

Aus der

Neurologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt Epileptologie

**Elektrophysiologische Charakterisierung eines L1649Q
FHM3 knock-in Mausmodells auf Einzelzell- und
Netzwerkebene**

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

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

vorgelegt von

Philipp Justus Lührs

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter Professor Dr. T. Freilinger

2. Berichterstatter Professorin Dr. M. Knipper-Breer

Tag der Disputation: 28.10.2022

Inhalt

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung | 5 |
| 1.1 | Migräne | 5 |
| 1.1.1 | Epidemiologie und Genetik | 6 |
| 1.1.2 | Familiäre Hemiplegische Migräne | 6 |
| 1.1.3 | Genetik der FHM | 7 |
| 1.1.4 | Pathomechanismus der FHM | 10 |
| 1.2 | Ionenkanäle | 13 |
| 1.2.1 | Ionenkanäle und deren Rolle bei der zellulären Erregbarkeit | 14 |
| 1.2.2 | Aufbau und Funktion von spannungsabhängigen Natriumkanälen | 14 |
| 1.2.3 | Nomenklatur der Natriumkanäle | 16 |
| 1.2.4 | Expressionsmuster der Natriumkanäle | 17 |
| 1.3 | Zielsetzung der Arbeit | 19 |
| 2 | Material und Methoden | 20 |
| 2.1 | Mausmodell | 20 |
| 2.2 | Genotypisierung | 20 |
| 2.2.1 | Material zur Genotypisierung | 20 |
| 2.2.2 | Isolierung und Amplifikation der Versuchstier-DNA | 21 |
| 2.2.3 | Gelelektrophorese | 22 |
| 2.3 | Multielektroden-Arrays | 23 |
| 2.3.1 | Material zur Kultivierung von Neuronen auf Multielektroden- Arrays | 23 |
| 2.3.2 | Netzwerkaktivität in Multielektroden-Arrays | 24 |
| 2.3.3 | Beschichtung der Multielektroden-Arrays | 24 |
| 2.3.4 | Erstellung primärer Zellkulturen | 25 |
| 2.3.5 | Messungen spontaner Netzwerkaktivität mittels Multielektroden-Arrays ... | 26 |
| 2.4 | Patch-Clamp Messungen | 29 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.4.1 | Patch-Clamp Technik..... | 29 |
| 2.4.2 | Elektrischer Schaltplan der Whole-Cell-Konfiguration..... | 31 |
| 2.4.3 | Präparation thalamokortikaler Hirnschnitte | 32 |
| 2.4.4 | Pipetten..... | 33 |
| 2.4.5 | Aufbauplan des Setups..... | 34 |
| 2.4.6 | Messung | 35 |
| 2.4.7 | Messprotokolle..... | 36 |
| 2.5 | Statistische Auswertung | 38 |
| 3 | Ergebnisse | 39 |
| 3.1.1 | Netzwerkanalyse hippocampaler Neurone mit Multielektroden-Arrays | 40 |
| 3.1.2 | Entwicklung der Parameter über 10 Tage..... | 40 |
| 3.1.3 | Kurzzeitversuche Lamotrigin..... | 41 |
| 3.1.4 | Entwicklung der Parameter über 7 Tage mit Normierung und Langzeitversuche Lamotrigin | 42 |
| 3.2 | Patch Clamp Versuche..... | 43 |
| 3.2.1 | Kortikale Neuronen | 43 |
| 3.2.2 | Hippokampale Neurone | 46 |
| 4 | Diskussion..... | 49 |
| 5 | Literaturverzeichnis..... | 56 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| ACSF | Artificial Cerebrospinal Fluid |
| ATP1A2 | Gen einer Natrium-Kalium-ATPase |
| AUC | Area under the Curve |
| BD | Burstdauer |
| BOLD-MRT | Blood oxygenation level dependent-MRT |
| CA1 | Cornu Ammonis Sektor 1 |
| CACNA1A | Kalziumkanalgen |
| DIV | Days in vitro |
| DMEM | Dulbecco`s modified eagle medium |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| E17 | Embryonic Day 17 |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycoltetraessigsäure |
| FHM | Familiäre Hemiplegische Migräne |
| FKS | fötales Kälber Serum |
| GABA | γ -Aminobuttersäure |
| GEFS+ | generalised epilepsy with febrile seizures plus |
| HBSS | Hanks balanced salt solution |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl) - 1-piperazinyl) -ethansulfonsäure |
| HET | Heterozygote |
| IBI | Interburst Intervall |
| IFMT | Aminosäuresequenz Isoleucin, Methionin, Phenylalanin und Threonin |
| IHS | International Headache Society |
| kDa | Kilo-Dalton |
| MA | Migräne mit Aura |
| MEA | Multi Electrode Array |
| MO | Migräne ohne Aura |

| | |
|----------------|---|
| NB | Neurobasal Medium (Gibco) |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| OPV | Operationsverstärker |
| PB | Population Burst |
| PBS | Phosphat gepufferte Saline |
| PDL | Poly-D-Lysin |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| SCNxA | Sodium Channel alpha-Untereinheit |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SHM | Sporadische Hemiplegische Migräne |
| SMEI | severe myoclonic epilepsy of infancy |
| Taq-Polymerase | Polymerase des Thermus aquaticus |
| tsa-Zellen | transformierte menschliche Nierenzellen |
| TTX | Tetrodotoxin |
| UE | Untereinheit |
| WT | Wildtyp |

1 Einleitung

Migräne ist eine Erkrankung, die den Menschen seit langem bekannt ist. In medizinischen Papyri aus dem alten Ägypten wird Migräne als das Werk von Dämonen beschrieben. Die Behandlung der Erkrankung konnte magisch, pharmakologisch und chirurgisch erfolgen. So sollten die Schläfen nach dem Prinzip *similia similibus* (gleiches mit gleichem) mit der Asche verbrannter Schädel von Seewölfen eingerieben werden, oder es wurde versucht, die quälenden Dämonen mittels Trepanation zu befreien (Karenberg and Leitz 2001). Mit der Zeit wurden neue Modelle zur Krankheitsentstehung der Migräne entwickelt, auf deren Grundlage verschiedene Therapien entstanden. Die lange in der Medizin dominierende Humoralpathologie versuchte den Betroffenen mit Aderlässen Linderung zu verschaffen, ab dem 19. Jahrhundert haben Ärzte mit Elektrotherapien experimentiert, um ihren Patienten zu helfen (Koehler and Boes 2010). Anfang des 20. Jahrhunderts operierte der berühmte Neurochirurg Dr. Harvey Cushing vier Patientinnen, während sie eine Migräneattacke erlitten. Seine Versuche einer chirurgischen Migränebehandlung stützten sich auf eine Vielzahl verschiedener Hypothesen zur Krankheitsentstehung, inklusive humoraler Mechanismen, organischer Ursachen, Gefäßspasmen und erhöhtem intrakraniellen Druck. Keiner seiner Eingriffe konnte die Attacken lindern oder neue Erkenntnisse über die Krankheit gewinnen. Seine zu Lebzeiten nicht veröffentlichte Fallstudie spiegelt das breite Spektrum an vermuteten Pathomechanismen wider, die das damalige Verständnis von Migräne prägten (Latimer, Pendleton et al. 2011).

1.1 Migräne

Die Migräne zählt zu den sog. primären Kopfschmerzerkrankungen, bei denen der Schmerz das Hauptsymptom ist, ohne dass eine strukturelle Erkrankung vorliegt. Primäre Kopfschmerzerkrankungen sind von sekundären zu unterscheiden, bei denen die Schmerzen durch eine andere Erkrankung verursacht werden, wie zum Beispiel eine intrakranielle Raumforderung. Die klinische Diagnose der klassischen Migräne umfasst anamnestisch mindestens 5 Schmerzattacken mit einer Dauer von 4-72 Stunden, die nicht auf eine andere Erkrankung zurückzuführen sind. Die Attacken müssen dabei mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllen: unilaterale Lokalisierung, pulsierende Qualität des Schmerzes, mittlere bis schwere Schmerzintensität und Verstärkung des Schmerzes durch physische Aktivität. Während der Kopfschmerzattacke muss

mindestens eines der folgenden vegetativen Begleitsymptome auftreten: Übelkeit und/oder Erbrechen oder Photophobie und Phonophobie. Den Kopfschmerzattacken geht bei ca. einem Drittel der Betroffenen eine Auraphase mit reversiblen zentralnervösen Symptomen voraus (Lipton, Stewart et al. 2001). Man unterscheidet daher Migräne ohne Aura (MO) von Migräne mit Aura (MA) (The International Classification of Headache Disorders). Die Aura-Symptome bauen sich stufenweise auf und sind bei den meisten Betroffenen klassischer Weise visueller Natur in Form von sog. Flimmerskotomen. Diese umfassen negative Symptome in Form von Gesichtsfeldausfällen sowie positiv Skotome in Form von bogenförmigen Linien, die während der Auraphase typischerweise von zentral nach peripher wandern und von flimmernden Mustern umgeben sind. Seltener sind nicht-visuelle Aurasymptome wie Gefühlsstörungen, Aphasie oder Paresen.

Migräne wird nach WHO-Kriterien zu den 20 am stärksten den Menschen in seiner Lebensqualität beeinträchtigenden Krankheiten gezählt (Leonardi, Steiner et al. 2005) und verursacht außerdem eine enorme volkswirtschaftliche Belastung (Neubauer and Ujlaky 2002). Als Volkskrankheit mit hohen sozio-ökonomischen Kosten und einem starken Leidensdruck für die Betroffenen wird Migräne in der *Global Burden of Disease Study 2015* an dritter Stelle in der Rangliste für Arbeitsausfälle durch Krankheitsfolge gelistet (Leonardi, Steiner et al. 2005). Die Prävalenz der Migräne ist ungefähr 6% bei Männern und zwischen 15% und 17% bei Frauen. Die Prävalenz variiert im Alter. Sie steigt bis zum 40. Lebensjahr und fällt dann bei Männern und Frauen (Stewart, Shechter et al. 1994).

Die Migräne hat eine starke genetische Komponente. Eine dänische Studie konnte zeigen, dass Verwandte ersten Grades von Migränepatienten ein signifikant höheres Risiko haben, selbst zu erkranken. Verwandte ersten Grades von MO Patienten hatten ein fast doppelt so hohes Risiko, verglichen mit der Normalbevölkerung. MA Verwandte ersten Grades erfuhren eine noch stärkere Risikosteigerung um das 3,8fache (Russell and Olesen 1995). Zwillingsstudien offenbarten, dass sich Umwelteinflüsse und genetische Faktoren bei der Krankheitsentstehung die Waage halten (Mulder, Van Baal et al. 2003). Statistische Segregationsanalysen in der dänischen Bevölkerung untermauern die Theorie, wonach MA und MO multifaktoriell vererbt werden (Russell, Iselius et al. 1995). In Genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) werden die einzelnen

Genome einer Gruppe von Individuen auf genetische Unterschiede untersucht und es wird erforscht, ob bestimmte genetische Varianten mit bestimmten Phänotypen assoziiert sind. In einer zuletzt veröffentlichten GWA mit 375,000 Probanden wurden 38 Gen-Loci im Menschen gefunden, die das Migränerisiko beeinflussen (Gormley, Anttila et al. 2016). Viele der Gene werden stark in Gewebe von Arterien exprimiert. Diese Ergebnisse rücken die vaskuläre Komponente in der Pathophysiologie der Migräne in den Fokus. Der Schwerpunkt könnte jedoch auf einer Schwäche der Methoden beruhen, da die Bereitstellung und Untersuchung von neuronalem Gewebeproben höhere Ansprüche stellt als die Darstellung vaskulären Gewebes, so dass spezifisches neuronales Gewebe mit Relevanz für die Migränepathophysiologie eventuell nicht in die Untersuchung einbezogen wurde (Gormley, Winsvold et al. 2016). Einige der 38 Gen-Loci zeigten zudem eine ausgeprägte Expression in neuronalem Gewebe. Unter den 38 Gen-Loci waren zwei für Ionenkanäle und drei Kanäle, die mit der Ionenhomöostase in Verbindung stehen. Es fanden sich also Argumente für vaskuläre und neuronale Komponenten in der Pathophysiologie.

Genetisch komplexe Erkrankung wie Migräne produzieren selten klare Vererbungsmuster. Eine wichtige Ausnahme ist die Familiäre hemiplegische Migräne (FHM), für die ein monogener Erbgang gesichert ist (Freilinger and Dichgans 2006).

1.1.1 Hemiplegische Migräne

Die Hemiplegische Migräne ist eine MA mit obligatorischer Motoraura in Form einer reversiblen motorischen Schwäche, die in der Regel weniger als 72 Stunden besteht, in Einzelfällen aber bis zu Tagen oder sogar mehreren Wochen anhalten kann. In der klinischen Praxis ist eine milde motorische Schwäche anamnestisch oft nicht eindeutig von sensorischen Ausfällen zu unterscheiden, wodurch die Diagnosestellung oft erschwert ist. (Freilinger and Dichgans 2013). Die HM wird unterteilt in eine sporadische und eine familiäre Form. Die Familiäre Hemiplegische Migräne ist definiert durch eine MA mit Hemiplegie und mindestens einem Verwandten ersten oder zweiten Grades, der ebenfalls an einer MA mit Hemiplegie leidet. FHM Patienten können zusätzlich zu den hemiplegischen Anfällen auch an MA oder MO leiden (The International Classification of Headache Disorders der IHS). Die Krankheit manifestiert sich typischerweise in der Kindheit oder frühen Jugend und damit früher als die häufigen Formen der Migräne. Die

Attackenfrequenz ist ebenfalls niedriger als bei den klassischen Migräneformen mit durchschnittlich 3 Attacken pro Jahr (Freilinger and Dichgans 2013). Die motorischen, sensorischen und visuellen Aurasymptome der FHM gleichen denen der MA, halten aber vergleichsweise länger an. 69% der Betroffenen leiden während der Anfälle außerdem an Symptomen, die die IHS Kriterien der Basilarismigräne (neuer Begriff: Migräne mit Hirnstamm-Aura) erfüllen, mit charakteristischen Hirnstammsymptomen wie Schwindel, Tinnitus, Ataxie und Bewusstseins Einschränkungen (Thomsen, Eriksen et al. 2002). Mögliche Komplikationen während einer Attacke beinhalten Fieber, Verwirrtheit, Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma sowie epileptische Anfälle (Freilinger and Dichgans 2013). Viele FHM Erkrankte berichten von exogenen Faktoren als Auslöser einer Attacke, wie hellem Licht, Stress und Stimmungslage oder physischer Anstrengung (Hansen, Hauge et al. 2011). Auch leichte Kopftraumata und Kontrastmittelexposition sind beschriebene Triggerfaktoren für Anfälle. Die pure FHM kann zudem von einer FHM plus mit interiktaler Kleinhirnsymptomatik wie Nystagmus und Stand und Gangataxie unterschieden werden (Freilinger and Dichgans 2006). Diese Symptome können sich in den Intervallen zwischen den Attacken entwickeln. Des Weiteren wurden permanente kognitive Defizite beschrieben, die sich als mentale Retardierung oder im späteren Verlauf einsetzende dementielle Entwicklung manifestieren können (Freilinger and Dichgans 2013). Fälle von hemiplegischer Migräne treten neben der familiären Form auch sporadisch (SHM) auf. Bei der SHM ist die Familienanamnese bezüglich HM unauffällig. SHM-Patienten zeigen gleichzeitig die typischen FHM Merkmale prolongierter Aura mit mehreren Aurasymptomen inklusive iktaler Hemiplegie, die sie von MA Attacken abgrenzen (Thomsen, Ostergaard et al. 2003).

1.1.2 Genetik der FHM

Die FHM ist eine genetisch heterogene Erkrankung mit autosomal-dominantem Erbgang. Bis heute konnten Mutationen in drei Genen als ursächlich für FHM beschrieben werden (Freilinger and Dichgans 2006).

Tabelle 1: Übersicht der bekannten FHM Subtypen

| Subtyp | Lokus | Gen | Genprodukt |
|--------|---------|----------------|---|
| FHM1 | 19q13 | <i>CACNA1A</i> | Neuronaler Kalziumkanal Ca _v 2.1 |
| FHM2 | 1q21-23 | <i>ATP1A2</i> | Astrozytäre Na ⁺ -K ⁺ -ATPase |
| FHM3 | 2q24 | <i>SCN1A</i> | Neuronaler Natriumkanal Na _v 1.1 |

CACNA1A, das erste Gen, das mit FHM assoziiert wurde, kodiert für den neuronalen Kalziumkanal Ca_v2.1. Missense-Mutationen in *CACNA1A* betreffen die Hälfte der an purer FHM Erkrankten und so gut wie alle Familien, in denen FHM plus mit Kleinhirnsymptomatik beschrieben werden konnte (Ophoff, Terwindt et al. 1996, Ducros, Denier et al. 2001). Der Kanal wird im gesamten Gehirn prä- und postsynaptisch exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Transmitterausschüttung. Passend zu den zerebellären Symptomen wurde eine erhöhte Dichte der Kanäle im Kleinhirn gemessen (Westenbroek, Sakurai et al. 1995). Elektrophysiologische Studien an einem Knock-in-Mausmodell der humanen FHM1 R192Q-Mutation zeigten funktionsverstärkende Effekte inklusive einer erhöhten Ca⁺-Stromdichte in Körnerzellen und einer verstärkten Transmitterausschüttung an der neuromuskulären Synapse. Es wurde außerdem ein reduzierter Schwellenwert und eine erhöhte Ausbreitungsgeschwindigkeit von Kortikaler Streudepolarisation im Mausmodell gemessen (van den Maagdenberg, Pietrobon et al. 2004).

FHM2 wird durch Mutationen mit Funktionsverlust im Gen *ATP1A2* verursacht. Das Gen kodiert für eine membranäre Na⁺-K⁺-ATPase, mit deren Hilfe Zellen aktiv einen Ionengradienten aufbauen (Vanmolkot, Kors et al. 2003). In FHM2 W887R-Knock-in Mäusen wurde eine verminderte Expression der Na⁺-K⁺-ATPase an der Zelloberfläche nachgewiesen. Wie FHM1 Tiere zeigten die W887R-Mäuse eine niedrigere Schwelle zur Auslösung von CSD (Leo, Gherardini et al. 2011).

Mutationen im *SCN1A*-Gen auf Chromosom 2q24 im Zusammenhang mit FHM wurden erstmal 2005 beschrieben. *SCN1A* kodiert die α-Untereinheit des spannungsgesteuerten Natriumkanal Nav1.1 (Dichgans, Freilinger et al. 2005). Der Nav1.1 Natriumkanal ist vor allem auf GABAergen Interneuronen lokalisiert (Ogiwara, Miyamoto et al. 2007). Die Q1489K-Missense-Mutation auf Chromosom 2q24 wurde in drei Familien mit

hemiplegischer Migräne gefunden, bei denen sich weder Mutationen in *CACN1A* noch in *ATP1A2* fanden, den beiden Genen, die bis dato mit FHM assoziiert wurden. Mit der Entdeckung der *SCN1A*-Mutation wurde ein dritter FHM Subtyp definiert, die FHM3 (Dichgans, Freilinger et al. 2005).

SCN1A (Abbildung 3) ist das Hauptziel epileptogener Mutationen und stark mit Epilepsie assoziiert. Die entdeckte Q1489K-Mutation ist insofern bemerkenswert, als dass sie die erste *SCN1A*-Mutation unter über 150 beschriebenen Mutationen ist, die nicht entweder mit schweren frühkindlichen Epilepsien (SMEI) oder mit generalisierter Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus (GEFS+) assoziiert ist (Meisler and Kearney 2005, Mulley, Scheffer et al. 2005, Vanmolkot, Babini et al. 2007). Die in SMEI beschriebenen Mutationen betreffen Nonsense-, Leseraster- und Missense-Mutationen (Rhodes, Lossin et al. 2004), während GEFS+ ausschließlich mit Missense-Mutationen assoziiert ist (George 2005, Barela, Waddy et al. 2006).

Erste funktionelle Studien der entdeckten Q1489K-Mutation in rekombinanten humanen *SCN5A*-Kanälen, die zu humanen *SCN1A*-Kanälen stark homolog sind, zeigten eine beschleunigte Erholungszeit von der schnellen Inaktivierung in den Kanälen (Dichgans, Freilinger et al. 2005).

2007 wurde eine weitere FHM3-Mutation im *SCN1A*-Gen beschrieben. Genomanalysen in zehn nordamerikanischen Familien mit FHM führten zur Entdeckung der L1649Q-Mutation. Funktionelle Analysen der Mutation in *SCN5A*-Kanälen zeigten eine verlangsamte Inaktivierung sowie eine doppelt so schnelle Erholung von der schnellen Inaktivierung. Beides sprach für eine Funktionssteigerung der Natriumkanäle als Konsequenz der Mutation (Vanmolkot, Babini et al. 2007).

Weitere Untersuchungen mit der L1649Q-Mutation in *SCN1A*-Kanälen in transfizierten tsA-201 Zellen zeigten sowohl zu den vorhergegangenen Versuchen mit *SCN5A*-Kanälen als auch untereinander widersprüchliche Ergebnisse. In tsA-201 Zellen transfiziert mit der L1649Q-Mutation wurde ein kompletter Funktionsverlust aufgrund stark reduzierter Oberflächenexpress auf der Zellmembran beobachtet. In der gleichen Arbeit wurden Nav1.1-Kanäle mit der FHM3 Q1489K-Mutation in der langen Splicevariante in tsA-201 Zellen exprimiert und zeigten einen Funktionsverlust im Vergleich zu Wildtypen (Kahlig,

Rhodes et al. 2008). In einer anderen Arbeit wurde die kurze Splicevariante von Q1489K in tsA-201 Zellen transfiziert und es konnte eine Funktionsverstärkung beobachtet werden (Cestèle, Scalmani et al. 2008).

Bei auf Kahlig, Rodes et al. 2008 aufbauenden Versuchen gelang es schließlich, die in der Arbeit beschriebene verminderte Oberflächenexpression von L1649Q-Nav1.1-Kanälen in langer Splicevariante durch Modifikation der Inkubationstemperatur und Koexpression von interaktiven Proteinen zu erhöhen. Die exprimierten Kanäle mit der L1649Q-Mutation zeigten eine Funktionssteigerung im Vergleich zum Wildtypen (Cestèle, Schiavon et al. 2013).

