

Aus der Abteilung für Zellbiologie  
Biomedizinisches Zentrum (BMC)  
Institut der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Michael Kiebler

# Die Rolle von spannungsgesteuerten, neuronalen Natriumkanälen in der Epileptogenese von Pumilio2 defizienten Mäusen



Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Philipp Follwaczny  
aus Donaueschingen

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
Der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Michael A. Kiebler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jan Rémi  
Prof. Dr. Ortrud Steinlein

Mitbetreuung durch die  
Promovierten Mitarbeiter: Dr. Rico Schieweck und  
PD Dr. Bastian Popper

Dekan: Prof. Dr. med Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2023

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

**Pumilio2-deficient mice show a predisposition for epilepsy**

Philipp Follwaczny, Rico Schieweck, Therese Riedemann, Antonia Demleitner, Tobias Straub, Anna H. Klemm, Martin Bilban, Bernd Sutor, Bastian Popper and Michael A. Kiebler; Disease Models & Mechanisms (2017) 51 (1): 57-67

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Molekulare Grundlagen der Epileptogenese</b>	<b>6</b>
1.1.1. Neuronale Erregung	6
1.1.2. Neuronale Inhibition	7
1.1.3. Spannungsgesteuerte Ionenkanäle	9
1.1.4. Transmittergesteuerte Ionenkanäle	10
<b>1.2. Die Rolle von RNA-Bindeproteinen in Neuronen</b>	<b>11</b>
1.2.1. Zellhomöostase	11
1.2.2. Das RNA-Bindeprotein Pumilio2 (Pum2)	12
<b>1.3. Pum2 defiziente Mäuse</b>	<b>16</b>
<b>1.4. Pum2 im Gesamtgehirn von Pum2<sup>GT</sup> Mäusen</b>	<b>17</b>
<b>1.5. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Mäuse und Gewebepräparation</b>	<b>19</b>
2.1.1. Mäuse	19
2.1.2. Gewebepräparation Immunfluoreszenzfärbungen	19
2.1.3. Gewebepräparation Biochemie	20
<b>2.2. RNA Analysen</b>	<b>20</b>
2.2.1. RNA Isolation	20
2.2.2. cDNA Synthese	21
2.2.3. RT-qPCR	21
<b>2.3. Proteinanalysen</b>	<b>23</b>
2.3.1. Herstellung der Lysate	23
2.3.2. Western Blot	24
<b>2.4. Immunfluoreszenz</b>	<b>25</b>
2.4.1. Gehirnschnitte	25
2.4.2. Färbung	25
2.4.3. Mikroskopie und Quantifizierung	26
<b>2.5. Statistik</b>	<b>28</b>
<b>2.6. Quelltext zur Quantifizierung</b>	<b>28</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Pum2 Defizient im Hippocampus</b>	<b>30</b>
3.1.1. Epileptische Anfälle in adulten Pum2 defizienten Mäusen	30
3.1.2. Pum2 im Hippocampus von Pum2 <sup>GT</sup> Mäusen	31

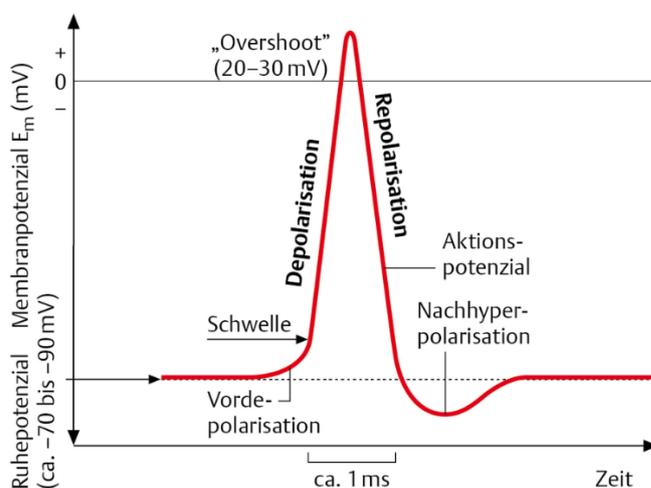
<b>3.2. Die Natriumkanäle Nav1.1, Nav1.2 und Nav1.6 im Kontext der Epileptogenese in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen</b>	<b>33</b>
<b>3.3. Pum2 Sequenzmotive in SCN1A, SCN2A und SCN8A</b>	<b>34</b>
<b>3.4. SCN1A Level in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen</b>	<b>36</b>
<b>3.5. Hippocampale Expression des spannungsabhängigen Natriumkanals Nav1.1 in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen</b>	<b>38</b>
3.5.1. Adulte Nav1.1 Expression im Hippocampus	38
3.5.2. Juvenile Nav1.1 Expression im Hippocampus	39
<b>3.6. SCN2A Level in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen</b>	<b>41</b>
<b>3.7. Hippocampale Expression des spannungsabhängigen Natriumkanals Nav1.2 in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen</b>	<b>42</b>
3.7.1. Adulte Nav1.2 Expression im Hippocampus	42
3.7.2. Juvenile Nav1.2. Expression im Hippocampus	43
<b>3.8. SCN8A Level in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen</b>	<b>45</b>
<b>3.9. Hippocampale Expression des spannungsabhängigen Natriumkanals Nav1.6 in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen</b>	<b>46</b>
3.9.1. Adulte Nav1.6 Expression im Hippocampus	46
3.9.2. Juvenile Nav1.6 Expression im Hippocampus	47
3.9.3. Nav1.6 Expression im Gesamtgehirn	49
3.9.4. Überlegungen zum Signal-Rausch Verhältnis bei Immunfluoreszenzexperimenten (Signal to noise/Gating)	50
<b>3.10. Alternatives Splicing der mRNA von SCN2A und SCN8A im Exon5</b>	<b>52</b>
<b>3.11. Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>58</b>
4.1. Die Rolle von Pum2 in der Epileptogenese	59
4.2. Auswirkung einer Pum2 Defizienz auf die Expression von spannungsgesteuerten Natriumkanälen	61
4.3. Die Rolle von Pum2 in inhibitorischen Interneuronen	63
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>65</b>
<b>6. Anhang</b>	<b>66</b>
6.1. Abkürzungsverzeichnis	66
6.2. Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis	67
<b>7. Literatur</b>	<b>68</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Molekulare Grundlagen der Epileptogenese

### 1.1.1 Neuronale Erregung

Der Entstehung von epileptischen Anfällen liegen verschiedene Ursachen zu Grunde. Auf diesen Ursachen, also der Ätiologie, basiert ein wichtiger Teil der Klassifikation einer Epilepsie und damit einhergehend auch die Therapie. So spricht man z.B. bei einer Mutation in Ionenkanälen von einer ‚genetischen‘ Epilepsie. Eine Epilepsie aufgrund einer Verletzung und damit einer einhergehenden Vernarbung von Gehirnparenchym wird als strukturelle Epilepsie bezeichnet. Die Basis der Entstehung epileptischer Anfälle bildet jedoch eine Störung in der Regulation der neuronalen Erregung (Staley 2015). Auf molekularer Ebene gibt eine Vielzahl an Proteinen, welche an der Generierung von Aktionspotentialen und damit der neuronalen Erregung beteiligt sind. **Abb.1** zeigt den Verlauf eines Aktionspotentials mit den einzelnen Phasen.



**Abb. 1:** Verlauf eines Aktionspotentials mit der Änderung des Membranpotentials über die Zeit. Ab dem Erreichen eines Schwellenpotentials kommt es durch das Öffnen spannungsabhängiger Natriumkanäle zu einer schnellen Depolarisation, welches als elektrisches Signal dient. Quelle: [via.medicini.thieme.de](http://via.medicini.thieme.de); Taschenatlas Physiologie, Thieme 2018.

An der Depolarisation der Zellmembran sind vor allem spannungsabhängige Natriumkanäle beteiligt, es kommt also zu einem verstärkten Einstrom von Natriumionen in die Zelle (Catterall 1992). Das Signal zum Öffnen dieser Kanäle führt zur Überschreitung des Ruhemembranpotentials. Die Repolarisation entsteht durch einen Ausstrom von Kaliumionen, welcher wiederum von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen gewährleistet wird. In der Ruhephase wird dann ein

energieabhängiger Ausgleich der Ionenkonzentrationen über die Natrium-/Kalium-ATPase geschaffen. Die Erregung in Form von Aktionspotentialen wird dann an den Synapsen in ein chemisches Signal umgewandelt und führt auf der Seite eines Dendriten im nachgeschalteten Neuron letztendlich wieder zur Ausbildung eines Aktionspotentials. Dies wiederum ermöglicht die neuronale Kommunikation innerhalb eines neuronalen Netzwerkes. Als Schnittstelle kommt den Synapsen somit auch eine besondere Regulation der Signalweitergabe zu. Ein eintreffendes Signal kann inhibiert oder aber propagiert werden (Müller et al. 2012). Zu diesen Mechanismen leisten wiederum transmittergesteuerte Ionenkanäle einen entscheidenden Beitrag, welche unter anderem den Transfer von Chlorid-, Natrium-, Kalium- oder Calciumionen gewährleisten (McNamara, Huang and Leonard 2006). Durch den Einstrom bestimmter Ionen kommt es so zu einer Propagation oder Inhibition eines eingehenden Aktionspotentials. Vereinfacht betrachtet könnte die Kommunikation zwischen einzelnen Neuronen somit zunächst als digitales Signal betrachtet werden. Es kann ein Aktionspotential und somit ein Signal entstehen oder aber die initiale Potentialdifferenz über die Zellmembran ist nicht ausreichend, wodurch kein Aktionspotential entsteht. Der Realität kommt jedoch die Beschreibung Analog näher. Neben der Inhibition oder Propagation eines Aktionspotentials an der Postsynapse tragen spezifische Zelltypen zu weiteren Kombinationsmöglichkeiten im Sinne der Kommunikation bei. Vereinfacht betrachtet kann ein, an einem Neuron eingehendes Signal 1:1 weitergeleitet werden und somit die nachgeschaltete Nervenzelle erregen oder aber es erfolgt eine Signalumkehr, indem das Empfängerneuron gehemmt wird. Darüber hinaus kann auch eine „Feedback“ Hemmung des vorgeschalteten Neurons erfolgen oder eine Disinhibition, indem zwei inhibierende Zellen hintereinander geschaltet sind (Roux and Buzsáki 2015). Somit ergibt sich eine Vielzahl weiterer Möglichkeiten der neuronalen Inhibition. Zellen mit dieser Funktion werden inhibitorische Interneurone genannt.

### 1.1.2 Neuronale Inhibition

Das Vorkommen inhibitorischer Interneurone im Hippocampus ist bisher gut beschrieben. Eine gängige Charakterisierung stellt das Vorkommen bestimmter calciumbindenden Proteine dar. So können Parvalbumin, Calbindin oder Calretinin positive Zelltypen unterschieden werden. Unter den Parvalbumin positiven Zellen kann man aufgrund der folgenden morphologischen Kriterien eine weitere Differenzierung

in drei weitere Subklassen vornehmen, abhängig von der Lage des Zellkörpers und der axonalen Projektion in unterschiedliche Schichten des Cornu Ammonis (CA) des Hippocampus (McBain and Fisahn 2001). Neben den CA Regionen kommen diese Zellen aber auch im Gyrus Dentatus im Bereich des Hilus vor (Dudek and Sutula 2007).

Stark vereinfacht betrachtet wird ein an den Dendriten dieser Zellen eingehendes Signal durch GABAerge Transmission an der Präsynapse als inhibitorisches Signal an die Postsynapse der nachfolgenden Zelle weitergeleitet. Durch verschiedene axonale Projektionen kann die nachfolgende Zelle dann im Bereich der Dendriten, des Somas oder am Axon inhibiert werden (Sloviter et al. 2006; Ogiwara et al. 2007).

Es wurde bereits früh erkannt, dass das Gehirn dauerhaft eine Grundaktivität aufweist. Durch EEG (Elektroenzephalogramm) Ableitungen konnte herausgefunden werden, dass bestimmte Gehirnregionen eine bestimmte, rhythmische Grundfrequenz aufweisen, welche sich abhängig vom Aktivitätszustand verändert (Teplan 2012).

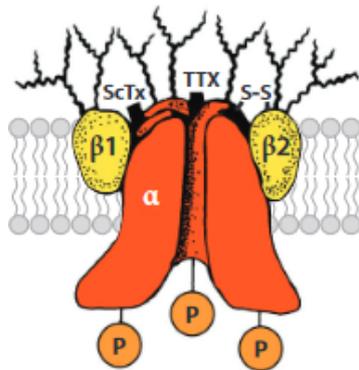
Elektrophysiologische Messungen ergaben, dass neuronale Netzwerke ebenfalls oszillieren. Die bekanntesten Frequenzbänder sind der Theta- (ca. 4-12Hz) und der Gammabereich (ca. 30-80Hz). Auf Netzwerkebene betrachtet stellt diese Oszillation einen Funktionszustand einer bestimmten Gehirnregion dar. Bisherige Untersuchungen ergaben, dass inhibitorische Interneurone wesentlich an der Modulation dieser Oszillation beteiligt sind (Whittington, Jefferys, and Traub 1996; Chapman and Lacaille 1999). So kann ein Interneuron auf mehrere Pyramidenzellen projizieren, was eine grundlegende Eigenschaft der Regulation eines Netzwerkes darstellt (Kann, Papageorgiou, and Draguhn 2014). Eine fehlende Frequenzmodulation in tieferen Hirnregionen kann durch ein Überschießen zu einer synchronen Anregung höherer Gehirnregionen führen und somit einen epileptischen Anfall auslösen (Chrobak and Buzsaki 1994; Bragin et al. 1995).

Aufgrund dessen stehen mitunter inhibitorische Interneurone im Fokus der Forschung an Epilepsie. Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass experimentell induzierte epileptische Anfälle zu einem Verlust von Interneuronen im Hippocampus führen (Obenaus, Esclapez, and Houser 1993; Houser and Esclapez 1996; Buckmaster and Jongen-Rêlo 1999). Darüber hinaus ist bekannt, dass im experimentell erzeugten Epilepsiemodell die durch  $Na_v1.1$  vermittelten, schnellen Natriumeinströme in

Interneuronen im Hippocampus reduziert sind. Interessanterweise tritt dies bei exzitatorischen Pyramidenzellen nicht auf (Yu et al. 2006).

### 1.1.3 Spannungsgesteuerte Ionenkanäle

Wie eingangs erwähnt, bilden spannungsgesteuerte Ionenkanäle die Grundlage der neuronalen Depolarisation. Im Folgenden soll auf die genauere Funktion eines solchen Kanals, im Speziellen auf spannungsgesteuerte Natriumkanäle, eingegangen werden.



**Abb. 2:** Modularer Aufbau eines spannungsgesteuerten Natriumkanals. Der Kanal ist in der Zellmembran verankert. Die  $\alpha$ -Untereinheit stellt die „Pore“ als Durchlass für Natriumionen dar. Die  $\beta$ -Untereinheiten induzieren eine Konformationsänderung in Abhängigkeit einer Potentialdifferenz und bedingen dadurch den Durchlass von Natrium-Ionen. P: Phosphorylierungsstellen; ScTx, TTX, S-S markieren Bindestellen für Toxine (Tetrodotoxin) auf der  $\alpha$ -Untereinheit. Die gewellten Linien sind potentielle Glykosylierungsstellen (Catterall et. al 2020).

**Abb. 2** zeigt den modularen Aufbau eines spannungsgesteuerten Natriumkanals ( $Na_v$ ).  $Na_v$ -Kanäle sind Transmembranproteine, welche den selektiven Durchlass von Natriumionen in Abhängigkeit einer Potentialdifferenz zwischen Intra- und Extrazellulärraum ermöglichen. Dies erfordert einen modularen Aufbau des Kanals, weshalb der Kanal aus verschiedenen Untereinheiten besteht. Die  $\alpha$ -Untereinheit (250kDa) besteht aus 24 Transmembranproteinen. Durch diese können Natriumionen passieren. Die beiden  $\beta$ -Untereinheiten haben jeweils eine Masse von 30-40kDa und sind singuläre Transmembranproteine, die im Wesentlichen für die Kinetik und die spannungsabhängige Aktivierung verantwortlich sind. Bei Erreichen des Schwellenpotentials von ca. -55mV öffnet der Kanal durch eine Konformationsänderung der S1-S4 Transmembrandomäne. Nach 1-2ms schließt sich der Kanal und geht schließlich wieder in den aktivierbaren Zustand über (Catterall, Lenaeus and Gamal El-Din 2020). Durch Unterschiede in der Zusammensetzung der Untereinheiten ergibt sich eine heterogene Proteinfamilie mit verschiedenen Typen. Die im menschlichen Gehirn am häufigsten vertretenen Typen sind  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$  und  $Na_v1.6$  (Leterrier et al. 2010). Durch alternatives Splicing ergibt sich eine zusätzliche Heterogenität. Dies wurde bisher vor allem für *SCN2A* (Gazina et al. 2015) und *SCN8A* (Gazina et al. 2010) beschrieben. Das Vorkommen von bestimmten

Splicevarianten kann die neuronale Erregbarkeit vermindern (Lin and Baines 2015; Gazina et al. 2015). Eine Dysregulation z.B. im Rahmen einer Mutation in diesen Kanälen kann zu schweren Verlaufsformen von Epilepsie führen (Hargus et al. 2013; Blanchard et al. 2015). Die neuronale Erregbarkeit kann durch Modulation und Steuerung der Expression dieser Kanäle verändert werden (Lin and Baines 2015). Aus diesem Grund stellen spannungsabhängige Ionenkanäle Zielstrukturen in der Pharmakotherapie von Epilepsie dar. Antikonvulsive Medikamente wie Carbamazepin und andere wirken speziell auf diesen Kanal (Catterall, Lenaeus, and Gamal El-Din 2020; Uebachs et al. 2012). Neben den spannungsgesteuerten Natriumkanälen tragen aber auch die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle KCNQ2 und KCNQ3 zur Epileptogenese bei (Mulley et al. 2006).

#### 1.1.4 Transmittergesteuerte Ionenkanäle

Im Gegensatz zu den spannungsgesteuerten Ionenkanälen reagieren transmittergesteuerte Ionenkanäle auf das Binden bestimmter Liganden an die Rezeptoreinheit (Behrends et al. 2017). Ein bekannter Vertreter dieser Rezeptortypen ist der GABA<sub>A</sub> Rezeptor, welcher auf das Binden von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) einen schnellen Einstrom von Chloridionen ermöglicht. Daraus resultiert eine neuronale Inhibition. Der Kanal öffnet nach Binden eines Liganden durch eine Konformationsänderung, er wird somit als ionotroper Rezeptor bezeichnet (Zhu et al. 2018). Auch in der GABA<sub>A</sub> Rezeptorfamilie herrscht eine relativ große Heterogenität. Kombinationen aus 19 unterschiedlichen Untereinheiten sind insgesamt möglich. Die häufigste Variante stellt die  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  Konformation dar, diese besteht aus zwei  $\alpha_1$ -, zwei  $\beta_2$ - und einer  $\gamma_2$ -Untereinheit(en) (Zhu et al. 2018). GABA bindet an die  $\beta$ - $\alpha$  Bindestelle, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt und Chloridionen einströmen können. Neben dieser besitzt der Rezeptor auch allosterische Bindestellen. Bindet ein Ligand an die  $\alpha$ - $\gamma$  Bindestelle, ändert sich die Wahrscheinlichkeit, dass sich der Kanal im offenen Zustand befindet, was einen geöffneten Zustand widerspiegelt (Riss et al. 2008). So können Arzneimittel wie Benzodiazepine den offenen Zustand stabilisieren und somit eine verstärkte neuronale Inhibition erzeugen (Zhu et al. 2018). Neben den ionotropen Rezeptoren existieren auch metabotrope Rezeptoren. Das Funktionsprinzip beruht hier auf der Existenz sogenannter G Proteine, einer zwischengeschalteten Protein-Kaskade zur Signaltransduktion, welche zu einer Öffnung des Kanals führt. Für den Ablauf dieser

Kaskade wird Energie in Form von Guanosintriphosphat (GTP) benötigt, weshalb die Rezeptoren auch als G-Protein gekoppelte Rezeptoren bezeichnet werden (Frangaj and Fan 2018). Der GABA<sub>B</sub> Rezeptor zählt zu dieser Art von Rezeptoren. Auch er führt durch den Austausch von Calcium- und Kaliumionen über die Plasmamembran zu einer neuronalen Inhibition. Im Vergleich zum GABA<sub>A</sub> Rezeptor ist seine Kinetik aufgrund der zwischengeschalteten Proteinkaskade deutlich langsamer. Neben GABA können Arzneistoffe wie Baclofen an den Rezeptor binden (Frangaj and Fan 2018). Störungen in diesem GABAergen System können die Grundlage für die Entstehung von epileptischen Anfällen sein (Staley 2015). Neben dem GABAergen System spielen auch andere transmittergesteuerte Ionenkanäle eine Rolle in der Epileptogenese (McNamara, Huang, and Leonard 2006). An dieser Stelle sind die AMPA- und die NMDA-Rezeptoren zu erwähnen. Diese Rezeptoren werden durch den Ligand Glutamat aktiviert. Störungen in diesem System tragen ebenfalls zur Epileptogenese bei (Staley 2015).

## 1.2 Die Rolle von RNA-Bindeproteinen in Neuronen

### 1.2.1 Zellhomöostase

Homöostase beschreibt die Aufrechterhaltung weitgehend konstanter Verhältnisse in einem dynamischen Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht wird durch zelleigene Vorgänge gesteuert. In Neuronen dient es der Regulation der elektrischen Aktivität als übergeordnetes Ziel (O'Leary and Wyllie 2011). Dadurch stehen regulative Mechanismen in engem Zusammenhang mit der elektrischen Aktivität von Neuronen. Man spricht daher von aktivitätsregulierenden Mechanismen. Diese werden im Wesentlichen in zwei Kategorien unterteilt. Zum einen die Regulation an der Synapse und zum anderen die Regulation der Membranerregbarkeit, wobei eine gewisse Überschneidung der Kategorien besteht (O'Leary and Wyllie 2011). Neben der Steuerung der Genexpression im Zellkern, stellt die lokale Proteinexpression an der Synapse somit eine weitere wichtige Regulationsebene dar. An diesen Mechanismen der Synapse sind unter anderem RNA-Bindeproteine (RBPs) wesentlich beteiligt. Sie helfen, die molekulare Zusammensetzung einer Synapse und damit deren Funktion zu steuern. Hierbei kontrollieren sie die Lokalisation und lokale Translation von mRNA (Schieweck et al. 2021; Bramham and Wells 2007). Weiterhin wurde für RBFOX1 bisher auch eine Rolle beim alternativen Splicen belegt (Carreira-Rosario et al. 2016).

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression von Liganden-gesteuerten Ionenkanälen wie dem AMPA- oder dem NMDA-Rezeptor aber auch spannungsabhängige Ionenkanäle wie dem  $K_v1.1$  auf diese Weise durch RBPs an der Synapse reguliert wird (Wang et al. 2016; Bureau, Shepherd, and Svoboda 2008). Bisher wurden die RNA-Bindeproteine FMRP und RBFOX1 mit der Entstehung epileptischer Anfälle in Verbindung gebracht (Hengst et al. 2006; Lal et al. 2013) In Mäusen führte zudem eine Pumilio 2 Defizienz zu epileptischen Anfällen (Follwaczny et al. 2017; Siemen et al. 2011).

### 1.2.2 Das RNA-Bindeprotein Pumilio 2 (Pum2)

Die Funktion und Entwicklung des zentralen Nervensystems bedingen eine extrem hohe Variabilität der daran beteiligten Neurone. Insbesondere das Gehirn ist hier einer großen zellulären Dynamik ausgesetzt, welche Vorgänge wie z.B. das Lernen ermöglichen. Die sogenannte „synaptische Plastizität“ beschreibt hier permanente Vorgänge des Umbaus neuronaler Netzwerke und der damit verbundenen Veränderungen der Genexpression (Mauger and Scheiffele 2017). Dies setzt eine große Anzahl an transkriptionellen und posttranskriptionellen Modulationsmöglichkeiten voraus. Von der DNA zum Protein kann eine Regulation somit auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Transkription, Splicing, Translation, RNA Transport, sowie RNA Stabilität sind hierbei wesentliche Punkte, an denen regulatorisch eingegriffen werden kann (Alberts et al. 2014). RBPs kommen hierbei eine Schlüsselrolle zu da sie, nach der Transkription, an den oben genannten Regulationsschritten beteiligt sind (Schieweck, Ninkovic, and Kiebler 2021).

Es existiert eine Vielzahl verschiedener RBPs, welche zelltypspezifisch sind und räumlich und zeitlich agieren. Verschiedene, spezifische RNA Bindedomänen ermöglichen eine hohe Variabilität der Regulation, da den RBPs eine veränderte Spezifität zu einer RNA, in Abhängigkeit eines jeweiligen Komplexes mit anderen Proteinen zukommen kann (Heo and Kim 2009).

Soll ein bestimmtes Gen exprimiert und somit ein Protein hergestellt werden, wird zunächst RNA durch die Transkription hergestellt, welche dann in der Translation in ein Protein übersetzt wird. Ein erster wichtiger Schritt in der RNA Prozessierung ist das Splicing. Durch alternatives Splicing ergibt sich die Möglichkeit der Herstellung verschiedener Proteinisoformen. Für die RBPs Nova1 und Nova2 ist eine Beteiligung

am alternativen Splicing bereits belegt (Ule et al. 2006). Ziel RNAs sind hierbei z.B. die der synaptischen Proteine wie dem Gerüstprotein Gephyrin oder dem Kaliumkanal Girk 2. Beide kommen v.a. an inhibitorischen Synapsen vor, wodurch Nova 1/2 eine wesentliche Rolle in inhibitorischen Signalwegen spielt (Huang et al. 2005; Ule et al. 2006).

Schlussendlich kann auch die RNA der RBPs selbst dem alternativen Splicing, u.a. durch andere RBPs, unterliegen, wodurch eine komplexe Interaktion verschiedener RBPs bestehen kann. So ist z.B. Ptbp1 am alternativen Splicing von Ptbp2 beteiligt (Raj and Blencowe 2015). Ptbp1 kann durch alternatives Splicing das Exon 10 der mRNA von Ptbp2 entfernen, wodurch ein vorzeitiges Stoppcodon eingefügt wird (Boutz et al. 2007; Spellman, Llorian, and Smith 2007). Vereinfacht ausgedrückt wird dadurch verhindert, dass der Multiprotein-Splicingfaktor Exon Junction Complex (EJC) von der *Ptbp2* mRNA entfernt wird. Die Expression von Ptbp2 ist wiederum wichtig für die Differenzierung von neuronalen Stammzellen in Neurone (Kurosaki, Popp, and Maquat 2019; Lejeune et al. 2002). Bisher konnte vor allem eine überschießende Neurogenese mit schwereren Symptomen einer Epilepsie in Verbindung gebracht werden (Hosford, Liska, and Danzer 2016).

Schlussendlich wird durch die Translation ein Protein mit Hilfe einer mRNA hergestellt. Die zelluläre Proteinsynthese ist ein komplexer und streng regulierter Prozess, welcher ebenfalls von RBPs beeinflusst werden kann. Eines der bekanntesten Beispiele ist hier das Protein mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Durch die Kombination mit verschiedenen anderen Proteinen entstehen Komplexe, die sich in ihrer Sensitivität auf Rapamycin, einem mTOR Inhibitor, unterscheiden. mTOR selbst ist wiederum an vielen verschiedenen Signalwegen in der Zelle beteiligt und nimmt über Translationsfaktoren wie die S6K1 oder 4EBP1 Einfluss auf die Translation anderer Proteine. In Neuronen kann mTOR somit regulierend auf die Synthese von Gephyrin, einem Gerüstprotein, einwirken (Sabatini et al. 1999). An diesem können wiederum GABA oder Glycin Rezeptoren verankert werden (Tyagarajan and Fritschy 2014). Die *mTOR* mRNA kann wiederum von dem RBP Nucleolin gebunden werden, wodurch die lokale Translation im Axon reguliert wird (Terenzio et al. 2018).

Aufgrund der Neuronen-spezifischen Morphologie kommt dem mRNA Transport und der nachfolgenden lokalen Proteinsynthese eine besondere Bedeutung zu. Daher

haben RBPs eine essentielle Funktion in der embryonalen Entwicklung, in der Ausbildung von Zellausläufern wie Axone und Dendriten, aber auch bei der Ausbildung von Synapsen (Jung et al. 2014; Pouloupoulos et al. 2019).

