*	9,52 ± 1,93	9,08 ± 1,46

Tabelle 26: **Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Anzahl der Netzwerk-Bursts innerhalb von 10 Minuten**, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

Für den Haupteffekt des Faktors „steigende Riluzolkonzentration/zeitlicher Verlauf“ gibt es einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,0001$ und $F = 45,80$). Für den Haupteffekt des Faktors „Transduktionsbedingung“ und für die Interaktion dieser beiden Faktoren liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Beim paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen (Post-hoc-Test) zeigen sich bei den Kontrollmessungen ohne Applikation keine statistisch signifikanten Veränderungen der Anzahl der Netzwerk-Bursts im Laufe der Messungen (in dem Fall also ausschließlich im zeitlichen Verlauf und ohne steigende Riluzolapplikationen) (Abb. 19c). Bei allen Gruppen mit Riluzolapplikation zeigen sich statistisch signifikante Abnahmen der Anzahl der Netzwerk-Bursts (Tabelle 27 und Abb. 19b). Für die Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*) liegt ein statistisch signifikanter Unterschied schon bei einer Riluzolkonzentration von $0,2 \mu\text{M}$ vor, bei den anderen Transduktionsbedingungen ist die Abnahme der Anzahl der Netzwerk-Bursts ab einer Riluzolkonzentration von $2 \mu\text{M}$ statistisch signifikant. Bei allen Bedingungen wird der Effekt mit steigender Riluzolkonzentration stärker (Tabelle 27).

	<i>KCNA2</i> WT (n = 13)	P405L (n = 13)	GFP (n = 12)	ohne Transduktion (n = 10)
Kontrolle	8,67 ± 2,54	15,25 ± 3,42	9,44 ± 1,86	9,04 ± 1,91
+0,2 μM RLZ	4,25 ± 1,55*	9,68 ± 2,81*	6,57 ± 1,34 ^{ns}	4,33 ± 1,36 ^{ns}
+2 μM RLZ	0,40 ± 0,20*	0,84 ± 0,50**	1,32 ± 0,60**	0,39 ± 0,28**
+5 μM RLZ	0,03 ± 0,02*	0,39 ± 0,31**	0,68 ± 0,36**	0,23 ± 0,23**

Tabelle 27: **Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Anzahl der Netzwerk-Bursts innerhalb von 10 Minuten**, 0,2, 2 und 5 μM Riluzol, 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

3.4.7 Netzwerk-Burst-Dauer

In der Folge zeige ich die Auswirkungen der verschiedenen Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Transduktion auf die Höhe der Netzwerk-Burst-Dauer. Bei diesen Messungen fallen die geringeren Netzwerk-Burst-Dauern bei P405L (LOF, *KCNA2*) im Vergleich zu den anderen untersuchten Bedingungen auf.

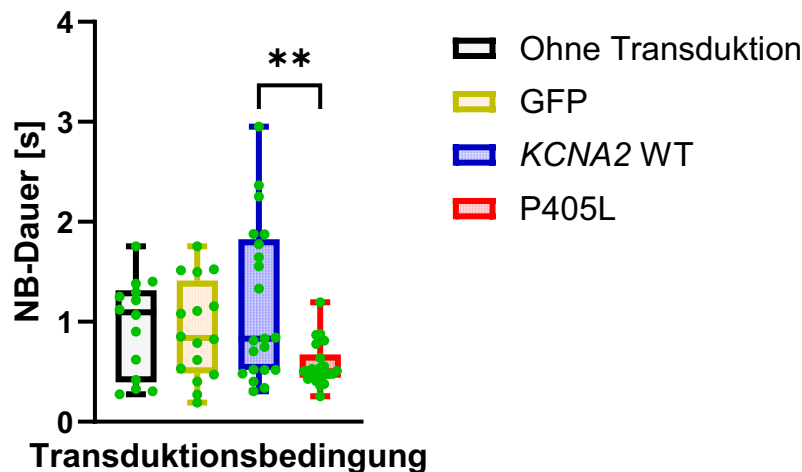


Abbildung 20: Netzwerk-Burst-Dauern in s. *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP, Kontrolle ohne Transduktion. Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (ein Zeitpunkt - keine Messwiederholungen) (n = 14 bis n = 22), 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Bei den verschiedenen Transduktionsbedingungen ergeben sich bei den Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol statistisch signifikante Unterschiede für die Höhe der Netzwerk-Burst-Dauer ($p = 0,0046$ und $F = 4,740$). Im paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen (Post-hoc-Test) fällt dabei ein statistisch signifikanter Unterschied der Höhe der Netzwerk-Burst-Dauer zwischen den beiden Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT und P405L (LOF, *KCNA2*) auf ($p = 0,0023$ und $t = 3,728$) auf (Tabelle 28 und Abb. 20).

	<i>KCNA2</i> WT (n = 21)	P405L (n = 22)	GFP (n = 16)	ohne Transduktion (n = 14)
Kontrolle	$1,17 \pm 0,17$	$0,57 \pm 0,05^{**}$	$0,91 \pm 0,12$	$0,95 \pm 0,13$

Tabelle 28: Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Netzwerk-Burst-Dauern in s, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$ Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

3.4.8 Anzahl der Spikes pro Netzwerk-Burst

Nachfolgend präsentiere ich den Einfluss von Riluzol auf die Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst bei den vier verschiedenen Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Transduktion. Außerdem sollen die Auswirkungen der verschiedenen Bedingungen auf die Höhe der Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst präsentiert werden.

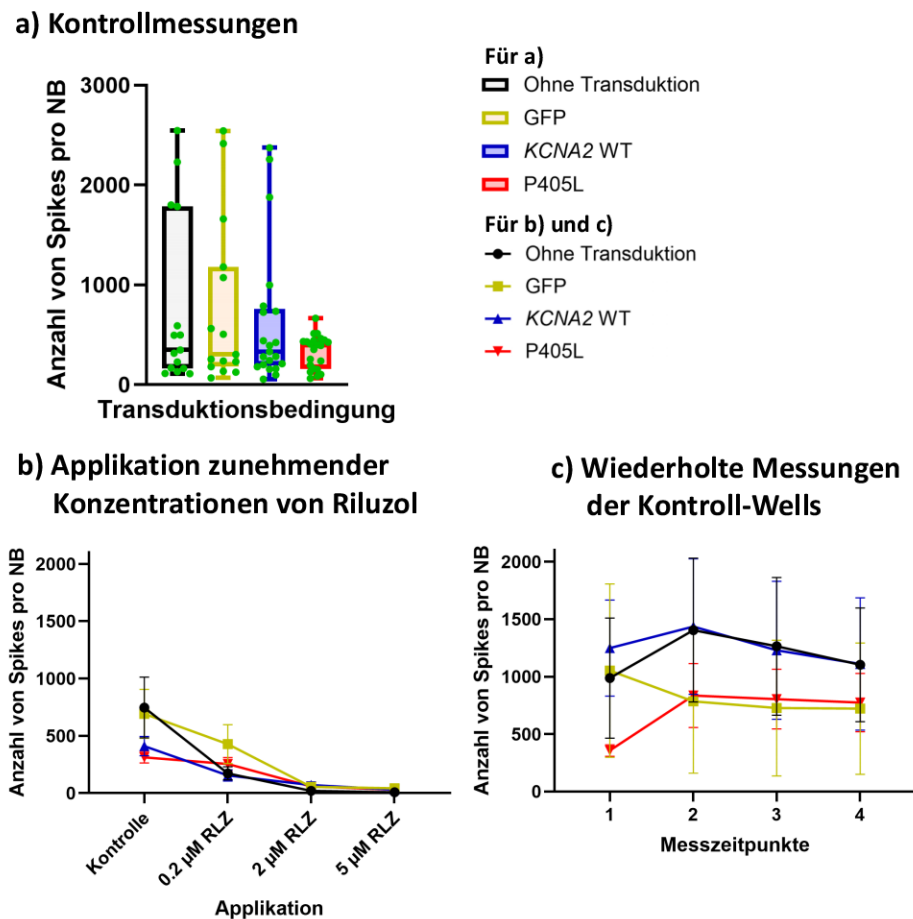


Abbildung 21: Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst.

KCNA2 WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP, Kontrolle ohne Transduktion. Dieselben Wells wurden dabei vier mal nacheinander gemessen - Kontrollmessung und nach Applikation zunehmender Konzentrationen von Riluzol. Diese vier genannten Messzeitpunkte entsprechen auch den vier Messzeitpunkte der Kontroll-Wells (Abb. 21c) - die Messungen fanden ca. bei Minute 0, 12, 24 und 36 statt. a) Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst, Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (ein Zeitpunkt - keine Messwiederholungen) ($n = 15$ bis $n = 22$). b) Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst, aufsteigende Applikation von Riluzol (0,2, 2 und 5 µM) ($n = 10$ bis $n = 13$). c) Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst, Wiederholte Messungen der Kontroll-Wells ohne Applikation von Riluzol ($n = 3$ bis $n = 9$), für a) 1-way ANOVA und für b-c) 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Bei diesen Messungen fallen zum einen die geringere Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst bei der Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*) im Vergleich zu den anderen untersuchten Transduktionsbedingungen auf (statistisch allerdings nicht signifikant). Zum an-

deren führt die Applikation von Riluzol bei allen untersuchten Transduktionsbedingungen zu einer Abnahme der Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst. Der Effekt von Riluzol nimmt dabei mit steigender Konzentration zu.

Bei den verschiedenen Transduktionsbedingungen ergeben sich bei den Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Höhe der Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst (Tabelle 29 und Abb. 21a).

	KCNA2 WT (n = 21)	P405L (n = 22)	GFP (n = 15)	ohne Transduktion (n = 15)
Kontrolle	629,73 ± 151,71	331,31 ± 35,58	765,95 ± 215,28	768,76 ± 220,85

Tabelle 29: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Bei den Messungen ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede in der Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst. Für den Haupteffekt des Faktors „steigende Riluzolkonzentration/-zeitlicher Verlauf“ liegt ein statistisch signifikanter Unterschied vor ($p < 0,0001$ und $F = 27,65$). Für den Haupteffekt des Faktors „Transduktionsbedingung“ und für die Interaktion dieser beiden Faktoren liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Beim paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen (Post-hoc-Test) zeigen sich bei den Kontrollmessungen ohne Riluzolapplikation keine statistisch signifikanten Veränderungen der Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst im Laufe der Messungen (in dem Fall also ausschließlich im zeitlichen Verlauf und ohne steigende Riluzolapplikationen) (Abb. 21c). Für die Transduktionsbedingungen P405L (LOF, KCNA2) und KCNA2 WT zeigen sich nach Applikation von Riluzol statistisch signifikante Abnahmen der Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst (Tabelle 30 und Abb. 21b). Für KCNA2 WT liegt dieser statistisch signifikante Unterschied bereits ab einer Riluzolkonzentration von $0,2 \mu\text{M}$ vor. Für P405L (LOF, KCNA2) erst ab einer Riluzolkonzentration von $2 \mu\text{M}$. Bei diesen beiden Transduktionsbedingungen wird der statistisch signifikante Unterschied mit steigender Riluzolkonzentration stärker (Tabelle 30).