Wie bereits beschrieben wurden Mutationen in *SCN1A* bisher vor allem mit Epilepsien assoziiert, wie der generalisierten Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus (GEFS+) (Escayg, MacDonald et al. 2000) und der schweren infantilen myoklonischen Epilepsie (Mulley, Scheffer et al. 2005). Die mit GEFS+ in Verbindung stehende Nav1.1-R1648H-Mutation findet sich nur eine Aminosäure von der in dieser Arbeit vorgestellten L1649Q-Mutation entfernt. In verschiedenen publizierten Studien zeigten sich, ähnlich wie bei den Untersuchungen der L1649Q-Mutation, widersprüchliche Ergebnisse entweder als Funktionsverstärkung oder Funktionsverlust in heterologen Modellsystemen (Alekov, Rahman et al. 2000, Spampinato, Escayg et al. 2001, Lossin, Wang et al. 2002) Die Konsequenzen auf die Elektrophysiologie verschiedener Neuronentypen wurden schließlich in einem Knock-in-Mausmodell untersucht, das den menschlichen Epilepsie-Phänotyp mit spontanen generalisierten Anfällen und einer verminderten Schwelle zur Auslösung von thermal induzierten Anfällen zeigte. Es konnte eine ubiquitäre Mindererregbarkeit der Interneuronen im Thalamus, Cortex und im Hippokampus gezeigt werden. In den exzitatorischen Neuronen der Versuchstiere konnten keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden. Die Veränderung in den Interneuronen mit der R1648H-Mutation, die letztendlich zu verminderter Erregbarkeit führte, betraf die Auslösung von Aktionspotentialen am Axoninitialsegment (Hedrich, Liautard et al. 2014).

Die Identifikation der FHM-Gene ist ein wichtiger Schritt zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Migräne. Das Studium der klar definierten hereditären Migräneformen

deutet auf elektrophysiologische Veränderungen in Folge einer Kanalopathie als Schlüsselmechanismen in der Entstehung von Migräneaura und möglicherweise auch dem Schmerz.

1.1.3 Pathomechanismus der FHM

Die theoretischen Modelle zu den Mechanismen der Entstehung der FHM basieren weitestgehend auf der Auslösung einer kortikalen Streudepolarisation und der Interaktion elektrophysiologischer, vaskulärer und ionenhomöostatischer Faktoren.

1.1.3.1 Kortikale Streudepolarisation und Migräneaura

Es wurden bisher drei verschiedene transgene Mausmodelle generiert: mit den FHM1-Mutationen R192Q (van den Maagdenberg, Pietrobon et al. 2004) und S218L (van den Maagdenberg, Pizzorusso et al. 2010) und der FHM2 Mutation W887R (Leo, Gherardini et al. 2011). Allen ist eine erhöhte Anfälligkeit für Kortikale Streudepolarisationen (Cortical Spreading Depression, CSD) gemeinsam, eine sich über den Kortex ausbreitende Depolarisationswelle, der eine anhaltende Depression der neuronalen Aktivität folgt (Leo 1944). Die CSD wird als Korrelat der Migräneaura betrachtet (Lauritzen 1994, Pietrobon and Moskowitz 2013). CSD wird von einer lokalen Erhöhung der Kaliumkonzentration ausgelöst, die Neuronen dauerhaft für ungefähr 30-50 Sekunden depolarisiert (Smith, Bradley et al. 2006). Es wurde vermutet, dass die initiale Akkumulation von extrazellulärem Kalium eine Folge von wiederholter Depolarisation übererregbarer Neuronen im Kortex ist, und dass diese Akkumulation der Ausgangspunkt der Depolarisationswelle ist. Die Fortleitung der Welle ist noch nicht ganz verstanden. Es wird vermutet, dass die interstitielle Diffusion von Kalium und Glutamat die Welle fortleiten. Eine andere Vermutung ist die Fortleitung via gap junctions (Dodick 2018).

Die Depolarisationswelle betrifft neuronale und gliale Membranen und ist mit einer Hyperämie assoziiert, gefolgt von einer oligämischen Phase. In fMRT-Studien wurden vor und während provozierten visuellen Auren BOLD-Signale im visuellen Kortex von MA-Probanden gemessen werden. Die BOLD-Signale zeigten eine initiale Hyperämie, die sich den Skotomen entsprechend retinotop über den Kortex ausbreiteten. Geschwindigkeit, Dauer und Ausbreitungsverhalten ähneln den der CSD. Der Hyperämie folgt ein vermindertes BOLD-Signal mit verringerter BOLD-Antwort auf visuelle Reize. Die

Korrelation der BOLD-Signale mit den Aurasymptomen einerseits und der CSD andererseits bekräftigen die Annahme, dass eine kortikale Streudepolarisation in Form einer CSD für die Aurasymptome verantwortlich ist (Hadjikhani, del Rio et al. 2001).

Die erhöhte Anfälligkeit für CSD in den FHM-Tiermodellen hängt möglicherweise mit einer gestörten Ionenhomöostase und dem Anstieg exzitatorischer Aminosäuren im Extrazellulärraum zusammen, die von den Mutationen der Ionenleitfähigkeiten ausgeht (Moskowitz, Bolay et al. 2004). Kalium und Glutamat zählen zu den etablierten Auslösern von CSD. So geht aus einem Block der für Glutamat selektiven N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA) dementsprechend eine Unterdrückung von CSD hervor, während die Blockade unspezifischer AMPA-Rezeptoren keine Auswirkung auf die Sensibilität für CSD hat (Nellgård and Wieloch 1992). Die gesteigerte Erregbarkeit der FHM-Netzwerke führt nach dem aktuellen Modell auf verschiedenen Wegen zu erhöhten extrazellulären Kalium und Glutamat Konzentrationen. Die Funktionsverstärkung der Mutationen der *CACNA1A*-Kanäle in FHM1-Patienten führen zu einer vermehrten Ausschüttung von Glutamat in den synaptischen Spalt. Die im *ATP1A2*-Gen kodierte membranäre $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des astrozytären Natrium-Kalium Gradienten. Astrozyten sorgen über einen an den Natriumgradienten gekoppelten Glutamatttransporter für die synaptische Glutamat-Clearance. Der Funktionsverlust der Mutation in FHM2 resultiert in verminderter Clearance und analog zur FHM1 in gesteigerter Glutamat und Kaliumkonzentration extrazellulär (Moskowitz, Bolay et al. 2004).

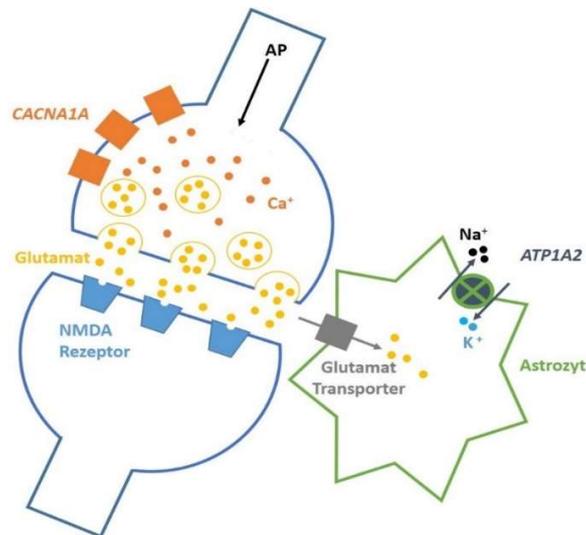


Abbildung 1: Möglicher Pathomechanismus der FHM. Ein vom Soma kommendes Aktionspotential (**AP**) depolarisiert die Präsynapse. FHM1-CACNA1A Kanäle lassen vermehrt Kalzium einströmen, es kommt zu erhöhter Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat. Astrozyten bauen über ATP1A2 einen Natrium-Kalium Gradienten über ihrer Membran auf. Der Gradient dient als Energiequelle für die Aufnahme von Glutamat. Bei Funktionsverlust im Fall von FHM2 kann Glutamat nicht suffizient aus dem synaptischen Spalt abtransportiert werden. Zudem ist die Kaliumclearance gestört. Es kommt zur Erhöhung des extrazellulären Kaliums. Nach (Freilinger and Dichgans 2006)

1.1.3.2 Von der CSD zum Migräne-Kopfschmerz

Ein pulsierender, unilateraler Kopfschmerz ist die klinische Manifestation der Migräne. Es wird daher angenommen, dass der Nervus trigeminus und die von ihm nozizeptiv innervierten kranialen Gefäße eine wichtige Rolle im Pathomechanismus spielen (Pietrobon and Striessnig 2003). Ein direkter nozizeptiver Effekt einer CSD konnte im Tierexperiment mit Ratten demonstriert werden. CSD im visuellen Kortex führt zu zeitlich verzögerter Aktivierung meningealer Nozizeptoren (Zhang, Levy et al. 2010) und zentraler trigeminovaskulärer Neuronen (Zhang, Levy et al. 2011). Die Verzögerung zwischen dem Auslösen der kortikalen CSD und der Aktivierung der Trigemineuronen entspricht ungefähr der Zeit zwischen dem Auftreten der Aurasymptome und dem Beginn der Kopfschmerzen. Über trigeminale und parasympathische Aktivierung löst eine CSD außerdem eine Vasodilatation der Arteria meningea media aus, die große Teile der Dura Mater versorgt. Gleichzeitig treten Plasmaproteine aus dem Endothel in der Dura Mater aus und es kommt perivaskulär zu ödematösen Veränderungen (Bolay, Reuter et al. 2002). Nach dem aktuellen Modell begünstigt die Plasmaextravasation eine sterile

Inflammation im ödematösen Milieu. Hinzu kommen von den überaktiven Neuronen an der Wellenfront der CSD freigesetzte Ionen und Neurotransmitter. Im Zusammenspiel der freigesetzten Ionen und der Ausschüttung proinflammatorischer Neuropeptide aus den Nervenendigungen in der Dura kommt es zu einer neurogenen Entzündung, die zu anhaltenden trigeminovaskulärem Schmerzempfinden führt (Pietrobon and Moskowitz 2013).

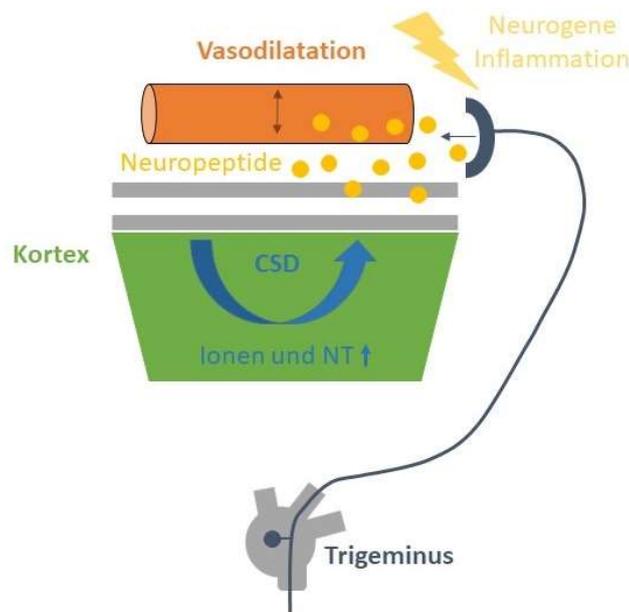


Abbildung 2: Möglicher Pathomechanismus des Migräneschmerzes. Kortikale Streudepolarisation (**CSD**), eine Welle neuronaler und glialer Depolarisation breitet sich über den Kortex aus. Die freigesetzten Ionen (v.a. Kalium) und Neurotransmitter (**NT**) aktivieren trigeminovaskuläre Nervenendigungen, aus denen proinflammatorische Neuropeptide ausgeschüttet werden. Über parasympathische Reflexe kommt es zu einer Vasodilatation. Aus den Gefäßen der Dura treten Plasmaproteine aus und begünstigen die neurogene Entzündung. Erstellt nach (Pietrobon and Moskowitz 2013).

1.2 Ionenkanäle

Der Transport von Ionen über die Zellmembran spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen. Ionenpumpen erzeugen aktiv einen elektrochemischen Gradienten über der isolierenden Membran. Ionenkanäle sind transmembranäre Proteine, die den passiven Austausch der Ionen über die Membran regulieren. Sie unterscheiden sich untereinander in Ionenselektivität und Aktivierungsmechanismus. Selektive Kanäle besitzen einen Filter, der nur bestimmte Ionenklassen passieren lässt. So gibt es Kanäle, die nur Natriumionen passieren lassen, und andere, die nur für Kaliumionen durchlässig

sind (Gouaux and MacKinnon 2005). Aktiviert werden die Kanäle über Second-Messenger-Systeme, Liganden oder Änderungen der Membranspannung (Kandel, Schwartz et al. 2000).

1.2.1 Ionenkanäle und deren Rolle bei der zellulären Erregbarkeit

In Muskelzellen und Neuronen spielt das fein abgestimmte Zusammenspiel verschiedener Ionenkanäle eine Schlüsselrolle bei der Signalerzeugung und Weiterleitung. Aus Fehlfunktion von Ionenkanälen resultieren sogenannte Kanalopathien, wie das Brugada-Syndrom bei dysfunktionalen kardialen Natriumkanälen (Benito, Brugada et al. 2008) oder benigne familiäre Neugeborenenkrämpfe bei Mutationen in neuronalen Kaliumkanälen (Lerche, Biervert et al. 1999).

Neuronen verarbeiten chemische und elektrische Eingangssignale und leiten sie weiter. Steigt das Membranpotential eines Neurons über einen Schwellenwert, werden spannungsabhängige Natriumkanäle aktiviert und ein Aktionspotential wird initiiert. Da das Funktionieren des gesamten Netzwerkes von möglichst fehlerfreier Signalerzeugung und Weiterleitung der einzelnen Neuronen abhängig ist, können Fehlfunktionen in spannungsabhängigen Natriumkanälen schwerwiegende Effekte auf den Organismus haben (Kandel, Schwartz et al. 2000).

1.2.2 Aufbau und Funktion von spannungsabhängigen Natriumkanälen

Spannungsabhängige Natriumkanäle bestehen aus einer α -Untereinheit und einer bzw. zwei β -Untereinheiten (Abbildung 3). Die α -Untereinheit ist ein Glykoprotein (260 kDa), bestehend aus vier homologen Domänen (I-IV), die jeweils aus sechs transmembranären α -Helices (S1-S6) aufgebaut sind. Sie formt die Pore, indem sich die vier Domänen ringförmig in die Membran einlagern und ist auch ohne die modulierenden β -Untereinheiten funktionsfähig (Catterall, Goldin et al. 2005). Nach dem mathematischen Modell von Hodgkin und Huxley können Natriumleitfähigkeiten drei Zustände einnehmen: geschlossen, offen und inaktiviert (Hodgkin and Huxley 1952). Beim Ruhemembranpotential ist der Kanal geschlossen und für Ionen nicht durchlässig. Änderungen der Membranspannung werden von einem Spannungssensor im S4-Segment registriert. Die S4-Segmente der einzelnen Domänen enthalten in jeder dritten Position positiv geladene Aminosäuren, die sich bei Depolarisation über die Membran

verschieben und durch Konformationsänderungen den Ionenkanal aktivieren, so dass Natriumionen über die Membran fließen können. Die schnelle Inaktivierung erfolgt durch eine intrazelluläre Schleife zwischen den Domänen III und IV, die die Aminosäuresequenz Isoleucin, Methionin, Phenylalanin und Threonin (IFMT) enthält (Abbildung 3). Die Sequenz bindet an eine aus verschiedenen Regionen zusammengesetzte Kopplungsseite und verschließt den Poreneingang bei anhaltender Depolarisation von innen (Goldin 2003, Catterall, Goldin et al. 2005).

Es wurden bis heute vier β -Untereinheiten $\beta 1$ bis $\beta 4$ beschrieben (Frank, Yarov-Yarovoy et al. 2005). Die β -Untereinheiten sind multifunktional. Sie modulieren zum einen die Gating-Eigenschaften der α -Untereinheit wie die Aktivierungs- und Inaktivierungszeit (Catterall 2000). Sie können zum anderen mit der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett wechselwirken (McCormick, Isom et al. 1998, Isom 2001). Die zerebralen α -Untereinheiten sind nicht-kovalent an eine $\beta 1$ -Untereinheit und über Disulfidbrücken an eine $\beta 2$ -Untereinheit gebunden (Whitaker, Clare et al. 2000).

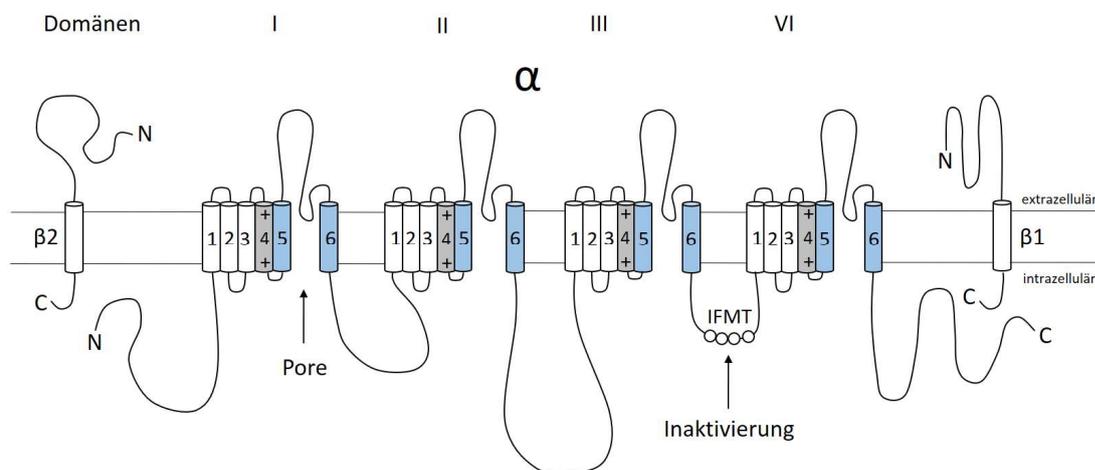


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Natriumkanals in der Zellmembran. Die α -Untereinheit besteht aus vier homologen Domänen (I-IV), mit jeweils sechs Transmembransegmenten (1-6), die über intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden sind. In Segment 4 ist der Spannungssensor mit positiv geladenen Aminosäuren (mit + gekennzeichnet), Segment 5 und 6 bilden die Pore. Der Inaktivierungspartikel wird von einer Schleife zwischen Domäne III und IV gebildet und enthält das IFMT Motiv. Die β -Untereinheiten bestehen aus je einem Transmembranprotein. **N** für N-Terminus, **C** für C-Terminus der Proteine. Nach (Catterall, Goldin et al. 2005)

Es wurden bis heute vier β -Untereinheiten $\beta 1$ bis $\beta 4$ beschrieben (Frank, Yarov-Yarovoy et al. 2005). Die β -Untereinheiten sind multifunktional. Sie modulieren zum einen die Gating-Eigenschaften der α -Untereinheit wie die Aktivierungs- und Inaktivierungszeit (Catterall 2000). Sie können zum anderen mit der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett wechselwirken (McCormick, Isom et al. 1998, Isom 2001). Die zerebralen α -Untereinheiten sind nicht-kovalent an eine $\beta 1$ -Untereinheit und über Disulfidbrücken an eine $\beta 2$ -Untereinheit gebunden (Whitaker, Clare et al. 2000).

1.2.3 Nomenklatur der Natriumkanäle

Eine große Anzahl verschiedener Natriumkanäle wurde mit Hilfe von biochemischen Verfahren, elektrophysiologischen Messungen und Klonierung entdeckt (Goldin 2001). Die Nomenklatur der Kanäle beruht auf der Nomenklatur für spannungsabhängige Kaliumkanäle (Chandy 1991). Der Name setzt sich aus dem Symbol für das permeable Ion (Na) und der im Index stehenden Abkürzung für den Öffnungs-Mechanismus (zum Beispiel „V“ für Voltage) zusammen. Die nachfolgende Zahl beschreibt die genetische Subfamilie (aktuell nur $Nav1$), die zweite Zahl die Isoformen der Subfamilie in chronologischer Reihenfolge der Entdeckung, zum Beispiel $Nav1.1$ als chronologisch erstentdeckter Kanal (Goldin, Barchi et al. 2000).

1.2.4 Expressionsmuster der Natriumkanäle

Im phylogenetischen Stammbaum kann man erkennen, dass $Nav1.1$, $Nav1.2$, $Nav1.3$ und $Nav1.7$ am nächsten verwandt sind (Abbildung 4 verändert nach Goldin, Barchi et al. 2000). Sie sind hoch sensitiv auf Tetrodotoxin (TTX), einen Natriumkanalblocker, und werden alle in Neuronen exprimiert. Ihre Gene liegen auf dem Chromosom 2q23-24. $Nav1.5$, $Nav1.8$ und $Nav1.9$ sind ebenfalls eng verwandt. Ihre Gene sind auf Chromosom 3p21-24 lokalisiert. Sie werden als Tetrodotoxin-resistent bezeichnet und werden in Herzzellen und im Hinterhorn des Rückenmarks exprimiert. Die Kanäle $Nav1.4$, hauptsächlich in der Skelettmuskulatur vertreten, und $Nav1.6$, primär im ZNS exprimiert, liegen jeweils auf den Chromosomen 17q23-25 und 12q13, und werden zu den TTX sensitiven Kanälen gezählt. Die 10. Isoform wird Na_x bezeichnet, funktionell nicht

exprimiert und ist zu 50% identisch in der Sequenz mit der Nav_v-Subfamilie. Sie wird wie die erste Gruppe auf Chromosom 2q23-24 kodiert (Catterall, Goldin et al. 2005).

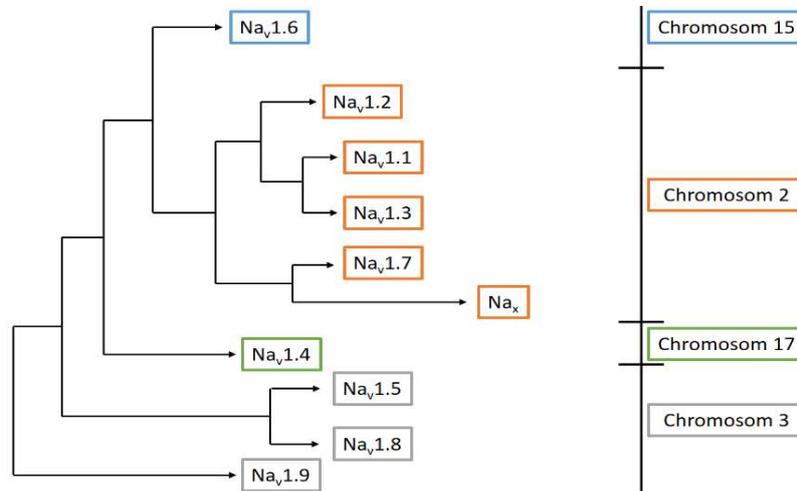


Abbildung 4: Stammbaum der humanen α -Untereinheiten der Natriumkanäle. Verändert nach (Goldin, Barchi et al. 2000). Farbliche Zuordnung der Kanäle zu den entsprechenden Chromosomen.

