

Aus der
Neurologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt Epileptologie

**Rolle von SCN1A bei der „Cortical Spreading Depression“:
Untersuchung eines Mausmodells für hemiplegische
Migräne**

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

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

vorgelegt von

Vogel, Niklas

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Freilinger

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Lerche

Tag der Disputation: 23.04.2024

Widmung

Für meine Eltern Ulrich und Edith Vogel

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis.....	11
Abkürzungen	12
1. Einleitung	15
1.1. Migräne	15
1.1.1. Prävalenz der Migräne.....	15
1.1.2. Diagnosekriterien der Migräne.....	16
1.1.3. Pathomechanismus des Migräneschmerzes	16
1.1.4. Phänomenologie der Migräneaura.....	17
1.1.5. Pathomechanismus der Migräneaura	18
1.1.6. Familiäre hemiplegische Migräne	21
1.1.7. Genetik der familiären hemiplegischen Migräne	22
1.1.8. Akuttherapie und Prophylaxe der Migräne.....	26
1.2. Ionenkanäle.....	28
1.2.1. Aufbau und Funktion spannungsgesteuerter Natriumionenkanäle	29
1.2.2. Nomenklatur spannungsgesteuerter Natriumionenkanäle	32
1.2.3. Expressionsmuster und Kanalopathien spannungsgesteuerter Natriumionenkanäle.....	34
1.2.4. Phrixotoxin-3 als Peptidmodulator spannungsgesteuerter Natriumionenkanäle.....	36
1.3. Wissenschaftliche Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	37
2. Material und Methoden.....	39
2.1. Versuchstiere für Messungen an akuten Hirnschnitten und in primären hippocampalen Neuronenkulturen.....	39

2.1.1. Mausmodell	39
2.1.2. Genotypisierung.....	39
2.2. Untersuchungen mittels Patch-Clamp-Technik an akuten Hirnschnitten	43
2.2.1. Patch-Clamp-Technik	43
2.2.2. Whole-Cell-Ableitung	44
2.2.3. Präparation der akuten thalamokortikalen Hirnschnitte	45
2.2.4. Glaspipetten für Versuche an akuten Hirnschnitten.....	47
2.2.5. Messlösungen für Versuche an akuten Hirnschnitten.....	47
2.2.6. Allgemeiner Versuchsablauf der Versuche mittels Patch-Clamp- Technik	49
2.2.7. Patch-Clamp-Setup	51
2.2.8. Experimenteller Versuchsaufbau zur Messung einer Cortical Spreading Depression in akuten Hirnschnitten.....	52
2.2.9. Messparameter zur Analyse einer Cortical Spreading Depression in akuten Hirnschnitten.....	53
2.2.10. Experimenteller Versuchsaufbau zur Messung von spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingängen in akuten Hirnschnitten	56
2.3. Untersuchungen mittels Multielektrodenarray in primären hippocampalen Neuronenkulturen.....	57
2.3.1. Ableitung von Strömen im Multielektrodenarray	57
2.3.2. Anfertigung der primären hippocampalen Neuronenkulturen	57
2.3.3. Beschichtung der Multielektrodenarrays.....	58
2.3.4. Messung spontaner Netzwerkaktivität von primären hippocampalen Neuronenkulturen im Multielektrodenarray	59

2.3.5.	Messparameter zur spontanen Netzwerkaktivität von primären hippocampalen Neuronenkulturen im Multielektrodenarray	60
2.4.	Untersuchungen zum Einfluss von Phrixotoxin-3 auf mit Nav1.1- und Nav1.2-Kanälen transfizierte HEK-Zelllinien.....	62
2.4.1.	Kultivierung der HEK-Zelllinien	62
2.4.2.	Glaspipetten für die Versuche an den HEK-Zelllinien	63
2.4.3.	Messlösungen für die Versuche an den HEK-Zelllinien	63
2.4.4.	Patch-Clamp-Setup zur Untersuchung des Einflusses von Phrixotoxin-3 auf Nav1.1- und Nav1.2-Kanäle	65
2.4.5.	Experimenteller Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses von Phrixotoxin-3 auf Nav1.1- und Nav1.2-Kanäle	66
2.4.6.	Messparameter zur Untersuchung des Einflusses von Phrixotoxin-3 auf Nav1.1- und Nav1.2-Kanäle	66
2.5.	Auswertung und Statistik.....	69
3.	Ergebnisse	70
3.1.	Untersuchungen zur CSD und spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingängen wildtypischer und heterozygoter Scn1a-L1649Q-mutierter Mäuse in akuten Hirnschnitten	70
3.1.1.	Untersuchung des Schwellenwertes bis zur Auslösung einer CSD	70
3.1.2.	Untersuchung zur Dauer einer CSD	72
3.1.3.	Untersuchung der spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingänge kortikaler Pyramidenzellen.....	73
3.2.	Untersuchung zur Netzwerkaktivität von primären hippocampalen Neuronenkulturen wildtypischer und heterozygoter Scn1a-L1649Q-mutierter Mäuse im Multielektrodenarray	77
3.3.	Untersuchung zum Einfluss von Phrixotoxin-3 auf HEK-Zelllinien mit den spezifischen Natriumkanälen Nav1.1 und Nav1.2	85

3.3.1.	Einfluss von Phrixotoxin-3 auf die Stromdichte.....	85
3.3.2.	Einfluss von Phrixotoxin-3 auf die Aktivierung und Inaktivierung ..	87
3.4.	Einfluss von Phrixotoxin-3 auf die Netzwerkaktivität von primären hippocampalen Neuronenkulturen wildtypischer und Scn1a-L1649Q-mutierter Mäuse im Multielektrodenarray	91
4.	Diskussion.....	100
4.1.	Suszeptibilität der heterozygoten Tiere mit Scn1a-L1649Q-Mutation für eine Cortical Spreading Depression	100
4.2.	Einfluss der Scn1a-L1649Q-Mutation auf spontane inhibitorische postsynaptische Eingänge bei kortikalen Pyramidenzellen	103
4.3.	Pathomechanismus und Triggerfaktoren der Cortical Spreading Depression	104
4.4.	Einfluss der Scn1a-L1649Q-Mutation auf die Netzwerkaktivität.....	106
4.5.	Kanalwirksamkeit und Spezifität von Phrixotxin-3	107
4.6.	Wirksamkeit von Phrixotoxin-3 auf die Netzwerkaktivität	110
4.7.	Ausblick.....	112
5.	Zusammenfassung.....	116
6.	Literaturverzeichnis	118
7.	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	126
8.	Veröffentlichungen	128
9.	Danksagung	129

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schaubild zur Pathophysiologie der familiären hemiplegischen Migräne 1-3.	26
Abbildung 2: Graphische Darstellung der Untereinheiten eines spannungsgesteuerten Natriumionenkanals.	30

Abbildung 3: Inaktivierung eines spannungsgesteuerten Natriumionenkanals.	31
Abbildung 4: Ergebnis einer Genotypisierung des Scn1a-Gens aus Mausschwanzbiopsien.	42
Abbildung 5: Funktionsprinzip der Whole-Cell-Ableitung.....	45
Abbildung 6: Skizze zur Anfertigung der akuten Hirnschnitte.....	46
Abbildung 7: Skizzierung des Patch-Clamp-Messstandes für die Messung an akuten Hirnschnitten.	52
Abbildung 8: Beispiel einer experimentell ausgelösten Cortical Spreading Depression einer Pyramidenzelle.....	54
Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung zur Dauer einer experimentell ausgelösten Cortical Spreading Depression.	55
Abbildung 10: Versuchsablauf der Messungen im Multielektrodenarray an embryonalen wildtypischen bzw. heterozygoten Scn1a-L1649Q-mutierten Kulturen aus Hippocampusneuronen.	60
Abbildung 11: Beispielhafte Analyse einer zweiminütigen Messung zur Netzwerkaktivität einer primären hippocampalen Neuronenkultur.	61
Abbildung 12: Patch-Clamp-Messstand für die Untersuchung des Einflusses von Phrixotoxin-3 auf Nav1.1- und Nav1.2-Kanäle.....	65
Abbildung 13: Schwellenwert (ms) bis zur Auslösung einer CSD in kortikalen Pyramidenzellen von wildtypischen (schwarz, n= 5) und heterozygoten Scn1a-L1649Q-mutierten (rot, n= 8) Mäusen.....	72
Abbildung 14: Dauer (s) einer CSD in kortikalen Pyramidenzellen von wildtypischen (schwarz, n= 5) und heterozygoten Scn1a-L1649Q-mutierten (rot, n= 8) Mäusen.....	73
Abbildung 15: Amplitude [pA] der spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingänge bei kortikalen Pyramidenzellen von wildtypischen (WT, schwarz, n = 20) und heterozygoten (HET, rot, n = 10) Mäusen.....	74
Abbildung 16: Frequenz [Hz] der spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingänge bei kortikalen Pyramidenzellen von wildtypischen (WT, schwarz, n = 21) und heterozygoten (HET, rot, n = 10) Mäusen.....	75

Abbildung 17: Aufzeichnung von spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingängen kortikaler Pyramidenzellen bei wildtypischen (schwarz) und heterozygoten (rot) Mäusen verändert nach (Auffenberg et al., 2021).....	76
Abbildung 18: Aufzeichnung der Netzwerkaktivität von primären hippocampalen Neuronenkulturen von wildtypischen (schwarz, n = 23) und heterozygoten (rot, n = 20) Mäusen anhand der Gesamtanzahl an Spikes im Verlauf von 21 Tagen in vitro (DIV).	78
Abbildung 19: Anzahl an Populationsbursts.	79
Abbildung 20: Anzahl aller Spikes innerhalb von Populationsbursts in Prozent (%).	80
Abbildung 21: Mittlere Dauer eines Populationsbursts in Sekunden (s).	81
Abbildung 22: Zeitspanne zwischen zwei Populationsbursts in Sekunden (s)..	82
Abbildung 23: Mittlere Spitzenfeuerungsrate eines Populationsbursts in Hertz (Hz).	83
Abbildung 24: Kappa als Synchronizitätsparameter des Netzwerks.....	84
Abbildung 25: Stromdichte von Neuronen mit Nav1.1-Kanälen ohne Zugabe von Phrixotoxin-3 (schwarz, n= 13) und nach der Zugabe von Phr-3 in den Konzentrationen von 10 nM (grün, n= 7) und 100 nM (rot, n= 9).	86
Abbildung 26: Stromdichte von Zellen mit Nav1.2-Kanälen ohne Phrlixotoxin-3 (schwarz, n= 19) und nach der Zugabe von Phr-3 in den Konzentrationen von 10 nM (grün, n= 2) und 100 nM (rot, n= 12).	87
Abbildung 27: Aktivierungs- und Inaktivierungskurve von Nav1.1-Kanälen ohne Phr-3 (schwarz, n= 13) und nach Zugabe von Phr-3 in den Konzentrationen von 10 nm (grün, n= 7) und 100 nM (rot, n= 9, bei der Inaktivierung n= 8).	88
Abbildung 28: Aktivierungs- und Inaktivierungskurve von Nav1.2-Kanälen ohne Phr-3 (schwarz, n= 19) und nach Zugabe von Phr-3 in den Konzentrationen von 10 nM (grün, n= 2) und 100 nM (rot, n= 12, bei der Inaktivierung n= 10).....	89
Abbildung 29: Untersuchung des Einflusses von Phr-3 auf wildtypische (WT; schwarz, n = 11) und heterozygote (HET; rot, n = 15)	

Hippocampusneurone an den Tagen DIV 14 (A) und DIV 21 (B) anhand der Anzahl an Spikes.	92
Abbildung 30: Anzahl an Populationsbursts in Abhängigkeit der Konzentration [nM] an Phrixotoxin-3.	93
Abbildung 31: Anzahl aller Spikes innerhalb von Populationsbursts [%] in Abhängigkeit der Konzentration [nM] an Phrixotoxin-3.	94
Abbildung 32: Dauer eines Populationsbursts [ms] in Abhängigkeit der Konzentration [nM] an Phrixotoxin-3.	96
Abbildung 33: Interburstintervall [ms] in Abhängigkeit der Konzentration [nM] an Phrixotoxin-3.	97
Abbildung 34: Spitzenfeuerungsrate eines Populationsbursts [Hz] in Abhängigkeit der Konzentration [nM] an Phrixotoxin-3.	98
Abbildung 35: Kappa als Synchronizitätsparameter in Abhängigkeit der Konzentration [nM] an Phrixotoxin-3.	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genetik der familiären hemiplegischen Migräne nach (Freilinger and Dichgans, 2006).	22
Tabelle 2: Nomenklatur der humanen spannungsgesteuerten Natriumionenkanäle.	33
Tabelle 3: Protokoll zur Anfertigung eines 100 ml Vorrats an Lysepuffer.	40
Tabelle 4: Protokoll für einen 25 µl PCR-Ansatz.	41
Tabelle 5: Protokoll zur Anfertigung von 10 ml Intrazellulärlösung zur Messung einer CSD an akuten Hirnschnitten.	48
Tabelle 6: Protokoll zur Anfertigung von 10 ml Intrazellulärlösung zur Messung von spontanen postsynaptischen inhibitorischen Strömen an akuten Hirnschnitten.	48
Tabelle 7: Protokoll zur Anfertigung von 100 ml Extrazellulärlösung für die Messung an akuten Hirnschnitten.	48
Tabelle 8: Geräte- und Softwareliste für das Setup zur Messung an den akuten Hirnschnitten.	51
Tabelle 9: Herstellung einer Neurobasal plus Lösung (50 ml) als Nährmedium der Hippocampuskulturen.	58
Tabelle 10: Protokoll zur Anfertigung eines 250 ml Vorrats an Intrazellulärlösung für die Messung an den HEK-Zelllinien.	64
Tabelle 11: Protokoll zur Anfertigung eines 1000 ml Vorrats an Extrazellulärlösung für die Messungen an den HEK-Zelllinien.	65

Abkürzungen

6-tmS	Sechs transmembranöse Segmente
aCSF	künstliche Zerebrospinalflüssigkeit
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionisäure
APV	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATP1A2	<i>ATPase Na⁺/K⁺ transporting subunit alpha 2</i>
CACNA1A	<i>Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 A</i>
Ca _v	Spannungsgesteuerter Calciumionenkanal
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CSD	<i>Cortical Spreading Depression</i>
D1-D4	Domänen 1-4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DIV	Tage in vitro
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E17	Embryonaler Tag 17
E _c	Kommandopotential
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
E _m	Membranpotential
FHM	Familiäre hemiplegische Migräne
FKS	Fetales Kalbserum
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GEFS+	Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GTP	Guanosintriphosphat

HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HET	Heterozygote
HVA	<i>High Voltage Activated</i>
ICK	<i>Inhibitory Cysteine Knot</i>
IFM	Isoleucin-Phenylalanin-Methionin-Sequenz
KCl	Kaliumchlorid
Kir	Einwärtsgerichtete Kaliumkanäle
k_v	Steigungsfaktor
K_v	Spannungsgesteuerter Kaliumionenkanal
LVA	<i>Low Voltage Activated</i>
L-Typ	<i>Longlasting-Type</i>
M	Molar
MA	Migräne mit Aura
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
mBD	Mittlere Burstdauer
mIBI	Mittleres Interburstintervall
mPFR	Mittlere Spitzenfeuerungsrate
MEA	Multielektrodenarray
MO	Migräne ohne Aura
Na_v	Spannungsgesteuerter Natriumionenkanal
NBQX	6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
P14-P20	Postnatales Alter von 14 -20 Tagen
PB	Populationsbursts
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PB%	Prozentualer Anteil aller Spikes innerhalb von Populationsbursts
PCR	Polymerase Kettenreaktion

PDL	Poly-D-Lysin
Phr-3	Phrixotoxin-3
PRRT2	<i>Proline rich transmembrane protein 2</i>
R	Resistent
RB21	<i>Four-Repeat-Type Channel</i>
R _f	Rückkopplungswiderstand
Rpm	Umdrehungen pro Minute
R _s	Serienwiderstand
S	Sensibel
S1-S6	Segmente 1-6
S4	Viertes Segment
SCN1A	<i>Sodium channel protein type 1 subunit alpha</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SHM	Sporadische hemiplegische Migräne
SIDS	<i>Sudden Infant Death Syndrome</i>
sIPSC	Spontane inhibitorische postsynaptische Eingänge
SNAP-25	<i>synaptosomal-associated protein of 25 kDa</i>
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
TPC1	<i>Two Pore Segment Channel 1</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
T-Typ	<i>Transient-Type</i>
V _{1/2}	Spannung der halbmaximalen Aktivierung
VGSC	Spannungsgesteuerte Natriumionenkanäle
V _{rev}	Umkehrpotential
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Migräne

1.1.1. Prävalenz der Migräne

Die Migräne ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen und stellt weltweit das dritthäufigste Krankheitsbild dar (2018). In Europa sind 17% der Frauen und 8% der Männer von einer Migräne betroffen (Pietrobon and Moskowitz, 2013). Global gesehen leiden etwa 15% der Weltbevölkerung an einer Migräne (de Vries et al., 2009). Die Lebenszeitprävalenz für die Erkrankung an einer Migräne liegt bei etwa 18% (12% für Männer und 24% für Frauen) (Russell et al., 1995b). Eine Studie mit Schulkindern unterschiedlichen Alters konnte nachweisen, dass ein erster Prävalenzpeak bereits im Kindesalter auftritt. Die höchste Prävalenz liegt demnach bei Mädchen im Alter von 13 bis 14 Jahren und bei Jungen rund zwei Jahre früher (Abu-Arefeh and Russell, 1994). In der „*American migraine study*“ zeigte sich, dass die höchste Migräneprävalenz bei Männern und Frauen um das 40igste Lebensjahr liegt (Stewart et al., 1994). Etwa ein Drittel der Patient(inn)en, die an einer Migräne leiden, haben eine Migräne mit Aura (MA), wobei nicht jede Episode mit einer Aura einhergehen muss (Ferrari, 1998).

Eine dänische Studie konnte nachweisen, dass die Erkrankung an einer Migräne ohne Aura (MO) sowohl von genetischen Faktoren als auch von Umwelteinflüssen abhängt, während für die MA anscheinend ausschließlich oder vorwiegend genetische Faktoren relevant sind. Des Weiteren zeigte sich, dass Verwandte ersten Grades von MO-Betroffenen sowohl ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung an einer MO (1,9fach) als auch für die MA (1,4fach) besitzen. Bei Verwandten ersten Grades von MA-Patient(inn)en besteht lediglich ein erhöhtes Risiko an einer MA zu erkranken. Hierbei ist das Risiko jedoch deutlich höher (4fach) (Russell and Olesen, 1995). Dennoch handelt es sich bei der Migräne nicht um eine klassische Erbkrankheit im Sinne einer monogenen Vererbung, sondern um eine multifaktorielle oder genetisch komplexe Erkrankung (Freilinger

and Dichgans, 2006, Russell et al., 1995a). Eine Ausnahme hiervon stellt die familiäre hemiplegische Migräne (FHM), eine schwere und seltene Unterform der MA, dar, welche zwar genetisch heterogen (drei bekannte, ursächliche Gene) ist, bei der jedoch ein monogener Erbgang vorliegt (Freilinger and Dichgans, 2006).

Bei Migränepatient(inn)en besteht zudem eine erhöhte Komorbidität zu weiteren Erkrankungen des neuropsychiatrischen Formenkreises. Dazu zählen unter anderem die Epilepsie, ischämische Hirninfarkte, sowie affektive Störungen und Angststörungen (Ferrari, 1998).

1.1.2. Diagnosekriterien der Migräne

Die Diagnose einer Migräne richtet sich nach den Kriterien der „*International headache society (IHS)*“ und umfasst die im Folgenden beschriebenen Merkmale. Eine Migräne ist gekennzeichnet durch wiederkehrende, meist einseitige Kopfschmerzattacken von mittlerer bis hoher Intensität und einer pulsierenden Qualität. Körperliche Betätigung verschlimmert die Kopfschmerzen. Eine Kopfschmerzepisode kann von mindestens vier bis zu 72 Stunden anhalten. Die Episoden werden von einer Phonophobie, einer Photophobie sowie Übelkeit und/oder Erbrechen begleitet. Man unterscheidet zwischen einer Migräne ohne Aurasymptomatik (MO) und einer Migräne mit Aura (MA) (2018). Zur Diagnosestellung einer Migräne müssen mindestens zwei Attacken, welche die Diagnosekriterien einer MA oder fünf Attacken, welche die Kriterien einer MO erfüllen, aufgetreten sein (Lipton et al., 2004, 2018).

1.1.3. Pathomechanismus des Migräneschmerzes

Es gilt als wahrscheinlich, dass die Entstehung des Migränekopfschmerzes von der Aktivierung und Sensibilisierung afferenter Schmerzbahnen des Trigeminiernervs abhängt. Dieser innerviert im Gehirn insbesondere die Meningen und die großen Blutgefäße (Levy, 2010). Die Erregung meningealer Nozizeptoren soll demnach zur Aktivierung weiterer trigemino-vaskulärer Neuronen führen. Diese bewirken wiederum die Aktivierung verschiedener

Areale des Hirnstamms und des Gehirns, die letztlich den Migräneschmerz und andere weitere Symptome verursachen (Akerman et al., 2011). Die genauen Prozesse, und welche Strukturen noch beteiligt sind, bleiben jedoch weitestgehend unbekannt.

Die Dauer einer Migräneattacke scheint von einer neurogenen Entzündungsreaktion abhängig zu sein. So konnte nachgewiesen werden, dass während einer Episode vermehrt Neuropeptide wie Neurokinin A, Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) und Substanz P durch perivaskuläre trigeminale und parasympathische Fasern freigesetzt werden. Diese führen zu einer Vasodilatation benachbarter Gefäße, einer Plasmaextravasation, der Aktivierung von Mastzellen der Dura mater und zur Freisetzung von proinflammatorischen Faktoren wie Bradykinin und Protonen (Waeber and Moskowitz, 2005). Somit lässt sich auch die Effektivität der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) zur Akutbehandlung bei Migräneattacken erklären. Die Vermutung, dass insbesondere CGRP eine wichtige Rolle beim Migränekopfschmerz besitzt, wurde in weiteren Studien bekräftigt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von CGRP-Rezeptorantagonisten in der Behandlung von Migräne möglich ist (Olesen et al., 2004), und die intravenöse Gabe von CGRP bei Migränepatient(inn)en die Entstehung von Migräne-ähnlichen Kopfschmerzen begünstigt (Lassen et al., 2002). Diese Erkenntnisse führten dazu, dass 2018 mit Erenumab der erste monoklonale Antikörper gegen den CGRP-Rezeptor auf den Markt kam und mit Eptinezumab, Fremanezumab und Galcanezumab drei weitere Antikörper gegen CGRP selbst folgten (Diener H.-C., 2019).

1.1.4. Phänomenologie der Migräneaura

Unter einer Aura werden neurologische Symptomkomplexe verstanden, welche mindestens fünf Minuten anhalten und typischerweise innerhalb von wenigstens 60 Minuten vollständig reversibel sind, sich in der Regel vor der Kopfschmerzattacke manifestieren und meistens ebenfalls einseitig auftreten (Lipton et al., 2004, 2018). Die Aura tritt typischerweise schleichend auf, breitet sich über einer Region (beispielsweise Flimmern im rechten Gesichtsfeld) aus

und bildet sich langsam wieder zurück. Es werden Positivsymptome (z.B. nadelstichartige Parästhesien oder Flimmern) von Negativsymptomen (z.B. Paresen, Skotome oder Aphasie) unterschieden. Die häufigste Aura stellt das Flimmerskotom dar. Hierbei handelt es sich um eine blitzende, meist zickzackförmige visuelle Sensation, welche als Fortifikation bezeichnet wird. Diese tritt zentral in einem Gesichtsfeld auf und breitet sich langsam nach peripher aus. Nach Abklingen des Flimmerns verbleibt ein transienter Gesichtsfeldausfall (2018). Die Symptome der Aura können jedoch vielgestaltig sein. Sie umfassen insbesondere visuelle Störungen (99%) wie ein Flimmerskotom oder eine Hemianopsie. Es sind aber auch Störungen der Sensorik (31%) wie Hypästhesien, Parästhesien oder andersartige Dysästhesien, der Sprache (18%) wie einer Dysarthrie oder Aphasie und in seltenen Fällen auch der Motorik (6%) wie Paresen und Feinmotorikstörungen oder auch Koordinationsstörungen möglich (Ferrari, 1998, Russell and Olesen, 1996).

1.1.5. *Pathomechanismus der Migräneaura*

Bereits im Jahr 1944 gelang die Erstbeschreibung der sogenannten „*Cortical Spreading Depression*“ (*CSD*). Hierbei handelt es sich um eine kurzzeitige neuronale Übererregbarkeit, welche sich langsam über den Kortex ausbreitet und der eine langandauernde neuronale Inhibition folgt (Leao, 1947). Die *CSD* wird nicht nur bei der Migräne beschrieben, sondern auch in zahlreichen weiteren neurologischen Erkrankungen, wie beispielsweise bei Epilepsien, Hirntraumata, Schlaganfällen und subarachnoidalen Blutungen (Kramer et al., 2016). Obwohl das Phänomen der *CSD* bereits vor beinahe 80 Jahren beschrieben und seitdem zahlreiche Studien hierzu durchgeführt wurden, konnte der Pathomechanismus dieses Phänomens bis heute nicht gänzlich geklärt werden. Die sich über den Kortex ausbreitende Depolarisationswelle wandert mit einer Geschwindigkeit von etwa 3-5 mm/min und geht dann in eine Phase der neuronalen Inhibition über. Die Phase der Übererregbarkeit wird den Positivsymptomen der Aura, also beispielsweise der Fortifikation bei einem Flimmerskotom zugeschrieben, während die anschließende Zeitspanne der neuronalen Hemmung die

Negativsymptome, wie beispielsweise die Halbseitenlähmung der FHM erklären soll (Freilinger and Dichgans, 2006, Lauritzen, 1994). Die *CSD* besteht aus insgesamt drei Phasen. (i) Einer frühen Phase, in der die apikalen Dendriten bereits nahezu komplett depolarisiert sind, während das Soma nur teilweise depolarisiert wurde, (ii) einer Hauptphase, in der die gesamte Membran der Nervenzelle depolarisiert und (iii) einer späten Phase, in der ein Teil der Dendriten noch depolarisiert bleibt, während sich das Soma bereits in der Repolarisation befindet. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich die *CSD* in den apikalen Dendriten entwickelt und erst anschließend auf das Soma übergeht (Canals et al., 2005, Pietrobon and Moskowitz, 2014). Entsprechend der Veränderungen des Membranpotentials, zeigen sich auch Veränderungen der Ionenkonzentrationen im Extrazellularraum. Während der Entwicklung einer *CSD* kommt es zu einem raschen Anstieg der $[K^+]_e$ auf 30-60 mM, einem Abfall der $[Na^+]_e$ und $[Cl^-]_e$ auf 50-70 mM und einem Abfall der $[Ca^{2+}]_e$ auf 0,2-0,8 mM (Pietrobon and Moskowitz, 2014).

Die Entstehung einer *CSD* kann durch viele verschiedene Faktoren begünstigt werden. So sind sowohl eine gestörte Homöostase der Ionenkonzentrationen im Inneren und Äußeren der Zellen mit begleitender Störung der Ionengradienten über der Zellmembran als auch die Freisetzung von Neurotransmittern oder anderen Molekülen an der Entstehung einer *CSD* beteiligt (Pietrobon and Moskowitz, 2014). Bereits 1956 wurde ein Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration als möglicher Auslöser einer *CSD* vermutet (Grafstein, 1956), ein Faktor, der seitdem in zahlreichen Publikationen zur experimentellen Auslösung einer *CSD* genutzt wurde. Für die Beseitigung von K^+ -Ionen aus dem Extrazellularraum sind insbesondere die Gliazellen verantwortlich. Prädisponiert für eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration ist daher insbesondere der visuelle Kortex, da hier das geringste Verhältnis von Gliazellen zu Neuronen vorliegt. Hierdurch lässt sich auch das hohe Auftreten der visuellen Symptome einer Aura von nahezu 100% erklären (Ferrari, 1998).

Weitere Studien zeigten, dass die präsynaptischen Cav2.1-Kanäle eine entscheidende Rolle in der Fortleitung der *CSD* besitzen. Durch eine Blockierung

der Kanäle mittels Cd^{2+} oder Ni^{2+} kann die Fortleitung einer ausgelösten *CSD* verhindert werden (Jing et al., 1993, Footitt and Newberry, 1998). Zudem zeigten Versuche im Mausmodell einen reduzierten Schwellenwert zur Auslösung einer *CSD* bei Mutationen der $\text{Ca}_v2.1$ -Kanäle, die bei der FHM1 zu einem Funktionsgewinn führen (Tottene et al., 2009).

Andere Studien belegen, dass auch NMDA-Rezeptoren einen wesentlichen Anteil an der Entstehung und/oder der Weiterleitung einer *CSD* besitzen, wohingegen die AMPA-Rezeptoren keinen elementaren Einfluss an der *CSD* zu haben scheinen. Eine Blockade der NMDA-Rezeptoren kann selbst bei Erhöhung der Kaliumkonzentration weit über den Schwellenwert hinaus die Entstehung einer *CSD* verhindern. Demgegenüber hat eine Blockade der AMPA-Rezeptoren keinen nennenswerten Effekt (Marrannes et al., 1988, Lauritzen and Hansen, 1992).

Die $\text{Ca}_v2.1$ -Kanäle regulieren die Freisetzung von Glutamat, welches in der Folge als Transmitter für die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren fungiert. Dies legt nahe, dass auch Glutamat selbst eine tragende Rolle in der Entstehung der *CSD* besitzt (Marrannes et al., 1988). Das durch Glutamat eine *CSD* ausgelöst werden kann, wurde erstmals 1959 beschrieben. Neben L-Glutaminsäure und D-Glutaminsäure konnten auch L-Asparagin und L-Asparaginsäure eine *CSD* auslösen (Van Harreveld, 1959).

Zuletzt haben auch die Astrozyten einen Einfluss auf die *CSD*, da sie für die Beseitigung der Kaliumionen und des Glutamats aus dem synaptischen Spalt zuständig sind. Kommt es zu einem Übergewicht in der Freisetzung der Moleküle gegenüber der Beseitigung, kann dies demnach zur Entstehung einer *CSD* beitragen, wie es beispielsweise bei der FHM2 der Fall ist, bei der es durch unterschiedliche Mutationen zu einer gestörten Funktionalität der Na^+/K^+ -ATPase auf Astrozyten kommt, wodurch zum einen der Austausch von Kalium nach intrazellulär und Natrium nach extrazellulär und zum anderen der Abtransport von Glutamat aus dem synaptischen Spalt beeinträchtigt wird (Leo et al., 2011).

Der exakte Ablauf und die Konstellation, in der letztlich eine *CSD* verursacht wird, ist dennoch ungeklärt. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass es erst unter

bestimmten Zellstressbedingungen (z.B. Infekte, Fieber, körperliche Belastung oder Elektrolytstörungen) zu einer Veränderung des physiologischen Elektrolytgleichgewichts kommt und Patient(inn)en mit einer Beeinträchtigung in einer der oben genannten, an der Entstehung oder Weiterleitung einer CSD beteiligten Mechanismen, eine Prädisposition hierfür besitzen (Freilinger and Dichgans, 2006).

1.1.6. *Familiäre hemiplegische Migräne*

Die familiäre hemiplegische Migräne (FHM) stellt eine spezielle Unterform der MA dar. Die FHM ist bislang die einzige Migräneerkrankung mit einer monogenen autosomal-dominanten Vererbung, wenn gleich auch bei anderen monogen vererbten Erkrankungen wie einigen zerebro-vaskulären Erkrankungen eine MA gehäuft beobachtet werden kann. So leiden beim CADASIL („*Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*“) etwa die Hälfte der Betroffenen unter einer MA, welche häufig das Erstsymptom der Erkrankung darstellt (Freilinger, 2014, de Boer et al., 2020)

Die FHM erfüllt die Kriterien einer typischen MA mit visuellen, sensorischen und/oder sprachlichen Ausfallerscheinungen und zeichnet sich durch das zusätzliche Auftreten reversibler Halbseitenlähmungen aus. Aufgrund des autosomal-dominanten Erbgangs muss zur Diagnosestellung mindestens ein Verwandter 1. oder 2. Grades von der FHM betroffen sein (2018). Ein weiterer Unterschied zur typischen MA besteht in der Dauer der Aurasymptomatik, welche für gewöhnlich nicht länger als 60 Minuten andauert. Bei der FHM kann diese stattdessen auch Tage oder sogar Wochen anhalten. Zwischen zwei Anfällen können mehrere Jahre vergehen (Freilinger and Dichgans, 2006).

Die FHM tritt häufig bereits in der Kindheit auf. Die Erkrankung kann aber auch erst im Erwachsenenalter manifest werden (Freilinger and Dichgans, 2006). Schwere Komplikationen wie hohes Fieber, epileptische Anfälle oder Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma sind möglich. Auch basiläre

Symptome (also Hirnstammsymptome) im Sinne einer Dysarthrie, eines Schwindels, sowie bilateraler sensibler oder motorischer Defizite stellen eine häufige Begleitsymptomatik (69%) dar und treten oft erst im Anschluss an die typischen Aurasymptome auf (Russell and Ducros, 2011, Thomsen et al., 2002).

Eine Sonderform der FHM bildet die FHM plus, bei der es zusätzlich zu den Episoden zu einer Kleinhirnatrophie mit Augenbewegungsstörungen, sowie Gang- und Standataxie kommen kann. Eine Kleinhirntaxie tritt bei bis zu 20% der FHM-Betroffenen auf. Neben der familiär vererbten FHM ist auch ein sporadisches Auftreten der hemiplegischen Migräne (SHM) beschrieben, welche jedoch einen eigenständigen Subtyp darstellt (2018).

Im Gegensatz zur MA im Allgemeinen stellen die FHM und die SHM eine sehr seltene Erkrankung mit jeweils nur etwa 200 betroffenen Familien dar (Russell and Ducros, 2011).

1.1.7. Genetik der familiären hemiplegischen Migräne

Bislang wurden drei ursächliche Gene der FHM gefunden. Es ist allerdings von weiteren Genen auszugehen, da die bereits entdeckten Mutationen der drei Gene nur bei etwa 70% der FHM-Betroffenen vorkommen. Alle drei Gene kodieren für Proteine, die auf unterschiedliche Weise an dem Ionentransport über die Zellmembran beteiligt sind. Demnach handelt es sich bei der FHM um eine Kanalopathie. Die entsprechenden Mutationen betreffen dabei ausschließlich Aminosäuren innerhalb der Domänen zur Bildung der Pore oder innerhalb des Spannungssensors (Freilinger and Dichgans, 2006).

Tabelle 1: Genetik der familiären hemiplegischen Migräne nach (Freilinger and Dichgans, 2006).

Subtyp	Gen	Genprodukt	Lokus	Effekt	Häufigkeit
FHM1	CACNA1A	Spannungsabhängiger neuronaler Ca ²⁺ -Kanal	19p13	„Gain-of-function“	>50%

FHM2	<i>ATP1A2</i>	Astrozytäre ATP-abhängige Na ⁺ /K ⁺ -Pumpe	1q21-23	„Loss-of-function“	10-20%
FHM3	<i>SCN1A</i>	Spannungsabhängiger neuronaler Na ⁺ -Kanal	2q24	„Gain-of-function“	Wenige Familien

In Tabelle 1 werden die drei unterschiedlichen Subtypen mit ihren jeweils betroffenen Genen und deren jeweiligen Genprodukten zusammen mit der Häufigkeit des Vorkommens aufgeführt. In Abbildung 1 (siehe unten) werden die pathophysiologischen Folgen der Genmutationen der drei FHM-Subtypen dargestellt.

CACNA1A war das erste Gen, das als ursächlich für die Erkrankung identifiziert werden konnte (Ophoff et al., 1996). Mit über 50% ist es zugleich das häufigste betroffene Gen der FHM. Es befindet sich auf dem Chromosom 19p13 und kodiert für einen im zentralen Nervensystem prä- und postsynaptisch vorkommenden, spannungsabhängigen P/Q-Typ-Kalziumkanal (Ophoff et al., 1996, Joutel et al., 1993, Westenbroek et al., 1995). Ein *gain-of-function* führt hierbei zu einem gesteigerten präsynaptischen Ca²⁺-Einstrom mit erhöhter postsynaptischer Glutamatfreisetzung (Tottene et al., 2009, Tottene et al., 2002). Bei FHM plus-Erkrankten mit einhergehender Kleinhirnatrophie konnten ausschließlich Mutationen auf diesem Gen festgestellt werden (Terwindt et al., 1996). Mittlerweile wurden für dieses Gen bereits mehr als 30 unterschiedliche Mutationen entdeckt, bei denen es sich zumeist um *Missense*-Mutationen handelt. In 40% der Fälle kommt es dabei an Position 666 zu einem Austausch von Threonin zu Methionin (Russell and Ducros, 2011). Insbesondere bei der FHM1 kommt es zu schweren Attacken (bis zu 30%), die mit einem Koma einhergehen können. Diese wird häufig von einer Halbseitenlähmung (80%), Fieber (47%) und Meningismus (16%) begleitet. Die Symptome können Tage bis hin zu Wochen anhalten. In 8% der Fälle treten zusätzlich epileptische Anfälle auf. Selten können derartig schwere Attacken zu dauerhaften Hirnschäden, Hirnatrophie und bis hin zum Tod führen. Die *S218L*-Mutation scheint hierbei das höchste Risiko schwerer, insbesondere Trauma-assoziiierter Attacken mit

Hirnödem zu bieten (Russell and Ducros, 2011, Kors et al., 2001, Stam et al., 2009).