Die bisherige Annahme ist, dass mRNAs in der 3'-UTR sogenannte Sortiersignale (zipcodes) besitzen, welche den Transport der RNA ermöglichen (Andreassi and Riccio 2009). Diese zipcodes können dann von RBPs erkannt werden, die dann zusammen mit anderen Proteinen sogenannte „RNA-Granula“ bilden (Kiebler and Bassell 2006; Kiebler et al. 1999; Krichevsky and Kosik 2001). Diese RNA-Granula werden dann mithilfe von Motorproteinen entlang dem Zytoskelett zum Zielort transportiert (Kanai, Dohmae, and Hirokawa 2004). Innerhalb dieser RNA-Granula fungieren RBPs auch als Translationsregulatoren. Oft wird somit verhindert, dass die mRNA bereits während des Transportes translatiert wird (Hüttelmaier et al. 2005).

Schlussendlich ist die Stabilität und Lebenszeit einer mRNA ebenfalls von Bedeutung für die Proteinsynthese. Bisher ist bekannt, dass der PolyA Schwanz am 3'-Ende einer mRNA hier eine wesentliche Rolle spielt. Ein längerer PolyA Schwanz führt zu einer verstärkten Translation und damit zu einer längeren Lebensdauer (Mendez and Richter 2001). Ein Proteinkomplex, welcher für die Kürzung des PolyA Schwanzes zuständig ist, ist der CCR4-NOT Komplex (Collart 2016). Es ist bekannt, dass Proteine der Pumilio Genfamilie an diesen Komplex binden und somit eine Kürzung des Schwanzes bewirken (Van Etten et al. 2012; Goldstrohm et al. 2006).

Das RBP Pumilio2 fällt in diese Pumilio Genfamilie (Puf). Die Puf Proteine besitzen ein evolutionär konserviertes Charakteristikum. Sie binden präferentiell im Bereich der 3'-UTR von RNA mit der Zielsequenz der Abfolge 3'-UGUR-5', gefolgt von vier weiteren Basenpaaren, dem sogenannten Nanos response element (Jenkins, Baker-Wilding, and Edwards 2009; Gamberi et al. 2002; Wang et al. 2018; Miller, Higgin, and Tanaka Hall 2008). Die Bindedomäne besteht aus acht  $\alpha$ -Helices (Puf1 - Puf8), von der jede Kontakt zu einer Base aufnimmt (Jenkins, Baker-Wilding, and Edwards 2009). Für Pum2 sind bisher drei verschiedene Sequenzmotive bekannt: 1. TGTAATA, 2. TGTAGATA und 3. TGTACATA, welche von Pum2 gebunden werden können (White, Moore-Jarrett, and Ruley 2001). Diese Bindestellen konnten bisher durch unterschiedliche Methoden wie individual-nucleotide resolution Cross-linking and

Immuno Precipitation (iCLIP) und PolyU *tagging* bestätigt werden (Zahr et al. 2018; Lapointe et al. 2015)

Auf diese Weise erfolgt eine lokale Steuerung der Translation. Für Pum2 ist vor allem eine Regulation auf Proteinebene, jedoch nicht so sehr auf mRNA Ebene bekannt. Dadurch lässt sich rückschließen, dass Pum2 vor allem als Translationsregulator fungiert (Schieweck et al. 2021). Durch die Interaktion mit der 5'-Cap Struktur der mRNA wirkt es als Translationssuppressor (Mendez and Richter 2001). Zusätzlich kann Pum2 über eine Interaktion mit den Elongationsfaktoren EF1A und den Argonaute Proteinen die Translation hemmen (Friend et al. 2012). Auf ähnliche Weise bewirkt Pum2 über das Protein FMRP eine Regulation der Translation (Stefani et al. 2004). Eine komplexe Interaktion scheint Pum2 auch mit dem RNA-Bindeprotein Staufen 2 einzugehen, welches wiederum für den mRNA Transport zuständig ist (Goetze et al. 2006; Fritzsche et al. 2013; Heraud-Farlow and Kiebler 2014).

Das Protein Pum2 ist bisher in vielen Organismen, von der Hefe bis zum Menschen, evolutionär konserviert. In der Maus und im Menschen wurde Pum2 bisher vor allem in embryonalen Stammzellen, Keimzellen und Neuronen nachgewiesen (Gamberi et al. 2002; Zhang et al. 2017). Im Gehirn der Maus kommt Pum2 nahezu ubiquitär in allen cerebralen Regionen vor (Siemen et al. 2011). Insbesondere das Vorkommen im Hippocampus der Maus und Menschen ist bisher gut belegt (Siemen et al. 2011; Vessey et al. 2006; Wu et al. 2015). In Neuronen kommt Pum2 auch eine wichtige Rolle in der neuronalen Entwicklung und damit verbunden, bei der Ausbildung neuronaler Ausläufer, zu (Vessey et al. 2010). Pum2 lokalisiert sich daher vor allem im somatodendritischen Kompartiment von Neuronen. In Dendriten trägt Pum2 so auch wesentlich zur Entwicklung der typischen Morphologie bei. Ein Fehlen von Pum2 führt so zu einer deutlich geringeren Ausbildung dendritischer *spines* (Vessey et al. 2010). Aber auch im Axon kann Pum2 durch eine Retention von mRNA das axonale Wachstum aktivieren (Martínez et al. 2019).

Betrachtet man die Ebene der Synapsen, so sind auch dort interessante Effekte von Pum2 bekannt. Ein Fehlen von Pum2 scheint so zu einer verstärkten Erregbarkeit zu führen (Vessey et al. 2010). In diesem Zusammenhang ist der direkte Zusammenhang von Pum2 sowie der Ionenkanäle wie Nav 1.1 oder Nav 1.6 bereits belegt (Vessey et al. 2010; Driscoll et al. 2013; Mee 2004). Weiterhin ist bekannt, dass Pum2 auch im

inhibitorischen, GABAergen System eine regulatorische Funktion übernimmt. So gelang der Nachweis, dass Pum2 den GABA<sub>A</sub> Rezeptor herunterreguliert (Schieweck et al. 2021).

Wie andere RBPs auch liegt Pum2 intrazellulär in sog. „Ribonukleoprotein-Partikeln“ (RNPs) vor (Vessey et al. 2006). Eine Assemblierung verschiedener RNPs führt wiederum zu der Bildung von „RNA-Granula“ (Fritzsche et al. 2013; Heraud-Farlow and Kiebler 2014; Kiebler and Bassell 2006). In diesem Zusammenhang konnte auch eine Funktion von Pum2 in sogenannten „Stress Granula“ nachgewiesen werden, welche wiederum eine Rolle bei der Regulation von metabolischem Stress zukommt, wie er unter anderem bei epileptischen Anfällen entsteht (Vessey et al. 2006).

RBPs und so auch Pum2 schaffen somit unter anderem durch die Regulation der Proteinsynthese ein gewisses Gleichgewicht bei der neuronalen Erregbarkeit (Schieweck, Ninkovic, and Kiebler 2021). Eine Dysregulation und somit ein gestörtes Gleichgewicht, kann daher zur Entstehung von cerebralen Erkrankungen wie z.B. Epilepsie führen.

### 1.3 Pumilio 2 defiziente Mäuse

Mäuse, bei denen die Pum2 Expression ausgeschaltet wurde, zeigen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen multiple Veränderungen (Follwaczny et al. 2017; Siemen et al. 2011). Auf Verhaltensebene scheint dies unter anderem das Fressverhalten und das Aktivitätsniveau zu betreffen (Siemen et al. 2011). Aber auch das Lernen scheint in Pum2 defizienten Mäusen eingeschränkt zu sein. Ein Doppelknockout von Pum1 und Pum2 in Mäusen ergab konsekutiv deutliche Einschränkungen im Langzeitgedächtnis und der räumlichen Orientierung. So haben betroffene Tiere beispielsweise deutliche Schwierigkeiten, bestimmte Wege wieder zu finden oder Objekte wiederzuerkennen (Zhang et al. 2017; Siemen et al. 2011). Auf zellulärer Ebene wurde als mögliches, morphologisches Korrelat eine erhöhte Apoptoserate im Gyrus Dentatus sowie eine gestörte Neurogenese gefunden (Zhang et al. 2017). Eine weitere interessante Beobachtung ist das Auftreten spontaner, epileptischer Anfälle bei Pum2 defizienten Mäusen (Follwaczny et al. 2017; Siemen et al. 2011). Weiterführende Untersuchungen ergaben entsprechende elektrophysiologische Veränderungen. So konnten in 50% der Tiere, mittels Video-EEG-Monitoring, typische Veränderungen der kortikalen Erregung in Zusammenhang mit Absence-ähnlichem Verhalten beobachtet werden (Siemen et

al. 2011). Im Hippocampus scheint zudem die Aktivität inhibitorischer Interneurone herabgesetzt zu sein (Follwaczny et al. 2017; Schieweck et al. 2021). Auf molekularer Ebene ergeben sich multiple Veränderungen, welche möglicherweise ursächlich für o.g. Einschränkungen sein können. Pum2 fördert z.B. die GABAerge, inhibitorische Transmission (Schieweck et al. 2021). Weiterhin zeigt sich eine veränderte Expression typischer Proteine. So ist auf mRNA Ebene im Hippocampus die Expression des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kcnq3 aber auch die des spannungsabhängigen Natriumkanals Nav 1.1 runterreguliert. Im Bulbus olfactorius und im Kleinhirn ist zudem die Expression von Nav 1.2 verringert (Siemen et al. 2011). In der Fruchtfliege ergab sich durch eine Repression der Translation des spannungsabhängigen Ionenkanal Nav 1.6, zudem ein direkter Einfluss von Pum2 auf die Membranerregbarkeit (Driscoll et al. 2013).

## 1.4 Pumilio 2 im Gesamtgehirn von Pum2<sup>GT</sup> Mäusen

Um zu überprüfen, ob das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell eine Pum2 Defizienz aufweist und es somit für die nachfolgenden Experimente geeignet ist, erfolgte zunächst eine Charakterisierung der mir zur Verfügung stehenden Maus Mutante.

Die Daten der experimentellen Überprüfung des Konstruktes zum Knock-Down von Pum2 wurden bereits in Follwaczny et. al. 20017 veröffentlicht. Ergebnisse der RT-qPCR ergaben eine signifikante Reduktion der *Pum2* RNA im Gesamtgehirn. Im Vergleich zum Wildtyp konnte eine Reduktion der *Pum2* mRNA um mehr als 50% beobachtet werden. Auf Proteinebene wurde dieser Effekt in einer noch stärkeren Ausprägung beobachtet. Western-Blot Analysen ergaben eine signifikante Reduktion von Pum2. Im Vergleich zum Wildtyp konnte nahezu kein Protein mehr nachgewiesen werden. Daraus lässt sich die Funktionalität des Gene-Trap-Mausmodells schlussfolgern, welches durch eine Insertion zwischen Exon 10-11 zu einem verkürzten und somit nicht mehr funktionsfähigem Protein führt. Aufgrund seines epileptogenen Potentials und der weiteren Untersuchungen lag der Fokus auch auf dem im Temporallappen liegenden Hippocampus als integraler Bestandteil des limbischen Systems. Darum erfolgte die Bestimmung von Pum2 auf Proteinebene auch selektiv im Hippocampus. Die Western-Blot Ergebnisse ergaben auch hier eine deutliche Reduktion von Pum2 in Hippocampus-Extrakten. Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Experimente, dass das Tiermodell bestens geeignet für weitere Experimente ist.

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Wie eingangs erwähnt, spielen spannungsgesteuerte Natriumkanäle eine wesentliche Rolle bei der Epileptogenese. Auch die Variation der Proteinzusammensetzung von Nav Kanälen durch alternatives Splicing kann die Entstehung epileptischer Anfälle beeinflussen. Weiterhin weisen Pum2 defiziente Mäuse das Auftreten spontaner epileptischer Anfälle auf. Bisher konnte ein Einfluss von Pum2 auf mRNA Ebene für die Kanäle Nav1.1, Nav1.2 und Nav1.5 in verschiedenen Regionen nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden folgende daher Fragestellungen formuliert:

- I. Sind die mRNAs der spannungsgesteuerten Natriumkanäle *SCN1A*, *SCN2A* und *SCN8A* ein potentiell Ziel von Pum2 und wie wirkt sich dessen Einfluss auf die mRNA Level im Gesamtgehirn von Mäusen aus?
- II. In welchem Maß beeinflusst Pum2 die Proteinexpression von Nav1.1, Nav1.2 und Nav1.6 im Hippocampus und im Gesamtgehirn?
- III. Treten Splicevarianten von *SCN2A* und *SCN8A* in Pum2 defizienten Mäusen auf?

Um diese Fragestellungen zu bearbeiten, wurde zunächst eine theoretische Bindestellenanalyse der Ziel mRNAs durchgeführt. Anschließend wurde mittels RT-qPCR Änderungen der mRNA Level *SCN1A*, *SCN2A* und *SCN8A* ermittelt. Weiterhin wurden mögliche Splicevarianten der mRNAs von *SCN2A* und *SCN8A* nachgewiesen. Um einen möglichen Einfluss von Pum2 auf die Proteinexpression von Nav1.1, Nav1.2 und Nav1.6 zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen im Hippocampus und Western-Blots für das Gesamtgehirn durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen möglichen Einfluss von Pum2 auf spannungsgesteuerte Natriumkanäle und somit eine mögliche Rolle bei der Entstehung von epileptischen Anfällen in Mäusen nachzuweisen. Auf diese Weise würden sich neue Erkenntnisse für weitere Forschungen zu Epileptogenese in Menschen und damit auch zu zukünftigen Pharmakotherapien ergeben.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Mäuse und Gewebepräparation

#### 2.1.1 Mäuse

Für die Insertion des Gene Trap Vektors (B6.129P2-Pum2<sup>GT(XE772)Byg</sup>) in den Pum2 Genloкус wurden homozygote C57Bl6/J Wildtyp Mäuse verwendet. Die im folgenden bezeichneten Pum2 genetrapped Mäuse (Pum2<sup>GT</sup>) wurden von Renee Preijo Pera (UCSF, San Francisco, CA) bezogen und sind seit langem im Kiebler Labor bzw. in der CAM des BMC etabliert.

Für alle Experimente wurden homozygote Pum2 genetrapped (Pum2<sup>GT</sup>, B6.129P2-Pum2<sup>GT(XE772)Byg</sup>) und altersgleiche wildtypische Mäuse verwendet. Es wurden nur männliche Mäuse im Alter von P0, P21 und 5 Monaten (5M) untersucht. Gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz wurden die Mäuse in Gruppen von 2-5 Tieren in einzelnen, belüfteten Käfigen bei einem 12h/12h Licht/Dunkel-Zyklus gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Mäuse wurden im Alter von P21 und 5 Monaten (5M) mittels CO<sub>2</sub>-Inhalation betäubt und getötet, neugeborene Mäuse wurden dagegen enthauptet. Alle Experimente wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (A.Z.:55.2-1-54-2532-167-2013) und streng nach deutschen Tierschutzrichtlinien und Ethikrichtlinien durchgeführt.

#### 2.1.2 Gewebepräparation Immunfluoreszenzfärbungen

Um Zugang zum Herzen zu erhalten, wurde der Thorax mittels Y-Schnitt nach der Tötung geöffnet. Das Tier wurde zunächst mit PBS (pH 7,4, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) über den linken Ventrikel perfundiert. Anschließend wurde die Vena cava inferior durchtrennt, damit das Blut aus dem arteriovenösen System entweichen konnte. Die transkardiale Perfusion mit PBS wurde durchgeführt, bis die Leber und die Nieren anämisch waren. Nach diesem Schritt wurden die Mäuse für 12 Minuten mit 4% PFA (pH 7,0) Roti R-Histofix (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) perfundiert. Für die Immunhistochemie wurden die PFA-perfundierten Gehirne in 4% PFA für 3-12 Stunden bei 4°C postfixiert und in 10ml 30%iger Saccharose in ddH<sub>2</sub>O

bei 4°C kryopräserviert, bis sie auf den Boden des Falcon Reaktionsgefäßes gesunken waren (mindestens 1 Woche).

### 2.1.3 Gewebepräparation Biochemie

Für biochemische Analysen wurden die Gehirne auf gleiche Weise entnommen. Die Mäuse wurden enthauptet und die Schädel entlang der Mittellinie des Hinterhaupts bis zum Bregma geöffnet, dann wurden die Hinterhauptbeine zur Seite geklappt, um Zugang zum Gehirn zu erhalten. Anschließend wurde das Gehirn einschließlich Kleinhirn, Medulla oblongata und Riechkolben vorsichtig entfernt. Für biochemische Analysen wurden die Gehirne sofort nach der Präparation in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

## 2.2 RNA Analysen

### 2.2.1 RNA Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit dem TRIzol-Reagenz® (Invitrogen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dazu wurden 1 mL TRIzol mit einem Gehirn im FastPrep-24™ 5G Gerät bei 60 m/s für 40s homogenisiert. Anschließend wurden die Proben mit weiteren 9 mL TRIzol versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Homogenisat wurde dann mit 0.2vol Chloroform versetzt und anschließend gemischt. Danach wurden die Probe für 15 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und mit 1 vol 100% Isopropanol gemischt und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 12,000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL eiskaltem 80%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30-50 µL RNase-freiem Wasser resuspendiert. In einem letzten Schritt wurde die RNA-Lösung bei 55-60°C für 10-15 min inkubiert. Zur Depletion von genomischer DNA wurde das RNeasy Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll verwendet.

Tabelle 1: Geräte

Name	Hersteller
FastPrep-24™ 5G	MP Biomedicals
Nanodrop 2000	Thermo Scientific

Tabelle 2: Chemikalien

Name	Hersteller
TRIzol	Invitrogen
Chloroform-Isoamylalkohol	Sigma Aldrich
Isopropanol	Carl Roth
RNAse freies Wasser	Sigma Aldrich
Mini RNeasy Kit	Qiagen

## 2.2.2 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgte mittel reverser Transkription von 2 µg isolierter, gereinigter Gesamt-RNA. Es wurde die Superskript III reverse Transkriptase (Invitrogen), sowie die Reagenzien in **Tabelle 3** verwendet und nach dem Herstellerprotokoll verfahren. Die exakte Methode ist in Sharangdhar et al. 2017 beschrieben.

Tabelle 3: Chemikalien

Name	Hersteller
Random Primer (Oligo DTs)	NEB
dNTPs	NEB
RT Buffer	Thermo Fisher
DTT	Invitrogen
First Strand Buffer	Invitrogen
RNAse inhibitor	Thermo Fisher
Superscript III RT	Invitrogen
RNAse freies Wasser	

### 2.2.3 qRT-PCR

Für die qRT-PCR wurde der unten aufgeführte Ansatz selbst hergestellt und verwendet. Zur Amplifizierung wurde die Hot Star Taq Polymerase verwendet. Die durch die Amplifizierung entstandenen Replikate (Amplikon) wurden mittels fluoreszierendem SYBR Green detektiert, welcher bei der Replikation in die Basensequenz integriert wurde.

Reagenz	Menge [ $\mu$ l]
H2O	340
Std. Taq Buffer	210
BSA	40
Betain	400
dNTPs	16
SYBR Green 1:100	4

Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. 95°C für 5 min
2. 95°C für 15 sek
3. 60°C für 15 sek
4. 68°C für 20 sek
5. 95°C für 10 sek
6. 60°C für 1min
7. 60-97°C kontinuierliche Steigerung um 0,2°C/s
8. 37°C für 30sek

Die Effizienz der PCR wurde nach der  $\Delta\Delta$ CT Methode (Schmittgen and Livak 2008) optimiert. Als Referenzgen wurde PP1A oder 18S verwendet.

Tabelle 4: Geräte

Name	Hersteller
Lightcycler 96	Roche

Tabelle 5: Chemikalien

Name	Hersteller
Std. Taq Buffer	NEB
BSA	NEB
Betain	Sigma
dNTPs	NEB
SYBR Green ®	
Hot Start Taq	NEB

Tabelle 6: Primersequenzen

Gene Name	Sequenz
SCN1A	FW: 5' - GAATCCCAAGCCAGACAAA - 3' RV: 3' - ACCATCTCTGGAGGAATGT - 5'
SCN2A	FW: 5' - ACAGGAATTTATACTTTTGAATCA - 3' RV: 3' - TGTCTGACGTCATGATACTC - 5'
Exon 5A	FW: 5' - ACAGGAATTTATACTTTTGAATCA - 3' RV: 3' - TGTCTCAGCGCTGAGA - 5'
Exon 5N	FW: 5' - ACAGGAATTTATACTTTTGAATCA - 3' RV: 3' - TGTAACCTAGGCAATGTTTC - 5'
SCN8A	FW: 5' - CTT CAG TGT CAT CAT GAT GG - 3' RV: 3' - TGAAGACAATCGTGGGC - 5'
Exon 5A	FW: 5' - CTT CAG TGT CAT CAT GAT GG - 3' RV: 3' - CCGAGCTTTGAAAACCTATCTC - 5'
Exon 5N	FW: 5' - CTT CAG TGT CAT CAT GAT GG - 3' RV: 3' - GAG GGC TTT GAA AAC TAT TTC - 5'
PP1A	FW: 5' - GTCAACCCACCGTGTCTT - 3' RV: 3' - GTTTC AAGTTTCTGTGCGCT - 5'
18S	FW: 5' - GAAACTGCGAATGGCTCATTAAA - 3' RV: 3' - AGGAGAGGATGAACCTATTGACACC - 5'

## 2.3 Proteinanalysen

### 2.3.1 Herstellung der Lysate

Die Gehirne wurden in 1mL SDS-Lysepuffer mittels FastPrep-24™ 5G Homogenisator (6,0 m/s für 40s, Adapter: Quick prep, Menge: 50mg) zusammen mit einer Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette (komplette ULTRA-Tabletten, mini, Roche) und einer Phosphatase-Inhibitor-Cocktail-Tablette (PhosSTOP, Roche) lysiert, um Degradation und Dephosphorylierung zu vermeiden. Anschließend wurden die Lysate mit weiteren 3mL SDS-Lysepuffer gemischt und für 2h inkubiert. Die Lysate wurden sonifiziert (drei Pulse), um die DNA zu zerstören, und bei 25.000g für 10min zentrifugiert, um Zelltrümmer und Gehirnreste zu entfernen. Der Überstand wurde aufbewahrt und mit SDS-Ladepuffer gemischt, dann bei 95°C für mindestens 5min zur Denaturierung inkubiert. Die Proben wurden erneut bei 25.000xg für 10min zentrifugiert, um noch nicht lysiertes Material des Protein-Lysats zu beseitigen.

### 2.3.2 Western Blot

Gleiche Proteinmengen wurden für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) auf 10%-Acrylamidgele aufgetragen. Die Trennungsspannung betrug 60mV. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrocellulose-Membranen (Porengröße 0,2µm), in Blotting Buffer, bei 100V für 1,5h überführt. Vinculin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Membranen wurden dann für 30min in Western Blotting (WB) Blocking Solution geblockt und mit den primären Antikörpern (Rabbit anti-Na<sub>v</sub>1.6 polyclonal 1:500, Goat anti-Vinculin polyclonal 1:1,000) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen mit PBS+Tween (PBST) 3-mal für 7min gewaschen und anschließend mit den entsprechenden Sekundärantikörpern für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper wurden in WB Blocking Solution verdünnt. Danach wurden die Membranen erneut 3-mal für 7min gewaschen. Die Proteinbanden wurden mit einem Odyssey® CLx Imaging System (LI-COR) detektiert. Für die Quantifizierung der Proteine wurde die Image Studio™ Software (LI-COR) verwendet und auf die Ladekontrolle normalisiert.

Tabelle 7: Geräte

Name	Hersteller
PBS	Kiebler Lab
SDS	Kiebler Lab
Rabbit anti-Na <sub>v</sub> 1.6 polyclonal	Alomone
Mouse anti-Vinculin polyclonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Goat anti-Rabbit IRDye 680RD 1:15000	Li-Cor
Donkey anti-Mouse IRDye 800CW 1:15000	Li-Cor

## 2.4 Immunofluoreszenz

### 2.4.1 Gehirnschnitte

Die Gehirne wurden mithilfe eines Leica Kryotoms bei -23 bis -25 °C geschnitten. Das Gewebe wurde frontal im Abstand von 20 µm geschnitten und in PBS (pH7,4) überführt. Die Schnitte wurden bis zur Verwendung bei -20°C in Aufbewahrungslösung gelagert.

Tabelle 8: Geräte

Name	Hersteller
CM3050 S Research Kryostat	Leica

Tabelle 9: Chemikalien

Name	Hersteller
PBS	Kiebler Lab
Storing Solution (30% Sucrose)	Kiebler Lab

### 2.4.2 Färbung

Die Färbung der Schnitte erfolgte im sogenannten ‚free-floating‘ Verfahren. Dazu wurde das Gewebe in 1,5 ml PBS gewaschen und in 2 mL IHC-Blocklösung ((PBS + 0.5% Triton (v/v) + 1% Bovine Serum Albumin (BSA, w/v)) bei Raumtemperatur für eine Stunde geblockt. Anschließend wurde das Gewebe mit dem primären Antikörper (verdünnt in Blocklösung) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 Minuten in PBS gewaschen und mit dem entsprechenden

sekundären Antikörper (verdünnt in Blocklösung) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zellkerne wurden mit DAPI 5 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Nach einem erneuten Waschen in PBS wurden die Schnitte auf Objektträger übertragen und mit Fluoromount G (Sigma) eingebettet.

Tabelle 10: Antikörper

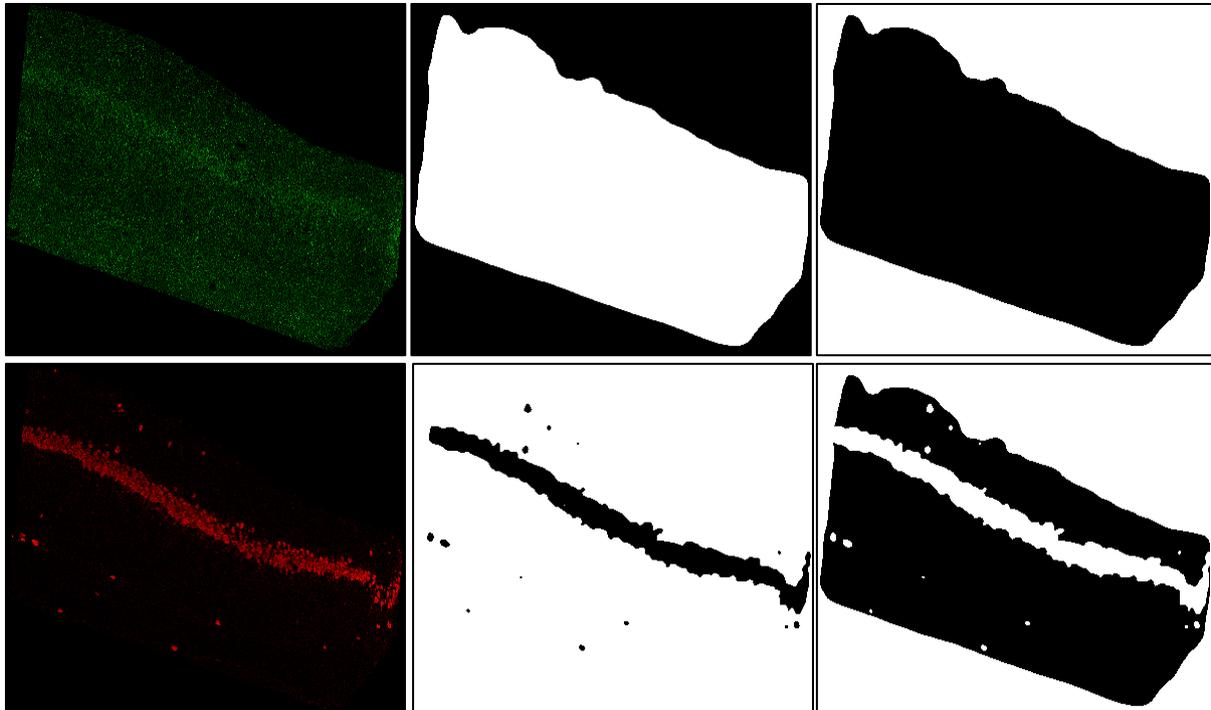
Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Rabbit anti-Nav1.1 polyclonal	1:250	Alomone Labs
Rabbit anti-Nav1.2 polyclonal	1:250	Alomone Labs
Rabbit anti-Nav1.6 polyclonal	1:250	Alomone Labs
Rabbit anti-Pum2 polyclonal	1:500	Abcam
Chicken anti-NeuN polyclonal	1:500	Millipore
Mouse anti-MAP2 monoclonal	1:500	Sigma
Goat anti-chicken IgY AF647	1:500	Life Technologies
Donkey anti-rabbit IgG AF488	1:500	Life Technologies
Donkey anti-mouse IgG AF647	1:500	Life Technologies

Name	Hersteller
DAPI Working solution	Thermo Fisher

### 2.4.3 Mikroskopie und Quantifizierung

Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte mit einem Leica SP8 confocalen Mikroskop. Die Bilder wurden entweder mit einem 40x/1,3 oder einem 63x/1,4 Objektiv für Ölimmersion aufgenommen. Die Bildpixelgröße betrug 80 nm. Die Fluoreszenzeinstellungen für die Detektion wurden wie folgt verwendet: DAPI: 430-470 nm, AF488: 500-550, AF555: 560-600, AF647: 650-700. Die Aufnahmen erfolgten sequentiell. AF488, AF555 und AF647 wurden mit Hybrid-Photodetektoren (HyDs) aufgenommen, DAPI mit einer herkömmlichen Photomultiplier-Röhre. Die Schnitte wurden mit dem Image-Prozessier-Programm Fiji (1.50g, PMID 26153368) quantifiziert. Die Auswahl der jeweiligen Hirnregionen erfolgte nach bekannten anatomischen Grenzen im Hippocampus (Martin, Tan, and Goldowitz 2002). Somit wurden die Regionen CA1, CA2, CA3 sowie der Gyrus Dentatus innerhalb des NeuN

Kanals, also anhand des Zellbandes, manuell abgegrenzt und digital ausgeschnitten. Auf diese Weise sollte eine mögliche Selektionsbias vermieden werden. Auf Basis des Kanals für NeuN, welcher das Zellsoma darstellt, wurde eine Maske für die Zellschicht erstellt. Dies erfolgte durch die Anwendung eines unteren Grenzwertes für die Signalstärke des Kanals. Die Bildabschnitte, welche über dem Grenzwert lagen, wurden markiert, wobei die übrigen Abschnitte verworfen wurden. Anhand des Kanals, welcher die zu quantifizierende Färbung zeigt, wurde nach o.g. Schema die Gesamtmaske bestimmt und erstellt. Es erfolgte eine Invertierung und eine digitale Subtraktion der Maske der Zellschicht von der Gesamtmaske, um somit die Maske zur Quantifizierung der Zellperipherie zu erhalten. Dieser Vorgang ist exemplarisch in **Abb. 3** dargestellt. Links in Farbe sind die ursprünglichen Bilder der jeweiligen Kanäle zu sehen. In der oberen Reihe wird die Gesamtmaske erstellt. Die untere Reihe zeigt die Erstellung der Maske für Zellschicht und die Peripherie. Dieser Prozess wurde schließlich in einem Programm als Makro-Text verfasst, wodurch eine automatische Quantifizierung stattfinden konnte.