Die Natriumkanäle können alternativ auch nach ihren genetischen Bezeichnungen benannt werden. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2: Zuordnung der α -Untereinheiten zu den jeweiligen Genen und dem primären Vorkommen, verändert nach (Goldin, Barchi et al. 2000).

| Name | Gen | Vorkommen |
|----------------------|--------|--|
| Nav _v 1.1 | SCN1A | ZNS, PNS |
| Nav _v 1.2 | SCN2A | ZNS |
| Nav _v 1.3 | SCN3A | ZNS |
| Nav _v 1.4 | SCN4A | Skelettmuskulatur |
| Nav _v 1.5 | SCN5A | Herzmuskulatur |
| Nav _v 1.6 | SCN8A | ZNS, PNS |
| Nav _v 1.7 | SCN9A | PNS, Schwannsche Zellen |
| Nav _v 1.8 | SCN10A | PNS |
| Nav _v 1.9 | SCN11A | PNS |
| Nav _x | SCN7A | Herz, Uterus, PNS Skelettmuskel, Astrozyten, |

Im Gehirn finden sich primär die Isoformen Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, und Nav1.6. Das Expressionsmuster der Isoformen unterscheidet sich sowohl auf zellulärer Ebene zwischen den Neuronentypen, als auch in den einzelnen Hirnregionen (Vacher, Mohapatra et al. 2008).

Während der Entwicklung variiert die Expressionsstärke der einzelnen Natriumkanäle. So steigt die Dichte von Nav1.1 und Nav1.2 in der 3. Woche postnatal stark an. Im weiteren Entwicklungsverlauf sinkt die Kanaldichte von Nav1.1 im adulten Organismus auf 50% des postnatalen Spitzenwertes und ist am höchsten im kaudalen Teil des Gehirns, wie der Medulla, der Pons und dem Kleinhirn. Umgekehrt steigt die Nav1.2 Dichte postnatal weiter an und ist im rostralen Teil wie Kortex und Hippokampus am stärksten. Nav1.3 ist hauptsächlich in der fetalen und frühen postnatalen Zeit vorhanden und im adulten Gehirn nur noch schwach vertreten (Beckh, Noda et al. 1989, Gong, Rhodes et al. 1999).

Die Natriumkanalgene unterliegen während des Reifungsprozesses außerdem einem alternativen Splicing der prä-mRNA. Das Exon 5N der Gene *SCN2A*, *SCN3A* und *SCN8A* ist neonatal dominant und wird postnatal zunehmend von Exon 5A ersetzt (Gazina, Richards et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass 5A stärker erregbar ist als die 5N Form. Es kommt folglich während der Reifung innerhalb einer Kanalsubfamilie zu elektrophysiologischen Veränderungen (Xu, Thomas et al. 2007).

Die adulten Isoformen zeigen auch untereinander elektrophysiologische Unterschiede. So sind die vor allem am distalen Axoninitialsegment (AIS) von kortikalen Pyramidenzellen gelegenen Nav1.6 leichter erregbar und es wird vermutet, dass sie der Aktionspotentialinitiierung dienen. Im Gegensatz dazu haben die weiter proximal gelegenen Nav1.2 Kanäle eine höhere Schwelle zum Auslösen eines Aktionspotentials. Ihre Funktion liegt wahrscheinlich in der Weiterleitung (Hu, Tian et al. 2009). Wie auch im Kortex wurde Nav1.2 im Hippokampus primär in Pyramidenzellen lokalisiert (Nusser 2012).

Komplementär konnte mit immunhistochemischen Verfahren offengelegt werden, dass Nav1.1 primär auf kortikalen und hippokampalen Interneuronen exprimieren und hier eine Schlüsselrolle bei der Initialisierung von Aktionspotentialen in inhibitorischen Schaltkreisen einnehmen (Siehe auch Kapitel 1.1.3). Subzellulär verteilen sie sich in den

Interneuronen auf AIS, Axon und das Soma. Der Verlust von Nav1.1 in Knock-in-Mäusen mit einer *SCN1A*-Funktionsverstärkung führte zu Übererregbarkeit der neuronalen Netzwerke (Ogiwara, Miyamoto et al. 2007, Nusser 2012).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Veränderungen der Erregbarkeit der Neuronen und der Netzwerkaktivität spielen in der Entstehung der Migräne vermutlich eine entscheidende Rolle (Abschnitt 1.1.4.) Ziel der Arbeit war die elektrophysiologische Charakterisierung eines transgenen Mausmodells für Familiäre Hemiplegische Migräne Typ 3 mit der L1649Q-Mutation im *SCN1A*-Gen, um einen Beitrag zum besseren Verständnis des Pathomechanismus der FHM3 zu leisten. Längerfristig könnten die Erkenntnisse aus der Untersuchung monogenetischer Migräneformen an der Klärung der Entstehungsmechanismen der Migräne allgemein mitwirken und neue Therapiewege dieser häufigen und für die Betroffenen schwer belastenden Erkrankung aufzeigen.

In akuten murinen Hirnschnitten wurden mit der Patch-Clamp-Technik einzelne Neuronen im Kortex und Hippokampus untersucht. Es wurden exzitatorische und inhibitorische Neuronen gemessen und dabei wurde folgende Frage gestellt:

- Gibt es elektrophysiologische Unterschiede zwischen L1649Q-Mutanten und Wildtypen in Bezug auf Ruhemembranpotential, das Verhältnis von Strominjektionen zu dadurch ausgelösten Aktionspotentialen und die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotential?

Zudem wurden auf Multielektroden-Arrays embryonale Neuronen kultiviert und die Netzwerkaktivität abgeleitet. Es wurde außerdem der Effekt von Lamotrigin auf die Aktivität der Kulturen untersucht. Lamotrigin ist ein potenter Natriumkanalblocker und wird als Antiepileptikum eingesetzt (Wang, Huang et al. 1996). Untersuchungen mit Lamotrigin in der Migränetherapie haben zum Teil widersprüchliche Ergebnisse gezeigt. Im Vergleich von Lamotrigin mit einem Placebo in zwei gemischten Kohorten von MA und MO Patienten konnte Lamotrigin die Stärke der Attacken nicht verringern (Steiner, Findley et al. 1997). Langzeitstudien an MA-Patienten konnten durch den Einsatz von Lamotrigin die Dauer, Frequenz und Symptome der Migräneaura reduzieren, bei einigen MA Patienten außerdem die Frequenz der Attacken senken (Lampl, Katsarava et al. 2005).

Aurasymptome sind bei FHM vergleichsweise stark ausgeprägt, wodurch die auradämpfende Wirkung von Lamotrigin bei FHM von besonderem Interesse ist. In einer Fallstudie konnte gezeigt werden, dass eine Monotherapie mit Valproat die Frequenz der Attacken zweier FHM Patienten vermindert, eine Polytherapie mit Valproat in Kombination mit Lamotrigin führte zu einer Anfallsfreiheit. Der Wirkmechanismus blieb unbekannt (Pelzer, Stam et al. 2014).

Ziel der MEA-Untersuchungen war die Beantwortung folgender Fragen:

- Unterscheidet sich die Netzwerkaktivität der L1649Q-Kulturen von Wildtypkulturen?
- Wie beeinflusst Lamotrigin die Aktivität der Kulturen?

2 Material und Methoden

2.1 Mausmodell

Das in dieser Promotionsarbeit untersuchte FHM3-Mausmodell entstand durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. T. Freilinger. Durch homologe Rekombination wurde ein transgenes Knock-in-Versuchsmodell aus einer C57BL/6-Mauslinie geschaffen. Der gestellte Tierversuchsantrag für die Experimente für diese Arbeit wurde vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (§4 Mitteilung vom 19.08.2014.) Teile der Einzelzellmessungen dieser Arbeit sind in das Paper „Hyperexcitable interneurons trigger cortical spreading depression in an Scn1a migraine model.“ im Journal for Clinical Investigation im November 2021 mit eingeflossen (Auffenberg, Hedrich et al. 2021).

2.2 Genotypisierung

Um zwischen Wildtypen und Heterozygoten L1649Q-mutierten Tieren zu unterscheiden, wurden den Versuchstieren der Patch-Clamp- und MEA-Experimente Schwanzbiopsien entnommen. Das Gewebe diente der Genotypisierung der Tiere.

2.2.1 Material zur Genotypisierung

Tabelle 3: Materialien zur Genotypisierung der Versuchstiere

| Produkt | Firma |
|---|--------------------------------------|
| Agarose Basic | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| DDT | |
| dNTP's | |
| EDTA | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| MgCl ₂ | |
| NaCl | VWR International, Darmstadt |
| Orange G | |
| peqGold Range Mix DNA-Ladder 10.000 bp | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| 5x PCR Puffer | |
| Primer | |
| RedSafe | iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea |
| 10% SDS | |
| Spermidin | |
| Taq-Polymerase | |
| TBE-Puffer | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Tris-HCl | AppliChem GmbH, Darmstadt |

2.2.2 Isolierung und Amplifikation der Versuchstier-DNA

Die Gewebeprobe aus den Schwanzbiopsien wurde über Nacht bei 55°C lysiert und mit Proteinase K verdaut.

Tabelle 4: Chemikalien zur Herstellung des Lysat (100 ml)

| Chemikalie | Konzentration in M | Volumen in ml |
|-----------------|--------------------|---------------|
| Tris-HCl pH 7,5 | 1 | 5 |
| EDTA pH 8,0 | 0,5 | 10 |
| NaCl | 5 | 2 |

| | | |
|------------------|---|-------|
| DDT | 1 | 0,5 |
| Spermidin | 1 | 0,05 |
| 10% SDS | - | 20 |
| H ₂ O | - | 62,45 |

Gewebereste wurden vom Lysat durch Zentrifugation getrennt und die DNA durch Zugabe von 100% Isopropanol gefällt. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die gewonnene DNA einem PCR-Ansatz beigefügt und in einem Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen) amplifiziert.

Tabelle 5: PCR-Ansatz (25 µl)

| Chemikalie | Volumen in µl |
|------------------------|---------------|
| DNA | 2 |
| Forward-Primer (5 µM) | 1 |
| Backward-Primer (5 µM) | 1 |
| 5x PCR Puffer | 5 |
| dNTP's (10mM) | 0,5 |
| Taq-Polymerase | 0,2 |
| MgCl ₂ | 1 |
| H ₂ O | 14,3 |

Tabelle 6: PCR-Programm

| Temperatur in °C | Zeit in s |
|---------------------|-----------|
| 95 | 300 |
| 95 | 30 |
| 60 | 30 |
| 72 | 45 |
| 72 | 600 |

} 35 Zyklen

2.2.3 Gelelektrophorese

Eine Gelelektrophorese ermöglicht die räumliche Trennung der isolierten DNA-Fragmente nach Größe. Es wurden 1,0 % w/v Agarose in 1x TBE-Puffer gelöst und RedSafe zur Färbung der DNA-Stränge beigefügt. Nach Anlegen einer Spannung von 120 mV wanderten die negativ geladenen und mit Orangen-G versetzten DNA-Proben durch das Gel in Richtung Anode. Dabei entsteht ein für den jeweiligen Genotyp charakteristisches Bandenmuster. Als Referenz für die Größe der Banden wurde mit den Proben eine DNA-Leiter auf das Gel aufgetragen.



Abbildung 5: Bandenmuster einer Genotypisierung. Einzelbanden entstanden bei Wildtypproben, die Doppelbanden bei Proben heterozygoter L1649Q-Versuchstiere. Ganz links im Bild die DNA-Leiter als Größenreferenz. Die Fragmentgröße des ersten Amplifikats (WT) betrug hierbei 298 bp, die des zweiten Amplifikats 197 bp.

2.3 Multielektroden-Arrays

Multielektroden-Arrays (MEAs, Multi Channel Systems (MCS), Reutlingen) ermöglichen simultane, nicht-Zell-invasive Langzeitaufnahmen neuronaler Netzwerke in vitro.

2.3.1 Material zur Kultivierung von Neuronen auf Multielektroden-Arrays

| Produkt | Firma |
|--|--------------------------------------|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose, | Life Technologies, Carlsbad, CA, USA |
| L-Glutamin | Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland |
| FKS (fötale Kälberserum) | PAN-Biotech, Aidenbach |
| B-27 supplement | Gibco (Life Technologies) |
| Pen/Strep (10000 µg/ml) | Biochrom, Berlin |

| | |
|------------------|---------------------------|
| Laminin (1mg/mL) | Sigma-Aldrich |
| Trypsin (10x) | Gibco (Life Technologies) |
| HBSS | PAA Laboratories, Cölbe |
| Neurobasal | Gibco (Life Technologies) |
| PBS | Gibco (Life Technologies) |

DMEM+: 45 ml DMEM + 5 ml FKS + 250 µl Pen/Strep

NB+: 49 ml Neurobasal + 1 ml B27 (50x) + 250 µl L-Glutamin + 100 µl Pen/Strep

2.3.2 Netzwerkaktivität in Multielektroden-Arrays

Gemessen werden extrazelluläre Feldpotentiale, welche durch neuronale Potentialänderungen (wie Aktionspotentiale) ausgelöst werden (Spira and Hai 2013).

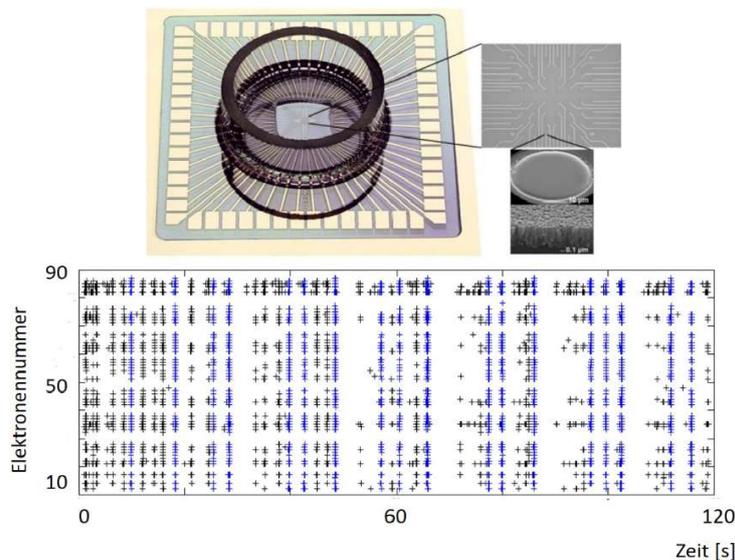


Abbildung 6: MEA-Messplatte mit 59 Aufnahmeelektroden und einer Referenzelektrode. Der Abstand zwischen den Elektroden beträgt 200 µm, der Durchmesser der einzelnen Elektroden 30 µm mit einem Eingangswiderstand von 30-50 kΩ. Die Neuronen wurden in der Messkammer kultiviert, die von ihnen erzeugten Feldpotentiale über die Elektroden aufgenommen und in Form von Spike Raster Plots (rechts) gespeichert. Jedes Kreuz repräsentiert ein innerhalb festgelegter Grenzwert gemessenes Potential auf der jeweiligen Elektrode (Elektrodennummern auf der Y-Achse) über der gemessenen Zeit (X-Achse).

2.3.3 Beschichtung der Multielektroden-Arrays

Eine Beschichtung mit Poly-D-Lysin (PDL) dient der verbesserten Adhäsion neuronaler Zellen auf der Oberfläche des Kulturgefäßes. Der Effekt basiert auf der elektrostatischen Interaktion des PDL mit negativen Ladungen in der Zellmembran (Yavin and Yavin 1974). PDL wurde in PBS gelöst (0,1 mg PDL/1 ml PBS). Jeweils 1 ml PDL-Lösung wurde auf die Messplatten aufgetragen und 24 Stunden bei 4°C gelagert. Anschließend wurde das PDL abgesaugt und die MEAs in zwei Waschschrritten mit sterilem Wasser und anschließend mit PBS gewaschen. Unter sterilen Bedingungen wurden die Messplatten luftgetrocknet und anschließend das Elektrodenfeld in der Mitte der Platte mit 15 µl in HBSS gelöstem Laminin beschichtet (5 µg Lam/1 ml HBSS).

Tabelle 7: Übersicht der Arbeitsschritte zur Beschichtung

| | Arbeitsschritte |
|-------|--|
| Tag 1 | - 1 ml PDL-Lösung (0.1 mg PDL/1 ml PBS) auf Messplatten auftragen - in Paraffin eingewickelt 24 h bei 4°C lagern |
| Tag 2 | - PDL-Lösung absaugen - 2 x mit sterilem Wasser waschen - 1 x mit PBS waschen - unter UV-Bestrahlung lufttrocknen - Lamininlösung (5 µg /1 ml HBSS) auf Elektrodenfeld auftragen |

2.3.4 Erstellung primärer Zellkulturen

Zur Gewinnung hippokampaler Neuronen von E17-Embryonen wurden trächtige Mäuse mit CO₂ eingeschläfert. Die Embryonen wurden rasch aus dem Muttertier entnommen und direkt im Anschluss dekapiert. Die Gehirne wurden aus dem Schädel präpariert und die Hippokampi wurden aus dem Gehirn isoliert. Schwanzbiopsien dienten zur späteren Genotypisierung der einzelnen Embryos. Das isolierte Gewebe wurde dreimal mit HBSS gewaschen und in 0.05% Trypsin (in HBSS) für 14 min bei 37°C angedaut. Daraufhin wurden die Proben dreifach mit DMEM+ gereinigt. Die mechanische Dissoziation der

Zellen aus dem Gewebeverband erfolgte durch wiederholtes Titrieren mittels einer 100 μl Pipette und anschließender Zuhilfenahme eines Zellsiebs (Maschenbreite 40 μm , Becton Dickinson).

Die Anzahl der gelösten Neuronen in den Proben wurde mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt. Auf die PDL-beschichteten MEA-Chips wurden anschließend je 120.000 isolierte Zellen in einem Volumen von 100 μl DMEM gegeben. Nach vier Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 wurde das DMEM durch Neurobasal+ (NB+) ersetzt. Bis zum Versuchsbeginn und zwischen den Versuchstagen wurden die Kulturen bei 37°C und 5 % CO_2 aufbewahrt. Ein Medienwechsel mit frischem NB+ erfolgte fünf Tage nach der Zellaussaat, anschließend alle 2-3 Tage und unmittelbar einen Tag vor den Messungen.

2.3.5 Messungen spontaner Netzwerkaktivität mittels Multielektroden-Arrays

Die Netzwerkaktivität primärer hippocampaler Neuronen von E17-Mäusen wurde mit Hilfe von MEAs gemessen. Die Neuronen wurden direkt nach der Präparation auf die mit Poly-D-Lysin und Laminin beschichteten MEA-Platten gesät und in NB+ kultiviert. Nach 7, 11, 14 und 21 Tagen wurde die Spontanaktivität in vitro bei ca. 36°C gemessen. Die ersten zwei Minuten dienen der Gewöhnung der aus dem Inkubator entnommenen Kultur an die neuen Umweltparameter und wurden nicht aufgezeichnet. Einen Tag vor jeder Messung wurde das Medium gewechselt.

In den MEA-Kulturen wurde der Effekt von Lamotrigin auf die Netzwerkaktivität der Neuronen mit und ohne die L1649Q-Natriumkanalmutation gemessen. Nach der Zugabe der jeweiligen Lamotriginkonzentration erfolgte ein Messabschnitt von zwei Minuten ohne Aufzeichnung. Der Abschnitt diente als Einwirkzeit für das Lamotrigin auf die Zellen.

Die Messungen erfolgten nach dem folgenden Schema:

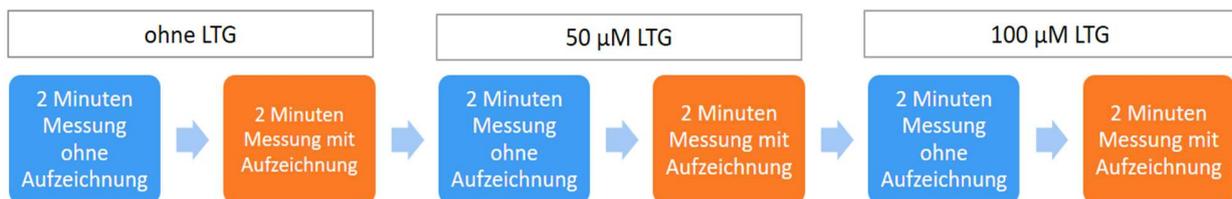


Abbildung 8 : Ablaufschema der Messungen. LTG= Lamotrigin

Die Aktivität der neuronalen Primärkulturen wurde parallel über allen 60 Elektroden mit einer Abtastrate von 25 kHz aufgezeichnet und mit der Standardsoftware des Herstellers „MC_Rack“ (Multi Channel Systems, Reutlingen) visualisiert und gespeichert.

Eine Analyse der MEA-Daten erfolgte nach den Aufzeichnungen mit Hilfe des Programms Spanner (Result, Düsseldorf; siehe Illes, Theiss et al. 2009). Die Software detektiert Potentialänderungen über den Elektroden. Treten die Änderungen im festgelegten Bereich zwischen 20 und 300 μV auf, werden sie im Spike-Rasterplot als Kreuz (Spike) dargestellt. Errechnet wurde die absolute Anzahl an detektierten Spikes über den gesamten Zeitraum der Messung und das durchschnittliche Zeitintervall zwischen den Spikes.

Zur Analyse synchroner Netzwerkaktivität über allen Elektroden in Form von „Population Bursts“ (PB) wurde ein spezielles MatLab-Skript (SSMT, Düsseldorf) verwendet. Bursts sind Feuersalven, schnelle Abfolgen von Aktionspotentialen. Während eines Population Burst herrscht eine erhöhte Feuerrate im Netzwerk und es kann über mehreren Elektroden eine synchrone Aktivität abgeleitet werden. Um PB aus der Gesamtaktivität zu filtern, wurden Bursts ausgewählt, die die durchschnittliche 1 s Feuerrate (x-Achse) überschritten. Folgende Kriterien mussten erfüllt sein, um als PB gewertet zu werden: 1. die maximale Feuerrate musste die Höchstfeuerrate um 3 Standardabweichungen überschreiten, 2. die maximale Feuerrate überschritt 10 % des Durchschnitts der fünf höchsten Feuerraten, 3. mindestens drei Elektroden waren beteiligt. Das von Stephan Theiss von der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geschriebene Skript kalkuliert auf Grundlage der zuvor erstellten Spanner-Daten die Gesamtanzahl und durchschnittliche zeitliche Länge der PB, die Zeitintervalle zwischen den Bursts, die Höchstfeuerrate in den Bursts und den Anteil der Gesamtspikes an PB. Zusätzlich ermittelte das Programm Kappa, einen Parameter für die Synchronizität des neuronalen Netzwerks. Bei $\text{Kappa}=1$ herrscht absolute Synchronizität; zur detaillierten Ableitung von Kappa (Illes, Theiss et al. 2009).