ATP1A2 wurde als zweites Gen entdeckt und ist somit ursächlich für die Entstehung der FHM2 (De Fusco et al., 2003). Es kodiert für eine $\alpha 2$ -Untereinheit einer Na^+/K^+ -ATPase, die vorwiegend von Astrozyten exprimiert wird. *ATP1A2* wird aber nicht nur im ZNS, sondern ebenfalls in der Muskulatur und im Fettgewebe gebildet (Freilinger and Dichgans, 2006). Ursächlich bei der FHM2 ist ein *loss-of-function* der Na^+/K^+ -ATPase von Astrozyten. Dieser führt zu einer Beeinträchtigung eines astrozytären Glutamattransporters, wodurch es zu einem verminderten Abtransport von Glutamat aus dem synaptischen Spalt kommt. Zudem entsteht eine erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration, welche zusätzlich die Entstehung einer CSD begünstigt (Tavraz et al., 2008). Bislang konnten mehr als 50 Mutationen entdeckt werden. Auch hier handelt es sich überwiegend um *Missense*-Mutationen. Es konnten aber auch vereinzelt Mutationen des Stoppkodons sowie Deletionen als Auslöser ermittelt werden. Anders als bei der FHM1 gibt es bei der FHM2 nur selten Anzeichen zerebellärer Schädigungen. Allerdings wurde ebenso wie bei der FHM1 ein gehäuftes Auftreten von epileptischen Anfällen beschrieben. Vereinzelt konnte bei Betroffenen verschiedener Familien eine mentale Retardierung beobachtet werden (Leo et al., 2011).

Als drittes und bislang letztes ursächliches Gen für die FHM konnte 2005 das *SCN1A*-Gen auf dem Chromosom 2q24 identifiziert werden. Hierbei wurden drei betroffene Familien, bei denen sowohl im *CACNA1A*-Gen als auch im *ATP1A2*-Gen keine Mutation festgestellt werden konnte, einer umfangreichen Genanalyse unterzogen. Bei allen drei Familien konnte eine *Gln1489Lys*-*Missense*-Mutation auf dem *SCN1A*-Gen nachgewiesen werden. Bis zu dieser Untersuchung wurden Mutationen dieses Gens insbesondere mit der Entstehung von Epilepsien in Verbindung gebracht. Darunter die generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus (GEFS+) und die schwere infantile myoklonische Epilepsie (Dichgans et al., 2005). Mittlerweile konnten weitere Mutationen für die FHM3 entdeckt werden, welche eine alleinige FHM (*L1649Q* und *Q1489K*), aber auch begleitende epileptische Anfälle (*L263V* und *T1174S*) sowie rezidivierende Attacken

vorübergehender Blindheit (*Q1489H* und *F1499L*) verursachen können (Cestele et al., 2013). Das *SCN1A*-Gen kodiert für eine α -Untereinheit eines spannungsgesteuerten Natriumionenkanals ($\text{Na}_v1.1$), welcher auf inhibitorischen Interneuronen exprimiert wird.

Ein etabliertes Gen für eine FHM4 wurde bislang nicht identifiziert, allerdings wird hieran weiter intensiv geforscht und es wurden bereits einige potentielle Kandidaten diskutiert (Kumar et al., 2022). Zuletzt wurde das Gen *PRRT2* als ein mögliches weiteres ursächliches Gen einer FHM diskutiert. Dieses kodiert für ein Protein, das mit SNAP-25 („*synaptosomal-associated protein of 25 kDa*“) interagiert und hierüber die Funktion spannungsgesteuerter Calciumkanäle beeinflussen könnte. Eine Studie, die kürzlich veröffentlicht wurde, konnte in 12 von 163 Probanden mit einer FHM ohne Nachweis einer Mutation in den bislang bekannten oben beschriebenen Genen Mutationen im *PRRT2*-Gen nachweisen. Zudem konnten in 105 von 697 FHM-Patient(inn)en Mutationen nachgewiesen werden, von denen 17% Mutationen im *PRRT2*-Gen aufwiesen (Kumar et al., 2022, Riant et al., 2022). Ein weiteres potentielles Gen stellt *SLC1A3* dar, welches für den exzitatorischen Aminosäuretransporter 1 (EAAT1) kodiert, der an der Beseitigung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt beteiligt ist (Kovermann et al., 2017).

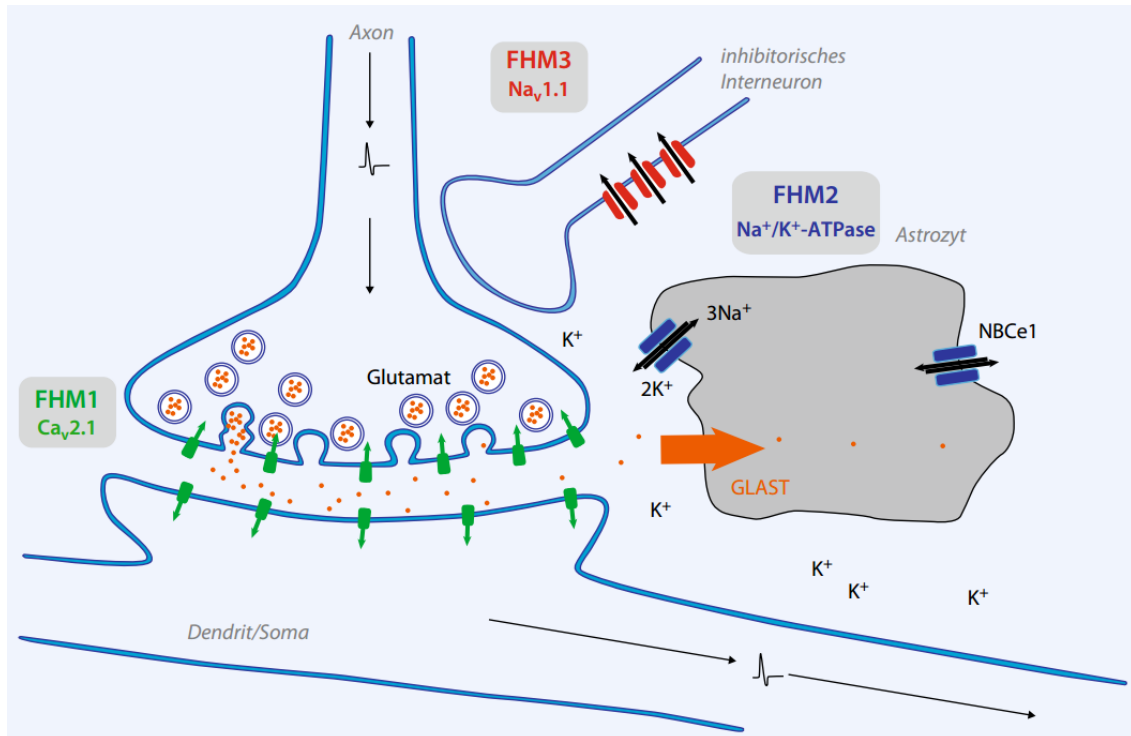


Abbildung 1: Schaubild zur Pathophysiologie der familiären hemiplegischen Migräne 1-3.

Dargestellt sind eine zentrale prä- und postsynaptische Einheit mit einem benachbarten Astrozyten und einem inhibitorischen Interneuron. Die Synapse beinhaltet die genetisch veränderten $Ca_v2.1$ -Kanäle der FHM1 (grün), welche zu einem gesteigerten Calciumeinstrom und einer erhöhten Glutamatfreisetzung (orange) führen. In dem angrenzend dargestellten Astrozyten sind die veränderten Na^+/K^+ -ATPasen der FHM2 (blau) eingezeichnet, die den Abtransport von Glutamat aus dem synaptischen Spalt über den Glutamattransporter GLAST (orange) beeinträchtigen und zu einer gesteigerten extrazellulären Kaliumkonzentration führen. Die bei der FHM3 betroffenen $Nav1.1$ -Kanäle (rot) sind in dem inhibitorischen Interneuron dargestellt. Abbildung aus (Freilinger and Dichgans, 2013).

1.1.8. Akuttherapie und Prophylaxe der Migräne

Bei der Migräne kann zwischen einer Akuttherapie während einer Episode und einer Prophylaxe zur Vermeidung von Episoden unterschieden werden. Eine prophylaktische Therapie ist bei Migränepatient(inn)en indiziert, die mindestens drei Episoden pro Monat erleiden müssen (H.-C. Diener, 2018). Weitere mögliche

Indikationen stellen schwere therapierefraktäre Attacken bzw. ein schlechtes Ansprechen auf die Akuttherapie dar. Die Erstlinientherapie für eine Prophylaxe beinhaltet die β -Blocker Propranolol oder Metoprolol, den Calciumkanalblocker Flunarizin, die Antikonvulsiva Valproat oder Topiramid sowie das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin (Pietrobon, 2003, H.-C. Diener, 2018). Für die prophylaktische Therapie der chronischen Migräne besteht zudem eine Zulassung für OnabotulinumtoxinA (R. Ruscheweyh, 2018). 2018 kam mit Erenumab der erste monoklonale Antikörper gegen den CGRP-Rezeptor auf den Markt. Seitdem folgten mit Eptinezumab, Fremanezumab und Galcanezumab drei Antikörper gegen CGRP selbst. Diese Substanzen sind zur Behandlung der episodischen (≥ 4 Migränetage/Monat) und chronischen Migräne ab 4 Migränetagen pro Monat zugelassen. In der Praxis werden diese Medikamente jedoch erst eingesetzt, sofern es zu einem Versagen der o.g. Erstlinientherapie im Sinne einer fehlenden Wirksamkeit, dem Auftreten von Nebenwirkungen oder dem Bestehen von Kontraindikationen kommt (Diener H.-C., 2019).

In der Akuttherapie stellen weiterhin die Triptane die effektivste Therapie dar. Diese können subcutan, oral, nasal und rektal appliziert werden. Die subcutane Anwendung zeigt hierbei mit etwa zehn Minuten den schnellsten Wirkungseintritt (Ferrari, 1998). Bei mildereren Kopfschmerzen können auch NSAR eingesetzt werden. Den stärksten Effekt zeigen hierbei ASS und Ibuprofen (H.-C. Diener, 2018).

Im Hinblick auf die Aurasymptome zeigen die Standardtherapeutika hingegen keine Wirkung. In einer Patient(inn)enstudie konnte jedoch eine deutliche Reduktion des Auftretens einer Migräneaura unter der Therapie mit Lamotrigin nachgewiesen werden (Lampf, 2005). Im Hinblick auf die hemiplegische Migräne konnte ein möglicher Nutzen einer intranasalen Applikation des NMDA-Rezeptorantagonisten Ketamin gezeigt werden (Afridi et al., 2013, Kaube et al., 2000).

1.2. Ionenkanäle

Ionenkanäle bilden die Basis für viele verschiedene Prozesse innerhalb einer Zelle und zur Vernetzung zwischen den Zellen. Der Transport von Ionen über die lipophile Zellmembran erfolgt mittels spezifischer transmembranöser Transportproteine entlang eines elektrochemischen Gradienten. Allgemein kann man zwischen Ionenkanälen und Ionenpumpen unterscheiden. Ionenkanäle transportieren die Ionen passiv entlang ihres Konzentrationsgefälles über die Membran. Bei Ionenpumpen werden die Ionen unter Hydrolyse von ATP aktiv entgegen ihres Gradienten transportiert (Gouaux and Mackinnon, 2005). Die wichtigste Ionenpumpe ist die Natrium-Kalium-ATPase. Diese bewahrt durch den Austausch von drei Natriumionen aus dem Zellinneren gegen zwei Kaliumionen des Extrazellularraums, das für das Ruhemembranpotential benötigte elektrochemische Konzentrationsgleichgewicht (Apell et al., 2017).

Ionenkanäle unterscheiden sich durch ihre Selektivität für bestimmte Ionen und in ihrem Aktivierungsmechanismus. Es gibt zwei wichtige Ionenkanalgruppen. Die erste Gruppe bilden die spannungsgesteuerten Ionenkanäle. Diese Kanäle werden durch eine Depolarisation der Zellmembran aktiviert und sind bei der Initiierung, Weiterleitung und Beendigung von Aktionspotentialen bedeutsam (Bastug and Kuyucak, 2012). Für die Initiierung der Aktionspotentiale sind insbesondere die spannungsgesteuerten Natrium-Ionenkanäle und Calcium-Ionenkanäle von Bedeutung. Demgegenüber sind die spannungsgesteuerten Kalium-Ionenkanäle für die Rückführung der Spannungsänderung zum Ruhemembranpotential relevant (Catterall et al., 2017). Die zweite Gruppe von Ionenkanälen umfasst die ligandengesteuerten Ionenkanäle. Diese werden durch die Bindung von spezifischen Molekülen aktiviert und sind bei der Signaltransduktion von Bedeutung (Bastug and Kuyucak, 2012). Neben diesen beiden Formen der Aktivierung von Ionenkanälen gibt es weitere Mechanismen. Beispiele sind die Vermittlung über *second messenger*, Licht oder Temperaturveränderungen (Kim, 2014).

Ionenkanäle können sich in drei verschiedenen Zuständen befinden. Beim geöffneten Zustand im Anschluss an die Aktivierung ist ein Ionenfluss über die

Membran möglich. Beim geschlossenen Zustand können die Ionenkanäle aktivierbar oder inaktivierbar sein. In der aktivierbaren Phase führt eine Spannungsänderung oberhalb eines Schwellenwerts zur Öffnung der Ionenkanäle. Ein inaktivierbarer Zustand liegt während der Refraktärzeit vor. Hierbei kann selbst ein Reiz oberhalb des Schwellenwerts keine Öffnung der Ionenkanäle bewirken (Hodgkin and Huxley, 1952).

1.2.1. Aufbau und Funktion spannungsgesteuerter Natriumionenkanäle

Die meisten Ionenkanäle bestehen aus mehreren Proteinuntereinheiten. Einige Ionenkanäle besitzen dagegen nur ein einziges Protein. Die Proteinuntereinheiten werden durch verschiedene Gene kodiert, wodurch sich das Risiko zur Entstehung einer Fehlbildung erhöht. Bislang sind über 400 Gene bekannt, die für Ionenkanäle kodieren (Kim, 2014).

Abbildung 2 zeigt den Aufbau der spannungsgesteuerten Natriumionenkanäle (VGSC). Die VGSC bestehen aus einer 260 kDa schweren α -Untereinheit und einer oder mehreren β -Untereinheiten (β 1, β 2 und/oder β 3) mit je 33-36 kDa. Diese dienen der Funktionsmodulierung des Kanals. Die α -Untereinheit besteht aus vier porenbildenden homologen Domänen (D1 bis D4), die ihrerseits aus sechs α -helikalen transmembranösen Segmenten (S1 bis S6) bestehen. Die Domänen sind über große intrazelluläre Aminosäureketten verbunden, während die einzelnen Segmente über kleinere extra- und intrazelluläre Aminosäureketten verbunden sind (Catterall, 2000, Plummer and Meisler, 1999).

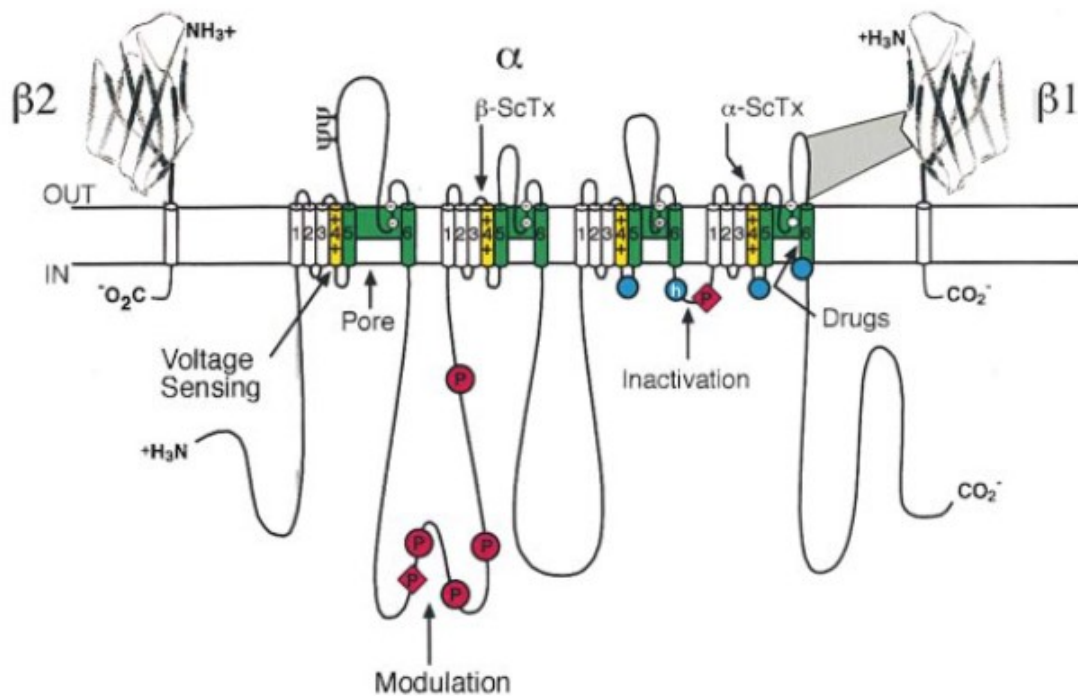


Abbildung 2: Graphische Darstellung der Untereinheiten eines spannungsgesteuerten Natriumionenkanals.

Hier ist die α -Untereinheit des $\text{Na}_v1.2$ -Kanals zusammen mit den $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Untereinheiten abgebildet. Die β -Untereinheiten besitzen im Inneren der Zelle (IN) eine endständige Carboxylgruppe und außerhalb der Zelle (OUT) eine endständige Aminogruppe. Ihre Immunglobulin-ähnliche Faltung interagiert mit den Aminosäureketten der α -Untereinheit. Die α -Untereinheit besteht aus vier homologen Domänen (D1 bis D4) mit jeweils sechs transmembranösen Segmenten (S1 bis S6). Die Segmente sind über intrazelluläre und extrazelluläre Aminosäureketten verbunden. Die Domänen sind über wesentlich längere intrazelluläre Aminosäureketten verbunden. Die S4-Segmente der Domänen bilden mit ihren positiv geladenen Aminosäuren den Spannungssensor des Kanals (gelb), während die S5- und S6-Segmente für die Porenbildung zuständig sind (grün). Die extrazellulären P-Schleifen zwischen S5 und S6 fungieren als Filter für die Ionenselektivität. Die intrazelluläre Aminosäurekette zwischen D3 und D4 beinhaltet die Isoleucin-Phenylalanin-Methionin-Sequenz (IFM), welche für die schnelle Inaktivierung entscheidend ist. Abbildung aus (Yu and Catterall, 2003).

Das vierte Segment (S4) einer jeweiligen Domäne fungiert als Spannungssensor und beinhaltet eine positiv geladene Aminosäure (Lysin oder Arginin) an jeder

dritten Position. Eine eintreffende Depolarisation führt zu einer Aktivierung mit folgender Auswärtsbewegung der S4-Segmente und bewirkt so die Öffnung des Kanals (Kruger and Isom, 2016, Payandeh et al., 2011). Eine Reduktion an positiven Ladungen des S4-Segments führt zu einer Verschiebung der Aktivierbarkeit hin zu höheren Spannungspotentialen (Stuhmer et al., 1989).

Eine Schleife zwischen D3 und D4 beinhaltet eine Isoleucin-Phenylalanin-Methionin-Sequenz (IFM). Diese ist für die schnelle Inaktivierung des Kanals zuständig. Hierbei kommt es, wie in Abbildung 3 dargestellt, durch eine Umlagerung der Sequenz von innen zum Verschließen der noch geöffneten Pore. 1989 konnte gezeigt werden, dass durch die Antikörperblockade eines intrazellulären Segments zwischen D3 und D4 die Schließung des Kanals deutlich verlangsamt wird. Eine Blockierung im inaktivierten Zustand des Kanals blieb dagegen folgenlos (Vassilev et al., 1989). Eine weitere Studie von 1989 zeigte, dass durch eine Unterbrechung der Schleife zwischen D3 und D4 die Inaktivierungsrate stark reduziert wird (Stuhmer et al., 1989). Spätere Studien zeigten, dass insbesondere Mutationen der IFM zu einer Beeinträchtigung oder einem Fehlen der Inaktivierbarkeit des Kanals führen (West et al., 1992).

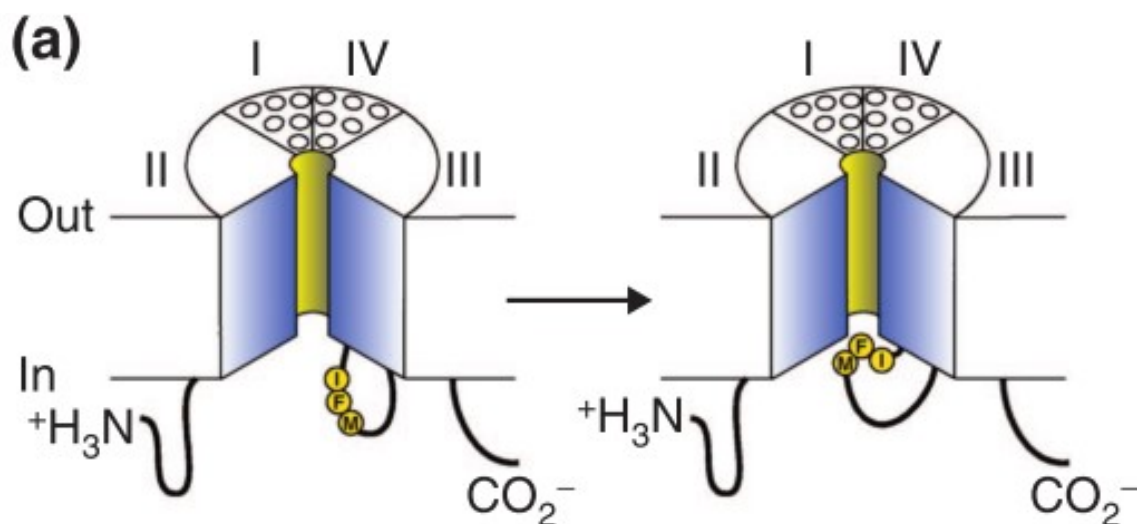


Abbildung 3: Inaktivierung eines spannungsgesteuerten Natriumkanals.

Hier ist ein VGSC mit den vier Domänen (I-IV) abgebildet, die im Zentrum gemeinsam eine Pore ausbilden. Links ist der Kanal im geöffneten Zustand und rechts im

inaktivierten Zustand dargestellt. Bei der aktivierten Form befindet sich die intrazelluläre Schleife zwischen D3 und D4 außerhalb der Kanalöffnung (links), bei der inaktivierten Form legt sich die Schleife mit ihrer IFM vor die innere Pore und inaktiviert dadurch den Kanal. Abbildung aus (Yu and Catterall, 2003).

Zwischen S5 und S6 der jeweiligen Domänen wird eine extrazelluläre Schleife ausgebildet, welche teilweise innerhalb der Zellmembran verläuft (P-Schleife). Zusammen bilden die vier P-Schleifen in der Nähe der äußeren Pore einen Ring aus Glutamat. Dieser Ring ist für die Ionenselektivität zuständig und ist bevorzugt für hydratisierte Natriumionen durchlässig (Kruger and Isom, 2016, Payandeh et al., 2011). Studien konnten eine Sequenz von überwiegend negativ geladenen Aminosäuren an identischen Positionen in allen vier Domänen nachweisen. Diese Aminosäuren bilden innerhalb der Kanäle einen inneren und äußeren Ring, die ebenfalls als Selektionsfilter für Ionen dienen sollen. Eine Untersuchung zeigte, dass bei Veränderungen der Aminosäuresequenz des inneren Rings innerhalb aller vier Domänen (DEKA zu EEEE) eine Umwandlung der Natriumselektivität hin zu einer Calciumselektivität bewirkt werden kann und bekräftigt somit diese Vermutung (Catterall, 2000, Heinemann et al., 1992).

1.2.2. Nomenklatur spannungsgesteuerter Natriumionenkanäle

Wie in Tabelle 2 aufgeführt, konnten bislang zehn unterschiedliche VGSC (Nav1.1 bis Nav1.9 und Nav_x) und fünf β -Proteine (β 1-4 und β 1B) nachgewiesen werden. Diese werden von den Genen *SCN(X)A* und *SCN1B* bis *SCN4B* kodiert (Kruger and Isom, 2016). Das β 1-Gen befindet sich auf dem Chromosom 19q13, wogegen die Gene von β 2 und β 3 auf dem Chromosom 11q22-23 lokalisiert sind (Yu and Catterall, 2003). Der Index „Nav“ resultiert aus dem chemischen Symbol des Ions, für welches der Ionenkanal durchlässig ist (Natrium/Na) und dem Regulationsmechanismus zur Öffnung des Kanals (*spannungsgesteuert/voltage gated*). Die erste Zahl hinter dem Index gibt die Unterfamilie des Genes an. Bei den VGSC gibt es nur eine einzige Unterfamilie (Nav1). Die Zahl, die der Dezimalstelle folgt, bezeichnet die spezielle Isoform des Kanals und wurde nach

der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert (Nav1.1 bis Nav1.9). Der Kleinbuchstabe im Anschluss einer Zahl steht für die Splicevariante einer Isoform (Bsp. Nav1.1a). Die Isoformen der neun spannungsgesteuerten Natriumionenkanäle (Nav1.1 bis Nav1.9) gleichen sich in ihrer Aminosäuresequenz in über 50% (Catterall et al., 2005).

Tabelle 2: Nomenklatur der humanen spannungsgesteuerten Natriumionenkanäle.

TTX = Tetrodotoxin, S = Sensibel, R = Resistent. Verändert nach (Ogata and Ohishi, 2002, Catterall et al., 2005).

Isoform	Gen	Chromosom	TTX-Sensibilität	Primärgewebe
Nav1.1	SCN1A	2q24	S	ZNS, Herzmuskel
Nav1.2	SCN2A	2q23-24	S	ZNS
Nav1.3	SCN3A	2q24	S	Embryonales ZNS
Nav1.4	SCN4A	17q23-25	S	Skelettmuskel
Nav1.5	SCN5A	3p21	R	Herzmuskel
Nav1.6	SCN8A	12q13	S	ZNS, PNS, Gliazellen
Nav1.7	SCN9A	2q24	S	Schwanzzellen, Spinalganglien, Neuroendokrine Zellen
Nav1.8	SCN10A	3p22-24	R	Spinalganglien
Nav1.9	SCN11A	3p21-24	R	Spinalganglien
Nav	SCN6A/SCN7A	2q21-23	R	PNS, Uterus, Herzmuskel, Gliazellen

Die Gene zur Kodierung der α -Untereinheiten befinden sich auf vier verschiedenen Chromosomen. Die Gene von Nav1.1 bis Nav1.3, sowie Nav1.7 sind auf dem zweiten Chromosom lokalisiert. Diese Kanäle sind sich in ihrer Sequenz, ihren physikalischen Eigenschaften, ihrem Expressionsmuster und

ihrer hohen Sensibilität für das Gift Tetrodotoxin (TTX) sehr ähnlich. Die zweite Gruppe bilden die Isoformen Nav1.5, Nav1.8 und Nav1.9, welche sich allesamt auf dem dritten Chromosom befinden. Alle drei Isoformen besitzen im Vergleich zur ersten Gruppe eine erhöhte Resistenz gegenüber dem TTX (mikromolarer Bereich). Diese kommt durch einen einzigen Aminosäureaustausch innerhalb der ersten Domäne zustande. Die Isoformen Nav1.4 (Chromosom 17) und Nav1.6 (Chromosom 12) zeigen mit einer Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von bis zu 85% eine ausgesprochen hohe Ähnlichkeit zu den Isoformen des zweiten Chromosoms. Dies zeigt sich auch in ihrer hohen Sensibilität gegenüber dem TTX im nanomolaren Bereich. Die Sequenz von Nav1.7 entspricht den anderen neun Isoformen in etwa 50% ihrer Aminosäuresequenz, besitzt aber wesentliche Unterschiede in den Bereichen des Spannungssensors, des Inaktivierungstors und der Kanalöffnung. Dies lässt die Vermutung zu, dass dieser Kanal kein reiner spannungsgesteuerter Ionenkanal und eventuell nicht ausschließlich für Natriumionen permeabel ist. Allerdings befinden sich die Gene für diesen Kanal ebenfalls auf dem zweiten Chromosom und sind mit den Aminosäuresequenzen der anderen Kanäle auf diesem Chromosom zu über 50% identisch (Goldin et al., 2000).

1.2.3. Expressionsmuster und Kanalopathien spannungsgesteuerter Natriumionenkanäle

Die β -Untereinheiten der Ionenkanäle dienen als Funktionsmodulatoren der α -Untereinheiten. Die β 1- und β 2-Untereinheiten sind bei der postnatalen Entwicklung des Gehirns entscheidend und werden insbesondere im adulten Gehirn exprimiert. Die β 1B- und β 3-Untereinheiten sind insbesondere bei der embryonalen Entwicklung des Gehirns relevant. Die Expression nimmt mit zunehmender postnataler Entwicklung des Gehirns ab, während deren Expression im Herzen noch bis ins Erwachsenenalter persistiert. Über das Expressionsmuster der β 4-Untereinheit ist bislang nur wenig bekannt (O'Malley and Isom, 2015).

Entsprechend dem Expressionsmuster der VGSC in zahlreichen erregbaren Geweben (siehe Tabelle 2) können auch entsprechende Funktionsstörungen weitreichend sein. Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 und teilweise auch Nav1.6 werden im ZNS exprimiert. Mutationen dieser Kanäle besitzen daher eine hohe Relevanz bei der Entstehung von verschiedenen Epilepsien wie der GEFS+ (Wallace et al., 1998, Escayg et al., 2000) und der schweren frühkindlichen myoklonischen Epilepsie, dem Dravet-Syndrom (Claes et al., 2001, Marini et al., 2011). Dabei können sowohl Mutationen der α -Untereinheiten als auch der β -Untereinheiten ursächlich sein. Alleine für das *SCN1A*-Gen wurden bereits über 1200 ursächliche Mutationen identifiziert (Kruger and Isom, 2016).

Für das *SCN4A*-Gen das für Nav1.4 der Skelettmuskulatur kodiert, sind mehr als 40 verschiedene Mutationen bekannt (Savio-Galimberti et al., 2012). Diese können zur Entstehung einer Paramyotonia congenita oder einer hypokaliämischen periodischen Paralyse führen, die periodisch auftretende Attacken von Muskelschwäche hervorrufen (Catterall, 2000).

Nav1.5 ist für die Initiierung des kardialen Aktionspotentials zuständig. Demnach können Mutationen dieses Kanals unterschiedliche kardiale Erkrankungen hervorrufen. Die relevantesten kardialen Erkrankungen, bei denen eine Mutation des *SCN5A*-Gens zugrunde liegen, sind das Long-QT-Syndrom (5-10%) und das Brugada-Syndrom (20%). Dabei kann es zu paroxysmalen ventrikulären Tachykardien kommen. Allerdings sind viele weitere Herzerkrankungen mit *SCN5A*-Mutationen assoziiert. Dazu zählen die dilatative Kardiomyopathie, das Sick-Sinus-Syndrom und das *sudden infant death syndrome* (SIDS). Zudem können auch Mutationen des *SCN10A*-Gens Herzrhythmusstörungen hervorrufen (Savio-Galimberti et al., 2012).

Eine weitere Gruppe von Kanalopathien sind die chronischen und neuropathischen Schmerzsyndrome. Diese werden durch Mutationen von Nav1.7, Nav1.8 oder Nav1.9 verursacht. Eine bedeutende Rolle scheint insbesondere Nav1.7 zu besitzen. Hierfür konnten innerhalb eines Jahrzehnts drei verschiedene Schmerzsyndrome zugeordnet werden (Catterall et al., 2008).

1.2.4. *Phrixotoxin-3 als Peptidmodulator spannungsgesteuerter Natriumionenkanäle*

Phrixotoxin-3 (Phr-3) ist ein Spinnengift und wird aus den Kieferklauen der weiblichen Spinne *Phrixotrichus auratus* gewonnen. Es handelt sich dabei um einen der bislang potentesten bekannten Peptidmodulatoren von VGSC (Bosmans et al., 2006). Aufgrund ihrer essenziellen Rolle bei der Entwicklung von Aktionspotentialen stellen VGSC eines der häufigsten Angriffsziele von Tiergiften dar (Bosmans et al., 2002). Phr-3 gehört zur Familie der *inhibitory cysteine knot* (ICK) Peptide. Dies ist eine Proteinstruktur, welche insbesondere in Toxinen von Pflanzen, Weichtieren und Spinnentieren vorkommt (Bosmans et al., 2006, Craik et al., 2001, Escoubas and Rash, 2004). Es besteht aus insgesamt 34 Aminosäuren und verfügt über sechs Cysteinreste, die drei Disulfidbrücken ausbilden (Bosmans et al., 2006). Phr-3 hat große strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen bereits bekannten Spinnentoxinen. Die größten Übereinstimmungen besitzen die chinesischen Spinnengifte Huwentoxin IV der Spinne *Ornithoctonus huwena* (77 %) und Hainantoxin IV der Spinne *Selenocosmia hainana* (82 %) (Bosmans et al., 2006, Peng et al., 2002, Li et al., 2004). Wie Untersuchungen an lebenden Mäusen zeigen, führt Phr-3 bereits in einer Konzentration von 500 pmol zu Lähmungen sowie einer reduzierten Atemfrequenz. Symptome einer exzitatorischen Neurotoxizität wie beispielsweise Krämpfe konnten nicht beobachtet werden (Bosmans et al., 2006). Der Tod der Tiere tritt nach etwa 10 bis 20 Minuten ein. Phr-3 zeigt bei den VGSC Nav1.1 bis Nav1.5 und ebenfalls Nav1.8 bereits in geringer Konzentration einen Effekt. Der bei weitem größte Effekt zeigte sich in der Studie für den Nav1.2-Kanal ($IC_{50} = 0,6 \text{ nM} \pm 0,1 \text{ nM}$). Für einen vergleichbaren Effekt waren bei Nav1.1 wesentlich höhere Konzentrationen notwendig ($IC_{50} = 610 \text{ nM} \pm 63 \text{ nM}$) (Bosmans et al., 2006).

1.3. **Wissenschaftliche Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Die FHM stellt eine seltene, aber schwerwiegende Unterform der MA dar. Zusätzlich zu anderen möglichen Aurasymptomen tritt als Hauptcharakteristikum dieses Krankheitsbildes eine reversible Halbseitenlähmung auf (Kahlig et al., 2008). Bislang konnten drei ursächliche Gene dieser Erkrankung identifiziert werden. Die Mutationen, die zur FHM1 und FHM2 führen, bewirken über jeweils unterschiedliche Mechanismen eine gesteigerte neuronale Erregbarkeit, eine vermehrte Ausschüttung von Glutamat und eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer *CSD* (Tottene et al., 2009, Leo et al., 2011). Demgegenüber ist die Pathophysiologie der FHM3 bisher weniger gut verstanden. Das FHM3-Gen *SCN1A*, welches von unserer Arbeitsgruppe mittels positioneller Klonierung identifiziert wurde, kodiert für einen auf inhibitorischen Neuronen exprimierten VGSC (Nav1.1) (Dichgans et al., 2005). In *knock-in* Mausmodellen für Epilepsie-assoziierte *SCN1A*-Mutationen ließ sich eine reduzierte Exzitabilität von inhibitorischen Neuronen in mehreren Gehirnbereichen nachweisen (Hedrich et al., 2014, Ogiwara et al., 2007, Yu et al., 2006). Dagegen zeigte sich in weiteren Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe eine erhöhte Erregbarkeit von inhibitorischen Neuronen in einem *knock-in* Mausmodell einer FHM3-assoziierten *SCN1A*-Mutation. Das Ziel dieses Projektes war die Untersuchung der pathophysiologischen Auswirkungen der *L1649Q*-Mutation des *SCN1A*-Gens in einem transgenen *knock-in* Mausmodell der FHM3 auf Einzelzellebene und auf Netzwerkebene. Primäres Ziel war es, zu überprüfen, ob eine erhöhte Suszeptibilität der Pyramidenzellen gegenüber einer *CSD* nachzuweisen ist, obwohl die Mutation zu einer erhöhten Erregbarkeit der inhibitorischen Neurone führt.

- Mittels *Patch-Clamp*-Technik sollte die Aktivität von Pyramidenzellen der fünften Kortexschicht in akuten Hirnschnitten nach Auslösung einer *CSD* mittels 3 M Kaliumchloridlösung gemessen werden. Unsere Hypothese war, dass es bei der FHM3 aufgrund der Übererregbarkeit präsynaptischer inhibitorischer Neurone zu einer Elektrolytverschiebung mit erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration kommt, welche hierüber zu einer

gesteigerten Suszeptibilität der Pyramidenzellen gegenüber einer *CSD* führt.