**Abb. 3:** zeigt ein Beispiel für den Prozess der Generierung von Quantifizierungsmasken in Fiji. Der zu quantifizierende Kanal (Grün) wurde verwendet, um die Gesamtmasken zu erhalten. Der NeuN-Kanal (Rot) wurde verwendet, um die Pyramidenzellschicht zu identifizieren. Um die Peripherie der Pyramidenzellschicht zu messen, wurde eine invertierte, kombinierte Maske erzeugt.

## 2.5 Statistik

Zur statistischen Analyse wurde GraphPad Prism (Version 7; GraphPad, San Diego, CA, USA) verwendet. Nach der Prüfung auf eine Gaußsche Normalverteilung wurden entsprechende Tests durchgeführt. Die Werte werden jeweils as Mean +/- SEM angegeben. Bei bestätigter Normalverteilung wurde der Student's t-Test (*unpaired two-tailed*) für zwei Gruppen verwendet. Für mehrere Gruppen wurde die One-Way ANOVA mit dem Tukey Post Hoc Test verwendet.

## 2.6 Quelltext zur Quantifizierung

### 1. Gesamtmaske

```
1) //get overall shape of the hippocampus
2) Ddir = getDirectory("Choose Destination Folder");
3) getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
4) Original_width=width;
5) Original_height=height;
6) run("Gaussian Blur...", "sigma=180");
7) setAutoThreshold("Default");
8) setAutoThreshold("Default dark");
9) run("Convert to Mask");
10) run("Fill Holes");
11) run("Analyze Particles...", "size=100000-Infinity show=Outlines display
    summarize add");
12) newImage("Mask", "8-bit black", width, height, 1);
13) roiManager("select", 0);
14) run("Create Mask");
15) run("Invert LUT");
16) path_Mask = Ddir + "_green_Mask.tif";
17) saveAs("tif", path_Mask);
18) run("Select None");
19) run("Invert");
20) path_Mask_inverted = Ddir + "_green_Mask_inverted";
21) saveAs("tif", path_Mask_inverted);
```

### 2. Invertierte und kombinierte Maske

```
1) Ddir = getDirectory("Choose Destination Folder");
```

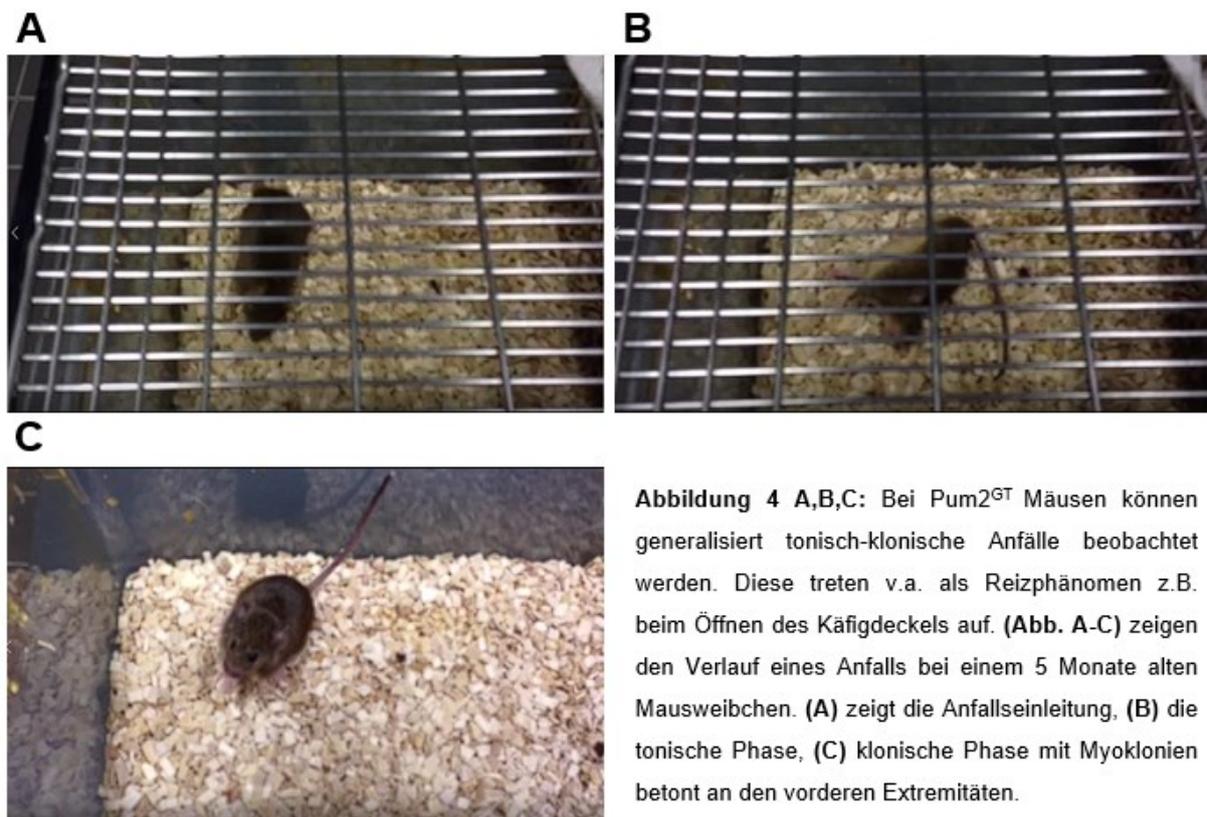
```
2) getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
3) Original_width=width;
4) Original_height=height;
5) interpolation=None");
6) roiManager("select", 0);
7) run("Clear Outside");
8) run("Median...", "radius=2");
9) setAutoThreshold("Default dark");
10) run("Convert to Mask");
11)for(i=0; i<15;i++){ run("Dilate");}
12)run("Gaussian Blur...", "sigma=80");
13) setAutoThreshold("Default");
14) run("Convert to Mask");
15) path_red=Ddir + "_red";
16) saveAs("tif", path_red);
17)waitForUser("Pause","Load _green_Mask_inverted.tif and then press
    OK");
18) imageCalculator("Add create", "_green_Mask_inverted.tif", "_red.tif");
19) run("Invert");
20)path_calculated=Ddir + "_calculated";
21) saveAs("tif", path_calculated);
```

# 3. Ergebnisse

## 3.1 Pum2 Defizienz im Hippocampus

### 3.1.1 Epileptische Anfälle in adulten Pum2 defizienten Mäusen

Ab einem Alter von ca. 5 Monaten, also in adulten Tieren, konnte in Pum2 defizienten Mäusen das Auftreten von Krampfanfällen beobachtet werden. Interessanterweise treten diese bei jüngeren Tieren nicht auf. Dies spricht für eine späte Ausprägung eines möglichen Phänotyps mit einer Prädisposition für epileptische Anfälle. Zur genaueren Beobachtung der Anfallssemiologie wurden Videoaufnahmen bei Auftreten eines Anfalls angefertigt.

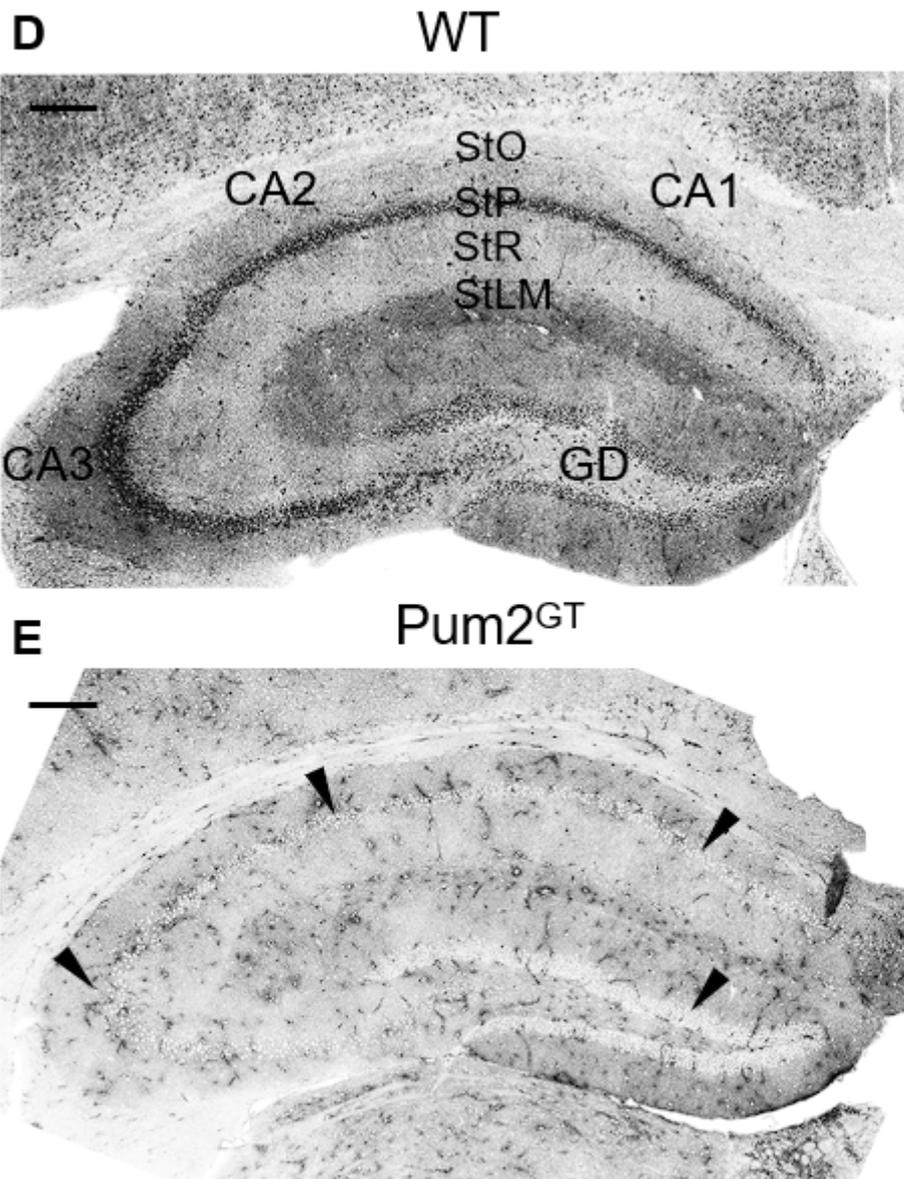


**Abb.4** zeigt den Verlauf eines solchen Anfalls. Typischerweise traten die Anfälle bei Auftreten eines externen Stimulus auf. Zumeist war dies das Öffnen des Käfigdeckels, welcher mit einer veränderten Geräuschkulisse und Luftzirkulation einhergeht. Nach unseren Beobachtungen lässt sich ein Anfall grob in drei Phasen unterteilen. Die erste Phase **Abb.4A** war gekennzeichnet von einer generalisiert klonischen Komponente

mit Myoklonien des ganzen Körpers. In der darauffolgenden, zweiten Phase **Abb.4B** kam es für eine kurze Zeit zu einer tonischen Verkrampfung mit Überstrecken des Kopfes und des Schwanzes nach dorsal. Anschließend erfolgte augenscheinlich das Zurückkehren des Bewusstseins, in dessen Verlauf sich die Tiere wieder aufrichteten **Abb.4C**, jedoch noch deutlich benommen wirkten, was für eine postiktale Phase spricht. Auffällig waren hier intermittierende Myoklonien, betont an den vorderen Extremitäten, zu beobachten. Nach einer Dauer von 3-4 Minuten trat eine Besserung ein und die Mäuse zeigten wieder ein normales Verhalten. Ohne einen auftretenden Stimulus traten keine Anfälle auf, dies spricht für ein Provokations-Anfallsleiden (provozierte Epilepsie). Aufgrund dieser Beobachtungen erfolgte im Anschluss die nähere Untersuchung epilepsierelevanter Ziele im Mausgehirn.

### 3.1.2 Pum2 im Hippocampus von Pum2<sup>GT</sup> Mäusen

Da sich meine Arbeit aufgrund des epileptogenen Potentials im Wesentlichen auf den Hippocampus bezog, erfolgte die Bestimmung des Pum2 Proteins daher selektiv in diesem Teil des limbischen Systems. Western-Blot Analysen ergaben bereits eine deutliche Reduktion von Pum2 im Hippocampus. Der Gene Trap Vektor führte in unseren Versuchstieren zu einer um bis zu 80%-90% verminderten Expression von Pum2 (Follwaczny et al. 2017). Diese Ergebnisse decken sich mit den bisher aus der Literatur bekannten Ergebnissen (Siemen et al. 2011; Xu et al. 2007). Um diesen Effekt näher zu klassifizieren, erfolgte zudem eine histologische Untersuchung des Hippocampus in Pum2 Defizienten Mäusen. **Abb.4D,E**. Die hierbei verwendeten Antikörper gegen Pum2 wurden im Vorfeld bereits erfolgreich verwendet und getestet (Follwaczny et al. 2017). Das Augenmerk lag hier vor allem der genauen Verteilung von Pum2 im Hippocampus. Analysiert wurde insbesondere, in welchen Schichten, aber auch in welchen übergeordneten Regionen es zu einer Anfärbung von Pum2 kommt. Dies ermöglichte dann im Folgenden einen visuellen Vergleich mit den histologischen Untersuchungen an den spannungsabhängigen Natriumkanälen. Nach der Präparation und Fixation des Mausgehirne adulter Tiere durch PFA, erfolgte die Krykonservierung und Kryotomie. Schnitte, in denen der Hippocampus gut erhalten und zu sehen war, wurden zuerst mittels spezifischen anti-Pum2-Antikörpern inkubiert und über Standard-Immunfluoreszenz mit Fluoreszenz-gekoppelten Sekundär-Antikörpern nachgewiesen.



**Abbildung 4 D,E: Pum2 Expression im Hippocampus und generalisiert-tonisch-klonische Anfälle bei Pum2<sup>GT</sup> Mäusen.** Immunfluoreszenzfärbung von Pum2 (schwarz) im Hippocampus. Es ist ein geringeres Signal (Pfeile) in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen (D) im Vergleich zum WT (E) v.a. im Stratum pyramidale (StP) der Regionen CA1, CA2 and CA3 sowie im Gyrus dentatus (GD) und im stratum lacunosum-moleculare (StLM) zu sehen. Maßstab: 200µm; StO = Stratum oriens, StP = Stratum pyramidale, StR = Stratum radiatum, StLM = Stratum lacunosum moleculare.

Durch die gleichzeitige Inkubation mit dem Antikörper Anti-NeuN und dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI erfolgte eine Anfärbung der Zellsomata und der DNA im Nucleus. Schlussendlich wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen getätigt, in denen die drei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe spezifisch angeregt wurden. Die Immunfluoreszenzfärbung des WT zeigt ein deutliches Vorliegen vom Pum2 im Zellband der Regionen CA1 bis CA3 des Hippocampus. Besonders die Region CA3

zeigt sowohl im Zellband, als auch in der Peripherie ein besonders intensives Färbeverhalten. Aber auch im Stratum Lac Mol (StLM) der Region CA1 und CA2 sowie in der Zellperipherie des Gyrus Dentatus (GD) erscheint ein deutlich ausgeprägtes Pum2 Signal. Im Pum2<sup>GT</sup> Mäusen dagegen ist die Anfärbung von Pum2 kaum mehr zu erkennen. Die Pfeile deuten auf das fehlende Protein im Vergleich zum WT hin. Somit konnte mit einer weiteren, unabhängigen Methode die Reduktion von Pum2 im Hippocampus Pum2-defizienter Tiere belegt werden. Hier tritt eine nahezu vollständige Reduktion der Expression vom Pum2 auf. Dieser Effekt ist flächendeckend im ganzen Hippocampus zu beobachten. Zudem scheint es Unterschiede in der Expression von Pum2 innerhalb der Regionen und Schichten in WT Mäusen zu geben. Inwiefern diese stark verminderte Expression von Pum2 einen Effekt auf das Vorliegen spannungsabhängiger Natriumkanäle als relevante Proteine der Epilepsie im Gehirn hat, sollte in den folgenden Versuchen untersucht werden.

### 3.2 Die Natriumkanäle Na<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.2 und Na<sub>v</sub>1.6 im Kontext der Epileptogenese in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen

Wie eingangs beschrieben, haben spannungsabhängige Natriumkanäle (Na<sub>v</sub>) eine wichtige Funktion in der neuronalen Homöostase und damit auch in der Entstehung epileptischer Anfälle (Oliva, Berkovic, and Petrou 2012). Der Einfluss von Pum2 auf Na<sub>v</sub> 1.6 wurde in einfachen Organismen wie der Fruchtfliege, *Drosophila melanogaster*, bereits gut beschrieben (Driscoll et al. 2013). Auch in Pum2 defizienten Mäusen konnte ein Effekt auf spannungsabhängige Natriumkanäle, vor allem im Bulbus olfactorius und dem Kleinhirn, beobachtet werden. Bisherige Untersuchungen ergaben eine Reduktion der Genexpression von Na<sub>v</sub>1.1 und Na<sub>v</sub>1.2 in dieser Gehirnregion (Siemen et al. 2011). Es erfolgte bisher jedoch keine nähere Untersuchung, inwiefern das RNA-Bindeprotein Pum2 Einfluss auf die Kanäle Na<sub>v</sub>1.1, Na<sub>v</sub>1.2 und Na<sub>v</sub>1.6 (Gennamen *SCN1A*, *SCN2A* und *SCN8A*) nimmt. In meiner Arbeit fokussierte ich mich auf diese Kanäle, da sie vor allem in Neuronen der Maus dominant exprimiert sind, aber auch verstärkt im menschlichen Gehirn vorkommen. Aufgrund des für Na<sub>v</sub>1.2 (*SCN2A*) und Na<sub>v</sub>1.6 (*SCN8A*) bereits bekannten, alternativen Splicings (Gazina et al. 2010; Plummer, McBurney, and Meisler 1997), wurde die mRNA *SCN2A* (Na<sub>v</sub>1.2) und *SCN8A* (Na<sub>v</sub>1.6) gezielt auf das Vorliegen der jeweiligen Splicevariante(n) untersucht. Für *SCN1A* wurden bisher keine Splicevarianten in der Maus beschrieben, es konnte jedoch gezeigt werden, dass der dafür kodierende Kanal

im Zusammenhang mit der Entstehung genetischer Epilepsieformen, wie dem Dravet Syndrom, steht (Catterall, Kalume, and Oakley 2010). Ein weiterer Fokus lag in der Proteinanalytik auf Nav1.6, dieser ist zum einen methodisch gut zugänglich und ist in der Literatur häufig mit Epilepsie in Verbindung gebracht worden (Hargus et al. 2013). Da dem Hippocampus ein hohes epileptogenes Potential zugeschrieben wird (Traub and Llinás 1979) und diese anatomische Struktur bisher schwerpunkthaft in der Epilepsieforschung untersucht wurde, konzentrierte ich mich in der Proteinanalyse vor allem auf den Hippocampus. Für Nav1.6 wurde die Proteinbestimmung zusätzlich für das Gesamthirn durchgeführt. Um einen möglichen Effekt von Pum2 auf spannungsabhängige Natriumkanäle zu überprüfen erfolgte in einem ersten Schritt die bioinformatische Analyse der mRNA spannungsabhängiger Natriumkanäle in der Maus.

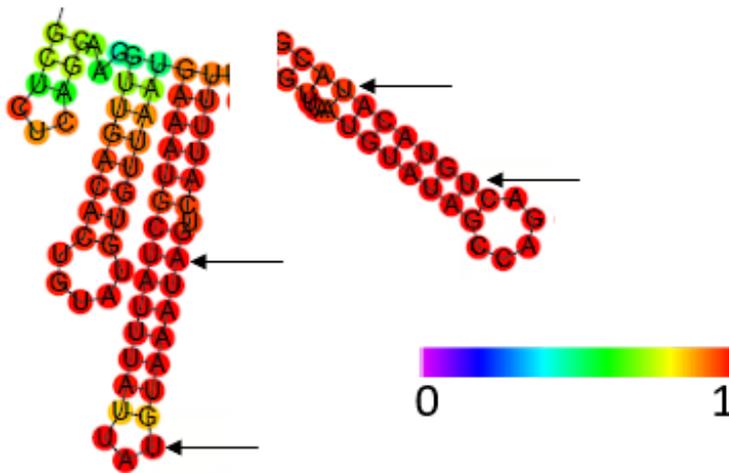
### 3.3 Pumilio 2 Sequenzmotive in *SCN1A*, *SCN2A* und *SCN8A*

Für die Interaktion vom Pum2 mit einer mRNA ist eine bestimmte Abfolge von Basen notwendig, die meist durch ein sogenanntes Sequenzmotiv dargestellt wird. In einem ersten Schritt sollte das Vorkommen dieser Sequenzmotive in der jeweiligen mRNA untersucht werden. Weiterhin wurde auf das Auftreten von möglichen intramolekularen Basenpaarungen innerhalb der Primärsequenz der mRNA geachtet. Das Vorkommen solcher Strukturen, wie z.B. charakteristischer Haarnadelstrukturen, können die Zugänglichkeit von Pum2 zur Ziel-RNA beeinflussen. Die mRNAs *SCN1A*, *SCN2A* und *SCN8A* wurden durch eine bioinformatische Strukturvorhersage analysiert. Die Primärstrukturen stammen aus der NCBI Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Die Analyse der Sekundärstruktur erfolgte durch das Softwarepaket „*Vienna RNA Package*“ (<https://www.tbi.univie.ac.at/RNA/#>). Dieser Algorithmus beruht im Wesentlichen auf der Berechnung der möglichen, minimalen freien Energie einer Sekundärstruktur (Zucker and Stiegler 1981). Die Software berücksichtigt ebenfalls die Thermodynamik einer Basenpaarung (McCaskill 1990), suboptimale Strukturen mit geringer freier Energie (Wuchty et al. 1999) und dem Abstand von Basenpaaren in einem Abschnitt, den Strangabständen (Shapiro and Zhang 1990). Basierend auf diesem Algorithmus wird eine Sekundärstruktur errechnet, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in der Realität vorliegt. Anschließend wird das Ergebnis der Berechnungen visualisiert und ausgegeben, was schlussendlich eine optische Analyse möglich macht.

## A

mRNA	Bindestellen	Bindestellen (S)
SCN1A (Na <sub>v</sub> 1.1)	4	2 (-512,6 kcal/mol)
SCN2A (Na <sub>v</sub> 1.2 )	5	1 (-626,9 kcal/mol)
SCN8A (Na <sub>v</sub> 1.6 )	3	0

## B SCN1A



## C SCN2A

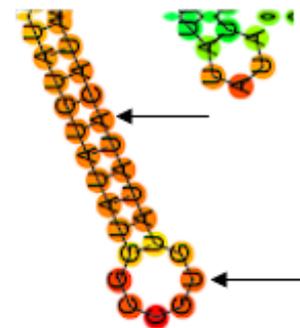


Abbildung 5: Analyse der Pum2 Bindestellen in der *SCN1A*, *SCN2A* and *SCN8A* 3'UTR mRNA.

Um eine mögliche Interaktion von Pum2 mit der mRNA der Natriumkanäle Na<sub>v</sub> 1.1 (*SCN1A*) Na<sub>v</sub> 1.2 (*SCN2A*) und Na<sub>v</sub> 1.6 (*SCN8A*) abzuschätzen, wurde eine theoretische Bindestellenanalyse mittels Minimum Free Energy & Thermodynamic Ensemble Prediction durchgeführt (ViennaRNA Package) durchgeführt. **Abb.5A:** Zeigt die gefundene Gesamtanzahl von Sequenzmotiven in der Primärsequenz (linke Spalte) und die Anzahl der Bindestellen welche innerhalb einer Struktur der Sekundärsequenz liegen (Bindestellen (S), rechte Spalte). **(B,C)** zeigen exemplarisch eine Abbildung über die mögliche Faltung im Bereich der Pum2 Sequenzmotive für *SCN1A* und *SCN2A*. Die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen der Struktur ist farblich kodiert, wobei rot einer hohen Wahrscheinlichkeit entspricht. In der 3'UTR aller drei Natriumkanäle konnten Pum2 Sequenzmotive gefunden werden.

Wahrscheinlichkeit der Struktur (MFE BPP: Minimum free energy Predicted base-pairing probability). Pfeile weisen auf den Beginn und das Ende des Sequenzmotives (*SCN1A*: TGTAATA, TGATATA. *SCN2A*: TGTATATA)

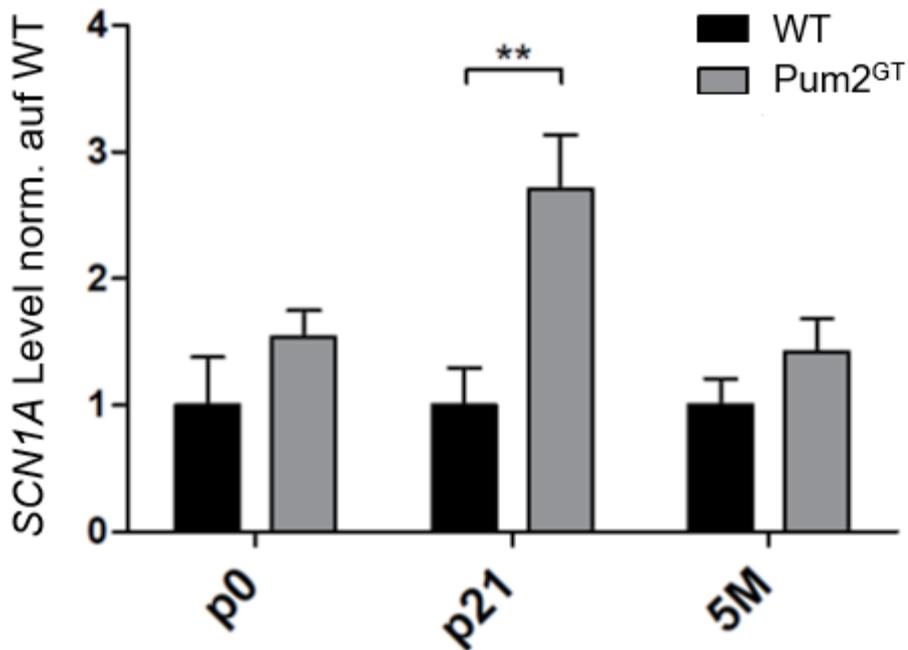
Die so erhaltenen Ergebnisse wurden manuell auf die Sequenzen der Pum2

Sequenzmotive untersucht, welche vor allem in der 3`-UTR der mRNA lokalisiert sind. (Doyle and Kiebler 2011; Hafner et al. 2010; Muraro et al. 2008).