	KCNA2 WT (n = 13)	P405L (n = 13)	GFP (n = 12)	ohne Transduktion (n = 10)
Kontrolle	409,91 ± 84,37	313,23 ± 50,47	692,70 ± 213,70	747,19 ± 265,29
+0,2 μM RLZ	155,03 ± 49,28*	254,50 ± 56,29 ^{n.s}	427,63 ± 169,97 ^{n.s}	172,90 ± 57,02 ^{n.s}
+2 μM RLZ	71,31 ± 27,07*	57,90 ± 23,01**	54,75 ± 20,14 ^{n.s}	20,43 ± 13,82 ^{n.s}
+5 μM RLZ	30,18 ± 23,19**	29,88 ± 16,15**	43,64 ± 19,18 ^{n.s}	7,47 ± 7,47 ^{n.s}

Tabelle 30: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Spikeanzahl pro Netzwerk-Burst, 0,2, 2 und 5 μM Riluzol, 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

3.4.9 Netzwerk-Burst Spike-Frequenz

Nachfolgend werden die Auswirkungen der verschiedenen Transduktionsbedingungen *KCNA2* WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP und ohne Transduktion auf die Höhe der Spike-Frequenz innerhalb der Netzwerk-Bursts aufgezeigt. Bei diesen Messungen fallen die geringeren Spike-Frequenzen innerhalb der Netzwerk-Bursts bei der Transduktionsbedingung *KCNA2* WT im Vergleich zu den anderen untersuchten Transduktionsbedingungen auf (statistisch allerdings nicht signifikant).

Bei den verschiedenen Transduktionsbedingungen ergeben sich bei den Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol keine statistisch signifikanten Unterschiede für die Höhe der Spike-Frequenz innerhalb der Netzwerk-Bursts (Tabelle 31 und Abb. 22).

	<i>KCNA2</i> WT (n = 21)	P405L (n = 22)	GFP (n = 16)	ohne Transduktion (n = 14)
Kontrolle	39,48 ± 4,52	52,16 ± 6,06	53,28 ± 9,45	60,90 ± 11,06

Tabelle 31: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der Kontrollmessungen der Spike-Frequenzen innerhalb der Netzwerk-Bursts in Hz, 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

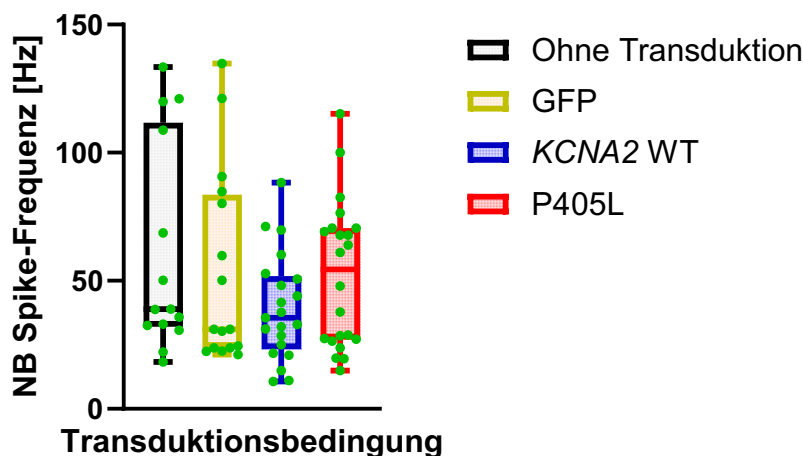


Abbildung 22: Spike-Frequenzen innerhalb der Netzwerk-Bursts in Hz.

KCNA2 WT, P405L (LOF, *KCNA2*), GFP, Kontrolle ohne Transduktion. Spike-Frequenzen innerhalb der Netzwerk-Bursts in Hz, Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol (ein Zeitpunkt - keine Messwiederholungen) (n = 14 bis n = 22), 1-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

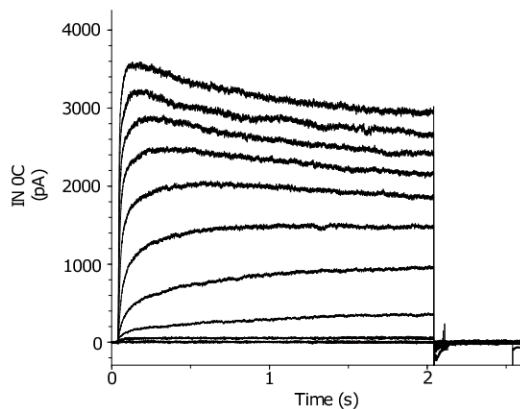
3.5 Experimente mit BmK86-P1, Ionenströme in CHO-Zellen, whole-cell patch-clamp Messungen

Die Experimente mit BmK86-P1 wurden durchgeführt, um die Wirkung von BmK86-P1 auf die Kombination aus verschiedenen K_V1 -Subtypen (in meinen Experimenten $K_V1.2$ und $K_V1.1$) zu untersuchen.

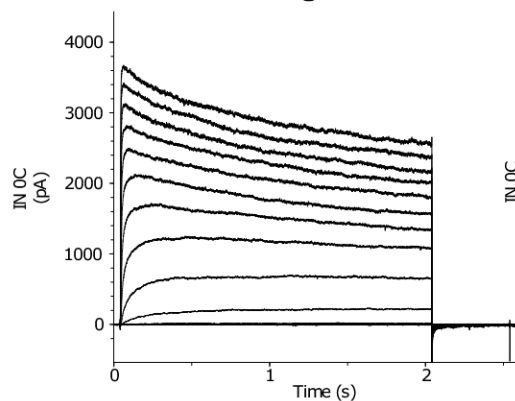
3.5.1 Amplitude des Kaliumstroms in CHO-Zellen

Zu Beginn der Präsentation der Ergebnisse meiner Experimente mit BmK86-P1 in CHO-Zellen möchte ich an dieser Stelle exemplarisch die Rohdaten einer Messung mit *KCNA2* WT zeigen, um eine Vorstellung über die spezifische Blockade dieses Kanals durch BmK86-P1 zu ermöglichen (Abb. 23). Es ist zu sehen, dass die Applikation von BmK86-P1 zu einer deutlichen Blockade des Kaliumstroms geführt hat.

a) Kontrollmessung/Baseline



b) 12 min nach Applikation von Extrazellulär-Lösung



c) 12 min nach Applikation von BmK86-P1

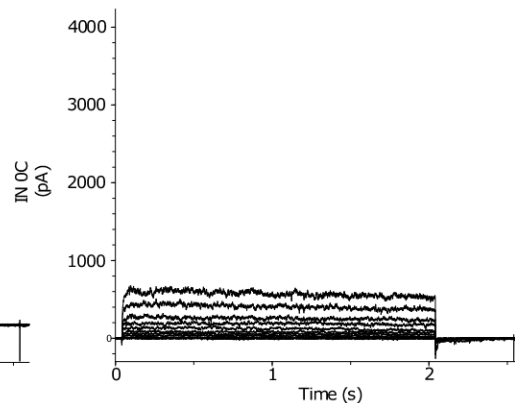


Abbildung 23: Exemplarische Rohdaten der Messungen der Kaliumströme bei den Experimenten mit BmK86-P1, *KCNA2* WT, in CHO-Zellen.

a) Kontrollmessung/Baseline. b) 12 min nach Applikation der Extrazellulär-Lösung (500 μ L). c) 12 min nach Applikation von BmK86-P1 (3 μ M).

Hier stelle ich den Einfluss von BmK86-P1 auf die Amplitude des Kaliumstroms bei den Bedingungen *KCNA2* WT, *KCNA1* WT und *KCNA1* WT + *KCNA2* WT (Kotransfektion) dar. Die Werte entsprechen den Mittelwerten der Amplitude des Kaliumstroms bei einer Spannung von +30 mV. Um den Einfluss von BmK86-P1 zu zeigen, erfolgt die Angabe als relative Änderung im Vergleich zu einer Baseline. Die Baseline für die Messungen nach Applikation von Extrazellulär-Lösung entspricht der Kontrollmessung ohne Applikation. Die Baseline für die Messungen nach Applikation von BmK86-P1 entspricht der Messung nach Applikation von Extrazellulär-Lösung nach 12 Minuten.

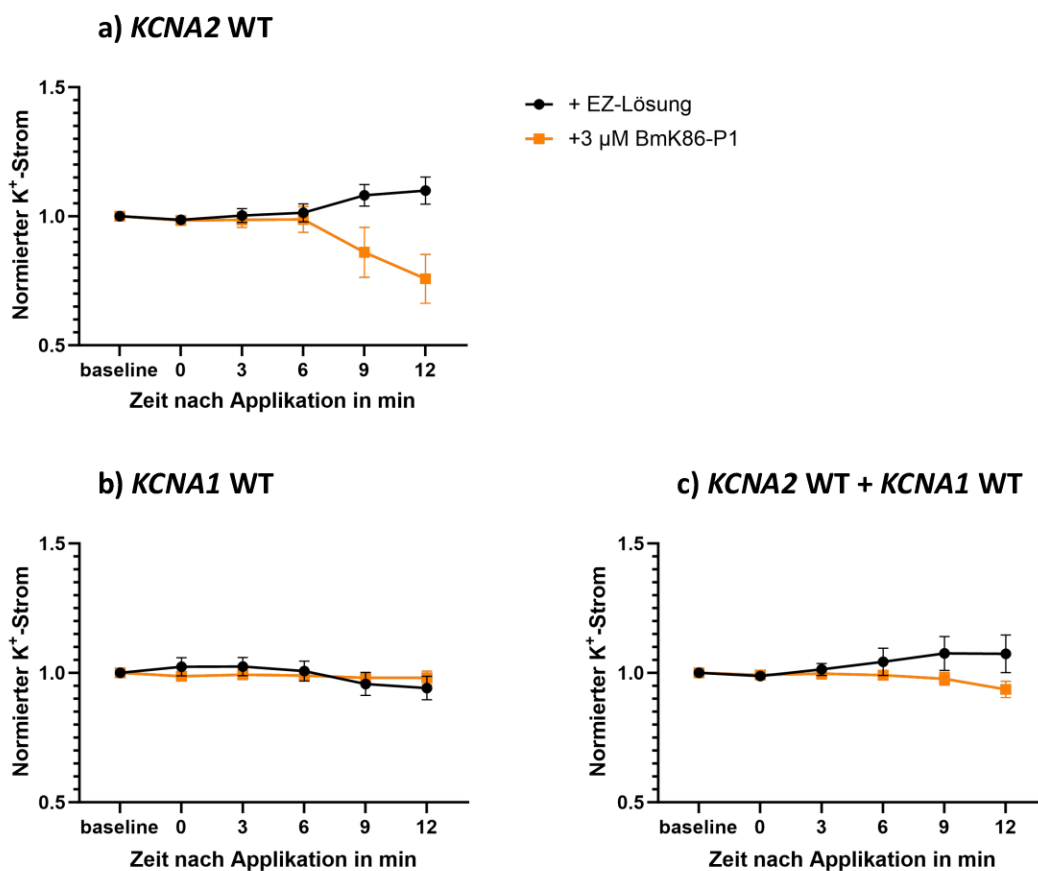


Abbildung 24: Amplituden des Kaliumstroms (bei +30 mV), Experimente mit BmK86-P1, in CHO-Zellen.