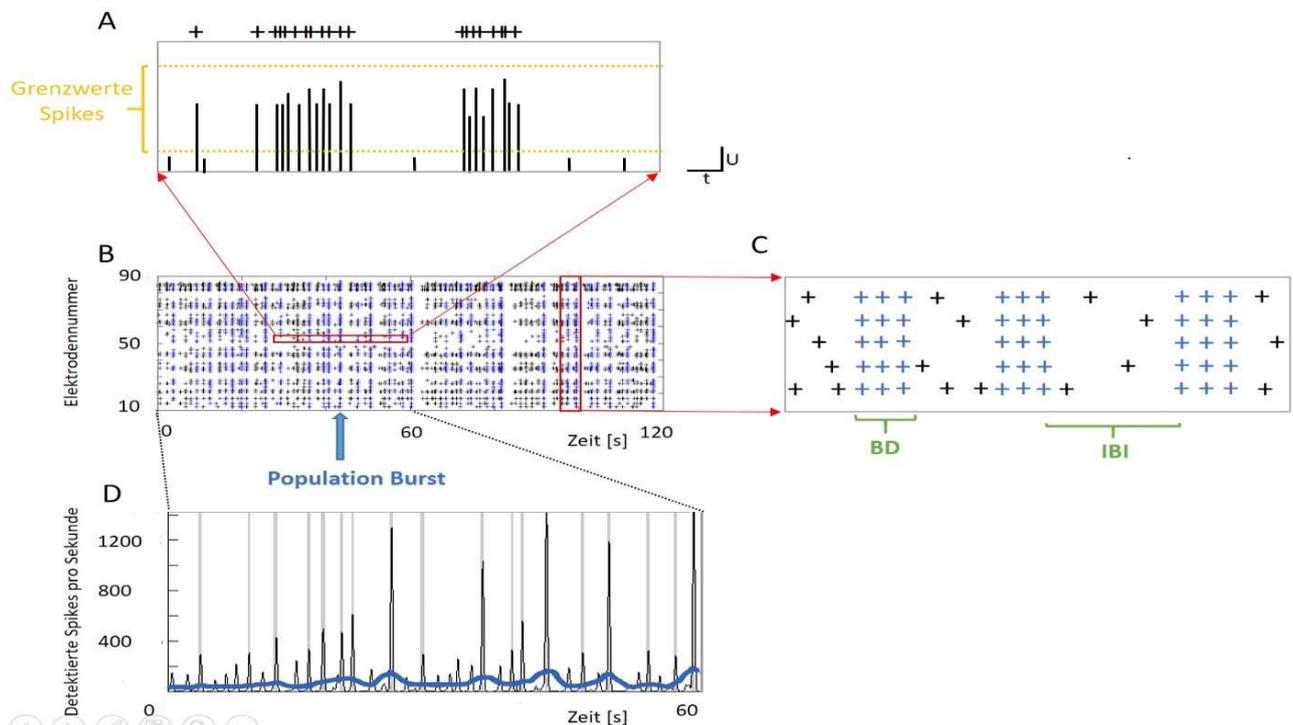


Abbildung 9: Analyse der MEA-Messungen **A** Schematische Abbildung der Messparameter einer einzelnen Elektrode, analysiert mit dem Programm Spanner (Result, Düsseldorf). Jede gemessene Potentialänderung innerhalb des definierten Grenzbereichs wird als Kreuz im Spike Raster Plot abgebildet. **B** Spike Raster Plot einer Aufnahme über 120 s. Potentialänderungen sind als Kreuze dargestellt. Synchroner Aktivität in Form von Population Bursts (PB) wird blau hervorgehoben. **C** schematische Darstellung des Rasterplots. BD = Burstdauer, IBI = Interburst Intervall **D** Darstellung der Netzwerkanalyse mit MatLab (SMMT, Düsseldorf). Die Höchstfeuerrate wurde errechnet, indem die Summe aller Spikes über allen Elektroden in 5 ms Abschnitten zusammengefasst und mittels einer Gauß-Funktion mit 100 ms Standardabweichung geglättet wurde.

2.4 Patch-Clamp Messungen

Die Patch-Clamp Technik erlaubt es dem Experimentator, Strom- und Spannungsänderungen auf Einzelzellebene zu messen und so die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zelle zu analysieren.

2.4.1 Patch-Clamp Technik

Die Technik wurde 1976 erstmals von den deutschen Wissenschaftlern Erwin Neher und Bernd Sakmann beschrieben (Neher and Sakmann). Den richtungsweisenden Schritt machten zuvor Kenneth S. Cole und Howard J. Curtis in den 1930er Jahren, als sie mit Hilfe einer spitzen Elektrode Zellen auf ein Kommandopotential klemmten und über eine zweite Elektrode die abfallenden Ströme maßen (Cole 1979). Auf dieser Grundlage

entwickelten die britischen Forscher Hodgkin und Huxley bereits 1952 ein mathematisches Modell der neuronalen Zellmembran, das spannungsabhängige Ionenleitfähigkeiten vorhersagte (Hodgkin and Huxley 1952).

Bei der Patch-Clamp Technik werden mit einer Öffnung versehenen Pipetten aus Glas auf die Membran aufgesetzt und mittels Unterdrucks an die Zelle angeheftet. Die Pipette ist mit einer leitfähigen Lösung gefüllt und in ihr befindet sich eine Elektrode, über die Strom geleitet werden kann. Durch den Unterdruck wird ein hochohmiger Widerstand im Gigaohmbereich ($10^9\Omega$) erzeugt, der sogenannte Gigaseal. Diese Einstellung wird Cell-Attached-Modus genannt (siehe Abbildung 11). In dieser Konfiguration können die Ströme einzelner Ionenkanäle gemessen werden. Vom Cell-attached-Modus ausgehend sind verschiedene weiterführende Techniken anwendbar. Mit der Inside-out und der Outside-out-Methode können Einzelkanalströme in verschiedenen Milieus untersucht werden. Mit der in dieser Arbeit verwendeten Whole-Cell-Konfiguration kann die Summe aller Einzelkanalströme der gesamten Zelle gemessen werden (Hamill, Marty et al. 1981).

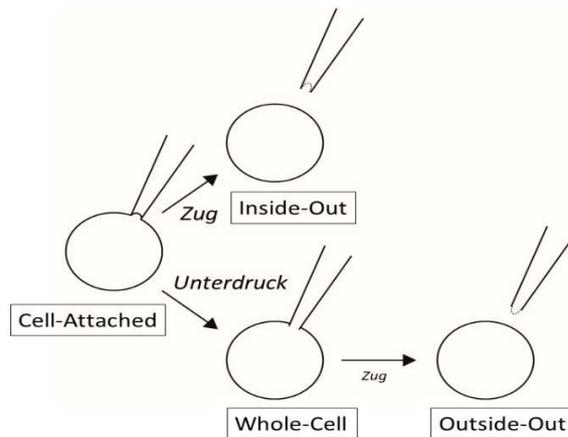


Abbildung 10: Mögliche Patch-Clamp-Konfigurationen. Ausgangspunkt ist der Cell-Attached-Modus: Die Glaspipette wird auf die Membran aufgesetzt und ein Unterdruck erzeugt. Zieht man die Pipette in diesem Modus von der Zelle, gelangt man zur Inside Out Konfiguration, die ehemals zyttoplasmatische Seite zeigt nach Außen in die Badlösung. In diesem Modus kann der Einfluss von Ionen und Transmitter auf die intrazelluläre Seite studiert werden. Öffnet man die Zelle, indem man den Druck in der Pipettenspitze weiter erniedrigt oder Strom injiziert, erreicht man die Whole-Cell-Konfiguration. Es können Ströme gemessen werden, die durch alle Ionenkanäle fließen, die in der Zellmembran exprimiert sind. Von dieser Konfiguration ausgehend erhält man durch Zug an der Pipette den Outside-Out-Modus, bei dem der extrazelluläre Einfluss auf die Ionenkanäle untersucht werden kann.

2.4.2 Elektrischer Schaltplan der Whole-Cell-Konfiguration

Durch die Verschaltung von Elektrode und Verstärker kann die Zelle auf ein vom Experimentator definiertes Kommandopotential geklemmt werden. Gleichzeitig kann über die gleiche Elektrode der abfallende Strom gemessen werden, der benötigt wird, um das vorgegebene Potential an der Membran zu halten. Dieser Strom repräsentiert den durch die Ionenleitfähigkeiten der Zelle fließenden Strom unter umgekehrtem Vorzeichen. Versuche, bei denen die Zelle auf eine definierte Spannung geklemmt wird und die abfallenden Ströme gemessen werden, sind Voltage-Clamp-Experimente. Wird keine Spannung geklemmt, und stattdessen Strom injiziert und die Spannungsänderung gemessen, spricht man von Current-Clamp-Experimenten.

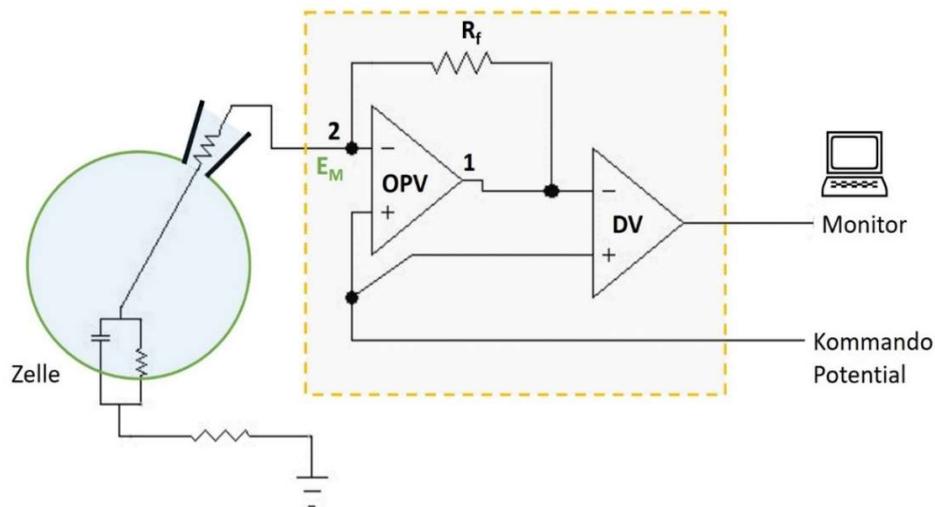


Abbildung 11: Der Operationsverstärker (OPV) ermittelt die Differenz aus Membranpotential (E_m) und Kommandopotential im Voltage-Clamp Modus. Zwischen dem Ausgang des OPV und der Pipette entsteht eine Spannung, die proportional zu dieser Differenz ist und über den Differentialverstärker (DV) aufgezeichnet werden kann. Der Eingangswiderstand der beiden Verstärker ist so hoch ist, dass praktisch kein Strom in sie hineinfließen kann. Daher fließt der durch die Spannungsdifferenz zwischen dem Ausgang des OPV (Punkt 1) und des Membranpotentials (Punkt 2) resultierende Strom über den Rückkopplungswiderstand (R_f) in die Zelle. Es fließt so lange Strom über R_f , bis die Differenz zwischen Membran- und Kommandopotential gleich Null ist. Da R_f bekannt ist, kann zusammen mit der durch den Differentialverstärker gemessenen Spannung die Stärke der in die Zelle injizierten Ströme nach dem Ohm'schen Gesetz ($U = R \times I$) berechnet nach werden. Man kann also das Membranpotential der Zelle konstant halten und die dazu benötigten Stromflüsse messen. Die Ströme geben Auskunft über Eigenschaften der Kanäle. Sie repräsentieren die an der Membran fließenden Ströme mit umgekehrtem Vorzeichen. Im Current-Clamp Modus wird Strom injiziert und die resultierende Spannung gemessen, das Rückkopplungssystem ist hier nicht nötig. Die elektrischen Eigenschaften der Zelle werden in einer Parallelschaltung beschrieben. Die Membran trennt geladene Ionen voneinander und hat daher Eigenschaften eines Kondensators. Parallel dazu geschaltet sind die Leitfähigkeiten der Zelle.

2.4.3 Präparation thalamokortikaler Hirnschnitte

Um die Nährstoffversorgung der Neuronen in den akuten Schnitten nach der Dekapitation des Versuchstieres zu gewährleisten, wurden artifizielle Cerebrospinalflüssigkeiten angefertigt. Sie passen die Ionenkonzentration um die Zelle *in-vitro* dem natürlichen Umgebungsmilieu im lebenden Versuchstier an.

Tabelle 8: ACFS-Lösungen zur Anfertigung und Messung der akuten Hirnschnitte. pH = 7,4, Osmolarität 305 mOsm/kg

| Chemikalie | Konzentration in mM in der Präparationslösung | Konzentration in mM in der Inkubations- und Messlösung |
|--|--|---|
| NaCl | 125 | 125 |
| NaHCO ₃ | 25 | 25 |
| KCl | 2,5 | 2,5 |
| NaH ₂ PO ₄ | 1,25 | 1,25 |
| Glucose | 10 | 10 |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 1 | 2 |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 7 | 1 |

P15 bis P20 Versuchstiere wurden mit Isofluran anästhesiert und anschließend dekapitiert. Die Hirne wurden in gekühlter und mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begaster Präparationslösung entfernt.

Im Anschluss wurden thalamokortikale Schnitte nach Agmon and Connors für die kortikalen Messungen angefertigt (Agmon and Connors 1991). Bei dieser Präparationstechnik wird der Erhalt der thalamokortikalen Verbindungen in den einzelnen Schnitten gewährleistet. Für die Messungen in der hippokampalen CA1 Region wurden horizontale Schnitte präpariert. Die Präparation erfolgte jeweils mit einem Microm HM 650 V Vibratom. Die Schnitte wurden vor den Messungen bei 36°C für eine Stunde in der Messlösung inkubiert und währenddessen kontinuierlich mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast.

2.4.4 Pipetten

Zum Ziehen der Pipetten wurde ein Sutter P97 Puller (Sutter Instruments) verwendet. Jeweils zwei Pipetten wurden aus einer GF150F-10P Borosilikat-Glaskapillare gezogen. Die Kapillaren waren 100 mm lang, mit einem Innendurchmesser von 0.86 mm und einem Außendurchmesser von 1,5 mm. In der Kapillare befand sich ein Filament zur verbesserten Leitfähigkeit. Es wurden nur Pipetten mit einem Widerstand zwischen 3 und 5 MΩ benutzt. Vor den Messungen wurden die Pipetten mit künstlicher intrazellulärer

Lösung gefüllt. Wurde die Zelle bei den Whole-Cell-Messungen geöffnet, diffundierte die intrazelluläre Lösung in das Zellinnere und ersetzte das Zytoplasma.

Tabelle 9: Intrazelluläre Lösung, zur Färbung mit und 0.2% Biocytin oder Lucifer Yellow versehen. pH = 7,2, Osmolarität 290 mOsm/kg

| Chemikalie | Konzentration in mM |
|---------------------|----------------------------|
| KCl | 5 |
| ATP-Mg | 4 |
| Phosphokreatin | 10 |
| GTP-Na | 0.3 |
| HEPES | 10 |
| K-Gluconat | 125 |
| 2 MgCl ₂ | 2 |
| 10 EGTA | 10 |

2.4.5 Aufbauplan des Setups

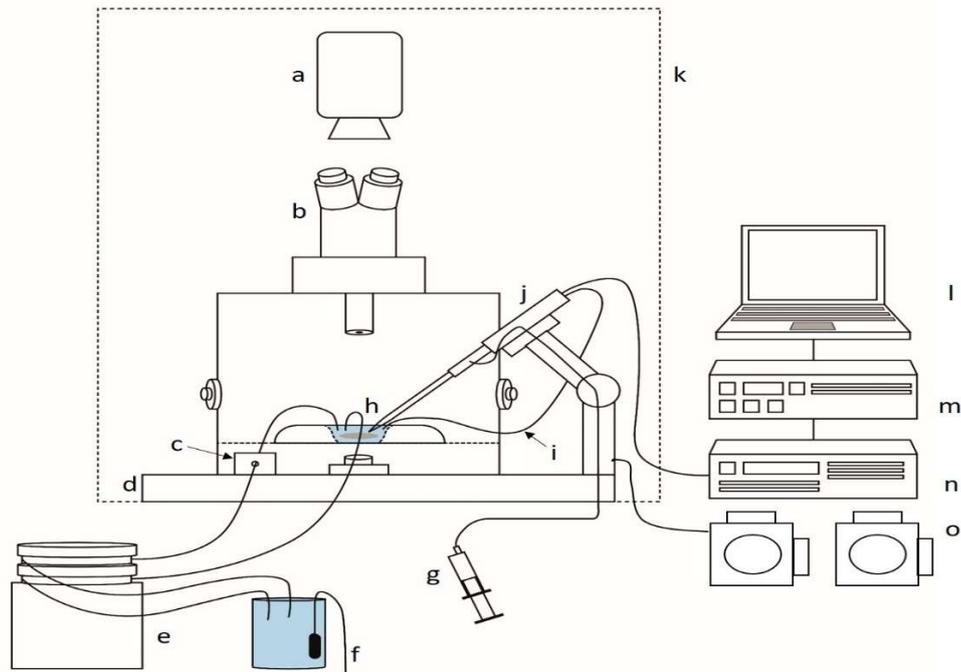


Abbildung 13: Bestandteile des verwendeten Patch Clamp Messstandes: **a** Kamera (XM10, Olympus), **b** Mikroskop (BX61WI, Olympus), **c** Heater (Scientifica), **d** Tisch mit Schwingungsdämpfung (Vibraplane, Kinetic Systems), **e** Pumpe (Minipuls S3, Gilson), **f** artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF blau) mit Carbogen (95 % O₂, 5 % Co₂) begast, **g** Druckkontrolle über Spritze, **h** Schnitt in Messkammer in ACSF (blau), **i** Badelektrode, **j** Headstage (CV 7 B Axon Instruments) **k** Faradaykäfig zur Abschirmung, **l** Computer, **m** Digitalumsetzer (Digidata 1440 A, Molecular Devices), **n** Verstärker (Multiclamp 700 B, Molecular Devices) **o** Mikromanipulatoren Scientifica, East Sussex, UK

2.4.6 Messung

Über ein Pumpensystem wurden die Schnitte kontinuierlich mit carbogengesättigter ACSF versorgt. Die Pipette wurde mit Intrazellulärlösung gefüllt mittels eines Elektrodenhalters an der Headstage (Abbildung 13 j) befestigt. Vor dem Eintauchen in die Badlösung wurde ein Überdruck in der Pipette erzeugt (Abbildung 13 g) um das Eindringen von Schmutzpartikeln und Geweberesten in die Pipettenspitze zu verhindern. Über den Verstärker wurde kontinuierlich ein Testpuls gegeben, der als Rechteck auf dem Bildschirm erschien. Nach dem Eintauchen in die Lösung entstand eine Spannung zwischen der Badelektrode und der Pipette. Mit der Autoregulation des Pipette Offset der Software Clampex wurde eine ausgleichende Spannung erzeugt, die die Spannungskurve

des Testpulses auf ein Nullpotential regulierte (sog. Offset). Der Widerstand der Pipettenspitze wurde erst in der Badlösung angezeigt. Es wurden nur Pipetten verwendet, die einen Widerstand zwischen 3 und 5 M Ω hatten. Die Pipettenspitze wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators über der Zielzelle positioniert. Durch den Überdruck in der Pipette strömte Flüssigkeit aus der Spitze. Der Druck der Flüssigkeit erzeugte eine charakteristische Deformation auf der Oberfläche der Membran, die als Orientierungshilfe diente. Durch den Widerstand der immer näherkommenden Membran wurde der rechteckige Testpuls kleiner. Wurde der Überdruck jetzt in einen negativen Druck umgewandelt, entstand ein Gigaseal ($10^9\Omega$) zwischen Membran und Pipette. Die Pipette hatte Eigenschaften eines Kondensators, dessen Ladung und Entladung am Anfang bzw. Ende des Testpulses kapazitive Ströme verursachten, die die Messungen der Potentialänderungen verzögerten und dadurch Messungen schneller Aktionspotentiale verzerrt hätten. Die kapazitiven Ströme wurden von der Clampex-Software durch die Cp-Fast-Funktion automatisch durch komplementäre Ströme mit umgekehrtem Vorzeichen kompensiert. Der Druck in der Pipette wurde anschließend weiter erniedrigt, bis sich die Zellmembran über der Pipettenspitze öffnete. Eine Öffnung erkannte man an dem plötzlichen Aufstieg der kapazitiven Ströme zu Beginn und am Ende des Testpulses. Um den Widerstand der Pipettenspitze und eventuell darin enthaltender Membranfragmente auszugleichen (Serienwiderstand) und möglichst genaue Messungen zu bekommen, wurde die Schaltfläche R_s -Compensation verwendet. Sie addierte automatisch eine Spannung zum Kommandopotential, die proportional zum Membranstrom war und den Serienwiderstand kompensierte. Messungen des Ruhemembranpotentials, des Eingangswiderstandes und zum Erstellen von Input-Output Kurven wurden im Current-Clamp Modus durchgeführt. Um den Serienwiderstand R_s im Current-Clamp Modus zu kompensieren, wurde die Funktion Bridge Balance verwendet. Der Verstärker berechnete und addierte zu den gemessenen Spannungen und ausgehend vom bekannten Serienwiderstand die Spannung, die über dem Serienwiderstand verloren ging (Molleman 2003).