**Abb.5A** zeigt die Gesamtanzahl gefundener Bindestellen innerhalb der 3`-UTR, sowie die Anzahl der Bindestellen, welche innerhalb einer intramolekularen Struktur liegen, für die eine hohe Wahrscheinlichkeit des Vorliegens *in vivo* besteht. In **Abb.5B,C** sind exemplarisch ausgewählte Strukturen innerhalb der 3`-UTR zu sehen. Die Sequenzmotive sind mit Pfeilen markiert. Für *SCN1A* lassen sich somit 2 Bindestellen erkennen, welche innerhalb einer Haarnadelstruktur liegen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit vorkommt. Die Bindestelle in der mRNA *SCN2A* liegt in einer Haarnadelstruktur, die wenig wahrscheinlich gebildet wird (Rot entspricht einer hoher Basenpaarungswahrscheinlichkeit). Für *SCN1A* ergaben sich somit 4, für *SCN2A* 5 und für *SCN8A* 3 vorhergesagte Bindestellen (**Abb.5A**), die außerhalb einer intramolekularen Struktur der Sekundärsequenz liegen. Daten aus Untersuchungen zu Pum2, welche mit der iCLIP Methode erhalten wurden (Zhang et al. 2017) legen den Schluss nahe, dass Pum2 am ehesten eine Primärsequenz innerhalb einer mRNA bindet. Daher lässt ich schlussfolgern, dass innerhalb der 3`-UTR der jeweiligen spannungsabhängigen Natriumkanäle adäquate Bindestellen für Pum2 vorliegen. Dies wiederum legt nahe, dass Pum2 über diese mit der jeweiligen Ziel-RNA interagiert und auf diese Weise reguliert.

### 3.4 *SCN1A* Level in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen

Als nächsten Schritt wurden mittels RT-qPCR die mRNA Level für *SCN1A* untersucht. Nav1.1 ist sowohl im Soma, den Dendriten aber vor allem am Axon-Initialsegment der Neuronen lokalisiert. Er hat dort eine wesentliche Funktion in der Generierung von Aktionspotentialen (Letierrier et al. 2010; W.-H. Lin et al. 2017). Somit sollte geprüft werden, ob ein Unterschied in den mRNA Level zwischen WT und Pum2<sup>GT</sup> Mäusen in verschiedenen Altersgruppen besteht. Nach Präparation der Mausgehirne wurden diese kryokonserviert. Anschließend erfolgte die RNA Isolation und Aufreinigung, sowie Erstellung der cDNA, um dann eine PCR durchzuführen. Es wurden jeweils Referenzgene verwendet, um eine Normalisierung der Werte durchführen zu können. Zur besseren Darstellung der Ergebnisse wurden die so erhaltenen Werte auf den Wildtyp normalisiert. **Abb.6** zeigt die mRNA Level von *SCN1A* im Gesamtgehirn.



**Abbildung 6: Signifikant erhöhte *SCN1A* mRNA Level in 21 Tage alten *Pum2*<sup>GT</sup> Mäusen.**

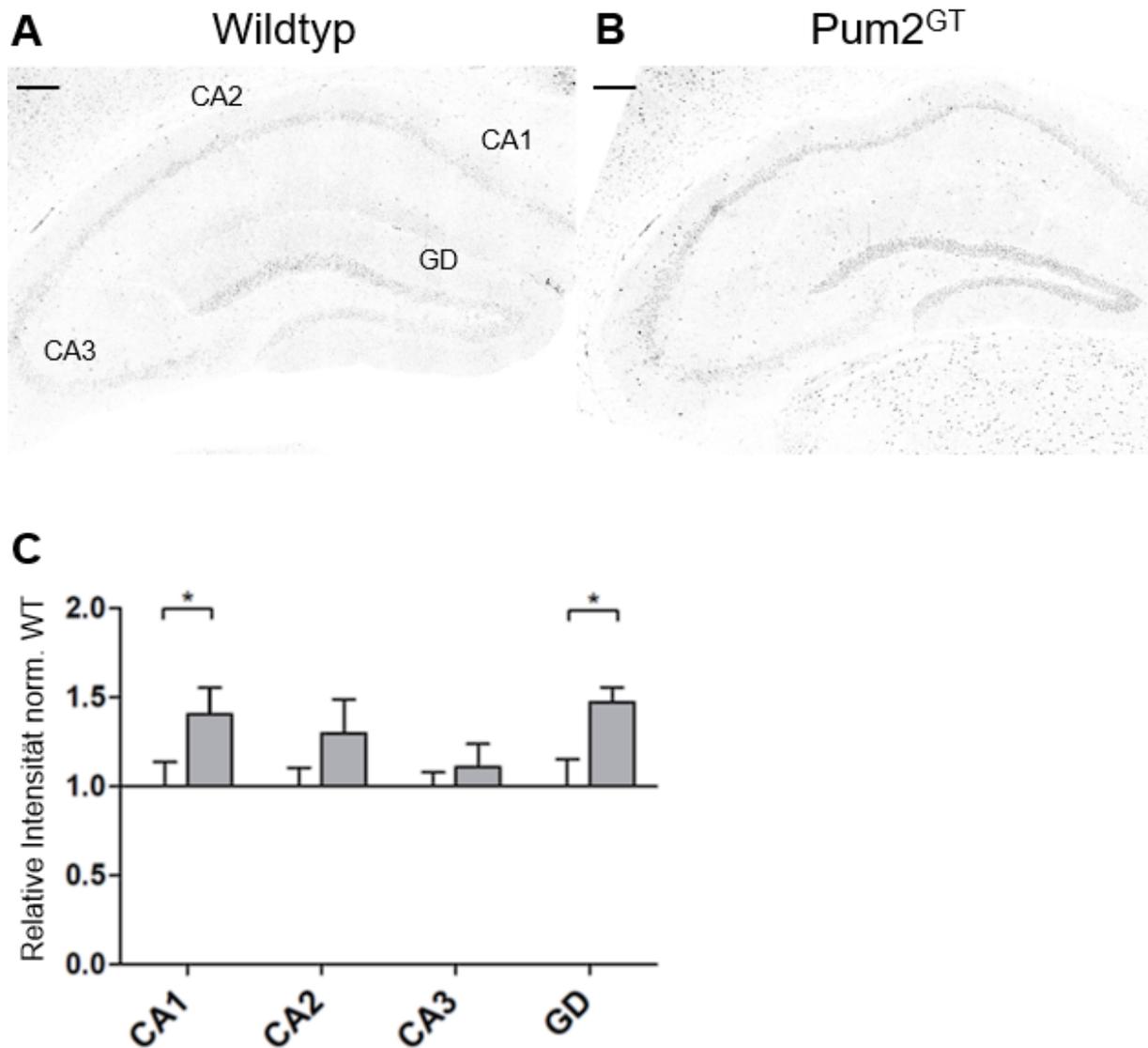
RT-pPCR Daten der *SCN1A* (*Nav*<sub>v</sub>1.1) mRNA im Gesamtgehirn. Dargestellt sind die Altersgruppen p0 bis 5 Monate. Die Wildtyp-Daten sind auf 1 normalisiert. In der Altersgruppe von 21 Tagen sind deutlich erhöhte *SCN1A* mRNA Level in *Pum2*<sup>GT</sup> Mäusen zu erkennen. Altersgruppen: p0= neugeboren, p21= 21 Tage, 5M= 5 Monate (n=6 für alle Gruppen, unpaired, t-test, Mean + SEM, \*P<0.05).

Es wurden drei unterschiedliche Altersgruppen untersucht, in Grau dargestellt sind die Werte der *Pum2* defizienten Tiere. In neugeborenen (p0) und adulten (5M) Mäusen sind leicht erhöhte, jedoch nicht signifikant unterschiedliche *SCN1A* mRNA Level zu sehen. Deutlich, signifikant erhöhte mRNA Level ergaben sich in der Altersgruppe von 21 Tage alten Mäusen (p21). Hier zeigt sich eine knapp 1,5-fache Erhöhung gegenüber dem Wildtyp. In der Altersgruppe 5 Monate alten Mäusen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, was durch einen möglichen kompensatorischen Effekt während der Adoleszenz erklärt werden könnte. Der signifikante Unterschied in 21 Tage alten Mäusen lässt auf einen möglichen, ausgeprägten Effekt von *Pum2* in jüngeren Tieren schließen. Aufgrund dessen erfolgte als nächster Schritt die Betrachtung der Proteinexpression von *Nav* 1.1 (*SCN1A*).

## 3.5 Hippocampale Expression des spannungsabhängigen Natriumkanals $Nav_{1.1}$ in $Pum2^{GT}$ Mäusen

### 3.5.1 Adulte $Nav_{1.1}$ Expression im Hippocampus

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen wurde die  $Nav_{1.1}$  Expression im Hippocampus untersucht. Die präparierten Schnitte wurden mit entsprechenden Antikörpern gegen  $Nav_{1.1}$  und einem fluoreszierenden Sekundärantikörper inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch visualisiert. Die so erhaltenen Ergebnisse, wurden mit Hilfe einer geeigneten Grafiksoftware (Fiji) quantifiziert. Hierbei wurden entsprechende Masken kreiert, um eine spezifische Betrachtung und Abgrenzung der jeweiligen Subregionen zu ermöglichen. Die Auswahl der Regionen basierte hierbei auf dem erhaltenen Bild in der Sequenz für das Signal NeuN (Zellsoma). Die so erhaltenen Ergebnisse wurde anschließend auf den Wildtyp normalisiert. **Abb.7A,B** zeigt die Färbungen im Hippocampus für  $Pum2^{GT}$  und WT. Das Fluoreszenzsignal für  $Nav_{1.1}$  ist in schwarz dargestellt. Zur besseren Darstellung wurden die Signale für NeuN (Zellsoma) und den Zellkern (DAPI) hier nicht dargestellt. In **Abb.7C** sind die dazugehörigen Quantifizierungen, normalisiert auf den Wildtyp, zu sehen. Im Alter von 5 Monaten liegt in den  $Pum2^{GT}$  Mäusen im Vergleich zum WT ein signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal für  $Nav_{1.1}$  in der CA1 Region sowie im Gyrus Dentatus (GD) vor. Für die Regionen CA2 und CA3 konnte ebenfalls ein leicht erhöhtes Intensitätssignal beobachtet werden. Dieses erlangte in den verschiedenen Quantifizierungen jedoch (noch) keine Signifikanz. Die Regionen CA1 und der GD besitzen ausgeprägte Verbindungen zu medialen mamillären Kernen und dem diagonalen Band als Teile des limbischen Systems. Somit ergibt sich für  $Nav_{1.1}$  eine signifikant gesteigerte Expression im DG und der Region CA1 in adulten Tieren. Interessanterweise treten in diesen Altersstufen auch epileptische Anfälle auf.



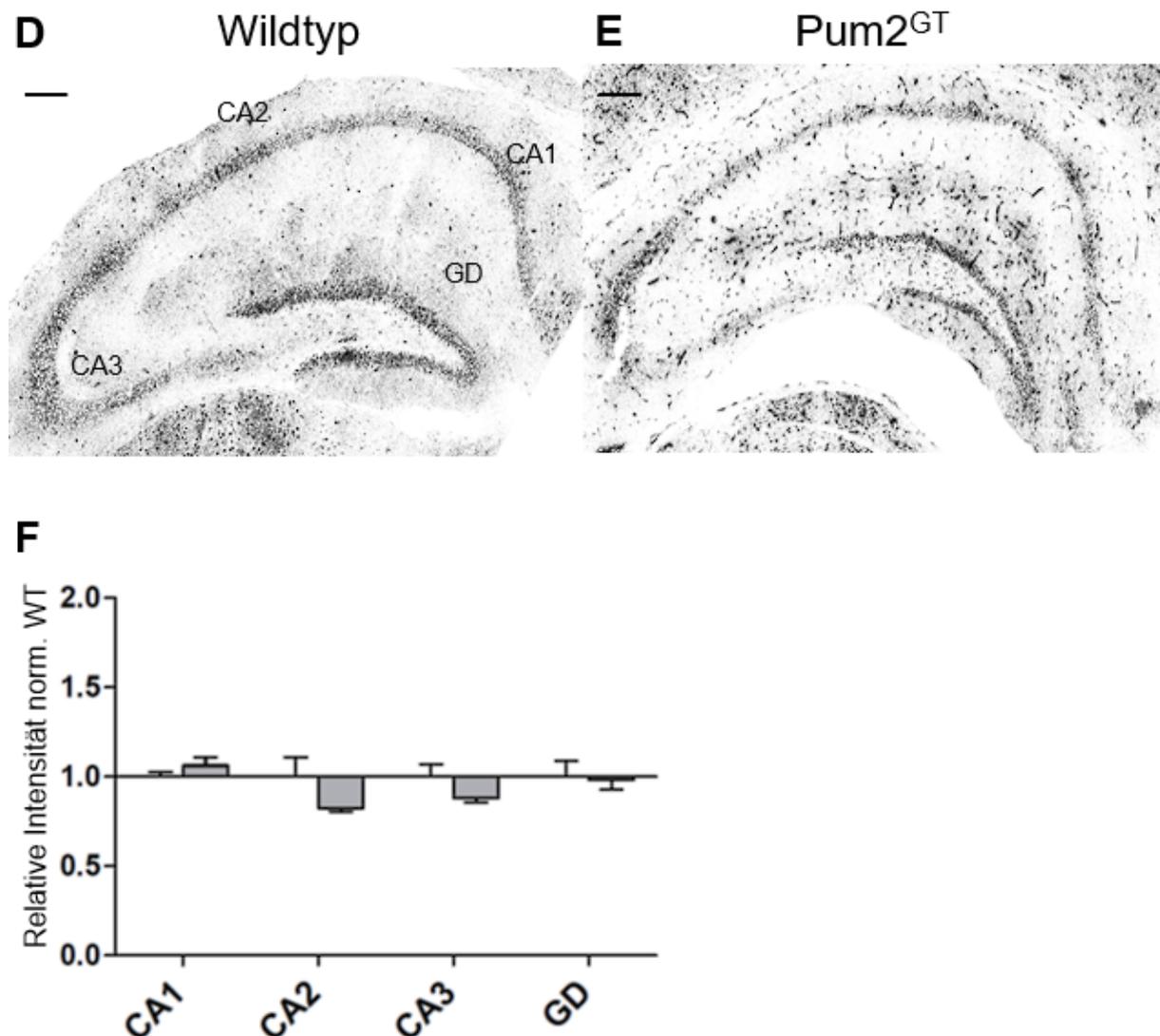
**Abbildung 7: Gesteigerte Na<sub>v</sub>1.1 Expression in CA1 und Gyrus Dentatus des Hippocampus**

Abbildungen (A) und (B) zeigen eine Immunfluoreszenzfärbung für Na<sub>v</sub> 1.1 in 5 Monate alten Mäusen. Abbildung (C) zeigt die dazugehörige Quantifizierung der Signalstärke, normalisiert auf den Wildtyp. Im Vergleich zum Wildtyp (A) zeigt sich in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen (B) eine gesteigerte Na<sub>v</sub> 1.1 Expression in der Region CA1 und dem Gyrus Dentatus (GD). Maßstab: 200µm (n=3 pro Gruppe; 1 way ANOVA, Tukey's multiple comparison Test; Mean + SEM, p=0.05).

Somit stellte sich weiterführend die Frage, ob eine mögliche veränderte Proteinexpression auch in jüngeren Tieren zu beobachten war.

### 3.5.2 Juvenile $\text{Na}_v1.1$ Expression im Hippocampus

In **Abb.7 D,E** ist die Immunfluoreszenzfärbung für  $\text{Na}_v1.1$  in 21 Tage alten Mäusen zu sehen. In Schwarz dargestellt ist das Signal für  $\text{Na}_v1.1$ , NeuN und DAPI sind dagegen der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt. Auch hier wurde das Intensitätssignal



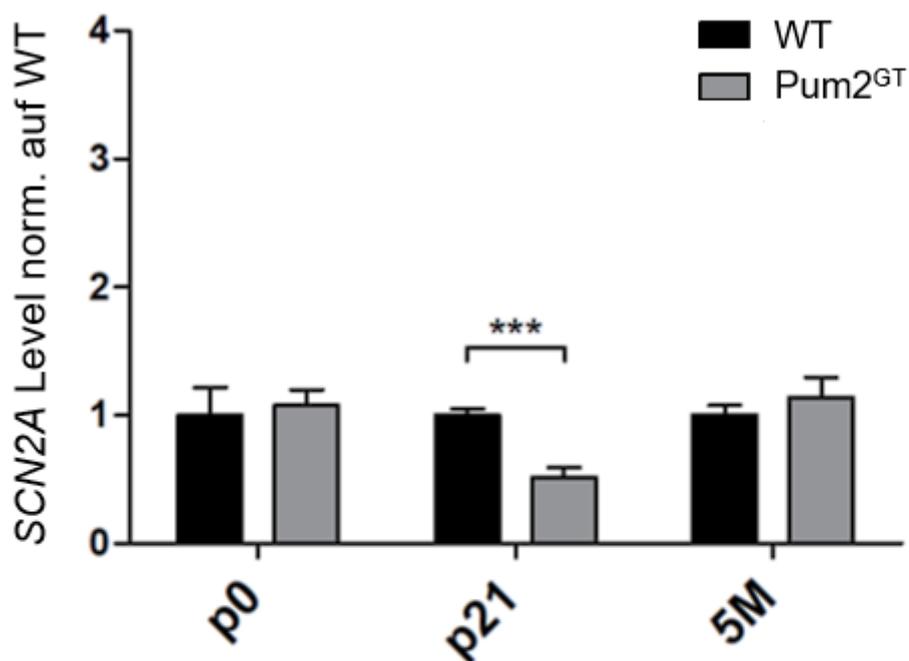
**Abbildung 7 D,E:** (D) und (E) zeigen eine Immunfluoreszenzfärbung für  $\text{Na}_v1.1$  in 21 Tage alten Mäusen. **Abbildung (F)** zeigt die dazugehörige Quantifizierung der Signalstärke normalisiert auf den Wildtyp. Im Vergleich zum Wildtyp (D) zeigt sich in  $\text{Pum2}^{\text{GT}}$  Mäusen (E) in allen Regionen kein signifikanter Unterschied der  $\text{Na}_v1.1$  Expression. Maßstab:  $200\mu\text{m}$ . ( $n=3$  pro Gruppe; 1 way ANOVA, Tukey's multiple comparison Test; Mean + SEM,  $*p=0.05$ ).

analog zu den adulten Tieren quantifiziert und auf den Wildtyp normalisiert. Im Vergleich zu den Färbungen in adulten Tieren ist ein erhöhtes Hintergrundrauschen

zu erkennen, zudem kann auch eine intensive Gefäßfärbung erkannt werden. Die anatomischen Strukturen sind jedoch deutlich abgrenzbar, wodurch eine reguläre Quantifizierung möglich war. **Abb.7F** zeigt die dazugehörigen Quantifizierungen normalisiert auf den Wildtyp. Es ist eine diskrete Reduktion des Signals für Nav1.1 in den Regionen CA2 und CA3 zu erkennen. Dieser Effekt ist jedoch bisher (noch) nicht signifikant. Somit lässt sich schlussfolgern, dass in 21 Tage alten Tieren keine signifikant veränderte Expression von Nav1.1 zu erkennen ist, was man jedoch aufgrund der erhöhten mRNA Level hätte erwarten können. Dies spricht möglicherweise für einen Effekt von Pum2 auf die Translation der *SCN1A* mRNA.

### 3.6 *SCN2A* Level in *Pum2*<sup>GT</sup> Mäusen

Entsprechend der Untersuchungen zu *SCN1A* erfolgte auch für *SCN2A* die Bestimmung der mRNA Level im Gesamtgehirn.



**Abbildung 8: Signifikant geringere *SCN2A* mRNA Level in 21 Tage alten *Pum2*<sup>GT</sup> Mäusen.** RT-pPCR Daten der *SCN2A* (*Nav*<sub>v</sub>1.2) mRNA im Gesamtgehirn. Dargestellt sind die Altersgruppen p0 bis 5 Monate. Die Wildtyp-Daten sind auf 1 normalisiert. In der Altersgruppe von 21 Tagen sind deutlich geringere *SCN2A* mRNA Level in *Pum2*<sup>GT</sup> Mäusen zu erkennen. Altersgruppen: p0= neugeboren, p21= 21 Tage, 5M= 5 Monate (n=6 für alle Gruppen, unpaired t-test, Mean + SEM \*P<0.05).

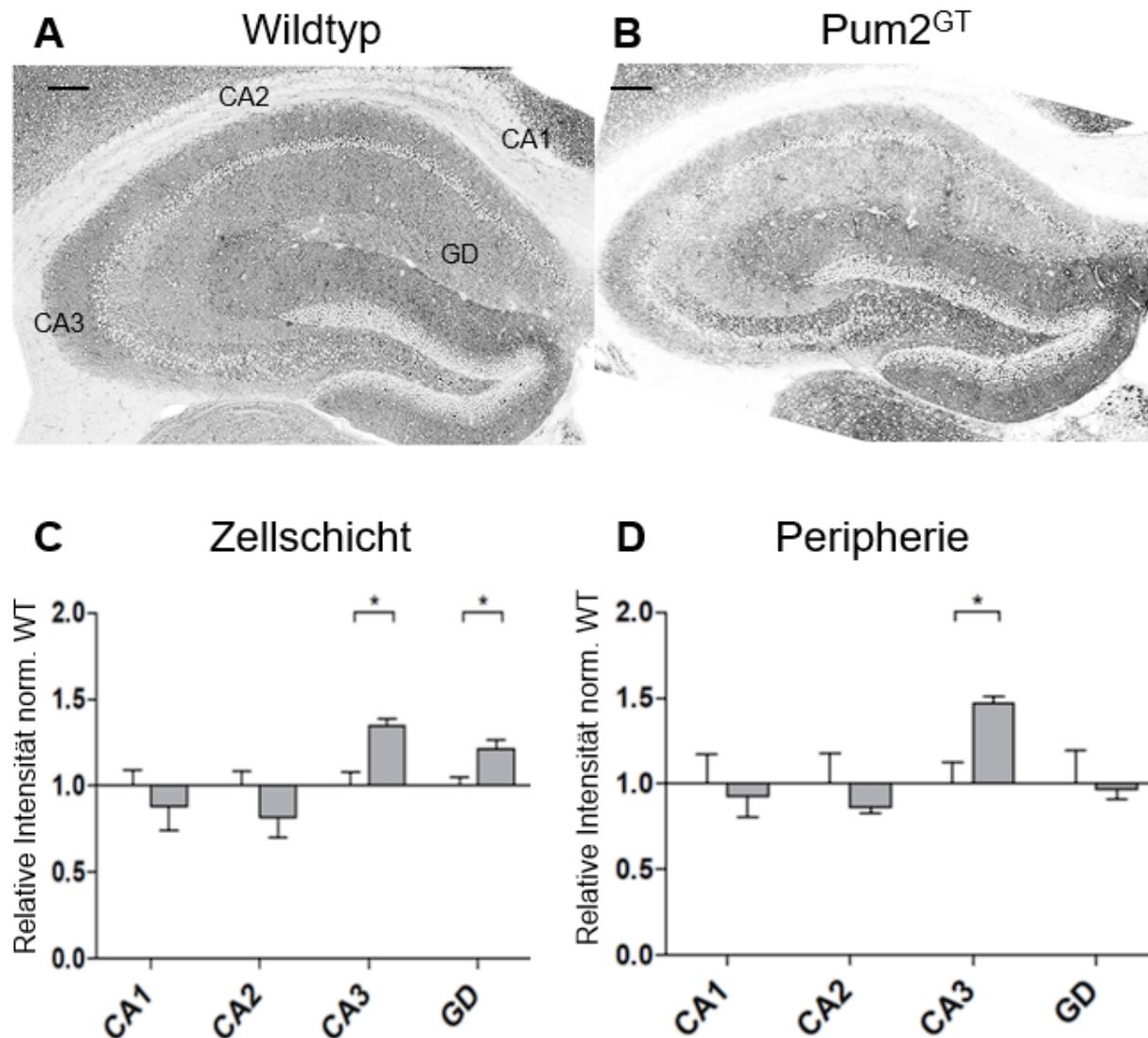
**Abb.8** zeigt die Ergebnisse der qPCR Untersuchungen im WT und den  $Pum2^{GT}$  Mäusen. Die Ergebnisse für  $Pum2^{GT}$  sind in Grau dargestellt. Es wurden ebenfalls die drei Altersstufen p0, p21 sowie 5M im Gesamtgehirn betrachtet. Nach Normalisierung auf das Referenzgen wurde auch hier zusätzlich auf den Wildtyp normalisiert. Während in den Altersstufen p0 (Neugeborenen) und 5M (Adult) kaum ein Unterschied zwischen den verschiedenen Linien zu erkennen ist, finden man in 21 (Juvenil) Tage alten Mäusen signifikant reduzierte *SCN2A* mRNA Level. Hier zeigt sich eine knapp 50%-ige Reduktion. Dies deutet auf eine Regulation der mRNA Level in juvenilen Tieren hin. Ein ähnlicher Effekt konnte analog dazu für die mRNA Level für *SCN1A* beobachtet werden. Zur Bestimmung der Proteinexpression von  $Nav1.2$  wurden anschließend ebenfalls Immunfluoreszenzfärbung angefertigt.

### 3.7 Hippocampale Expression des spannungsabhängigen Natriumkanals $Nav1.2$ in $Pum2^{GT}$ Mäusen

#### 3.7.1 Adulte $Nav1.2$ Expression im Hippocampus

$Nav1.2$  ist vor allem in unmyelinisierten Zellfortsätzen von Neuronen lokalisiert, dies beinhaltet sowohl Axone als auch Dendriten (Leterrier et al. 2010). Im Wesentlichen aber wurde ihm eine Expression im Axoninitialsegment gefunden (Lorincz and Nusser 2008; Onwuli and Beltran-Alvarez 2016). **Abb.9A,B** zeigt die Immunfluoreszenzfärbung für  $Nav1.2$ . Es ist deutlich zu erkennen, dass eine starke Anfärbung in der Peripherie, welche hauptsächlich aus Zellfortsätzen besteht, erfolgt. Im Gegensatz dazu sind die Zellbänder, die vorwiegend Zellkörper enthalten, kaum angefärbt. Dies ist an den weißen Zellbändern des GD und der CA Regionen deutlich zu erkennen. Aus diesem Grund wurde eine zusätzliche Quantifizierung für die Zellperipherie vorgenommen. Diese wurde als Schicht ober- und unterhalb, des einer Region zugehörigen Zellbandes, definiert. **Abb.9C,D** zeigt die dazugehörigen Ergebnisse der Quantifizierung. Im Zellband findet sich in  $Pum2^{GT}$  Mäusen vor allem in der CA3 Region sowie im GD ein stärkeres Signal für  $Nav1.2$ . Zudem scheinen die Regionen CA1 und CA2 ein leicht schwächeres Signal aufzuweisen. Dieser Effekt war jedoch bisher nicht statistisch signifikant. In der Peripherie der  $Pum2^{GT}$  Mäuse scheint eine geringere, jedoch nicht signifikant unterschiedliche Anfärbung in den Regionen CA1 und CA2 vorzuliegen. Gleichzeitig ist ein knapp 1,5-fach stärkeres, signifikantes

Signal in der CA3 Region zu sehen. Dies ist an dem scharf begrenzten und dunkel dargestellten Band an der Basis des GD bis in die Region CA3 deutlich zu erkennen. Schlussendlich konnte mikroskopisch eine gesteigerte Proteinexpression von  $Na_v1.2$  im Hippocampus adulter Mäuse nachgewiesen werden. Dies betrifft das Zellband der Region CA3 und des GD. In der Peripherie wurde eine gesteigerte Expression in der

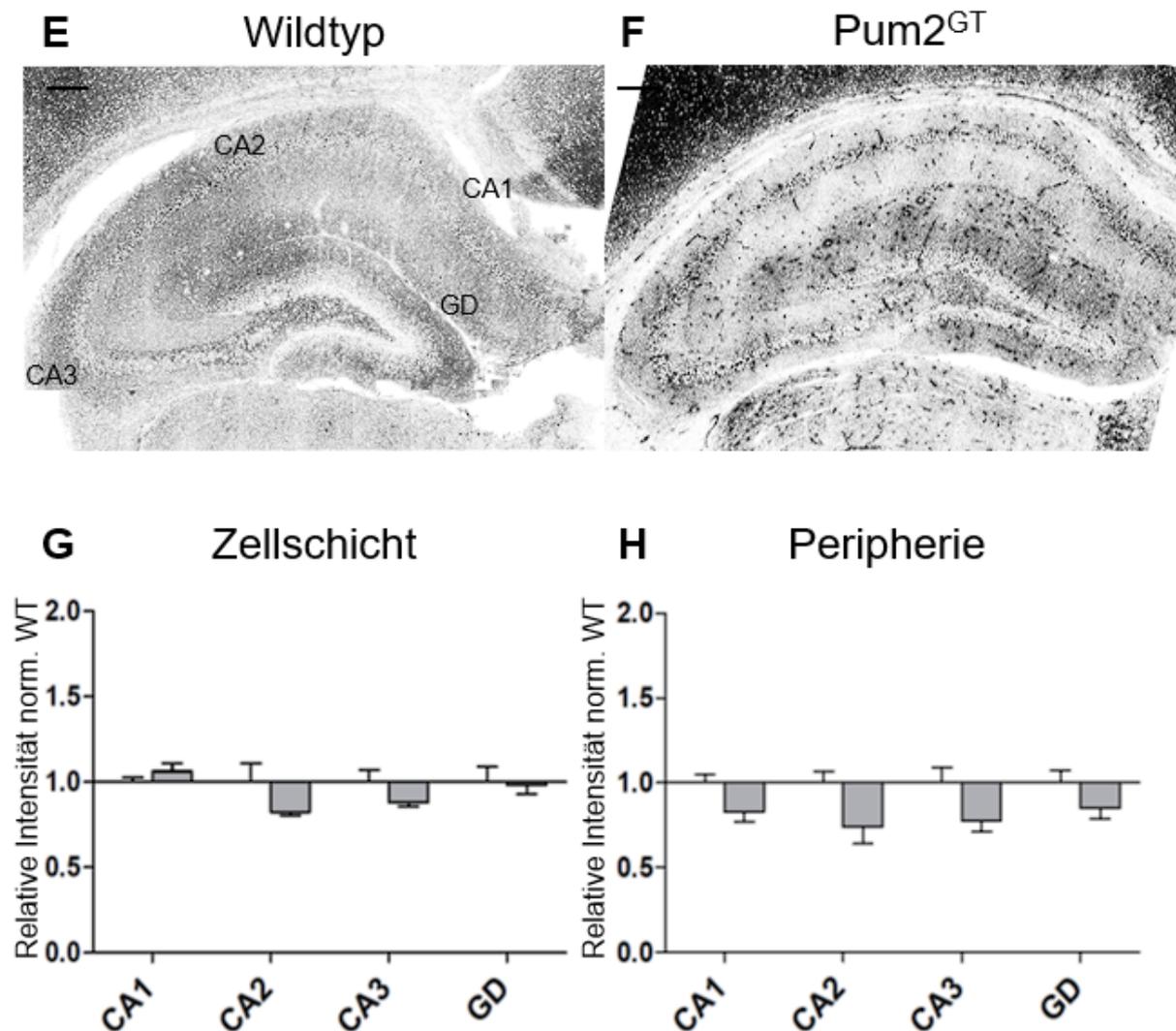


**Abbildung 9: Veränderte  $Na_v 1.2$  Expression im Hippocampus.** (A) und (B) zeigen eine Immunfluoreszenzfärbung für  $Na_v 1.2$  in 5 Monate alten Mäusen mit den zugehörigen Quantifizierungen (C) und (D). Da  $Na_v 1.2$  v.a. in der Peripherie lokalisiert ist, wurde diese zusätzlich quantifiziert. Es zeigt sich eine stärkere Anfärbung in der Region CA3 und im Gyrus Dentatus (GD) der Zellschicht (C). Weiterhin zeigt sich ein stärkeres Signal in der Peripherie der Region CA3 (D). Maßstab: 200 $\mu$ m (n=3 pro Gruppe; 1 way ANOVA, Tukey's multiple comparison Test, Mean + SEM, \*p=0.05.)