Dieselben Zellen wurden dabei 11 mal nacheinander gemessen - Kontrollmessungen, 5-mal nach Applikation von 500 µL Extrazellulärlösung (jeweils im Abstand von 3 Minuten), 5-mal nach Applikation von 3 µM BmK86-P1 (jeweils im Abstand von 3 Minuten). a) Normierte Amplituden des Kaliumstroms, *KCNA2* WT (jeweils n = 15). b) Normierte Amplituden des Kaliumstroms, *KCNA1* WT (jeweils n = 11). c) Normierte Amplituden des Kaliumstroms, *KCNA2* WT + *KCNA1* WT (jeweils n = 7), 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$.

Bei diesen Messungen fällt bei *KCNA2* WT eine Abnahme der Amplitude des Kaliumstroms nach Applikation von BmK86-P1 im zeitlichen Verlauf auf. Bei den beiden anderen untersuchten Bedingungen kommt es zu keinem systematischen Effekt durch BmK86-P1.

Eine statistisch signifikante Reduktion des Kaliumstroms nach Applikation von BmK86-P1 im Vergleich zur Applikation von Extrazellulär-Lösung über den zeitlichen Verlauf findet sich lediglich bei *KCNA2* WT. Für den Haupteffekt des Faktors „Applikation“ (Toxin oder Extrazellulär-Lösung) liegt ein statistisch signifikanter Unterschied vor ($p = 0,0308$ und $F = 5,762$) und dieser verstärkt sich bei der Interaktion mit dem Haupteffekt des Faktors „zeitlicher Verlauf“ ($p = 0,0060$ und $F = 6,204$). Für den Haupteffekt des Faktors „zeitlicher Verlauf“ alleine liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Im paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen (Post-hoc-Test) sich beim Messzeitpunkt 12 Minuten nach Applikation des Toxins ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur entsprechenden Baseline 12 Minuten nach Applikation der Extrazellulär-Lösung ($p = 0,0215$ und $t = 3,494$). Dann beträgt die durchschnittliche Amplitude des Kaliumstroms 75,8% ausgehend vom Mittelwert der entsprechenden Baseline (Vergleich: 110% 12 Minuten nach Applikation der Extrazellulär-Lösung ausgehend von der entsprechenden Baseline) (Tabelle 32 und Abb. 24a). Bei den zwei weiteren Transfektionsbedingungen lässt sich kein deutlicher Effekt nach Applikation von BmK86-P1 beobachten (Tabelle 32 und Abb. 24b-c). Entsprechend ist auch keine dieser Veränderungen statistisch signifikant. Es lässt sich aufgrund der fehlenden statistisch nachweisbaren Effekte lediglich die vorsichtige Aussage treffen, dass der reduzierende Effekt auf die Amplitude des Kaliumstroms bei der Kotransfektion aus *KCNA1* WT und *KCNA2* WT stärker ist als auf *KCNA1* WT alleine.

	<i>KCNA2</i> WT		<i>KCNA1</i> WT		<i>KCNA1</i> WT + <i>KCNA2</i> WT	
	EZ-L (n = 15)	BmK86-P1 (n = 15)	EZ-L (n = 11)	BmK86-P1 (n = 11)	EZ-L (n = 7)	BmK86-P1 (n = 7)
baseline	1 ± 0,22	1 ± 0,21	1 ± 0,26	1 ± 0,26	1 ± 0,22	1 ± 0,22
Applikation	0,99 ± 0,02	0,98 ± 0,01	1,02 ± 0,04	0,99 ± 0,01	0,99 ± 0,02	0,99 ± 0,02
+3 min	1,00 ± 0,03	0,99 ± 0,03	1,02 ± 0,04	0,99 ± 0,01	1,01 ± 0,02	1,00 ± 0,02
+6 min	1,01 ± 0,04	0,99 ± 0,05	1,01 ± 0,04	0,99 ± 0,02	1,04 ± 0,05	0,99 ± 0,02
+9 min	1,08 ± 0,04	0,86 ± 0,10	0,96 ± 0,05	0,98 ± 0,02	1,08 ± 0,07	0,98 ± 0,02
+12 min	1,10 ± 0,05	0,76 ± 0,10*	0,94 ± 0,05	0,98 ± 0,03	1,07 ± 0,07	0,94 ± 0,03

Tabelle 32: Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte der normierten Amplituden des Kaliumstroms bei +30 mV, 3 μ M BmK86-P1, 2-way ANOVA, statistisches Signifikanzniveau für alle Tests bei $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet und bedeuten folgendes: ns = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, **** = $p \leq 0,0001$.

4 Diskussion

In der nun folgenden Diskussion konzentriere ich mich auf die Kernfrage, die gleichzeitig als Hypothese meines Promotionsprojektes dient (siehe 1.5 „Wissenschaftliche Fragestellungen“): Lassen sich *in vitro* Effekte von Riluzol nachweisen, sodass Riluzol als potentielle Präzisionstherapie für Patient:innen mit *KCNA2* loss-of-function Varianten dienen könnte?

Vor Beginn der Diskussion möchte ich die wissenschaftlichen Fragestellungen (siehe 1.5 „Wissenschaftliche Fragestellungen“) in Erinnerung rufen:

- Untersuchung einer möglichen direkten Wirkung von Riluzol auf *KCNA2* WT/ P405L (LOF, *KCNA2*) bzw. den Gesamtkaliumstrom
- Untersuchung des Einflusses von Riluzol auf die Inaktivierungskinetik des Kaliumstroms (Modifikation von Kalium-A-Typ-Strom zu Kalium-D-Typ-Strom)
- Untersuchung der use-dependent Natrium-Kanal-Blockade unter der Bedingung einer vorhandenen *KCNA2*-LOF-Mutation

1. Experimente mit Riluzol

Ionenströme, whole-cell patch-clamp Messungen

Transfektionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*) zeigt einen relevanten Effekt auf die Höhe der Kaliumstromdichte in CHO-Zellen und Neuronen: Auffällige Ergebnisse ergeben die Kontrollmessungen ohne Riluzolapplikation. Hierbei lassen sich sowohl bei den Messungen an CHO-Zellen (*KCNA2* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) (Kotransfektion)) als auch an Neuronen (Gesamtkaliumstrom, P405L (LOF, *KCNA2*)) statistisch signifikante Effekte auf die Höhe der Kaliumstromdichte zeigen, wenn P405L (LOF, *KCNA2*) an der Transfektions-/Transduktionsbedingung beteiligt ist. In diesen Fällen ist die Kaliumstromdichte niedriger als bei den anderen Transfektions-/Transduktionsbedingungen (Beispiel: bei den Messungen der CHO-Zellen je nach vergleichter Transfektionsbedingung Mittelwerte 78,8% bis 88,5% niedriger). Die Ergebnisse zeigen kongruent zu Daten von Syrbe et al. (Syrbe et al., 2015), dass der erwartete Effekt der *KCNA2* loss-of-function Variante P405L im Rahmen meiner Messungen nachweisbar ist und sowohl bei CHO-Zellen als auch bei Neuronen zu deutlich reduzierten (Gesamt-)Kaliumströmen führt. Außerdem ist es auffällig, dass die Kotransfektion aus *KCNA4* WT + P405L (LOF, *KCNA2*) einen recht hohen Wert für die Kaliumstromdichte aufweist. Dies spricht dafür, dass *KCNA4* WT bei meinen Messungen einen ziemlich dominanten Effekt auf die Höhe der Kaliumstromdichte hat, wenn *KCNA4* WT im Rahmen einer Kotransfektion an der Transfektionsbedingung beteiligt ist.

Riluzol zeigt keinen relevanten Effekt auf die Höhe der Kaliumstromdichte:

Aus der Literatur sind durchaus Effekte von Riluzol auf die Höhe der Amplitude von Kaliumströmen bekannt (Bellingham, 2011; Zona et al., 1998). In der Regel sind diese Effekte aber bei deutlich höheren Konzentrationen beschrieben, als ich sie in meinen Experimenten verwendet habe. Zona et al. konnten in ihren Experimenten z.B. eine IC_{50} von 88 μ M, bezogen auf den Gesamtkaliumstrom in Neuronen zeigen. Die Messergebnisse der Stromdichte des Kaliumstroms zeigen kein einheitliches bzw. systematisches Ergebnis. Die Messungen der Effekte von Riluzol auf die Stromdichte des Kaliumstroms unterliegen offenbar Schwankungen, die durch Signifikanzmessungen nicht adäquat abgebildet werden, und denen aufgrund der fehlenden Konsistenz keine ausreichende Bedeutung beigemessen werden kann. Der potenzielle direkte Effekt von Riluzol auf den $K_V1.2$ -Strom bzw. Gesamtkaliumstrom in Neuronen hat einen Teil meiner Hypothese dargestellt (siehe oben bzw. 1.5 „Wissenschaftliche Fragestellungen“) und konnte durch die Ergebnisse meiner Messungen für die untersuchten Konzentrationen entkräftet werden. Eine direkte Modulation des $K_V1.2$ -Stroms in einer Art und Weise, die die erhöhte epileptische Aktivität bei Patient:innen mit *KCNA2*-LOF-Mutationen reduzieren könnte, ist somit nicht zu erwarten.

Es zeigt sich kein relevanter Unterschied der Inaktivierungskinetik der Kaliumströme bei den untersuchten Transfektionsbedingungen:

Die Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol zeigen keine Unterschiede der Inaktivierungskinetik der Kaliumströme zwischen den verschiedenen untersuchten Transfektionsbedingungen (Vergleich der jeweiligen Kotransfektionen aus *KCNA2* WT + *KCNA4* WT und *KCNA4* WT + P405L (LOF, *KCNA2*). Die loss-of-function Variante P405L (LOF, *KCNA2*) scheint also die Inaktivierungskinetik des Kaliumstroms nicht anders zu beeinflussen als *KCNA2* WT. Dies zu zeigen hat eine gewisse Relevanz für mein Promotionsprojekt, da sich somit bei beiden Transfektionsbedingungen bezüglich der Inaktivierungskinetik der Kaliumströme die gleichen Ausgangsbedingungen für eine potentielle Modulation durch Riluzol finden lassen.