- In einem zweiten Schritt sollten die Folgen der Mutation auf die inhibitorischen Interneurone und deren Auswirkungen auf die Pyramidenzellen untersucht werden. Hierzu wurden die Frequenz und die Amplitude spontaner inhibitorischer postsynaptischer Eingänge (sIPSC) an kortikalen Pyramidenzellen untersucht. Ziel hierbei war es zu überprüfen, ob die Mutation ausschließlich zu einer gesteigerten Aktivität der Interneurone führt oder es auch zu einer erhöhten Amplitude und somit erhöhten Freisetzung an GABA in den synaptischen Spalt kommt. Die Hypothese war, dass GABA selbst nicht ursächlich für die Initiierung einer *CSD* ist, sondern die gesteigerte Aktivität der Interneurone vordergründig zu vermehrten Aktionspotentialen mit folgender Elektrolytverschiebung im Sinne einer erhöhten Kaliumkonzentration führen und hierüber das Auftreten einer *CSD* begünstigt wird.
- In einem dritten Schritt sollten die Auswirkungen der Mutation auf die Gesamtheit des neuronalen Netzwerks untersucht werden, wozu die Netzwerkaktivität in primären hippocampalen Neuronenkulturen über 21 Tage im Multielektrodenarray analysiert wurde. Unsere Hypothese hierbei war, dass die Mutation zu einem gesteigerten Auftreten von Populationsbursts mit anschließender Inhibierung der neuronalen Netzwerkaktivität als Korrelat einer *CSD* führt.
- In einem letzten Schritt sollte die Auswirkung des Spinnengifts Phr-3 auf mit Nav1.1- und Nav1.2-Kanälen transfizierte *HEK*-Zellen. Ziel hierbei war es anschließend den Effekt des Toxins auf die neuronale Netzwerkaktivität der primären hippocampalen Neuronenkulturen im Multielektrodenarray zu testen. Anhand der publizierten Datenlage, bei der es zu einer gesteigerten Inhibierung von Nav1.2-Kanälen kommt, war die Hypothese, dass der Einsatz von Phr-3 zu einer Inhibierung der Populationsbursts führen könnte.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere für Messungen an akuten Hirnschnitten und in primären hippocampalen Neuronenkulturen

2.1.1. Mausmodell

2007 konnte nachgewiesen werden, dass die *L1649Q*-Mutation auf dem *SCN1A*-Gen, welche im vierten Segment der vierten Domäne eines spannungsgesteuerten Nav1.1-Kanals, also dem Spannungssensor des Kanals lokalisiert ist, eine FHM3 herbeiführt (Vanmolkot et al., 2007). Mittels homologer Rekombination konnte ein transgenes *knock-in* Mausmodell für die repräsentative humane FHM3-Mutation *L1649Q* generiert werden (Auffenberg et al., 2021), welches die Grundlage dieser Promotionsarbeit war. Bei den Versuchen an akuten Hirnschnitten mittels *Patch-Clamp*-Technik wurden ausschließlich Jungtiere im Alter von 14 bis 20 Tagen nach Geburt (PX) verwendet. Die Untersuchungen mittels Multielektrodenarray erfolgten an primären hippocampalen Neuronenkulturen, welche aus Embryonen am embryonalen Tag 17.5 (E17.5) generiert wurden. Das Aktenzeichen der Tierversuchsgenehmigung lautet §4 Mitteilung vom 19.08.2014.

2.1.2. Genotypisierung

Anhand einer Genotypisierung kann festgestellt werden, ob ein Gen in homozygoter, heterozygoter oder wildtypischer Form vorliegt. In diesem Fall ging es um die Analyse des *Scn1a*-Gens im Hinblick auf eine *L1649Q*-Mutation. Die Genotypisierung erfolgte anhand von Mausschwänzen und diente zur retrospektiven Feststellung, ob die Untersuchungen an den akuten Hirnschnitten und den Hippokampuskulturen an heterozygoten oder wildtypischen Mäusen erfolgt war.

Zur Freisetzung der DNA aus dem Zellinneren erfolgte über Nacht bei 55 °C und 500 Umdrehungen pro Minute (rpm) (*Thermomixer compact*; *Eppendorf Vertrieb*

Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf) unter Zugabe von 500 µl Lysepuffer, welches nach dem in Tabelle 3 beschriebenen Protokoll angefertigt wurde und der Zugabe von 10 µl Proteinase K (Bioline GmbH, Luckenwalde) zunächst eine Lyse der Mausschwänze.

Tabelle 3: Protokoll zur Anfertigung eines 100 ml Vorrats an Lysepuffer.

Chemikalie	Konzentration (M)
Tris-HCl pH 7,5 (AppliChem GmbH, Darmstadt)	1
EDTA pH 8,0 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)	0,5
NaCl (VWR International, Darmstadt)	5
DDT (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)	1
Spermidin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)	1
10% SDS (Bio-Rad Laboratories GmbH, Herules, Kalifornien)	-
H ₂ O	-

Am folgenden Tag wurde die lysierte DNA zunächst für fünf Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert, wodurch sich die Zellreste absetzten und der die DNA-enthaltende Überstand in eine neue Eppendorf-Tube überführt werden konnte. Zu dem Überstand wurden 350 µl 100%iges Isopropanol (Höfer Chemie GmbH, Kleinblittersdorf) hinzugegeben und bis zum Ausfallen der DNA durchmischt. Danach wurde das Gemisch für weitere 15 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde wiederum mit 350 µl 70 %igem Ethanol (Höfer Chemie GmbH, Kleinblittersdorf) gewaschen und erneut für fünf Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet für etwa 30-45 Minuten an der Luft getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet mit 25 µl Ampuwa H₂O (medpex, Ludwigshafen) resuspendiert. Zur Vervielfältigung der DNA folgte anschließend eine PCR nach dem in Tabelle 5 dargestelltem Protokoll (T3 Thermocycler; Biometra GmbH, Göttingen). Hierzu wurden wie in Tabelle 4

aufgeführt zwei Primer-RNAs für den Anfang und das Ende der RNA-Kette, eine hitzestabile Taq-Polymerase für die Replikation, Nucleosidtriphosphat-Moleküle als Bausteine für die DNA-Kette, Mg^{2+} -Ionen zur Stabilisierung der Primer und eine Pufferlösung als geeignetes Milieu für den Replikationsprozess benötigt.

Tabelle 4: Protokoll für einen 25 μ l PCR-Ansatz.

Chemikalie	Volumen (μ l)
DNA	2
Forward-Primer (5 μ M)	1
Backward-Primer (5 μ M)	1
5x PCR Puffer (<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>)	5
dNTP's (10mM) (<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>)	0,5
Taq-Polymerase (<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>)	0,2
$MgCl_2$ (<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>)	1
H ₂ O	14,3

Tabelle 5: Protokoll zur Amplifizierung des 25 μ l PCR-Ansatzes.

Zeit (min)	Temperatur ($^{\circ}$ C)
5	95
0,5	95
0,5	60
0,75	72
10	72
Bis zum Ende	4

} 35 Zyklen

Nach erfolgter Vervielfältigung wurden jeweils 10 μ l der DNA-Produkte zusammen mit Orange G (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*) in einem Verhältnis von 10:1 auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Das Orange G diente dabei als Farbstoff zur Kennzeichnung der DNA-Banden. Die Gelelektrophorese ist ein

Verfahren zur Auftrennung unterschiedlich großer und unterschiedlich geladener Moleküle, in diesem Fall der DNA-Bestandteile. Das Setting bestand aus einem 2,5 %igem Agarose-Gel, einer ionischen Pufferlösung (1x TBE-Puffer) und einem elektrischen Feld (120 V). Das Agarosegel diente als Trägersubstanz und wirkt ähnlich wie ein Sieb, wobei größere Bestandteile stärker zurückgehalten werden als kleinere. Zusätzlich wurden dem Gel 8 µl Redsafe (*iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea*) hinzugegeben. Dies ist eine Färbesubstanz, die sich an Nukleinsäuren bindet und den Nachweis der DNA-Banden unter UV-Licht bei 302 nm ermöglicht. Durch die Pufferlösung wird ein elektrisches Feld aufgebaut, in dem die DNA-Bestandteile von der Kathode hin zur positiv geladenen Anode wandern. Je kleiner und umso negativ geladener die DNA-Fragmente sind, desto schneller wandern die Moleküle zur Anode. Parallel zu den DNA-Substraten wurde eine aus 10.000 Basenpaaren bestehende *peqGOLD Range Mix DNA-Leiter* (*Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen*) aufgetragen, welche als Kontrollparameter zur Größenbestimmung der DNA-Banden diente (siehe Abbildung 4).

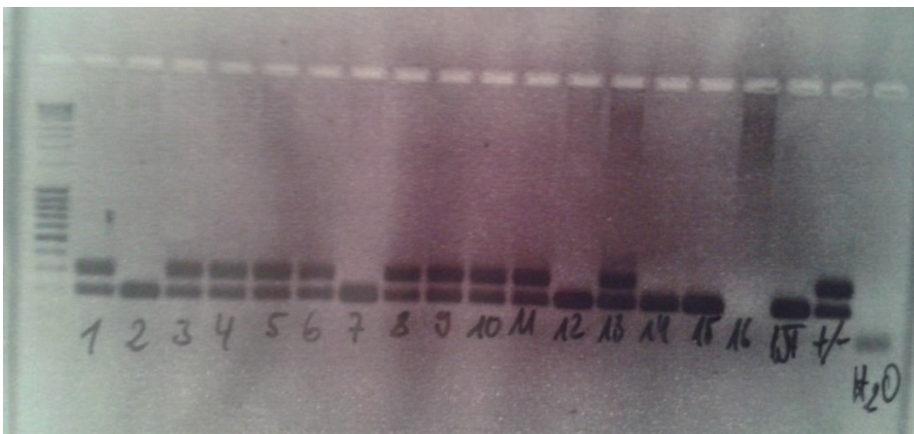


Abbildung 4: Ergebnis einer Genotypisierung des *Scn1a*-Gens aus Mausschwanzbiopsien.

Bei den Spalten mit nur einer Bande lag ein Wildtyp vor, bei den Spalten mit zwei Banden lag eine Heterozygotie für die L1649Q-Mutation vor. Bei Probe 16 gelang in diesem Falle keine erfolgreiche Genotypisierung. Die H₂O-Probe diente als Kontrolle zum Ausschluss einer Verunreinigung der Proben.

2.2. Untersuchungen mittels Patch-Clamp-Technik an akuten Hirnschnitten

2.2.1. Patch-Clamp-Technik

Die Erfindung der *Patch-Clamp*-Methodik 1976 durch Neher und Sakmann revolutionierte die Elektrophysiologie, da sie die Erforschung kleinster Stromflüsse (pA) über einzelne Kanäle ermöglicht (Carmeliet, 1993, Neher and Sakmann, 1976). Die Grundlage für diese Methodik lieferte die in den 1950er Jahren von Alan Hodgkin und Andrew Huxley aufgestellte Theorie, wonach spannungsgesteuerte Ionenkanäle für die Initiierung eines Aktionspotentials verantwortlich sind. Diese Theorie basierte auf ihren Messungen mit Tintenfischaxonen, bei denen es ihnen gelang, mittels *voltage-clamp*-Technik Ströme an Zellmembranen abzuleiten (Hodgkin and Huxley, 1952). Die dabei verwendete Methode der Spannungsklemme wurde bereits in den 1930er Jahren von K. S. Cole und H. J. Curtis entwickelt. Dabei werden zwei Elektroden in eine Zelle eingeführt. Die erste Elektrode dient dazu, die Zelle auf ein Kommandopotenzial zu klemmen, während die zweite Elektrode die auftretenden Ionenströme ableitet (Cole and Curtis, 1939).

Die *Patch-Clamp*-Technik basiert im Wesentlichen auf dem Prinzip der Spannungsklemme. Allerdings wird hierbei die Vorgabe des Kommandopotentials und die Ableitung des Ionenstroms von einer einzigen Elektrode übernommen. Dabei wird die Elektrode in eine mit Intrazellulärlösung befüllten Glaspipette eingetaucht. In einer Extrazellulärlösung befindet sich eine weitere Elektrode (Badelektrode), die dem Aufbau der Spannung zwischen Intrazellulärraum und Extrazellulärraum dient. Unter der Erzeugung eines Überdrucks im Inneren der Glaspipette wird diese vorsichtig an die Zellmembran herangeführt. Der Überdruck dient dazu die Pipette offen zu halten. Sobald die Pipette an der Zellmembran anliegt, wird der Überdruck aufgehoben, wodurch ein Unterdruck entsteht, welcher ein Ansaugen der Zellmembran an die Öffnung der Glaspipette bewirkt. Dieser Zustand wird als *Cell-Attached-Modus* bezeichnet. Im Idealfall wird in dieser Phase ein Gigaseal ($10^9 \Omega$) angestrebt. Ein Gigaseal bewirkt, dass nur wenige Leckströme auftreten. Je mehr Leckströme

auftreten, desto schwächer ist die Verbindung von Glaspipette und Zellmembran (Verkhratsky et al., 2006, Hamill et al., 1981).

Ausgehend vom *Cell-Attached-Modus* können vier Untersuchungsmethoden unterschieden werden. Der *Cell-Attached-Modus* selbst ermöglicht die Messung von Stromflüssen über den mit der Pipette verbundenen Membranabschnitt. Ausgehend von diesem Modus kann durch ruckartiges Zurückziehen der Pipette und ein damit verbundenes Herausreißen eines Membranstücks der *Inside-Out-Modus* erreicht werden. Hierbei können Messungen an der Membraninnenseite durchgeführt werden. Ebenfalls vom *Cell-Attached-Modus* ausgehend kann der *Whole-Cell-Modus* erreicht werden, welcher Grundlage dieser Arbeit war. Hierbei wird über einen Unterdruck bei weiterhin bestehender Verbindung zwischen Zelle und Pipette ein Membranstück herausgerissen und somit eine offene Verbindung zwischen dem Zellinneren und dem Inneren der Pipette hergestellt. Dieser Modus hat den Vorteil, dass Spannungsänderungen einer gesamten Zelle abgeleitet werden können. Zieht man die Pipette ausgehend vom *Whole-Cell-Modus* von der Zelle zurück, kann der *Outside-Out-Modus* erreicht werden, bei dem das Äußere der Membran zur Badlösung gerichtet ist (Rubaiy, 2017, Hamill et al., 1981).

2.2.2. *Whole-Cell-Ableitung*

In Abbildung 5 wird das Funktionsprinzip einer *Whole-Cell-Ableitung* dargestellt. Die *Whole-Cell-Ableitung* basiert wie auch die anderen *Patch-Clamp*-Modi auf zwei hintereinander geschalteten Differentialverstärkern und einem Rückkopplungswiderstand (R_f) zwischen dem Eingang des Membranpotentials (E_m) und dem Ausgangspotential des ersten Differentialverstärkers. Der erste Differentialverstärker registriert und verstärkt die Spannungsdifferenz zwischen dem Membranpotential (E_m) und dem Kommandopotential (E_c). Dabei ist zu beachten, dass aufgrund des hohen Eingangswiderstands ($10^{12} \Omega$) des Differentialverstärkers ein Stromfluss über diesen nicht möglich ist. Stattdessen fließt der aufgrund der Spannungsdifferenz entstehende Strom über den R_f in die Zelle und bewirkt eine Angleichung des E_m an das E_c . Sobald das E_m dem E_c

entspricht, endet aufgrund der nun fehlenden Spannungsdifferenz der Stromfluss. Der zweite Differentialverstärker registriert und verstärkt die Spannungsdifferenz zwischen dem E_c und der entstehenden Spannungsdifferenz des ersten Differentialverstärkers. Demnach wird über den zweiten Differentialverstärker das E_m gemessen. Über den bekannten R_f und die gemessene Spannung kann der kompensatorische Strom gemessen werden, welcher nötig ist, um das E_m an das E_c anzugleichen ($I=U/R$) (Schwarz, 2015).

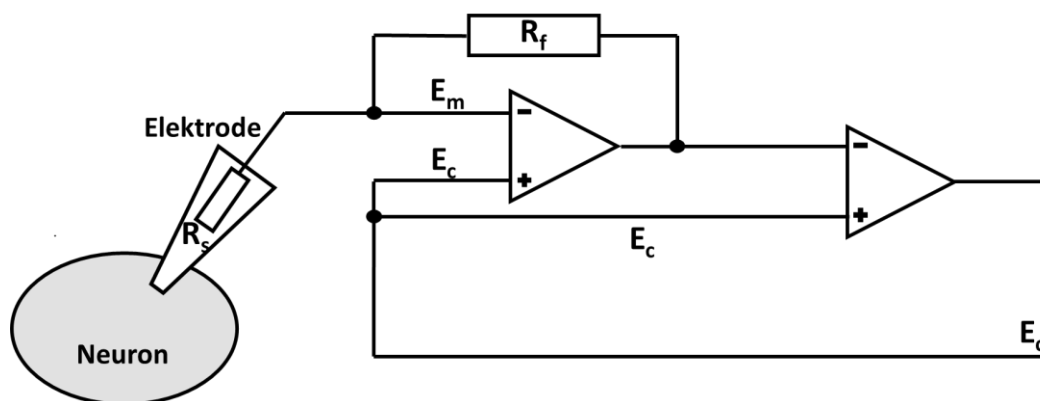


Abbildung 5: Funktionsprinzip der Whole-Cell-Ableitung.

E_m = Membranpotential, E_c = Kommandopotential, R_s = Serienwiderstand, R_f = Rückkopplungswiderstand verändert nach (Schwarz, 2015).

2.2.3. Präparation der akuten thalamokortikalen Hirnschnitte

Die Anfertigung der akuten Hirnschnitte erfolgte mit wildtypischen und heterozygoten Mäusen, die zwischen 14 und 20 Tage alt waren (P14 - P20). Die Mäuse wurden unter Zufuhr von Isofluran (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*) betäubt und danach mit einer Schere dekapitiert. Die Schädelkalotte wurde mittels eines Skalpells vorsichtig eröffnet und das Gehirn durch einen Spatel aus der Schädelhöhle entfernt. Anschließend wurde das Gehirn wie in Abbildung 6 dargestellt, zur Anfertigung eines thalamokortikalen Schnittes auf eine Rampe mit einer Neigung von 10° aufgelegt und unter Trennung des rostralen Hirnabschnitts und des *Bulbus olfactorius* ein Querschnitt im 55° Winkel durch das Gehirn gemacht. Der Hintergrund dieser Schnitfführung ist die Erhaltung

einer funktionellen Verbindung zwischen dem Thalamus und dem Kortex. Danach wurde das präparierte Gehirn mit dem 55° Winkel nach unten aufliegend auf ein *HM 650V Vibrating Blade Microtom (Microm VWR International, Darmstadt)* aufgebracht, mit einem Block aus Agarose fixiert und nach dem Erreichen des Thalamus Schnitte von $400\ \mu\text{m}$ angefertigt. Die Schnitthanfertigung erfolgte in einer gekühlten künstlichen Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF) unter ständiger Zufuhr von Carbogen (5 Volumenanteile CO_2 und 95 Volumenanteile O_2). Anschließend wurden die Schnitte auf einem Netz aus Nylon in der Extrazellulärlösung für etwa eine Stunde bei 36°C aufbewahrt und durchgehend mit Carbogen begast.

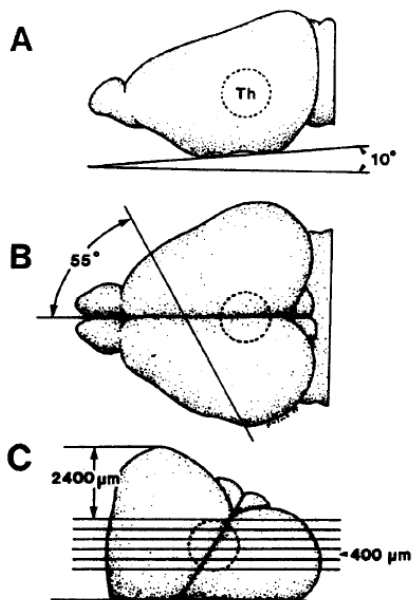


Abbildung 6: Skizze zur Anfertigung der akuten Hirnschnitte.

(A) Lage des herausoperierten Gehirns auf einer Rampe mit einer Neigung von 10° , Th = geschätzte Position des Thalamus. (B) Der Bulbus olfactorius, das Kleinhirn und der rostrale Bereich des Großhirns werden in einem initialen Querschnitt von 55° abgetrennt und verworfen (links). (C) Lage des präparierten Gehirns mit dem 55° Winkel nach unten aufliegend. Anfertigung von $400\ \mu\text{m}$ dicken Schnitten mit Erhalt der thalamocorticalen Verbindungen. Entnommen aus (Agmon and Connors, 1991).

2.2.4. *Glaspipetten für Versuche an akuten Hirnschnitten*

Für die Versuche an den akuten Hirnschnitten von Mäusen wurden dünnwandige GB150F-10 Kapillaren aus Borosilikatglas (Innendurchmesser: 0,86 mm, Außendurchmesser: 1,5 mm, Länge: 100 mm) benutzt. Aus jeweils einer Kapillare wurden mittels eines P-97 *Flaming/Brown Micropipette Pullers* (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) zwei Pipetten hergestellt, welche unter einem MF-79 *Microforge* Mikroskops (Narishige, Japan) auf ihre Funktionalität hin geprüft wurden. Zur Optimierung der Messungen wurden bei den ableitenden Pipetten nur solche verwendet, deren Widerstand zwischen 3,0 und 5,0 M Ω betrug. Der Widerstand der Pipetten, die mit KCl befüllt wurden, wurde so gering wie möglich gehalten (0,2 – 0,5 M Ω).

2.2.5. *Messlösungen für Versuche an akuten Hirnschnitten*

Die extrazelluläre Lösung repräsentierte das Umgebungsmilieu eines Nervenzellverbandes, während die intrazelluläre Lösung den Bedingungen im Inneren einer Zelle entsprach. Da die Zellen sehr klein sind, kam es nach Durchbrechung der Zellmembran sehr rasch zum Austausch mit der Intrazellulärlösung im Inneren der Pipette. Dadurch entsprach das Innere der Zelle bereits nach kurzer Zeit den Werten der definierten zugeführten intrazellulären Lösung. Der pH-Wert beider Lösungen wurde mittels NaOH (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*) bzw. HCl (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*) auf 7,4 eingestellt. Eine Ausnahme hiervon stellte die Intrazellulärlösung bei der Messung der spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingänge dar. Hierbei wurde ein pH-Wert von 7,2 angestrebt. Die Osmolarität der extrazellulären Lösung wurde auf 305 mOsm/l und die der intrazellulären Lösung auf 290 mOsm/l eingestellt. Bei Abweichungen der Osmolarität wurde D-Mannitol (*AppliChem, Darmstadt*) zum Angleichen eingesetzt, wobei 0,0183 g auf 100 ml 1 mOsm/l entsprach. Die Aufbewahrung der Lösungen erfolgte bei 4 °C. Die Protokolle zur Anfertigung der einzelnen Lösungsansätze sind in den Tabellen 5,6 und 7 aufgeführt.

Tabelle 5: Protokoll zur Anfertigung von 10 ml Intrazellulärlösung zur Messung einer CSD an akuten Hirnschnitten.

Chemikalie	Konzentration (mM)
KCl (<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>)	20
ATP-Mg (<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>)	4
Kreatinphosphat (<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>)	10
GTP-Na (<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>)	0,3
HEPES (<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>)	10
K-Gluconat (<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>)	100

Tabelle 6: Protokoll zur Anfertigung von 10 ml Intrazellulärlösung zur Messung von spontanen postsynaptischen inhibitorischen Strömen an akuten Hirnschnitten.

Chemikalie	Konzentration (mM)
KCl	5
ATP-Mg	4
Kreatinphosphat	10
GTP-Na	0,3
MgCl ₂ (<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>)	2
EGTA (<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>)	10
K-Gluconat	125
HEPES	10

Tabelle 7: Protokoll zur Anfertigung von 100 ml Extrazellulärlösung für die Messung an akuten Hirnschnitten.

Chemikalie	Konzentration
------------	---------------

	(mM)
NaCl (<i>VWR International, Darmstadt</i>)	125
NaHCO ₃ (<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>)	25
KCl	2,5
MgCl ₂ *6H ₂ O (<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>)	1
NaH ₂ PO ₄ (<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>)	1,25

Bei der Extrazellulärlösung wurden zwei verschiedene Ansätze hergestellt. Eine *Recording*-Lösung, welche für die Messung und eine *Cutting*-Lösung, die zur Anfertigung der akuten Hirnschnitte verwendet wurde. Beiden Ansätzen wurden zunächst 1,80 g Glukose (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*) hinzugegeben. Für die *Recording*-Lösung wurden zusätzlich zwei Milliliter einer 1 M CaCl₂*2H₂O-Lösung hinzugegeben. Für die *Cutting*-Lösung wurden ein Milliliter einer 1 M CaCl₂*2H₂O-Lösung und sechs Milliliter einer 1 M MgCl₂*6H₂O-Lösung hinzugegeben.

2.2.6. Allgemeiner Versuchsablauf der Versuche mittels Patch-Clamp-Technik

Über eine eigens angefertigte Harfe aus Nylon wurden die akuten Hirnschnitte auf dem Objektisch fixiert. Ein Pumpensystem sorgte für eine kontinuierliche Versorgung der präparierten Hirnschnitte mit einer carbogengesättigten (95% O₂, 5% CO₂), wie in Tabelle 7 bzw. 11 aufgeführten, künstlichen Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF). Die aCSF wurde über die Software *LinLab* (*Scientifica, East Sussex, UK*) auf eine konstante Temperatur von 34 °C erwärmt. Die folgenden Schritte beziehen sich sowohl auf die Versuche mit den akuten Hirnschnitten als auch auf die später folgenden Versuche an den mit Nav1.1- und Nav1.2-Kanälen transfizierten *HEK*-Zelllinien. Die Messelektrode wurde in eine mit aCSF (siehe Tabelle 5, 6 bzw. 10) befüllte Glaspipette eingetaucht und am Elektrodenhalter befestigt. Eine in die aCSF eingetauchte mit Silberchlorid-beschichtete Referenzelektrode sorgte für einen Spannungsaufbau. Durch eine

handelsübliche Spritze, die über den Elektrodenhalter mit der Pipette verbunden war, konnte vor dem Eintauchen in die aCSF ein Überdruck im Inneren der Pipette erzeugt werden. Dadurch konnte ein Verschluss der Pipettenöffnung durch Gewebe oder Luft verhindert werden. Nach dem Eintauchen der Pipette in die aCSF wurde die Spannung zwischen den beiden Elektroden zunächst genullt und die Pipettenspitze über einen Mikromanipulator langsam an die Zelle herangeführt. Sobald durch den erzeugten Überdruck eine leichte Einbeulung an der Zellmembran erkennbar war, wurde über einen an der Spritze befestigten Drei-Wege-Hahn der Überdruck in einen Unterdruck umgewandelt. Dies führte zum Erreichen des *Cell-Attached-Modus*, bei dem im Idealfall ein Gigaseal ($10^9 \Omega$) zwischen Pipettenspitze und Zellmembran erreicht wurde. Dabei gilt, dass die Leckströme umgekehrt proportional zur Höhe des Widerstands sind. Die Eigenschaft der Glaspipette als Kondensator zu fungieren, verursacht von der Pipette ausgehende transiente Stromflüsse, die durch die *Cp Fast*-Funktion der Software *Clampex* (*Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riß*) kompensiert wurden. Durch rasche Erhöhung des Unterdrucks wurden die Zellen anschließend geöffnet, sodass eine freie Verbindung zwischen dem Zellinneren und der Intrazellulärlösung der Pipette bestand (*Whole-Cell-Modus*). Die Öffnung der Zellmembran wurde durch einen Anstieg der kapazitiven Ströme und ein Absinken des Gigaseals begleitet. Die Zellen wurden jedoch nur verwendet, wenn die Leckströme weniger als 100 pA betragen. Die Kompensation des nicht-physiologischen und somit ungewollten Serienwiderstandes, welcher durch die Pipettenspitze und mögliche Membranbestandteile hervorgerufen wurde, erfolgte über die Funktion *R_s Compensation* der *Clampex-Software*. Diese Funktion verhindert, dass während der *voltage-clamp*-Messung zu niedrige Stromflüsse berechnet werden, welche nötig sind, um die Zelle auf das Kommandopotential zu klemmen. Dies geschieht, indem eine Spannung zum Kommandopotential addiert wird, welche dem hervorgerufenen Stromverlust entspricht. Für die Kompensation des Serienwiderstandes in der *current-clamp*-Messung wurde die Funktion *bridge balance* verwendet. Dabei wird anhand einer konstanten Strominjektion das entsprechende Membranpotential ermittelt. Aufgrund des Serienwiderstands kommt es hier zu einem Spannungsabfall, welcher über die

Funktion *bridge balance* nachträglich kompensiert wird. Die Aufzeichnung des kontinuierlichen Stroms über den Verstärker erfolgte über einen Analog/Digital-Wandler, welcher den kontinuierlichen Strom zu bestimmten Zeitpunkten (Abtastfrequenz) umrechnet und aufzeichnete.

2.2.7. Patch-Clamp-Setup

Der elektrophysiologische Messstand für die Versuche an den akuten Hirnschnitten mittels Patch-Clamp-Technik unter Auslösung einer CSD ist in Abbildung 7 skizziert. Für die KCI-Applikation wurde eine zweite Pipette benötigt, welche bei der Messung der spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingänge nicht benötigt wurde. In Tabelle 8 sind die benötigten Geräte und die Software aufgeführt.

Tabelle 8: Geräte- und Softwareliste für das Setup zur Messung an den akuten Hirnschnitten.

Software	Firma
cellSens Software	Olympus Life Science, Hamburg
LinLab Software	Scientifica, East Sussex, UK
MultiClamp 700B	Scientifica, East Sussex, UK
pClamp Software	Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riß

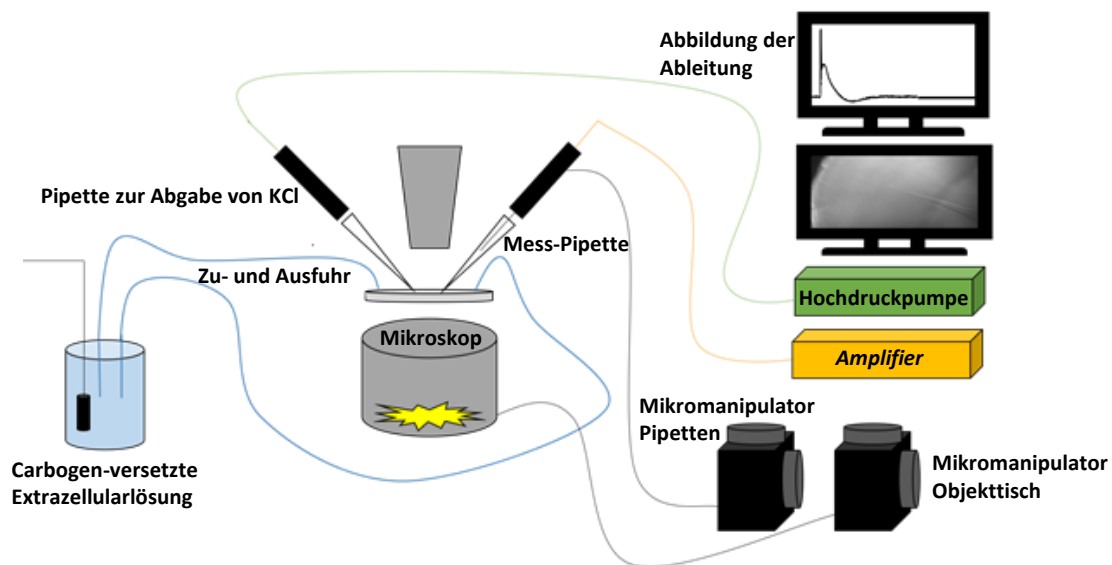


Abbildung 7: Skizzierung des Patch-Clamp-Messtandes für die Messung an akuten Hirnschnitten.

Labormikroskop BX61WI (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) mit Lichtquelle im Zentrum abgebildet (grau mit gelb), dessen vergrößerte Bilder auf einen Bildschirm übertragen wurden (unterer Bildschirm). Eine Schlauchradpumpe Minipuls 3 (Gilson, Middleton, USA) die hier nicht abgebildet ist, sorgte über eine Zu- und Ausfuhr (blaue Linien) für eine konstante Zirkulation von frischer mit Carbogen versetzter Extrazellulärlösung (blaues Becherglas). Die linke Pipette diente zur Applikation von KCl, welche über eine PDES-02DX Hochdruckpumpe (grüner Kasten; npi, Tamm, Deutschland) gesteuert wurde. Die rechte Pipette, welche mit einem CV203BU Vorverstärker (Molecular Devices, Sunnyvale, California) ausgestattet war, diente der Ableitung der Neurone und war mit einem Multiclamp 700B Amplifier (orangener Kasten; Molecular Devices, Sunnyvale, California) verbunden. Dieser war wiederum mit einem Digidata 1440A Digitizer (Molecular Devices, Sunnyvale, California) verbunden (hier nicht abgebildet), welcher für die graphische Umwandlung der Messung (oberer Bildschirm) sorgte. Über je einen Mikromanipulator (Scientifica East Sussex, UK) konnten zum einen der Objektisch (rechter Manipulator; schwarzer Kasten) und zum anderen die beiden Pipetten (linker Manipulator) bewegt werden. Über einen Schalter am linken Manipulator konnte zwischen den jeweiligen Pipetten gewechselt werden.

2.2.8. Experimenteller Versuchsaufbau zur Messung einer Cortical Spreading Depression in akuten Hirnschnitten

Die Messungen erfolgten an akuten Hirnschnitten von Jungtieren (P14 – P20) eines transgenen heterozygoten *knock-in* Mausmodelles mit heterozygoter *Scn1a-L1649Q*-Mutation bzw. Wildtypen. Die Ableitungen wurden an exzitatorischen kortikalen Pyramidenzellen der fünften Kortexschicht in thalamokortikalen Schnitten unter Auslösung einer *Cortical Spreading Depression* (CSD) mittels lokaler Applikation einer drei molaren Kaliumchloridlösung (KCl) durchgeführt. Der Versuchsaufbau orientierte sich im Wesentlichen an dem in Tottene et al. beschriebenen Versuchsaufbau zur Messung einer experimentell ausgelösten CSD in einem Mausmodell für die FHM1 (Tottene et al., 2009). Die akuten Hirnschnitte wurden unter der in Abschnitt 2.2.3. beschriebenen Anleitung angefertigt und anschließend kontinuierlich mit einer Carbogen-gesättigten (95% O₂, 5% CO₂) aCSF versorgt. Der allgemeine Versuchsablauf wurde bereits in Abschnitt 2.2.6. beschrieben. Zusätzlich wurde in diesem Versuch jedoch eine zweite Pipette zur Applikation von KCl benötigt (siehe Abbildung 7). Die Platzierung dieser Pipette erfolgte etwa auf Höhe der fünften Schicht in einem Abstand von etwa 600 µm zur ableitenden Pipette. Der Abstand zum akuten Hirnschnitt selbst wurde nicht festgelegt und variierte entsprechend. Die Applikation von KCl erfolgte mit Hilfe einer PDES-02DX npi Hochdruckpumpe (*npi, Tamm, Deutschland*), über die das KCl mit einem konstanten Druck von 0,5 bar und einer manuell variabel einstellbaren Zeit (ms) appliziert werden konnte. Über einen Anstieg der Applikationsdauer in Schritten von 25 ms wurde ein Schwellenwert zur Auslösbarkeit einer CSD ermittelt. Zwischen zwei Pulsabgaben mussten mindestens acht Minuten liegen, um eine Akkumulation des KCl zu verhindern und eine Regeneration der Zelle in den Ausgangszustand zu ermöglichen.

2.2.9. Messparameter zur Analyse einer *Cortical Spreading Depression* in akuten Hirnschnitten

Die Messung und Auslösung einer *CSD* wurde im *Current-Clamp*-Modus durchgeführt. Hierbei wurde die Spannungsänderung innerhalb der abgeleiteten Zelle nach Zugabe des KCl registriert. Abbildung 8 zeigt eine ausgelöste *CSD* mit einer auf die Depolarisation folgenden langandauernden Repolarisation und Hyperpolarisation.

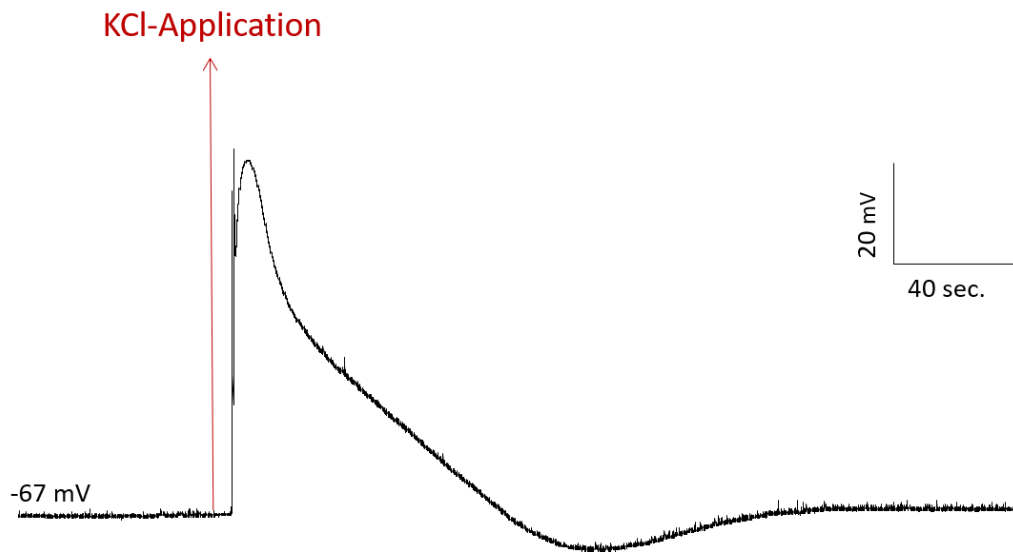


Abbildung 8: Beispiel einer experimentell ausgelösten Cortical Spreading Depression einer Pyramidenzelle.