Region CA3 deutlich. Dies lässt vermuten, dass Pum2 möglicherweise eine Regionenspezifische Regulation der Translation übernimmt.

### 3.7.2 Juvenile $Na_v1.2$ . Expression im Hippocampus

In 5 Monate alten, adulten Tieren werden epileptische Anfällen beobachtet. Mikroskopisch konnte eine veränderte  $Na_v1.2$  Expression nachgewiesen werden. Um nachzuvollziehen, ab welchem Alter dieser Effekt bereits sichtbar wird, wurden entsprechende Analysen in juvenilen, 21 Tage alten Tieren, durchgeführt.

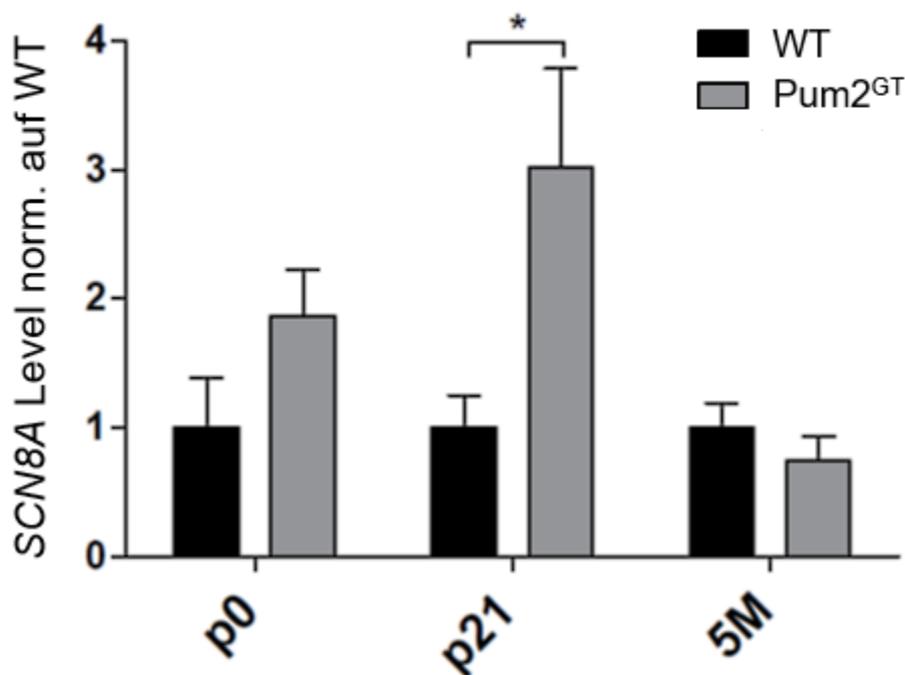


**Abbildung 9 E,F:** (E) und (F) zeigen Immunfluoreszenzfärbungen für  $Na_v1.2$  in 21 Tage alten Mäusen, mit den zugehörigen Quantifizierungen (G) und (H). Es ließ sich kein signifikanter Effekt erkennen. Maßstab: 200 $\mu$ m (n=3 pro Gruppe; 1 way ANOVA, Tukey's multiple comparison test; Mean + SEM, \*p=0.05).

In **Abb.9E,F** sind die Färbungen für Nav1.2 in 21 Tage alten Mäusen abgebildet. Das Fluoreszenzsignal ist in Schwarz dargestellt. Wie in den Schnitten der adulten Tiere ist auch hier erkennbar, dass eine Anfärbung des Kanals vor allem in der Peripherie stattfindet. Analog zu den vorherigen Quantifizierungen wurde auch hier das Intensitätssignal im Zellband und in der Peripherie quantifiziert. **Abb.9G,H** zeigt die dazugehörigen Ergebnisse der Quantifizierung. Scheinbar findet in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen, im Vergleich zum Wildtyp, eine geringere Anfärbung in der Peripherie statt. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht statistisch signifikant. Zusammengefasst konnte in 21 Tage alten Mäusen keine signifikant veränderte Proteinexpression von Nav1.2 im Hippocampus beobachtet werden. Auch hier liegt somit die Vermutung nahe, dass Pum2 einen regulatorischen Effekt auf die Translation der SCN2A mRNA hat.

### 3.8 *SCN8A* Level in *Pum2*<sup>GT</sup> Mäusen

Als nächstes wurden mittels RT-qPCR die mRNA Level von *SCN8A* (*Nav1.6*) untersucht. *Nav1.6* ist sowohl in der Peripherie, als auch am Zellsoma von Neuronen lokalisiert (Leterrier et al. 2010). Ihm kommt eine wichtige Funktion in der Generierung von Aktionspotentialen zu. Für *Nav1.6* sind alternative Splice-Varianten beschrieben (Zubović, Baralle, and Baralle 2012) und ihm wird eine wichtige Rolle in der Epileptogenese zugeschrieben (Hargus et al. 2013).



**Abbildung 10: Signifikant erhöhte *SCN8A* mRNA Level in 21 Tage alten *Pum2*<sup>GT</sup> Mäusen.**

RT-pPCR Daten der *SCN8A* (*Nav1.6*) mRNA im Gesamtgehirn. Dargestellt sind die Altersgruppen p0 bis 5 Monate. Die Wildtyp-Daten sind auf 1 normalisiert. In der Altersgruppe von 21 Tagen zeigen sich deutlich erhöhte *SCN8A* mRNA Level in *Pum2*<sup>GT</sup> Mäusen. Altersgruppen: p0= neugeboren, p21= 21 Tage, 5M= 5 Monate (n=6 für alle Gruppen, unpaired t-test, Mean + SEM, \*P<0.05).

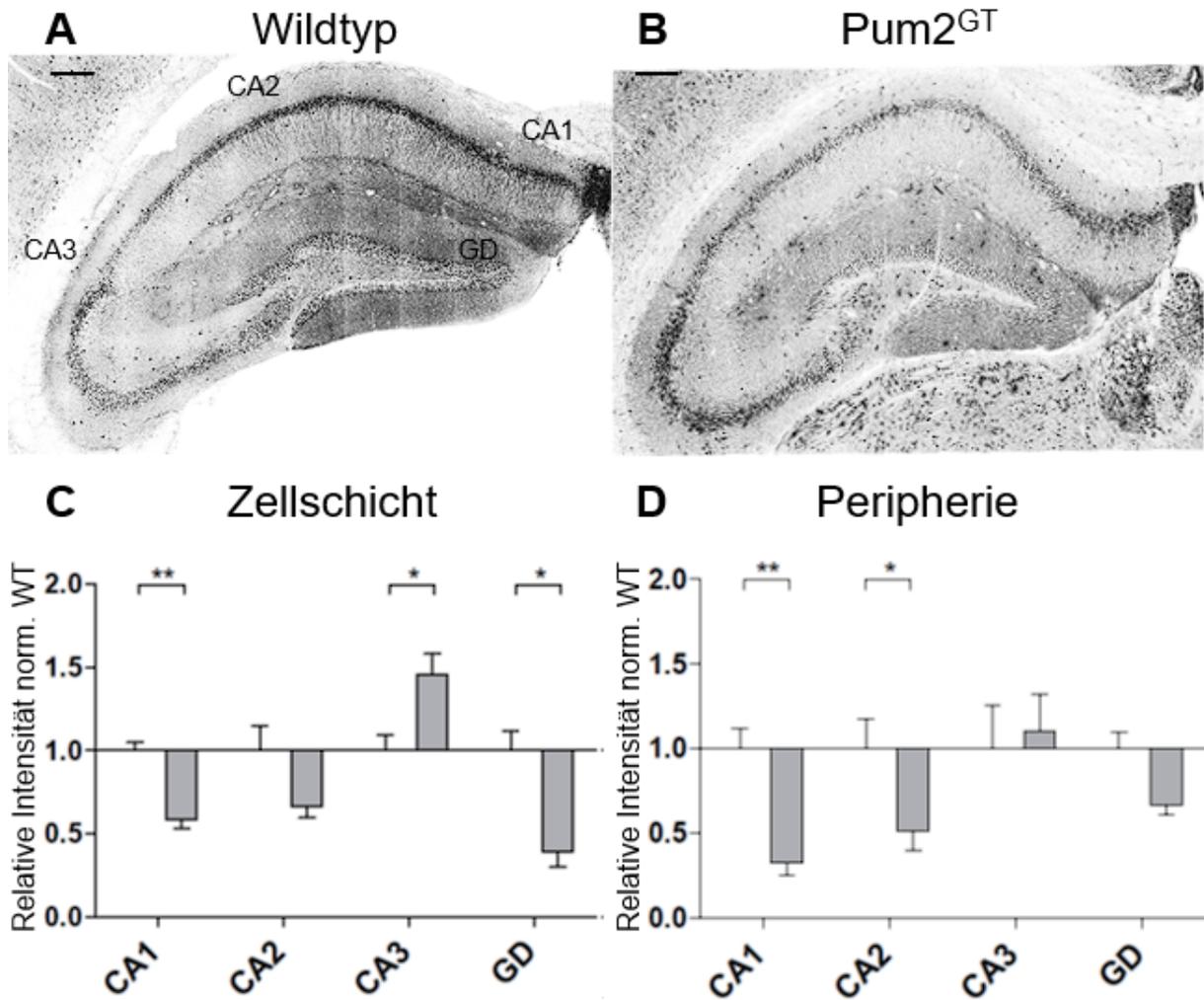
**Abb.10** zeigt die Ergebnisse für die mRNA im Gesamtgehirn in den jeweiligen Altersstufen p0 bis 5M. Für neugeborene Mäuse sind leicht erhöhte, jedoch nicht signifikante mRNA Level zu sehen. Auch hier findet sich in der Altersgruppe von 21 Tage alten Mäusen ein signifikanter Effekt. Die *SCN8A* mRNA ist hier im Vergleich zum Wildtyp knapp 3-fach erhöht. Zusammengefasst kann für *SCN8A* ein erhöhtes RNA Expressionslevel in jüngeren Tieren beobachtet werden. Auch hier könnte ein

Einfluss von Pum2 auf die Translation der mRNA von Nav1.6 vorliegen, was mit Hilfe der folgenden Experimente überprüft werden sollte.

### 3.9 Hippocampale Expression des spannungsabhängigen Natriumkanals Nav1.6 in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen

#### 3.9.1 Adulte Nav1.6 Expression im Hippocampus

Zur Beurteilung der Proteinexpression von Nav1.6 im Hippocampus wurden auch in diesem Fall Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Wie auch in den vorherigen Versuchen dargestellt, wurden dies Schnitte anschließend quantifiziert. Nav1.6 zeigt im Gegensatz zu den anderen untersuchten Kanälen ein gemischtes Färbeverhalten. Vor allem im Zellband erfolgt eine Anfärbung, jedoch auch in der Peripherie. Er scheint dort vor allem dendritisch lokalisiert zu sein. Dies lässt sich in **Abb.11A,B** anhand der Färbung des Hippocampus von 5M alten Tieren, im WT und in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen erkennen. So ist im Wildtyp, in der Schicht unterhalb des Zellbandes der Region CA1, eine stark angefärbte Peripherie zu erkennen. Bei genauer Betrachtung sind bereits einzeln abgrenzbare Dendriten zu erkennen. Vergleicht man die beiden Schnitte, so ist bereits ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Vor allem in der Peripherie ist ein schwächeres Signal für Nav1.6 sichtbar. Auch das Zellband der Region CA1 ist hier schwächer sichtbar. **Abb.11C,D** zeigen die Ergebnisse der dazugehörigen Quantifizierung. Zu den oben genannten Beobachtungen ergibt sich ein um ca. 0,5-fach geringeres, signifikantes Signal im Zellband und der Peripherie der CA1 Region. Zudem findet sich im Zellband der CA1 Region und im GD in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen ein signifikant geringeres Signal. In der CA3 Region hingegen erfolgt eine signifikant stärkere Anfärbung im Pum2<sup>GT</sup> Mäusen. In der Peripherie erfolgt in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen eine signifikant schwächere Anfärbung vor allem in den Regionen CA1 und CA2. In der Quantifizierung ergibt sich hier ein ca. 0,5- bis 0,7-fach abgeschwächtes Signal. Zusammengefasst ergibt sich für Nav1.6 eine veränderte Proteinexpression in



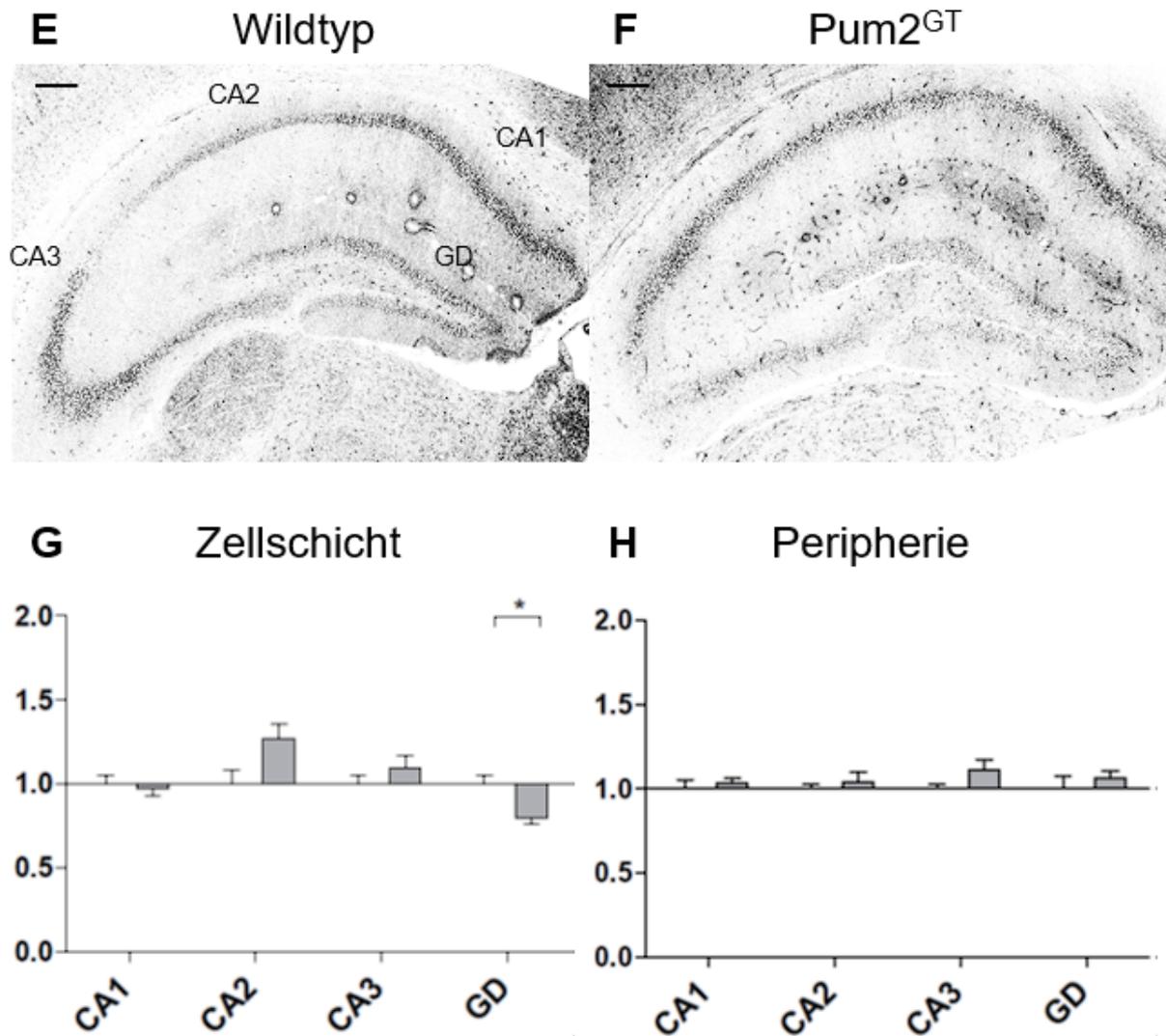
**Abbildung 11: Veränderte Na<sub>v</sub>1.6 Expression im Hippocampus.**

(A) und (B) zeigen Immunfluoreszenzfärbungen für Na<sub>v</sub> 1.6 in 5 Monate alten Mäusen. (C,D) zeigt die dazugehörige Quantifizierung der Signalstärke, normalisiert auf den Wildtyp. Da für Na<sub>v</sub> 1.6 eine somatische, wie periphere Lokalisation beschrieben ist, wurde beides quantifiziert. Im Vergleich zum Wildtyp (A) zeigt sich in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen (B) eine verringerte Na<sub>v</sub> 1.6 Expression in den Regionen CA1 und dem Gyrus Dentatus sowie eine gesteigerte Expression in CA3. (C) Es zeigt sich ein geringeres Signal in der Peripherie der Regionen CA1 und CA2 (D). Maßstab: 200µm (n=3 pro Gruppe; 1 way ANOVA, Tukey's multiple comparison test, Mean + SEM \*p=0.05).

5 Monate alten Tieren. Interessanterweise lässt sich dieser Effekt vor allem in der Peripherie, insbesondere an Dendriten nachweisen. Es ist bekannt, dass auch Pum2 vor allem dendritisch lokalisiert ist (Vessey et al. 2006). Möglicherweise kommt Pum2 dort ebenfalls eine Funktion in der Regulation der Translation von Na<sub>v</sub>1.6 zu.

### 3.9.2 Juvenile $\text{Na}_v1.6$ Expression im Hippocampus

Zur Bestimmung der Proteinexpression von  $\text{Na}_v 1.6$  im Hippocampus juveniler Tiere erfolgte ebenfalls eine fluoreszenz-mikroskopische Analyse. **Abb.11A,B** zeigt die



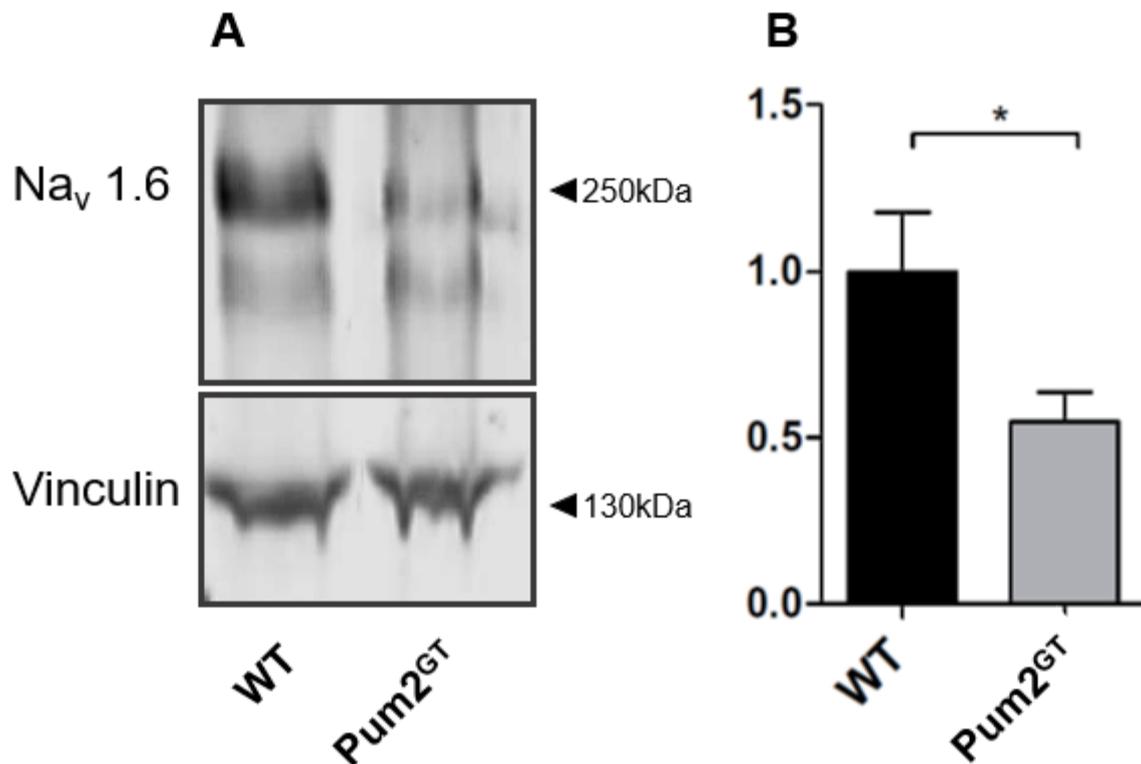
**Abbildung 11 E,F:** (E) und (F) zeigen Immunfluoreszenzfärbungen für  $\text{Na}_v 1.6$  in 21 Tage alten Mäusen. **Abbildung (G,H)** zeigen die dazugehörigen Quantifizierungen, normalisiert auf den Wildtyp. Im Vergleich zum Wildtyp (E) zeigt sich in  $\text{Pum2}^{\text{GT}}$  Mäusen (F) eine geringere  $\text{Na}_v 1.6$  Expression in der Zellschicht des Gyrus Dentatus. Maßstab:  $200\mu\text{m}$  ( $n=3$  pro Gruppe; 1 way ANOVA, Tukey's multiple comparison test; Mean + SEM,  $*p=0.05$ ).

entsprechenden Färbungen für  $\text{Na}_v1.6$  in 21 Tage alten Mäusen. Das Fluoreszenzsignal ist in Schwarz dargestellt. Im Vergleich zu Tieren der Altersstufe von 5 Monaten ist ein schwächeres Signal in der Peripherie zu erkennen. Die Zellbänder der Regionen CA und des GD sind nach wie vor deutlich angefärbt. Im

Wildtyp lassen sich zudem stark angefärbte Gefäßanschnitte erkennen. Auch hier wurde das Intensitätssignal im Zellband und in der Peripherie quantifiziert. **Abb.11C,D** zeigt die dazugehörigen Ergebnisse. Für die Regionen CA1 bis CA3 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Im Zellband des Gyrus Dentatus findet sich ein diskret schwächeres, jedoch statistisch signifikantes Signal. Schlussendlich tritt in 21 Tage alten Tieren keine signifikant veränderte Proteinexpression in den CA Regionen zwischen den zwei Mauslinien auf. Dies ist im Vergleich zu der schwächeren Expression der Regionen CA in adulten Tieren eine interessante Beobachtung, da diese Tiere epileptische Anfälle aufweisen. Im Zellband des GD konnte bereits in juvenilen Tieren eine schwächere Expression beobachtet werden. Dieser Effekt liegt in adulten Tieren noch deutlicher vor. Somit ergibt sich für Nav1.6 eine signifikant verringerte Expression im GD. Die Expression in den anderen Regionen scheint hingegen nicht beeinflusst zu sein. Dies spricht für eine stärkere Regulation der Translation durch Pum2 vor allem in adulten Tieren.

### 3.9.3 $Na_v1.6$ Expression im Gesamtgehirn

Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen der mRNA Analyse erfolgte als nächstes mittels Western-Blot die Untersuchung der  $Na_v1.6$  Expression im Gesamtgehirn.



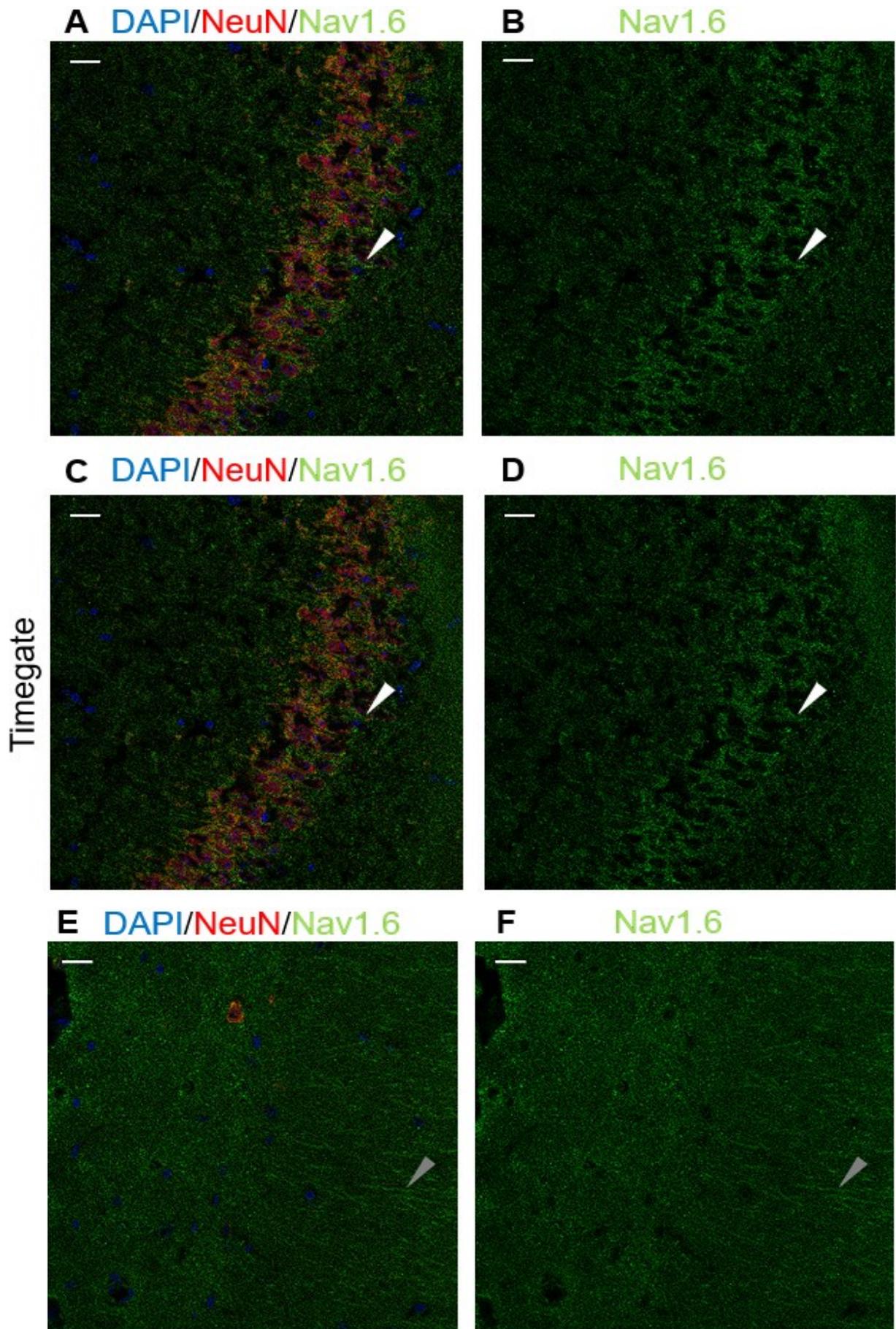
**Abbildung 12:**  $Na_v1.6$  Expression im Gesamthirn (A) zeigt einen repräsentativen Western Blot für  $Na_v1.6$  im Gesamtgehirn von 5 Monaten alten Mäusen. (B) zeigt die dazugehörige Quantifizierung normalisiert auf WT. Es zeigt sich ein geringeres  $Na_v1.6$  Level in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen (n=4 pro Gruppe; unpaired t-test, Mean + SEM, \*P<0.05).