Riluzol zeigt keinen relevanten Effekt auf die Inaktivierungskinetik der Kaliumströme:

Die Inaktivierungskinetik der Kaliumkanäle und die Effekte von Riluzol auf diese haben einen maßgeblichen Anteil an der Hypothese meines Promotionsprojektes (siehe 1.5 „Wissenschaftliche Fragestellungen“) (Du et al., 2020; Xu et al., 2001). Es wurde bereits gezeigt, dass Riluzol bei relativ hohen Dosen (signifikante Erhöhung der Inaktivierungszeit um mehr als den Faktor 20 durch Riluzol-Konzentration von 100 μ M) einen verlangsamen Effekt auf die Inaktivierung von $K_V1.4$ -Kaliumkanälen hat (Xu et al., 2001), was dazu führen könnte, dass aus einem Kalium-A-Typ-Strom ein Kalium-D-Typ-Strom wird und somit der Verlust von $K_V1.2$ -Strömen kompensiert wer-

den könnte. Die Messungen der Inaktivierungs-Zeitkonstante τ des Kaliumstroms bei den Transfektionsbedingungen, die *KCNA4* WT erhalten, zeigen nicht den Effekt, der bei der Hypothesenstellung dieses Promotionsprojektes herangezogen wurde. Die Ergebnisse zeigen für die hier verwendeten Riluzolkonzentrationen keinen systematischen Effekt auf die Inaktivierungs-Zeitkonstante τ des Kaliumstroms von $K_V1.4$ -Kaliumkanälen. Es lässt sich also sagen, dass die Messungen die Hypothese, dass sich ein Kalium-A-Typ-Strom durch die Wirkung von Riluzol einem Kalium-D-Typ-Strom angleicht und somit der Verlust von $K_V1.2$ -Strömen kompensiert werden könnte, für die hier verwendeten Riluzolkonzentrationen nicht unterstützen können. Dies ist jedoch plausibel angesichts der deutlich höheren Riluzolkonzentration (100 μM statt 2 bzw. 10 μM), bei der dieser Effekt schon einmal nachgewiesen werden konnte (Xu et al., 2001). In den von mir durchgeführten Experimenten haben wir uns für die Untersuchung von Riluzolkonzentrationen entschieden, die den Konzentrationen ähneln, die im klinischen Bereich heutzutage relevant sind. Da darunter eine generell gute Verträglichkeit von Riluzol und nur selten schwerwiegende Nebenwirkungen beschrieben werden und Riluzol als ALS-Therapie momentan für ein anderes Krankheitsbild eingesetzt wird (siehe 1.3.1 „Riluzol“), könnte eine höhere Dosierung von Riluzol für die potentielle gezielte Therapie für Patient:innen mit *KCNA2*-LOF-Mutationen durchaus diskutiert werden. Es stellt sich also zunächst die Frage, welche Riluzolkonzentrationen ein Mensch ohne relevante Nebenwirkungen verträgt und ob der beschriebene verlangsamende Effekt von Riluzol auf die Inaktivierung von $K_V1.4$ -Kaliumkanälen bei diesen potentiell erreichbaren verträglichen Konzentrationen auftreten kann. Bei einer positiven Beantwortung dieser Fragestellungen könnte es also dazu kommen, dass der verlangsamende Effekt auf die Inaktivierung von $K_V1.4$ -Kaliumkanälen einen unterstützenden Baustein für den potentiellen Einsatz von Riluzol bei Patient:innen mit *KCNA2*-LOF-Mutationen darstellen kann.

Riluzol zeigt keinen relevanten Effekt auf die Höhe der Natriumstromdichte in Neuronen: Aufgrund der Limitationen, die für meine Messungen der Natriumstromdichten an Neuronen gelten (siehe 2.2.1 Unterkapitel „Limitationen der Messungen des Gesamtnatriumstroms in Neuronen“), dienen die hier diskutierten Ergebnisse lediglich als Annäherung an die wirklichen Natriumstromdichten. Bei höheren Dosierungen (je nach Literatur ab ca. 10 μM) ist eine Unterdrückung der schnellen transienten Natriumströme bekannt (Bellingham, 2011). Meine Ergebnisse zeigen allerdings keine systematischen Effekte von Riluzol auf die Höhe der Natriumstromdichte in Neuronen. Somit stellen die Ergebnisse in Kombination mit den genannten Limitationen der Messungen keine konsistente Diskussionsgrundlage für meine Fragestellungen dar. Die für meine Hypothese zentrale Tatsache, dass Riluzol einen relevanten Teil der Wirkung über eine use-dependent Natrium-Kanal-Blockade erreicht, kann durch die Messungen der Natriumstromdichte in

Neuronen nicht untersucht werden und wird im Verlauf anhand verschiedener anderer Messergebnisse diskutiert.

Mögliche Bedeutung der Ergebnisse der whole-cell patch-clamp Messungen auf Ebene der Ionenströme mit Riluzol für den Menschen: Die bisher diskutierten Ergebnisse der in meinen Experimenten untersuchten Effekte von Riluzol können zwei der drei Fragestellungen, die Teil meiner Hypothesenbildung waren, bereits entkräften. Meine Ergebnisse zeigen weder eine direkte Modulation des $K_v1.2$ -Stroms in CHO-Zellen bzw. Gesamtkaliumströmen in Neuronen, noch einen Effekt auf die Inaktivierungskinetik der untersuchten Kaliumströme. Somit ist durch diese Parameter angesichts meiner Ergebnisse keine therapeutische Modulierung der erhöhten neuronalen Aktivität für Patient:innen mit *KCNA2* loss-of-function Varianten zu erwarten.

Neuronale Eigenschaften, whole-cell patch-clamp Messungen

Weitere Effekte von Riluzol, die potentielle Bausteine der anfallssuppressiven Wirkung von Riluzol sein könnten, sind die dämpfenden Auswirkungen auf das neuronale Feuern, auf die Anzahl der Aktionspotentiale und auf die Aktionspotential-Schwelle - also die Wirkung von Riluzol durch eine use-dependent Natrium-Kanal-Blockade. Diese Effekte sind bereits ausgiebig in der Literatur beschrieben und treten dieser entsprechend schon bei Riluzol-Konzentrationen auf, die den in meinen Experimenten verwendeten Riluzol-Konzentrationen ähneln und somit im Bereich der Konzentrationen liegen, die durch die zugelassenen Dosierungen des Medikaments erreicht werden (Bellingham, 2011, 2013; Lamanauskas & Nistri, 2008). Die Effekte auf die oben genannten Parameter werden v.a. mit der hemmenden Wirkung von Riluzol auf den persistierenden Natriumstrom begründet (Bellingham, 2011).

Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*) zeigt eine geringere Anzahl an Aktionspotentialen als Transduktionsbedingung *KCNA2* WT: Bei der Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*) finden sich bei den Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol eine statistisch signifikant geringere Anzahl der Aktionspotentiale im Vergleich zu der Transduktionsbedingung *KCNA2* WT (ca. eine Halbierung des Mittelwertes der Anzahl der Aktionspotentiale bei 0,2 nA). Dies ist durchaus überraschend, da P405L (LOF, *KCNA2*) als loss-of-function Variante eines Kaliumkanals aus folgenden Gründen zu einer erhöhten neuronalen Aktivität führen kann, die die durch die loss-of-function Variante hervorgerufene pathologisch erhöhte epileptische Aktivität erklärt. LOF-Mutation in Kaliumkanälen führen zu einer verzögerten Repolarisation, wodurch die Zelle länger in einem erregbaren Zustand verbleibt und sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass ein weiteres Aktionspotential ausgelöst wird.

Die unzureichende Repolarisation führt zu einem weniger negativen Membranpotential, wodurch die Aktionspotential-Schwelle leichter erreicht werden kann. Außerdem beeinträchtigen LOF-Mutationen in Kaliumkanälen die Nachhyperpolarisation, was ebenfalls zu einer schnelleren erneuten Erregung der Zelle beiträgt.

Riluzol zeigt keinen relevanten Effekt auf die Ruhemembranpotentiale und die Eingangswiderstände der Neuronen: Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass bisher kein Einfluss von Riluzol auf das Ruhemembranpotential und den Eingangswiderstand von Neuronen nachgewiesen wurde (Centonze et al., 1998). Diese Erkenntnisse werden durch die Ergebnisse der von mir durchgeführten Experimente bestätigt. Lediglich bei der Messung des Eingangswiderstands bei *KCNA2* WT kommt es bei einer Riluzolkonzentration von 2 μM zu einer statistisch signifikanten Abnahme des Eingangswiderstands. Diesem Ergebnis sollte man aufgrund der insgesamt fehlenden Konsistenz der Messergebnisse der Eingangswiderstände nach Applikation von Riluzol keine entscheidende Bedeutung beimessen. Für die Bedingung ohne Transduktion ergeben die Messungen ein deutlich positiveres Ruhemembranpotential als bei den anderen untersuchten Transduktionsbedingungen, was für eine höhere neuronale Aktivität sprechen würde, da das Ruhemembranpotential näher am Schwellenpotential liegt. Bei genauerer Betrachtung dieser Messungen lässt sich vermuten, dass eine kleine Anzahl an Ausreißerwerten zu diesem statistisch signifikanten Unterschied beigetragen hat. Dies könnte z.B. an gemessenen Zellen liegen, die bereits in ihrer Membranintegrität beeinträchtigt waren, da durch erhöhte Leckströme ein positiveres Ruhemembranpotential erreicht werden kann. Dies lässt sich an dieser Stelle allerdings nicht abschließend klären. Das Ruhemembranpotential wurde während der Experimente an Neuronen beim Wechsel vom Voltage- in den Current-Clamp-Modus abgelesen. Dies stellt eine Limitation dar, da das Ruhemembranpotential im Optimalfall direkt nach Eröffnen der Zelle und einer kurzen Stabilisierungsphase des Membranpotentials erhoben werden sollte. Angesichts dessen sollte man meine Ergebnisse als Versuch der Annäherung an das tatsächliche Ruhemembranpotential betrachten.

Riluzol zeigt einen relevanten Effekt auf die Anzahl der Aktionspotentiale (Reduktion) und auf die Höhe der Aktionspotential-Schwelle (Erhöhung): Schon 2 μM Riluzol führen in den durchgeführten Experimenten bei allen Transduktionsbedingungen zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Anzahl der Aktionspotentiale (je nach Transduktionsbedingung Abnahme der Mittelwerte der Anzahl der Aktionspotentiale um 3,8% bis 36,0%). Dieser Effekt verstärkt sich bei der Applikation von 10 μM Riluzol nochmal sehr stark (je nach Transduktionsbedingung Abnahme der Mittelwerte der Anzahl der Aktionspotentiale um 56,3% bis 94,1%). Dieser hemmende Effekt von 10 μM Riluzol auf die Anzahl der Aktionspotentiale ist zumindest in den in vitro

Experimenten so stark, dass in manchen gemessenen Zellen die Ausbildung von Aktionspotentialen vollständig blockiert wird. Zum Vergleich kam es bei durch Bellingham durchgeführten Experimenten zu einer Abnahme der Anzahl der Aktionspotentiale um ca. 80% nach der Applikation von 20 μM Riluzol (Bellingham, 2013). 2 μM Riluzol führen in den durchgeführten Experimenten hingegen zu einer im Vergleich zu 10 μM Riluzol eher moderaten Abnahme der Anzahl der Aktionspotentiale (siehe oben). Anders als bei der Anzahl der Aktionspotentiale zeigen 2 μM Riluzol bei den Messungen der Aktionspotential-Schwelle keinen eindeutigen Effekt. Durch die Applikation von 10 μM Riluzol wird die Aktionspotential-Schwelle allerdings bei allen Transduktionsbedingungen deutlich erhöht (je nach Transduktionsbedingung Zunahme der Mittelwerte um 5,8% bis 18,2%), was im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Erhöhung des Schwellenpotentials steht (Bellingham, 2013: Erhöhung des minimalen Stroms, um ein Aktionspotential auszulösen, um ca. 38% durch 20 μM Riluzol). Die beschriebenen Effekte werden v.a. mit der hemmenden Wirkung von Riluzol auf den persistierenden Natriumstrom im Sinne einer use-dependent Natrium-Kanal-Blockade begründet (Bellingham, 2011, 2013; Urbani & Belluzzi, 2000). Diese Ergebnisse können die Hypothese meines Promotionsprojekts unterstützen, da eine Fragestellung aus der Untersuchung der aus der Literatur bekannten use-dependent Natrium-Kanal-Blockade unter der Bedingung einer vorhandenen *KCNA2*-LOF-Mutation für Einzelzellen bestand. Für Einzelzellen (Neuronen) bestätigen meine Ergebnisse also die Wirkung von Riluzol über eine use-dependent Natrium-Kanal-Blockade auch unter der Bedingung einer vorhandenen *KCNA2*-LOF-Mutation.