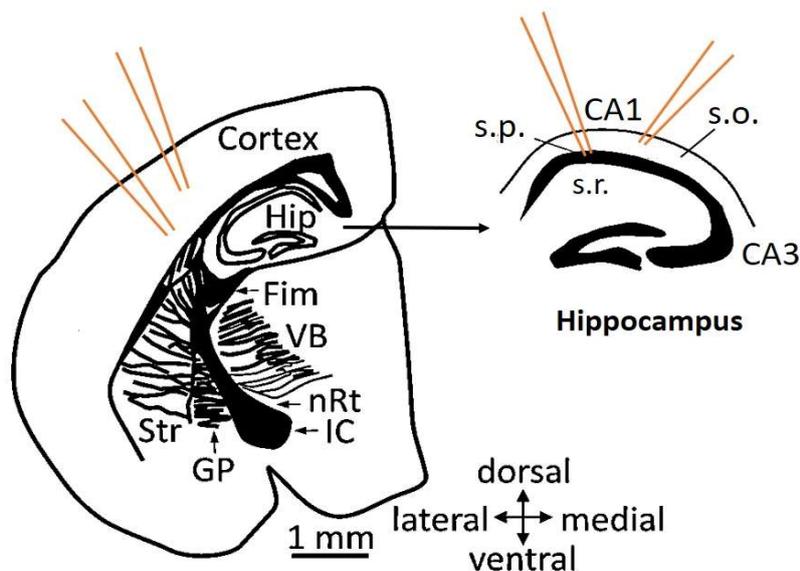


Abbildung 14: Thalamokortikaler Schnitt. Im Kortex wurden inhibitorische Interneuronen in Schicht IV (Lamina Granularis Interna) und exzitatorische Pyramidenzellen in Schicht V (Lamina Pyramidalis Interna) gemessen. Im Hippocampus (**Hip**) wurden im Cornu Ammonis 1 (**CA1**) inhibitorische Korbzellen im Stratum Oriens (**s.o.**) sowie Pyramidenzellen im Stratum Pyramidale (**s.p.**) gemessen. Darunter befindet sich das Stratum Radiatum (**s.r.**). Verändert nach (Agmon and Connors 1991).

2.4.7 Messprotokolle

Patch-Clamp-Messprotokolle regulieren die Spannungs- oder Stromänderungen, denen die Zelle im Versuch ausgesetzt wird. Je nach Protokoll können verschiedene Eigenschaften der Zelle untersucht werden.

Eingangswiderstand

Der Eingangswiderstand ist der Quotient aus Spannungsänderung an der Membran und injiziertem Strom. Er ist ein Maß für die Erregbarkeit der Zelle, die unter anderem von der Anzahl der Kanäle in der Zellmembran und ihren elektrophysiologischen Eigenschaften abhängt. Ein Anstieg des Membranwiderstandes bedeutet einen stärkeren Spannungssprung als Antwort auf einen Strom, dass Neuron erreicht also schneller die Depolarisationsschwelle. Um den Eingangswiderstand der Zellen zu berechnen, wurden hyperpolarisierende Strominjektionen von -0,01 nA bis -0,110 nA in elf Schritten appliziert, der Spannung gemessen und der Widerstand nach $R = U / I$ für jede Injektion berechnet. Der Mittelwert der Widerstände wurde als Eingangswiderstand der Zelle angegeben.

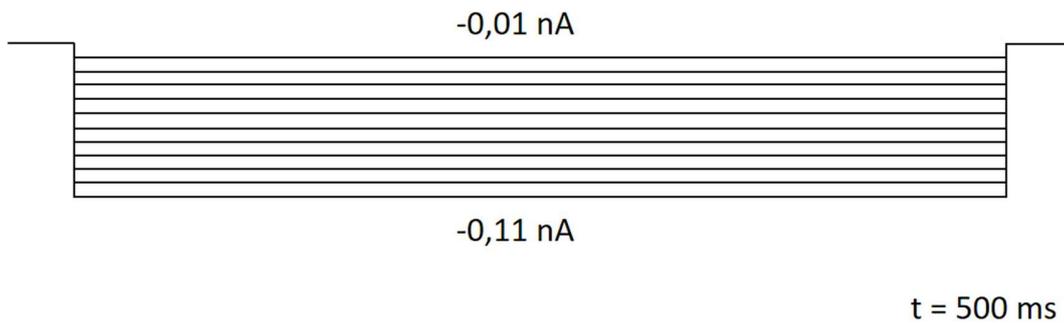


Abbildung 15: Protokoll zur Messung des Eingangswiderstands

Input Output Kurven

Zur Erstellung von Input-Output-Kurven wurde depolarisierende Stromstöße (Input) von 0,05 nA bis 0,3 nA in elf Schritten in die Zelle injiziert und die bei den Depolarisationen ausgelösten Aktionspotentiale (Output) gemessen. Mit zunehmender Depolarisation nimmt die Zahl der Aktionspotentiale pro Strominjektion zu. Die Anzahl der gemessenen Aktionspotentiale wurde gegen die Stromstärke in ein Diagramm aufgetragen. Die Strominjektion, bei der das erste Aktionspotential auftrat, wurde als Rheobase bezeichnet.

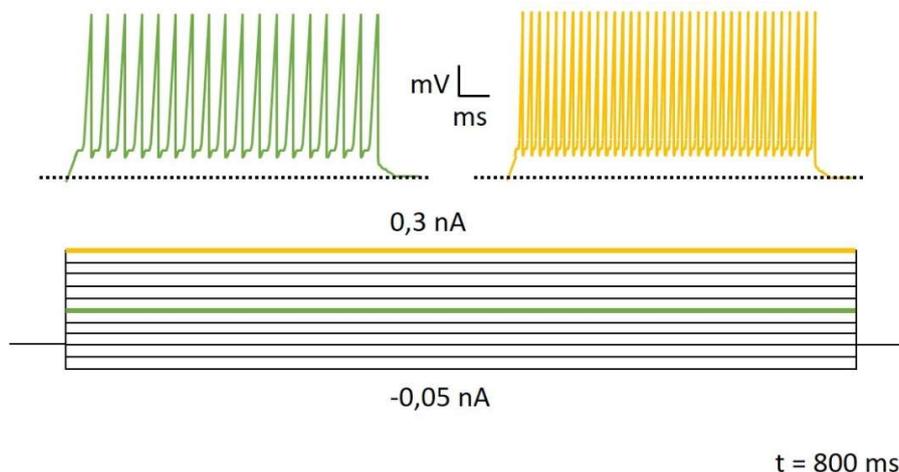


Abbildung 16: Oben: schematische Darstellung der ansteigenden Aktionspotentialsalven bei zunehmender Depolarisation. Die gestrichelte Linie symbolisiert das Haltepotential von -70 mV. Unten: verwendetes Messprotokoll

Ruhemembranpotential

Das Ruhemembranpotential wurde im Current-Clamp-Modus ohne Strominjektionen gemessen.

2.5 Statistische Auswertung

Zur Aufzeichnung und Berechnung der Parameter bei den MEA-Messungen diente die SPANNER Software (Hedrich, Liautard et al. 2014). Patch-Clamp-Versuche wurden durch die pClamp-Software (Molecular Devices, LLC, USA) aufgezeichnet. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA) bearbeitet und gespeichert.

Um die Daten der Input-Output-Graphen der Patch-Clamp Versuche zu vergleichen, wurde die Area under the Curve (AUC) in Excel berechnet (Abbildung 17).

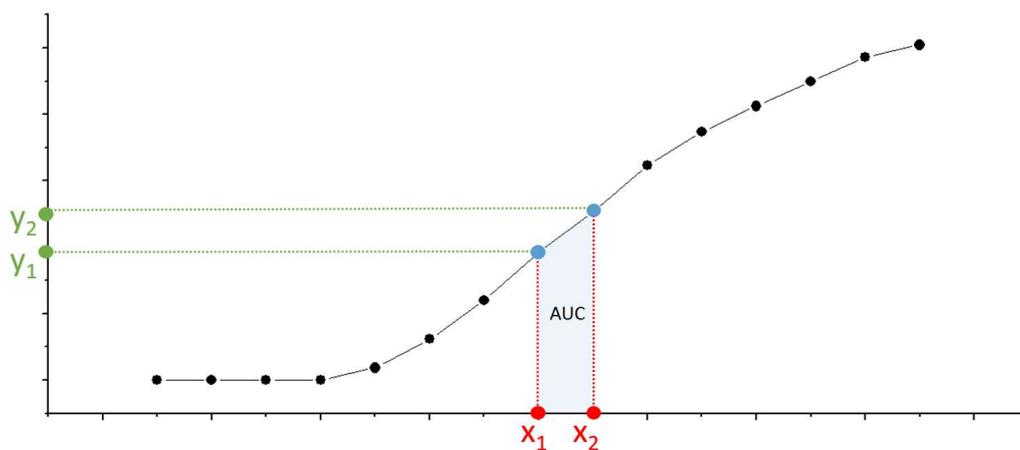


Abbildung 17: Die AUC wurde nach $(x_1 + x_2) / 2 * (y_2 - y_1)$ für jeden gemessenen Wert berechnet. Die Summe aller Flächen unter der Kurve wurde als Referenzparameter zum Vergleich der Input-Output Graphen benutzt.

Die statistische Auswertung der Datensätze erfolgte über die Software SigmaPlot 12.0 (Systat Software GmbH, Deutschland). Normalverteilte Daten wurde mittels t-test für unabhängige Stichproben analysiert, nicht-normalverteilte Daten mittels eines Mann-Whitney-Rangsummentest oder eines One-way ANOVA on Ranks Test. Als Signifikanzschwelle wurde ein p-Wert von kleiner 0,05 festgelegt.

Die Erstellung der statistischen Graphiken erfolgte mit Origin6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Bestimmten Signifikanzbereichen wurden Sternchen auf Basis des p-Wertes Sterne (*) zugeordnet wobei * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

Ausgangspunkt der Versuche war ein transgenes Mausmodell der L1649Q-Mutation im *SCN1A*-Gen, welches die α -Untereinheit des spannungsgesteuerten Natriumkanals Nav1.1 kodiert und mit Familiärer Hemiplegischer Migräne Typ 3 assoziiert ist (Dichgans, Freilinger et al. 2005). Das Mausmodell sollte die Bedingungen in Patienten möglichst authentisch repräsentieren. Zum Verständnis der elektrophysiologischen Auswirkungen der Mutation wurden Neuronen der Versuchstiere auf Netzwerk- und Einzelzellebene untersucht und mit denen von Wildtyptieren verglichen. Die Methoden orientierten sich an einer Multisystemanalyse der Arbeitsgruppe zur benachbarten epileptogenen R1648H-Mutation (Hedrich, Liautard et al. 2014).

3.1 Netzwerkanalyse hippocampaler Neuronen mit Multielektroden-Arrays

Das Netzwerkverhalten der Neuronen wurde mittels MEA-Chips untersucht. Die dissektierten hippocampalen Neuronen embryonaler Versuchstiere bildeten nach der Aussaat auf den Platten Netzwerke, deren elektrische Aktivität über Elektroden in den Messplatten abgeleitet wurde. Mittels einer Detektionssoftware konnte das Feuerverhalten der Netzwerke aufgenommen und analysiert werden. Verglichen wurde die Gesamtanzahl der einzelnen Aktionspotentiale, die über dem Netzwerk gemessen wurden (aufgenommen als Spikes), die mittlere Höchstfeuerrate des Netzwerkes, die Anzahl der Populationsbursts und die Anzahl der Aktionspotentiale in Populationsbursts in Prozent, die mittlere Dauer eines Populationsbursts, das Interburstintervall sowie Kappa als Referenzparameter für die Synchronizität der Netzwerkaktivität. Der Messzeitraum betrug jeweils zwei Minuten (Kapitel 2.5.3). Die einzelnen Parameter der L1649Q-Kulturen wurden mit Wildtypkulturen verglichen und als Boxplots dargestellt. Zur Untersuchung der Wirkung des Natriumkanalblockers Lamotrigin auf die Netzwerkaktivität wurden die Neuronen mit 100 μ M Lamotrigin inkubiert und anschließend die Aktivität über den Messplatten aufgenommen. Es fand eine Kurzzeitinkubation über zwei Minuten und eine Langzeitinkubation über sieben Tage statt.

3.1.1 Entwicklung der Parameter über 10 Tage

Hippokampale Neuronen, die an Tag E17 aus wildtypischen und heterozygoten Jungtieren entnommen wurden, wurden 21 Tage auf MEA-Chips kultiviert. Als Einschlusskriterium wurden mehr als 500 Spikes an 14 DIV für die Kulturen

vorausgesetzt. Die an den Tagen 11, 14 und 21 gemessenen Werte waren breit gestreut und es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Exemplarisch werden die Werte zu der Anzahl der Spikes (Number of Spikes) dargestellt.

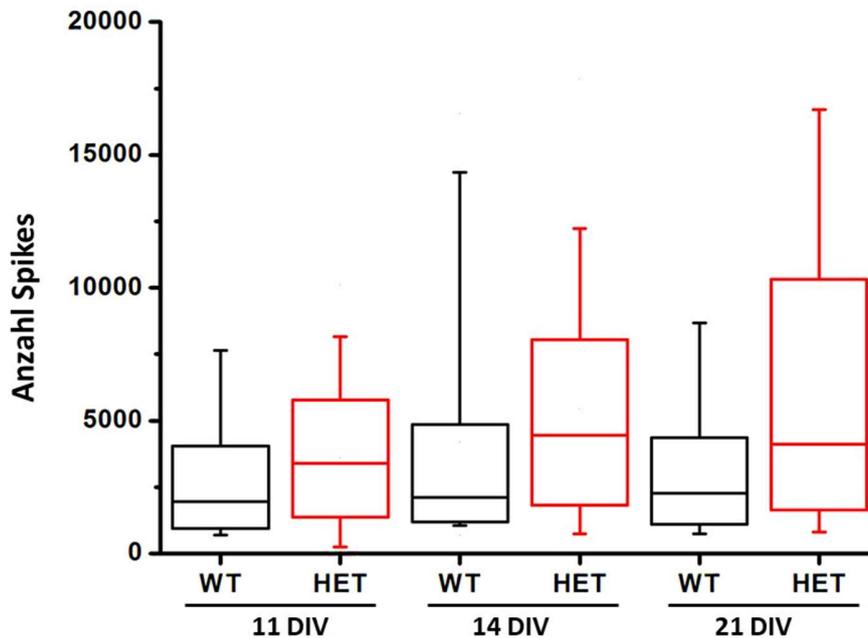


Abbildung 18: Die Anzahl der Spikes im Verlauf der Kultivierung als Boxplots dargestellt. Messpunkte 11, 14 und 21 days in vitro (DIV). Zu erkennen ist die breite Streuung der Werte. Es konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden. Signifikanztest One Way Anova. n WT = 18, n HET = 19

3.1.2 Kurzzeitversuche Lamotrigin

Das Netzwerkverhalten primärer hippocampaler Neuronen von E17 Mäusen wurde mit Hilfe von MEAs gemessen. Die vorgestellten Daten wurden an Tag 14 in vitro aufgenommen. Um eine vergleichbare Aktivität der Neuronen zu analysieren, wurden nur Aufnahmen verwendet, die mehr als 500 Spikes in der ersten Messung ohne Lamotrigin zeigten. Die Grenze von 500 Spikes wurde selbstgewählt. Kulturen, die weniger als 500 Spikes zeigten, entwickelten in der Regel keine vergleichbare Netzwerkaktivität. Die Netzwerkaktivität der Neuronen von Wildtypen und L1649Q-Kulturen wurde in der ersten Messung im Inkubationsmedium ohne Kanalblocker aufgezeichnet. Im Anschluss wurden dem Medium 50 μM bzw. 100 μM des Natriumkanalblockers Lamotrigin hinzugefügt. Der Zwischenschritt mit Inkubation in Medium mit 50 μM Lamotrigin wurde eingefügt, um eine stufenweise Anpassung der Zellen an die Konzentrationssteigerung zu gewährleisten. In

den Zwischenmessungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Lamotrigin konnte in Langzeitstudien die Dauer, Frequenz und Symptome der Migräneaura bei MA-Probanden reduzieren. Es verringerte bei einigen Studienteilnehmern außerdem die Frequenz der Attacken. (Lampl, Katsarava et al. 2005). Nach einer Einwirkzeit von zwei Minuten wurden weitere Messungen unter Einfluss von Lamotrigin durchgeführt. (Abbildung 19). Ausgewertet wurden die signifikanten Effekte bei 100 μM , normiert auf die erste Messung ohne Lamotrigin. Im Kurzzeitversuch der MEA-Kulturen reduzierte Lamotrigin die Gesamtanzahl der Spikes und die Spikes in Population Bursts im Vergleich zu Wildtypnetzwerken signifikant.



Abbildung 19: Messschema der MEA Versuche. Die Lamotriginkonzentration wurde in zwei Schritten erhöht. Ausgewertet wurde die Aktivität bei 100 μM an DIV 14.

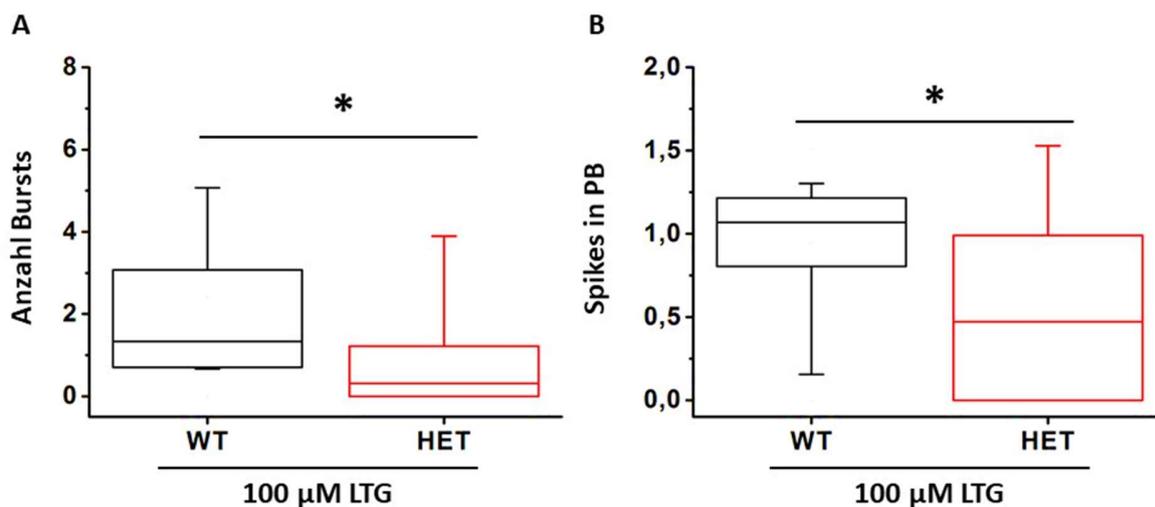


Abbildung 20: Quantitative Analyse hippokampaler Kulturen von WT und HET Mäusen an Tag 14 in vitro bei 100 μM Lamotrigin. Normierte Daten bezogen auf Aktivität bei 0 μM Lamotrigin. Die Zugabe von Lamotrigin senkte sowohl die Anzahl der Spikes in Population Burst als auch die Number of Burst in Kulturen heterozygoter Tiere. **A** Mann-Whitney Rank Sum Test $p = 0,010$ **B** t-test $p = 0,025$. WT $n = 14$, HET $n = 25$

3.1.3 Entwicklung der Parameter über 7 Tage mit Normierung und Langzeitversuche Lamotrigin

Hippokampale Neuronen von E17 Mäusen wurden ab Tag 14 in vitro für sieben Tage bis Tag 21 in vitro in 100 μ M Lamotrigin inkubiert. Gemessen wurde die Aktivität an DIV 14 vor der Zugabe von Lamotrigin und an DIV 21 nach sieben Tagen Einwirkzeit. Einschlusskriterium waren mehr als 340 Spikes an 14 DIV ohne Lamotriginwirkung. Auch hier wurde der Grenzwert von 340 Spikes selbst gewählt, da MEA-Kulturen unter 340 Spikes keine vergleichbare Netzwerkaktivität entwickelten. MEA-Kulturen ohne Lamotriginzusatz wurden als Kontrollen sowie zum Vergleich der Messparameter zwischen Wildtypen und Mutationsträgern ohne Lamotriginzusatz gemessen. Zum besseren Vergleich wurden die Werte an DIV 21 auf DIV 14 normiert. Lamotrigin senkte im Langzeitversuch die Anzahl der Spikes in Population Bursts und die Höchstfeuerrate signifikant im Vergleich zur heterozygoten Kontrolle.

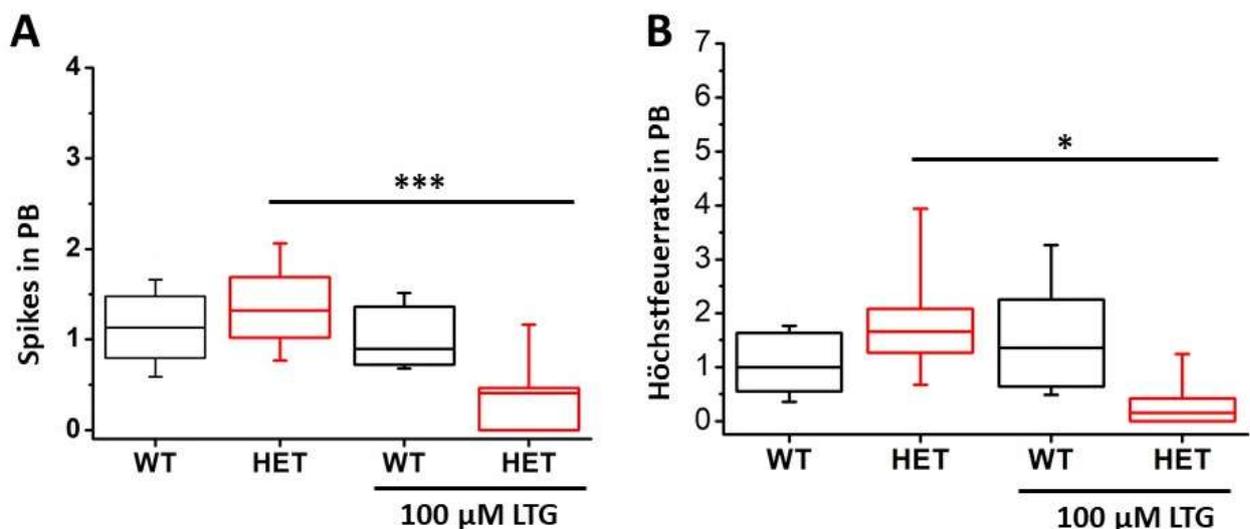


Abbildung 21: **A** Lamotrigin senkte den Anteil der Spikes in Population Bursts in der HET Gruppe. Auf die Wildtypen konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden. *** One way Anova mit Post-hoc Test: Bonferroni $p < 0,001$ * t-test **B** Lamotrigin hat einen signifikanten Effekt auf die heterozygoten Kulturen HET-HET+ One way Anova mit Post-hoc: Dunns Test $p < 0,05$. WT $n = 15$, WT-LTG $n = 6$, HET $n = 22$, HET-LTG $n = 7$

3.2 Patch-Clamp Versuche

Zur Untersuchung der Auswirkung der L1649Q-Mutation im Nav1.1-Natriumkanal auf Einzelzellebene wurde das Patch-Clamp Verfahren in akuten Hirnschnitten von Wildtyp und L1649Q-heterozygoten Mäusen angewandt. Die Messungen fanden an Thalamokortikalen Hirnschnitten nach Agmon and Connors 1991 statt.