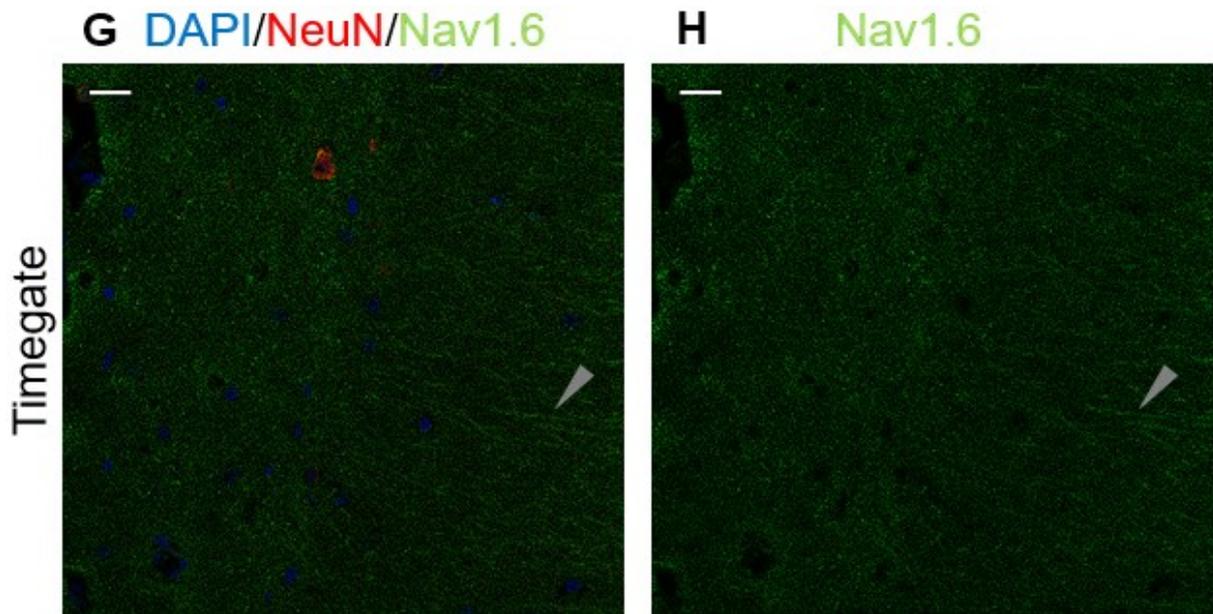
**Abb.12A** zeigt den dazugehörigen Western-Blot in adulten Tieren. Als Kontrolle wurde Vinculin verwendet und die Ergebnisse wurde auf den Wildtyp normalisiert. Es sind insgesamt schwächere Banden für  $Na_v1.6$  im Bereich von 250 kDa in Pum2<sup>GT</sup> Hirnextrakten zu sehen. **Abb.12B** zeigt die dazugehörige Quantifizierung, welche eine signifikant schwächere Bandenintensität der Pum2<sup>GT</sup> Mäuse zeigt. Somit findet sich in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen eine um ca. 50% verringerte Proteinexpression von  $Na_v1.6$  im Vergleich zum Wildtyp. Die Untersuchung der mRNA Level von *SCN8A* ergaben hier ebenfalls ein möglicherweise geringeres Level, welches jedoch nicht statistisch

signifikant ist. Möglicherweise kommt Pum2 dadurch eher eine Rolle in der Regulation der Translation als eine Rolle in der Regulation der mRNA Level zu.

### 3.9.4 Überlegungen zum Signal-Rausch Verhältnis bei Immunfluoreszenzexperimenten (Signal to noise /Gating)

Um den Effekt möglicher Autofluoreszenz und somit den Grad des Hintergrundrauschens in Immunfluoreszenzfärbungen besser einschätzen zu können, wurden sogenannte „*gating*-Versuche“ durchgeführt. Durch die chemische Präparation des Gewebes kann dieses bei Laseranregung grundsätzlich ebenfalls Licht emittieren, was möglicherweise zu zusätzlichen Signalen führt. Das vom Fluoreszenzfarbstoff und dem Gewebe emittierte Licht trifft nach bestimmten Zeitabständen auf den Detektor. Die Zeitabstände zwischen der Emission und der Detektion des Lichtes sind bekannt und können so zur Selektion des Signals dienen. In diesem Versuch wurde ein Zeitfenster von 12ns gewählt, um möglichst nur das vom Farbstoff emittierte Licht zu detektieren. In **Abb.13** sind Schnitte mit einer Dreifachfärbung zu erkennen: Zellsoma (rot), Nav1.6 (grün) und Zellkern (blau). Die Färbung des Zellsomata erfolgte mittels Antikörper gegen NeuN, für Nav1.6 wurden die gleichen Antikörper wie in den vorhergehenden Versuchen verwendet, der Zellkern wurde mittels DAPI dargestellt. **Abb.13A,B** zeigt einen Zellbandausschnitt ohne *gating*, der Pfeil markiert eine prominente Anfärbung mit Nav1.6. **Abb.13C,D** stellen denselben Ausschnitt mit *gating* dar. Es ist kein relevanter Unterschied zu erkennen. **Abb.13E,F** zeigt einen Ausschnitt der Zellperipherie mit Nav1.6 Färbung (grün) ohne *gating*. Im Vergleich dazu ist in **Abb.13G,H** derselbe Ausschnitt mit *gating* zu sehen. Auch hier ist nahezu kein Unterschied zu erkennen. Anhand dieses Versuches lässt sich schlussfolgern, dass bei den beschriebenen Experimenten kein signifikantes Hintergrundrauschen auftritt.





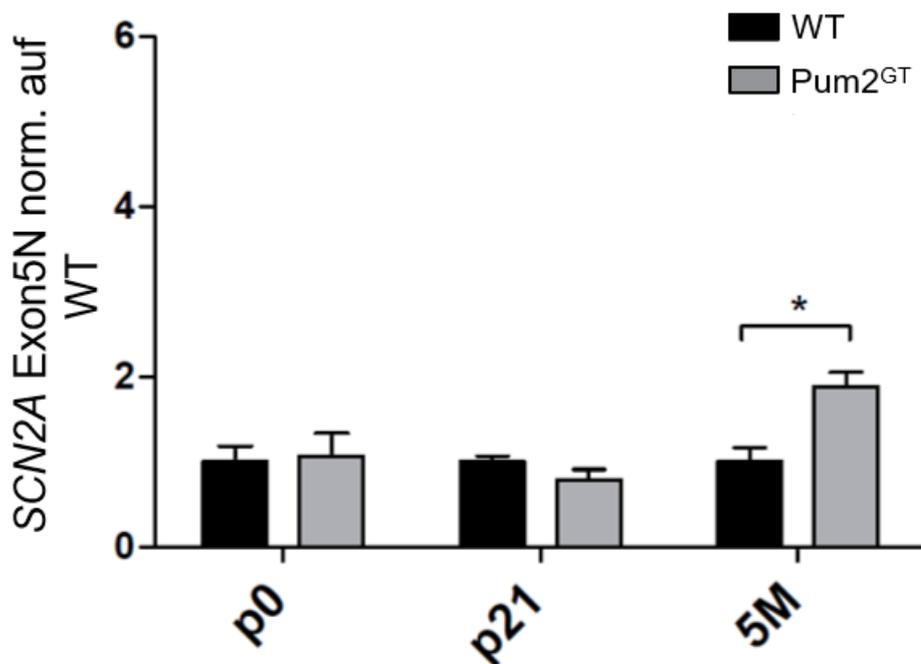
**Abbildung 13: Autofluoreszenz Kontrollversuch**

(A-H) zeigen Immunfluoreszenzfärbungen für Nav1.6, NeuN (Zellkörper) und DAPI (Zellkern). Um einen möglichen Autofluoreszenzeffekt zu erkennen, wurden Gatingversuche durchgeführt und ein Timegate von 12ns verwendet. (A,B) zeigen das Zellband ohne Gating, (C,D) mit Gating. Die Anfärbung von Nav1.6 (weiße Pfeile) ist jeweils gut zu erkennen. (E,F) zeigen die Peripherie ohne Gating, (G,H) mit Gating. Auch hier sind neuronale Ausläufer gut zu erkennen (graue Pfeile). Es ist kaum Autofluoreszenz detektierbar.

### 3.10 Alternatives Splicing der mRNA von SCN2A und SCN8A im Exon5

Es ist bekannt, dass das Exon 5 als Teil der für die  $\alpha$ -Untereinheiten kodierenden mRNA alternativem Splicing unterliegt. In Mäusen ist dies vor allem für die *SCN2A* und *SCN8A* mRNA bekannt (Gazina et al. 2010). Für das Exon 5 sind zwei wesentliche Splicevarianten beschrieben. Exon 5A beschreibt eine adulte Version, Exon 5N eine neonatale Version. Diese Bezeichnung erfolgte aufgrund des prädominanten Vorliegens in der jeweiligen Altersstufe (Kearney et al. 2002; Plummer, McBurney, and Meisler 1997) Das Vorliegen bestimmter Splicevarianten wurde darüber hinaus mit veränderten neurophysiologischen Eigenschaften der Kanäle in Verbindung gebracht (Kearney et al. 2002). Weitere Untersuchungen in Menschen ergaben, bei vorliegender genetischer Epilepsie, ein verändertes Verhältnis zwischen den Splicevarianten des Exon 5 in Nav1.2 und Nav1.6. So konnte für Nav1.2 ein „*gain of*

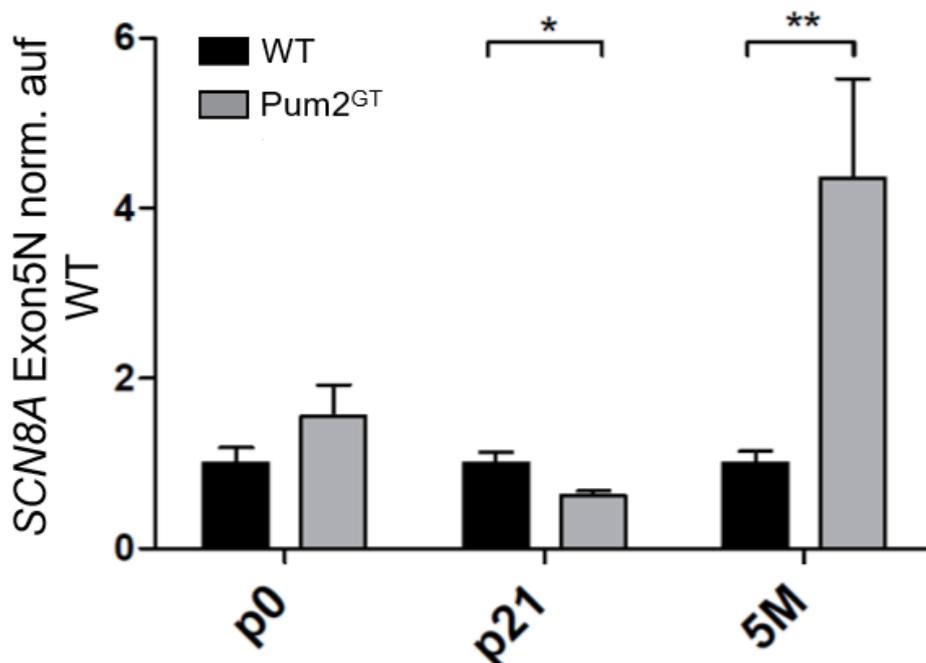
*function*“ bei überwiegendem Vorkommen des Exon 5A beobachtet werden. Dies würde einen schnelleren Natriumeinstrom und ein längerer Verbleib im geöffneten Zustand nahelegen (Liao et al. 2010). Es wurde daher die mRNA von Nav1.2 (SCN2A) und Nav1.6 (SCN8A) auf das Vorliegen der Splicevarianten Exon5 A/N (adult/neonatal) in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen untersucht.



**Abbildung 14:** Erhöhtes Vorkommen der neonatalen *SCN2A Exon 5* Splicevariante in adulten Mäusen

Die Splicevariante Exon5N, der *SCN2A* mRNA, liegt in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen im Alter von 5 Monaten verstärkt vor. In den Altersgruppen p0 und p21 konnte kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Die Wildtypdaten sind auf 1 normalisiert. Es wurde das Gesamtgehirn verwendet. Altersgruppen: p0= neugeboren, p21= 21 Tage, 5M= 5 Monate (n=6 für alle Gruppen, unpaired t-test, Mean + SEM, \*P<0.05).

**Abb.14** zeigt die RT-qPCR Ergebnisse für *SCN2A*. Es wurden die bisherigen drei Altersstufen verwendet. Um die jeweilige Splicevariante zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Primer verwendet, welche die entsprechende Splicevarianten spezifisch erkennen. Zudem erfolgte die Replikation des gesamten Exon5 als Kontrolle. Aus den so erhaltenen Ergebnissen wurde, zur besseren Vergleichbarkeit, ein Verhältnis zwischen E5N zu E5A gebildet. Diese wurde dann auf den Wildtyp normalisiert. Für *SCN2A* ist in den jeweiligen Altersgruppen bei adulten, 5 Monate alten Mäusen, ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die neonatale Splicevariante *SCN2A E5N* liegt in 5 Monaten alten Mäusen fast doppelt so häufig vor wie die adulte Splicevariante.



**Abbildung 15: Erhöhtes Vorkommen der Neonatalen *SCN8A Exon 5* Splicevariante in adulten Mäusen**

Die Splicevariante Exon5N, der *SCN8A* mRNA, liegt in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen im Alter von 5 Monaten verstärkt vor. In 21 Tagen alten Pum2<sup>GT</sup> Mäusen ist diese geringer. In der Altersgruppen p0 konnte kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Die Wildtypdaten sind auf 1 normalisiert. Es wurde das Gesamtgehirn verwendet. Altersgruppen: p0= neugeboren, p21= 21 Tage, 5M= 5 Monate (n=6 für alle Gruppen, unpaired t-test, Mean + SEM, \*P<0.05).

In **Abb.15** sind die Ergebnisse zu *SCN8A* zu sehen. Auch hier wurde ein Verhältnis aus E5N zu E5A gebildet. Für *SCN8A* sind in den jeweiligen Altersgruppen signifikante Unterschiede in 21 Tage und 5 Monaten alten Mäusen zu erkennen. In Mäusen der Altersgruppe p21 scheint die neonatale Splicevariante in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen, gegenüber dem Wildtyp, verringert zu sein. In der Altersgruppe von 5M ist ihr Vorkommen in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen gegenüber dem Wildtyp jedoch deutlich erhöht. Hier ergibt sich ein ca. 4-facher Effekt. Zusammengefasst ergibt sich in Pum2<sup>GT</sup> Mäusen für Nav1.2 und Nav1.6 ein Shift der Splicevarianten zugunsten von E5N. Aufgrund der Bedeutung sei hier erneut angemerkt, dass in diesem Alter Anfälle beobachtet werden können. Möglicherweise stellt das vermehrte Vorkommen von E5N somit einen Versuch der Regulation der neuronalen Aktivität, bei verminderter Anfallsschwelle dar. Interessanterweise konnte für *SCN8A* im Alter von 21 Tagen ein Überwiegen der Splicevariante E5A festgestellt werden. Möglicherweise spielt Pum2 hier eine Rolle am

alternativen Splicing zugunsten einer gesteigerten neuronalen Erregbarkeit, was einen epileptischen Phänotyp begünstigen könnte. Um zu gewährleisten, dass die entworfenen Primer jeweils spezifisch für das entsprechende Exon sind, wurden zunächst Kreuztests der Primer für *SCN2A* und *SCN8A* als zusätzliche Kontrollen durchgeführt. Es sollte geprüft werden, ob die gewählten Primer spezifische Ergebnisse für die jeweiligen nachzuweisenden Exone liefern.

**Tabelle 11**

	Primer <i>SCN2A</i>			
Primer	E5A	E5A	E5N	E5N
Template	E5N	E4/6	E5A	E4/6
Cq-Value (Dilution 1:156250)	18,2	7,76	16,99	7,3
Delta	10,44		9,69	

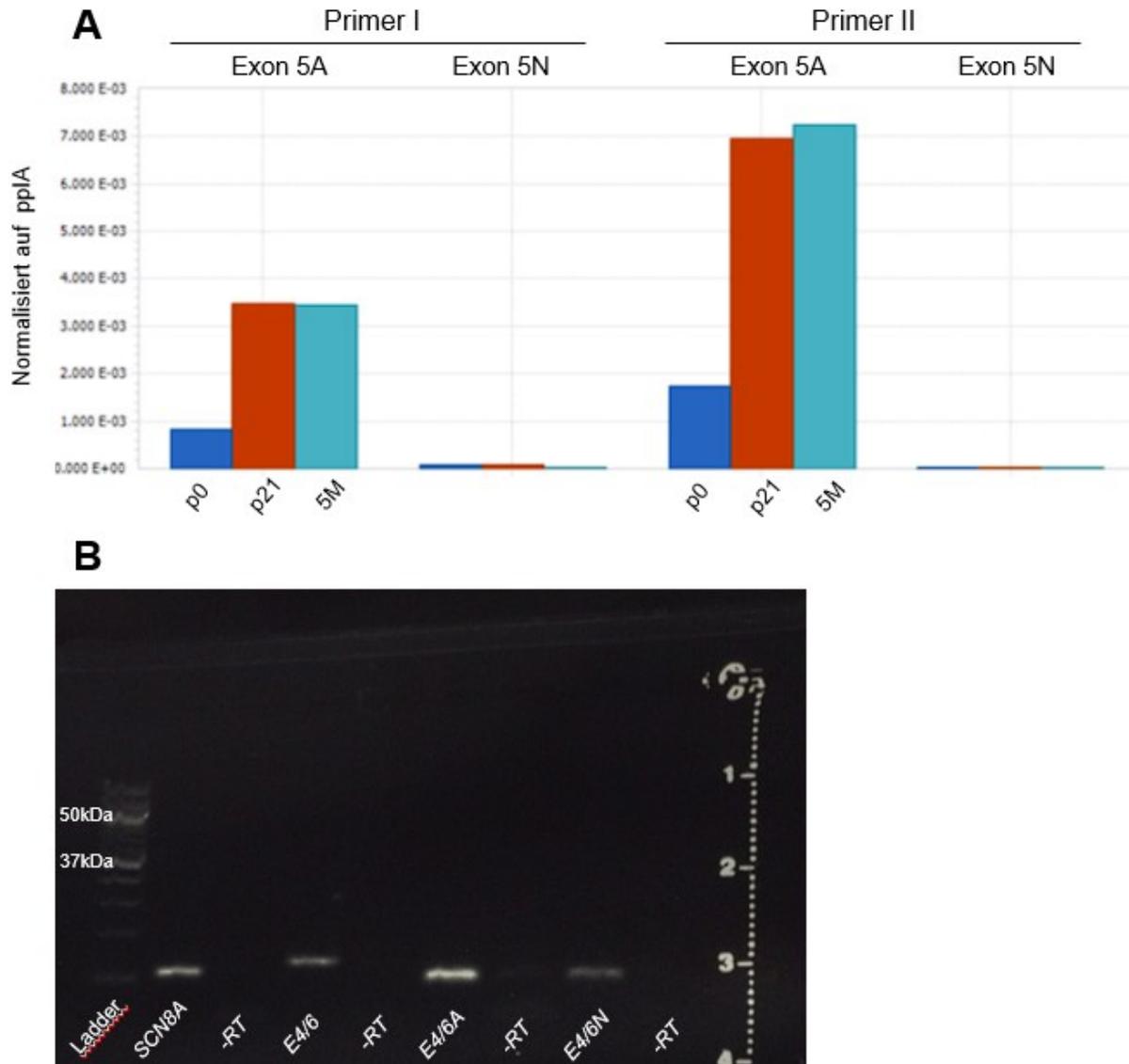
**Tabelle 12**

	Primer <i>SCN8A</i>			
Primer	E5A	E5A	E5N	E5N
Template	E5N	E4/6	E5A	E4/6
Cq-Value (Dilution 1:156250)	13,02	3,26	20,42	9,49
Delta	9,76		10,93	

**Abbildung 16: Primerspezifitätstest der alternativen Exone 5A/5N der *SCN2A* und *SCN8A* mRNA**

Um die Primerspezifität zu prüfen, erfolgte eine Kreuztestung. Dabei wurde als Negativkontrolle dem jeweiligen Primer (grün) das jeweils andere Template (blau) zugewiesen. Als Positivkontrolle wurde das E4/6 mit dem passenden Template verwendet. **Tabelle 11** zeigt eine deutliche Abweichung der  $\Delta$ Cq-Werte für die jeweilige Kontrolle bei *SCN2A*. Der Schwellenwert wird bei der Positivkontrolle früher erreicht. **Tabelle 12** zeigt dies für *SCN8A*. Auch hier liegen die Schwellenwerte deutlich auseinander.

In **Abb.16 und Tabelle 12** sind die Ergebnisse für *SCN2A* zu sehen. Als Parameter wurde hierbei der Cp-Wert betrachtet.



**Abbildung 17: Spezifitätstest neuer Primer (A)** zeigt die Ergebnisse eines RT-qPCR Laufs zweier unterschiedlicher Primer (Primer I und II) für *SCN8A*, welche jedoch das gleiche Exon erkennen. Normalisiert wurde auf ppA. Es zeigt sich im wesentlichen ein gleiches Muster über die Altersstufen. **(B)** zeigt eine Gel-Kontrolle der Replikate für *SCN8A*. Es zeigen sich singuläre Banden ohne Nebenprodukte, sowie keine sichtbaren Banden in den Negativkontrollen.

Dieser Wert gibt die nötige Anzahl an Replikationszyklen an, die notwendig sind, um den Schwellenwert zur Detektion des Fluoreszenzsignals zu überschreiten. Ein niedriger Cp-Wert spiegelt somit eine gute Primerbindung wieder. Tabelle 1 zeigt die

Cq-Werte für die jeweilige Kombination aus Primer und Template. Für die Kombination aus dem Primer für Exon 5A und dem Template Exon 5N wäre somit ein hoher Cq-Wert zu erwarten. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Differenz der Cq-Werte aus den jeweiligen Läufen gebildet. Die Differenz der Cp-Werte bezüglich dem Exon 5A/N in *SCN2A* ist ausreichend groß, um von einer Primerspezifität auszugehen. In **Abb.16 und Tabelle 13** sind die Ergebnisse für *SCN8A* dargestellt. Auch hier liegen die Cq-Werte ausreichend weit auseinander, um von einer ausreichenden Primerspezifität auszugehen. Für *SCN8A* (*Nav1.6*) wurde zur weiteren Kontrolle ein für das Exon 5 spezifischer, jedoch nicht identischer Primer verwendet. Hierdurch sollte überprüft werden, ob Primer mit unterschiedlicher Basensequenz, ähnliche Ergebnisse für die Replikation desselben Zielabschnittes liefern, was eine Spezifität bestätigen würde. In **Abb.17A** sind die Ergebnisse der unterschiedlichen Primer mit Affinität zum selben Exon dargestellt. Für Primer I und Primer II sind jeweils ähnliche Ergebnisse zu sehen, was ebenfalls für die Primerspezifität spricht. Die durchgeführte Auftrennung eines qPCR-Laufs auf einem Agarosegel ist in **Abb.17B** zu sehen. In den Negativkontrollen ist jeweils keine Bande nachweisbar. Weiterhin ist jeweils nur eine singuläre Bande der Positivkontrollen zu sehen. Dies lässt den Schluss zu, dass kein unspezifischer DNA-Abschnitt repliziert wird, was ebenfalls für eine Spezifität der Primer spricht. Schlussendlich kann aufgrund dieser durchgeführten Versuche von einer ausreichenden Spezifität der Primer für Exon5N bzw. Exon5A ausgegangen werden. Dies trifft für *SCN2A* wie auch für *SCN8A* zu.

### 3.11 Zusammenfassung

Die bioinformatische Untersuchung der mRNAs der spannungsabhängigen Natriumkanäle legt mit einer hohen Wahrscheinlichkeit eine Interaktion von Pum2 mit bestimmten, definierten Sequenzmotiven der entsprechenden Ziel-mRNAs zu. In den nachfolgenden Experimenten konnte eine veränderte Genexpression von *SCN1A*, *SCN2A* und *SCN8A* in *Pum2<sup>GT</sup>* Mäusen beobachtet werden. Insbesondere in 21 Tage alten Mäusen waren die Level von *SCN1A* und *SCN8A* signifikant erhöht. Für *SCN2A* ergab sich in juvenilen Tieren eine verringerte Genexpression. Dahingegen konnte auf Proteinebene in adulten Tieren eine veränderte Proteinexpression von *Nav1.1*, *Nav1.2* und *Nav1.6* im Hippocampus beobachtet werden. Insbesondere konnte für *Nav1.6* in 5

Monate alten Tieren eine deutlich verringerte Expression im Bereich der Dendriten der Region CA1 gefunden werden. Verringerte Proteinlevel von Nav1.6 im Gesamtgehirn deuten bereits auf eine mögliche Regulation der Translation durch Pum2 hin. In *SCN2A* und *SCN8A* liegt in adulten Mäusen ein erhöhtes Vorkommen der Exon 5N Splicevariante vor, wohingegen für *SCN8A* in 21 Tage alten Tieren ein erhöhtes Vorkommen der Exon 5A Splicevariante beobachtet werden konnte, welche eher exzitatorische Eigenschaften aufweist. Diese Ergebnisse deuten auf eine Interaktion von Pum2 mit den jeweiligen Kanälen hin. Unklar bleibt jedoch bisher, ob ein Fehlen von Pum2 über eine veränderte Expression von spannungsabhängigen Natriumkanälen einen epileptischen Phänotyp auslösen kann oder ob die beobachteten Effekte eher kompensatorische Mechanismen auf eine gesteigerte neuronale Erregbarkeit darstellen.

## 4. Diskussion

Eine Epilepsie ist durch das Auftreten spontaner epileptischer Anfälle gekennzeichnet. Diesen liegen häufig eine gesteigerte neuronale Erregbarkeit zugrunde. In diesem Zusammenhang wurden bisher eine Reihe von möglichen genetischen Risikofaktoren bestimmt (McNamara, Huang, and Leonard 2006), zu denen u.a. auch die spannungsabhängigen Natriumkanäle *SCN1A* (Nav1.1), *SCN2A* (Nav1.2) und *SCN8A* (Nav1.6) zählen. In adulten Versuchstieren mit einer nahezu fehlenden Expression des RNA-Bindeproteins Pum2 treten epileptische Anfälle auf. In dieser Arbeit wurde daher die altersabhängige Expression der oben genannten Natriumkanäle in Pum2-defizienten Mäusen untersucht. Wie in den Resultaten beschrieben, gelang es mir, eine veränderte Genexpression der spannungsabhängigen Natriumkanäle *SCN1A*, *SCN2A* und *SCN8A* in juvenilen, Pum2 defizienten Mäusen nachzuweisen. In heranwachsenden, adoleszenten Tieren beginnen Anfälle aufzutreten, zu dieser Zeit ist eine veränderte Proteinexpression dieser spannungsabhängigen Natriumkanäle Nav1.1, Nav1.2 und Nav1.6 im Hippocampus Pum2-defizienter Mäuse zu beobachten. Weiterhin wurde das Vorkommen alternativer, exzitatorischer Splicevarianten des Exon 5 in den *SCN2A* und *SCN8A* mRNA nachgewiesen. Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse lassen somit einen Einfluss von Pum2 auf die Expressionslevel der oben genannten genetischen Faktoren vermuten, welche in einer gesteigerten neuronalen Erregbarkeit münden und somit das Auftreten epileptischer Anfälle begünstigen. Elektrophysiologische Daten unterlegen diese Vermutung. So ergab sich eine verminderte „Paired-Pulse Inhibition“ im Signalweg der Schaffer Kollateralen des Hippocampus (Follwaczny et al. 2017) sowie anfallstypische Muster und eine verminderte Anfallsschwelle in EEG Untersuchungen Pum2-defizienter Mäuse. Diese Befunde legen daher eine Rolle von Pum2 in der Epileptogenese nahe.