Mögliche Bedeutung der whole-cell patch-clamp Messungen mit Riluzol auf der neuronalen Ebene für den Menschen: Die in den auf neuronaler Einzelzell-Ebene durchgeführten Experimenten gezeigten Effekte von Riluzol unterstützen die Hypothese (siehe 1.5 „Wissenschaftliche Fragestellungen“), dass das Medikament der Wiederherstellung eines natürlichen Feuerverhaltens bei Patient:innen mit *KCNA2* loss-of-function Varianten dienen könnte. Die Abnahme der Anzahl der Aktionspotentiale und die Erhöhung der Aktionspotential-Schwelle zeigen, dass der Mechanismus einer use-dependent Natrium-Kanal-Blockade auch unter der Bedingung einer vorhandenen *KCNA2*-LOF-Mutation zu tragen kommt und somit zu einer therapeutischen Modulation der pathologisch erhöhten Aktivität beitragen könnte. Der Wirkmechanismus funktioniert laut meiner Ergebnisse also auch unter genetisch veränderten Bedingungen. Dies ist eine wichtige Erkenntnis für die potentielle klinische Anwendbarkeit von Riluzol bei Patient:innen mit *KCNA2* loss-of-function Varianten.

Netzwerk-Effekte, Mikroelektrodenarray Messungen

Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*) zeigt höhere Netzwerk-Aktivität der kortikalen Neuronenkulturen als Transduktionsbedingung *KCNA2* WT:

Insgesamt zeigen die MEA-Messungen eine höhere neuronale Netzwerk-Aktivität bei der Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*), wenn man diese mit der Transduktionsbedingung *KCNA2* WT vergleicht. Der erwartbare Effekt der *KCNA2* loss-of-function Variante, der für einige Parameter auch bei den Einzelzell-Messungen beobachtet werden konnte, lässt sich somit auch auf Netzwerk-Ebene zeigen.

Die Kontrollmessungen ohne Applikation von Riluzol, die sich somit lediglich durch die verschiedenen Transduktionsbedingungen unterscheiden, zeigen eine höhere neuronale Netzwerk-Aktivität bei der Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*), wenn man diese mit der Transduktionsbedingung *KCNA2* WT vergleicht. Die Neuronenkulturen, die P405L (LOF, *KCNA2*) enthalten, weisen im Durchschnitt eine höhere Anzahl an Spikes, an Bursts und an Netzwerk-Bursts auf, wenn man sie mit den Neuronenkulturen vergleicht, die *KCNA2* WT enthalten (z.B. durchschnittliche Anzahl an Spikes 56,8% höher). Eine um mehr als 50% erhöhte Spike-Anzahl spricht für eine erhöhte Erregbarkeit. Es ist allerdings sehr wichtig zu betonen, dass nur wenige dieser festgestellten Unterschiede statistisch signifikant sind (Anzahl der Netzwerk-Bursts). Höhere Netzwerk-Aktivität von *KCNA2*-Funktionsverlust-Varianten konnte in MEA-Experimenten bereits gezeigt werden (Uysal, 2023). Bei diesen genannten Experimenten lagen allerdings einige Unterschiede zu meinen durchgeführten Experimenten vor, die natürlich eine Rolle spielen, wenn man die Ergebnisse miteinander vergleichen möchte (z.B. abgeleitete induzierte pluripotente Stammzellen vs. kortikale Neuronenkulturen aus Mäusen). Außerdem ist beim Vergleich dieser beiden Transduktionsbedingungen im Durchschnitt sowohl eine geringere Burst- als auch Netzwerk-Burst-Dauer bei der Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*) auffällig (statistisch signifikante Unterschiede bei der Netzwerk-Burst-Dauer). Diese Ereignisse treten demnach mit einer höheren Frequenz auf (geringe Dauer der Bursts/Netzwerk-Bursts und höhere absolute Anzahl an Bursts/Netzwerk-Bursts bei P405L (LOF, *KCNA2*)), was für eine höhere neuronale Netzwerk-Aktivität spricht.

Für die verbleibenden untersuchten Parameter lässt sich vereinfacht sagen, dass die Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*) im Mittel eine höhere Spike-Frequenz innerhalb der Bursts/Netzwerk-Bursts, eine kürzere Dauer der Bursts/Netzwerk-Bursts und eine geringere Anzahl an Spikes pro Burst/Netzwerk-Burst aufweisen als die Neuronenkulturen, die *KCNA2* WT enthalten. Dies scheint zunächst kontraintuitiv. Aufgrund der höheren Spike-Frequenz innerhalb der Bursts/Netzwerk-Bursts ergibt sich allerdings eine relativ stärkere Abnahme der Dauer der Bursts/Netzwerk-Bursts als der absoluten Spikeanzahl pro Burst/Netzwerk-Burst im Vergleich zwischen den beiden Zellkonditio-

nen. Dies spricht zumindest nicht gegen eine höhere Netzwerk-Aktivität der Neuronenkulturen, die P405L (LOF, *KCNA2*) enthalten, als der Transduktionsbedingung *KCNA2* WT.

Riluzol zeigt generell eine starke Hemmung der Netzwerk-Aktivität der kortikalen Neuronenkulturen: Bei allen durchgeführten MEA-Messungen hemmt die Applikation von Riluzol die Netzwerk-Aktivität der kortikalen Neuronenkulturen. Diese Hemmung ist v.a. bei einer Konzentration von 5 μM Riluzol sehr stark, sodass je nach konkreter Fragestellung (Spikes, Bursts, Netzwerk-Bursts) bei einzelnen Wells keine Aktivität detektiert werden konnte. In MEA-Experimenten von Van Drongelen et al. konnte bereits demonstriert werden, dass 20 μM Riluzol die Netzwerk-Aktivität (Bursts pro Sekunde) mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung komplett aufheben kann (van Drongelen et al., 2006). Suresh et al. konnten diesen Effekt in durchgeführten Versuchen mit einer Riluzol-Konzentration von 20 μM ebenfalls zeigen (Suresh et al., 2016). In den von mir durchgeführten Experimenten konnte dieser Effekt also schon bei etwas geringeren Konzentrationen von Riluzol demonstriert werden. Auch eine Konzentration von 0,2 μM Riluzol kann in einigen meiner Experimente bereits statistisch signifikante Unterschiede hervorrufen. Dies ist eine nicht unerhebliche Erkenntnis für den klinischen Einsatz von Riluzol, da Riluzol in MEA-Experimenten demnach schon bei verhältnismäßig niedrigen Dosierungen zu einer sehr starken Unterdrückung der neuronalen Netzwerk-Aktivität führt.

Riluzol scheint bei einer Konzentration von 0,2 μM eine Angleichung der erhöhten Netzwerk-Aktivität von Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*) auf das Level von Transduktionsbedingung *KCNA2* WT zu bewirken und Riluzol scheint insgesamt hemmender auf die Aktivität der Neuronenkulturen mit P405L (LOF, *KCNA2*) im Vergleich zu *KCNA2* WT zu wirken: Ein Einsatz von Riluzol in niedriger Konzentration (bei 0,2 μM , siehe folgende Erklärung) hat in den MEA-Experimenten zu einer Angleichung der P405L-Kondition an die *KCNA2* WT-Kondition bezogen auf die Spikeanzahl, die Burstanzahl pro Minute und die Netzwerk-Burst-Anzahl geführt: Unter Kontrollbedingungen ohne Riluzol-Applikation lassen sich bei meinen 10-minütigen Experimenten im Mittel über 2000 Spikes mehr nachweisen für die Wells, die P405L (LOF, *KCNA2*) enthalten, als bei denen, die *KCNA2* WT enthalten (allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied). Selbst nach der Applikation von 0,2 μM Riluzol ergeben sich im Mittel ungefähr die gleiche Anzahl an Spikes für die Wells der Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*), wie für die Wells, die *KCNA2* WT enthalten, ohne Applikation von Riluzol. Ähnliche Ergebnisse konnten die Experimente auch für die Anzahl der Bursts pro Minute und für die Anzahl der Netzwerk-Bursts zeigen.

Des Weiteren zeigt Riluzol eine deutlich stärkere Abnahme der Spikeanzahl pro Burst/Netzwerk-Burst bei P405L (LOF, *KCNA2*) im Vergleich zu *KCNA2* WT (z.B. bei einer Applikation von 5 μ M Riluzol: nicht signifikante Abnahme der Anzahl der Spikes pro Burst bei *KCNA2* WT und stark signifikante Abnahme der Anzahlen der Spikes pro Burst bei P405L (LOF, *KCNA2*) mit $p < 0,0001$). Somit scheint Riluzol hemmender auf die neuronale Aktivität der Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*) zu wirken. Hier möchte ich eine Parallele zur Arbeit von Tidball et al. ziehen (Tidball et al., 2020). Tidball et al. haben auch MEA-Experimente durchgeführt (zur Untersuchung von *SCN8A*-Mutationen). Interessanterweise konnten sie dabei zeigen, dass 1 μ M Riluzol den prozentualen Anteil von Spikes in Network-Bursts bei den induzierten pluripotenten Stammzellen der drei Patient:innen im Gegensatz zu Kontroll-Neuronen senken konnte (Tidball et al., 2020). Analog zur von Tidball et al. gezeigten spezifischen hemmenden Wirkung von Riluzol auf die neuronale Aktivität bei einer mutierten Variante, zeigen meine Ergebnisse ebenfalls eine stärkere Hemmung von Riluzol auf die neuronale Aktivität der Neuronenkulturen, die P405L (LOF, *KCNA2*) enthalten.

Mögliche Bedeutung der Ergebnisse der MEA-Messungen mit Riluzol auf der Netzwerk-Ebene für den Menschen: Die Resultate der MEA-Experimente bahnen möglicherweise den Weg dafür, Riluzol als potentielle Therapieoption bei Patient:innen mit *KCNA2* loss-of-function Varianten in Erwägung zu ziehen und diesen Ansatz weiter zu untersuchen (durch z.B. Mausmodelle, Experimente mit humanen Neuronen oder klinische Studien). Dafür spricht neben der generellen Hemmung der neuronalen Netzwerk-Aktivität durch Riluzol v.a. die Feststellung, dass eine Konzentration von 0,2 μ M Riluzol die erhöhte Anzahl an Spikes, Bursts und Netzwerk-Bursts bei der Transduktionsbedingung P405L (LOF, *KCNA2*) in meinen Messungen auf das Level des Wildtyps (ohne Applikation von Riluzol) normalisieren konnte. Allerdings muss gesagt werden, dass bei einigen dieser Beobachtungen kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden konnte.