3.2.1 Kortikale Neuronen

Einzelzellmessungen an kortikalen Pyramidenzellen aus Schicht V (stratum pyramidale internum) und Interneuronen aus Schicht IV (stratum granulosum internum) in der S1-Region des Kortex (Siehe Abbildung 14 im Material- und Methodenteil).

Eingangswiderstand

Es konnte gezeigt werden, dass inhibitorische Interneuronen im Kortex von L1649Q-Mutanten einen signifikant höheren Eingangswiderstand haben als kortikale Interneuronen von Wildtyptieren. Demgegenüber zeigte sich in Pyramidenzellen kein signifikanter Unterschied.

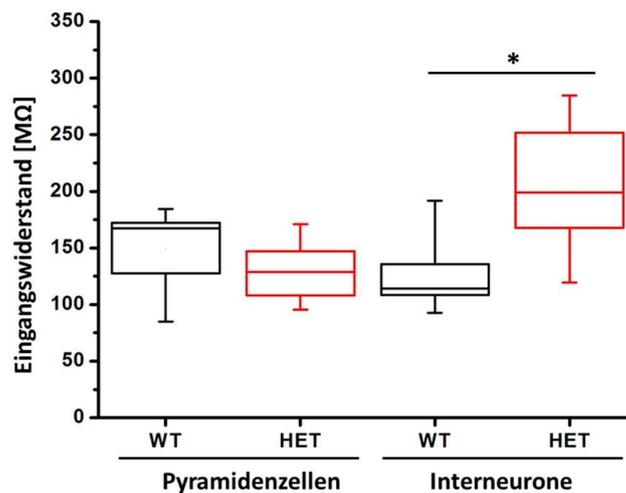


Abbildung 23: Vergleich der Eingangswiderstände in Wildtypmäusen vs. L1649Q-Mutanten in Pyramidenzellen (t-Test $p=0,173$. WT $n=9$, HET $n=13$) bzw. kortikalen Interneuronen (t-Test $p=0,015$. WT $n=7$, HET $n=6$)

Input-Output-Kurven

Akute Hirnschnitte von Wildtypen und L1649Q-Mutanten wurden mittels Patch-Clamp-Technik untersucht. Im Current-Clamp-Modus wurden depolarisierende Stromstöße (Input) von -0,05 nA bis 0,3 nA in 0,25 nA Schritten in die Zelle injiziert und die bei den Depolarisationen ausgelösten Aktionspotentiale (Output) gemessen und gegen den Strom aufgetragen. Zur statistischen Analyse wurde die AUC als Referenzparameter genutzt.

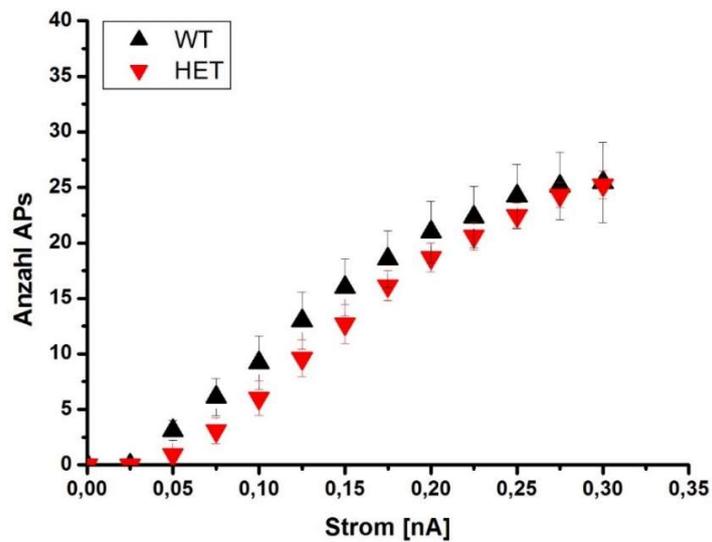


Abbildung 24: Input-Output Diagramm kortikaler Pyramidenzellen aus Schicht V (stratum pyramidale internum). Mittelwerte \pm Standardfehler der ausgelösten Aktionspotentiale. t-Test. HET n=13, WT n=9

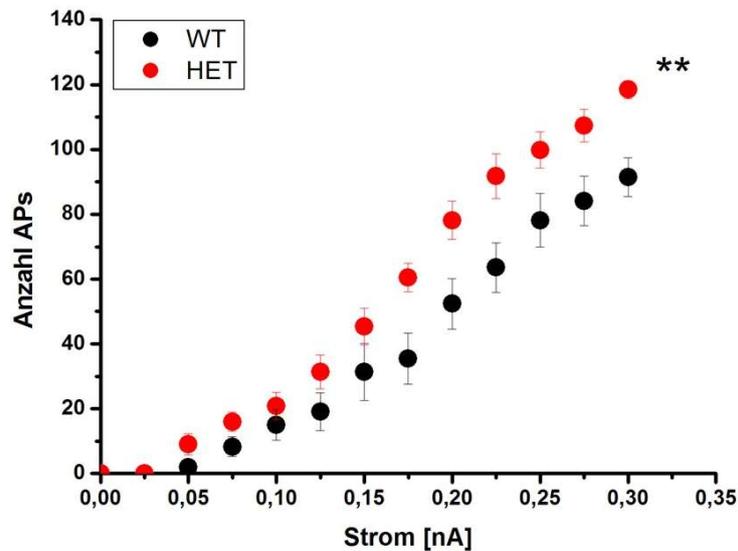


Abbildung 25: Input-Output Diagramm kortikaler Interneuronen aus Schicht IV (stratum granulosum internum). Mittelwerte \pm Standardfehler der ausgelösten Aktionspotentiale. HET n=6, WT n=7

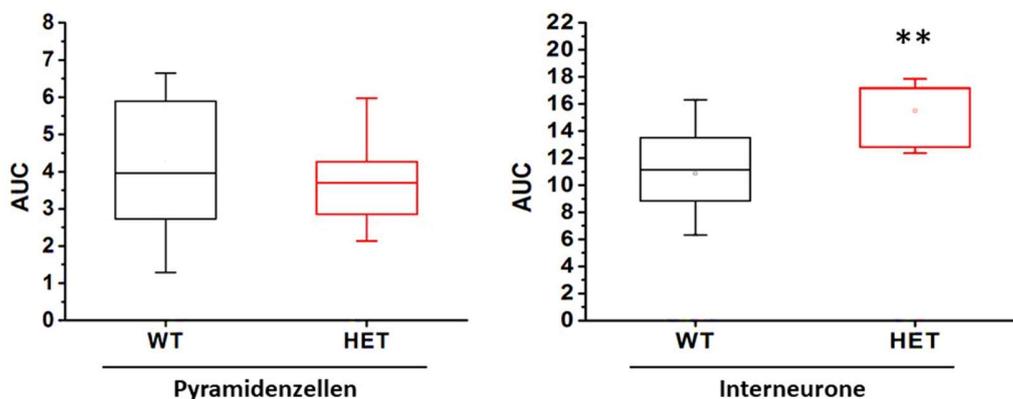


Abbildung 26: Vergleich der AUC als Referenzparameter. Signifikanztest: Mann-Whitney-Rangsummentest. Pyramidenzellen $p = 0,423$. HET n=13, WT n=9, Interneurone: $p = 0,008$. HET n=6, WT n=7

Für die Interneurone der L1649Q-Mutanten besteht eine signifikante Funktionsverstärkung im Vergleich zu den Interneurone des Wildtyp. Eine Strominjektion gleicher Stärke löst in den Interneurone der L1649Q-Mutanten eine höhere Anzahl an Aktionspotentialen als in Wildtypen aus. Die Mutanten sind vergleichsweise stärker erregbar.

3.2.2 Hippokampale Neuronen

Die Einzelzellmessungen fanden an hippocampalen Pyramidenzellen im stratum pyramidale und an Interneuronen aus dem stratum oriens in der CA1-Region statt. Die Interneuronen und Pyramidenzellen wurden durch ihre Lokalisation und anhand morphologischer Charakteristika identifiziert. Bestätigt wurden die Merkmale mittels Färbung mit Lucifer Yellow. Für die Analyse wurden ausschließlich Schnellfeuernde Interneuronen verwendet. Sie mussten elektrophysiologische Kriterien erfüllen (Aktionspotentialdauer > 0,6 ms, starke Hyperpolarisierung nach Aktionspotential). Morphologische Kriterien waren Lokalisation im stratum oriens, nahe am stratum pyramidale.

Eingangswiderstand

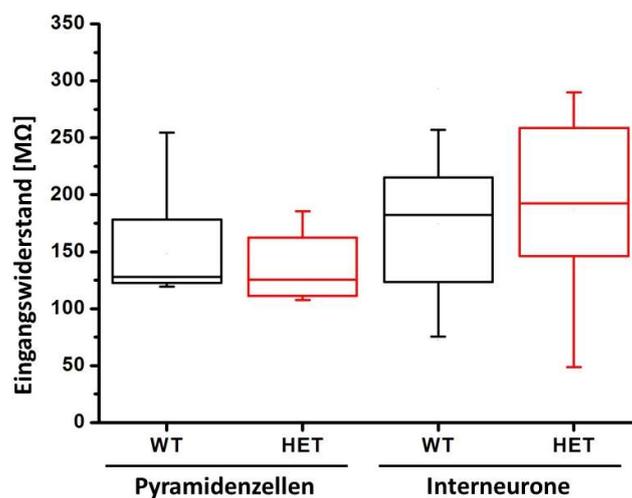


Abbildung 27: Vergleich der Eingangswiderstände hippocampaler Pyramidenzellen in Wildtypmäusen und L1649Q-Mutanten, HET n=12, WT n=11 und hippocampaler Interneurone ohne signifikante Unterschiede (t-test). HET n = 8, WT n = 15

Im Gegensatz zu den kortikalen Neuronen gibt es im Hippokampus weder in Pyramidenzellen noch in inhibitorischen Interneuronen einen signifikanten Unterschied im Eingangswiderstand.

Input Output Kurven

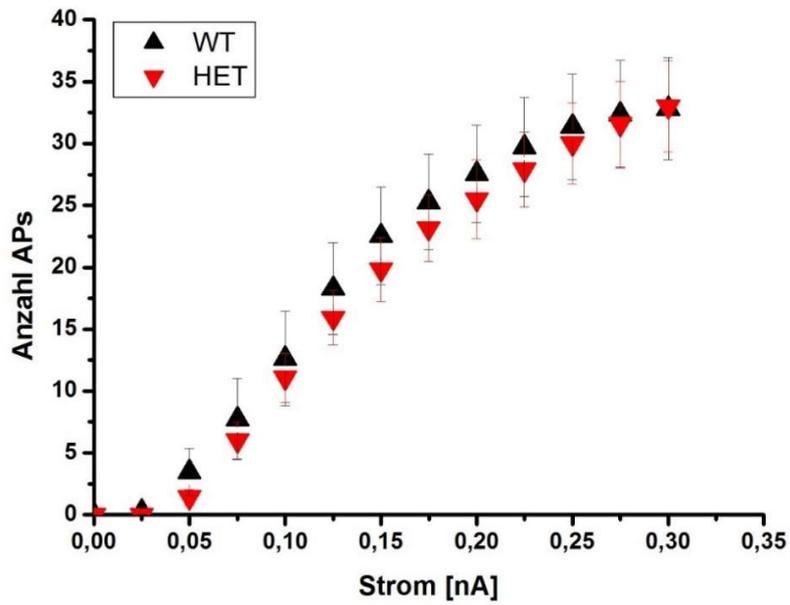


Abbildung 28: Input-Output Diagramm hippokampaler Pyramidenzellen aus CA1 (stratum pyramidale). Mittelwerte \pm Standardfehler der ausgelösten Aktionspotentiale ohne signifikante Unterschiede (t-test). HET n=12, WT n=11

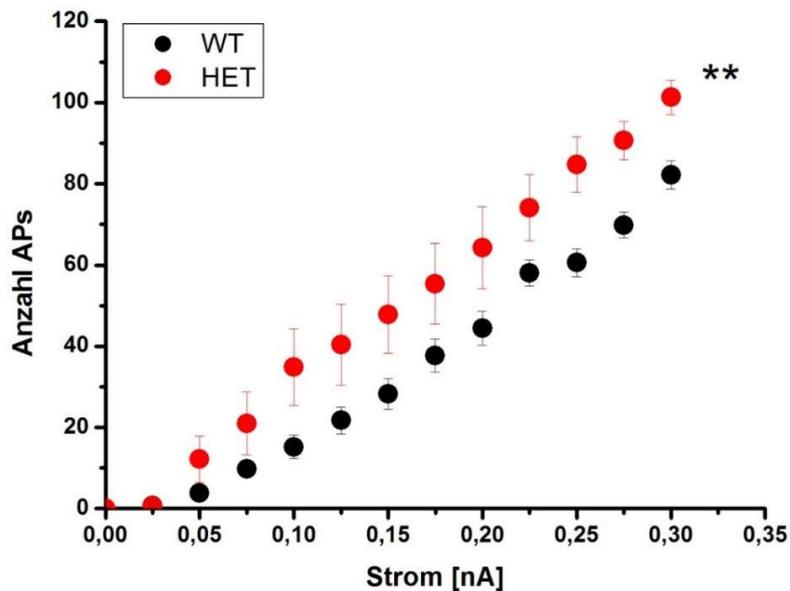


Abbildung 29: Input-Output Diagramm hippocampaler Interneuronen aus dem stratum oriens in der CA1 Region. Mittelwerte \pm Standardfehler der ausgelösten Aktionspotentiale. HET n = 8, WT n = 15. Mann-Whitney-Rangsummentest p = 0,008

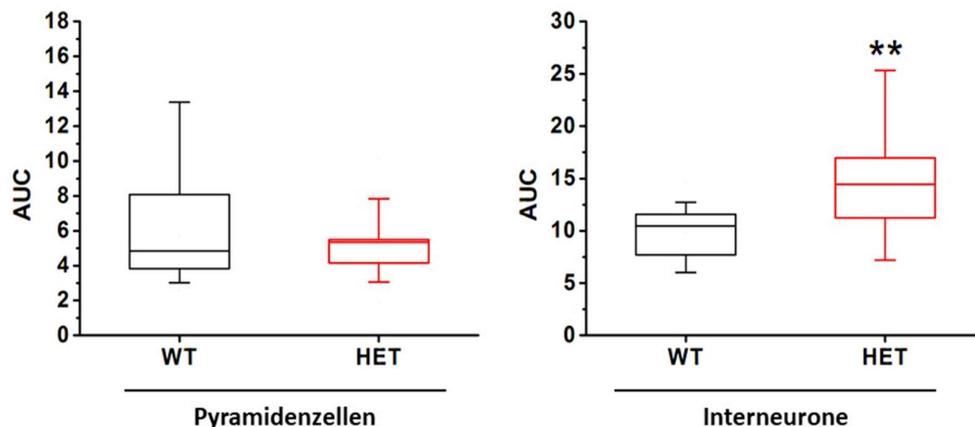


Abbildung 30: Vergleich der AUC als Referenzparameter. Signifikanztest: Mann-Whitney-Rangsummentest. Pyramidenzellen: p = 1,0. HET n=12, WT n=11. Interneurone: p = 0,008. HET n = 8, WT n = 15

Wie im Kortex konnte auch im Hippokampus eine signifikante Steigerung der Aktionspotentiale bei gleicher Strominjektion zwischen den Interneuronen der Wildtypen und der L1649Q-Mutanten gemessen werden. Die Pyramidenzellen im hippocampalen stratum pyramidale zeigten keine signifikanten Unterschiede.

4 Diskussion

Es wurde ein transgenes Mausmodell mit der L1649Q-Mutation im *SCN1A*-Gen untersucht. Das Gen kodiert die α -Untereinheit des spannungsgesteuerten Natriumkanals Nav1.1 und ist mit Familiärer Hemiplegischer Migräne Typ 3 assoziiert (Dichgans, Freilinger et al. 2005). Es wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften auf Netzwerk- und Einzelzellebene in verschiedenen Hirnregionen untersucht und mit denen von Wildtyptieren verglichen: In den *Einzelzellmessungen* konnte gezeigt werden, dass inhibitorische Interneuronen von L1649Q-Mutanten einen signifikant höheren Eingangswiderstand haben als kortikale Interneuronen von Wildtyptieren. Für die Interneuronen der L1649Q-Mutanten besteht außerdem eine signifikante Funktionsverstärkung im Sinne einer erhöhten Erregbarkeit im Vergleich zu den Interneuronen des Wildtyps. In Pyramidenzellen zeigten sich keine Unterschiede zwischen Wildtypen und L1649Q-Mutanten, weder bezüglich Eingangswiderstand noch Erregbarkeit. In Studien zum *Netzwerkverhalten* primärer hippocampaler Neuronen unter Einfluss von Lamotrigin zeigte sich eine höhere Sensibilität der L1649Q-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp in Kurz- und Langzeitversuchen mit jeweils unterschiedlicher Einwirkdauer.

4.1 Entdeckung der FHM3 und erste Untersuchungen der *SCN1A*-Mutationen

Seit der Entdeckung der L1649Q-Mutation zeigten Studien in heterologen Modellsystemen widersprüchliche Ergebnisse (Dichgans, Freilinger et al. 2005, Vanmolkot, Babini et al. 2007, Cestèle, Scalmani et al. 2008, Cestèle, Schiavon et al. 2013). Das in dieser Arbeit verwendete L1649Q-knock-in-Mausmodell könnte Klarheit über die funktionellen Konsequenzen der Mutation bringen. Es stellt ein aussagekräftiges Versuchsmodell dar, das den Gegebenheiten im Menschen am nächsten kommt. Die von Hedrich, Liautard et al. untersuchte benachbarte R1648H-Mutation wurde zuvor ebenfalls in anderen Arbeiten in heterologen Expressionssystem untersucht. Hier zeigten sich, ähnlich wie bei den publizierten Studien der L1649Q-Mutation, widersprüchliche Ergebnisse entweder als Funktionsverstärkung oder Funktionsverlust in heterologen Modellsystemen (Alekov, Rahman et al. 2000, Spanpanato, Escayg et al. 2001, Lossin, Wang et al. 2002). Die murinen Mutationsträger von Hedrich, Liautard et al. zeigten den menschlichen Epilepsie-Phänotyp mit spontanen generalisierten Anfällen und einer

verminderten Schwelle zur Auslösung von thermal induzierten Anfällen (Hedrich, Liautard et al. 2014). Das *SCN1A*-Mausmodell kann daher als den heterologen Modellen überlegenes Modell gesehen werden, da es zudem noch die glialen und ionenhomöostatischen Umgebungsbedingungen *in vivo* wiedergibt.

4.2 MEA-Analysen zur Messung der Netzwerkaktivität

Hippokampale MEA-Kulturen sind ein stabiles und etabliertes System. Der Hippocampus scheint außerdem eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Migräne zu spielen. Er ist Teil des limbischen Systems und bedeutend für die Schmerzverarbeitung (Liu and Chen 2009). In neuen Studien zeigte sich ein Zusammenhang zwischen hippokampalem Volumen und hippokampaler Aktivität und Migränesymptomatik in betroffenen Patienten (Liu, Chou et al. 2018). So untersuchten Liu H. et al. die Beziehung zwischen dem Hippocampus und Migräneoutcome. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen dem Volumen des rechten Hippocampus und einem positiven Outcome eine positive Korrelation besteht. Als positiver Outcome wurde eine Reduktion der Attackenfrequenz um mehr als 50% in 2 Jahren festgelegt. Es wurde vermutet, dass ein kleiner Hippocampus mit einem insuffizienten inhibitorischen Feedback zur Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse einhergeht. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse kontrolliert Reaktionen auf Stress. Durch fehlendes inhibitorisches Feedback könnte es zu einer Überreaktion kommen, die den zusätzlichen Kopfschmerz triggert (Sousa, Lucassen et al. 2014). Eine Längsschnittstudie zeigte ein vermindertes Volumen des Hippocampus in Patienten mit neu diagnostizierter Migräne nach einem Jahr (Liu, Lan et al. 2013). In weiblichen Migränepatienten konnte im Ruhezustand eine niedrigere intraregionale Aktivität über den Hippocampi beidseits beobachtet werden im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten. Es wurde vermutet, dass wiederholte Migräneattacken die Architektur und Funktion der Regionen verändern können (Gao, Xu et al. 2016). Reifung der hippokampalen Interneuronen ist maßgeblich an der Entwicklung synchroner Netzwerkaktivität beteiligt, und die Beeinträchtigung inhibitorischer Interneuronen während der Reifephase kann zu neurologischen Krankheiten wie Epilepsie, Autismus oder Schizophrenie führen. Mutationen, die zu elektrophysiologischen Veränderungen im Verhalten der Interneuronen führen, könnten daher in die Entwicklung des Netzwerks eingreifen und zu erhöhter Anfälligkeit für

Migräneanfälle führen, zum Beispiel über die Entstehung von kortikalen Streudepolarisationen durch erhöhtes extrazelluläres Kalium.

Die Entwicklung der synchronen Netzwerkaktivität lässt sich *in vitro* in hippokampalen Neuronen gut beobachten und vergleichen. Um den Effekt der Nav1.1-Mutation auf die Netzwerkaktivität zu bestimmen, wurden primäre hippokampale Neuronen auf Multielektrodensystemen kultiviert. Die Inkubationszeit betrug insgesamt 21 Tage mit Messungen an Tag 7, 11, 14 und 21 *in vitro*. Vergleichbare Netzwerkuntersuchungen mit hippokampalen Neuronen wurden für die benachbarte epileptogene R1648H-Mutation durchgeführt. Hier zeigten die heterozygoten R1648H-Kulturen im Vergleich zu den Wildtyp-Kulturen eine höhere Höchstfeuerrate in Populationbursts sowie eine reduzierte Anzahl an Bursts insgesamt mit einer längeren Burstdauer und verlängerten Intervallen zwischen den Bursts. Die absoluten Werte der Netzwerkaktivität der L1649Q-Kulturen dagegen waren breit gestreut, und es konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden.

Dafür gibt es verschiedene Erklärungsansätze: Zwar wurde auf jedem MEA die gleiche Anzahl an 120.000 hippokampalen Neuronen kultiviert, doch könnten über den Messelektroden jeweils unterschiedlich hohen Zelldichten auf den Messplatten kultiviert worden sein. Auch könnte die Vernetzung der Zellen untereinander durch die unterschiedliche Verteilung auf den Platten sich zwischen den MEAs unterscheiden. Die Messzeit könnte zudem zu kurz sein, um Unterschiede in der Aktivität zu detektieren. Die Netzwerke könnten phasenweise Unterschiede in der Gesamtaktivität aufweisen, wie es zum klinischen Bild der Migräne mit rekurrenten Attacken passen würde. Solche phasenabhängigen Aktivitätsänderungen könnte man eher über längere Zeiträume detektieren. Eine Schwachstelle der Versuche ist zudem die niedrige Fallzahl.