### 4.1 Die Rolle von Pum2 in der Epileptogenese

Möglicherweise kann das Fehlen von Pum2 im Rahmen der Epileptogenese zu dem Entstehen von epileptischen Anfällen führen. Es ist daher naheliegend, dass sich bereits während der neuronalen Entwicklung eine veränderte Genexpression ergibt, welche dann in fortgeschrittenem Alter zum Auftreten epileptischer Anfälle führt. Durch

das Fehlen von Pum2 direkt oder alternativ durch eine veränderte neuronale Erregbarkeit indirekt beeinflusst könnte somit eine Störung in der Regulation der Neurogenese in jungen Tieren ebenfalls zur Epileptogenese beitragen. Im Hinblick auf eine veränderte Genexpression zeigten sich signifikante Unterschiede: in 21 Tagen alten Mäusen treten veränderte mRNA Level für die Natriumkanäle *SCN1A* ( $\text{Nav}1.1$ ), *SCN2A* ( $\text{Nav}1.2$ ) und *SCN8A* ( $\text{Nav}1.6$ ) auf. Für *SCN1A* und *SCN8A* ergeben sich verminderte, für die *SCN2A* erhöhte mRNA Level. Die altersabhängige Genexpression der *SCN2A* und *SCN8A* mRNAs wurde Mäusen bereits beschrieben. So ist für *SCN2A* bei steigendem Alter eine verringerte Expression bekannt, dagegen für *SC8A* eine im Alter steigende Expression (Liao et al. 2010). Dies verdeutlicht eine in Pum2-defizienten Mäusen veränderte Genexpression im Vergleich zum Wildtyp, welche die neuronale Erregbarkeit in jungen Tieren steigern und schließlich in adulten Tieren zum Auftreten epileptischer Anfälle führen kann. Interessanterweise liegen jedoch in juvenilen Pum2<sup>GT</sup> Tieren kaum signifikante Unterschiede in der Proteinexpression vor. Für Pum2 ist zudem bekannt, dass vor allem auf Proteinebene regulatorische Effekte zu beobachten sind, nicht so sehr jedoch auf mRNA Ebene (Schieweck, Ninkovic, and Kiebler 2021). Es ist jedoch in der Literatur beschrieben, dass Pum2 auch die RNA Stabilität beeinflusst (Mendez and Richter 2001). Dies kann auf direkte Weise, durch das Binden von Pum2 an die entsprechende mRNA, sowie auf indirekte Weise durch die Beeinflussung von anderen RNA-Bindeproteinen wie z.B. Staufen 2 erfolgen (Schieweck, Ninkovic, and Kiebler 2021). Dies legt die Vermutung nahe, dass Pum2, für die von mir beobachteten Veränderungen der *SCN1A*, *SCN2A* und *SCN8A* mRNA Level in juvenilen Tieren verantwortlich ist, nicht jedoch für Änderungen auf Proteinebene. Daher kommt Pum2 wohl hauptsächlich eine regulatorische Funktion auf mRNA Ebene zu.

Auf Proteinebene konnte in 21 Tage alten Tieren eine signifikant verringerte Expression für  $\text{Nav}1.6$  im Gyrus Dentatus des Hippocampus beobachtet werden. Im Zusammenhang mit Epilepsie ergeben sich für den Hippocampus daraus mehrere interessante Aspekte. So wurden im Tiermodell durch ein experimentell ausgelöstes Fehlen inhibitorischer Interneurone epileptische Anfälle ausgelöst (Huusko et al. 2013). Durch die experimentelle Applikation von Kainat (Salz der Kaininsäure), einem Agonisten des Glutamatrezeptors, lassen sich in Versuchstieren epileptische Anfälle auslösen (Ben-Ari 1985; Sperk 1994). In diesem Kainat-Tiermodell tritt nach dem

Auslösen epileptischer Anfälle ein Shift der mRNA spannungsabhängiger Natriumkanäle hin zu den mRNA Typen II und III auf. Diese beinhalten jeweils das Exon 5 A/N, welche durch veränderte Kanaleigenschaften charakterisiert sind, wobei die Splicevariante 5A als exzitatorisch angesehen wird (Bartolomei et al. 1997). Zudem ist bekannt, dass inhibitorische Interneurone im Gyrus Dentatus verstärkt den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor exprimieren (Milenkovic et al. 2013). Pum2 hemmt wiederum die Expression des GABA<sub>A</sub> Rezeptors. Hier könnte ein verringertes Expressionslevel von Nav1.6 im Gyrus Dentatus eine regulatorische Antwort auf eine erhöhte neuronale Erregbarkeit durch fehlende neuronale Inhibition darstellen. Durch alternatives Splicing könnten somit auch die Kanaleigenschaften in Richtung verminderter Exzitation geändert werden. Dies würde einen primären Effekt von Pum2 auf ein anderes Ziel-Protein wie z.B. den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor nahelegen.

Elektrophysiologische Daten in 2-3 Monate alten Pum2-defizienten Mäusen ergeben keine generell gesteigerte neuronale Erregbarkeit. Es konnte aber ein verändertes „Paired-Pulse“ Verhalten beobachtet werden (Follwaczny et al. 2017). Dies spricht für eine verminderte Inhibition auf der Ebene neuronaler Netzwerke. Eine Schlüsselrolle kommt hierbei dem GABAergen System zu. Auch hier kommt es bei Pum2<sup>GT</sup>-defizienten Mäusen zu Veränderungen, wie z.B. zu einer veränderten Expression des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors. Auf mRNA Ebene wurde in Pum2-defizienten Mäusen erhöhte Level des GABA<sub>A</sub> Rezeptors festgestellt (Follwaczny et al. 2017). Bisher geht man jedoch davon aus, dass Pum2 ein Repressor der Expression des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors ist (Schieweck et al. 2021). Somit könnten, durch das Fehlen von Pum2 bedingte, höhere mRNA Level des GABA<sub>A</sub> Rezeptors in inhibitorischen Interneuronen eine gesteigerte Erregung anderer Neurone wie z.B. Pyramidenzellen bedeuten. Diese würden dann wiederum durch eine Verringerung der Expression von Ionenkanälen eine bestehende neuronale Übererregbarkeit zu kompensieren versuchen.

Zusammengefasst ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig klar, ob eine veränderte mRNA Expression von spannungsabhängigen Natriumkanälen in 21 Tage alten Mäusen eine kompensatorische Antwort auf eine veränderte neuronale Erregbarkeit darstellt oder ob sie direkt auf das Fehlen von Pum2 zurückzuführen ist. Da ein direkter Einfluss von Pum2 auf spannungsabhängige Natriumkanäle bisher gut belegt ist (Driscoll et al. 2013; W.-H. Lin et al. 2017), wäre es denkbar, dass diese beobachteten Veränderungen bereits einen Phänotyp in juvenilen Tieren darstellen. In

21 Tagen alten Tieren treten gewöhnlich jedoch noch keine Anfälle auf. Dies hat möglicherweise verschiedene Gründe: (i) Die Veränderungen der Genexpression sind nicht robust genug, sodass noch keine epileptischen Anfälle auftreten; (ii) Eine weitere Überlegung ist, dass bereits eine Regulation der neuronalen Erregbarkeit stattfindet, indem andere spannungsabhängige Natriumkanäle in ihren Level sinken. So konnten zwar hohe *SCN2A* mRNA Level, bei jedoch niedrigen *SCN1A* und *SCN8A* Levels beobachtet werden; und (iii) Ein oder mehrere, bisher nicht untersuchte Targets werden ebenfalls in ihrer Expression beeinträchtigt, wodurch sich wiederum eine Kompensation einer gesteigerten Exzitation ergibt.

## 4.2 Auswirkung einer *Pum2* defizienz auf die Expression von spannungsgesteuerten Natriumkanälen

In 5 Monate alten Mäusen treten im Vergleich zu 21 Tage alten Tieren keine signifikant veränderten mRNA Expressionslevel auf. In den Immunfluoreszenzfärbungen dagegen ergaben sich veränderte Proteinexpression für *Nav1.1*, *Nav1.2* und *Nav1.6* im Hippocampus. Dies spricht für eine mögliche Rolle von *Pum2* als Translationsregulator der entsprechenden mRNA, welche anderweitig bereits beschrieben wurde (Schieweck, Ninkovic, and Kiebler 2021). Kritisch muss hier jedoch erwähnt werden, dass die Analyse der mRNA Level im Gesamtgehirn erfolgte. Die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte jedoch im isoliert betrachteten Hippocampus. Dies lässt eine direkte Verknüpfung von beobachteten Veränderungen auf mRNA Ebene mit den Veränderungen auf Proteinebene also noch nicht zu. So könnte eine stark erhöhte Genexpression entsprechender Gene in anderen Gehirnregionen eine verringerte Genexpression im Hippocampus überdecken. Dies stellt somit eine klare Limitation der bisherigen Experimente dar. Dennoch kann aus meiner Sicht bereits ein erster Vergleich zwischen den erhaltenen Ergebnissen gezogen werden.

Interessanterweise ergibt sich für *Nav1.6* (*SCN8A*) keine signifikant veränderten mRNA Level in 5 Monate alten Tieren. Meine Daten zeigen jedoch eine überwiegend schwächere *Nav1.6* Proteinexpression im Hippocampus und im Gesamtgehirn. Die bisherige Annahme ist, dass *Pum2* die Expression von *Nav1.6* hemmt und somit auch die Ausbildung von Aktionspotentialen einschränkt (Lin et al. 2017). Dies könnte somit

eine regulatorische Antwort auf die gesteigerte neuronale Erregbarkeit darstellen, welche möglicherweise durch eine verstärkte Expression von Nav1.1 oder Nav1.2 hervorgerufen wird. So könnte ein erhöhtes Vorkommen von Nav1.2 im Axon-Initialsegment eine verstärkte Bildung von Aktionspotentialen und somit mehr Aktivität an der Präsynapse bedeuten. Ein kompensatorischer Mechanismus würde dann die Verringerung der Expression von Nav1.6 an den Dendriten darstellen, um die Aktivität der Postsynapse einzuschränken.

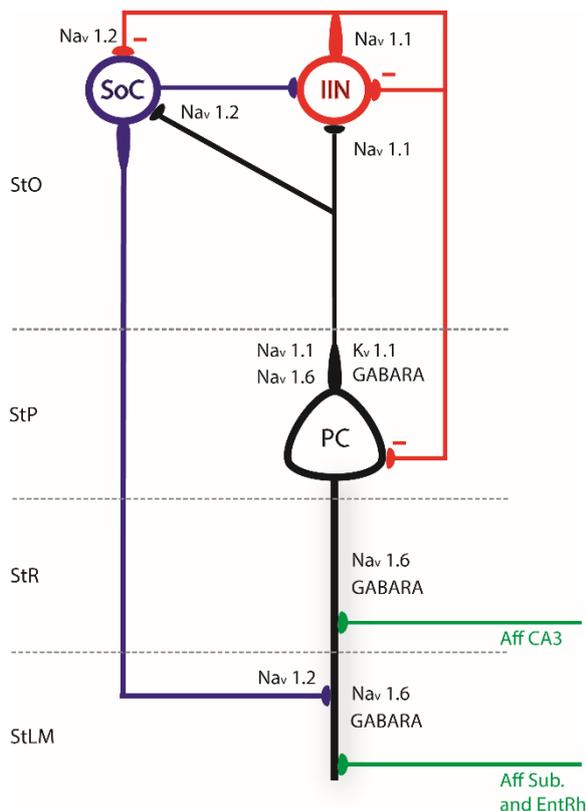
Das vermehrte Vorkommen der Exon 5N Splicevarianten in Nav1.2 und Nav1.6, welche in Verbindung mit einer Anfallsprotektion stehen, könnte somit ebenfalls eine kompensatorische Antwort auf eine gesteigerte neuronale Erregung innerhalb eines neuronalen Netzwerks sein. Dahingegen tritt in schweren Epilepsieformen für Nav1.2 ein vermehrtes Vorkommen der exzitatorischen Splicevariante mit dem Exon5A auf (Liao et al. 2010). Inwiefern Pum2 einen direkten Einfluss auf das Splicing der *SCN1A* und *SCN8A* mRNAs nimmt, gilt es jedoch erst im Detail zu untersuchen.

Somit bleibt weiterhin die Frage offen, wie sich konkret Veränderungen in der Expression spannungsabhängiger Natriumkanäle auf die Funktion bestehender neuronaler Netzwerke auswirken. Ein wichtiger Aspekt ist hier die gesteigerte Expression von Nav1.1. Eine globale Funktionsstörung dieses Kanals kann zu schweren Epilepsieformen wie dem Dravet-Syndrom führen (Catterall, Kalume, and Oakley 2010). In Bezug auf neuronale Netzwerke kommt diesem Kanal vor allem eine Rolle in inhibitorischen Interneuronen des GABAergen Systems zu (Catterall, Kalume, and Oakley 2010). Aufgrund der oben genannten Effekte von Pum2 auf den GABA<sub>A</sub> Rezeptor liegt ein Zusammenhang mit der Ausbildung eines epileptischen Phänotyps und den durch Pum2 vermittelten Veränderungen an der Expression von Nav1.1 und dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor nahe.

### 4.3 Die Rolle von Pum2 in inhibitorischen Interneuronen

Wie eingangs erwähnt, ergibt sich durch inhibitorische Interneurone eine Vielzahl von Möglichkeiten der zellulären Kommunikation. **Abb. 18** zeigt eine vereinfachte, schematische Abbildung der möglichen Verschaltung eines Interneurons der CA Region. Die anatomische Schichtung der CA Region ist links dargestellt. Das

Interneuron (rot) kann in der abgebildeten Konstellation eine Vorwärtshemmung durch Hemmung der SoC (blau) und eine Rückwärtshemmung durch Hemmung der PC (schwarz) betreiben. In grün dargestellt sich eingehende Afferenzen aus anderen Regionen. Zudem sind die spannungsabhängigen Natriumkanäle und der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor mit der entsprechenden Lokalisation innerhalb der Zelle abgebildet.



**Abb. 18:** zeigt die schematische, stark vereinfachte Verschaltung von Neuronen im Stratum pyramidale auf zellulärer Ebene. Somit bekommen die inhibitorischen Interneurone über die Pyramidenzellen Input aus der CA3 Region, dem Subiculum und dem entorhinalen Cortex. Es erfolgt dann eine Rückkopplung auf die Pyramidenzellen, sowie ein Feedback zum Stratum oriens. In dieser Konstellation ist dem inhibitorischen Interneuron eine Vorwärts- und eine Rückwärtshemmung zur Modulation des „Schaltkreises“ möglich. Nav<sub>v</sub>1.6 ist hier v.a. an den Dendriten der PC lokalisiert, während Nav<sub>v</sub>1.1 und Nav<sub>v</sub>1.2 v.a. axonal lokalisiert sind. PC= Pyramidenzelle, SoC=Stratum oriens Zelle, IIN= inhibitorisches Interneuron, Aff =Afferenz.

Pum2 ist ein Repressor des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors im inhibitorischen System (Schieweck et al. 2021). Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor wird unter anderem in Parvalbumin positiven Interneuronen im Hippocampus exprimiert. Gleichzeitig stellt GABA auch den überwiegend vorkommenden Transmitter in diesen Interneuronen dar (Milenkovic et al. 2013).

In Pum2-defizienten Mäusen ist die Expression von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in der CA1 Region im Hippocampus erhöht (Follwaczny et al. 2017). Gleichzeitig tritt eine gesteigerte Expression von Nav<sub>v</sub>1.1 in der CA1 Region und im Gyrus Dentatus auf. In Bezug auf die dort lokalisierten Interneurone ist ein interessanter Aspekt da, wie eingangs bereits beschrieben, elektrophysiologischen Daten ein verändertes „Paired

Pulse“ Verhalten zeigen, was eine eingeschränkte Funktion inhibitorischer Interneurone nahelegt (Follwaczny et al. 2017).

Weiterführende, elektrophysiologische Untersuchungen in Zellkultur ergaben eindeutige Ergebnisse, dass Pum2 die Amplitude postsynaptischer Ströme des GABAergen Systems in Neuronen vermindert (Schieweck et al. 2021). Daraus abgeleitet könnte dies für einer verminderten Erregbarkeit inhibitorischer Interneurone sprechen, da eine Stimulation des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors eine nachgeschaltete Inhibition des Interneurons bedeutet, was wiederum für eine verminderte Inhibition nachgeschalteter neuronaler Netzwerke, z.B. in der CA1 Region, sprechen könnte (**Abb. 18**). Eine Steigerung der Nav1.1 Expression in inhibitorischen Interneuronen könnte somit einen Versuch der Kompensation des schwachen, eingehenden postsynaptischen Signals darstellen, um dadurch eine Fortleitung eintreffender Signale zu gewährleisten. Wie in Abb. 19 zu erkennen, könnte dadurch die Vorwärtshemmung der nachgeschalteten SoC und Rückwärtshemmung der PC weiterhin gewährleistet werden und somit die korrekte Funktion eines inhibitorischen Interneurons aufrecht erhalten werden. Dahingegen konnte in einem Mausmodell durch experimentelle Mutation von Nav1.1 in inhibitorischen Interneuronen und somit resultierender kompletter bzw. teilweiser Inaktivierung eine schwere Form der Epilepsie ausgelöst werden (Yu et al. 2006). Eine Steigerung der Nav1.6 Expression an der Postsynapse (Peripherie) und im Zellsoma (Zellschicht) wie es meine Ergebnisse für die CA3 Region zeigen, könnte parallel dazu ebenfalls ein Kompensationsversuch darstellen. So würden die schwach eintreffenden Signale der inhibitorischen Interneurone dadurch stärker propagiert.

Somit könnte Pum2 eine duale Funktion ausüben, als Repressor der neuronalen Erregbarkeit über eine Regulation des inhibitorischen (GABAergen) Systems und gleichzeitig auch durch Förderung der neuronalen Erregbarkeit über die Regulation der Expression spannungsabhängiger Natriumkanäle.

Schlussendlich gelang mir in dieser Arbeit der experimentelle Nachweis multipler Veränderungen der Proteinexpression spannungsabhängiger Natriumkanäle in Pum2-defizienten Mäusen. Dies könnte entweder eine veränderte und somit unphysiologische Erregbarkeit der betroffenen Zellen bedingen, oder aber die gefunden Veränderungen stellen Kompensationsmechanismen auf eine bereits

bestehende, anderweitig ausgelöste, zelluläre Erregbarkeit dar. Auf der Ebene eines einzelnen Neurons wären die Auswirkungen einer Pum2 Defizienz auf die neuronale Erregbarkeit somit recht überschaubar. In einem größeren Verbund von Neuronen stellt sich die Situation jedoch deutlich schwieriger dar.

Aufgrund der Komplexität neuronaler Netzwerke lässt sich die Bedeutung von Pum2 auf Netzwerkebene noch nicht abschließend klären. Da auf zellulärer Ebene jedoch bereits belegt werden konnte, dass Pum2 die neuronale Erregbarkeit durch die Regulation der Expression spannungsabhängiger Natriumkanäle (Driscoll et al. 2013) beeinflusst, liegt der Schluss nahe, dass ein Fehlen von Pum2 sich auf die Funktion eines solchen Zellverbundes auswirkt und somit zur Entstehung epileptischer Anfälle beiträgt oder diese gar auslösen kann.

## 5. Zusammenfassung:

Epilepsie ist eine häufig auftretende neurologische Erkrankung. Mit der Zeit konnten, neben Mutationen an Ionenkanälen, einige weitere Ursachen für das Entstehen genetisch bedingter Epilepsieformen identifiziert werden. Hier geraten auch RNA-Bindeproteine wie Pum2 in den Fokus. Im Tierversuch konnte das Auftreten epileptischer Anfälle, bei einem Mangel von Pum2 bereits beobachtet werden. Bisher ist jedoch unklar, inwiefern das Fehlen von Pum2 für die Ausprägung eines epileptischen Phänotyps verantwortlich ist. Das Ziel dieser Arbeit war es daher die Expression spannungsanhängiger Natriumkanäle, bei einem Fehlen von Pum2, zu untersuchen, um so einen Beitrag zur Beschreibung des epileptischen Phänotyps Pum2 defizienter Mäuse zu leisten. Zu diesem Zweck wurde die Expression der Natriumkanäle  $Nav1.1$ ,  $Nav1.2$  und  $Nav1.6$  und ihrer mRNA *SCN1A*, *SCN2A* und *SCN8A*, sowie das Vorliegen möglicher Splicevarianten untersucht. Hierbei fokussierte ich mich auf den Hippocampus, da ihm ein hohes epileptogenes Potential zugeschrieben wird. In dieser Arbeit konnten veränderte mRNA Level in juvenilen Tieren sowie ein verstärktes Auftreten der Splicevariante Exon 5N in der mRNA *SCN2A* und *SCN8A* nachgewiesen werden. Zudem ergab sich eine veränderte Proteinexpression im Hippocampus adulter, Pum2 defizienter Mäuse, welche die Entstehung epileptischer Anfälle begünstigen oder diese sogar auslösen könnte. Somit wäre Pum2 ein wesentliches Target im Hinblick auf die Genese genetischer Epilepsieformen.

## 6. Anhang:

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis:

3'-UTR	3'-Untranslatierte Region
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionsäure
BACE1	Beta secretase 1
BSA	Bovines Serum Albumin
CA	Cornu Ammonis
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin Kinase II alpha
cDNA	Complimentäre DNA
CPEB	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein
E5A	Exon 5 Adult
E5N	Exon 5 Neonatal
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GD	Gyrus Dentatus
IIN	Inhibitorisches Interneuron
MBD2	Methyl-CpG-binding domain protein 2
mRNA	Messenger RNA
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
p0, p21	Postnataler Tag 0, 21
PC	Pyramidalzelle
PFA	Paraformaldehyd
PUF	Pumilio and FBF
Pum1	Pumilio 1
Pum2	Pumilio 2
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
RBP	RNA Binding Protein
Stau2	Staufen 2
SoC	Stratum Oriens Zelle
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

### 6.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis:

Tabelle 1: Geräte RNA Analyse

Tabelle 2: Chemikalien RNA Analyse

Tabelle 3: Chemikalien cDNA Synthese

Tabelle 4: Geräte RT-qPCR

Tabelle 5: Chemikalien RT-qPCR

Tabelle 6: Primersequenzen

Tabelle 7: Chemikalien WB

Tabelle 8: Geräte Immunfluoreszenz

Tabelle 9: Chemikalien Immunfluoreszenz

Tabelle 10: Antikörper Immunfluoreszenz

Tabelle 11: Primertest *SCN2A*

Tabelle 12: Primertest *SCN8A*

Abbildung 1: Aktionspotential

Abbildung 2: Modularer Aufbau spannungs-gesteuerter Natriumkanäle

Abbildung 3: Maskenerstellung

Abbildung 4: Generalisiert-tonisch-klonische Anfälle bei *Pum2<sup>GT</sup>* Mäusen und *Pum2* Expression im Hippocampus

Abbildung 5: *Pum2* Bindestellenanalyse in der *SCN1A*, *SCN2A* and *SCN8A* 3'UTR mRNA.

Abbildung 6: Signifikant erhöhte *SCN1A* mRNA Level in 21 Tage alten *Pum2<sup>GT</sup>* Mäusen

Abbildung 7: Veränderte *Nav1.1* Expression im Hippocampus

Abbildung 8: Signifikant geringere *SCN2A* mRNA Level in 21 Tage alten *Pum2<sup>GT</sup>* Mäusen

Abbildung 9: Veränderte *Nav 1.2* Expression im Hippocampus

Abbildung 10: Signifikant erhöhte *SCN8A* mRNA Level in 21 Tage alten *Pum2<sup>GT</sup>* Mäusen

Abbildung 11: Veränderte *Nav1.6* Expression im Hippocampus

Abbildung 12: *Nav 1.6* Expression im Gesamthirn

Abbildung 13: Generelle Überlegungen zum Signal-Rausch Verhältnis bei Immunfluoreszenzexperimenten

Abbildung 14: Erhöhtes Vorkommen der Neonatalen *SCN2A Exon 5* Splicevariante in adulten Mäusen

Abbildung 15: Erhöhtes Vorkommen der Neonatalen *SCN8A Exon 5* Splicevariante in adulten Mäusen

Abbildung 16: Primerspezifitätstest der Exons 5A/5N der *SCN2A* und *SCN8A* mRNA

Abbildung 17: Spezifitätstest neuer Primer

Abbildung 18: Schematische Verschaltung Stratum Pyramidale

## 7. Literatur

- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2014. "Molecular Biology of The Cell. New York: Garland Science." Taylor and Francis Group.
- Andreassi, Catia, and Antonella Riccio. 2009. "To Localize or Not to Localize: mRNA Fate Is in 3'UTR Ends." *Trends in Cell Biology* 19 (9): 465–74. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.06.001>.
- Bartolomei, F., M. Gastaldi, A. Massacrier, R. Planells, S. Nicolas, and P. Cau. 1997. "Changes in the MRNAs Encoding Subtypes I, II and III Sodium Channel Alpha Subunits Following Kainate-Induced Seizures in Rat Brain." *Journal of Neurocytology* 26 (10): 667–78. <https://doi.org/10.1023/A:1018549928277>.
- Behrends, Jan C, Josef Bischofberger, Rainer Deutzmann, Heimo Ehmke, Stephan Frings, Stephan Grissmer, Markus Hoth, Armin Kurtz, Jens Leipziger, and Frank Müller. 2017. *Physiologie*. Thieme.
- Ben-Ari, Y. 1985. "Limbic Seizure and Brain Damage Produced by Kainic Acid: Mechanisms and Relevance to Human Temporal Lobe Epilepsy." *Neuroscience* 14 (2): 375–403. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0306-4522\(85\)90299-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0306-4522(85)90299-4).
- Blanchard, Maxime G, Marjolein H Willemsen, Jaclyn B Walker, Sulayman D Dib-Hajj, Stephen G Waxman, Marjolijn C J Jongmans, Tjitske Kleefstra, et al. 2015. "De Novo Gain-of-Function and Loss-of-Function Mutations of SCN8A in Patients with Intellectual Disabilities and Epilepsy." *Journal of Medical Genetics* 52 (5): 330–37. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102813>.
- Boutz, Paul L., Peter Stoilov, Qin Li, Chia Ho Lin, Geetanjali Chawla, Kristin Ostrow, Lily Shiue, Manuel Ares, and Douglas L. Black. 2007. "A Post-Transcriptional Regulatory Switch in Polypyrimidine Tract-Binding Proteins Reprograms Alternative Splicing in Developing Neurons." *Genes and Development* 21 (13): 1636–52. <https://doi.org/10.1101/gad.1558107>.
- Bragin, A, G Jando, Z Nadasdy, M van Landeghem, and G Buzsaki. 1995. "Dentate EEG Spikes and Associated Interneuronal Population Bursts in the Hippocampal Hilar Region of the Rat." *Journal of Neurophysiology* 73 (4): 1691–1705. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.73.4.1691>.
- Bramham, Clive R, and David G Wells. 2007. "Dendritic mRNA: Transport, Translation and Function." *Nature Reviews. Neuroscience* 8 (10): 776–89. <https://doi.org/10.1038/nrn2150>.
- Buckmaster, Paul S, and Ana L Jongen-Rêlo. 1999. "Highly Specific Neuron Loss Preserves Lateral Inhibitory Circuits in the Dentate Gyrus of Kainate-Induced Epileptic Rats." *The Journal of Neuroscience* 19 (21): 9519 – 9529. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-21-09519.1999>.
- Bureau, Ingrid, Gordon M G Shepherd, and Karel Svoboda. 2008. "Circuit and Plasticity Defects in the Developing Somatosensory Cortex of *Fmr1* Knock-Out Mice." *The Journal of Neuroscience* 28 (20): 5178 – 5188. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1076-08.2008>.
- Carreira-Rosario, Arnaldo, Varsha Bhargava, Jens Hillebrand, Rahul K. Kollipara, Mani Ramaswami, and Michael Buszczak. 2016. "Repression of Pumilio Protein Expression by Rbfox1 Promotes Germ Cell Differentiation." *Developmental Cell* 36 (5): 562–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.010>.
- Catterall. 1992. "Cellular and Molecular Biology of Voltage-Gated Sodium Channels." *Physiological Reviews* 72 (4 Suppl): S15-48.
- Catterall, Franck Kalume, and John C Oakley. 2010. "NaV1.1 Channels and Epilepsy." *The Journal of Physiology* 588 (Pt 11): 1849–59. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187484>.
- Catterall, Lenaeus, and Gamal El-Din. 2020. "Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 60: 133–54. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021757>.
- Chapman, C Andrew, and Jean-Claude Lacaille. 1999. "Intrinsic Theta-Frequency Membrane Potential Oscillations in Hippocampal CA1 Interneurons of Stratum Lacunosum-Moleculare." *Journal of Neurophysiology* 81 (3): 1296–1307. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.3.1296>.