Limitationen der Experimente mit Riluzol: Die Limitationen für die Messungen des Ruhemembranpotentials und der Natriumstromdichte wurden bereits an der jeweiligen Stelle genannt und diskutiert. Der Erfolg von Transfektion bzw. Transduktion ist auch bei sorgfältiger Arbeit und dem Befolgen der entsprechenden Protokolle nicht einheitlich für jede Zelle. Somit wurden in meinen Experimenten Zellen bzw. Neuronenkulturen miteinander verglichen, die sich möglicherweise alleine schon im jeweiligen Transfektions- bzw. Transduktionserfolg unterschieden haben. Dies gilt insbesondere auch für die Kotransfektionen, die in meinen Experimenten Verwendung fanden (CHO-Zellen). Hier konnte ich nur bedingt garantieren, dass die DNA zu gleichen Anteilen innerhalb der Zellen exprimiert wurde (obwohl die gleiche Menge an DNA in den Expe-

rimenten verwendet wurde). Durch die Verwendung von fluoreszierenden Markern und das Messen von Zellen, die ungefähr in der gleichen Intensität fluoreszierten, habe ich versucht, diese Fehlerquelle möglichst zu minimieren. Aus der laborexperimentellen Arbeit ergeben sich noch weitere Limitationen, da sowohl die Zellkulturen als auch der Gentransfer und die whole-cell patch-clamp Experimente an sich von vielen Parametern abhängen, die sich bei den verschiedenen Experimenten unterscheiden haben könnten. Als Beispiel sind die Lösungen für die whole-cell patch-clamp Experimente zu nennen, welche im Laufe der Zeit wiederholt neu zusammenstellen musste. Durch genaues, sorgfältiges und reproduzierbares Arbeiten habe ich versucht, Fehlerquellen dieser Art zu minimieren. Je nach genauer Fragestellung liegt auch lediglich eine verhältnismäßig kleine Datengrundlage vor (z.B. $n = 6$ bis $n = 9$ bei den Messungen der Effekte von Riluzol auf die Aktionspotential-Schwelle). Auch dies ist eine Limitation der entsprechenden Ergebnisse.

Zusammenfassende Diskussion der Effekte von Riluzol

Zusammenfassend können die Ergebnisse meiner Experimente als Grundlage dienen, dass Riluzol als potenzielle Therapieoption für Patient:innen mit *KCNA2* loss-of-function Varianten weiter untersucht werden könnte (durch z.B. Mausmodelle, Experimente mit humanen Neuronen oder klinische Studien). Die Abnahme der Anzahl der Aktionspotentiale und die Erhöhung der Aktionspotential-Schwelle durch Riluzol sind vielversprechende Aspekte für eine anfallssuppressive Therapie. Darüber hinaus zeigen die MEA-Experimente, dass Riluzol die Netzwerk-Aktivität der kortikalen Neuronenkulturen hemmt, was auf eine mögliche Rolle des Medikaments bei der Reduzierung der neuronalen Übererregbarkeit hinweist. Die Tatsache, dass einige der beobachteten Effekte bereits bei niedrigen Riluzol-Konzentrationen auftreten, die im Bereich der Konzentrationen liegen, die durch die zugelassenen Dosierungen erreicht werden können (siehe 1.3.1 „Riluzol“), ist ein weiterer positiver Aspekt für die klinische Anwendbarkeit des Medikaments. Anders als die Ergebnisse meiner Experimente haben verschiedene Studien bereits zeigen können, dass Riluzol eine Wirkung auf Kaliumströme hat (Bellingham, 2011; Xu et al., 2001). Auch wenn dies bisher nur für deutlich höhere Konzentrationen nachgewiesen wurde, die in meinen Experimenten nicht untersucht wurden, könnte eine potentielle Modulation der Kaliumströme dazu beitragen, die gestörte Kaliumhomöostase, die bei *KCNA2* loss-of-function Varianten vorliegt, zu korrigieren.

Inwiefern die beschriebenen Effekte von Riluzol v.a. durch die Blockade des persistierenden Natriumstroms bzw. die use-dependent Natrium-Kanal-Blockade ausgelöst werden oder eventuell auch andere bereits bekannte Effekte von Riluzol, wie z.B. die reduzierte Ausschüttung des exzitatorischen Transmitters Glutamat (Bellingham, 2011; Lazarevic

et al., 2018), maßgeblich daran beteiligt sind, ist durch meine Experimente nicht final zu klären. Die Hypothese einer veränderten Inaktivierungskinetik von $K_v1.4$ -Kanälen kann durch die Ergebnisse meiner Versuche definitiv nicht bestätigt werden.

Abschließend deuten die *in vitro* Ergebnisse in Kombination mit aus der Literatur bekannten Erkenntnissen also darauf hin, dass Riluzol das Potenzial haben könnte, die pathophysiologischen Merkmale von *KCNA2* loss-of-function Varianten zu modulieren und somit als potenzielle gezielte Therapie für diese Patient:innengruppe dienen könnte. Die inhibierende Wirkung auf die neuronale Aktivität konnte in meinen Experimenten auf jeden Fall sowohl auf Einzelzell-Ebene in Neuronen als auch auf Ebene von Neuronen-Netzwerken nachgewiesen werden. Der im Titel gewählte Begriff der Präzisionsmedizin ist jedoch vermutlich nicht ganz treffend, da die Wirkung von Riluzol nicht komplett präzise auf *KCNA2* loss-of-function Varianten zugeschnitten ist (z.B. Wirkung auch auf *KCNA2* WT). Man könnte somit eher von einer gezielten Therapie sprechen. Es ist außerdem wichtig zu beachten, dass weitere Forschung und klinische Studien erforderlich sind, um die Wirksamkeit und Sicherheit von Riluzol als gezielte Therapie für Patient:innen mit *KCNA2* loss-of-function Varianten zu bestätigen und zu optimieren. Zu nennen wären dafür z.B. zunächst Mausmodelle und Versuche an humanen Neuronen und langfristig die Durchführung von klinischen Studien. Die vorliegenden Ergebnisse bieten eine vielversprechende Grundlage für zukünftige Untersuchungen und könnten den Weg für neue Therapieansätze in der Epilepsieforschung ebnen.

Gezielte Therapien bei Kanalopathie-bedingten Epilepsien - Vorstellung eines vergleichbaren Projektes Tidball et al. haben in ihrem Projekt variantenspezifische Veränderungen der persistierenden und transienten Natriumströme in Neuronen von *SCN8A*-Epilepsiepatient:innen untersucht (Tidball et al., 2020). Dabei haben sie induzierte pluripotente Stammzellen von drei verschiedenen Patient:innen verwendet, was durch die direkte Entnahme von Zellen der Patient:innen gelang, welche anschließend zu Neuronen konditioniert wurden. Auf diesem Weg werden die genetischen Veränderungen im Genom der Patient:innen ziemlich genau auf die Zellebene übertragen, welche dann die individuelle patient:innenspezifische genetische Situation repräsentiert und auf welcher dann elektrophysiologische Untersuchungen möglich sind (Simkin et al., 2022). Bei dem Projekt von Tidball et al. wurde in einigen Experimenten außerdem Riluzol angewendet. Einerseits konnten in whole-cell patch-clamp Experimenten gezeigt werden, dass 3 μ M Riluzol komplett und reversibel spontane Aktionspotentiale inhibiert und das Schwellenpotential für Aktionspotentiale erhöht hat (Tidball et al., 2020). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen meiner Experimente mit Riluzol. Andererseits haben Tidball et al. auch MEA-Experimente durchgeführt, was entsprechend eine Parallele zum hier vorliegenden Dissertationsprojekt darstellt. Interessanterweise konnten sie dabei zeigen, dass

1 μM Riluzol den prozentualen Anteil von Spikes in Network-Bursts bei den induzierten pluripotenten Stammzellen der drei Patient:innen im Gegensatz zu Kontroll-Neuronen senken konnte (Tidball et al., 2020). Außerdem wurde von Tidball et al. ein sehr interessantes Vorgehen im Sinne eines bench-to bedside-Ansatzes beschrieben. Aufgrund der Kombination aus einer klinischen Verschlechterung der Epilepsie bei betroffenen Patient:innen, den von Tidball et al. erhobenen Daten und der bestehenden Zulassung von Riluzol für ALS wurde sich dafür entschieden, Riluzol bei zwei der drei Patient:innen Off-Label als Therapie einzusetzen: Bei Person 1 verringerte sich die Anfallshäufigkeit um 50%. Bei Person 3 kam es zu einem sofortigen und dramatischen Anfallsrückgang mit monatelanger Anfallsfreiheit (Tidball et al., 2020).

2. Experimente mit BmK86-P1

Ionenströme, whole-cell patch-clamp Messungen

BmK86-P1 zeigt bei einer Konzentration von 3 μM eine spezifische Blockade der $K_{\text{V}}1.2$ -Kaliumströme: Die Ergebnisse meiner Experimente weisen darauf hin, dass das Toxin BmK86-P1 als spezifischer Blocker für $K_{\text{V}}1.2$ -Kanäle wirkt und somit die im Vorfeld formulierte Hypothese (siehe 1.5 „Wissenschaftliche Fragestellungen“), dass BmK86-P1 wie aus der Literatur bekannt einen spezifischen Blocker für $K_{\text{V}}1.2$ -Kanäle darstellt (Qin et al., 2021), unterstützt werden kann. Nach Applikation des Toxins kommt es bei *KCNA2* WT zu einem statistisch signifikanten Abfall der Amplitude des Kaliumstroms. Dann beträgt die durchschnittliche Amplitude des Kaliumstroms 75,8% ausgehend vom Mittelwert der entsprechenden Baseline (Vergleich: 110% 12 Minuten nach Applikation der Extrazellulär-Lösung ausgehend von der entsprechenden Baseline). Qin et al. haben in ihren Experimenten mit 1 μM BmK86-P1 eine Hemmung der $K_{\text{V}}1.2$ -Ströme um ca. 90% und der $K_{\text{V}}1.1$ -Ströme um ca. 5% zeigen können (Qin et al., 2021). Für die anderen beiden untersuchten Transfektionsbedingungen lassen sich keine statistisch signifikanten Effekte zeigen. Die Tatsache, dass die Blockade des Kaliumstroms bei der Kotransfektion aus *KCNA2* WT + *KCNA1* WT stärker ist, als bei *KCNA1* WT alleine, könnte die Hypothese ebenfalls unterstützen, da die $K_{\text{V}}1.2$ -spezifische Blockade in der Kotransfektion zum Tragen kommen könnte.

Bedeutung der whole-cell patch-clamp Messungen mit BmK86-P1 auf der Ebene der Ionenströme für weitere Untersuchungen: Durch Unterschiede in der Porenregion zwischen $K_{\text{V}}1.1$ - und $K_{\text{V}}1.2$ -Kanälen begründet sich die unterschiedlich starke Inhibition des Stroms durch das Toxin BmK86-P1 (Qin et al., 2021). Versuche von Qin et al. konnten zeigen, dass Val381 in der Filterregion des $K_{\text{V}}1.2$ -Kanals der entscheidende Faktor für die Selektivität für $K_{\text{V}}1.2$ gegenüber $K_{\text{V}}1.1$ ist. Zwei Reste (Gln357 und Thr383) in der Porenregion des $K_{\text{V}}1.2$ -Kanals beeinflussten die Bindung von BmK86-P1

in den Versuchen ebenfalls (Qin et al., 2021). Insgesamt unterstützen die Messungen die Idee BmK86-P1 als spezifischen Blocker für die Kaliumkanalforschung einzusetzen. Des Weiteren könnten sich im Verlauf auch therapeutische Anwendungen des Toxins ergeben, welche in der Traditionellen Chinesischen Medizin bereits bestehen (dort werden weiterverarbeitete *Buthus martensii* Karsch-Skorpione zur Behandlung vieler Krankheiten wie z.B. chronische Schmerzen, rheumatoide Arthritis und Schlaganfall eingesetzt) (Qin et al., 2021). Auch wenn der therapeutische Einsatz vermutlich nicht so breit bzw. diffus wäre, wie er in der Traditionellen Chinesischen Medizin teilweise besteht, sondern aufgrund der selektiven Wirkung eventuell als Therapie für GOF-Mutation von $K_v1.2$ -Kanälen. Abschließend lässt sich sagen, dass die Messergebnisse die weitere Untersuchung dieses Toxins unterstützen (z.B. neuronale whole-cell patch-clamp Messungen) und es sich um ein weiteres Beispiel dafür handelt, dass im Reich der Natur zahlreiche Toxine existieren, die eine therapeutische oder laborexperimentelle Verwendung finden könnten.