Die Dauer einer *CSD* wurde manuell innerhalb der *Clampfit 10.7* Datei ermittelt und berechnete sich aus dem Beginn der *CSD*, welcher das Erreichen des Schwellenwertes markierte und dem Wiedererlangen eines konstanten Ruhemembranpotentials (siehe Abbildung 9).

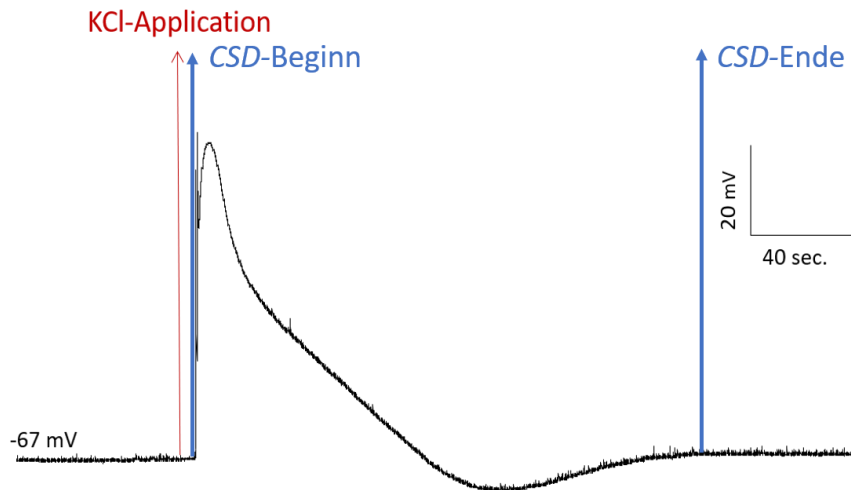


Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung zur Dauer einer experimentell ausgelösten Cortical Spreading Depression.

Der rote Pfeil markiert die Applikation des KCl. Die blauen Pfeile markieren den Beginn und das Ende der CSD.

Die Applikation des KCl erfolgte mit Hilfe eines Picospritzers, über die das KCl mit einem konstanten Druck von 0,5 bar und einer manuell variabel einstellbaren Zeit (ms) appliziert werden konnte. Über einen schrittweisen Anstieg der Applikationsdauer von je 25 ms wurde ein Schwellenwert zur Auslösbarkeit einer CSD ermittelt. Zwischen zwei Pulsabgaben mussten mindestens acht Minuten liegen, um eine Akkumulation des KCl zu verhindern und eine Regeneration der Zelle in den Ausgangszustand zu ermöglichen. In unsere Auswertung zur Ermittlung des Schwellenwertes definierten wir die CSD als eine Depolarisation mit anschließender langanhaltender Repolarisation und einer folgenden Hyperpolarisation von mindestens -2 mV gegenüber dem Ausgangspotential (Ruhemembranpotential vor Auslösung einer CSD). Entsprechend musste die Hyperpolarisation aus Abbildung 8 mindestens -69 mV betragen, um in die Wertung als CSD einzugehen.

2.2.10. Experimenteller Versuchsaufbau zur Messung von spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingängen in akuten Hirnschnitten

In diesem Versuch wurde die Netzwerkaktivität an akuten Hirnschnitten von Jungtieren (P14 – P20) eines transgenen heterozygoten *knock-in* Mausmodelles mit *Scn1a-L1649Q*-Mutation bzw. Wildtypen verglichen. Dazu wurden die Frequenz und die Amplitude spontaner inhibitorischer postsynaptischer Eingänge (sIPSC) in kortikalen Pyramidenzellen der fünften Hirnschicht in thalamokortikalen Schnitten gemessen. Die Anfertigung der akuten Hirnschnitte erfolgte anhand der unter 2.2.3. beschriebenen Anleitung und die akuten Hirnschnitte wurden während der gesamten Messung kontinuierlich mit einer Carbogen-gesättigten (95% O₂, 5% CO₂) aCSF versorgt. Zur Messung der sIPSC wurden die AMPA-Rezeptoren und die Kainat-Rezeptoren über die Zugabe von 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (NBQX, 10 µM; *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*) und die NMDA-Rezeptoren über die Zugabe von 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (APV, 30 µM) blockiert. Die Messung erfolgte nach dem in 2.2.6. beschriebenen allgemeinen Versuchsablauf unter Verwendung des *Whole-Cell-Modus*.

2.3. Untersuchungen mittels Multielektrodenarray in primären hippocampalen Neuronenkulturen

2.3.1. Ableitung von Strömen im Multielektrodenarray

Die Technik des Multielektrodenarrays (MEA) ermöglicht die simultane, nicht-Zell-invasive Messung eines neuronalen Netzwerks *in vitro* über die Registrierung von extrazellulären Feldpotentialen. Änderungen der Feldpotentiale spiegeln die Spannungsänderungen einzelner Neurone oder die Überlagerung von schnellen Aktionspotentialen, synaptischen Potentialen und langsamen glialen Potentialen zeitlich und räumlich wieder (Spira and Hai, 2013).

Die MEA bestehen aus einem Raster aus 60 ebenflächigen Elektroden mit einem Durchmesser von jeweils 30 μm und einem Abstand untereinander von 200 μm . Die Elektroden haben entsprechend der Angaben des Herstellers (*Multi Channel Systems*) einen Eingangswiderstand von 30 – 50 k Ω . Die Netzwerkaktivität wurde bei 25 kHz abgetastet und über das Programm *MC-Rack* von *Multi Channel Systems* visualisiert und gespeichert. Die Ermittlung der Spikes und die Berechnung der Populationsbursts erfolgten über die *SPANNER Software* (*RESULT Medical, 40219 Düsseldorf, Deutschland*) (Hedrich et al., 2014, Illes et al., 2009).

2.3.2. Anfertigung der primären hippocampalen Neuronenkulturen

Zur Anfertigung der primären Hippocampuskulturen wurden ausschließlich Embryonen von wildtypischen und heterozygoten Mäusen am Tag E17.5 verwendet, welche separat präpariert und deren Zellen kultiviert wurden. Hierzu wurde eine terminiert verpaarte, trächtige Maus mittels CO₂ betäubt, alle Embryonen aus dem Muttertier herausoperiert und diese anschließend dekapitiert. Danach wurde der Hippocampus eines jeden Tieres unter einem Mikroskop vom restlichen Gehirn abgetrennt und in einer kalten HBSS-Lösung aufbewahrt. Zur späteren Analyse des Genotyps wurden zusätzlich Schwanzbiopsien entnommen. Die Hippocampi wurden nun dreimal mittels HBSS (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*) gewaschen und danach für 14

Minuten bei 37 °C mit 0,05 %igem Trypsin (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*) angedaut. Dann wurden die Proben dreimal mit DMEM+ aufgereinigt. Dieses bestand aus 45 ml DMEM und fünf Milliliter FKS (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*). Im Anschluss folgte die mechanische Auftrennung des Zellverbandes durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren der Proben mittels einer 100 µl Pipette. Nach erfolgreicher Trennung der Zellen aus ihrem Verband wurden die in DMEM+ gelösten Proben über ein Zellsieb mit einer Maschenbreite von 40 µm gefiltert. Zuletzt wurde die Zellzahl einer jeden Probe durch Zuhilfenahme einer Neubauer-Kammer ermittelt. Auf jeden vorbeschichteten MEA-Chip wurden 120.000 isolierte Neurone in einem Volumen von 100 µl DMEM aufgetragen. Die befüllten MEA-Chips wurden bei 37 °C und fünf Prozent CO₂ für vier Stunden inkubiert. Danach wurde das DMEM durch eine, wie in Tabelle 9 aufgeführten Neurobasal plus Lösung ersetzt und weiterhin bei 37 °C und fünf Prozent CO₂ inkubiert. Der Medienwechsel erfolgte fünf Tage nach Anfertigung der Kulturen und anschließend alle zwei bis drei Tage, sowie einen Tag vor jeder Messung.

Tabelle 9: Herstellung einer Neurobasal plus Lösung (50 ml) als Nährmedium der Hippocampuskulturen.

Chemikalie	Volumen (ml)
Neurobasal (<i>Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts</i>)	49
B27 50x (<i>Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts</i>)	1
L-Glutamin	0,25
Penicillin/ Streptomycin (<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>)	0,1

2.3.3. Beschichtung der Multielektrodenarrays

Die Beschichtung der MEA-Chips erfolgte über zwei Tage mittels Poly-D-Lysin (PDL; *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*) und Laminin (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*). PDL ist eine Haftlösung, die zur Fixierung der Nervenzellen auf dem MEA-Chip eingesetzt wird. Es unterstützt die Zelladhäsion, das Wachstum,

sowie die Zelldifferenzierung. Laminin erleichtert als Glykoprotein ebenfalls die Zelladhäsion und sorgt zusätzlich für ein schnelleres Wachstum von Neuriten in Zellkulturen. Am ersten Tag wurden die MEA-Platten mit einem Milliliter einer PDL-Lösung (0,1 mg/ml PBS) befüllt, anschließend mit Paraffinfilm umwickelt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am zweiten Tag wurde das PDL wieder von den MEA-Platten entfernt. Dann wurden die MEA-Platten mit einem Milliliter H₂O gewaschen, um toxisches ungebundenes Lysin zu beseitigen. Anschließend wurden die MEA-Platten mit einem Milliliter PBS gewaschen und unter sterilen Bedingungen (UV-Strahlung) für etwa 30 Minuten an der Luft getrocknet. Danach wurden 15 µl Laminin (5 µg/ml HBSS) in die Mitte einer jeden MEA-Platte aufgetragen. Im Anschluss wurden diese erneut mit Paraffinfilm umwickelt und bei 4 °C bis zum Auftragen der Zellkultur aufbewahrt. Die maximale Aufbewahrungsdauer betrug sieben Tage.

2.3.4. Messung spontaner Netzwerkaktivität von primären hippocampalen Neuronenkulturen im Multielektrodenarray

Zum Vergleich der neuronalen Spontanaktivität von wildtypischen bzw. heterozygoten *Scn1a-L1649Q*-mutierten Nervenzellen wurden Kulturen aus embryonalen Hippocampusneuronen von Mäusen angefertigt und über einen Zeitraum von 21 Tagen *in vitro* (DIV) gemessen. Die Messungen erfolgten an den Tagen sieben, elf, 14 und 21 für jeweils vier Minuten bei einer Temperatur von 36 °C. Die ersten zwei Minuten dienten den Kulturen zur Gewöhnung an die veränderten Bedingungen und wurden nicht aufgezeichnet. Die zweiten zwei Minuten wurden dann aufgezeichnet. Das Nährmedium wurde an jedem dritten Tag ausgetauscht. An den Messtagen 14 und 21 wurde zusätzlich der Effekt von Phr-3 (*Alomone labs, Jerusalem*) in einer Konzentration von fünf und zehn Nanomolar auf die Spontanaktivität der Neuronen untersucht. Dabei erfolgte zunächst die Routinemessung über vier Minuten ohne Phr-3. Danach wurden wie in Abbildung 10 dargestellt zunächst 5 nM Phr-3 hinzugegeben und vier Minuten gemessen. Danach wurde nochmals bei 10 nM Phr-3 für vier Minuten gemessen. Dabei wurden jeweils nur die zweiten zwei Minuten aufgezeichnet. Nach der

letzten Messung wurde das Nährmedium der Kultur wieder gegen eine frische Neurobasal plus Lösung ersetzt.

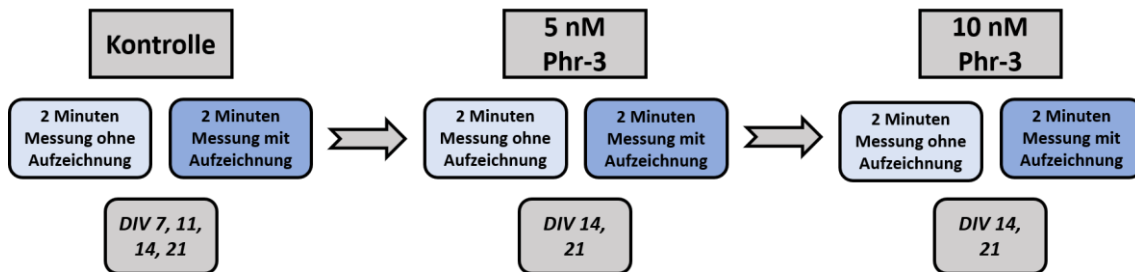


Abbildung 10: Versuchsablauf der Messungen im Multielektrodenarray an embryonalen wildtypischen bzw. heterozygoten *Scn1a-L1649Q*-mutierten Kulturen aus Hippocampusneuronen.

2.3.5. Messparameter zur spontanen Netzwerkaktivität von primären hippocampalen Neuronenkulturen im Multielektrodenarray

Die Erfassung der Netzwerkaktivität der jeweiligen Neuronenkultur erfolgte für zwei Minuten anhand von 60 Elektroden und wurde wie in Abbildung 11 dargestellt, in einem Spike-Raster-Plot bestehend aus einer Zeitachse (x-Achse) und einer Auflistung der einzelnen Elektrodennummern (y-Achse) aufgeführt. Jedes erfasste Aktionspotential wurde innerhalb dieses Spike-Raster-Plots durch ein Kreuz dargestellt. Bei einem schwarzen Kreuz lag das Aktionspotential außerhalb, bei einem blauen Kreuz innerhalb eines sogenannten Populationsbursts (PB). Als PB wurden Phasen definiert, in denen über mehreren Elektroden zeitgleich eine hohe Frequenz von Potentialänderungen detektiert wurden und demnach eine hohe Synchronität des neuronalen Netzwerks vorlag.

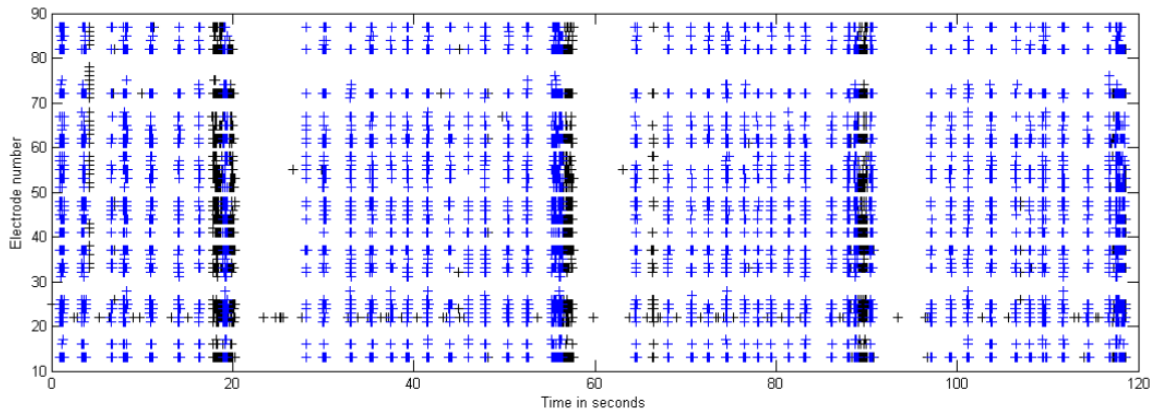


Abbildung 11: Beispielhafte Analyse einer zweiminütigen Messung zur Netzwerkaktivität einer primären hippocampalen Neuronenkultur.

y-Achse: Elektrodennummern, *x*-Achse: Zeit in Sekunden. Blaue Kreuze: Aktionspotentiale innerhalb eines PB, schwarze Kreuze: Aktionspotentiale außerhalb eines PB.

Die Aufzeichnungen wurden anhand der folgenden Parameter nach (Illes et al., 2009) analysiert:

Anzahl von Spikes

Die Summe aller registrierten Aktionspotentiale innerhalb einer zweiminütigen Messung.

Mittlere Populationsfeuerungsrate

Die Spikes aller Elektroden wurden in nicht-überlappende fünf Millisekunden Bereiche eingeteilt und mittels einer Gauß-Funktion mit einer Standardabweichung von 100 ms geglättet (Hedrich et al., 2014, Illes et al., 2009).

Anzahl von Populationsbursts

Die Summe aller errechneten PB innerhalb einer zweiminütigen Messung. Die Ermittlung von PB erfolgte, wenn die mittlere PFR innerhalb einer Sekunde überschritten wurde. Für die Bewertung als PB wurden drei Kriterien vorausgesetzt:

- i) Die maximale Feuerungsrate war um mindestens drei Standardabweichungen höher als die mittlere PFR,
- ii) die Feuerungsrate lag um zehn Prozent höher als der Durchschnitt der fünf höchsten Feuerungsraten,
- iii) eine zeitgleiche Aktivität von mindestens drei Elektroden wurde erfasst.

PB die weniger als 200 ms voneinander entfernt waren, wurden zu einem einzigen PB zusammengefasst (Hedrich et al., 2014, Illes et al., 2009).

Anzahl von Spikes in Populationsbursts in %

Der prozentuale Anteil aller erfassten Aktionspotentiale einer zweiminütigen Messung, die innerhalb eines PB lagen.

Mittlere Dauer eines Populationsbursts

Die durchschnittliche Dauer eines PB in Millisekunden innerhalb einer zweiminütigen Messung.

Interburstintervall

Die durchschnittliche Dauer zwischen zwei PB in Sekunden innerhalb einer zweiminütigen Messung.

Kappa

Kappa ist ein definierter Bereich von -1 bis +1 und dient als Synchronizitätsparameter des neuronalen Netzwerks. Der Wert wurde anhand aller Elektrodenpaare ermittelt, die wenigstens eine Frequenz von 30 Spikes pro Minute aufwiesen. Hierbei wurde in nicht-überlappenden Abständen von 10 ms überprüft, ob in diesem Zeitintervall Spikes von beiden Elektroden eines Elektrodenpaares, von nur einer Elektrode oder keiner der beiden Elektroden erfasst wurden und anhand der Korrelation die Synchronizität nach Kappa bestimmt (Hedrich et al., 2014).

2.4. Untersuchungen zum Einfluss von Phrixotoxin-3 auf mit Nav1.1- und Nav1.2-Kanälen transfizierte HEK-Zelllinien

2.4.1. Kultivierung der HEK-Zelllinien

Wir verwendeten eine *Human Embryonic Kidney* Zelllinie HEK-293 für die funktionelle Charakterisierung von neuronalen VGSC (Nav1.1 und Nav1.2), da sie einfach zu kultivieren und zu transfizieren sind. Nav1.1 wird insbesondere im Zellkörper inhibitorischer Interneurone exprimiert und ist somit für die Freisetzung von GABA relevant (Cestele et al., 2013, Catterall et al., 2008), während Nav1.2 zwar auch in inhibitorischen Neuronen exprimiert wird, jedoch hauptsächlich für die Aktivierung exzitatorischer Nervenzellen von Bedeutung ist (Ye et al., 2018). Wir verglichen den Einfluss von Phr-3 auf Zelllinien mit Expression der Kanaluntereinheiten Nav1.1 bzw. Nav1.2. Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte in T75 cm² Kulturflaschen, welche mit 12 ml DMEM+ (45 ml DMEM; *Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*, 5 ml FKS; *PAN-Biotech GmbH, Aidenbach*, 1 ml L-Glutamin; *Biochrom GmbH, Berlin*) befüllt wurden. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Ein Medienwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage. Nach Ausbildung eines gleichmäßigen Kulturrasens wurden die Zellen in eine neue T75 cm² Kulturflasche im Verhältnis 1:10 überführt.

2.4.2. *Glaspipetten für die Versuche an den HEK-Zelllinien*

Für die Versuche mit den transfizierten HEK-Zelllinien wurden ausschließlich dünnwandige GB150F-8P Kapillaren aus Borosilikatglas (Innendurchmesser: 0,86 mm, Außendurchmesser: 1,5 mm, Länge: 80 mm) verwendet. Aus jeweils einer Kapillare wurden mittels eines *P-97 Flaming/Brown Micropipette Pullers* (*Sutter Instrument, Novato, CA, USA*) zwei Pipetten hergestellt, welche unter einem *MF-79 Microforge* Mikroskops (*Narishige, Japan*) auf ihre Funktionalität geprüft wurden. Zur Optimierung der Messungen wurden bei den GB150F-8P Kapillaren nur Pipetten verwendet, deren Widerstand zwischen 1,0 und 2,5 MΩ lag.

2.4.3. *Messlösungen für die Versuche an den HEK-Zelllinien*

Die extrazelluläre Lösung repräsentierte das Umgebungsmilieu eines Nervenzellverbandes, während die intrazelluläre Lösung den Bedingungen im

Inneren einer Zelle entsprach. Da die Zellen sehr klein sind, kam es nach Durchbrechung der Zellmembran sehr rasch zum Austausch mit der Intrazellulärlösung im Inneren der Pipette. Dadurch entsprach das Innere der Zelle bereits nach kurzer Zeit den Werten der definierten zugeführten intrazellulären Lösung. Der pH-Wert beider Lösungen wurde mittels NaOH (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*) bzw. HCl (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*) auf 7,4 eingestellt. Die Osmolarität der extrazellulären Lösung wurde auf 300 mOsm/l und die der intrazellulären Lösung auf 290 mOsm/l eingestellt. Bei Abweichungen der Osmolarität wurde D-Mannitol (*AppliChem, Darmstadt*) zum Angleichen eingesetzt, wobei 0,0183 g auf 100 ml 1 mOsm/l entsprach. Die Protokolle zur Anfertigung der entsprechenden Lösungen sind in den Tabellen 10 und 11 aufgeführt. Die Aufbewahrung der Lösungen erfolgte bei 4 °C.

Tabelle 10: Protokoll zur Anfertigung eines 250 ml Vorrats an Intrazellulärlösung für die Messung an den HEK-Zelllinien.

Chemikalie	Konzentration (mM)
CsCl (<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>)	130
NaCl	5
MgCl ₂	2
EGTA	5
HEPES	10

Tabelle 11: Protokoll zur Anfertigung eines 1000 ml Vorrats an Extrazellulärlösung für die Messungen an den HEK-Zelllinien.

Chemikalie	Konzentration (mM)
NaCl	140
KCl	4
MgCl ₂	1
CaCl ₂ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)	2
HEPES	5
Glukose	4

2.4.4. Patch-Clamp-Setup zur Untersuchung des Einflusses von Phrixotoxin-3 auf Nav1.1- und Nav1.2-Kanäle

Der elektrophysiologische Messstand zu den Versuchen an den HEK-Zelllinien wurde in Abbildung 12 skizziert.

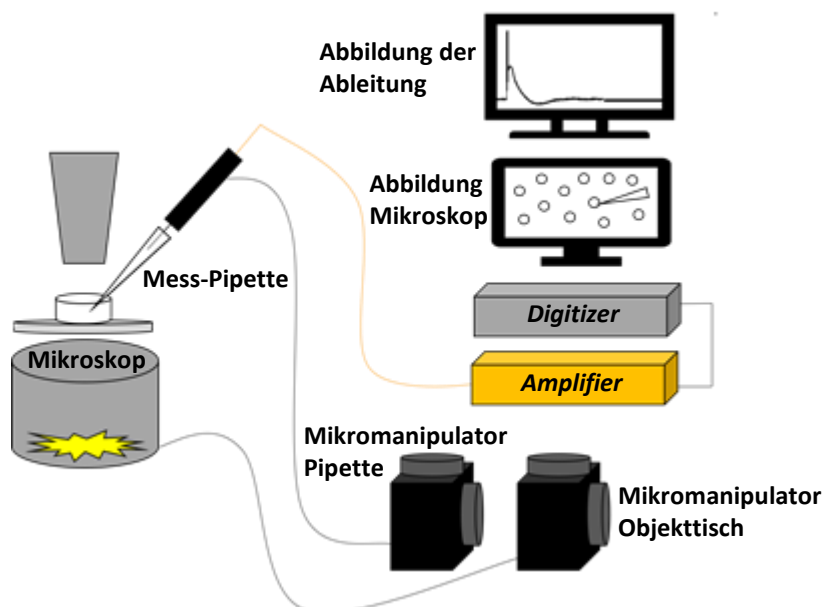


Abbildung 12: Patch-Clamp-Messstand für die Untersuchung des Einflusses von Phrixotoxin-3 auf Nav1.1- und Nav1.2-Kanäle.

Leica Lichtmikroskop (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) im Zentrum abgebildet (grau und gelb), dessen vergrößerte Bilder auf einen Bildschirm übertragen wurden (unterer Bildschirm). Die Pipette, welche mit einem CV203BU Vorverstärker (Molecular Devices, Sunnyvale, California) ausgestattet war, diente dem Ableiten der HEK-Zellen und war mit einem Axopatch 200B Amplifier (orangener Kasten; Molecular Devices, Sunnyvale, California) verbunden. Dieser war wiederum mit einem Digidata 1440A Digitizer (Molecular Devices, Sunnyvale, California) verbunden (grauer Kasten), welcher für die graphische Umwandlung der Messung (oberer Bildschirm) sorgte. Über je einen Mikromanipulator (Scientifica East Sussex, UK) konnten zum einen der Objektisch (rechter Manipulator; schwarzer Kasten) und zum anderen die Pipette (linker Manipulator) bewegt werden.

2.4.5. Experimenteller Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses von Phrixotoxin-3 auf Nav_v1.1- und Nav_v1.2-Kanäle

Für die Experimente mittels *Patch-Clamp*-Technik wurden die Zellen vereinzelt und einige Tropfen der Lösung in Kulturschalen von 35 mm Durchmesser und einer Füllmenge von zwei ml DMEM+ übertragen. Diese wurden dann für wenige Stunden im Inkubator kultiviert und konnten anschließend für die Messungen verwendet werden.

Die Messungen dienten der vergleichenden funktionellen Charakterisierung der in HEK-Zelllinien transfizierten neuronalen VGSC Nav_v1.1 und Nav_v1.2 unter der Einwirkung des Spinnentoxins Phr-3. Hierzu wurden Messungen in der *Whole-Cell*-Konfiguration ohne Zugabe des Spinnentoxins und mit Konzentrationen von 10 nM und 100 nM des Phr-3 durchgeführt. Die Wirkung des Toxins wurde anhand der Stromdichte, der Aktivierung und der Inaktivierung überprüft.

2.4.6. Messparameter zur Untersuchung des Einflusses von Phrixotoxin-3 auf Nav_v1.1- und Nav_v1.2-Kanäle

Aktivierungskurve

Die Aktivierungskurve stellt das Verhältnis der Spannung zur Leitfähigkeit dar und wurde über die Messung des Maximalstroms an verschiedenen

Spannungspunkten ermittelt. Die Messung erfolgte von -105 mV bis 30 mV und die Spannung wurde dabei in Schritten von 7,5 mV erhöht. Die Strom-Spannungskurve wurde durch die Aufzeichnung des Maximalstroms eines jeden Spannungssprungs gegen die Spannung erhalten. Nach der Normierung der maximalen Stromamplitude wurden die Werte mittels folgender Boltzmann-Funktion gefittet:

$$I(V) = \frac{g \cdot (V - V_{rev})}{\{1 + \exp[(V - V_{1/2}) / k_V]\}}$$

mit I als gemessene Stromamplitude bei dem Testpotential V , V_{rev} als Umkehrpotential, g als Leitfähigkeit, $V_{1/2}$ als Spannung der halbmaximalen Aktivierung (Hälfte aller Natriumkanäle geöffnet) und k_V als Steigungsfaktor.

Die Berechnung der Leitfähigkeit erfolgte anhand des beobachteten Umkehrpotentials:

$$g(V) = \frac{I}{(V - V_{rev})}$$

mit I als gemessene Stromamplitude bei dem Testpotential V , V_{rev} als Umkehrpotential, g als Leitfähigkeit (Hedrich et al., 2014).

Zur Darstellung der Aktivierungskurve wurde die Leitfähigkeit gegen die Spannung aufgetragen und die Datenpunkte durch folgende Boltzmann-Verteilung gefittet:

$$g(V) = \frac{g_{max}}{\{1 + \exp[(V - V_{1/2}) / k_V]\}}$$

mit g als Leitfähigkeit bei Testpotential V , $V_{1/2}$ als Spannung der halbmaximalen Aktivierung, g_{max} als maximale Leitfähigkeit und k_V als Steigungsfaktor (Hedrich et al., 2014).

Die Stromdichte (pA/pF) errechnete sich aus dem Quotienten der maximalen Amplitude (pA) des Natriumstroms und der Kapazität (pF) der Zelle und wurde ebenfalls gegen die Spannung aufgetragen.

Inaktivierungskurve

Zur Bestimmung der Inaktivierungskurve wurde ein Messprotokoll verwendet, bei dem die Zelle durch variierende Spannungssprünge beginnend von -170 mV bis zuletzt -27,5 mV depolarisiert wurde, die sich schrittweise um 7,5 mV erhöhten. Nach jedem Spannungssprung folgte jeweils ein zweiter, depolarisierender Testpuls auf -20 mV. Dieser lag im Bereich des maximalen Einwärtsstroms, bei dem nahezu alle aktivierbaren Natriumkanäle geöffnet werden. Je größer die hervorgerufene Inaktivierung der ersten Depolarisation war, umso niedriger fiel die Amplitude des erzeugten Natriumstroms während der zweiten Depolarisation aus.

Ähnlich wie bei der Aktivierungskurve wurden die Datenpunkte der Inaktivierung durch folgende Boltzmann-Verteilung gefittet:

$$I(V) = \frac{I_{\max}}{\{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k_v]\}}$$

mit I als Stromamplitude bei der konditionierenden Spannung V , I_{\max} als maximale Stromamplitude, $V_{1/2}$ als Spannung der halbmaximalen Inaktivierung und k_v als Steigungsfaktor (Hedrich et al., 2014).

2.5. *Auswertung und Statistik*

Die Aufzeichnung der MEA-Versuche erfolgte über MC_Rack (*Multi Channel Systems MCS GmbH, USA*), während die Berechnung der Parameter über die SPANNER Software erfolgten (Hedrich et al., 2014). Die Aufzeichnung der Versuche mittels *Patch-Clamp*-Technik erfolgte über die pClamp-Software (*Molecular Devices, LLC, USA*). Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von Clampfit 10.7, Microsoft Excel 2016 (*Microsoft Corporation, USA*) und Gnuplot 5.2. Die Erstellung der Grafiken erfolgte überwiegend mit dem Programm Origin6.1 (*OriginLab Corporation, Northampton, USA*), einige der Abbildungen wurden mit Hilfe von Microsoft Word 2016 (*Microsoft Corporation, USA*) und Microsoft PowerPoint 2016 (*Microsoft Corporation, USA*) angefertigt. Die Software SigmaPlot 12.0 (*Systat Software GmbH, Deutschland*) wurde zur statistischen Auswertung der Daten verwendet. Der Vergleich unpaarer, nicht-normalverteilter Datensätze erfolgte durch einen Rangsummentest. Die Graphiken zur CSD wurden trotz einer Normalverteilung der Datensätze, aufgrund der geringen Fallzahl mittels Boxplot und Rangsummentest dargestellt. Um mehr als zwei Datensätze miteinander zu vergleichen, wurden ein ANOVA *on Ranks* und ein post hoc Dunns Test durchgeführt. Die Signifikanzen wurden in den Grafiken anhand von Sternchen (*) aufgeführt (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$). Die Kurven zur Stromdichte, Aktivierung und Inaktivierung wurden mit Mittelwerten \pm Standardfehler (SEM = *Standard error of the mean*) angegeben, die Boxplots wurden mit Median (Querstrich), Mittelwert ($^{\circ}$), oberem und unterem Quartil, oberem und unterem „Whisker“ sowie Minimum und Maximum ($^{\times}$) dargestellt.

Es gilt zu beachten, dass die ausgeschriebenen Mediane unter den abgebildeten Graphiken im Ergebnisteil bei gerader Stichprobenanzahl nicht exakt mit den graphisch dargestellten Medianen übereinstimmen. Dies liegt daran, dass die verwendete Software für die Graphikerstellung „Origin6.1“ bei einem Datensatz mit gerader Anzahl den Obermedian ermittelte, während bei der statistischen Auswertung mittels SigmaPlot 12.0 bei gerader Anzahl das arithmetische Mittel der beiden mittleren Beobachtungswerte bestimmt wurde.

3. Ergebnisse

3.1. *Untersuchungen zur CSD und spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingängen wildtypischer und heterozygoter Scn1a-L1649Q-mutierter Mäuse in akuten Hirnschnitten*

Um den Effekt der Mutation hinsichtlich der Suszeptibilität gegenüber einer CSD und die Auswirkungen der Mutation auf die Aktivität inhibitorischer Neurone zu untersuchen, erfolgten Messungen mittels *Patch-Clamp* an akuten Hirnschnitten von wildtypischen und heterozygoten *Scn1a-L1649Q* mutierten Jungtieren eines *knock-in* Mausmodells. In einem ersten Schritt erfolgte die Ableitung von Pyramidenzellen der fünften Hirnschicht, um anschließend deren Spannungsänderung nach lokaler Applikation einer 3 M KCl Lösung zu bestimmen, um so das Auftreten einer CSD zu registrieren. Der Versuchsaufbau orientierte sich an der in Tottene et al. beschriebenen Messung einer experimentell ausgelösten CSD mittels KCl in einem Mausmodell für FHM1 (Tottene et al., 2009). Analysiert wurden der Schwellenwert einer CSD (siehe Abbildung 13) und die Dauer einer CSD (siehe Abbildung 14) vom Beginn der Depolarisation bis zum Wiedererlangen des Ruhemembranpotentials. In einem zweiten Schritt wurden ebenfalls Pyramidenzellen der fünften Hirnschicht abgeleitet. Hier wurden nun jedoch isoliert die zu registrierenden spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingänge hinsichtlich ihrer gemittelten Amplitude (siehe Abbildung 15) und ihrer durchschnittlichen Frequenz (siehe Abbildung 16) aufgezeichnet.

3.1.1. *Untersuchung des Schwellenwertes bis zur Auslösung einer CSD*

Der genaue Versuchsaufbau ist unter Abschnitt 2.2.8. beschrieben. In Abbildung 7 (siehe Abschnitt 2.2.7.) ist das Setup der Untersuchung dargestellt. Die Applikation der 3 M KCl-Lösung erfolgte mit Hilfe einer Hochdruckpumpe. Die Applikation erfolgte mit einem konstanten Druck von 0,5 bar und einer manuell variabel einstellbaren Zeit in Millisekunden. Über einen schrittweisen Anstieg (25 ms) der Applikationsdauer wurde der Schwellenwert bis zu Auslösung einer CSD

für jede abgeleitete Pyramidenzelle ermittelt. Zwischen zwei Pulsabgaben wurden mindestens acht Minuten Abstand eingehalten, um eine Regeneration der Zelle und des Schnittes zu ermöglichen und die Ausgangskonzentration des Kaliums der aCSF wiederzuerlangen. Eine *CSD* wurde von uns als eine Depolarisationswelle definiert, auf die eine langanhaltende Repolarisation und eine Hyperpolarisation von wenigstens -2 mV gegenüber dem Ausgangspotential (Ruhemembranpotential vor Auslösung einer *CSD*) folgten.

In Abbildung 13 wurde der Schwellenwert für das Erreichen einer definierten *CSD* in akuten Hirnschnitten wildtypischer (WT) und heterozygoter (HET) Tiere in Form eines Boxplots dargestellt. Hierbei fiel der Median des Schwellenwerts bei den HET (212,5 ms) niedriger aus als der Median der WT (250 ms). Aufgrund einer geringen Fallzahl (fünf Zellen bei den WT gegenüber acht Zellen bei den HET) ergab sich hieraus jedoch kein signifikanter Unterschied ($p = 0,222$). Das obere Quartil der HET (243,75) befand sich noch unterhalb des Medians der WT (250 ms) und das Maximum der HET (250 ms) lag auf Höhe des Medians der WT. Bei den HET ergab sich ein Minimum von 75 ms gegenüber einem Minimum von 175 ms bei den WT.

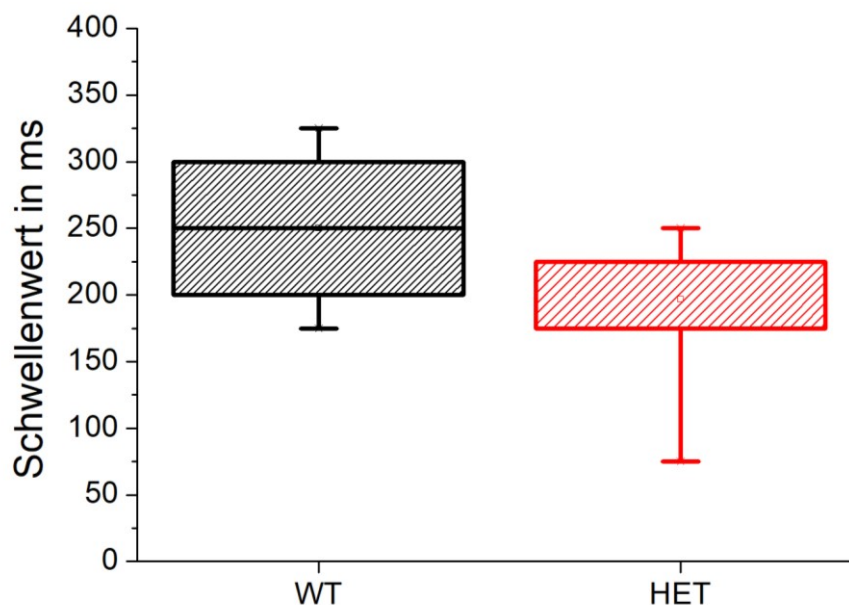


Abbildung 13: Schwellenwert (ms) bis zur Auslösung einer CSD in kortikalen Pyramidenzellen von wildtypischen (schwarz, n= 5) und heterozygoten *Scn1a-L1649Q*-mutierten (rot, n= 8) Mäusen.