Zusätzlich zur Untersuchung der Netzwerkaktivität im Verlauf der Kultivierung wurden Versuche zur Wirkung von Lamotrigin auf die Netzwerkaktivität gemacht.

In Studien mit MA Patienten reduzierte Lamotrigin die Frequenz der Aurasymptome pro Monat um mehr als die Hälfte in 75% der Betroffenen. Dreiviertel dieser Patienten berichteten zusätzlich von einer signifikanten Reduktion ihrer Migränesymptome. Die beschriebene Korrelation zwischen Migräneaura und Symptomen deutet auf mit Aura

assoziierter Netzwerkaktivität wie CSD als Auslöser der Schmerz- und Ausfallsymptome der Migräne. Es wurde vermutet, dass Netzwerkanalysen eine wichtige Rolle beim Verständnis der Pathomechanismen haben könnten (Lampl, Katsarava et al. 2005).

In den Kurzzeitversuchen mit Lamotrigin konnte eine signifikant stärkere Senkung der Spikezahl in Populationbursts und der Anzahl der Bursts in L1649Q-Mutationen im Vergleich zum Wildtypen beobachtet werden. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Langzeitwirkung auf die Neuronenkulturen untersucht. Lamotrigin senkte die Anzahl der Spikes in Populationbursts in L1649Q-Kulturen signifikant im Vergleich zu L1649Q-Kulturen ohne Langzeitbehandlung. Auch die maximal Feuerrate in Populationbursts wurde durch Lamotrigin signifikant verringert. Die Langzeitbehandlung mit Lamotrigin hatte keinen signifikanten Effekt auf Kulturen von wildtypischen Tieren. Die Ergebnisse deuten daher auf eine höhere Sensibilität der L1649Q-Kulturen als Wirkmechanismus von Lamotrigin in der Migränetherapie. Lamotrigin bindet an die inaktivierte Form von spannungsgesteuerten Natriumkanälen und limitiert dadurch anhaltend repetitives Feuern der Neuronen (Macdonald and Greenfield 1997, Czapinski, Blaszczyk et al. 2005). Lamotrigin reduziert außerdem Kalziumströme, indem es an spannungsabhängige Kalziumkanäle vom P-, Q- und N-Typ bindet, die an der Transmitterausschüttung beteiligt sind (Stefani and Bernardi 1997, Czapinski, Blaszczyk et al. 2005). Beide Effekte könnten ursächlich für die dämpfende Wirkung von Lamotrigin auf die Netzwerkaktivität der heterozygoten L1649Q-Kulturen sein. Durch den Block der betroffenen Natriumkanäle könnte die Funktionsverstärkung der Mutationsträger, die in den Einzelzellversuchen gemessen wurde, ausgeglichen werden. Bei einer Mutation mit Funktionsverlust wäre eine Therapie mit Lamotrigin in diesem Modell nicht indiziert, da es die verminderte Funktion des Kanals weiter senken würde. Außerdem könnte die für den Pathomechanismus vermutliche wichtige Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration durch die Blockade der Natriumkanäle durch Lamotrigin verringert werden.

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Netzwerkanalysen und der Ergebnisse der Versuche mit Lamotrigin bezüglich Signifikanz ist mit Blick auf die oben beschriebene phasenabhängige Aktivität von Migräne zu betrachten. Es kann vermutet werden, dass bei einer höheren Fallzahl und einer längeren Messzeit Unterschiede in der

Netzwerkaktivität zu sehen gewesen wären. Zu bedenken ist hierbei jedoch, dass die maximal mögliche Messzeit natürlich begrenzt ist durch die Anforderungen der Kulturen, wie frisches Medium und Außentemperatur und die Verfügbarkeit von Messgeräten.

Die Ergebnisse der Lamotrigin-Versuche entsprechen den beschriebenen klinischen Studien mit lindernden Effekten von Lamotrigin auf die Symptomatik von MA Patienten (D'Andrea, Granella et al. 1999, Lampl, Buzath et al. 1999, Lampl, Katsarava et al. 2005). Lamotrigin dämpft die Netzwerkaktivität und könnte so die Schwelle für eine Depolarisationswelle im Cortex erhöhen und dadurch eine Aura verhindern. Weitere Untersuchungen der Netzwerkaktivität unter Einfluss von spezifischen Kanalblockern könnten zum genaueren Verständnis der Wirkung der L1649Q-Mutation beitragen. Um genauere Ergebnisse zu erzielen, sollte in zukünftigen Experimenten die Anzahl der MEA-Kulturen erhöht werden. Durch Erhöhung der Anzahl der MEA-Kulturen könnten außerdem genaue Grenzwerte zum Einschluss der MEA-Kulturen festgelegt werden. In den hier präsentierten Versuchsreihen wurde eine Mindestanzahl an Spikes festgestellt, bei der eine regelrechte Funktionalität des neuronalen Netzwerks angenommen werden kann. MEA-Kulturen, die an DIV 14 vergleichsweise wenig Spikes zeigten, entwickelten im weiteren Verlauf eine schwächere Netzwerkaktivität. Diese Unterschiede zwischen den Kulturen sind vermutlich auf Faktoren während der Kultivierung wie Verteilung der Zelldichte zurückzuführen. Die Anzahl der Kulturen zwischen Kurz- und Langzeitkulturen unterscheidet sich, es gibt mehr in den Kurzzeitversuchen. Die Grenzwerte zwischen Langzeit- und Kurzzeitversuchen unterscheiden sich, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten und eine Mindestanzahl an Kulturen einbeziehen zu können. Die Grenze an Spikes an DIV 14 bei den Langzeitversuchen wurde deshalb niedriger gewählt. Dies ist sicherlich als ein Schwachpunkt der MEA-Versuche zu betrachten. Wie bereits erwähnt, könnte eine Verlängerung der Messzeit eventuelle phasenabhängige Aktivitätsunterschiede in den Netzwerken detektieren. So könnte das Aktivitätsprofil der Netzwerke genauer untersucht werden. Versuche mit Lamotrigin und anderen spezifischeren Kanalblockern auf Einzelzellzebene könnten Unterschiede in der Wirkung von Lamotrigin auf exzitatorische und inhibitorische Neuronen untersuchen.

4.3 Übererregbare Interneuronen in Einzelzellmessungen

In den in dieser Arbeit durchgeführten Patch-Clamp-Experimenten in akuten Hirnschnitten von Wildtypmäusen und L1649Q-Heterozygoten konnte eine Übererregbarkeit inhibitorischer Interneuronen im Kortex und Hippocampus der Mutationsträger gemessen werden. Exzitatorische hippokampale und kortikale Pyramidenzellen unterlagen keinen Veränderungen in Bezug auf die Erregbarkeit. Der Eingangswiderstand inhibitorischer Interneuronen im Kortex war bei Mutationsträgern im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Eine verminderte Kanaldichte in den Mutanten könnte dafür verantwortlich sein. Wie schon zuvor beschrieben, bestätigen die Messungen, dass Nav1.1 in Interneuronen der wichtigste Natriumkanal auf der untersuchten Entwicklungsstufe ist und gleichzeitig keine maßgebliche Funktion zur Aktionspotentialgeneration in exzitatorischen Neuronen hat (Hedrich, Liautard et al. 2014). Die Ergebnisse stimmen mit den immunhistochemischen Färbungen, bei denen Nav1.1 auf den Axonen inhibitorischer Interneuronen nachgewiesen wurde, überein (Ogiwara, Miyamoto et al. 2007), sowie Messungen an Mausneuronen mit Nav1.1 Funktionsverlust, bei denen in inhibitorischen Interneuronen eine reduzierte Natriumstromdichte gemessen wurde (Frank, Mantegazza et al. 2006). Funktionelle Analysen der mit FHM3 assoziierten Q1489K-Mutation und der in dieser Arbeit untersuchten L1649Q-Mutation wurden wie weiter oben beschrieben bereits in heterologen Expressionssystemen unternommen und zeigten widersprüchliche Ergebnisse, die zum Teil auf Problemen mit den Modellsystemen beruhten. Die hier vorgestellten Ergebnisse legen eine zentrale Rolle übererregbarer Interneuronen in der Entstehung der FHM3 nahe.

4.4 Migräne und Epilepsie in unmittelbarer Nachbarschaft

Ein Vergleich mit der benachbarten R1648H-Mutation bietet wegen der unmittelbaren Nähe der Mutationen und der Gemeinsamkeiten von FHM und Epilepsie an. Beide sind chronische neurologische Erkrankungen mit episodenhaften Attacken. Sie zeigen Parallelen in Symptomen, Komorbiditäten und der Behandlung (Haut, Bigal et al. 2006). Epilepsie entsteht durch neuronale Übererregbarkeit. In den bisherigen theoretischen Modellen der FHM ist Übererregbarkeit in Form einer kortikalen Depolarisationswelle das erste, proximale Ereignis und neurovaskuläre Vorgänge sind das folgende sekundäre Ereignis. Als Auslöser einer solchen Depolarisationswelle werden unter anderem erhöhte

Werte von extrazellulärem Kalium und Glutamat diskutiert. Die Depolarisationswelle wird als Korrelat der Aurasymptomatik betrachtet und kann nach aktuellen Theorien zum Pathomechanismus der Migräne mit Aura sekundär zur Aktivierung auf- und absteigender Bahnen, perimeningealer Vasodilatation und neurogener Inflammation führen (Bolay, Reuter et al. 2002), die für die auf die Aura folgende Kopfschmerzsymptomatik verantwortlich gemacht werden. Auf die Depolarisationswelle folgt eine Phase neuronaler Mindererregbarkeit (Goadsby, Lipton et al. 2002, Pietrobon and Moskowitz 2013).

Dass Übererregbarkeit ein gemeinsamer Faktor in den Pathomechanismen von FHM und Epilepsie ist, wird auch in der Therapie deutlich. Medikamente, die an der Übererregbarkeit ansetzen, haben potentiell eine Wirkung auf beide Erkrankungen (Haut, Bigal et al. 2006). Für die epileptogenen Mutationen mit Funktionsverlust ist ein übererregbares Netzwerk als Konsequenz der elektrophysiologischen Veränderungen gut nachvollziehbar. So zeigten die Interneuronen mit der epileptogenen R1648H-Mutation einen Funktionsverlust und es folgt eine verminderte Inhibition der exzitatorischen Neuronen. Das Resultat ist ein überaktives Netzwerk. Für die L1649Q-Mutanten dagegen wurde in dieser Arbeit in den Einzelzellmessungen eine inhibitorische Funktionssteigerung beobachtet. Ein mindererregbares Netzwerk durch die verstärkte Inhibition der funktionsverstärkten Interneuronen wäre intuitiv die naheliegendere Konsequenz der L1649Q-Mutation. Die kortikale Depolarisationswelle, die als ein entscheidender Faktor in der Pathophysiologie angesehen wird, beruht jedoch auf einer verstärkten Depolarisation an der Wellenfront. Eine mögliche Hypothese zur Integration der hier vorgestellten Messungen in den Pathomechanismus der FHM beruht auf einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration durch die Übererregbarkeit der Interneuronen.

4.5 Extrazelluläres Kalium als Trigger

Extrazelluläre Kaliumerhöhung ist ein etablierter Auslöser von CSD. Erhöhte Aktivität hippocampaler Interneuronen führt zu einer extrazellulären Kaliumerhöhung und kann CSD auslösen (Avoli, Nagao et al. 1996), die schließlich die Aurasymptome hervorrufen könnten. So könnte die L1649Q-Mutation ein möglicher Auslöser des ersten proximalen Ereignisses der Übererregbarkeit in der Pathogenese der FHM sein. Es konnte gezeigt werden, dass eine CSD eine langandauernde Aktivierung von duralen Nozizeptoren und

zentralen trigeminovaskulären Neuronen auslöst (Zhang, Levy et al. 2010, Zhang, Levy et al. 2011). Damit würde sie schließlich sekundär die Kopfschmerzsymptomatik der FHM auslösen können. Die CSD wurden in den Versuchen von Zhang und Levy entweder mechanisch oder chemisch mittels Kaliumchlorids ausgelöst.

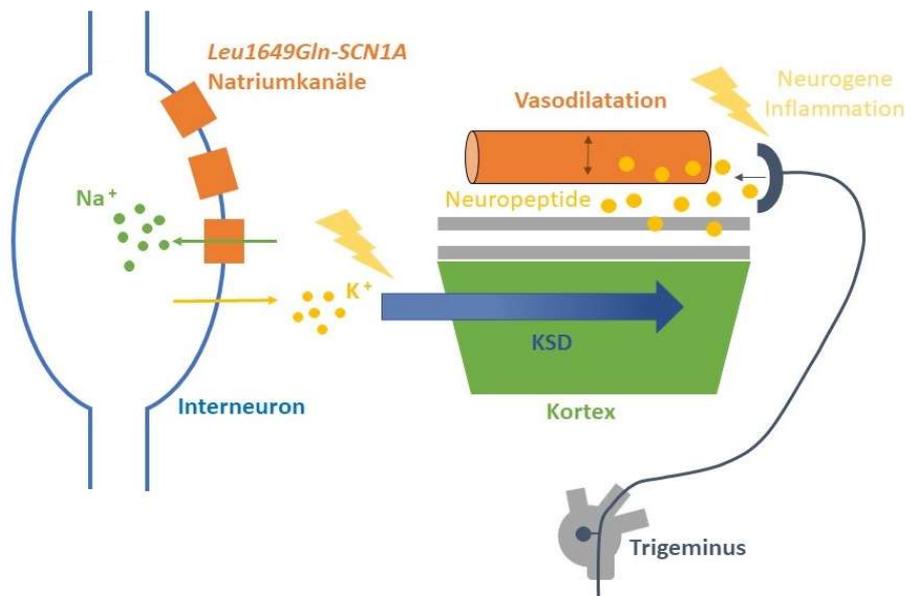


Abbildung 31: Pathomechanismus der FHM3 mit extrazellulärem Kalium als Trigger. Durch übererregbare Interneuronen kommt es zu einer Erhöhung des extrazellulären Kaliums. Die Kaliumkonzentration löst eine kortikale Depolarisationswelle aus, die die Aura verursacht und sekundär zur Aktivierung auf- und absteigender Bahnen, perimeningealer Vasodilatation und neurogener Inflammation führt, wodurch es zur Kopfschmerzsymptomatik kommt. Verändert nach (Freilinger and Dichgans 2006, Pietrobon and Moskowitz 2013)

Teile der Einzelzellmessungen dieser Arbeit sind in das Paper „Hyperexcitable interneurons trigger cortical spreading depression in an Scn1a migraine model.“ im Journal for Clinical Investigation im November 2021 mit eingeflossen (Auffenberg, Hedrich et al. 2021). In weiteren Versuchen an akuten Hirnschnitten konnte gezeigt werden, dass es bei Mutanten während einer kortikalen Streudepolarisation zu einem früheren und erhöhten Kaliumanstieg kommt. Wunderbar ergänzt wurden diese Ergebnisse durch Chever et al., die zeigen konnten, dass eine Erhöhung der Kaliumkonzentration und das Auslösen einer kortikalen Streudepolarisationswelle durch optogenetische Aktivierung von Interneuronen getriggert werden kann. Kortikalen Depolarisationswellen konnten

außerdem mit Hm1a ausgelöst werden, ein Neurotoxin das spezifisch den Nav1.1 Kanal verstärkt. Hm1a hat also funktionsverstärkende Effekte wie die hier beschriebene *L1649Q* Mutation.

4.6 Migräne und Epilepsie in der gleichen Mutation

In einer italienischen Familie konnte sowohl ein epileptischer als auch ein FHM3-Phänotyp beobachtet werden. Der Proband hatte benigne okzipitale Epilepsie, zwei Verwandte litten unter Fieberkrämpfen und entwickelten später eine benigne okzipitale Epilepsie. Zwei weitere Verwandte hatten FHM ohne Epilepsie oder Fieberkrämpfen. In allen Betroffenen fand man die *Thr1174Ser*-Mutation in *SCN1A*. Mit transfizierten tsA-201 Zellen konnte gezeigt werden, dass diese Mutation sowohl funktionsverstärkende als auch funktionsmindernde Effekte hat. Es wird spekuliert, dass die funktionsvermindernden Effekte der Epilepsie zuzuordnen sind, während die Funktionsverstärkung FHM auslösen könnte (Cestèle, Labate et al. 2013).

4.7 Funktionsverlust oder Funktionsverstärkung?

Das Auftreten von epileptischen Anfällen in FHM-Patienten wie in Patienten mit einer *Thr1174Ser*-Mutation ist bei FHM-Patienten mit anderen Mutationen bisher jedoch selten beobachtet worden (Dichgans, Freilinger et al. 2005, Vanmolkot, Babini et al. 2007), obwohl das *SCN1A*-Gen das Hauptziel epileptogener Mutationen ist (Meisler and Kearney 2005, Avanzini, Franceschetti et al. 2007). Es ist daher anzunehmen, dass sich die Pathomechanismen trotz der Gemeinsamkeiten unterscheiden müssen. Und obwohl wie oben beschrieben, die meisten epileptogenen Mutationen in Nav1.1 in einem Funktionsverlust resultieren, gibt es auch Mutationen mit Funktionsverstärkung der Nav1.1-Kanäle in Epilepsien (Spampanato, Escayg et al. 2001). Funktionsverstärkung und Funktionsverlust im selben Gen können also einen ähnlichen Phänotyp hervorbringen.

Die Konsequenzen der Mutationen in *SCN1A* vorherzusagen und ein Rückschluss von Funktionsverlust oder Funktionsverstärkung auf den Pathomechanismus zu ziehen, bleibt eine Herausforderung angesichts der komplexen Interaktionen von Zellen und Transmittern in den neuronalen Netzwerken betroffener Patienten. So kann interessanterweise der Neurotransmitter GABA der Interneuronen in einigen Regionen

des adulten Gehirns exzitatorische Wirkung haben (Marty and Llano 2005). Die übererregbaren L1649Q-Interneuronen könnten zu einer erhöhten extrazellulären GABA-Konzentration führen, die unter Umständen aktivitätssteigernd wirken könnten und eine CSD begünstigen könnten.

4.8 Zusammenfassung und Ausblick

Mutationen in Ionenkanälen können zur Funktionsverstärkung oder Funktionsminderung führen und so zu Veränderungen auf Einzel- und Netzwerkebene im betroffenen Organismus führen. In der Arbeit wurden die Auswirkungen der L1649Q-Mutation im SCN1A-Natriumkanal untersucht. Die L1649Q-Mutation ist ursächlich für die familiäre hemiplegische Migräne Typ 3. Voruntersuchungen in heterologen Modellsystemen zeigten widersprüchliche Ergebnisse. In dieser Arbeit wurde ein knock-in Mausmodell verwendet, um möglichst physiologische und Patienten-ähnliche Analysebedingungen zu schaffen.

In der Netzwerkanalyse zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtypkulturen und L1649Q-Mutanten im Netzwerkverhalten bei breit gestreuten Werten. Bei den Lang- und Kurzzeitversuchen zur Wirkung von Lamotrigin auf das Netzwerkverhalten zeigte sich eine höhere Sensibilität der L1649Q-Kulturen auf Lamotrigin mit dämpfender Wirkung auf die Aktivität, wodurch sich die Wirksamkeit von Lamotrigin im klinischen Einsatz bei der Behandlung von Migräne erklären lassen kann.

In den Einzelzellmessungen konnte eine Übererregbarkeit inhibitorischer Interneuronen im Kortex und Hippocampus der Mutationsträger gemessen werden. Exzitatorische hippokampale und kortikale Pyramidenzellen unterlagen keinen Veränderungen in Bezug auf die Erregbarkeit. Die erhöhte Aktivität der Interneuronen könnte im pathophysiologischen Modell der Migräneentstehung über die Erhöhung extrazellulären Kaliums zur Auslösung einer kortikalen Depolarisationswelle führen, die wiederum eine Migräneattacke auslösen kann.

Migräne ist eine häufig vorkommende Volkskrankheit mit hohem Leidensdruck und hohen sozioökonomischen Kosten. Umwelteinflüsse und genetische Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Migräne, der Pathomechanismus ist jedoch nicht genau verstanden. Ein tieferes Verständnis für die Entstehung der Migräne kann

Ausgangspunkt für neue Therapieansätze sein. Die Erforschung monogener Migräneformen wie der FHM in Knock-in Modellen ermöglichen gezielte Untersuchungen in eine aussagekräftigen Modellsystem. Um den Pathomechanismus der FHM genauer zu beschreiben, sind weitere Experimente auf Einzel- und Netzwerkebene nötig.