3. Schlussfolgerung und Ausblick

Ergebnisse, wie die hier vorliegenden, bieten eine vielversprechende Grundlage für zukünftige Untersuchungen und die Erschaffung neuer Therapieansätze in der Epileptologie und darüberhinaus. Die Entwicklung von Präzisionstherapien bzw. gezielten Therapien in der Epileptologie markiert einen bedeutenden Fortschritt auf dem Weg zu individualisierten Behandlungsansätzen für Patient:innen mit epileptischen Erkrankungen. Die genetische Charakterisierung von epileptischen Erkrankungen ermöglicht eine konkretere Identifizierung der Ursachen und liefert somit den Auftrag, präzise Therapien zu entwickeln, die auf die spezifischen pathophysiologischen Mechanismen einzelner Patient:innen zugeschnitten sind (Striano & Minassian, 2020; Balestrini, Mei, Sisodiya & Guerrini, 2023; Imbrici et al., 2016). Durch die Kombination von klinischen Daten, genetischen Informationen und fortgeschrittenen Bildgebungsverfahren könnten so zukünftig zunehmend personalisierte Behandlungspläne erstellt werden, die die patient:innenspezifischen Bedürfnisse und Merkmale berücksichtigen. Die weiterführende Erforschung und Implementierung von Präzisionstherapien und gezielten Therapien in der Epileptologie wird dazu beitragen, dass sich die Behandlungsergebnisse für Patient:innen mit Epilepsie weiter verbessern können. Es ist zu erwarten, dass in Zukunft die Anwendung von Präzisionsmedizin und gezielten Therapien in der Epileptologie zunehmend an Bedeutung gewinnt und dazu beiträgt, die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Behandlungen zu optimieren und die Lebensqualität der Patient:innen nachhaltig zu verbessern (Striano & Minassian, 2020; Balestrini et al., 2023; Imbrici et al., 2016). Diese optimistische Zukunftsaussicht ist aus dem Bereich der Epileptologie heraus auch auf viele andere seltene Erkrankungen zu übertragen.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung (deutsch)

Die genetische Charakterisierung von Krankheiten ermöglicht die Entwicklung präziser Therapien, so auch im Bereich der Epileptologie (Imbrici et al., 2016). Du et al. (University of Queensland) haben durch eine In-Silico-Studie die Hypothese aufgestellt, dass Inhibitoren des persistierenden Natriumstroms, wie z.B. Riluzol, bei Loss-of-Function (LOF) Varianten des D-Typ-Kaliumstroms (z.B. *KCNA2* LOF-Mutationen) einen potentiellen Therapieansatz darstellen könnten (Du et al., 2020).

Im Rahmen meines Promotionsprojektes habe ich *in vitro* Effekte von Riluzol als potentielle gezielte Therapie für Patient:innen mit *KCNA2* LOF-Varianten untersucht. Die Experimente dienten der Untersuchung der Effekte von Riluzol auf Kaliumströme (Stromdichte und Inaktivierungskinetik), auf neuronale Eigenschaften (z.B. Aktionspotential-Schwelle) und auf Netzwerk-Effekte. Dabei führte ich Whole-cell Patch-clamp Messungen und Mikroelektrodenarray-Messungen (MEA) durch.

Die Ergebnisse meines Promotionsprojektes bieten eine Grundlage dafür, dass Riluzol eine mögliche gezielte Therapieoption für die Behandlung von Patient:innen mit *KCNA2* LOF-Varianten darstellen könnte. Es konnte keine wesentliche direkte Wirkung auf Kaliumströme gezeigt werden. Die gemessene Abnahme der Anzahl der Aktionspotentiale und die Erhöhung der Aktionspotential-Schwelle sind allerdings vielversprechende Aspekte für eine anfallssuppressive Therapie. Darüber hinaus zeigen die MEA-Experimente, dass Riluzol die Netzwerk-Aktivität der kortikalen Neuronenkulturen hemmt, was eine mögliche Rolle des Medikaments bei der Reduzierung der neuronalen Übererregbarkeit zeigt. Einige der beobachtbaren Effekte treten bereits bei niedrigen Riluzol-Konzentrationen auf, die im Bereich der Konzentrationen liegen, die durch die zugelassenen Dosierungen erreicht werden (Plasmaspiegel von 1-2 μM und drei- bis viermal höhere Konzentrationen im Gehirngewebe). Dies ist ein weiterer positiver Aspekt für die klinische Anwendbarkeit des Medikaments, da für diese Dosierungen eine gute Verträglichkeit von Riluzol beschrieben wird (Bellingham, 2011).

Weitere Forschung (z.B. Mausmodelle) und klinische Studien sind notwendig, um die Wirksamkeit und Sicherheit von Riluzol als gezielte Therapie für Patient:innen mit *KCNA2* LOF-Varianten zu bestätigen und zu optimieren.

5.2 Abstract (english)

The genetic characterization of diseases enables the development of precise therapies, including the field of epileptology (Imbrici et al., 2016). Du et al. (University of Queensland) have hypothesized through an in-silico study that inhibitors of persistent sodium currents, such as riluzole, could present a potential therapeutic approach for loss-of-function (LOF) variants of the D-type potassium current (e.g. *KCNA2* LOF mutations) (Du et al., 2020).

In the context of my doctoral project, I investigated the *in vitro* effects of riluzole as a potential specific therapy for patients with *KCNA2* LOF variants. The experiments were designed to investigate the effects of riluzole on potassium currents (current density and inactivation kinetics), on neuronal properties (e.g. action potential threshold) and on network effects. I carried out whole-cell patch-clamp measurements and microelectrode array (MEA) measurements.

The results of my doctoral project provide a basis for riluzole to be a potential therapeutic option for the treatment of patients with *KCNA2* LOF variants. No significant direct effect on potassium currents could be shown. The reduction in the numbers of action potentials and the increase of the action potential threshold are promising aspects for a seizure-suppressive therapy. In addition, the MEA experiments show that riluzole inhibits the network activity of cortical neuron cultures, which shows a possible role of the drug in reducing neuronal hyperexcitability. Some of the observable effects occur at low riluzole concentrations, which are in the range of concentrations achieved by the approved doses (plasma levels of 1-2 M and three to four times higher concentrations in brain tissue). This is a further positive aspect for the clinical applicability of the drug, as good tolerability of riluzole is described for these doses (Bellingham, 2011).

Further research (e.g. mouse models) and clinical trials are needed to confirm the efficacy and safety of riluzole as a specific therapy for patients with *KCNA2* LOF variants.

6 Literatur

- Abdul Kadir, L., Stacey, M. & Barrett-Jolley, R. (2018). Emerging roles of the membrane potential: action beyond the action potential. *Frontiers in physiology*, 9, 1661.
- Aman, T. K., Grieco-Calub, T. M., Chen, C., Rusconi, R., Slat, E. A., Isom, L. L. & Raman, I. M. (2009). Regulation of persistent Na current by interactions between β subunits of voltage-gated na channels. *Journal of Neuroscience*, 29 (7), 2027–2042.
- Backhaus, K., Erichson, B., Plinke, W. & Weiber, R. (2016). *Multivariate Analysemethoden*. Springer.
- Balestrini, S., Mei, D., Sisodiya, S. & Guerrini, R. (2023). Steps to improve precision medicine in epilepsy. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 27 (6), 661–672.
- Baronas, V. A., McGuinness, B. R., Brigidi, G. S., Kolisko, R. N. G., Vilin, Y. Y., Kim, R. Y., ... Kurata, H. T. (2015). Use-dependent activation of neuronal $K_V1.2$ channel complexes. *Journal of Neuroscience*, 35 (8), 3515–3524.
- Behrends, J. C., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., ... others (2017). *Physiologie*. Thieme.
- Bellingham, M. C. (2011). A review of the neural mechanisms of action and clinical efficiency of riluzole in treating amyotrophic lateral sclerosis: what have we learned in the last decade? *CNS neuroscience & therapeutics*, 17 (1), 4–31.
- Bellingham, M. C. (2013). Pre-and postsynaptic mechanisms underlying inhibition of hypoglossal motor neuron excitability by riluzole. *Journal of neurophysiology*, 110 (5), 1047–1061.
- Brandes, R., Lang, F. & Schmidt, R. F. (2019). *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Springer-Verlag.
- Catterall, W. A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *The Journal of physiology*, 590 (11), 2577–2589.
- Ceballos, C. C., Roque, A. C. & Leao, R. M. (2017). A negative slope conductance of the persistent sodium current prolongs subthreshold depolarizations. *Biophysical Journal*, 113 (10), 2207–2217.
- Centonze, D., Calabresi, P., Pisani, A., Marinelli, S., Marfia, G. A. & Bernardi, G. (1998). Electrophysiology of the neuroprotective agent riluzole on striatal spiny neurons. *Neuropharmacology*, 37 (8), 1063–1070.
- Cole, K. S. (1949). Some physical aspects of bioelectric phenomena. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 35 (10), 558.
- Crill, W. E. (1996). Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annual review of physiology*, 58 (1), 349–362.

- Dall'Igna, O. P., Bobermin, L. D., Souza, D. O. & Quincozes-Santos, A. (2013). Riluzole increases glutamate uptake by cultured C6 astroglial cells. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 31 (7), 482–486.
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., ... MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *science*, 280 (5360), 69–77.
- Du, J., Vegh, V. & Reutens, D. C. (2020). Persistent sodium current blockers can suppress seizures caused by loss of low-threshold D-type potassium currents: Predictions from an in silico study of K_v1 channel disorders. *Epilepsia open*, 5 (1), 86–96.
- Dudev, T. & Lim, C. (2014). Ion selectivity strategies of sodium channel selectivity filters. *Accounts of chemical research*, 47 (12), 3580–3587.
- Falco-Walter, J. (2020). Epilepsy—definition, classification, pathophysiology, and epidemiology. In *Seminars in neurology* (Bd. 40, S. 617–623).
- Fumagalli, E., Funicello, M., Rauen, T., Gobbi, M. & Mennini, T. (2008). Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. *European journal of pharmacology*, 578 (2-3), 171–176.
- Goldin, A. L. (2003). Mechanisms of sodium channel inactivation. *Current opinion in neurobiology*, 13 (3), 284–290.
- Hedrich, U. B., Lauxmann, S., Wolff, M., Synofzik, M., Bast, T., Binelli, A., ... others (2021). 4-Aminopyridine is a promising treatment option for patients with gain-of-function *KCNA2*-encephalopathy. *Science translational medicine*, 13 (609), eaaz4957.
- Higgs, M. H. & Spain, W. J. (2011). K_v1 channels control spike threshold dynamics and spike timing in cortical pyramidal neurones. *The Journal of physiology*, 589 (21), 5125–5142.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117 (4), 500–544.
- Imbrici, P., Liantonio, A., Camerino, G. M., De Bellis, M., Camerino, C., Mele, A., ... others (2016). Therapeutic approaches to genetic ion channelopathies and perspectives in drug discovery. *Frontiers in pharmacology*, 7, 121.
- Kim, D. M. & Nimigeon, C. M. (2016). Voltage-gated potassium channels: a structural examination of selectivity and gating. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8 (5), a029231.
- Kiss, T. (2008). Persistent Na-channels: Origin and function: A review. *Acta Biologica Hungarica*, 59 (Supplement-2), 1–12.