Boxplot mit Median, Mittelwert ($^{\circ}$), oberes und unteres Quartil, oberer und unterer „Whisker“ mit Minimum und Maximum. Median (250 / 212,5), Interquartilsabstand (187,5 bis 312,5 / 175 bis 243,75), $p = 0,222$ im Rangsummentest.

3.1.2. Untersuchung zur Dauer einer CSD

In Abbildung 14 wurde die durchschnittliche Dauer einer CSD in Sekunden (s) bei kortikalen Pyramidenzellen der fünften Hirnschicht aus akuten Hirnschnitten von wildtypischen und heterozygoten *Scn1a-L1649Q*-mutierten knock-in Mäusen in Form eines Boxplots abgebildet. Der Median zur Dauer einer CSD lag bei den WT (200 s) und den HET (199,5) auf nahezu gleicher Höhe. Die Spannweite fiel mit einem Minimum von 108 s bis zu einem Maximum von 380 s bei den HET deutlich größer aus als die der WT (131 bis 247 s). Insgesamt ergab sich anhand des Rangsummentests ($p = 0,943$) kein Anhalt dafür, dass die *Scn1a-L1649Q*-Mutation zu einer länger anhaltenden CSD führen könnte.

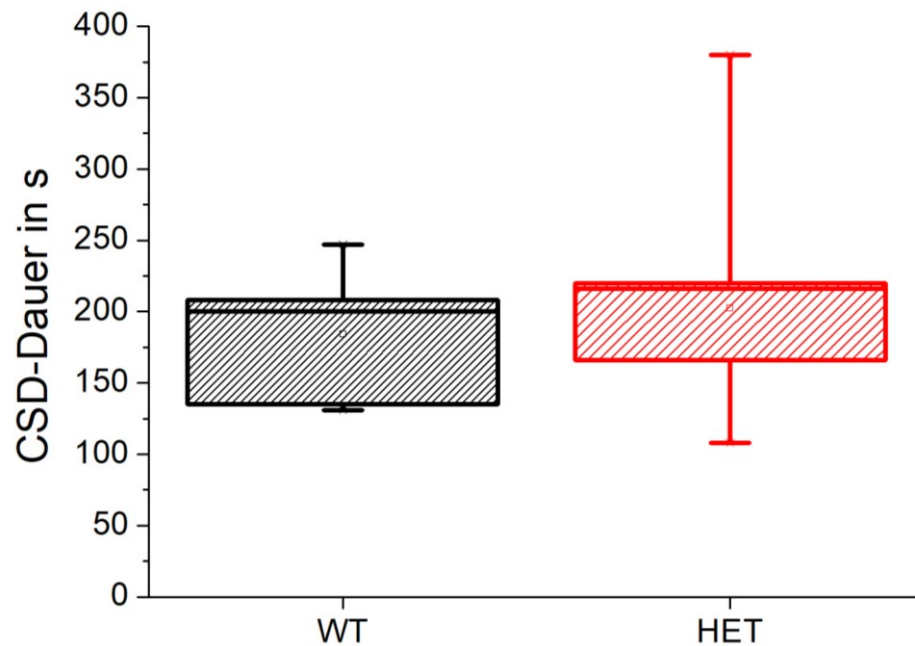


Abbildung 14: Dauer (s) einer CSD in kortikalen Pyramidenzellen von wildtypischen (schwarz, n= 5) und heterozygoten Scn1a-L1649Q-mutierten (rot, n= 8) Mäusen.

Boxplot mit Median, Mittelwert ($^{\circ}$), oberes und unteres Quartil, oberer und unterer „Whisker“ mit Minimum und Maximum. Median, Interquartilsabstand, Median (200 / 199,5), Interquartilsabstand (133 bis 227,5 / 124,75 bis 231,25), $p = 0,943$ im Rangsummentest.

3.1.3. Untersuchung der spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingänge kortikaler Pyramidenzellen

In diesem Abschnitt erfolgte die vergleichende Untersuchung von sIPSC kortikaler Pyramidenzellen in akuten Hirnschnitten aus Jungtieren wildtypischer und heterozygoter Scn1a-L1649Q-mutierter Mäuse mittels *Patch-Clamp*-Methode. Untersucht wurden die Amplitude [pA] und die Frequenz [Hz] der sIPSC. Zur Messung der sIPSC wurden die AMPA-Rezeptoren und Kainat-Rezeptoren unter Zugabe von NBQX (10 μ M) und die NMDA-Rezeptoren durch die Zugabe von APV (30 μ M) blockiert. Die Untersuchungsdaten hierzu wurden bereits in Auffmanberg et al., 2021 veröffentlicht.

In den Amplituden der sIPSC der WT und der HET ergaben sich, wie in einem Boxplot in Abbildung 15 graphisch dargestellt, keine wesentlichen Unterschiede. Der Median der Amplitude war bei den WT (-67,17 pA) gegenüber den HET (-68,42 pA) geringfügig positiver. Der Interquartilsabstand fiel bei den HET (-140,10 bis -22,76) dagegen deutlich größer aus als bei den WT (-94,09 bis -46,16), wogegen die Spannweite wiederum ähnlich breit ausfiel. Mit einem p von 0,676 ergab sich entsprechend kein signifikanter Unterschied der jeweiligen Amplituden von sIPSC (Auffenberg et al., 2021).

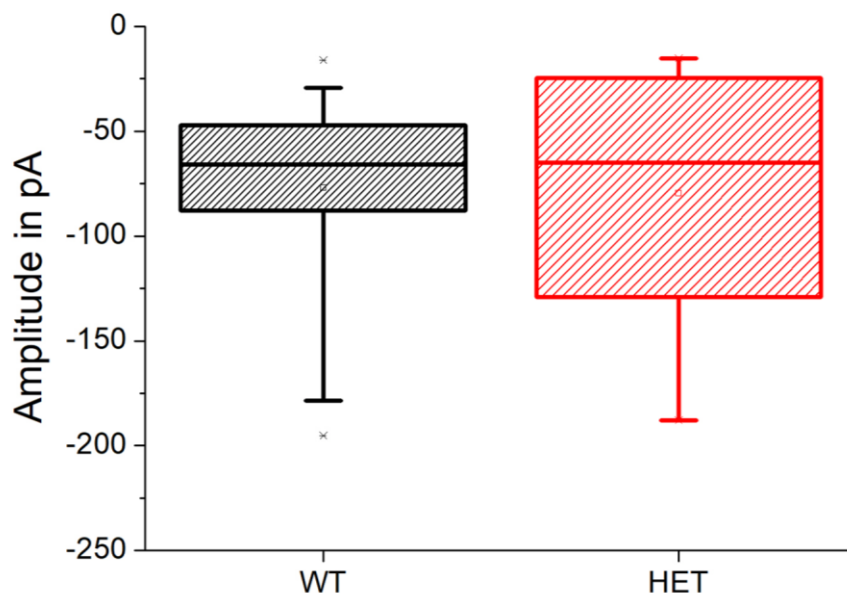


Abbildung 15: Amplitude [pA] der spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingänge bei kortikalen Pyramidenzellen von wildtypischen (WT, schwarz, n = 20) und heterozygoten (HET, rot, n = 10) Mäusen.

Boxplot mit Median, Mittelwert ($^{\circ}$), oberes und unteres Quartil, oberer und unterer „Whisker“ mit Minimum und Maximum ($^{\times}$). Median (-67,17 / -68,42), Interquartilsabstand (-94,09 bis -46,16 / -140,10 bis -22,76), p = 0,676 im Rangsummentest verändert nach (Auffenberg et al., 2021).

Bei der Frequenz der sIPSC ergab sich dagegen mit einem p von 0,015 ein signifikanter Unterschied zwischen den WT und den HET, wonach die Frequenz der HET signifikant höher ausfiel (Auffenberg et al., 2021). Der Median der

Frequenz von sIPSC lag bei den HET (25,36 Hz) gegenüber den WT (17,23 Hz) um 47 % höher. Die oberen 75% der HET befanden sich im Bereich des oberen Whiskers bzw. im Bereich der oberen 25 % der WT.

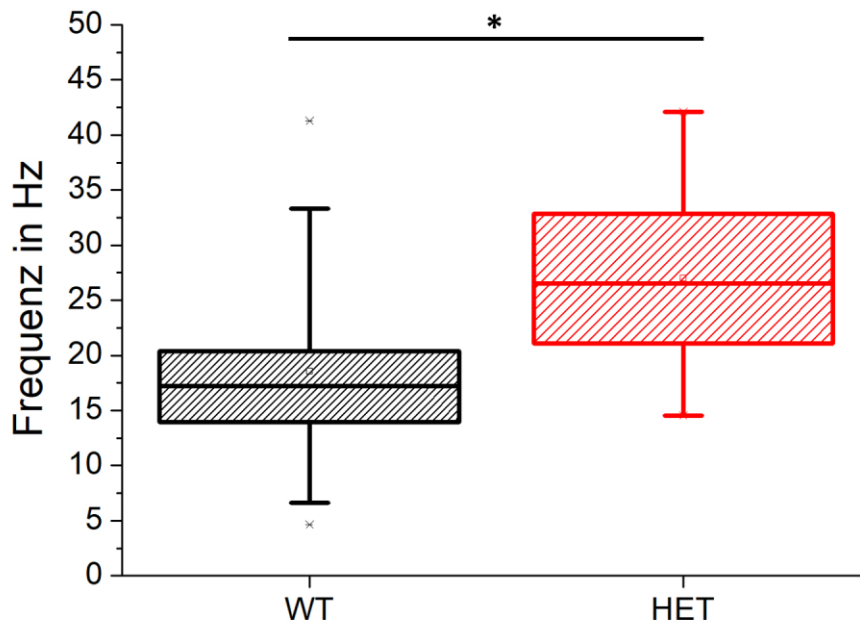


Abbildung 16: Frequenz [Hz] der spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingänge bei kortikalen Pyramidenzellen von wildtypischen (WT, schwarz, $n = 21$) und heterozygoten (HET, rot, $n = 10$) Mäusen.

Boxplot mit Median, Mittelwert ($^{\circ}$), oberes und unteres Quartil, sowie Minimum und Maximum ($^{\times}$). Median (17,23 / 25,36), Interquartilsabstand (13,05 bis 21,59 / 20,28 bis 34,33), $*p = 0,015$ im Rangsummentest verändert nach (Auffenberg et al., 2021).

In Abbildung 17 wurde ein Ausschnitt einer Aufzeichnung der sIPSC bei kortikalen Pyramidenzellen aus akuten Hirnschnitten von wildtypischen und heterozygoten *Scn1a-L1649Q*-mutierten Mäusen exemplarisch dargestellt, siehe auch in Auffenberg et al., 2021. Hier lässt sich bereits in der Aufzeichnung erkennen, was sich in den Auswertungen zur Amplitude und zur Frequenz der sIPSC bestätigte, und zwar, dass sich in der Amplitude der sIPSC zwischen den WT und den HET kein wesentlicher Unterschied ergab, während die Frequenz

der sIPSC bei den Pyramidenzellen der HET signifikant höher lag als bei den WT (siehe Abbildungen 15 und 16).

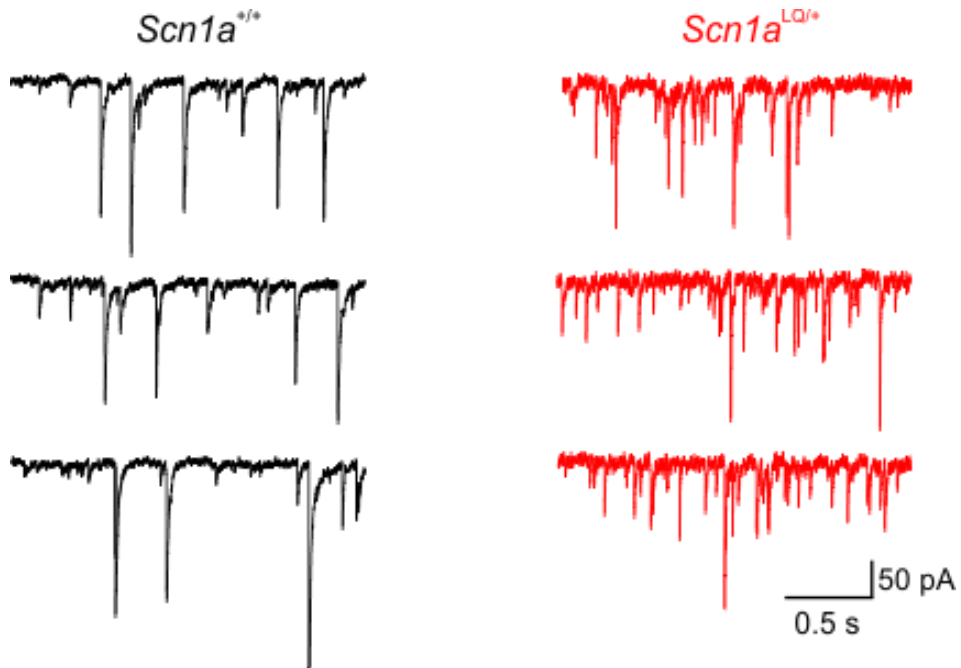


Abbildung 17: Aufzeichnung von spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingängen kortikaler Pyramidenzellen bei wildtypischen (schwarz) und heterozygoten (rot) Mäusen verändert nach (Auffenberg et al., 2021).

3.2. Untersuchung zur Netzwerkaktivität von primären hippocampalen Neuronenkulturen wildtypischer und heterozygoter *Scn1a-L1649Q*-mutierter Mäuse im Multielektrodenarray

Im MEA wurde die Netzwerkaktivität von primären hippocampalen Neuronenkulturen wildtypischer Mäuse mit denen heterozygoter *Scn1a-L1649Q*-mutierter Mäuse anhand verschiedener Parameter (siehe Abschnitt 2.3.5.) über einen Zeitraum von 21 Tagen nach *In-vitro*-Kultivierung (DIV 21) untereinander verglichen. Da aus den eigens angefertigten Messungen ein Ungleichgewicht an heterozygoten und wildtypischen Tieren zu Ungunsten der WT entstand, wurde zur Generierung einer größeren Stichprobe für die wildtypischen Mäuse zusätzlich auf Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zurückgegriffen (n=11), bei der nach gleichen Bedingungen ebenfalls die Netzwerkaktivität über 21 Tage betrachtet worden war. Die Vorarbeit erfolgte an dem gleichen transgenen Mausmodell und befasste sich mit der Fragestellung, welchen Einfluss Lamotrigin auf die Netzwerkaktivität der Kulturen hat. In dieser Arbeit wurde nur auf die Messdaten ohne Zugabe von Lamotrigin zurückgegriffen, welche ebenfalls an den Tagen 11, 14 und 21 über zwei Minuten erfolgt waren. Die Messungen der heterozygoten Mäuse wurden allesamt eigens angefertigt. Die Messung der Spontanaktivität erfolgte an 11, 14 und 21 DIV über eine Dauer von vier Minuten, von denen nur die letzten zwei Minuten aufgezeichnet und ausgewertet wurden.

In Abbildung 18 wurde die Anzahl aller über einen Zeitraum von zwei Minuten registrierten Spikes der Kulturen aus WT-Tieren (schwarz) und der Kulturen, welche aus heterozygoten Embryonen gewonnen wurden (rot) an den Messtagen DIV 11, 14 und 21 anhand eines Boxplots dargestellt. Bei den Kulturen, welche aus WT-Föten gewonnen wurden, war ein kontinuierlicher Anstieg des Medians erkennbar, während der Median bei den Kulturen aus HET-Föten nach DIV 14 zu fallen begann. Als Interquartilsabstand bezeichnet man den Bereich, in dem sich die mittleren 50 % der Daten befinden (gekennzeichnet durch die schraffierte Box). Der Interquartilsabstand war bei den Kulturen der WT-Embryonen deutlich breiter als bei den Kulturen aus den HET-Föten. Der

Median lag bei den WT an DIV 11 und DIV 21 höher, während der Median an DIV 14 bei den HET höher war. Insgesamt zeigte sich eine starke Schwankungsbreite in der Anzahl von Spikes von unter 1000 bis zu 20.000 Spikes. Es ergab sich weder zwischen den einzelnen Messtagen noch zwischen den Kulturen der WT- und HET-Tiere ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an Spikes ($p = 0,450$).

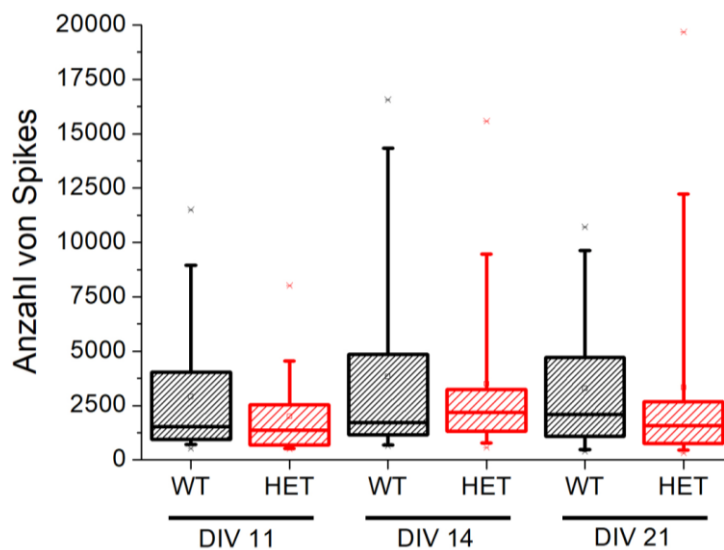


Abbildung 18: Aufzeichnung der Netzwerkaktivität von primären hippocampalen Neuronenkulturen von wildtypischen (schwarz, $n = 23$) und heterozygoten (rot, $n = 20$) Mäusen anhand der Gesamtanzahl an Spikes im Verlauf von 21 Tagen in vitro (DIV).

Gemessen wurde an den Tagen DIV 11, 14 und 21. Die Aufzeichnungsdauer betrug 2 Minuten. In den folgenden Graphen wurden unter gleichbleibenden Bedingungen verschiedene Parameter beobachtet, wobei die Farbkodierung in den Abbildungen beibehalten wurde. Angegeben wurden Median, Mittelwert ($^{\circ}$), oberes und unteres Quartil, sowie Minimum und Maximum (*). Signifikanztest: ANOVA on Ranks ($p = 0,450$) mit post hoc Dunn's Test ($*p < 0,05$).

DIV 11: Median (1540 / 1080), DIV 14: Median (1717 / 1994), DIV 21: Median (2081 / 1579).

In Abbildung 19 wurde die Anzahl aller über einen Zeitraum von zwei Minuten registrierten Populationsbursts (PB) analysiert. Sowohl bei den Kulturen aus den WT-Embryonen als auch bei den Kulturen der HET-Tiere lag der Median an DIV 11 (17 vs. 20) am höchsten. Hieraus lässt sich folgern, dass die Synchronizität des Netzwerks kontinuierlich abnahm. Bei den Kulturen der HET ergab sich zudem mit der Zunahme der DIV ein zunehmender Abfall des Medians der PB, während der Median bei den WT an DIV 21 gegenüber DIV 14 nochmals leicht anstieg, sodass an DIV 21 der Median bei den WT (14) erstmals knapp über dem der HET (13) lag. Der Interquartilsabstand und die Spannweite waren sowohl bei den WT als auch bei den HET-Tieren an DIV 14 am größten und der Interquartilsabstand war an den einzelnen DIV jeweils bei den HET breiter als bei den WT. Im paarweisen Vergleich mittels post-hoc Dunn's Test ergab sich für keine der Gruppen ein signifikanter Unterschied.

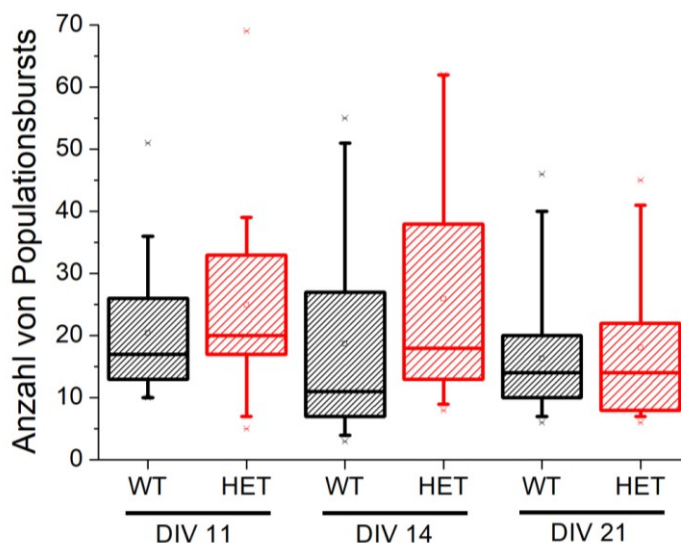


Abbildung 19: Anzahl an Populationsbursts.

Boxplot mit Median, Mittelwert ($^{\circ}$), oberes und unteres Quartil, sowie Minimum und Maximum ($^{\times}$). Signifikanztest: ANOVA on Ranks ($p = 0,039$) mit post hoc Dunn's Test ($*p < 0,05$). DIV 11: Median (17 / 20), DIV 14: Median (11 / 18), DIV 21: Median (14 / 13).

Abbildung 20 zeigt den prozentualen Anteil aller Spikes, die innerhalb eines Populationsbursts (PB%) stattgefunden haben im zeitlichen Verlauf über 21 DIV. Weder bei den Medianen noch bei den Interquartilsabständen ergaben sich wesentliche Unterschiede zwischen den Kulturen aus WT-Tieren und denen aus HET-Tieren. Der größte Unterschied zeigte sich an DIV 21 mit einem Median von 64,1 % bei den Kulturen der heterozygoten Tiere gegenüber 54,8 % bei den Kulturen der wildtypischen Tiere, während der Median der PB% an DIV 11 und DIV 14 bei den WT-Tieren jeweils höher lag als bei den HET-Tieren. Insgesamt wurde jedoch kein signifikanter Unterschied registriert ($p = 0,513$).

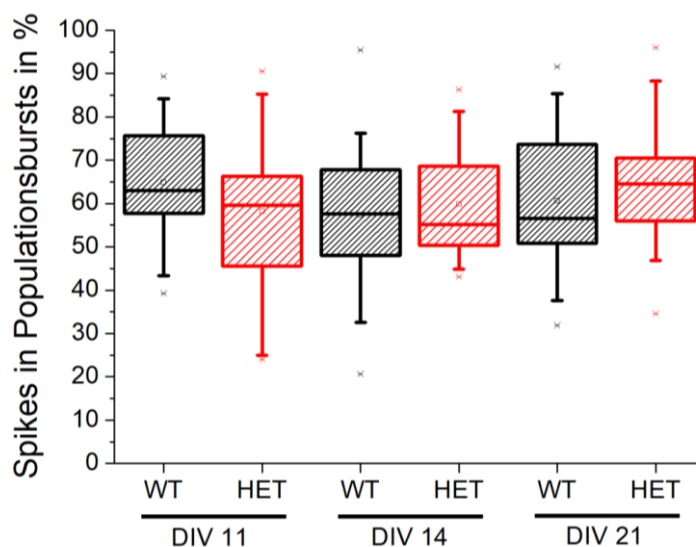


Abbildung 20: Anzahl aller Spikes innerhalb von Populationsbursts in Prozent (%).

Boxplot mit Median, Mittelwert ($^{\circ}$), oberes und unteres Quartil, sowie Minimum und Maximum ($^{\times}$). Signifikanztest: ANOVA on Ranks ($p = 0,513$). DIV 11: Median (62,7 / 58,8), DIV 14: Median (59,3 / 54,3), DIV 21: Median (54,8 / 64,1).

Abbildung 21 zeigt die über einen Zeitraum von zwei Minuten registrierte mittlere Populationsburstdauer [s] der Kulturen aus WT-Embryonen (schwarz) und der Kulturen, die aus HET-Föten gewonnen wurden (rot) an den Messtagen DIV 11, 14 und 21. Hier wird deutlich, dass die mittlere Burstdauer (mBD) bei den Kulturen der WT-Embryonen über die gesamte Zeit im Wesentlichen konstant war, was sich sowohl im Median als auch in den einzelnen Interquartilsabständen

und der Spannweiten widerspiegelt. Bei den Kulturen aus den Hippocampi der HET-Föten war die Schwankungsbreite dagegen größer. An DIV 11 und DIV 14 war der Median der WT-Tiere größer, während an DIV14 der Median der HET-Tiere höher lag. Bezüglich des Medians ergaben sich dennoch weder zwischen den einzelnen DIV noch zwischen den Kulturen der WT- und der HET-Embryonen signifikante Unterschiede.

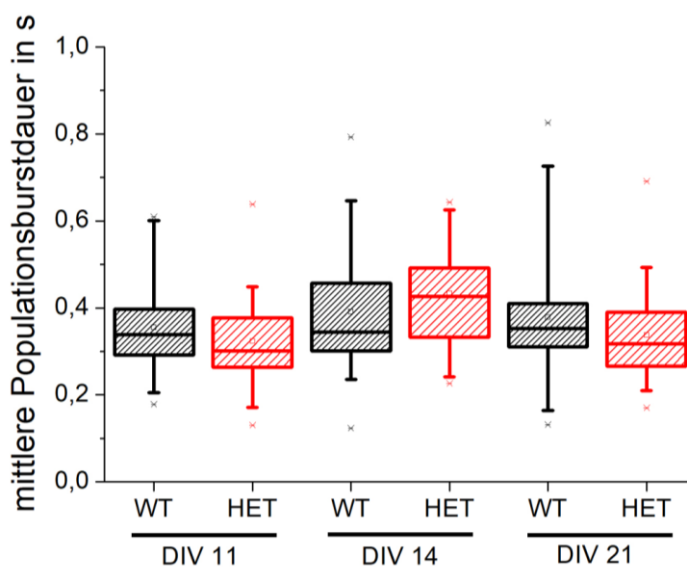


Abbildung 21: Mittlere Dauer eines Populationsbursts in Sekunden (s).

Boxplot mit Median, Mittelwert ($^{\circ}$), oberes und unteres Quartil, sowie Minimum und Maximum (*). Signifikanztest: ANOVA on Ranks ($p = 0,051$) mit post hoc Dunn's Test ($\ast p < 0,05$). DIV 11: Median (0,34 / 0,29), DIV 14: Median (0,35 / 0,43), DIV 21: Median (0,35 / 0,32).

In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass der Median des mittleren Interburstintervalls [s] bei den Kulturen wildtypischer Tiere (schwarz) stark schwankte und an DIV 14 (10,8) am höchsten war, während der Median bei den Kulturen der heterozygoten Tiere (rot) kontinuierlich zunahm und mit einem Median von 8,9 s an DIV 21 den Höchststand erreichte. Hieraus lässt sich ableiten, dass insbesondere bei den HET-Tieren das Auftreten von PB kontinuierlich abnahm, was sich auch in Abbildung 19 widerspiegelte.

Insgesamt war die Schwankungsbreite bei den Kulturen der wildtypischen Föten höher, was sich insbesondere an DIV 14 zeigte. Ein signifikanter Unterschied konnte weder für die einzelnen Messtage noch für die Kulturen wildtypischer und heterozygoter Tiere untereinander festgestellt werden ($p = 0,069$).

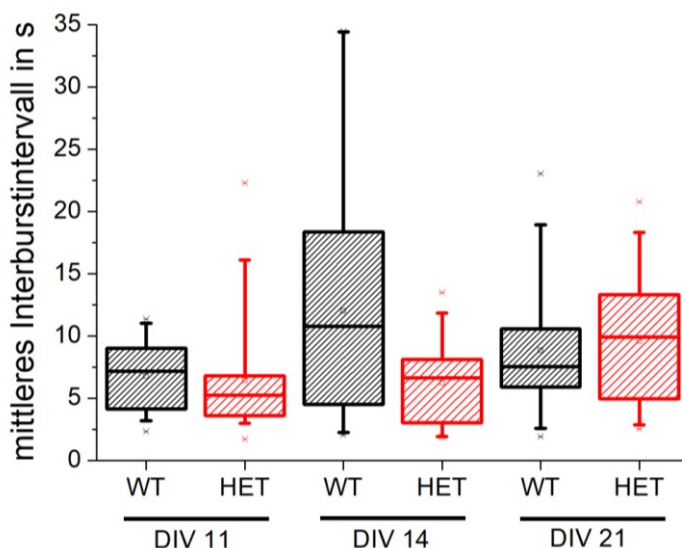


Abbildung 22: Zeitspanne zwischen zwei Populationsbursts in Sekunden (s).

Boxplot mit Median, Mittelwert ($^{\circ}$), oberes und unteres Quartil, sowie Minimum und Maximum ($^{\times}$). Signifikanztest: ANOVA on Ranks ($p = 0,069$) mit post hoc Dunn's Test ($*p < 0,05$). DIV 11: Median (7,2 / 5,3), DIV 14: Median (10,8 / 6,6), DIV 21: Median (7,6 / 8,9).

In Abbildung 23 wurde die mittlere Spitzenfeuerungsrate [Hz] eines PB der Kulturen wildtypischer (schwarz) und heterozygoter (rot) Tiere an den Messtagen DIV 11, 14 und 21 dargestellt. Der Median der mittleren Spitzenfeuerungsrate (mPFR) stieg bei beiden Kulturen im Verlauf von 21 DIV kontinuierlich an, sodass sich das jeweilige Maximum somit an DIV 21 befand. Für beide Kulturen ergab sich an DIV 21 gegenüber DIV 11 ein Anstieg von mindestens 100 Hz. Der größte Unterschied innerhalb eines Messtages zeigte sich an DIV 14 mit einem Median von 244 Hz bei den Kulturen wildtypischer Embryonen gegenüber 142 Hz bei den Kulturen heterozygoter Föten. Allerdings fand sich hierbei keine signifikante Differenz im post hoc Dunns Test. Auffallend war zudem, dass der Median der

mPFR bei den Kulturen der wildtypischen Tiere an allen drei Messtagen höher lag als bei denen der heterozygoten Tiere. Im ANOVA *on Ranks* ergab sich ein signifikanter Unterschied von $*p = 0,007$. Im paarweisen Vergleich der Einzelgruppen mittels post-hoc Dunn's Test ergab sich, dass die mPFR der Kulturen aus heterozygoten Embryonen an DIV 11 gegenüber der mPFR der Kulturen aus wildtypischen Föten an DIV 14 und DIV 21 signifikant niedriger war.

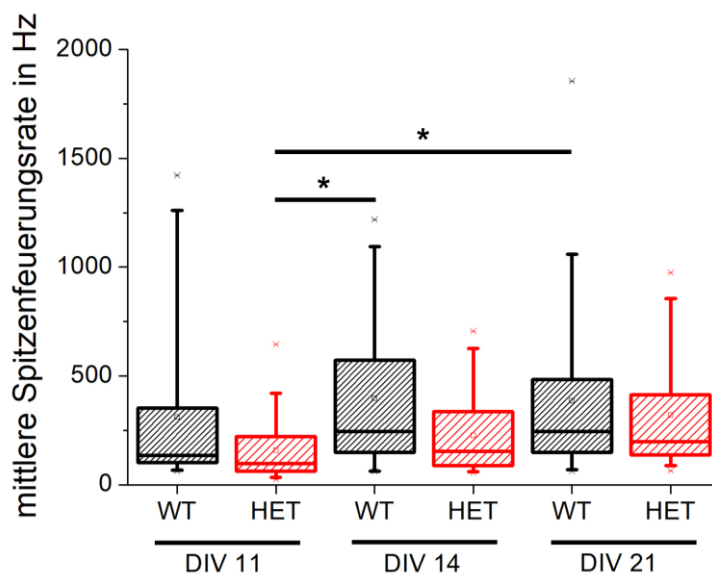


Abbildung 23: Mittlere Spitzenfeuerungsrate eines Populationsbursts in Hertz (Hz).

Boxplot mit Median, Mittelwert ($^{\circ}$), oberes und unteres Quartil, sowie Minimum und Maximum ($^{\times}$). Signifikanztest: ANOVA *on Ranks* ($*p = 0,007$) mit post hoc Dunn's Test ($*p < 0,05$). DIV 11: Median (134 / 89), DIV 14: Median (244 / 142), DIV 21: Median (244 / 189).

Zuletzt wurde das Kappa, welches einen Synchronizitätsparameter darstellt, der zwischen 0 und 1 liegt, an den Tagen DIV 11, 14 und 21 zwischen den Kulturen der wildtypischen (schwarz) und denen der heterozygoten (rot) Tieren verglichen (siehe Abbildung 24). Bei 0 lag entsprechend keine Synchronizität vor, während 1 eine maximale Synchronizität bedeutete. Das Kappa war bei den Kulturen der wildtypischen Tiere an allen drei Messtagen höher als bei den Kulturen der

heterozygoten Tiere, wobei sich jedoch kein signifikanter Unterschied zeigte. Auffallend war, dass der Median des Kappa und somit die Netzwerksynchronizität sowohl bei den Kulturen der wildtypischen Embryonen als auch bei den Kulturen der heterozygoten Föten sehr niedrig lag.

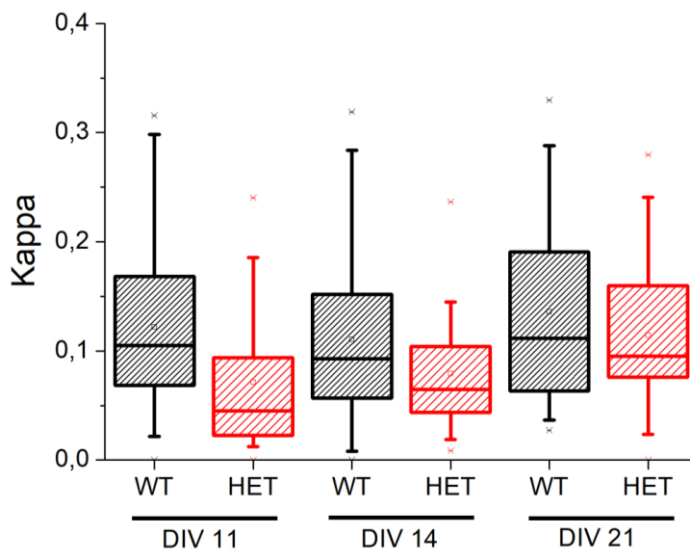


Abbildung 24: Kappa als Synchronizitätsparameter des Netzwerks.

Boxplot mit Median, Mittelwert ($^{\circ}$), oberes und unteres Quartil, sowie Minimum und Maximum ($^{\times}$). Signifikanztest: ANOVA on Ranks ($p = 0,050$) mit post hoc Dunn's Test ($*p < 0,05$). DIV 11: Median (0,11 / 0,04), DIV 14: Median (0,09 / 0,06), DIV 21: Median (0,11 / 0,09).

3.3. Untersuchung zum Einfluss von Phrixotoxin-3 auf HEK-Zelllinien mit den spezifischen Natriumkanälen Nav1.1 und Nav1.2

Mittels *Voltage-Clamp*-Modus erfolgten Ableitungen von Zellen mit transfizierten Nav1.1-Kanälen und Nav1.2-Kanälen der HEK-Zelllinie. Hierbei wurden Messungen ohne die Einwirkung von Phr-3, sowie Messungen unter der Zugabe von Phr-3 in den Konzentrationen von 10 nM und 100 nM durchgeführt. Betrachtet wurden der Einfluss von Phr-3 auf die Stromdichte, die Aktivierung und die Inaktivierung der Nervenzellen.

3.3.1. Einfluss von Phrixotoxin-3 auf die Stromdichte

Die Stromdichte (angegeben in pA/pF) errechnete sich aus dem Quotienten der maximalen Amplitude (pA) des Natriumstroms als Antwort auf den jeweiligen *Voltage-Step* und der Kapazität (pF) der Zelle und wurde gegen die Spannung von – 105 mV bis 67,5 mV aufgetragen.

Wie in Abbildung 25 zu sehen, kam es unter dem Einfluss von Phr-3 zu einer deutlichen Reduktion der Stromdichte von mit Nav_v1.1-Kanälen transfizierten Zellen. Unter der Zugabe von 10 nM Phr-3 (-538 pA/pF) war zwar bereits eine Verringerung der maximalen Stromdichte gegenüber der Kontrolle (-818,21 pA/pF) erkennbar, jedoch wies diese noch keine Signifikanz auf. Unter einer Konzentration von 100 nM Phr-3 (-185,42 pA/pF) zeigte sich dann jedoch eine signifikante Verringerung im post hoc Dunn's Test. Des Weiteren ist der Abbildung ein Shift der halbmaximalen Spannung der Aktivierung hin zu einer positiveren Spannung unter dem Einfluss von Phr-3 zu entnehmen.

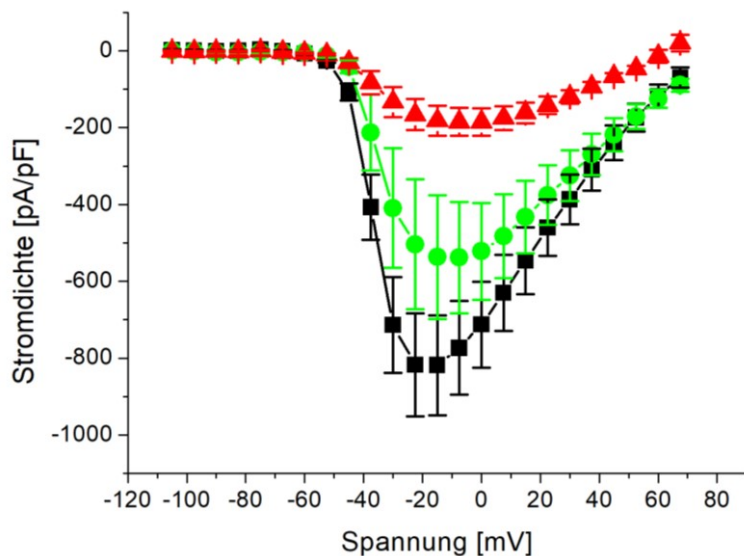


Abbildung 25: Stromdichte von Neuronen mit $Nav_{1.1}$ -Kanälen ohne Zugabe von Phrixotoxin-3 (schwarz, $n= 13$) und nach der Zugabe von Phr-3 in den Konzentrationen von 10 nM (grün, $n= 7$) und 100 nM (rot, $n= 9$).