5 Literaturverzeichnis

- Agmon, A. and B. Connors (1991). "Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro." Neuroscience **41**(2): 365-379.
- Alekov, A. K., M. Rahman, N. Mitrovic, F. Lehmann-Horn and H. Lerche (2000). "A sodium channel mutation causing epilepsy in man exhibits subtle defects in fast inactivation and activation in vitro." The Journal of physiology **529**(3): 533-540.
- Auffenberg, E., U. B. Hedrich, R. Barbieri, D. Miely, B. Groschup, T. V. Wuttke, N. Vogel, P. Lührs, I. Zanardi and S. Bertelli (2021). "Hyperexcitable interneurons trigger cortical spreading depression in an Scn1a migraine model." The Journal of Clinical Investigation.
- Avanzini, G., S. Franceschetti and M. Mantegazza (2007). "Epileptogenic channelopathies: experimental models of human pathologies." Epilepsia **48**(s2): 51-64.
- Avoli, M., T. Nagao, R. Köhling, A. Lücke and D. Mattia (1996). "Synchronization of rat hippocampal neurons in the absence of excitatory amino acid-mediated transmission." Brain research **735**(2): 188-196.
- Barela, A. J., S. P. Waddy, J. G. Lickfett, J. Hunter, A. Anido, S. L. Helmers, A. L. Goldin and A. Escayg (2006). "An epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A that decreases channel excitability." Journal of Neuroscience **26**(10): 2714-2723.
- Beckh, S., M. Noda, H. Lübbert and S. Numa (1989). "Differential regulation of three sodium channel messenger RNAs in the rat central nervous system during development." The EMBO journal **8**(12): 3611.
- Benito, B., R. Brugada, J. Brugada and P. Brugada (2008). "Brugada syndrome." Progress in cardiovascular diseases **51**(1): 1-22.
- Bolay, H., U. Reuter, A. K. Dunn, Z. Huang, D. A. Boas and M. A. Moskowitz (2002). "Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model." Nature medicine **8**(2): 136-142.
- Catterall, W. A. (2000). "From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels." Neuron **26**(1): 13-25.
- Catterall, W. A., A. L. Goldin and S. G. Waxman (2005). "International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels." Pharmacological reviews **57**(4): 397-409.
- Cestèle, S., A. Labate, R. Rusconi, P. Tarantino, L. Mumoli, S. Franceschetti, G. Annesi, M. Mantegazza and A. Gambardella (2013). "Divergent effects of the T1174S SCN1A mutation associated with seizures and hemiplegic migraine." Epilepsia **54**(5): 927-935.
- Cestèle, S., P. Scalmani, R. Rusconi, B. Terragni, S. Franceschetti and M. Mantegazza (2008). "Self-limited hyperexcitability: functional effect of a familial hemiplegic migraine mutation of the Nav1. 1 (SCN1A) Na⁺ channel." The Journal of Neuroscience **28**(29): 7273-7283.
- Cestèle, S., E. Schiavon, R. Rusconi, S. Franceschetti and M. Mantegazza (2013). "Nonfunctional Nav1. 1 familial hemiplegic migraine mutant transformed into gain of function by partial rescue of folding defects." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(43): 17546-17551.
- Chandy, K. (1991). "Simplified gene nomenclature." Nature **352**: 26.
- Cole, K. S. (1979). "Mostly membranes." Annual review of physiology **41**(1): 1-23.
- Czapinski, P., B. Blaszczyk and S. J. Czuczwar (2005). "Mechanisms of action of antiepileptic drugs." Current topics in medicinal chemistry **5**(1): 3-14.
- D'Andrea, G., F. Granella, M. Cadaldini and G. Manzoni (1999). "Effectiveness of lamotrigine in the prophylaxis of migraine with aura: an open pilot study." Cephalalgia **19**(1): 64-66.
- Dichgans, M., T. Freilinger, G. Eckstein, E. Babini, B. Lorenz-Depiereux, S. Biskup, M. D. Ferrari, J. Herzog, A. M. van den Maagdenberg and M. Pusch (2005). "Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine." The Lancet **366**(9483): 371-377.
- Dodick, D. W. (2018). "A phase-by-phase review of migraine pathophysiology." Headache: The Journal of Head and Face Pain **58**: 4-16.

Ducros, A., C. Denier, A. Joutel, M. Cecillon, C. Lescoat, K. Vahedi, F. Darcel, E. Vicaut, M.-G. Bousser and E. Tournier-Lasserre (2001). "The clinical spectrum of familial hemiplegic migraine associated with mutations in a neuronal calcium channel." New England Journal of Medicine **345**(1): 17-24.

Escayg, A., B. T. MacDonald, M. H. Meisler, S. Baulac, G. Huberfeld, I. An-Gourfinkel, A. Brice, E. LeGuern, B. Moulard and D. Chaigne (2000). "Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+ 2." Nature genetics **24**(4): 343-345.

Frank, H. Y., M. Mantegazza, R. E. Westenbroek, C. A. Robbins, F. Kalume, K. A. Burton, W. J. Spain, G. S. McKnight, T. Scheuer and W. A. Catterall (2006). "Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy." Nature neuroscience **9**(9): 1142.

Frank, H. Y., V. Yarov-Yarovoy, G. A. Gutman and W. A. Catterall (2005). "Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily." Pharmacological reviews **57**(4): 387-395.

Freilinger, P. D. T. and M. Dichgans (2006). "Genetik der Migräne." Der Nervenarzt **77**(10): 1186-1195.

Freilinger, T. and M. Dichgans (2013). "Ionenkanalerkrankungen des Gehirns—monogene Migräneformen." medizinische genetik **25**(4): 440-447.

Gao, Q., F. Xu, C. Jiang, Z. Chen, H. Chen, H. Liao and L. Zhao (2016). "Decreased functional connectivity density in pain-related brain regions of female migraine patients without aura." Brain research **1632**: 73-81.

Gazina, E., K. Richards, M. Mokhtar, E. Thomas, C. Reid and S. Petrou (2010). "Differential expression of exon 5 splice variants of sodium channel α subunit mRNAs in the developing mouse brain." Neuroscience **166**(1): 195-200.

George, A. L. (2005). "Inherited disorders of voltage-gated sodium channels." The Journal of clinical investigation **115**(8): 1990-1999.

Goadsby, P. J., R. B. Lipton and M. D. Ferrari (2002). "Migraine—current understanding and treatment." New England Journal of Medicine **346**(4): 257-270.

Goldin, A. L. (2001). "Resurgence of sodium channel research." Annual review of physiology **63**(1): 871-894.

Goldin, A. L. (2003). "Mechanisms of sodium channel inactivation." Current opinion in neurobiology **13**(3): 284-290.

Goldin, A. L., R. L. Barchi, J. H. Caldwell, F. Hofmann, J. R. Howe, J. C. Hunter, R. G. Kallen, G. Mandel, M. H. Meisler and Y. B. Netter (2000). "Nomenclature of voltage-gated sodium channels." Neuron **28**(2): 365-368.

Gong, B., K. J. Rhodes, Z. Bekele-Arcuri and J. S. Trimmer (1999). "Type I and type II Na⁺ channel α -subunit polypeptides exhibit distinct spatial and temporal patterning, and association with auxiliary subunits in rat brain." Journal of Comparative Neurology **412**(2): 342-352.

Gormley, P., V. Anttila, B. S. Winsvold, P. Palta, T. Esko, T. H. Pers, K.-H. Farh, E. Cuenca-Leon, M. Muona and N. A. Furlotte (2016). "Meta-analysis of 375,000 individuals identifies 38 susceptibility loci for migraine." Nature genetics **48**(8): 856-866.

Gormley, P., B. S. Winsvold, D. R. Nyholt, M. Kallela, D. I. Chasman and A. Palotie (2016). "Migraine genetics: from genome-wide association studies to translational insights." Genome medicine **8**(1): 86.

Gouaux, E. and R. MacKinnon (2005). "Principles of selective ion transport in channels and pumps." science **310**(5753): 1461-1465.

Hadjikhani, N., M. S. del Rio, O. Wu, D. Schwartz, D. Bakker, B. Fischl, K. K. Kwong, F. M. Cutrer, B. R. Rosen and R. B. Tootell (2001). "Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(8): 4687-4692.

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

Hansen, J. M., A. W. Hauge, M. Ashina and J. Olesen (2011). "Trigger factors for familial hemiplegic migraine." Cephalalgia **31**(12): 1274-1281.

Haut, S. R., M. E. Bigal and R. B. Lipton (2006). "Chronic disorders with episodic manifestations: focus on epilepsy and migraine." The Lancet Neurology **5**(2): 148-157.

Hedrich, U. B., C. Liautard, D. Kirschenbaum, M. Pofahl, J. Lavigne, Y. Liu, S. Theiss, J. Slotta, A. Escayg and M. Dihné (2014). "Impaired action potential initiation in GABAergic interneurons causes hyperexcitable networks in an epileptic mouse model carrying a human Nav1. 1 mutation." The Journal of Neuroscience **34**(45): 14874-14889.

Hedrich, U. B., C. Liautard, D. Kirschenbaum, M. Pofahl, J. Lavigne, Y. Liu, S. Theiss, J. Slotta, A. Escayg, M. Dihne, H. Beck, M. Mantegazza and H. Lerche (2014). "Impaired action potential initiation in GABAergic interneurons causes hyperexcitable networks in an epileptic mouse model carrying a human Na(V)1.1 mutation." J Neurosci **34**(45): 14874-14889.

Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952). "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve." The Journal of physiology **117**(4): 500.

Hu, W., C. Tian, T. Li, M. Yang, H. Hou and Y. Shu (2009). "Distinct contributions of Nav1. 6 and Nav1. 2 in action potential initiation and backpropagation." Nature neuroscience **12**(8): 996-1002.

Illes, S., S. Theiss, H.-P. Hartung, M. Siebler and M. Dihné (2009). "Niche-dependent development of functional neuronal networks from embryonic stem cell-derived neural populations." BMC neuroscience **10**(1): 1.

Isom, L. L. (2001). "Sodium channel β subunits: anything but auxiliary." The Neuroscientist **7**(1): 42-54.

Kahlig, K. M., T. H. Rhodes, M. Pusch, T. Freilinger, J. M. Pereira-Monteiro, M. D. Ferrari, A. M. van den Maagdenberg, M. Dichgans and A. L. George (2008). "Divergent sodium channel defects in familial hemiplegic migraine." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(28): 9799-9804.

Kandel, E. R., J. H. Schwartz, T. M. Jessell, S. A. Siegelbaum and A. Hudspeth (2000). Principles of neural science, McGraw-hill New York.

Karenberg, A. and C. Leitz (2001). "Headache in magical and medical papyri of ancient Egypt." Cephalalgia **21**(9): 911-916.

Koehler, P. J. and C. J. Boes (2010). "A history of non-drug treatment in headache, particularly migraine." Brain **133**(8): 2489-2500.

Lampl, C., A. Buzath, D. Klinger and K. Neumann (1999). "Lamotrigine in the prophylactic treatment of migraine aura—a pilot study." Cephalalgia **19**(1): 58-63.

Lampl, C., Z. Katsarava, H. Diener and V. Limmroth (2005). "Lamotrigine reduces migraine aura and migraine attacks in patients with migraine with aura." Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry **76**(12): 1730-1732.

Latimer, K., C. Pendleton, J. Rosenberg, A. A. Cohen-Gadol and A. Quiñones-Hinojosa (2011). "Dr. Harvey Cushing's attempts to cure migraine based on theories of pathophysiology: Historical vignette." Journal of neurosurgery **115**(5): 924-928.

Lauritzen, M. (1994). "Pathophysiology of the migraine aura." Brain **117**(1): 199-210.

Leo, A. A. (1944). "Spreading depression of activity in the cerebral cortex." Journal of neurophysiology **7**(6): 359-390.

Leo, L., L. Gherardini, V. Barone, M. De Fusco, D. Pietrobon, T. Pizzorusso and G. Casari (2011). "Increased susceptibility to cortical spreading depression in the mouse model of familial hemiplegic migraine type 2." PLoS Genet **7**(6): e1002129.

Leonardi, M., T. J. Steiner, A. T. Scher and R. B. Lipton (2005). "The global burden of migraine: measuring disability in headache disorders with WHO's Classification of Functioning, Disability and Health (ICF)." The journal of headache and pain **6**(6): 429-440.

Lerche, H., C. Biervert, A. Alekov, L. Schleithoff, M. Lindner, W. Klingler, F. Bretschneider, N. Mitrovic, K. Jurkat-Rott and H. Bode (1999). "A reduced K⁺ current due to a novel mutation in KCNQ 2 causes neonatal convulsions." Annals of neurology **46**(3): 305-312.

Lipton, R. B., W. F. Stewart, S. Diamond, M. L. Diamond and M. Reed (2001). "Prevalence and burden of migraine in the United States: data from the American Migraine Study II." Headache: The Journal of Head and Face Pain **41**(7): 646-657.

Liu, H.-Y., K.-H. Chou and W.-T. Chen (2018). "Migraine and the Hippocampus." Current pain and headache reports **22**(2): 13.

Liu, J., L. Lan, G. Li, X. Yan, J. Nan, S. Xiong, Q. Yin, K. M. von Deneen, Q. Gong and F. Liang (2013). "Migraine-related gray matter and white matter changes at a 1-year follow-up evaluation." The Journal of Pain **14**(12): 1703-1708.

Liu, M.-G. and J. Chen (2009). "Roles of the hippocampal formation in pain information processing." Neuroscience bulletin **25**(5): 237.

Lossin, C., D. W. Wang, T. H. Rhodes, C. G. Vanoye and A. L. George Jr (2002). "Molecular basis of an inherited epilepsy." Neuron **34**(6): 877-884.

Macdonald, R. L. and J. L. Greenfield (1997). "Mechanisms of action of new antiepileptic drugs." Current opinion in neurology **10**(2): 121-128.

Marty, A. and I. Llano (2005). "Excitatory effects of GABA in established brain networks." Trends in neurosciences **28**(6): 284-289.

McCormick, K. A., L. L. Isom, D. Ragsdale, D. Smith, T. Scheuer and W. A. Catterall (1998). "Molecular determinants of Na⁺ channel function in the extracellular domain of the β 1 subunit." Journal of Biological Chemistry **273**(7): 3954-3962.

Meisler, M. H. and J. A. Kearney (2005). "Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders." The Journal of clinical investigation **115**(8): 2010-2017.

Molleman, A. (2003). Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology, Wiley.

Moskowitz, M. A., H. Bolay and T. Dalkara (2004). "Deciphering migraine mechanisms: clues from familial hemiplegic migraine genotypes." Annals of neurology **55**(2): 276-280.

Mulder, E. J., C. Van Baal, D. Gaist, M. Kallela, J. Kaprio, D. A. Svensson, D. R. Nyholt, N. G. Martin, A. J. MacGregor and L. F. Cherkas (2003). "Genetic and environmental influences on migraine: a twin study across six countries." Twin Research **6**(05): 422-431.

Mulley, J. C., I. E. Scheffer, S. Petrou, L. M. Dibbens, S. F. Berkovic and L. A. Harkin (2005). "SCN1A mutations and epilepsy." Human mutation **25**(6): 535-542.

Neher, E. and B. Sakmann (2010). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." A century of Nature: twenty-one discoveries that changed science and the world: 224.

Nellgård, B. and T. Wieloch (1992). "NMDA-receptor blockers but not NBQX, an AMPA-receptor antagonist, inhibit spreading depression in the rat brain." Acta physiologica Scandinavica **146**(4): 497-503.

Neubauer, G. and R. Ujlaky (2002). "Migräne—eine Volkskrankheit und ihre Kosten: Indirekte Kosten überwiegen." Pharmazie in unserer Zeit **31**(5): 494-497.

Nusser, Z. (2012). "Differential subcellular distribution of ion channels and the diversity of neuronal function." Current opinion in neurobiology **22**(3): 366-371.

Ogiwara, I., H. Miyamoto, N. Morita, N. Atapour, E. Mazaki, I. Inoue, T. Takeuchi, S. Itoharu, Y. Yanagawa and K. Obata (2007). "Nav1. 1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation." The Journal of neuroscience **27**(22): 5903-5914.

Ophoff, R. A., G. M. Terwindt, M. N. Vergouwe, R. van Eijk, P. J. Oefner, S. M. Hoffman, J. E. Lamerdin, H. W. Mohrenweiser, D. E. Bulman and M. Ferrari (1996). "Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4." Cell **87**(3): 543-552.

Pelzer, N., A. H. Stam, J. A. Carpay, B. d. Vries, A. M. van den Maagdenberg, M. D. Ferrari, J. Haan and G. M. Terwindt (2014). "Familial hemiplegic migraine treated by sodium valproate and lamotrigine." Cephalalgia **34**(9): 708-711.

Pietrobon, D. and M. A. Moskowitz (2013). "Pathophysiology of migraine." Annual review of physiology **75**: 365-391.

Pietrobon, D. and J. Striessnig (2003). "Neurobiology of migraine." Nature Reviews Neuroscience **4**(5): 386-398.

Rhodes, T. H., C. Lossin, C. G. Vanoye, D. W. Wang and A. L. George (2004). "Noninactivating voltage-gated sodium channels in severe myoclonic epilepsy of infancy." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(30): 11147-11152.

Russell, M. B., L. Iselius and J. Olesen (1995). "Inheritance of migraine investigated by complex segregation analysis." Human genetics **96**(6): 726-730.

Russell, M. B. and J. Olesen (1995). "Increased familial risk and evidence of genetic factor in migraine." Bmj **311**(7004): 541-544.

Smith, J. M., D. P. Bradley, M. F. James and C. L.-H. Huang (2006). "Physiological studies of cortical spreading depression." Biological Reviews **81**(4): 457-481.

Society, H. C. S. o. t. I. H. (2004). "The international classification of headache disorders." Cephalalgia: an international journal of headache **24**: 9.

Sousa, N., P. J. Lucassen, J. Pruessner, O. Almeida, A. M. V. Dam, G. Rajkowska, D. F. Swaab and B. Czeh (2014). "Neuropathology of stress."

Spampanato, J., A. Escayg, M. H. Meisler and A. L. Goldin (2001). "Functional effects of two voltage-gated sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2." Journal of neuroscience **21**(19): 7481-7490.

Spira, M. E. and A. Hai (2013). "Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology." Nature nanotechnology **8**(2): 83-94.

Stefani, A. and G. Bernardi (1997). "Voltage-Activated Calcium Channels: Targets of Antiepileptic Drug Therapy?" Epilepsia **38**(9): 959-965.

Steiner, T., L. Findley and A. Yuen (1997). "Lamotrigine versus placebo in the prophylaxis of migraine with and without aura." Cephalalgia **17**(2): 109-112.

Stewart, W. F., A. Shechter and B. Rasmussen (1994). "Migraine prevalence. A review of population-based studies." Neurology **44**(6 Suppl 4): S17-23.

Thomsen, L., M. Eriksen, S. Roemer, I. Andersen, J. Olesen and M. Russell (2002). "A population-based study of familial hemiplegic migraine suggests revised diagnostic criteria." Brain **125**(6): 1379-1391.

Thomsen, L. L., E. Ostergaard, J. Olesen and M. B. Russell (2003). "Evidence for a separate type of migraine with aura Sporadic hemiplegic migraine." Neurology **60**(4): 595-601.

Vacher, H., D. P. Mohapatra and J. S. Trimmer (2008). "Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons." Physiological reviews **88**(4): 1407-1447.

van den Maagdenberg, A. M., D. Pietrobon, T. Pizzorusso, S. Kaja, L. A. Broos, T. Cesetti, R. C. van de Ven, A. Tottene, J. van der Kaa and J. J. Plomp (2004). "A Cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression." Neuron **41**(5): 701-710.

van den Maagdenberg, A. M., T. Pizzorusso, S. Kaja, N. Terpolilli, M. Shapovalova, F. E. Hoebeek, C. F. Barrett, L. Gherardini, R. C. van de Ven and B. Todorov (2010). "High cortical spreading depression susceptibility and migraine-associated symptoms in Cav2. 1 S218L mice." Annals of neurology **67**(1): 85-98.

Vanmolkot, K. R., E. Babini, B. de Vries, A. H. Stam, T. Freilinger, G. M. Terwindt, L. Norris, J. Haan, R. R. Frants and N. M. Ramadan (2007). "The novel p. L1649Q mutation in the SCN1A epilepsy gene is associated with familial hemiplegic migraine: genetic and functional studies." Human mutation **28**(5): 522-522.

Vanmolkot, K. R., E. E. Kors, J. J. Hottenga, G. M. Terwindt, J. Haan, W. A. Hoefnagels, D. F. Black, L. A. Sandkuijl, R. R. Frants and M. D. Ferrari (2003). "Novel mutations in the Na⁺, K⁺-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions." Annals of neurology **54**(3): 360-366.

Wang, S.-J., C.-C. Huang, K.-S. Hsu, J.-J. Tsai and P.-W. Gean (1996). "Presynaptic inhibition of excitatory neurotransmission by lamotrigine in the rat amygdalar neurons." Synapse **24**(3): 248-255.

Westenbroek, R. E., T. Sakurai, E. M. Elliott, J. W. Hell, T. Starr, T. P. Snutch and W. A. Catterall (1995). "Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels." The Journal of neuroscience **15**(10): 6403-6418.

Whitaker, W. R., J. J. Clare, A. J. Powell, Y. H. Chen, R. L. Faull and P. C. Emson (2000). "Distribution of voltage-gated sodium channel α -subunit and β -subunit mRNAs in human hippocampal formation, cortex, and cerebellum." Journal of Comparative Neurology **422**(1): 123-139.

Xu, R., E. A. Thomas, M. Jenkins, E. V. Gazina, C. Chiu, S. E. Heron, J. C. Mulley, I. E. Scheffer, S. F. Berkovic and S. Petrou (2007). "A childhood epilepsy mutation reveals a role for developmentally regulated splicing of a sodium channel." Molecular and Cellular Neuroscience **35**(2): 292-301.

Yavin, E. and Z. Yavin (1974). "Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface." The Journal of cell biology **62**(2): 540-546.

Zhang, X., D. Levy, V. Kainz, R. Nosedá, M. Jakubowski and R. Burstein (2011). "Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression." Annals of neurology **69**(5): 855-865.

Zhang, X., D. Levy, R. Nosedá, V. Kainz, M. Jakubowski and R. Burstein (2010). "Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura." The Journal of neuroscience **30**(26): 8807-8814.

Danksagungen

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Freilinger vielmals für die Planung und Betreuung des Projektes und die Chance, an der medizinischen Forschung teilzunehmen.

Prof. Dr. Lerche danke ich für die Möglichkeit, mit seiner Arbeitsgruppe und seinem Labor arbeiten zu dürfen.

Ich danke besonders meiner hochgeschätzten Doktormama Ulrike Hedrich-Klimosch für ihre herausragende Betreuung und geduldige Unterstützung.

Ich danke Dr. Dr. Henner Koch für seine Hilfe und seine ansteckende Energie und seinen ausgeprägten Forschergeist, der mich sehr inspiriert hat.

Ich danke Niklas Schwarz, den ich als Menschen und Forscher sehr schätze.

Ich danke Harshad, meinem Laborbruder, für seine Hilfe beim Reparieren des Patch Clamp Messstandes.

Ich danke Florian, Kevin und Julian für ihre Hilfe bei den Grafiken und ihre Freundschaft in und außerhalb des Labors. Es war ein mir ein ausgesprochen großes Vergnügen, mit ihnen ein Büro zu teilen und ihr Unternehmen wachsen zu sehen.

Ich danke Heidi für ihre geduldige Hilfe und Unterstützung und die gemeinsame Reparatur der Zentrifuge, die in den ersten Tagen meiner Laborarbeit durch natürliche Abnutzung und ohne jegliche Fremdeinwirkung leichten Schaden nahm und zügig wieder funktionstüchtig gemacht werden konnte.

Liste der Veröffentlichungen

Layer, N., J. Brandes, P. J. Lührs, T. V. Wuttke and H. Koch (2021). "The effect of lamotrigine and other antiepileptic drugs on respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex." Epilepsia.

Auffenberg, E., U. B. Hedrich, R. Barbieri, D. Miely, B. Groschup, T. V. Wuttke, N. Vogel, P. Lührs, I. Zanardi and S. Bertelli (2021). "Hyperexcitable interneurons trigger cortical spreading depression in an Scn1a migraine model." The Journal of Clinical Investigation.

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung unter Betreuung von Prof. Tobias Freilinger durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch (Postdoc).

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch von mir durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig (nach Anleitung durch Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch und Prof. Tobias Freilinger) verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Berlin, den 16.03.2022

Philipp Justus Lührs