- Kuo, J., Lee, R., Zhang, L. & Heckman, C. (2006). Essential role of the persistent sodium current in spike initiation during slowly rising inputs in mouse spinal neurones. *The Journal of physiology*, *574* (3), 819–834.
- Kurata, H. T. & Fedida, D. (2006). A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Progress in biophysics and molecular biology*, *92* (2), 185–208.
- Lamanauskas, N. & Nistri, A. (2008). Riluzole blocks persistent Na⁺ and Ca²⁺ currents and modulates release of glutamate via presynaptic NMDA receptors on neonatal rat hypoglossal motoneurons in vitro. *European Journal of Neuroscience*, *27* (10), 2501–2514.
- Lauxmann, S., Sonnenberg, L., Koch, N. A., Bosselmann, C., Winter, N., Schwarz, N., ... others (2021). Therapeutic potential of sodium channel blockers as a targeted therapy approach in *KCNA1*-associated episodic ataxia and a comprehensive review of the literature. *Frontiers in Neurology*, *12*, 703970.
- Lazarevic, V., Yang, Y., Ivanova, D., Fejtova, A. & Svenningsson, P. (2018). Riluzole attenuates the efficacy of glutamatergic transmission by interfering with the size of the readily releasable neurotransmitter pool. *Neuropharmacology*, *143*, 38–48.
- Löscher, W., Potschka, H., Sisodiya, S. M. & Vezzani, A. (2020). Drug resistance in epilepsy: clinical impact, potential mechanisms, and new innovative treatment options. *Pharmacological reviews*, *72* (3), 606–638.
- Mao, X., Cao, Z., Yin, S., Ma, Y., Wu, Y. & Li, W. (2007). Cloning and characterization of BmK86, a novel K⁺-channel blocker from scorpion venom. *Biochemical and biophysical research communications*, *360* (4), 728–734.
- Masnada, S., Hedrich, U. B., Gardella, E., Schubert, J., Kaiwar, C., Klee, E. W., ... others (2017). Clinical spectrum and genotype–phenotype associations of *KCNA2*-related encephalopathies. *Brain*, *140* (9), 2337–2354.
- Molleman, A. (2003). *Patch clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology*. John Wiley & Sons.
- Müller, P., Draguhn, A. & Egorov, A. V. (2024). Persistent sodium currents in neurons: potential mechanisms and pharmacological blockers. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, *476* (10), 1445–1473.
- Neher, E. & Sakmann, B. (1976). Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. *The Journal of physiology*, *258* (3), 705–729.
- Noh, K.-M., Hwang, J.-Y., Shin, H.-C. & Koh, J.-Y. (2000). A novel neuroprotective mechanism of riluzole: direct inhibition of protein kinase C. *Neurobiology of disease*, *7* (4), 375–383.
- Obien, M. E. J., Deligkaris, K., Bullmann, T., Bakkum, D. J. & Frey, U. (2015).

- Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Frontiers in neuroscience*, 8, 423.
- Oyrer, J., Maljevic, S., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F., Petrou, S. & Reid, C. A. (2018). Ion channels in genetic epilepsy: from genes and mechanisms to disease-targeted therapies. *Pharmacological reviews*, 70 (1), 142–173.
- Pack, A. M. (2019). Epilepsy overview and revised classification of seizures and epilepsies. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 25 (2), 306–321.
- Qin, C., Yang, X., Zuo, Z., Yang, L., Yang, F., Cao, Z., ... Wu, Y. (2021). BmK86-P1, a new degradation peptide with desirable thermostability and $K_v1.2$ channel-specific activity from traditional chinese scorpion medicinal material. *Toxins*, 13 (9), 610.
- Robbins, C. A. & Tempel, B. L. (2012). $K_v1.1$ and $K_v1.2$: similar channels, different seizure models. *Epilepsia*, 53, 134–141.
- Roux, B. (2017). Ion channels and ion selectivity. *Essays in biochemistry*, 61 (2), 201–209.
- Rudy, B., Maffie, J., Amarillo, Y., Clark, B., Goldberg, E., Jeong, H., ... Zagha, E. (2009). Voltage gated potassium channels: Structure and function of K_v1 to K_v9 subfamilies. *Encyclopedia of neuroscience*, 397–425.
- Scheffer, I. E. & Liao, J. (2020). Deciphering the concepts behind “epileptic encephalopathy” and “developmental and epileptic encephalopathy”. *European journal of paediatric neurology*, 24, 11–14.
- Shvartsman, A., Kotler, O., Stoler, O., Khrapunsky, Y., Melamed, I. & Fleidervish, I. A. (2021). Subcellular distribution of persistent sodium conductance in cortical pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, 41 (29), 6190–6201.
- Simkin, D., Ambrosi, C., Marshall, K. A., Williams, L. A., Eisenberg, J., Gharib, M., ... Kiskinis, E. (2022). ‘Channeling’ therapeutic discovery for epileptic encephalopathy through ipsc technologies. *Trends in Pharmacological Sciences*, 43 (5), 392–405.
- Spira, M. E. & Hai, A. (2013). Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology. *Nature nanotechnology*, 8 (2), 83–94.
- Spruston, N., Jaffe, D. B., Williams, S. H. & Johnston, D. (1993). Voltage-and space-clamp errors associated with the measurement of electrotonically remote synaptic events. *Journal of neurophysiology*, 70 (2), 781–802.
- Stafstrom, C. E. (2007). Persistent sodium current and its role in epilepsy. *Epilepsy Currents*, 7 (1), 15–22.
- Striano, P. & Minassian, B. A. (2020). From genetic testing to precision medicine in epilepsy. *Neurotherapeutics*, 17 (2), 609–615.
- Suresh, J., Radojicic, M., Pesce, L. L., Bhansali, A., Wang, J., Tryba, A. K., ... Van Drongelen, W. (2016). Network burst activity in hippocampal neuronal

- cultures: the role of synaptic and intrinsic currents. *Journal of Neurophysiology*, 115 (6), 3073–3089.
- Syrbe, S., Hedrich, U. B., Riesch, E., Djémié, T., Müller, S., Møller, R. S., ... others (2015). De novo loss-or gain-of-function mutations in *KCNA2* cause epileptic encephalopathy. *Nature genetics*, 47 (4), 393–399.
- Tidball, A. M., Lopez-Santiago, L. F., Yuan, Y., Glenn, T. W., Margolis, J. L., Clayton Walker, J., ... others (2020). Variant-specific changes in persistent or resurgent sodium current in *scn8a*-related epilepsy patient-derived neurons. *Brain*, 143 (10), 3025–3040.
- Trimmer, J. S. (2015). Subcellular localization of K⁺ channels in mammalian brain neurons: remarkable precision in the midst of extraordinary complexity. *Neuron*, 85 (2), 238–256.
- Urbani, A. & Belluzzi, O. (2000). Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian cns neurons. *European Journal of Neuroscience*, 12 (10), 3567–3574.
- Uysal, B. (2023). *Generation of a human disease model for KCNA2-related developmental and epileptic encephalopathy using ipsc-derived neurons*. University of Tübingen.
- Vacher, H., Mohapatra, D. P. & Trimmer, J. S. (2008). Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiological reviews*, 88 (4), 1407–1447.
- van Drongelen, W., Koch, H., Elsen, F. P., Lee, H. C., Mrejeru, A., Doren, E., ... Ramirez, J.-M. (2006). Role of persistent sodium current in bursting activity of mouse neocortical networks in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 96 (5), 2564–2577.
- Vera-González, A. (2022). Pathophysiological mechanisms underlying the etiologies of seizures and epilepsy. *Exon Publications*, 1–13.
- Wang, X., Umetsu, Y., Gao, B., Ohki, S. & Zhu, S. (2015). Mesomartoxin, a new K_v1.2-selective scorpion toxin interacting with the channel selectivity filter. *Biochemical Pharmacology*, 93 (2), 232–239.
- Wengert, E. R. & Patel, M. K. (2021). The role of the persistent sodium current in epilepsy. *Epilepsy Currents*, 21 (1), 40–47.
- Xiao, Y., Yang, J., Ji, W., He, Q., Mao, L. & Shu, Y. (2021). A- and d-type potassium currents regulate axonal action potential repolarization in midbrain dopamine neurons. *Neuropharmacology*, 185, 108399.
- Xu, L., Enyeart, J. A. & Enyeart, J. J. (2001). Neuroprotective agent riluzole dramatically slows inactivation of K_v1.4 potassium channels by a voltage-dependent oxidative mechanism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299 (1),

227–237.

- Yu, S. P. & Kerchner, G. A. (1998). Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Journal of neuroscience research*, 52 (5), 612–617.
- Zona, C., Siniscalchi, A., Mercuri, N. & Bernardi, G. (1998). Riluzole interacts with voltage-activated sodium and potassium currents in cultured rat cortical neurons. *Neuroscience*, 85 (3), 931–938.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Zentrum für Neurologie, Hertie-Institut für klinische Hirnforschung in der Abteilung Experimentelle Epileptologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Holger Lerche durchgeführt. Die Konzeption der Studie und der Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Holger Lerche, Dr. med. Stephan Lauxmann, Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch und Dr. med. Peter Müller. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder von mir eigenständig durchgeführt. Die Tierversuche zur Generierung kortikaler Neuronen-Kulturen wurden von Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch oder ebenfalls dafür geschulten Labormitgliedern durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch und Dr. med. Peter Müller durch mich. Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Prof. Dr. med. Holger Lerche, Dr. med. Stephan Lauxmann und Lukas Sonnenberg verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

8 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Prof. Dr. med. Holger Lerche für die Überlassung des interessanten Themas sowie das Vertrauen in mich bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. med. Stephan Lauxmann, Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch und Dr. med. Peter Müller, die mit mir gemeinsam maßgeblich an der Konzeption des Projektes und der Experimente gearbeitet haben und mich im Verlauf immer wieder unterstützt haben. Dr. med. Stephan Lauxmann hat mich dabei als Betreuer während des gesamten Prozesses begleitet und Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch war meine wichtigste Ansprechperson während der Zeit im Labor.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. med. Holger Lerche, Dr. med. Stephan Lauxmann und Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch außerdem für deren Unterstützung im Rahmen der Bewerbung um das Interdisziplinäre Promotionskolleg Medizin der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen bedanken. Das genannte Promotionskolleg hat mich durch die idelle und finanzielle Förderung im Verlauf meiner Arbeit an der Promotion unterstützt, wofür ich sehr dankbar bin.

Neben den genannten Personen, möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Epileptologie des Hertie-Institutes in Tübingen bedanken, die mir während der Zeit im Labor jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Darüberhinaus möchte ich Lukas Sonnenberg für seine konstruktiven Rückmeldungen während des Schreibprozesses danken.

Abschließend gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden, die meinen Weg im Laufe des Promotionsprojektes mit verfolgt haben und mich jederzeit unterstützen und motivieren konnten.