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Signifikanztest: ANOVA on Ranks mit post hoc Dunns Test ($*p < 0,05$), Kontrolle vs. 100 nM = $p < 0,05$. Maximale Stromdichte [pA/pF]: MW = -818,21 / -538,00 / -185,42, SEM = 130,04 / 144,83 / 35,13.

In Abbildung 26 wurden die mit $Nav_{1.2}$ -Kanälen transfizierten *HEK*-Zellen abgebildet. Hier ließ sich in einer Konzentration von 5 nM an Phr-3 (-1041,84 pA/pF) keinerlei Effekt gegenüber der Kontrolle (-861,60 pA/pF) nachweisen, wobei anzumerken ist, dass auch nur 2 Zellen mit einer Konzentration von 5 nM abgeleitet wurden. Unter einer Konzentration von 100 nM Phr-3 (-378,65 pA/pF) konnte schließlich eine deutliche Verringerung gegenüber der Kontrolle registriert werden. Allerdings ergab sich hieraus im Gegensatz zu den Messungen an den $Nav_{1.1}$ -Kanälen kein signifikanter Unterschied. Anders als bei den mit $Nav_{1.1}$ -Kanälen transfizierten Zellen ließ sich auch kein Shift der halbmaximalen Spannung der Aktivierung hin zu einer höheren Spannung erkennen.

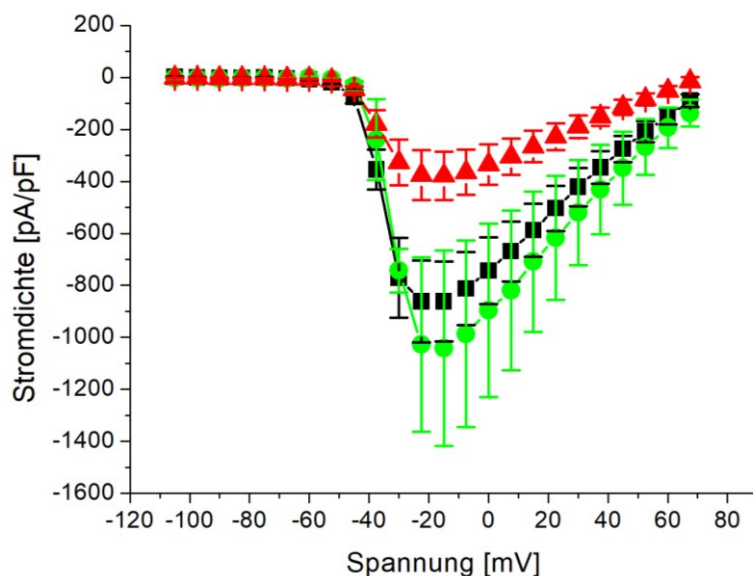


Abbildung 26: Stromdichte von Zellen mit $Na_v1.2$ -Kanälen ohne Phrixotoxin-3 (schwarz, $n=19$) und nach der Zugabe von Phr-3 in den Konzentrationen von 10 nM (grün, $n=2$) und 100 nM (rot, $n=12$).

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Signifikanztest: ANOVA on Ranks mit post hoc Dunns Test ($*p < 0,05$). Maximale Stromdichte [pA/pF]: MW = -861,60 / -1041,84 / -378,65, SEM = 152,67 / 375,37 / 93,17.

3.3.2. Einfluss von Phrixotoxin-3 auf die Aktivierung und Inaktivierung

Die Aktivierung wurde für einen Spannungsbereich von -105 mV bis 30 mV berechnet und mittels einer Boltzmann-Gleichung gefittet. Die Inaktivierung wurde für einen Spannungsbereich von -170 mV bis -27,5 mV ermittelt und ebenfalls über eine Boltzmann-Gleichung gefittet (siehe Abschnitt 2.4.6.).

Wie in Abbildung 27 zu erkennen ist, hatte Phr-3 keinerlei Effekt auf das Inaktivierungsverhalten der mit $Nav1.1$ -Kanälen transfizierten Zellen. Demgegenüber hatte das Toxin jedoch einen deutlichen Einfluss auf die Aktivierung der Zellen im Sinne einer später einsetzenden und langsamer ablaufenden Aktivierung, was sich sowohl in der Spannung der halbmaximalen Aktivierung ($V_{1/2}$) als auch am Steigungsfaktor (k) ausdrückte. Unter einer Konzentration von 10 nM an Phr-3 (-26,51 mV) ließ sich bereits eine Tendenz hin

zu positiveren Werten der $V_{1/2}$ gegenüber der Kontrolle (-33,70 mV) erkennen. Ein signifikanter Unterschied ließ sich jedoch erst unter einer Konzentration von 100 nM an Phr-3 (-21,00 mV) nachweisen. Für den Steigungsfaktor k ließ sich unter einer Konzentration von 100 nM an Phr-3 (-10,72) sowohl gegenüber der Kontrolle (-4,56) als auch gegenüber der Konzentration von 5 nM an Phr-3 (-5,02) ein signifikanter Unterschied nachweisen.

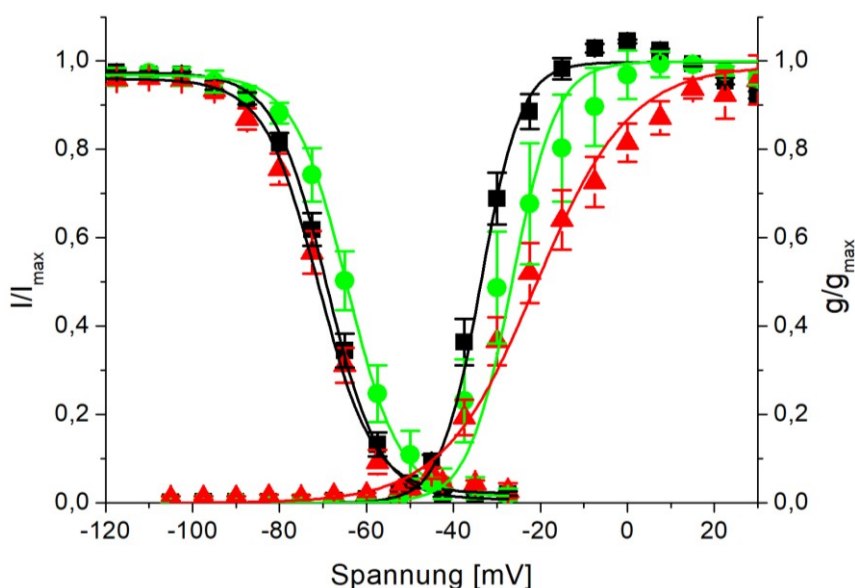


Abbildung 27: Aktivierungs- und Inaktivierungskurve von $Nav1.1$ -Kanälen ohne Phr-3 (schwarz, $n=13$) und nach Zugabe von Phr-3 in den Konzentrationen von 10 nm (grün, $n=7$) und 100 nM (rot, $n=9$, bei der Inaktivierung $n=8$).

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Signifikanztest: ANOVA on Ranks mit post hoc Dunns Test ($*p < 0,05$). Aktivierung: $V_{1/2} = p < 0,05$ für Kontrolle vs. 100 nM, $k = p < 0,05$ für Kontrolle vs. 100 nM und 10 nM vs. 100 nM.

Aktivierung: $V_{1/2}$ [mV] = -33,70 / -26,51 / -21,00, SEM = 1,37 / 4,53 / 3,68
 $k = -4,56 / -5,02 / -10,72$, SEM = 0,30 / 0,62 / 1,24

Inaktivierung: $V_{1/2}$ [mV] = -69,11 / -64,46 / -70,98, SEM = 1,18 / 2,33 / 1,26
 $k = -6,01 / -6,00 / -6,27$, SEM = 0,18 / 0,18 / 0,28

Wie in Abbildung 28 dargestellt, ließ sich bei den mit $Nav1.2$ -Kanälen transfizierten Zellen weder für die Inaktivierung noch für die Aktivierung unter

dem Einfluss des Toxins ein signifikanter Unterschied darstellen. Für die Aktivierungskurve war in einer Konzentration von 100 nM an Phr-3 zwar sowohl ein Trend der $V_{1/2}$ (-28,14 mV gegenüber -33,33 mV) als auch für die Steigung k (-7,03 gegenüber -4,19) im Sinne einer verzögert einsetzenden und langsamer ablaufenden Aktivierung erkennbar, allerdings ließ sich in der untersuchten Konzentration noch kein signifikanter Unterschied nachweisen.

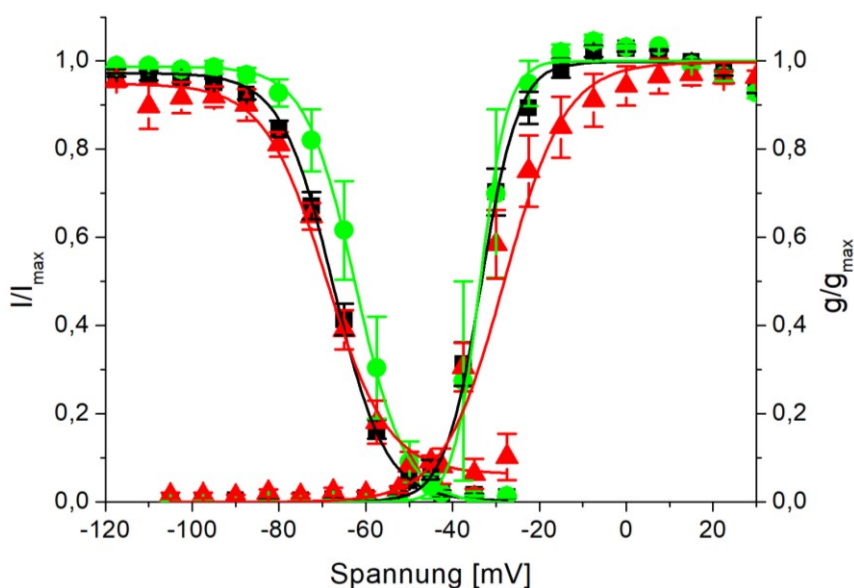


Abbildung 28: Aktivierungs- und Inaktivierungskurve von $Nav1.2$ -Kanälen ohne Phr-3 (schwarz, $n=19$) und nach Zugabe von Phr-3 in den Konzentrationen von 10 nM (grün, $n=2$) und 100 nM (rot, $n=12$, bei der Inaktivierung $n=10$).

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Signifikanztest: ANOVA on Ranks mit post hoc Dunns Test ($*p < 0,05$), hier keine signifikanten Änderungen.

Inaktivierung: $V_{1/2}$ [mV] = -67,43 / -62,37 / -69,13, SEM = 0,95 / 3,0 / 1,54
 k = -5,98 / -5,67 / -7,08, SEM = 0,20 / 0,16 / 1,48
 Aktivierung: $V_{1/2}$ [mV] = -33,33 / -33,63 / -28,14, SEM = 1,06 / 3,68 / 3,31
 k = -4,19 / -3,07 / -7,03, SEM = 0,32 / 0,09 / 1,14

Zusammengefasst kam es bei den mit $Nav1.1$ -Kanälen transfizierten Zellen bereits unter der Zugabe von 10 nM an Phr-3 zu einer Verschiebung der $V_{1/2}$ und des Steigungsfaktors k sowie einer Reduktion der mittleren Stromdichte um 34%,

während sich bei Nav1.2 erst bei 100 nM ein Effekt zeigte. Für beide Zelllinien ließ sich unter der Zugabe von 100 nM Phr-3 eine Reduktion der mittleren Stromdichte um mehr als die Hälfte (Nav1.1: 77%, Nav1.2: 56%) nachweisen. Ein signifikanter Unterschied der Stromdichte zeigte sich jedoch erst in einer Konzentration von 100 nM und nur für die mit Nav1.1-Kanälen transfizierten Zellen. Auch die $V_{1/2}$ verschob sich unter der Einwirkung von 100 nM bei beiden Zelllinien hin zu positiveren Werten (Nav1.1: +12,7 mV, Nav1.2: +5,19 mV), aber auch hier ließ sich erst unter der Konzentration von 100 nM des Toxins und nur bei den mit Nav1.1-Kanälen transfizierten Zellen ein signifikanter Effekt nachweisen.

3.4. Einfluss von Phrixotoxin-3 auf die Netzwerkaktivität von primären hippocampalen Neuronenkulturen wildtypischer und Scn1a-L1649Q-mutierter Mäuse im Multielektrodenarray

In diesem Versuchsteil wurde die Auswirkung des Spinnentoxins Phr-3 in Konzentrationen von 5 nM und 10 nM auf die Netzwerkaktivität der Kulturen aus wildtypischen (schwarz) und heterozygoten (rot) Embryonen an den Messtagen DIV 14 und DIV 21 untersucht (siehe Abbildung 10 unter Abschnitt 2.3.4.). Die Aufzeichnung erfolgte über jeweils zwei Minuten. In den folgenden Graphen wurden unter gleichbleibenden Bedingungen verschiedene Parameter (siehe Abschnitt 2.3.5.) betrachtet. In den folgenden Abbildungen wurden jeweils links (A) die Messungen an DIV 14 und rechts (B) die Untersuchung an DIV 21 dargestellt. Die Analyse zu den jeweiligen Messparametern wurde mittels Boxplot dargestellt, und angegeben wurden der Median, der Mittelwert ($^{\circ}$), das obere und untere Quartil, sowie Minimum und Maximum (x).

In Abbildung 29 wurde der Effekt von Phr-3 in Konzentrationen von 5 nM und 10 nM auf die Anzahl aller über einen Zeitraum von zwei Minuten registrierten Spikes in Kulturen wildtypischer (schwarz) und heterozygoter (rot) Tiere an den Tagen DIV 14 (Abb. 29A) und DIV 21 (Abb. 29B) dargestellt. Hierbei wurde die Anzahl an Spikes nach Zugabe von Phr-3 auf die Anzahl an Spikes ohne Phr-3 (0 nM) normiert. An beiden Messtagen ließ sich sowohl bei den Kulturen der wildtypischen als auch der heterozygoten Hippocampi nach Zugabe von Phr-3 mit zunehmender Konzentration ein progredienter Abfall der Spikes erkennen. Allerdings ergab sich erst in einer Konzentration von 10 nM an Phr-3 eine signifikante Reduktion der Anzahl von Spikes. Bei den Kulturen der heterozygoten Tiere zeigte sich unter einer Dosis von 10 nM an beiden Tagen eine signifikant verminderte Anzahl an Spikes, während sich bei den Kulturen der wildtypischen Tiere nur an DIV 21 eine signifikante Reduktion zeigte. An beiden Messtagen fiel die Reduktion der Anzahl an Spikes bei den Kulturen der heterozygoten Tiere sowohl unter einer Konzentration von 5 nM an Phr-3 als auch unter 10 nM an Phr-3 deutlicher aus als bei den Kulturen der wildtypischen

Föten. Allerdings ergab sich zwischen den Kulturen kein signifikanter Unterschied.

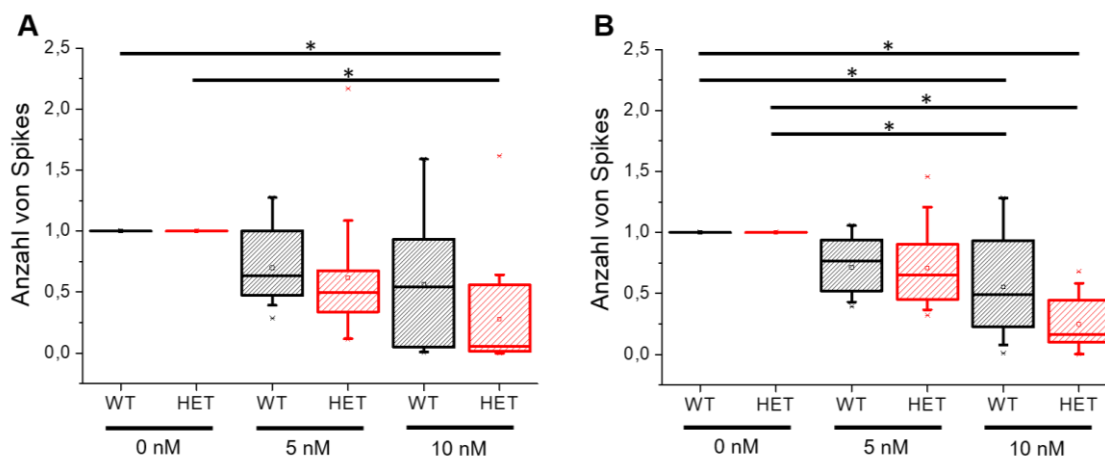


Abbildung 29: Untersuchung des Einflusses von Phr-3 auf wildtypische (WT; schwarz, $n = 11$) und heterozygote (HET; rot, $n = 15$) Hippocampusneurone an den Tagen DIV 14 (A) und DIV 21 (B) anhand der Anzahl an Spikes.

Die Anzahl der Spikes ohne Zugabe von Phr-3 diente als Baseline. Die Anzahl der Spikes nach der Zugabe von Phr-3 wurde auf die Anzahl der Spikes bei 0 nM normiert. Signifikanztest: ANOVA on Ranks ($***p < 0,001$ für A und für B) mit post hoc Dunn's Test ($*p < 0,05$). A) Median: 5 nM (0,63 / 0,50), 10 nM (0,54 / 0,06) B) Median: 5 nM (0,76 / 0,66), 10 nM (0,49 / 0,17).

In Abbildung 30 wurde die Anzahl aller über einen Zeitraum von zwei Minuten registrierten Populationsbursts (PB) der Kulturen von wildtypischen (schwarz) und heterozygoten (rot) Tieren nach Zugabe des Spinnentoxins Phr-3 dargestellt.

Bei den Kulturen der wildtypischen Föten zeigten sich zwischen den Messungen an DIV 14 und DIV 21 widersprüchliche Resultate. Während es im Mittel an DIV 14 unter der Zugabe von Phr-3 in beiden Konzentrationen zu einem Anstieg der PB kam, führte das Phr-3 an DIV 21 in beiden Konzentrationen zu einer leichten Reduktion der PB.

Bei den Kulturen der heterozygoten Tiere zeigte sich im Mittel an DIV 14 und an DIV 21 nach Zugabe von Phr-3 in einer Konzentration von 5 nM ein Anstieg der

PB. Demgegenüber führte eine Konzentration von 10 nM an Phr-3 an beiden Messtagen zu einem Abfall der PB. An DIV 14 kam es in einer Konzentration von 10 nM im Median sogar zu einer Auslöschung von PB. An DIV 14 zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an PB zwischen den Kulturen der wildtypischen Tiere unter dem Einfluss von Phr-3 in einer Konzentration von 5 nM und den Kulturen der heterozygoten Tiere unter dem Einfluss von 10 nM Phr-3 und zwar lag die Anzahl der PB bei den Kulturen der wildtypischen Tiere signifikant höher. An DIV21 ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Hier war die Anzahl an PB bei den Kulturen der heterozygoten Embryonen unter dem Einfluss von Phr-3 in einer Konzentration von 10 nM signifikant niedriger als bei 5 nM.

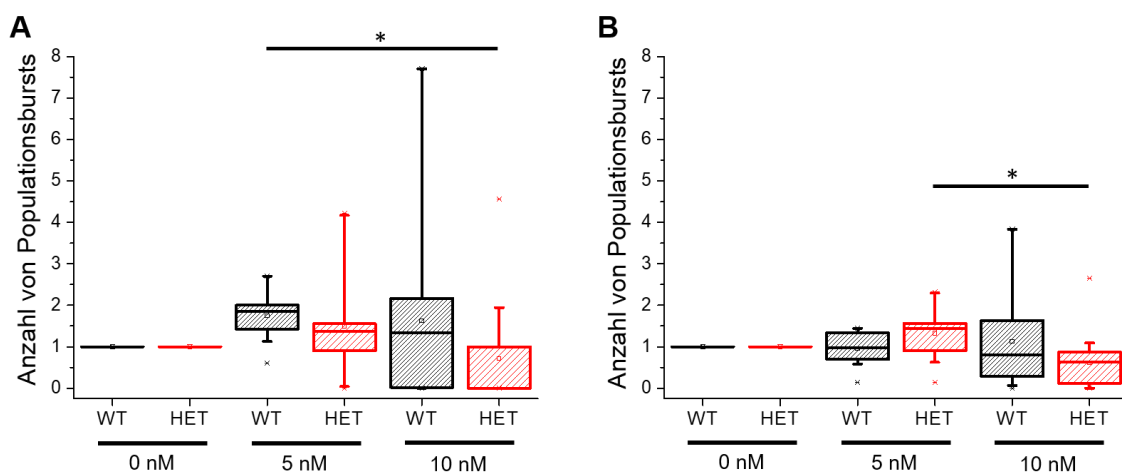


Abbildung 30: Anzahl an Populationsbursts in Abhängigkeit der Konzentration [nM] an Phrixotoxin-3.

A) Days in vitro 14, **B)** Days in vitro 21. Wildtypen (WT; schwarz, $n = 11$), Heterozygote (HET; rot, $n = 15$). Die Anzahl der Populationsbursts bei 5 nM und bei 10 nM wurden auf die Anzahl der Populationsbursts bei 0 nM normiert, die als Baseline diente. Signifikanztest: ANOVA on Ranks (** $p = 0,001$ für A, * $p = 0,011$ für B) mit post hoc Dunn's Test (* $p < 0,05$). A) Median: 5 nM (1,90 / 1,37), 10 nM (1,33 / 0) B) Median: 5 nM (0,98 / 1,44), 10 nM (0,8 / 0,64).

In Abbildung 31 wurde der Einfluss von Phr-3 auf den prozentualen Anteil aller über einen Zeitraum von zwei Minuten registrierten Spikes innerhalb von

Populationsbursts (PB%) bei Kulturen von wildtypischen (schwarz) Tieren und Kulturen, die aus Gehirnen heterozygoter Tiere (rot) stammen, abgebildet. Der PB% unter dem Effekt von Phr-3 in einer Konzentration von 5 nM und 10 nM wurde jeweils auf die PB% ohne Einfluss von Phr-3 (0 nM), welche die Baseline darstellte, normiert. An DIV 14 und DIV 21 ergab sich sowohl bei den Kulturen der wildtypischen als auch bei den Kulturen der heterozygoten Tiere unter dem Einfluss von 5 nM an Phr-3 keine wesentliche Änderung in dem PB%. Unter einer Konzentration von 10 nM an Phr-3 kam es dagegen sowohl bei den Kulturen der wildtypischen Tiere als auch bei Kulturen der heterozygoten Tiere zu einer Reduktion des PB%. Die Reduktion des PB% unter dem Einfluss des Toxins in einer Konzentration von 10 nM fiel dabei auf die Kulturen der heterozygoten Embryonen an beiden Messtagen größer aus. Ein signifikanter Unterschied fand sich jedoch nur an DIV 21. Und zwar fand sich hier eine signifikante Reduktion des PB% bei den Kulturen aus heterozygoten Tieren unter dem Einfluss von 10 nM an Phr-3 gegenüber den Kulturen aus wildtypischen und denen der heterozygoten Tiere unter dem Einfluss von 5 nM an Phr-3.

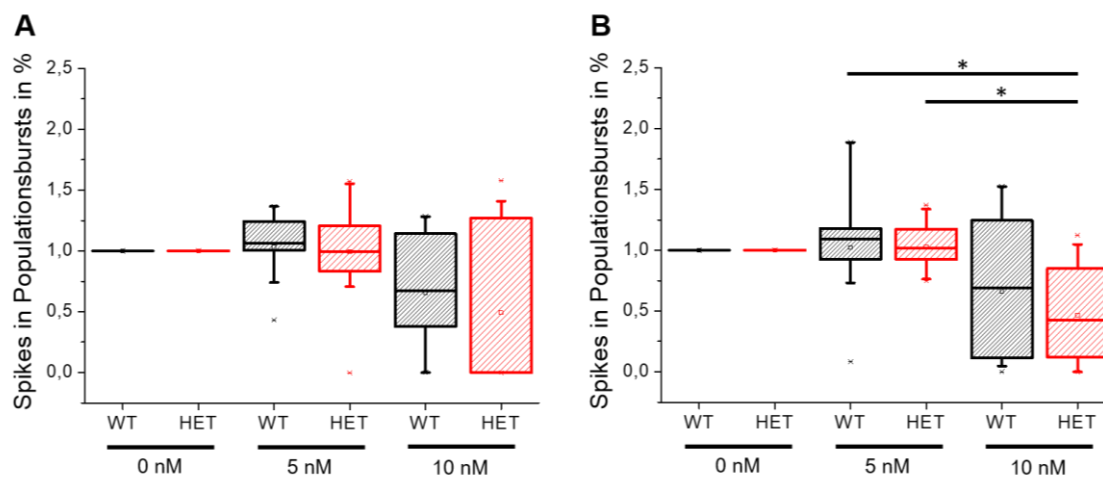


Abbildung 31: Anzahl aller Spikes innerhalb von Populationsbursts [%] in Abhängigkeit der Konzentration [nM] an Phrixotoxin-3.

A) Days in vitro 14, **B)** Days in vitro 21. Wildtypen (WT; schwarz, $n = 11$), Heterozygote (HET; rot, $n = 15$). Der PB% bei 5 nM und bei 10 nM wurden auf den PB% bei 0 nM normiert, die als Baseline diente. Signifikanztest: ANOVA on Ranks ($p = 0,125$ für A, $**p$

= 0,003 für B) mit *post hoc* Dunn's Test (* $p < 0,05$). A) Median: 5 nM (1,06 / 1,00), 10 nM (0,67 / 0) B) Median: 5 nM (1,09 / 1,02), 10 nM (0,69 / 0,43).

In Abbildung 32 wurde der Effekt von Phr-3 auf die mittlere Dauer der über einen Zeitraum von zwei Minuten registrierten PB der Kulturen aus wildtypischen (schwarz) und heterozygoten (rot) Tiere dargestellt.

Die mittlere Dauer der PB nahm an DIV 14 und an DIV 21 unter steigender Konzentration von Phr-3 sowohl bei den Kulturen aus wildtypischen als auch bei denen aus heterozygoten Tieren kontinuierlich ab, wobei der Effekt auf die Kulturen der heterozygoten Tiere jeweils etwas größer ausfiel ohne das sich zwischen den Kulturen signifikante Unterschiede ergaben.

An DIV 14 ergab sich für beide Kulturen sowohl in einer Konzentration von 5 nM als auch unter 10 nM an Phr-3 eine signifikante Reduktion der mittleren Dauer an PB gegenüber der Baseline. Signifikante Unterschiede zwischen den Kulturen und zwischen den Konzentrationen von 5 nM und 10 nM fanden sich dagegen nicht.

An DIV 21 kam es nach der Zugabe von Phr-3 dagegen nur bei den Kulturen der heterozygoten Tiere zu einer signifikanten Reduktion der mittleren Dauer an PB gegenüber der Baseline. Hierbei kam es wiederum bereits unter einer Konzentration von 5 nM zu einer signifikanten Reduktion. Zudem ergab sich eine signifikant niedrigere Dauer der PB bei den Kulturen der heterozygoten Tiere unter dem Einfluss von 10 nM an Phr-3 gegenüber den Kulturen der wildtypischen Embryonen unter dem Einfluss von 5 nM an Phr-3.

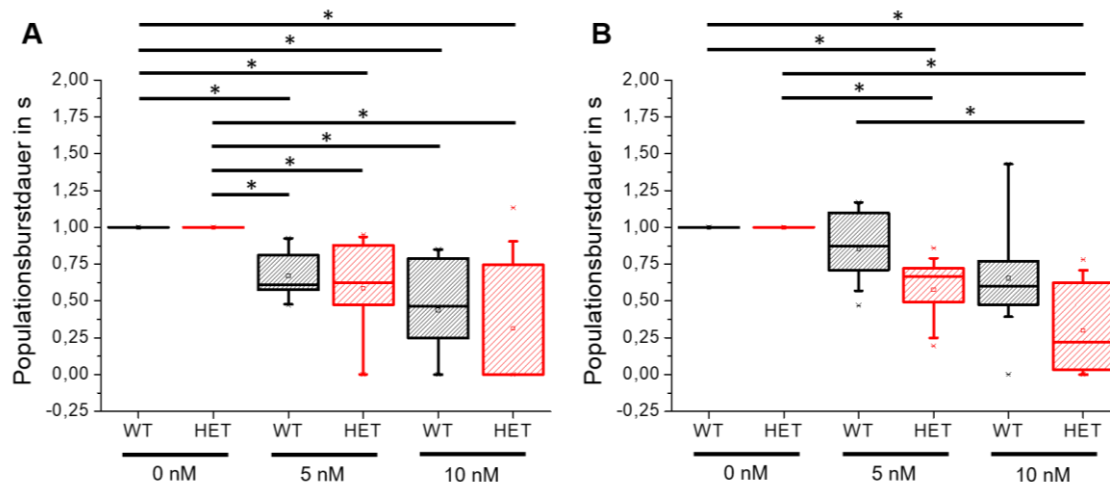


Abbildung 32: Dauer eines Populationsbursts [ms] in Abhängigkeit der Konzentration [nM] an Phrixotoxin-3.

A) Days in vitro 14, **B)** Days in vitro 21. Wildtypen (WT; schwarz, $n = 11$), Heterozygote (HET; rot, $n = 15$). Die Dauer der Populationsbursts bei 5 nM und bei 10 nM wurden auf die Dauer der Populationsbursts bei 0 nM normiert, die als Baseline diente. Signifikanztest: ANOVA on Ranks ($***p < 0,001$ für A und für B) mit post hoc Dunn's Test ($*p < 0,05$). A) Median: 5 nM (0,61 / 0,62), 10 nM (0,46 / 0) B) Median: 5 nM (0,87 / 0,66), 10 nM (0,60 / 0,22).

In Abbildung 33 wurde der Effekt von Phr-3 auf das über einen Zeitraum von zwei Minuten registrierte mittlere Interburstintervall (mIBI) der Kulturen von wildtypischen (schwarz) und heterozygoten (rot) Tieren abgebildet. Anzumerken ist, dass die analysierte Anzahl an Kulturen unter den verschiedenen Konzentrationen variierte, was daran lag, dass es bei einigen der Kulturen unter Phr-3 zu einer massiven Reduktion von PB kam, sodass hier kein mIBI bestimmt werden konnte.

An DIV 14 kam es sowohl bei den Kulturen der wildtypischen Föten als auch bei den Kulturen der heterozygoten Embryonen unter der Zugabe von Phr-3 in steigender Konzentration zu einem kontinuierlichen Abfall des mIBI, wobei sich nur für die Kulturen der wildtypischen Tiere eine signifikante Reduktion gegenüber der Baseline ergab. Hierbei ergab sich bereits unter einer Konzentration von 5 nM an Phr-3 eine signifikante Reduktion des mIBI. Zwischen

den Kulturen fanden sich an DIV14 und DIV21 keine signifikanten Unterschiede in dem Interburstintervall. An DIV 14 führte die Zugabe von Phr-3 sowohl bei den WT als auch bei den HET zu einer Reduktion des mIBI. Die Erhöhung der Konzentration von 5 nM auf 10 nM an Phr-3 führte hierbei zu keiner Verstärkung des Effekts.

An DIV 21 zeigte sich gegenüber den Resultaten an DIV 14 ein entgegengesetzter Effekt des Phr-3. Während es unter einer Konzentration von 5 nM an Phr-3 noch zu einem leichten Absinken des mIBI kam, führte eine Konzentration von 10 nM bei beiden Kulturen zu einem Anstieg des mIBI. Signifikante Unterschiede fanden sich an DIV 21 jedoch nicht.

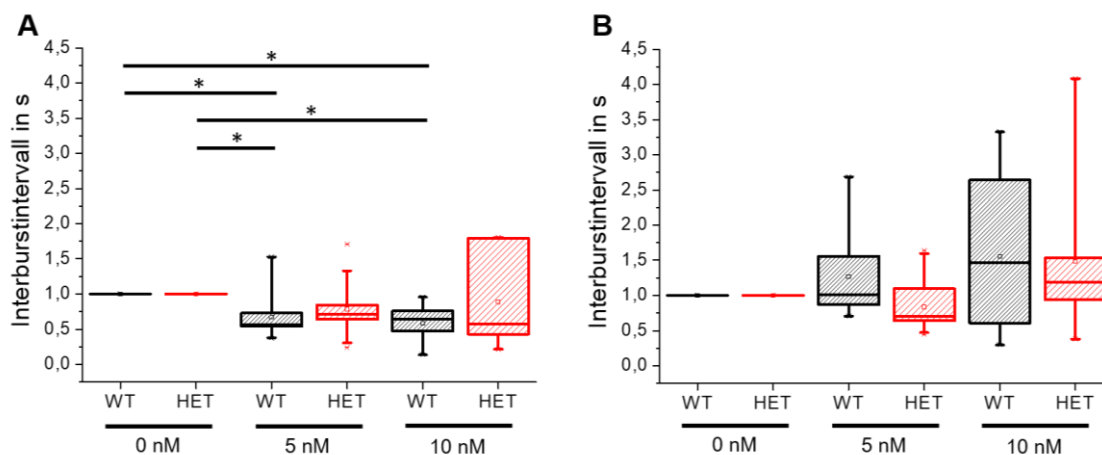


Abbildung 33: Interburstintervall [ms] in Abhängigkeit der Konzentration [nM] an Phrixotoxin-3.

A) Days in vitro 14, Wildtypen (WT; schwarz) $n = 11$ (0 nM und 5 nM), $n = 7$ (10 nM), Heterozygote (HET; rot) $n = 15$ (0 nM), $n = 13$ (5 nM), $n = 6$ (10 nM), **B)** Days in vitro 21, Wildtypen (WT; schwarz) $n = 11$ (0 nM), $n = 10$ (5 nM), $n = 9$ (10 nM), Heterozygote (HET; rot) $n = 15$ (0 nM), $n = 14$ (5 nM), $n = 10$ (10 nM). Das Interburstintervall bei 5 nM und bei 10 nM wurde auf das Interburstintervall bei 0 nM normiert, das als Baseline diente. Signifikanztest: ANOVA on Ranks ($***p < 0,001$ für A, $p = 0,193$ für B) mit post hoc Dunn's Test ($*p < 0,05$). A) Median: 5 nM (0,56 / 0,71), 10 nM (0,64 / 0,54) B) Median: 5 nM (0,95 / 0,70), 10 nM (1,47 / 1,16).

In Abbildung 34 wurde der Einfluss von Phr-3 auf die mittlere Spitzenfeuerungsrate (mPFR) aller über einen Zeitraum von zwei Minuten registrierten PB dargestellt.

Sowohl an DIV14 als auch an DIV21 kam es unter der Zugabe von Phr-3 in steigender Konzentration sowohl bei den Kulturen der wildtypischen als auch bei denen der heterozygoten Föten zu einer kontinuierlichen Reduktion der mPFR. Ein signifikanter Unterschied gegenüber der Baseline zeigte sich an beiden Messtagen und bei beiden Kulturen unter einer Konzentration von 10 nM an Phr-3. Insgesamt zeigte sich an beiden Messtagen sowohl unter einer Konzentration von 5 nM als auch unter 10 nM an Phr-3 bei den Kulturen der heterozygoten Tiere eine größere Reduktion der mPFR, wobei es jedoch zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den Kulturen der wildtypischen und denen der heterozygoten Tiere kam.

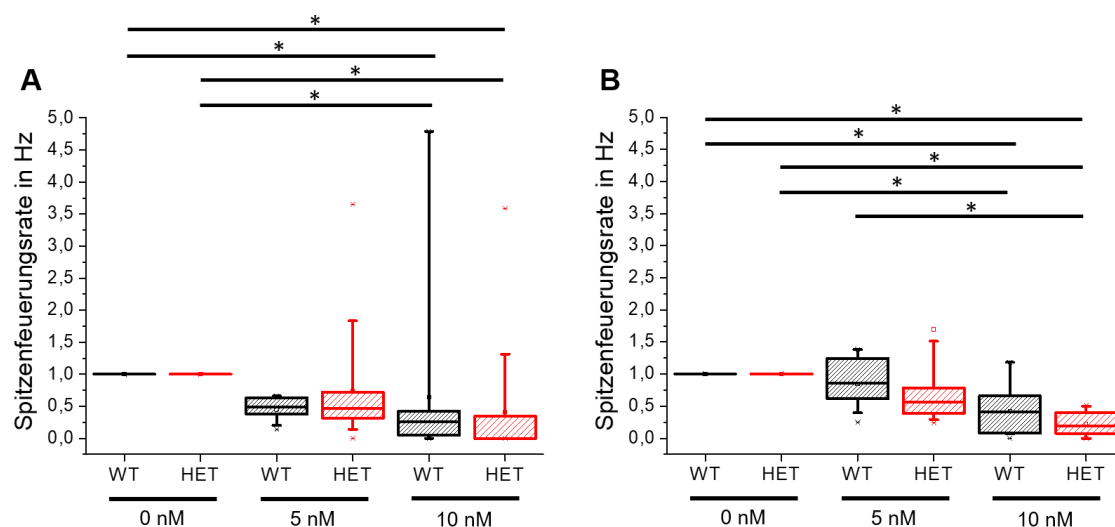


Abbildung 34: Spitzfeuerungsrate eines Populationsbursts [Hz] in Abhängigkeit der Konzentration [nM] an Phrixotoxin-3.

A) Days in vitro 14, **B)** Days in vitro 21. Wildtypen (WT; schwarz, $n = 11$), Heterozygote (HET; rot, $n = 15$). Die mPFR bei 5 nM und bei 10 nM wurden auf die mPFR bei 0 nM normiert, die als Baseline diente. Signifikanztest: ANOVA on Ranks ($***p < 0,001$ für A und für B) mit post hoc Dunn's Test ($*p < 0,05$). A) Median: 5 nM (0,49 / 0,47), 10 nM (0,26 / 0) B) Median: 5 nM (0,86 / 0,56), 10 nM (0,41 / 0,19).

In Abbildung 35 wurde der Effekt von Phr-3 in einer Konzentration von 5 nM und 10 nM auf das über einen Zeitraum von zwei Minuten registrierte Kappa abgebildet.

Bereits ohne den Einfluss von Phr-3 war das Kappa bei beiden Kulturen sehr niedrig (siehe Abbildung 24). Unter der Einwirkung von Phr-3 in einer Konzentration von 10 nM kam es bei beiden Kulturen zu einer weiteren Reduktion des Kappas, wobei sich hieraus kein signifikanter Unterschied ableiten ließ. Auch hier war die Reduktion des Kappa unter dem Einfluss von Phr-3 bei den Kulturen aus heterozygoten Tieren etwas stärker, wobei sich auch hierfür kein signifikanter Unterschied fand.

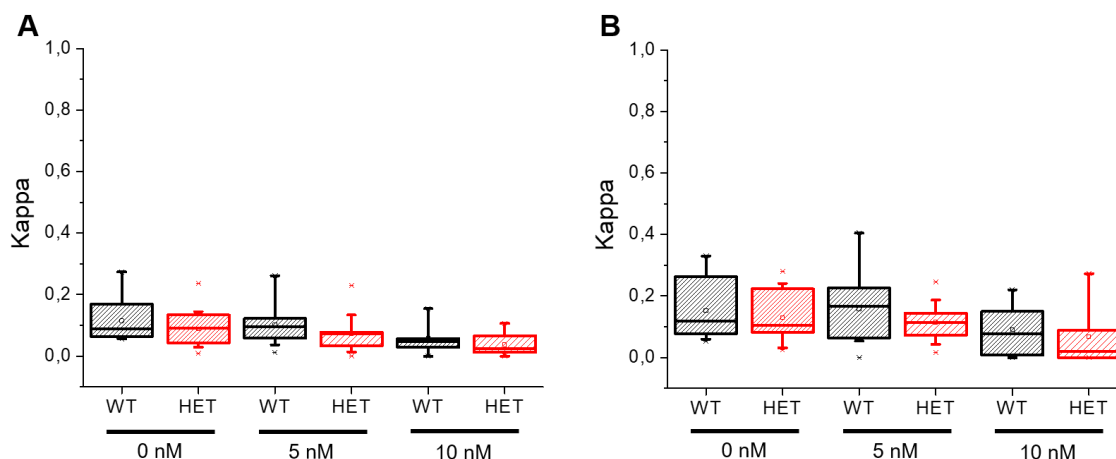


Abbildung 35: Kappa als Synchronizitätsparameter in Abhängigkeit der Konzentration [nM] an Phrixotoxin-3.

A) Days in vitro 14, Wildtypen (WT; schwarz) $n = 11$ (0 nM und 5 nM), $n = 8$ (10 nM), Heterozygote (HET; rot) $n = 15$ (0 nM), $n = 14$ (5 nM), $n = 7$ (10 nM), **B)** Days in vitro 21, Wildtypen (WT; schwarz) $n = 11$ (0 nM und 5 nM), $n = 9$ (10 nM), Heterozygote (HET; rot) $n = 15$ (0 nM und 5 nM), $n = 10$ (10 nM). Signifikanztest: ANOVA on Ranks ($p = 0,057$ für A, $p = 0,207$ für B) mit post hoc Dunn's Test ($*p < 0,05$). A) Median: Kontrolle (0,09 / 0,09), 5 nM (0,10 / 0,07), 10 nM (0,05 / 0,03) B) Median: Kontrolle (0,12 / 0,11), 5 nM (0,17 / 0,12), 10 nM (0,08 / 0,02).

4. Diskussion

Für die FHM konnten bislang drei ursächliche Gene identifiziert werden. Die FHM1 und die FHM2 sind bereits in einem Mausmodell näher untersucht worden. Hierbei konnte jeweils eine erhöhte Suszeptibilität für die Auslösung einer CSD, aufgrund einer erhöhten Glutamatkonzentration im extrazellulären Raum festgestellt werden. (Tottene et al., 2009, Leo et al., 2011). Die FHM3 ist hinsichtlich der Suszeptibilität gegenüber einer CSD und insbesondere hinsichtlich ihres zugrunde liegenden Pathomechanismus bislang weniger gut erforscht. In dieser Arbeit wurde die CSD-Entstehung bei der *L1649Q*-Mutation des *SCN1A*-Gens der FHM3 in einem transgenen *knock-in* Mausmodell untersucht. Des Weiteren wurden spontane inhibitorische postsynaptische Eingänge von kortikalen Pyramidenzellen bezüglich Veränderungen in der Frequenz und der Amplitude analysiert. Um zusätzlich die Auswirkungen der Mutationen auf die Gesamtheit des neuronalen Netzwerks hin zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit embryonale primäre hippocampale Neuronenkulturen über 21 *Days in vitro* im Multielektrodenarray untersucht. Zudem wurde die Wirkung des Spinnengifts Phrixotoxin-3 zunächst auf mit Nav1.1- und Nav1.2-Kanälen transfizierte HEK-Zelllinien beobachtet, um anschließend den Effekt des Toxins in einem neuronalen Netzwerk von primären hippocampalen wildtypischen und *Scn1a-L1649Q*-mutierten Neuronenkulturen zu untersuchen.

4.1. *Suszeptibilität der heterozygoten Tiere mit Scn1a-L1649Q-Mutation für eine Cortical Spreading Depression*

Die Untersuchungen mittels *Patch-Clamp*-Technik zur Suszeptibilität der heterozygoten *L1649Q*-Mutation des *Scn1a*-Gens in einem transgenen *knock-in* Mausmodell für eine CSD basierten im Wesentlichen auf dem Versuchsaufbau von Tottene et al., 2009 zur Messung der Suszeptibilität eines *knock-in* Migränemausmodells mit einer *Cacna1a-R192Q*-Genmutation gegenüber einer CSD. Der Abstand der Patch-Pipette und der KCl-applizierenden Pipette betrug demnach 600 μm und die Applikation erfolgte über eine Hochdruckpumpe mit 0,5

bar. Der Schwellenwert wurde über die Dauer der KCl-Abgabe in Schritten von 25 ms bestimmt.

In dieser Arbeit konnte eine Tendenz hin zu einer gesteigerten Suszeptibilität gegenüber einer CSD bei den heterozygoten Tieren mit einer *Scn1a-L1649Q*-Mutation beobachtet werden, wobei jedoch kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte. Grundlegend hierfür sind vermutlich insbesondere die niedrige Anzahl an abgeleiteten Neuronen. Demgegenüber ergab sich bei der Untersuchung zur Dauer einer CSD kein wesentlicher Unterschied zwischen den mutierten und den wildtypischen Mäusen.

Es gab verschiedene Variablen, die den Versuchsablauf beeinflusst haben können und anhand einer größeren Fallzahl besser zu kompensieren gewesen wären. Eine Variable stellte der Öffnungswiderstand der KCl-applizierenden Pipette dar. Hierbei wurden nur Pipetten mit einem Öffnungswiderstand von 0,2 – 0,5 M Ω verwendet. So wurde die KCl-Freisetzung über die Pipette zwar zeitlich definiert, jedoch variierte die Öffnungsfläche der Pipettenspitzen, sodass die freigesetzte Menge an Kalium trotz der Konstante „Zeit“ in den einzelnen Messungen möglicherweise variieren konnte. Für die Herstellung der Pipetten wurden die Kapillaren unter den gleichen Bedingungen mittels *P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller* bearbeitet und die Öffnungsfläche der Pipetten wurde unter einem Mikroskop näherungsweise verglichen, allerdings stellte dies keine exakte Bestimmung dar, sodass eine Schwankungsbreite von etwa 0,2 bis 0,5 m Ω blieb. Diese Variable ließ sich nicht vermeiden, sodass eine Kompensation nur über eine größere Stichzahl möglich wäre.

Eine weitere Variable die einen Einfluss auf die Schwellenwertbestimmung einer CSD gehabt haben kann, war der Abstand der KCl-applizierenden Pipette zum akuten Hirnschnitt. In dem Versuchsaufbau von Tottene et al., 2009 auf dem auch unser Versuchsaufbau basierte, war dieser Abstand nicht beschrieben, sodass wir ebenfalls auf eine Normierung dieses Abstands verzichteten. Der Abstand der KCl-applizierenden Pipette zum akuten Hirnschnitt könnte dennoch einen Einfluss auf die Menge des Kaliums haben, welches in die unmittelbare Umgebung der Zellen gelangt und somit das Elektrolytgleichgewicht

unterschiedlich stark beeinflussen. So könnte ein zu groß gewählter Abstand dazu führen, dass ein Teil des Kaliums durch die zur Zirkulation der aCSF dienenden Schlauchradpumpe abtransportiert wird, bevor es Einfluss auf die Umgebung der Pyramidenzellen nehmen kann. Wir versuchten daher die Pipette möglichst nah an den Schnitt zu bringen, sodass diese Möglichkeit vernachlässigbar erscheint. Allerdings kam es bei einem zu nah gewählten Abstand zu dem Schnitt gelegentlich zu einem Verlust der ableitenden Pyramidenzelle, sodass ein gewisser Abstand zu dem Schnitt oder ein veränderter Winkel der KCl-applizierenden Pipette gegenüber der ableitenden Zelle notwendig war. Gelegentlich gelang es trotz einer sehr hohen KCl-Applikation nicht, eine CSD auszulösen.

In dieser Arbeit deutete sich bei den Hirnschnitten der heterozygoten *Scn1a-L1649Q*-mutierten Tiere eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer CSD hinsichtlich des Schwellenwertes aber nicht im Hinblick auf die Dauer an, wobei weitere Messungen erforderlich wären, um eine Signifikanz dieser Resultate nachzuweisen. Die Ergebnisse decken sich mit den kürzlich veröffentlichten Daten des gleichen Mausmodells, bei denen eine signifikant erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer CSD für die Mutation bei *in vitro* und *in vivo* durchgeführten Versuchen nachgewiesen werden konnte. Bei den Versuchen *in vivo* konnte nach einer Kaliumchloridapplikation zum einen ein früheres Auftreten und zum anderen ein häufigeres Auftreten einer CSD verzeichnet werden, während die Geschwindigkeit der CSD-Ausbreitung unbeeinträchtigt blieb. Zudem konnte bei einer mittels elektrischen Stromabgabe induzierten CSD bei fünf von sechs Mäusen eine CSD ausgelöst werden, während bei den wildtypischen Mäusen selbst bei maximaler elektrischer Reizung keine CSD verursacht werden konnte. Bei den *in vitro* Versuchen wurde eine CSD über eine 400 ms anhaltende Applikation einer 200 mM KCl-Lösung hervorgerufen. Hierbei konnte bei den Hirnschnitten heterozygoter Tiere in 87,8 % der Fälle gegenüber 48,8% bei den wildtypischen Tieren erfolgreich eine CSD ausgelöst werden. Die Dauer einer CSD wurde nicht betrachtet (Auffenberg et al., 2021).

4.2. Einfluss der Scn1a-L1649Q-Mutation auf spontane inhibitorische postsynaptische Eingänge bei kortikalen Pyramidenzellen

In Vorarbeiten konnte ein *gain-of-function*-Effekt für die L1649Q-Mutation auf dem SCN1A-Gen, welches für einen vorwiegend auf inhibitorischen Neuronen exprimierten Natriumionenkanal (Nav1.1) kodiert, identifiziert werden (Cestele et al., 2013). In Versuchen zu isolierten Purkinje-Zellen konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass die Aktivierung, die Stromdichte und die Reaktivierung bei den Natriumkanälen unbeeinträchtigt bleibt, wogegen die Mutation zu einer signifikant verlangsamten Inaktivierung führt (Auffenberg et al., 2021). In akuten Hirnschnitten konnte schließlich nachgewiesen werden, dass die Mutation zu einer gesteigerten Anzahl an Aktionspotentialen in *fast-spiking*-Interneuronen führt, wogegen es bei den Pyramidenzellen zu keinem Effekt kam. Zudem konnte eine verlangsamte und inkomplette Inaktivierung der Natriumkanäle gegenüber den wildtypischen Mäusen beobachtet werden (Auffenberg et al., 2021).

Auf dieser Grundlage aufbauend, wurde in dieser Dissertation als nächstes der unmittelbare Effekt der gesteigerten Aktivität der inhibitorischen Neurone auf die Pyramidenzellen anhand von inhibitorischen postsynaptischen Eingängen untersucht (Daten bereits in Auffenberg et al., 2021 publiziert). Um die inhibitorischen Eingänge isoliert betrachten zu können, wurden die AMPA- und die Kainatrezeptoren durch die Zugabe von NBQX blockiert, während die NMDA-Rezeptoren mittels APV geblockt wurden. Hier zeigte sich bei den heterozygoten Tieren eine signifikant erhöhte Frequenz an sIPSC gegenüber den wildtypischen Tieren, wogegen die Amplitude unverändert blieb. Die erhöhte Frequenz der sIPSC bei den heterozygoten Tieren weist, passend zu den Ergebnissen in Vorarbeiten, dass die Mutation zu einer erhöhten Rate an Aktionspotentialen in inhibitorischen Neuronen führt, eine gesteigerte GABAerge synaptische Aktivität nach. Dagegen deutet die unbeeinträchtigte Amplitude der sIPSC daraufhin, dass die in Vorarbeiten nachgewiesene verlangsamte und inkomplette Inaktivierung der Natriumkanäle auf inhibitorischen Neuronen, letztlich nicht zu einer erhöhten Freisetzung an GABA führt (Auffenberg et al., 2021). Hieraus lässt

sich schlussfolgern, dass der Pathomechanismus in der Initiierung einer *CSD* bei der FHM3 nicht auf einer erhöhten Freisetzung an GABA in den synaptischen Spalt beruht, sondern auf einer als Folge der gesteigerten Aktivität der inhibitorischen Neurone auftretenden erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration beruht (Chever et al., 2021, Auffenberg et al., 2021).

4.3. Pathomechanismus und Triggerfaktoren der Cortical Spreading Depression

Bei der *CSD* handelt es sich um eine sich über den Kortex ausbreitende Depolarisationswelle, die von einer langandauernden Hemmung neuronaler Aktivität gefolgt wird und als ursächlich für die Migräneaura angesehen wird (Dichgans et al., 2005, Leao, 1947). Der genaue Pathomechanismus der *CSD* ist bislang jedoch nicht vollends geklärt. In verschiedenen Untersuchungen konnten viele mögliche Trigger für die Entstehung einer *CSD* beschrieben werden. Eine elementare Bedeutung haben dabei eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration (Grafstein, 1956, Ferrari, 1998) und der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat (Van Harreveld, 1959). Neben Glutamat konnte auch die Aminosäure Aspartat als Auslöser für die Entstehung der *CSD* beobachtet werden (Van Harreveld, 1959). Weitere wichtige Einflussfaktoren stellen die NMDA-Rezeptoren (Marrannes et al., 1988, Lauritzen and Hansen, 1992) und die präsynaptischen Ca_v2.1-Kanäle (Jing et al., 1993, Footitt and Newberry, 1998) dar.

Für die familiäre hemiplegische Migräne wurden bislang drei ursächliche Gene detektiert. Dies sind die Gene *CACNA1A* (FHM1), *ATP1A2* (FHM2) und *SCN1A* (FHM3) (Pietrobon and Brennan, 2019). Bei der FHM1 besteht der Pathomechanismus für die Entstehung einer *CSD* in einem gesteigerten präsynaptischen Ca²⁺-Einstrom aufgrund eines *gain-of-function* von P/Q-Typ-Kalziumkanälen, der zu einer erhöhten postsynaptischen Glutamatfreisetzung und Aktivierung von NMDA-Rezeptoren führt (Tottene et al., 2009, Tottene et al., 2002). Bei der FHM2 besteht der Pathomechanismus in einem *loss-of-function* einer astrozytären Na⁺/K⁺-ATPase, wodurch es zu einem verminderten

Abtransport von Glutamat und Kalium aus dem synaptischen Spalt und in der Folge zu einer gesteigerten Aktivierung von postsynaptischen NMDA-Rezeptoren kommt (Tavraz et al., 2008). Beide Genmutationen bewirken demnach über eine erhöhte Glutamat- und Kaliumkonzentration im synaptischen Spalt eine gesteigerte Suszeptibilität gegenüber der Entstehung und Fortleitung einer *CSD* (Russell and Ducros, 2011).

Demgegenüber besteht die Pathophysiologie der FHM3 in einem *gain-of-function* von Nav1.1-Kanälen, die insbesondere auf inhibitorischen Interneuronen exprimiert werden. Wie zuletzt in Untersuchungen zu einem *Scn1a-L1649Q knock-in* Mausmodell gezeigt werden konnte, führt diese zu einer erhöhten Anzahl an Aktionspotentialen der *fast-spiking* inhibitorischen Interneurone und zum anderen zu einer verzögerten Inaktivierung und einem erhöhten persistierenden Natriumstrom der Nav1.1-Kanäle, was letztlich eine erhöhte Freisetzung an GABA in den synaptischen Spalt herbeiführt (Auffenberg et al., 2021). Der Zusammenhang zwischen einer erhöhten Aktivität an inhibitorischen Interneuronen mit einer folglich erhöhten Freisetzung von GABA ist bislang und einer herbeigeführten *CSD* ist bislang weniger gut verstanden, da für den Neurotransmitter GABA einerseits ein potenziell hemmender Effekt für die Entstehung einer *CSD* beschrieben worden ist, während andererseits auch Hinweise für eine gesteigerte Suszeptibilität einer *CSD* unter der Wirkung von GABA beschrieben worden sind (Kramer et al., 2016). So führte beispielsweise das GABA-verstärkende Pharmakon Midazolam in Versuchen zu einem gesteigerten Auftreten einer *CSD* (Hertle et al., 2012).

Die Versuche zu den spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingängen an einem *Scn1a-L1649Q knock-in* Mausmodell in dieser Arbeit ergaben, dass die Mutation zu einer gesteigerten Frequenz und somit zu einer gesteigerten Aktivität der inhibitorischen Neurone mit entsprechend gehäufte Freisetzung von GABA in den synaptischen Spalt führt. Demgegenüber kommt es jedoch nicht zu einer gesteigerten Amplitude der sIPSC, was bedeutet, dass die pro Aktionspotential freigesetzte Menge an GABA in den synaptischen Spalt gegenüber den wildtypischen Mäusen unbeeinflusst bleibt (Auffenberg et al., 2021). Dies erlaubt

den Schluss, dass nicht die erhöhte Freisetzung von GABA ursächlich für die Entstehung der FHM3 ist, sondern die infolge der gesteigerten Aktivität der inhibitorischen Neurone auftretende Elektrolytverschiebung hin zu einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration den Pathomechanismus der *CSD*-Initiierung bei der FHM3 darstellt. Diese Vermutung wird durch weitere in Auffenberg et al., 2021 beschriebene Versuche untermauert, in denen Versuche an dem *Scn1a-L1649Q knock-in* Mausmodell zeigen konnten, dass es bei den heterozygoten Tieren während einer *CSD* zu einer frühzeitigen Elektrolytverschiebung mit einer gesteigerten extrazellulären Kaliumkonzentration kommt (Auffenberg et al., 2021).

Unterstützend konnte in einer anderen Studie nachgewiesen werden, dass mittels Heteroscodratoxin-1 (Hm1a), einem Toxin, welches die Inaktivierung der Nav1.1-Kanäle beeinträchtigt und so ähnlich wie die *L1649Q*-Mutation unseres zuvor beschriebenen *Scn1a-knock-in* Mausmodells zu einer gesteigerten Aktivität der inhibitorischen GABAergen Interneurone führt, über eine in der Folge gesteigerte extrazelluläre Kaliumkonzentration eine *CSD* herbeiführen kann. Des Weiteren konnte mittels einer optogenetisch-induzierten gesteigerten Aktivierung von GABAergen Interneuronen eine *CSD* initiiert und währenddessen eine gesteigerte extrazelluläre Kaliumkonzentration nachgewiesen werden (Chever et al., 2021, Auffenberg et al., 2021).

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die FHM3 mit einer gesteigerten Aktivität an GABAergen Interneuronen einen weiteren möglichen Pathomechanismus in der Entstehung einer *CSD* nachweist und die elementare Bedeutung einer Elektrolytverschiebung mit erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentration in der *CSD*-Entstehung untermauert.

4.4. Einfluss der *Scn1a-L1649Q*-Mutation auf die Netzwerkaktivität

Um den Einfluss der *Scn1a-L1649Q*-Mutation auf die neuronale Netzwerkaktivität zu untersuchen, wurden Kulturen aus embryonalen Hippocampusneuronen von wildtypischen und heterozygoten Mäusen auf einem MEA-Chip kultiviert, welcher über 60 Elektroden Aktionspotentiale von

Nervenzellen registrieren kann. Hierbei zeigten sich zwischen den wildtypischen und den heterozygoten Tieren für keine der gemessenen Parameter (Spikes, PB, PB%, mBD, mIBI, mPFR, Kappa) signifikante Unterschiede. Die größten Unterschiede ergaben sich für den Synchronizitätsparameter Kappa und die mittlere Spitzenfeuerungsrate (mPFR). Hier war der Median bei den Kulturen der heterozygoten Tiere an allen Messtagen niedriger als der für die Kulturen der wildtypischen Embryonen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die gesteigerte Aktivität der inhibitorischen Neuronen und eine damit einhergehende vermehrte Freisetzung von GABA die Synchronizität des neuronalen Netzwerks verringert. So konnte eine Studie über eine *loss-of-function*-Mutation des *SCN1A*-Gens, die zu einer verminderten Aktivität inhibitorischer Neurone und somit einer reduzierten Freisetzung von GABA führt, eine übererregbare und hochfrequente Netzwerkaktivität mit gesteigerter Synchronizität nachweisen. Diese Beobachtung unterstützend, bewirkte auch die Zugabe des GABA_A-Rezeptorblockers Bicucillin zu einer wildtypischen Kultur eine erhöhte Synchronizität des neuronalen Netzwerks (Hedrich et al., 2014). Unter Berücksichtigung dieser Versuche ließe sich für die in dieser Arbeit untersuchte *L1649Q*-Mutation mit dem Effekt einer gesteigerten Aktivität inhibitorischer Neurone und einer erhöhten Freisetzung von GABA ein hemmender Effekt auf die Synchronizität des neuronalen Netzwerks vermuten. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen signifikanter Unterschiede in dieser Arbeit wäre, dass sich das System unter normalen Bedingungen in einem kompensierten Ruhezustand befindet und sich der Effekt der Mutation erst unter Stressbedingungen auf das Netzwerk auswirkt (Freilinger and Dichgans, 2006).

4.5. Kanalwirksamkeit und Spezifität von Phrixotoxin-3

Das Gen für die Entstehung der FHM3 kodiert zwar für den auf inhibitorischen Neuronen exprimierten spannungsgesteuerten Natriumionenkanal Nav1.1 (Dichgans et al., 2005), allerdings sind die Entstehung und die Ausbreitung einer CSD dennoch an einer Aktivierung der exzitatorischen Neurone gekoppelt. Um die Schnittstelle zwischen der Übererregbarkeit der inhibitorischen Neurone bei

der FHM3 und der Aktivierung der exzitatorischen Neurone zu untersuchen, führten wir Versuche mit einem in der Literatur beschriebenen Nav1.2-Kanalblocker durch. In Voruntersuchungen zu dem Spinnengift Phrixotoxin-3 hatte sich ein konzentrationsabhängiger Einfluss für den überwiegend auf exzitatorischen Neuronen exprimierten Natriumionenkanal Nav1.2 und weniger für den auf inhibitorischen Neuronen exprimierten Nav1.1-Kanal gezeigt (Bosmans et al., 2006), weswegen wir uns in den folgenden Versuchen mit diesem Toxin beschäftigten. Um die in der Studie nachgewiesenen Ergebnisse zu bestätigen, wurde der Einfluss von Phr-3 zunächst auf Einzelzellebene mittels *Patch-Clamp*-Technik bei stabilen HEK-Zelllinien mit transfizierten Nav1.1- und Nav1.2-Kanälen untersucht. Wie bereits in Voruntersuchungen beschrieben, zeigte sich die Wirkung des Toxins auch in diesen Versuchen in Form einer Reduktion der Stromdichte und einer Verschiebung der Aktivierung hin zu positiveren Werten mit erhöhter $V_{1/2}$. Ein Einfluss auf die Inaktivierung konnte auch in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. In Voruntersuchungen war das Toxin am potentesten gegenüber Nav1.2 ($IC_{50} = 0,6 \text{ nM}$, $V_{1/2} = +10,7 \text{ mV}$), während die Wirkung auf Nav1.1 vergleichsweise gering ausfiel ($IC_{50} = 610 \text{ nM}$, $V_{1/2} = +1,9 \text{ mV}$) (Bosmans et al., 2006). In unserer Arbeit konnten wir die Ergebnisse der Studie jedoch nicht nachbilden. Hier zeigte sich entgegengesetzt zu den vorbeschriebenen Ergebnissen ein stärkerer Effekt auf den Kanal Nav1.1 ($V_{1/2} = +12,7 \text{ mV}$ bei 100 nM) bei geringerem Einfluss auf Nav1.2 ($V_{1/2} = +1,7 \text{ mV}$ bei 100 nM). Auch die Spezifität des Toxins gegenüber einem der Kanäle fiel insgesamt geringer aus. Bei Nav1.1 kam es bereits unter der Zugabe von 10 nM zu einer Verschiebung der $V_{1/2}$ und einer Reduktion der mittleren Stromdichte um 34% , während sich bei Nav1.2 erst bei 100 nM ein Effekt zeigte. Allerdings zeigte sich auch hier nur für Nav1.1 ein signifikanter Effekt, womit für Nav1.2 eine höhere Dosierung des Toxins notwendig wäre.

Der Einfluss des Toxins auf die Aktivierung, ohne jedoch die Inaktivierung und das Umkehrpotential zu beeinträchtigen spricht dafür, dass das Spinnengift den Einwärtsstrom von Natrium behindert, während es keinerlei Einfluss auf den Auswärtsstrom von Natrium zu haben scheint (Bosmans et al., 2006). Eine mögliche Wirkungsweise stellt daher die Interaktion mit dem Spannungssensor

der Lipidmembran dar, wodurch die Öffnung des Kanals beeinträchtigt werden könnte. Eine ähnliche Wirkungsweise wurde schon für das Spinnengift SGTx1, welches den Kaliumkanal $K_v2.1$ blockiert, beschrieben. In Strukturanalysen von Phr-3 konnten Ähnlichkeiten zu Strukturen des SGTx1 nachgewiesen werden, welche für diese Wirkungsweise verantwortlich sind (Bosmans et al., 2006, Wang et al., 2004).

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ließe sich schlussfolgern, dass Phr-3 mit seinem selektiven Effekt einer reduzierten Stromdichte und einer verzögerten Aktivierbarkeit der Nav1.1-Kanäle gegenüber der Nav1.2-Kanäle potenziell als GABA-Blocker einsetzbar wäre. Bezüglich eines möglichen Einsatzes bei der FHM3 ist jedoch anzumerken, dass die Aktivierbarkeit und die Stromdichte der Nav1.1-Kanäle bei der *L1649Q*-Mutation unbeeinträchtigt bleiben und es stattdessen zu einer verzögerten und inkompletten Inaktivierung der Kanäle kommt (Auffenberg et al., 2021), ein Effekt der wiederum von Phr-3 unbeeinflusst bleibt. Zudem zeigte sich in Voruntersuchungen zu diesem Toxin keine Spezifität für Nav1.1. Stattdessen ergab sich hier bei anderen getesteten spannungsgesteuerten Kanälen (Nav1.2 – Nav1.5) bereits in geringeren Konzentrationen als bei dem Nav1.1-Kanal ein wirksamer Effekt (Bosmans et al., 2006). Diese Kanäle werden unter anderem in der Skelettmuskulatur (Nav1.4) und im Herzen (Nav1.5) exprimiert (Ogata and Ohishi, 2002), sodass hierunter schwerwiegende Komplikationen wie Lähmungen oder Herzrhythmusstörungen auftreten könnten, sollte das Toxin als mögliches Therapeutikum eingesetzt werden. So traten in Versuchen an lebenden Mäusen unter einer Dosierung von 500 pmol bereits Lähmungen sowie eine Ateminsuffizienz und folglich der Tod der Tiere auf (Bosmans et al., 2006).

In Zusammenschau der Ergebnisse kann Phr-3 mit seinem Einfluss an der Aktivierung und des Natriumeinstroms bei Natriumionenkanälen einen spannenden Ansatz in der weiteren Erforschung von Kanalopathien der Natriumionenkanäle bieten. Insbesondere die Versuche an lebenden Mäusen lassen einen sinnvollen Einsatz von Phr-3 als Therapeutikum jeglicher Art jedoch bezweifeln.

4.6. Wirksamkeit von Phrixotoxin-3 auf die Netzwerkaktivität

Nach den Untersuchungen mittels *Patch-Clamp*-Technik zur Wirkungsspezifität und Wirkungsweise von Phr-3 auf die Natriumionenkanäle Nav1.1 und Nav1.2 folgten Versuche auf Netzwerkebene von embryonalen Hippocampusneuronen aus Kulturen wildtypischer und heterozygoter Tiere mit einer *Scn1a-L1649Q*-Mutation. Zu den beobachteten Parametern zählten unter anderem die Gesamtanzahl an Aktionspotentialen (Spikes), die Anzahl an Populationsbursts (PB), die mittlere Dauer der PB (mBD), die mittlere Spitzenfeuerungsrate und Kappa als Parameter für die Synchronizität der Netzwerkaktivität. Die Zugabe von Phr-3 erfolgte an den Messtagen 14 und 21 in Konzentrationen von 5 nM und 10 nM. Die Konzentration wurde so gewählt, dass das Toxin entsprechend den Ergebnissen aus unseren Vorversuchen auf Einzelzellebene nur einen Einfluss auf die Nav1.1-Kanäle haben sollte. Die Ergebnisse unter den Konzentrationen von 5 nM und 10 nM wurden jeweils auf das Ergebnis der Kontrollgruppe ohne Zugabe von Phr-3 normiert. Die Kontrollgruppe stellte somit eine Baseline von 1 dar.

Die Anzahl der Spikes reduzierte sich sowohl bei den Kulturen heterozygoter Tiere als auch bei den Kulturen wildtypischer Geschwister Tiere bereits unter dem Einfluss von 5 nM an Phr-3, wobei ein signifikanter Effekt erst unter 10 nM eintrat und die Wirkung auf das heterozygote Netzwerk stärker ausfiel. Für die Anzahl an PB zeigten sich keine eindeutigen Ergebnisse. So kam es unter der Einwirkung des Toxins teilweise zu einem Anstieg und teilweise zu einem Absinken an PB, ohne signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe aufzuweisen. Ein ähnliches Ergebnis präsentierte sich auch für den prozentualen Anteil von Spikes innerhalb von PB. Bei der Dauer der PB zeigte sich sowohl bei den Kulturen heterozygoter Tiere als auch bei den Kulturen wildtypischer Tiere eine signifikante Reduktion unter dem Einfluss des Spinnengifts. Auch hier wirkte sich das Toxin stärker auf die Kulturen der heterozygoten Tiere aus. Bei der Spitzenfeuerungsrate der PB zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie bei der Anzahl von Spikes. Schon die Applikation von 5 nM führte bei beiden Gruppen zu einer Reduktion des mPFR, wobei es erst bei 10 nM zu einem signifikanten Abfall kam. Diese fiel bei den Kulturen der heterozygoten Embryonen gegenüber

den Kulturen der wildtypischen Föten wiederum stärker aus. Beim Kappa kam es in beiden Kulturen zu einer Reduktion der Synchronizität, ohne jedoch einen signifikanten Unterschied aufzuweisen. In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich unter der Einwirkung des Toxins demnach für beide Kulturen teilweise eine signifikante Reduktion der Spikes, der mBD und der mPFR, während sich für die Anzahl an PB, an PB% und das Kappa kaum ein Einfluss darstellte. Allerdings war das Kappa bereits in der Kontrollgruppe auffällig niedrig. Das Toxin hatte insgesamt eine stärkere Wirkung auf das Netzwerk der heterozygoten Tiere, ohne jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen den wildtypischen und den heterozygoten Tieren aufzuweisen.

Anders als die Messungen zum Phr-3 auf Einzelzellebene in dieser Arbeit, die einen stärkeren Einfluss für Nav1.1-Kanäle aufzeigten, legen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe aufgrund einer Reduktion der Anzahl an Spikes, des mPFR und des Kappa einen stärkeren Effekt auf die Nav1.2-Kanäle nahe, da unter Inhibition GABAerger Neurone ein übererregbares Netzwerk zu erwarten wäre. So wiesen Ergebnisse einer Studie über ein *Scn1a*-Mausmodell mit einer *loss-of-function*-Mutation, welche zu einer verminderten Aktivität inhibitorischer Neurone führt, in Zellkulturen ein übererregbares Netzwerk mit gesteigerter Synchronizität auf. Der Einsatz des GABA_A-Antagonisten Bicucullin bewirkte zudem eine signifikante Steigerung des mPFR und des Kappa bei den wildtypischen Zellkulturen (Hedrich et al., 2014). Unter der Annahme, dass Phr-3 durch Hemmung von Nav1.1-Kanälen ebenfalls als GABA-Antagonist fungiert, hätte man in Anlehnung an diese Versuche demnach ebenfalls eine Steigerung von mPFR und Kappa erwarten können, wogegen es hier zu einem gegenteiligen Effekt mit einer Reduktion des mPFR, der mBD und des Kappa kam. Das Resultat dieser Messung stützt demnach eher die Ergebnisse einer anderen Studie, wonach Phr-3 eine hohe Spezifität für Nav1.2 ($IC_{50} = 0,6 \text{ nM}$, $V_{1/2} = +10,7 \text{ mV}$) aufweist, wogegen der Einfluss auf Nav1.1 ($IC_{50} = 610 \text{ nM}$, $V_{1/2} = +1,9 \text{ mV}$) deutlich geringer ausfällt (Bosmans et al., 2006). Dies legt die Vermutung nahe, dass unter der verwendeten Dosierung in unserem Versuch die Nav1.2-Kanäle gehemmt wurden, während die Nav1.1-Kanäle unbeeinträchtigt blieben, wodurch die Reduktion der Spikes, des mPFR, der mBD und des Kappa zu erklären

wären. Die höhere Wirksamkeit des Toxins auf die Zellkulturen der heterozygoten Tiere könnte darin begründbar sein, dass die gesteigerte Aktivität der inhibitorischen Neurone bei den Kulturen der heterozygoten Tiere die Sensitivität der Nav1.2-Kanäle bzw. der exzitatorischen Neurone gegenüber dem Toxin erhöhen.

4.7. Ausblick

In den Messungen zur *SCN1A-L1649Q*-Mutation auf Einzelzellebene konnte in dieser Arbeit eine Tendenz hin zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber einer *CSD* nachgewiesen werden, welche sich in anderen Studien bei *in vitro* und *in vivo* Messungen bestätigen ließ (Auffenberg et al., 2021). Anhand einer erhöhten Frequenz an spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingängen konnte nachgewiesen werden, dass es bei der Mutation zu einer gesteigerten Aktivität an inhibitorischen Neuronen kommt, welche als ursächlich für die erhöhte Suszeptibilität zu erachten ist. Da die unbeeinflusste Amplitude der sIPSC darauf schließen lässt, dass es nicht zu einer erhöhten Freisetzung von GABA während eines Aktionspotentials kommt, ist davon auszugehen, dass der Effekt der erhöhten Suszeptibilität für eine *CSD* nicht durch GABA selbst verursacht wird. Die Hypothese einer Elektrolytverschiebung hin zu einer gesteigerten extrazellulären Kaliumkonzentration ließ sich in anderen Versuchen untermauern. Somit konnte zuletzt mit einer gesteigerten Aktivität an inhibitorischen Neuronen ein neuer Pathomechanismus in der Entstehung einer *CSD* nachgewiesen werden (Auffenberg et al., 2021). In den Versuchen zur Netzwerkebene konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den heterozygoten und den wildtypischen Mäusen nachgewiesen werden. Demnach könnte sich das System unter normalen Bedingungen in einem kompensierten Ruhezustand befinden und nur unter dem Einfluss externer Stressoren dekompensieren. So sind Betroffene einer Migräne oder FHM auch nicht dauerhaft erkrankt. Stattdessen treten entsprechende Symptome schubförmig remittierend auf. Auf experimenteller Ebene in Zellkulturen stellen Veränderungen des pH-Wertes, eine Kaliumexposition oder ein Elektrolytungleichgewicht mögliche Trigger dar (Freilinger and Dichgans, 2006).

Demnach wären weitere Messungen der Netzwerkaktivität unter derartigen Stressbedingungen beispielsweise durch Kaliumapplikation sinnvoll.

Für die Akuttherapie und die Prophylaxe der Kopfschmerzen einer Migräne stehen mittlerweile eine Vielzahl an Therapieoptionen zur Verfügung. Fraglich ist jedoch deren Effekt auf die Migräneaura, für die es bislang kaum Therapieansätze gibt. Da die Migräneaura jedoch insbesondere bei der FHM die hauptsächlichste Limitierung in der Lebensqualität darstellt, wären Therapieansätze, die sich vorwiegend der Migräneaura widmen von Interesse. Nachdem mittlerweile für eine Vielzahl an Kanälen, Rezeptoren, Molekülen und Neurotransmittern (Grafstein, 1956, Pietrobon, 2014, Footitt, 1998, Marrannes, 1988, Van Harreveld) und nun auch für eine gesteigerte Aktivität inhibitorischer Interneurone (Auffenberg et al., 2021) ein Zusammenhang mit der Entstehung einer *CSD* nachgewiesen werden konnte, bieten sich in der Theorie auch eine Vielzahl an möglichen Behandlungsoptionen. Da der Entstehung der *CSD* jeweils unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen können, könnte auch der Erfolg einer möglichen Therapie jeweils unterschiedlich ausfallen. Eine Studie befasste sich mit der Identifizierung möglicher Therapeutika zur Verhinderung des Auftretens einer *Spreading Depression* bei Patient(inn)en mit einer akuten Hirnschädigung (Trauma, subarachnoidale oder intracerebrale Blutung, maligner Schlaganfall). Hierbei wurde ein protektiver Effekt für den NMDA-Antagonisten Ketamin festgestellt, während das GABAerg wirkende Benzodiazepin Midazolam zu einem erhöhten Auftreten einer *Spreading Depression* führte (Hertle et al., 2012). In einer weiteren Studie wurde die Wirkung von intranasal verabreichtem Ketamin anhand von elf Patient(inn)en mit einer FHM überprüft. Bei fünf dieser Patient(inn)en konnte eine Reduktion der Schwere und der Dauer der neurologischen Ausfallsymptome erzielt werden (Kaube et al., 2000, Russell and Ducros, 2011). Eine Studie zu Patient(inn)en, die an einer Migräne mit Aurasymptomen leiden, zeigte, dass die Therapie mit Lamotrigin, einem Antiepileptikum, welches über die Blockade von spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanälen die Freisetzung von Glutamat und Aspartat hemmt, bei 75% der Patient(inn)en zu einer Reduktion des Auftretens und der Dauer von Aurasymptomen führte (Lampl et al., 2005). Auch für den Einsatz des

Carboanhydrashemmers Acetazolamid konnte bereits ein günstiger Effekt bei einigen FHM-Patient(inn)en mit *CACNA1A*-Mutation nachgewiesen werden (Battistini et al., 1999). Auch einige Antiepileptika zeigten sich wirksam in der Reduktion einer *CSD*, wie beispielsweise Topiramate und Valproat, wogegen andere wie Carbamazepin und Oxcarbazepin keinen begünstigenden Effekt erzielen konnten. Eine Tatsache, die daraufhin deutet, dass nur diese Antiepileptika wirksam sind, welche auch in der Migräneprophylaxe eingesetzt werden können (Tozzi et al., 2012). Ein möglicher Grund dafür, dass Carbamazepin nicht effektiv ist, wäre die Vermutung, dass es unter der Medikation zu einer Verstärkung von Auswärtsströmen spannungsgesteuerter Kaliumkanäle kommt, was wiederum das Auftreten einer *CSD* begünstigen könnte. Da sowohl Valproat als auch Topiramate an unterschiedlichen Kanälen wirken, bleibt unklar welcher Wirkmechanismus Ursache für den begünstigenden Effekt darstellt und ob ein potenzieller Nutzen auch für die Aurasymptomatik bei FHM-Patient(inn)en zu erwarten wäre. Da Hinweise darauf vorliegen, dass sowohl Topiramate als auch Valproat seine Wirkung unter anderem über eine gesteigerte Aktivität von GABA entfalten, wäre dieses Medikament bei Patient(inn)en mit einer FHM3 möglicherweise als kontraproduktiv zu erachten, wogegen es in der Therapie der FHM1 und der FHM2 effektiv sein könnte. Dies lässt den Schluss zu, dass es für ein mögliches Therapieansprechen elementar sein kann, welche Mutation bei einer Migräne vorliegt.

Zusammenfassend konnte für eine Vielzahl an Medikamenten ein protektiver Effekt für die Entstehung und Fortleitung einer *CSD* beschrieben werden. In weiteren Messungen könnte deren Effekt speziell auf die FHM und insbesondere auf die FHM3 untersucht werden, da die Ursache der gesteigerten Suszeptibilität für die *CSD* jeweils eine andere ist und somit möglicherweise auch eine unterschiedliche Wirksamkeit der Medikamente zu erwarten ist. Hierfür wären weitere Untersuchungen im Mausmodell denkbar. Hierbei sind sowohl Versuchsansätze mit einer Gabe des Medikamentes am Untersuchungstag als auch Versuchsansätze mit einer Medikamentengabe über einen längeren Zeitraum denkbar. Eine weitere Einsatzmöglichkeit wären Patientenstudien, die zum Teil bereits erfolgt sind. Vorzugsweise wären hierbei antikonvulsive

Medikamente von Interesse, die einen Effekt auf den persistierenden Natriumstrom ausüben, wie beispielsweise Lamotrigin, Phenytoin, Lacosamid und Topiramamat (Wengert and Patel, 2021).

5. Zusammenfassung

Die Migräne stellt eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen weltweit dar und betrifft etwa 15% der Weltbevölkerung. Demgegenüber ist die familiäre hemiplegische Migräne als Unterform der Migräne mit Aura mit einer Prävalenz von etwa 1:10.000 deutlich seltener. Sie stellt die einzig monogen vererbte Form der Migräne dar und bislang konnten drei ursächliche Gene mit zahlreichen möglichen Mutationen nachgewiesen werden. Die Mutationen führen auf unterschiedliche Weise zu einer Kanalopathie. Bei der FHM1 und FHM2 konnte mittels eines Mausmodells nachgewiesen werden, dass die jeweiligen Kanalopathien auf jeweils unterschiedliche Weise zu einer erhöhten Aktivität von Glutamat im synaptischen Spalt und hierüber zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber einer *cortical spreading depression* führen, welche als Korrelat einer Migräneaura angesehen wird. Demgegenüber ist der Pathomechanismus hinter der FHM3 weniger gut verstanden. Bekannt ist, dass bei der FHM3 unterschiedliche Mutationen auf dem *SCN1A*-Gen vorliegen können, welches für einen spannungsgesteuerten Natriumionenkanal kodiert, der vorwiegend auf inhibitorischen Interneuronen exprimiert wird. Die Mutationen führen hierbei zu einem *gain-of-function* des Kanals.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der pathophysiologischen Auswirkungen der *L1649Q*-Mutation des *SCN1A*-Gens in einem transgenen *knock-in* Mausmodell der FHM3 auf Einzelzellebene und auf Netzwerkebene. In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob die Mutation überhaupt zu einer erhöhten Suszeptibilität der Zellen gegenüber einer *CSD* führt. Hierzu wurde eine *CSD* mittels einer KCl-Lösung in akuten Hirnschnitten ausgelöst, während die Spannungsänderung einer entfernten Pyramidenzelle abgeleitet wurde. Hier konnte nachgewiesen werden, dass es zwar eine Tendenz hin zu einer erhöhten Suszeptibilität bei den mutierten Mäusen gegenüber den wildtypischen Mäusen gab, dieser Unterschied jedoch nicht signifikant war. Ursächlich hierfür war am ehesten die insgesamt geringe Fallzahl an generierten Zellen.

In einem zweiten Schritt untersuchten wir die Auswirkungen der Mutation auf die spontanen inhibitorischen postsynaptischen Eingänge (sIPSC) einer Pyramidenzelle. Hier konnte eine signifikante Erhöhung der Frequenz an sIPSC bei den Mäusen mit der L1649Q-Mutation nachgewiesen werden, während die Amplitude unbeeinträchtigt blieb. Dies spricht dafür, dass die inhibitorischen Interneurone aufgrund der Mutation leichter aktiviert werden können, wogegen die pro Aktionspotential ausgeschüttete Menge des Neurotransmitters GABA hiervon unbeeinträchtigt bleibt.

In einer dritten Messung analysierten wir mittels Multielektrodenarray die Auswirkungen der Mutation auf ein neuronales Netzwerk anhand von hippocampalen Neuronenkulturen. Hier interessierten wir uns insbesondere für das Auftreten von Populationsbursts und die mittlere Spitzenfeuerungsrate eines Populationsbursts als mögliches Korrelat einer CSD. Hier konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den wildtypischen und den heterozygoten Neuronenkulturen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnten wir nachweisen, dass die L1649Q-Mutation auf dem SCN1A-Gen zu einer gesteigerten Aktivität von inhibitorischen Interneuronen führt, ohne Einfluss auf die jeweils freigesetzte Menge an GABA zu nehmen. Zudem konnten wir bei den heterozygoten Tieren eine Tendenz hin zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber einer CSD nachweisen. Unsere Hypothese ist, dass die gesteigerte Aktivierung der inhibitorischen Interneurone zu einer Elektrolytverschiebung hin zu einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration führt, wodurch das Auftreten einer CSD begünstigt wird.

6. Literaturverzeichnis

2018. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia*, 38, 1-211.
- ABU-AREFEH, I. & RUSSELL, G. 1994. Prevalence of headache and migraine in schoolchildren. *Bmj*, 309, 765-9.
- AFRIDI, S. K., GIFFIN, N. J., KAUBE, H. & GOADSBY, P. J. 2013. A randomized controlled trial of intranasal ketamine in migraine with prolonged aura. *Neurology*, 80, 642-7.
- AGMON, A. & CONNORS, B. W. 1991. Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. *Neuroscience*, 41, 365-79.
- AKERMAN, S., HOLLAND, P. R. & GOADSBY, P. J. 2011. Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nat Rev Neurosci*, 12, 570-84.
- APELL, H. J., HITZLER, T. & SCHREIBER, G. 2017. Modulation of the Na,K-ATPase by Magnesium Ions. *Biochemistry*, 56, 1005-1016.
- AUFFENBERG, E., HEDRICH, U. B., BARBIERI, R., MIELY, D., GROSCHUP, B., WUTTKE, T. V., VOGEL, N., LÜHRS, P., ZANARDI, I., BERTELLI, S., SPIELMANN, N., GAILUS-DURNER, V., FUCHS, H., HRABĚ DE ANGELIS, M., PUSCH, M., DICHGANS, M., LERCHE, H., GAVAZZO, P., PLESNILA, N. & FREILINGER, T. 2021. Hyperexcitable interneurons trigger cortical spreading depression in an Scn1a migraine model. *J Clin Invest*, 131.
- BASTUG, T. & KUYUCAK, S. 2012. Molecular dynamics simulations of membrane proteins. *Biophys Rev*, 4, 271-282.
- BATTISTINI, S., STENIRRI, S., PIATTI, M., GELFI, C., RIGHETTI, P. G., ROCCHI, R., GIANNINI, F., BATTISTINI, N., GUAZZI, G. C., FERRARI, M. & CARRERA, P. 1999. A new CACNA1A gene mutation in acetazolamide-responsive familial hemiplegic migraine and ataxia. *Neurology*, 53, 38-43.
- BOSMANS, F., ANEIROS, A. & TYTGAT, J. 2002. The sea anemone *Bunodosoma granulifera* contains surprisingly efficacious and potent insect-selective toxins. *FEBS Lett*, 532, 131-4.
- BOSMANS, F., RASH, L., ZHU, S., DIOCHOT, S., LAZDUNSKI, M., ESCOUBAS, P. & TYTGAT, J. 2006. Four novel tarantula toxins as selective modulators of voltage-gated sodium channel subtypes. *Mol Pharmacol*, 69, 419-29.
- CANALS, S., MAKAROVA, I., LOPEZ-AGUADO, L., LARGO, C., IBARZ, J. M. & HERRERAS, O. 2005. Longitudinal depolarization gradients along the somatodendritic axis of CA1 pyramidal cells: a novel feature of spreading depression. *J Neurophysiol*, 94, 943-51.
- CARMELIET, E. 1993. Electrophysiology on the molecular way. *Verh K Acad Geneesk Belg*, 55, 5-26.
- CATTERALL, W. A. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26, 13-25.
- CATTERALL, W. A., DIB-HAJJ, S., MEISLER, M. H. & PIETROBON, D. 2008. Inherited neuronal ion channelopathies: new windows on complex neurological diseases. *J Neurosci*, 28, 11768-77.

- CATTERALL, W. A., GOLDIN, A. L. & WAXMAN, S. G. 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 397-409.
- CATTERALL, W. A., WISEDCHAISRI, G. & ZHENG, N. 2017. The chemical basis for electrical signaling. *Nat Chem Biol*, 13, 455-463.
- CESTELE, S., SCHIAVON, E., RUSCONI, R., FRANCESCHETTI, S. & MANTEGAZZA, M. 2013. Nonfunctional NaV1.1 familial hemiplegic migraine mutant transformed into gain of function by partial rescue of folding defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 17546-51.
- CHEVER, O., ZERIMECH, S., SCALMANI, P., LEMAIRE, L., PIZZAMIGLIO, L., LOUCIF, A., AYRAULT, M., KRUPA, M., DESROCHES, M., DUPRAT, F., LÉNA, I., CESTÈLE, S. & MANTEGAZZA, M. 2021. Initiation of migraine-related cortical spreading depolarization by hyperactivity of GABAergic neurons and NaV1.1 channels. *J Clin Invest*, 131.
- CLAES, L., DEL-FAVERO, J., CEULEMANS, B., LAGAE, L., VAN BROECKHOVEN, C. & DE JONGHE, P. 2001. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet*, 68, 1327-32.
- COLE, K. S. & CURTIS, H. J. 1939. ELECTRIC IMPEDANCE OF THE SQUID GIANT AXON DURING ACTIVITY. *J Gen Physiol*, 22, 649-70.
- CRAIK, D. J., DALY, N. L. & WAINE, C. 2001. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon*, 39, 43-60.
- DE BOER, I., TERWINDT, G. M. & VAN DEN MAAGDENBERG, A. 2020. Genetics of migraine aura: an update. *J Headache Pain*, 21, 64.
- DE FUSCO, M., MARCONI, R., SILVESTRI, L., ATORINO, L., RAMPOLDI, L., MORGANTE, L., BALLABIO, A., ARIDON, P. & CASARI, G. 2003. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet*, 33, 192-6.
- DE VRIES, B., FRANTS, R. R., FERRARI, M. D. & VAN DEN MAAGDENBERG, A. M. 2009. Molecular genetics of migraine. *Hum Genet*, 126, 115-32.
- DICHGANS, M., FREILINGER, T., ECKSTEIN, G., BABINI, E., LORENZ-DEPIEREUX, B., BISKUP, S., FERRARI, M. D., HERZOG, J., VAN DEN MAAGDENBERG, A. M., PUSCH, M. & STROM, T. M. 2005. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet*, 366, 371-7.
- DIENER H.-C., M. A. E. A. 2019. Prophylaxe der Migräne mit monoklonalen Antikörpern gegen CGRP oder den CGRP-Rezeptor, Ergänzung der S1-Leitlinie Therapie der Migräneattacke und Prophylaxe der Migräne, 2019, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.
- ESCAYG, A., MACDONALD, B. T., MEISLER, M. H., BAULAC, S., HUBERFELD, G., AN-GOURFINKEL, I., BRICE, A., LEGUERN, E., MOULARD, B., CHAIGNE, D., BURESI, C. & MALAFOSSE, A. 2000. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet*, 24, 343-5.
- ESCOUBAS, P. & RASH, L. 2004. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, 43, 555-74.
- FERRARI, M. D. 1998. Migraine. *Lancet*, 351, 1043-51.

- FOOTITT, D. R. & NEWBERRY, N. R. 1998. Cortical spreading depression induces an LTP-like effect in rat neocortex in vitro. *Brain Res*, 781, 339-42.
- FREILINGER, T. 2014. [Genetics of primary headache syndromes]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 57, 919-27.
- FREILINGER, T. & DICHGANS, M. 2006. [Genetics of migraine]. *Nervenarzt*, 77, 1186, 1188-95.
- FREILINGER, T. & DICHGANS, M. 2013. Ionenkanalerkrankungen des Gehirns – monogene Migräneformen. *medizinische genetik*, 25, 440-447.
- GOLDIN, A. L., BARCHI, R. L., CALDWELL, J. H., HOFMANN, F., HOWE, J. R., HUNTER, J. C., KALLEN, R. G., MANDEL, G., MEISLER, M. H., NETTER, Y. B., NODA, M., TAMKUN, M. M., WAXMAN, S. G., WOOD, J. N. & CATTERALL, W. A. 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 28, 365-8.
- GOUAUX, E. & MACKINNON, R. 2005. Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science*, 310, 1461-5.
- GRAFSTEIN, B. 1956. Mechanism of spreading cortical depression. *J Neurophysiol*, 19, 154-71.
- H.-C. DIENER, C. G., P. KROPP 2018. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) in Zusammenarbeit mit der Deutschen Migräne- und Kopfschmerzgesellschaft (DMKG). Therapie der Migräne-attacke und Prophylaxe der Migräne.
- HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. & SIGWORTH, F. J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391, 85-100.
- HEDRICH, U. B., LIAUTARD, C., KIRSCHENBAUM, D., POFAHL, M., LAVIGNE, J., LIU, Y., THEISS, S., SLOTTA, J., ESCAYG, A., DIHNE, M., BECK, H., MANTEGAZZA, M. & LERCHE, H. 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, 14874-89.
- HEINEMANN, S. H., TERLAU, H., STUHMER, W., IMOTO, K. & NUMA, S. 1992. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, 356, 441-3.
- HERTLE, D. N., DREIER, J. P., WOITZIK, J., HARTINGS, J. A., BULLOCK, R., OKONKWO, D. O., SHUTTER, L. A., VIDGEON, S., STRONG, A. J., KOWOLL, C., DOHMEN, C., DIEDLER, J., VELTKAMP, R., BRUCKNER, T., UNTERBERG, A. W. & SAKOWITZ, O. W. 2012. Effect of analgesics and sedatives on the occurrence of spreading depolarizations accompanying acute brain injury. *Brain*, 135, 2390-8.
- HODGKIN, A. L. & HUXLEY, A. F. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 117, 500-44.
- ILLES, S., THEISS, S., HARTUNG, H. P., SIEBLER, M. & DIHNE, M. 2009. Niche-dependent development of functional neuronal networks from embryonic stem cell-derived neural populations. *BMC Neurosci*, 10, 93.
- JING, J., AITKEN, P. G. & SOMJEN, G. G. 1993. Role of calcium channels in spreading depression in rat hippocampal slices. *Brain Res*, 604, 251-9.
- JOUTEL, A., BOUSSER, M. G., BIOUSSE, V., LABAUGE, P., CHABRIAT, H., NIBBIO, A., MACIAZEK, J., MEYER, B., BACH, M. A., WEISSENBACH, J. & ET AL. 1993. A gene for familial hemiplegic migraine maps to chromosome 19. *Nat Genet*, 5, 40-5.

- KAHLIG, K. M., RHODES, T. H., PUSCH, M., FREILINGER, T., PEREIRA-MONTEIRO, J. M., FERRARI, M. D., VAN DEN MAAGDENBERG, A. M., DICHGANS, M. & GEORGE, A. L., JR. 2008. Divergent sodium channel defects in familial hemiplegic migraine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 9799-804.
- KAUBE, H., HERZOG, J., KAUFER, T., DICHGANS, M. & DIENER, H. C. 2000. Aura in some patients with familial hemiplegic migraine can be stopped by intranasal ketamine. *Neurology*, 55, 139-41.
- KIM, J. B. 2014. Channelopathies. *Korean J Pediatr*, 57, 1-18.
- KORS, E. E., TERWINDT, G. M., VERMEULEN, F. L., FITZSIMONS, R. B., JARDINE, P. E., HEYWOOD, P., LOVE, S., VAN DEN MAAGDENBERG, A. M., HAAN, J., FRANTS, R. R. & FERRARI, M. D. 2001. Delayed cerebral edema and fatal coma after minor head trauma: role of the CACNA1A calcium channel subunit gene and relationship with familial hemiplegic migraine. *Ann Neurol*, 49, 753-60.
- KOVERMANN, P., HESSEL, M., KORTZAK, D., JEN, J. C., KOCH, J., FAHLKE, C. & FREILINGER, T. 2017. Impaired K(+) binding to glial glutamate transporter EAAT1 in migraine. *Sci Rep*, 7, 13913.
- KRAMER, D. R., FUJII, T., OHIORHENUAN, I. & LIU, C. Y. 2016. Cortical spreading depolarization: Pathophysiology, implications, and future directions. *J Clin Neurosci*, 24, 22-7.
- KRUGER, L. C. & ISOM, L. L. 2016. Voltage-Gated Na⁺ Channels: Not Just for Conduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8.
- KUMAR, A., SAMANTA, D., EMMADY, P. D. & ARORA, R. 2022. Hemiplegic Migraine. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- LAMPL, C., KATSARAVA, Z., DIENER, H. C. & LIMMROTH, V. 2005. Lamotrigine reduces migraine aura and migraine attacks in patients with migraine with aura. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76, 1730-2.
- LASSEN, L. H., HADERSLEV, P. A., JACOBSEN, V. B., IVERSEN, H. K., SPERLING, B. & OLESEN, J. 2002. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia*, 22, 54-61.
- LAURITZEN, M. 1994. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain*, 117 (Pt 1), 199-210.
- LAURITZEN, M. & HANSEN, A. J. 1992. The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*, 12, 223-9.
- LEAO, A. A. 1947. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol*, 10, 409-14.
- LEO, L., GHERARDINI, L., BARONE, V., DE FUSCO, M., PIETROBON, D., PIZZORUSSO, T. & CASARI, G. 2011. Increased susceptibility to cortical spreading depression in the mouse model of familial hemiplegic migraine type 2. *PLoS Genet*, 7, e1002129.
- LEVY, D. 2010. Migraine pain and nociceptor activation--where do we stand? *Headache*, 50, 909-16.
- LI, D., XIAO, Y., XU, X., XIONG, X., LU, S., LIU, Z., ZHU, Q., WANG, M., GU, X. & LIANG, S. 2004. Structure--activity relationships of hainantoxin-IV and structure determination of active and inactive sodium channel blockers. *J Biol Chem*, 279, 37734-40.

- LIPTON, R. B., BIGAL, M. E., STEINER, T. J., SILBERSTEIN, S. D. & OLESEN, J. 2004. Classification of primary headaches. *Neurology*, 63, 427-35.
- MARINI, C., SCHEFFER, I. E., NABBOU, R., SULS, A., DE JONGHE, P., ZARA, F. & GUERRINI, R. 2011. The genetics of Dravet syndrome. *Epilepsia*, 52 Suppl 2, 24-9.
- MARRANNES, R., WILLEMS, R., DE PRINS, E. & WAUQUIER, A. 1988. Evidence for a role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. *Brain Res*, 457, 226-40.
- NEHER, E. & SAKMANN, B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260, 799-802.
- O'MALLEY, H. A. & ISOM, L. L. 2015. Sodium channel beta subunits: emerging targets in channelopathies. *Annu Rev Physiol*, 77, 481-504.
- OGATA, N. & OHISHI, Y. 2002. Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *Jpn J Pharmacol*, 88, 365-77.
- OGIWARA, I., MIYAMOTO, H., MORITA, N., ATAPOUR, N., MAZAKI, E., INOUE, I., TAKEUCHI, T., ITOHARA, S., YANAGAWA, Y., OBATA, K., FURUICHI, T., HENSCH, T. K. & YAMAKAWA, K. 2007. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J Neurosci*, 27, 5903-14.
- OLESEN, J., DIENER, H. C., HUSSTEDT, I. W., GOADSBY, P. J., HALL, D., MEIER, U., POLLENTIER, S. & LESKO, L. M. 2004. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N Engl J Med*, 350, 1104-10.
- OPHOFF, R. A., TERWINDT, G. M., VERGOUWE, M. N., VAN EIJK, R., OEFNER, P. J., HOFFMAN, S. M., LAMERDIN, J. E., MOHRENWEISER, H. W., BULMAN, D. E., FERRARI, M., HAAN, J., LINDHOUT, D., VAN OMMEN, G. J., HOFKER, M. H., FERRARI, M. D. & FRANTS, R. R. 1996. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell*, 87, 543-52.
- PAYANDEH, J., SCHEUER, T., ZHENG, N. & CATTERALL, W. A. 2011. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, 475, 353-8.
- PENG, K., SHU, Q., LIU, Z. & LIANG, S. 2002. Function and solution structure of huwentoxin-IV, a potent neuronal tetrodotoxin (TTX)-sensitive sodium channel antagonist from Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *J Biol Chem*, 277, 47564-71.
- PIETROBON, D. & BRENNAN, K. C. 2019. Genetic mouse models of migraine. *J Headache Pain*, 20, 79.
- PIETROBON, D. & MOSKOWITZ, M. A. 2013. Pathophysiology of migraine. *Annu Rev Physiol*, 75, 365-91.
- PIETROBON, D. & MOSKOWITZ, M. A. 2014. Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat Rev Neurosci*, 15, 379-93.
- PLUMMER, N. W. & MEISLER, M. H. 1999. Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics*, 57, 323-31.
- R. RUSCHEWEYH, S. F., C.GAUL, A. GENDOLLA, D. HOLLE-LEE, T. JÜRGENS, L.NEEB, A.STRAUBE 2018. Therapie der chronischen Migräne mit Botulinumneurotoxin A. Expertenempfehlung der Deutschen Migräne- und Kopfschmerzgesellschaft. *Nervenarzt*

- RIANT, F., ROOS, C., ROUBERTIE, A., BARBANCE, C., HADJADJ, J., AUVIN, S., BAILLE, G., BELTRAMONE, M., BOULANGER, C., CAHN, A., CATA, F., CHEURET, E., CUVELLIER, J. C., DEFO, A., DEMARQUAY, G., DONNET, A., GAILLARD, N., MASSARDIER, E., GUY, N., LAMOUREUX, S., LE MOIGNO, L., LUCAS, C., RATIU, D., REDON, S., REY, C., THAUVIN, C., VIALLET, F., TOURNIER-LASSERVE, E. & DUCROS, A. 2022. Hemiplegic Migraine Associated With PRRT2 Variations: A Clinical and Genetic Study. *Neurology*, 98, e51-e61.
- RUBAIY, H. N. 2017. A Short Guide to Electrophysiology and Ion Channels. *J Pharm Pharm Sci*, 20, 48-67.
- RUSSELL, M. B. & DUCROS, A. 2011. Sporadic and familial hemiplegic migraine: pathophysiological mechanisms, clinical characteristics, diagnosis, and management. *Lancet Neurol*, 10, 457-70.
- RUSSELL, M. B., ISELIUS, L. & OLESEN, J. 1995a. Inheritance of migraine investigated by complex segregation analysis. *Hum Genet*, 96, 726-30.
- RUSSELL, M. B. & OLESEN, J. 1995. Increased familial risk and evidence of genetic factor in migraine. *Bmj*, 311, 541-4.
- RUSSELL, M. B. & OLESEN, J. 1996. A nosographic analysis of the migraine aura in a general population. *Brain*, 119 (Pt 2), 355-61.
- RUSSELL, M. B., RASMUSSEN, B. K., THORVALDSEN, P. & OLESEN, J. 1995b. Prevalence and sex-ratio of the subtypes of migraine. *Int J Epidemiol*, 24, 612-8.
- SAVIO-GALIMBERTI, E., GOLLOB, M. H. & DARBAR, D. 2012. Voltage-gated sodium channels: biophysics, pharmacology, and related channelopathies. *Front Pharmacol*, 3, 124.
- SCHWARZ, N. 2015. Epilepsie und episodische Ataxie durch zwei synergistische Natriumkanalmutationen. *Dissertationsschrift Universität Tübingen*.
- SPIRA, M. E. & HAI, A. 2013. Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology. *Nat Nanotechnol*, 8, 83-94.
- STAM, A. H., LUIJCKX, G. J., POLL-THÉ, B. T., GINJAAR, I. B., FRANTS, R. R., HAAN, J., FERRARI, M. D., TERWINDT, G. M. & VAN DEN MAAGDENBERG, A. M. 2009. Early seizures and cerebral oedema after trivial head trauma associated with the CACNA1A S218L mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80, 1125-9.
- STEWART, W. F., SHECHTER, A. & RASMUSSEN, B. K. 1994. Migraine prevalence. A review of population-based studies. *Neurology*, 44, S17-23.
- STUHMER, W., CONTI, F., SUZUKI, H., WANG, X. D., NODA, M., YAHAGI, N., KUBO, H. & NUMA, S. 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, 339, 597-603.
- TAVRAZ, N. N., FRIEDRICH, T., DURR, K. L., KOENDERINK, J. B., BAMBERG, E., FREILINGER, T. & DICHGANS, M. 2008. Diverse functional consequences of mutations in the Na⁺/K⁺-ATPase alpha2-subunit causing familial hemiplegic migraine type 2. *J Biol Chem*, 283, 31097-106.
- TERWINDT, G. M., OPHOFF, R. A., HAAN, J., FRANTS, R. R. & FERRARI, M. D. 1996. Familial hemiplegic migraine: a clinical comparison of families linked and unlinked to chromosome 19.DMG RG. *Cephalalgia*, 16, 153-5.

- THOMSEN, L. L., ERIKSEN, M. K., ROEMER, S. F., ANDERSEN, I., OLESEN, J. & RUSSELL, M. B. 2002. A population-based study of familial hemiplegic migraine suggests revised diagnostic criteria. *Brain*, 125, 1379-91.
- TOTTENE, A., CONTI, R., FABBRO, A., VECCHIA, D., SHAPOVALOVA, M., SANTELLO, M., VAN DEN MAAGDENBERG, A. M., FERRARI, M. D. & PIETROBON, D. 2009. Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca(v)2.1 knockin migraine mice. *Neuron*, 61, 762-73.
- TOTTENE, A., FELLIN, T., PAGNUTTI, S., LUVISETTO, S., STRIESSNIG, J., FLETCHER, C. & PIETROBON, D. 2002. Familial hemiplegic migraine mutations increase Ca(2+) influx through single human CaV2.1 channels and decrease maximal CaV2.1 current density in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13284-9.
- TOZZI, A., DE IURE, A., DI FILIPPO, M., COSTA, C., CAPRONI, S., PISANI, A., BONSI, P., PICCONI, B., CUPINI, L. M., MATERAZZI, S., GEPPEPPI, P., SARCHIELLI, P. & CALABRESI, P. 2012. Critical role of calcitonin gene-related peptide receptors in cortical spreading depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 18985-90.
- VAN HARREVELD, A. 1959. Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle. *J Neurochem*, 3, 300-15.
- VANMOLKOT, K. R., BABINI, E., DE VRIES, B., STAM, A. H., FREILINGER, T., TERWINDT, G. M., NORRIS, L., HAAN, J., FRANTS, R. R., RAMADAN, N. M., FERRARI, M. D., PUSCH, M., VAN DEN MAAGDENBERG, A. M. & DICHGANS, M. 2007. The novel p.L1649Q mutation in the SCN1A epilepsy gene is associated with familial hemiplegic migraine: genetic and functional studies. Mutation in brief #957. Online. *Hum Mutat*, 28, 522.
- VASSILEV, P., SCHEUER, T. & CATTERALL, W. A. 1989. Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 8147-51.
- VERKHRATSKY, A., KRISHTAL, O. A. & PETERSEN, O. H. 2006. From Galvani to patch clamp: the development of electrophysiology. *Pflugers Arch*, 453, 233-47.
- WAEBER, C. & MOSKOWITZ, M. A. 2005. Migraine as an inflammatory disorder. *Neurology*, 64, S9-15.
- WALLACE, R. H., WANG, D. W., SINGH, R., SCHEFFER, I. E., GEORGE, A. L., JR., PHILLIPS, H. A., SAAR, K., REIS, A., JOHNSON, E. W., SUTHERLAND, G. R., BERKOVIC, S. F. & MULLEY, J. C. 1998. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet*, 19, 366-70.
- WANG, J. M., ROH, S. H., KIM, S., LEE, C. W., KIM, J. I. & SWARTZ, K. J. 2004. Molecular surface of tarantula toxins interacting with voltage sensors in K(v) channels. *J Gen Physiol*, 123, 455-67.
- WENGERT, E. R. & PATEL, M. K. 2021. The Role of the Persistent Sodium Current in Epilepsy. *Epilepsy Curr*, 21, 40-47.
- WEST, J. W., PATTON, D. E., SCHEUER, T., WANG, Y., GOLDIN, A. L. & CATTERALL, W. A. 1992. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁽⁺⁾-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10910-4.
- WESTENBROEK, R. E., SAKURAI, T., ELLIOTT, E. M., HELL, J. W., STARR, T. V., SNUTCH, T. P. & CATTERALL, W. A. 1995. Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci*, 15, 6403-18.

- YE, M., YANG, J., TIAN, C., ZHU, Q., YIN, L., JIANG, S., YANG, M. & SHU, Y. 2018. Differential roles of NaV1.2 and NaV1.6 in regulating neuronal excitability at febrile temperature and distinct contributions to febrile seizures. *Sci Rep*, 8, 753.
- YU, F. H. & CATTERALL, W. A. 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol*, 4, 207.
- YU, F. H., MANTEGAZZA, M., WESTENBROEK, R. E., ROBBINS, C. A., KALUME, F., BURTON, K. A., SPAIN, W. J., MCKNIGHT, G. S., SCHEUER, T. & CATTERALL, W. A. 2006. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci*, 9, 1142-9.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Hiermit erkläre ich, Niklas Vogel, dass meine Arbeit zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med. in der neurologischen Klinik der Universität Tübingen am Hertie-Institut zur klinischen Hirnforschung der Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt Epileptologie in der Arbeitsgruppe Migräne und primäre Kopfschmerzerkrankungen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Tobias Freilinger durchgeführt wurde.

Der Entwurf der Versuche erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. Tobias Freilinger und Frau Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch.

Die Versuche an den HEK-Zelllinien, den akuten Hirnschnitten zur Untersuchung einer CSD und den embryonalen hippocampalen Neuronenkulturen wurden (nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch, Herrn Dr. med. Niklas Schwarz, Herrn Dr. med. Henner Koch und Harshad P.A.) von mir eigenständig durchgeführt.

Die Anfertigung der akuten Hirnschnitte erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch und Herrn Harshad P.A..

Die Präparation der Embryonen aus dem Muttertier und die Präparation der Hippocampi aus den Embryonen erfolgte durch Frau Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch. Die Anfertigung der primären hippocampalen Neuronenkulturen erfolgte wiederum eigenständig unter Anleitung von Frau Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch. Ein Teil des Datensatzes (n=11) zu den Versuchen an primären hippocampalen Neuronenkulturen wildtypischer Mäuse wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Philipp Justus Lührs generiert.

Die Versuche zu den postsynaptischen spontanen inhibitorischen Eingängen an akuten Hirnschnitten erfolgten durch Frau Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch.

Die statistische Auswertung sämtlicher Versuche erfolgte (nach Anleitung durch Frau Dr. Ulrike Hedrich-Klimosch) durch mich.

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

Niklas Vogel

Düsseldorf, den 31.03.2023

8. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

AUFFENBERG, E., HEDRICH, U. B., BARBIERI, R., MIELY, D., GROSCHUP, B., WUTTKE, T. V., VOGEL, N., LÜHRS, P., ZANARDI, I., BERTELLI, S., SPIELMANN, N., GAILUS-DURNER, V., FUCHS, H., HRABĚ DE ANGELIS, M., PUSCH, M., DICHGANS, M., LERCHE, H., GAVAZZO, P., PLESNILA, N. & FREILINGER, T. 2021. Hyperexcitable interneurons trigger cortical spreading depression in an Scn1a migraine model. *J Clin Invest*, 131.

9. Danksagung

Ich bedanke mich in erster Linie bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. T. Freilinger, der mir mein Promotionsprojekt auf diesem Gebiet erst ermöglicht hat.

Ein besonderer Dank geht auch an Dr. Ulrike Hedrich, die mich als meine Betreuerin immer unterstützt, gefördert und motiviert hat.

Ein großer Dank gilt auch Hashard PA, der mir geholfen hat, wann immer ich eine helfende Hand benötigte.

Ich bedanke mich auch bei dem Rest aus der AG Lerche. Bei Kevin Klett, Florian Lutz und Dr. Niklas Schwarz, die in den Mittagspausen für die nötige Ablenkung gesorgt haben, bei Dr. Henner Koch und Philipp Lührs, die immer für einen Ideenaustausch zur Verfügung standen und bei allen anderen, welche die Zeit im Hertie-Institut für mich besonders gemacht haben.

Zudem bedanke ich mich bei meinen Eltern Edith und Ulrich Vogel, meinen beiden Brüdern Benjamin Truckenmüller und Danny Vogel, sowie Svenja Gehring, die mir auch abseits des Labors immer eine große Stütze waren und mich in schwierigen Zeiten stets motivierten.

Zuletzt danke ich dem IZKF-Promotionskolleg, welches mich nicht nur finanziell gefördert hat, sondern auch zu einem stetigen Austausch mit meinen Kommilitonen einlud, mich zum Vorantreiben meiner Dissertationsschrift motivierte und mir bei Fragen immer kompetent zur Seite stand.