- Chrobak, J J, and G Buzsaki. 1994. "Selective Activation of Deep Layer (V-VI) Retrohippocampal Cortical Neurons during Hippocampal Sharp Waves in the Behaving Rat." *The Journal of Neuroscience* 14 (10): 6160 – 6170. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-10-06160.1994>.
- Collart, Martine A. 2016. "The Ccr4-Not Complex Is a Key Regulator of Eukaryotic Gene Expression." *WIREs RNA* 7 (4): 438–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wrna.1332>.
- Doyle, Michael, and Michael A Kiebler. 2011. "Focus Review Mechanisms of Dendritic mRNA Transport and Its Role in Synaptic Tagging." *The EMBO Journal* 30 (17): 3540–52. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.278>.
- Driscoll, Heather E, Nara I Muraro, Miaomiao He, and Richard A Baines. 2013. "Pumilio-2 Regulates Translation of Nav1.6 to Mediate Homeostasis of Membrane Excitability." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (23): 9644–54. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0921-13.2013>.
- Dudek, F Edward, and Thomas P Sutula. 2007. "Epileptogenesis in the Dentate Gyrus: A Critical Perspective." In *The Dentate Gyrus: A Comprehensive Guide to Structure, Function, and Clinical Implications*, edited by Helen E B T - Progress in Brain Research Scharfman, 163:755–73. Elsevier. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63041-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63041-6).
- Etten, Jamie Van, Trista L Schagat, Joel Hrit, Chase A Weidmann, Justin Brumbaugh, Joshua J Coon, and Aaron C Goldstrohm. 2012. "Human Pumilio Proteins Recruit Multiple Deadenylases to Efficiently Repress Messenger RNAs \*." *Journal of Biological Chemistry* 287 (43): 36370–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373522>.
- Follwaczny, P., R. Schieweck, T. Riedemann, A. Demleitner, T. Straub, A.H. Klemm, M. Bilban, B. Sutor, B. Popper, and M.A. Kiebler. 2017. "Pumilio2-Deficient Mice Show a Predisposition for Epilepsy." *DMM Disease Models and Mechanisms* 10 (11): 1333-1342. <https://doi.org/10.1242/dmm.029678>.
- Frangaj, Aurel, and Qing R Fan. 2018. "Structural Biology of GABAB Receptor." *Neuropharmacology* 136: 68–79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.011>.
- Friend, Kyle, Zachary T Campbell, Amy Cooke, Peggy Kroll-Conner, Marvin P Wickens, and Judith Kimble. 2012. "A Conserved PUF–Ago–EEF1A Complex Attenuates Translation Elongation." *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (2): 176–83. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2214>.
- Fritzsche, Renate, Daniela Karra, Keiryn L. Bennett, Foong yee Ang, Jacki E. Heraud-Farlow, Marco Tolino, Michael Doyle, et al. 2013. "Interactome of Two Diverse RNA Granules Links mRNA Localization to Translational Repression in Neurons." *Cell Reports* 5 (6): 1749–62. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.023>.
- Gamberi, Chiara, David S Peterson, Luming He, and Ellen Gottlieb. 2002. "An Anterior Function for the Drosophila Posterior Determinant Pumilio." *Development* 129 (11): 2699–2710. <https://doi.org/10.1242/dev.129.11.2699>.
- Gazina, Bryan T.W. Leaw, Kay L. Richards, Verena C. Wimmer, Tae H. Kim, Timothy D. Aumann, Travis J. Featherby, et al. 2015. "'Neonatal' Nav1.2 Reduces Neuronal Excitability and Affects Seizure Susceptibility and Behaviour." *Human Molecular Genetics* 24 (5): 1457–68. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu562>.
- Gazina, K L Richards, M B C Mokhtar, E a Thomas, C a Reid, and S Petrou. 2010. "Differential Expression of Exon 5 Splice Variants of Sodium Channel Alpha Subunit MRNAs in the Developing Mouse Brain." *Neuroscience* 166 (1): 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.011>.
- Goetze, Bernhard, Fabian Tuebing, Yunli Xie, Mario M Dorostkar, Sabine Thomas, Ulrich Pehl, Stefan Boehm, Paolo Macchi, and Michael A Kiebler. 2006. "The Brain-Specific Double-Stranded RNA-Binding Protein Stauf2 Is Required for Dendritic Spine Morphogenesis ." *Journal of Cell Biology* 172 (2): 221–31. <https://doi.org/10.1083/jcb.200509035>.
- Goldstrohm, Aaron C, Brad A Hook, Daniel J Seay, and Marvin Wickens. 2006. "PUF Proteins Bind Pop2p to Regulate Messenger RNAs." *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (6): 533–39. <https://doi.org/10.1038/nsmb1100>.

- Hafner, Markus, Markus Landthaler, Lukas Burger, Mohsen Khorshid, Jean Hausser, Philipp Berninger, Andrea Rothballer, et al. 2010. "Transcriptome-Wide Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP." *Cell* 141 (1): 129–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.009>.
- Hargus, Nicholas J, Aradhya Nigam, Edward H Bertram, and Manoj K Patel. 2013. "Evidence for a Role of Nav1.6 in Facilitating Increases in Neuronal Hyperexcitability during Epileptogenesis." *Journal of Neurophysiology* 110 (5): 1144–57. <https://doi.org/10.1152/jn.00383.2013>.
- Hengst, Ulrich, Llewellyn J. Cox, Evan Z. Macosko, and Samie R. Jaffrey. 2006. "Functional and Selective RNA Interference in Developing Axons and Growth Cones." *Journal of Neuroscience* 26 (21): 5727–32. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5229-05.2006>.
- Heo, Inha, and V Narry Kim. 2009. "Regulating the Regulators: Posttranslational Modifications of RNA Silencing Factors." *Cell* 139 (1): 28–31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.013>.
- Heraud-Farlow, Jacki E, and Michael A Kiebler. 2014. "The Multifunctional Staufen Proteins: Conserved Roles from Neurogenesis to Synaptic Plasticity." *Trends in Neurosciences* 37 (9): 470–79. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.05.009>.
- Hosford, B. E., J. P. Liska, and S. C. Danzer. 2016. "Ablation of Newly Generated Hippocampal Granule Cells Has Disease-Modifying Effects in Epilepsy." *Journal of Neuroscience* 36 (43): 11013–23. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1371-16.2016>.
- Houser, Carolyn R, and Monique Esclapez. 1996. "Vulnerability and Plasticity of the GABA System in the Pilocarpine Model of Spontaneous Recurrent Seizures." *Epilepsy Research* 26 (1): 207–18. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(96\)00054-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0920-1211(96)00054-X).
- Huang, Cindy Shen, Song-Hai Shi, Jernej Ule, Matteo Ruggiu, Laura A Barker, Robert B Darnell, Yuh Nung Jan, and Lily Yeh Jan. 2005. "Common Molecular Pathways Mediate Long-Term Potentiation of Synaptic Excitation and Slow Synaptic Inhibition." *Cell* 123 (1): 105–18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.033>.
- Hüttelmaier, Stefan, Daniel Zenklusen, Marcell Lederer, Jason Dichtenberg, Mike Lorenz, XiuHua Meng, Gary J Bassell, John Condeelis, and Robert H Singer. 2005. "Spatial Regulation of  $\beta$ -Actin Translation by Src-Dependent Phosphorylation of ZBP1." *Nature* 438 (7067): 512–15. <https://doi.org/10.1038/nature04115>.
- Huusko, Noora, Christine Römer, Xavier Ekolle Nnode-Ekane, Katarzyna Lukasiuk, and Asla Pitkänen. 2013. "Loss of Hippocampal Interneurons and Epileptogenesis: A Comparison of Two Animal Models of Acquired Epilepsy." *Brain Structure and Function* 220 (1): 153–91. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0644-1>.
- Jenkins, Huw T., Rosanna Baker-Wilding, and Thomas A. Edwards. 2009. "Structure and RNA Binding of the Mouse Pumilio-2 Puf Domain." *Journal of Structural Biology* 167 (3): 271–76. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.06.007>.
- Jung, Hosung, Christos G. Gkogkas, Nahum Sonenberg, and Christine E. Holt. 2014. "Remote Control of Gene Function by Local Translation." *Cell* 157 (1): 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.005>.
- Kanai, Yoshimitsu, Naoshi Dohmae, and Nobutaka Hirokawa. 2004. "Kinesin Transports RNA: Isolation and Characterization of an RNA-Transporting Granule." *Neuron* 43 (4): 513–25. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.022>.
- Kann, Oliver, Ismini E Papageorgiou, and Andreas Draguhn. 2014. "Highly Energized Inhibitory Interneurons Are a Central Element for Information Processing in Cortical Networks." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 34 (8): 1270–82. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.104>.
- Kearney, Jennifer a, David a Buchner, Georgius De Haan, Maja Adamska, Stephen I Levin, Amy R Furay, Roger L Albin, et al. 2002. "Molecular and Pathological Effects of a Modifier Gene on Deficiency of the Sodium Channel Scn8a (Na(v)1.6)." *Human Molecular Genetics* 11 (22): 2765–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12374766>.
- Kiebler, Michael A, and Gary J Bassell. 2006. "Neuronal RNA Granules: Movers and Makers." *Neuron*

51 (6): 685–90. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.021>.

- Kiebler, Michael A, Indradeo Hemraj, Paul Verkade, Martin Köhrmann, Puri Fortes, Rosa M Marión, Juan Ortín, and Carlos G Dotti. 1999. "The Mammalian Staufén Protein Localizes to the Somatodendritic Domain of Cultured Hippocampal Neurons: Implications for Its Involvement in MRNA Transport." *The Journal of Neuroscience* 19 (1): 288–97. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-01-00288.1999>.
- Krichevsky, Anna M, and Kenneth S Kosik. 2001. "Neuronal RNA Granules: A Link between RNA Localization and Stimulation-Dependent Translation." *Neuron* 32 (4): 683–96. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00508-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00508-6).
- Kurosaki, Tatsuaki, Maximilian W Popp, and Lynne E Maquat. 2019. "Quality and Quantity Control of Gene Expression by Nonsense-Mediated MRNA Decay." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (7): 406–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0126-2>.
- Lal, Dennis, Eva M. Reinthaler, Janine Altmüller, Mohammad R. Toliat, Holger Thiele, Peter Nürnberg, Holger Lerche, et al. 2013. "RBFOX1 and RBFOX3 Mutations in Rolandic Epilepsy." *PLoS ONE* 8 (9): 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073323>.
- Lapointe, Christopher P, Daniel Wilinski, Harriet A J Saunders, and Marvin Wickens. 2015. "Protein-RNA Networks Revealed through Covalent RNA Marks." *Nature Methods* 12 (12): 1163–70. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3651>.
- Lejeune, Fabrice, Yasuhito Ishigaki, Xiaojie Li, and Lynne E Maquat. 2002. "The Exon Junction Complex Is Detected on CBP80-Bound but Not EIF4E-Bound MRNA in Mammalian Cells: Dynamics of MRNP Remodeling." *The EMBO Journal* 21 (13): 3536–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/emboj/cdf345>.
- Letierrier, Anna Brachet, Marie Pierre Fache, and Bénédicte Dargent. 2010a. "Voltage-Gated Sodium Channel Organization in Neurons: Protein Interactions and Trafficking Pathways." *Neuroscience Letters* 486 (2): 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.079>.
- Letierrier, Christophe, Anna Brachet, Marie Pierre Fache, and Bénédicte Dargent. 2010b. "Voltage-Gated Sodium Channel Organization in Neurons: Protein Interactions and Trafficking Pathways." *Neuroscience Letters* 486 (2): 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.079>.
- Liao, Yunxiang, Liesbet Deprez, Snezana Maljevic, Julika Pitsch, Lieve Claes, Dimitrina Hristova, Albena Jordanova, et al. 2010. "Molecular Correlates of Age-Dependent Seizures in an Inherited Neonatal-Infantile Epilepsy." *Brain* 133 (5): 1403–14. <https://doi.org/10.1093/brain/awq057>.
- Lin, and Baines. 2015. "Regulation of Membrane Excitability: A Convergence on Voltage-Gated Sodium Conductance." *Molecular Neurobiology* 51 (1): 57–67. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8674-0>.
- Lin, Carlo N. G. Giachello, Richard A. Baines, and Richard Baines. 2017. "Seizure Control through Manipulation of Pumilio: A Key Component of Neuronal Homeostasis." *Disease Models & Mechanisms* 10 (2): 1–29. <https://doi.org/10.1242/dmm.027045>.
- Lorincz, Andrea, and Zoltan Nusser. 2008. "Cell-Type-Dependent Molecular Composition of the Axon Initial Segment." *Journal of Neuroscience* 28 (53): 14329–40. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4833-08.2008.Cell-Type-Dependent>.
- Martin, Loren A., Seong Seng Tan, and Dan Goldowitz. 2002. "Clonal Architecture of the Mouse Hippocampus." *Journal of Neuroscience* 22 (9): 3520–30. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-09-03520.2002>.
- Martínez, José C., Lisa K. Randolph, Daniel Maxim Iascone, Helena F. Pernice, Franck Polleux, and Ulrich Hengst. 2019. "Pum2 Shapes the Transcriptome in Developing Axons through Retention of Target MRNAs in the Cell Body." *Neuron* 104 (5): 931-946.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.08.035>.
- Mauger, Oriane, and Peter Scheiffele. 2017. "Beyond Proteome Diversity: Alternative Splicing as a Regulator of Neuronal Transcript Dynamics." *Current Opinion in Neurobiology* 45: 162–68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.012>.

- McBain, Chris J, and André Fisahn. 2001. "Interneurons Unbound." *Nature Reviews Neuroscience* 2 (1): 11–23. <https://doi.org/10.1038/35049047>.
- McCaskill, J S. 1990. "The Equilibrium Partition Function and Base Pair Binding Probabilities for RNA Secondary Structure." *Biopolymers* 29 (6–7): 1105–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bip.360290621>.
- McNamara, James O, Yang Zhong Huang, and A Soren Leonard. 2006. "Molecular Signaling Mechanisms Underlying Epileptogenesis." *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2006 (356): re12. <https://doi.org/10.1126/stke.3562006re12>.
- Mee, Christopher J. 2004. "Regulation of Neuronal Excitability through Pumilio-Dependent Control of a Sodium Channel Gene." *Journal of Neuroscience* 24 (40): 8695–8703. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2282-04.2004>.
- Mendez, Raul, and Joel D Richter. 2001. "Translational Control by CPEB: A Means to the End." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (7): 521–29. <https://doi.org/10.1038/35080081>.
- Milenkovic, I., M. Vasiljevic, D. Maurer, H. Höger, T. Klausberger, and W. Sieghart. 2013. "The Parvalbumin-Positive Interneurons in the Mouse Dentate Gyrus Express GABAA Receptor Subunits Alpha1, Beta2, and Delta along Their Extrasynaptic Cell Membrane." *Neuroscience* 254: 80–96. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.019>.
- Miller, Matthew T, Joshua J Higgin, and Traci M Tanaka Hall. 2008. "Basis of Altered RNA-Binding Specificity by PUF Proteins Revealed by Crystal Structures of Yeast Puf4p." *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (4): 397–402. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1390>.
- Müller, Christina, Heinz Beck, Douglas Coulter, and Stefan Remy. 2012. "Inhibitory Control of Linear and Supralinear Dendritic Excitation in CA1 Pyramidal Neurons." *Neuron* 75 (5): 851–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.025>.
- Mulley, J. C., P. Nelson, S. Guerrero, L. Dibbens, X. Iona, J. M. McMahon, L. Harkin, et al. 2006. "A New Molecular Mechanism for Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy: Exonic Deletions in SCN1A." *Neurology* 67 (6): 1094–95. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000237322.04338.2b>.
- Muraro, Nara I, Andrew J Weston, Andre P Gerber, Stefan Luschnig, Kevin G Moffat, and Richard a Baines. 2008. "Pumilio Binds Para mRNA and Requires Nanos and Brat to Regulate Sodium Current in Drosophila Motoneurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (9): 2099–2109. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5092-07.2008>.
- O'Leary, Timothy, and David J.A. Wyllie. 2011. "Neuronal Homeostasis: Time for a Change?" *Journal of Physiology* 589 (20): 4811–26. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.210179>.
- Obenaus, A, M Esclapez, and C R Houser. 1993. "Loss of Glutamate Decarboxylase mRNA-Containing Neurons in the Rat Dentate Gyrus Following Pilocarpine-Induced Seizures." *The Journal of Neuroscience* 13 (10): 4470–4485. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-10-04470.1993>.
- Ogiwara, Ikuo, Hiroyuki Miyamoto, Noriyuki Morita, Nafiseh Atapour, Emi Mazaki, Ikuyo Inoue, Tamaki Takeuchi, et al. 2007. "Nav1.1 Localizes to Axons of Parvalbumin-Positive Inhibitory Interneurons: A Circuit Basis for Epileptic Seizures in Mice Carrying an Scn1a Gene Mutation." *The Journal of Neuroscience* 27 (22): 5903–14. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5270-06.2007>.
- Oliva, Megan, Samuel F. Berkovic, and Steven Petrou. 2012. "Sodium Channels and the Neurobiology of Epilepsy." *Epilepsia* 53 (11): 1849–59. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03631.x>.
- Onwuli, Donatus O., and Pedro Beltran-Alvarez. 2016. "An Update on Transcriptional and Post-Translational Regulation of Brain Voltage-Gated Sodium Channels." *Amino Acids* 48 (3): 641–51. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2122-y>.
- Plummer, Nicholas W., Michael W. McBurney, and Miriam H. Meisler. 1997. "Alternative Splicing of the Sodium Channel SCN8A Predicts a Truncated Two-Domain Protein in Fetal Brain and Non-Neuronal Cells." *Journal of Biological Chemistry* 272 (38): 24008–15. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.24008>.
- Poulopoulos, Alexandros, Alexander J Murphy, Abdulkadir Ozkan, Patrick Davis, John Hatch, Rory

- Kirchner, and Jeffrey D Macklis. 2019. "Subcellular Transcriptomes and Proteomes of Developing Axon Projections in the Cerebral Cortex." *Nature* 565 (7739): 356–60. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0847-y>.
- Raj, Bushra, and Benjamin J. Blencowe. 2015. "Alternative Splicing in the Mammalian Nervous System: Recent Insights into Mechanisms and Functional Roles." *Neuron* 87 (1): 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.004>.
- Riss, J, J Cloyd, J Gates, and S Collins. 2008. "Benzodiazepines in Epilepsy: Pharmacology and Pharmacokinetics." *Acta Neurologica Scandinavica* 118 (2): 69–86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01004.x>.
- Roux, Lisa, and György Buzsáki. 2015. "Tasks for Inhibitory Interneurons in Intact Brain Circuits." *Neuropharmacology* 88 (September): 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.09.011>.
- Sabatini, David M, Roxanne K Barrow, Seth Blackshaw, Patrick E Burnett, Michael M Lai, Michael E Field, Ben A Bahr, Joachim Kirsch, Heinrich Betz, and Solomon H Snyder. 1999. "Interaction of RAFT1 with Gephyrin Required for Rapamycin-Sensitive Signaling." *Science* 284 (5417): 1161–64. <https://doi.org/10.1126/science.284.5417.1161>.
- Schieweck, Rico, Jovica Ninkovic, and Michael A. Kiebler. 2021. "RNA-Binding Proteins Balance Brain Function in Health and Disease." *Physiological Reviews* 101 (3): 1309–70. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2019>.
- Schieweck, Rico, Therese Riedemann, Ignasi Forné, Max Harner, Karl E. Bauer, Daniela Rieger, Foong yee Ang, et al. 2021. "Pumilio2 and Staufen2 Selectively Balance the Synaptic Proteome." *Cell Reports* 35 (12). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109279>.
- Schmittgen, Thomas D, and Kenneth J Livak. 2008. "Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method." *Nature Protocols* 3 (6): 1101–8. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- Shapiro, Bruce A, and Kaizhong Zhang. 1990. "Comparing Multiple RNA Secondary Structures Using Tree Comparisons." *Bioinformatics* 6 (4): 309–18. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/6.4.309>.
- Sharangdhar, Tejaswini, Yoichiro Sugimoto, Jacqueline Heraud-Farlow, Sandra M Fernández-Moya, Janina Ehse, Igor Ruiz de los Mozos, Jernej Ule, and Michael A Kiebler. 2017. "A Retained Intron in the 3'-UTR of Calm3 mRNA Mediates Its Staufen2- and Activity-Dependent Localization to Neuronal Dendrites." *EMBO Reports* 18 (10): 1762–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.15252/embr.201744334>.
- Siemen, H, D Colas, HC Heller, O Brüstle, and Reijo Pera RA (2011). 2011. "Pumilio-2Function in the Mouse Nervous System Henrike." *PLOS ONE* 6(10): E25932. 101 (11): 1435–39. <https://doi.org/10.1371/Citation>.
- Sloviter, Robert S, Colin A Zappone, Brian D Harvey, and Michael Frotscher. 2006. "Kainic Acid-Induced Recurrent Mossy Fiber Innervation of Dentate Gyrus Inhibitory Interneurons: Possible Anatomical Substrate of Granule Cell Hyperinhibition in Chronically Epileptic Rats." *Journal of Comparative Neurology* 494 (6): 944–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cne.20850>.
- Spellman, Rachel, Miriam Llorian, and Christopher W J Smith. 2007. "Crossregulation and Functional Redundancy between the Splicing Regulator PTB and Its Paralogs NPTB and ROD1." *Molecular Cell* 27 (3): 420–34. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.016>.
- Sperk, Günther. 1994. "Kainic Acid Seizures in the Rat." *Progress in Neurobiology* 42 (1): 1–32. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)90019-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)90019-1).
- Staley, Kevin. 2015. "Molecular Mechanisms of Epilepsy." *Nature Neuroscience* 18 (3): 367–72. <https://doi.org/10.1038/nn.3947>.
- Stefani, Giovanni, Claire E Fraser, Jennifer C Darnell, and Robert B Darnell. 2004. "Fragile X Mental Retardation Protein Is Associated with Translating Polyribosomes in Neuronal Cells." *The Journal of Neuroscience* 24 (33): 7272– 7276. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2306-04.2004>.
- Teplan, M. 2012. "FUNDAMENTALS OF EEG MEASUREMENT M." *Measurement Science Review* 2.2 (2002): 1-11 FS-12-04: 59–64.

- Terenzio, Marco, Sandip Koley, Nitzan Samra, Ida Rishal, Qian Zhao, Pabitra K Sahoo, Anatoly Urisman, et al. 2018. "Locally Translated MTOR Controls Axonal Local Translation in Nerve Injury." *Science* 359 (6382): 1416–21. <https://doi.org/10.1126/science.aan1053>.
- Traub, R D, and R Llinás. 1979. "Hippocampal Pyramidal Cells: Significance of Dendritic Ionic Conductances for Neuronal Function and Epileptogenesis." *Journal of Neurophysiology* 42 (2): 476–96. <http://jn.physiology.org/content/jn/42/2/476.full.pdf>.
- Tyagarajan, Shiva K, and Jean-Marc Fritschy. 2014. "Gephyrin: A Master Regulator of Neuronal Function?" *Nature Reviews Neuroscience* 15 (3): 141–56. <https://doi.org/10.1038/nrn3670>.
- Uebachs, Mischa, Christina Albus, Thoralf Opitz, Lori Isom, Isabelle Niespodziany, Christian Wolff, and Heinz Beck. 2012. "Loss of B1 Accessory Na<sup>+</sup> Channel Subunits Causes Failure of Carbamazepine, but Not of Lacosamide, in Blocking High-Frequency Firing via Differential Effects on Persistent Na<sup>+</sup> Currents." *Epilepsia* 53 (11): 1959–67. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03675.x>.
- Ule, Jernej, Giovanni Stefani, Aldo Mele, Matteo Ruggiu, Xuning Wang, Bahar Taneri, Terry Gaasterland, Benjamin J Blencowe, and Robert B Darnell. 2006. "An RNA Map Predicting Nova-Dependent Splicing Regulation." *Nature* 444 (7119): 580–86. <https://doi.org/10.1038/nature05304>.
- Vessey, John P, Lucia Schoderboeck, Ewald Gingl, Ettore Luzi, Julia Riefler, Francesca Di Leva, Daniela Karra, Sabine Thomas, Michael A Kiebler, and Paolo Macchi. 2010. "Mammalian Pumilio 2 Regulates Dendrite Morphogenesis and Synaptic Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (7): 3222–27. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907128107>.
- Vessey, John P, Angelo Vaccani, Yunli Xie, Ralf Dahm, Daniela Karra, Michael A Kiebler, and Paolo Macchi. 2006. "Dendritic Localization of the Translational Repressor Pumilio 2 and Its Contribution to Dendritic Stress Granules." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (24): 6496–6508. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0649-06.2006>.
- Wang, Eric T, J Matthew Taliaferro, Ji-Ann Lee, Indulekha P Sudhakaran, Wilfried Rossoll, Christina Gross, Kathryn R Moss, and Gary J Bassell. 2016. "Dysregulation of MRNA Localization and Translation in Genetic Disease." *The Journal of Neuroscience* 36 (45): 11418–26. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2352-16.2016>.
- Wang, Laurent Ogé, Maria-Dolores Perez-Garcia, Latifa Hamama, and Soulayman Sakr. 2018. "The PUF Protein Family: Overview on PUF RNA Targets, Biological Functions, and Post Transcriptional Regulation." *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19020410>.
- White, Erica K, Tracy Moore-Jarrett, and H Earl Ruley. 2001. "PUM2, a Novel Murine Puf Protein, and Its Consensus RNA-Binding Site." *RNA* 7 (12): 1855–66. <https://doi.org/D0I: undefined>.
- Whittington, M A, T.J.G.R. Jefferys, and R D Traub. 1996. "Effects of Intravenous Anaesthetic Agents on Fast Inhibitory Oscillations in the Rat Hippocampus in Vitro." *British Journal of Pharmacology* 118 (8): 1977–86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15633.x>.
- Wu, Xu Ling, Hao Huang, Yun Yi Huang, Jin Xian Yuan, Xin Zhou, and Yang Mei Chen. 2015. "Reduced Pumilio-2 Expression in Patients with Temporal Lobe Epilepsy and in the Lithium-Pilocarpine Induced Epilepsy Rat Model." *Epilepsy and Behavior* 50: 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.05.017>.
- Wuchty, Stefan, Walter Fontana, Ivo L Hofacker, and Peter Schuster. 1999. "Complete Suboptimal Folding of RNA and the Stability of Secondary Structures." *Biopolymers* 49 (2): 145–65. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199902\)49:2<145::AID-BIP4>3.0.CO;2-G](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199902)49:2<145::AID-BIP4>3.0.CO;2-G).
- Xu, Eugene Yujun, Rhoda Chang, Nicholas A Salmon, and Renee A Reijo Pera. 2007. "A Gene Trap Mutation of a Murine Homolog of the Drosophila Stem Cell Factor Pumilio Results in Smaller Testes but Does Not Affect Litter Size or Fertility." *Molecular Reproduction and Development* 74 (7): 912–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrd.20687>.
- Yu, Frank H, Massimo Mantegazza, Ruth E Westenbroek, Carol a Robbins, Franck Kalume, Kimberly

- a Burton, William J Spain, G Stanley McKnight, Todd Scheuer, and William a Catterall. 2006. "Reduced Sodium Current in GABAergic Interneurons in a Mouse Model of Severe Myoclonic Epilepsy in Infancy." *Nature Neuroscience* 9 (9): 1142–49. <https://doi.org/10.1038/nn1754>.
- Zahr, Siraj K, Guang Yang, Hilal Kazan, Michael J Borrett, Scott A Yuzwa, Anastassia Voronova, David R Kaplan, and Freda D Miller. 2018. "A Translational Repression Complex in Developing Mammalian Neural Stem Cells That Regulates Neuronal Specification." *Neuron* 97 (3): 520–537.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.045>.
- Zhang, Dong Chen, Jing Xia, Wenqi Han, Xiekui Cui, Nils Neuenkirchen, Gretchen Hermes, Nenad Sestan, and Haifan Lin. 2017. "Post-Transcriptional Regulation of Mouse Neurogenesis by Pumilio Proteins." *Genes and Development* 31 (13): 1354–69. <https://doi.org/10.1101/gad.298752.117>.
- Zhu, Shaotong, Colleen M Noviello, Jinfeng Teng, Richard M Walsh, Jeong Joo Kim, and Ryan E Hibbs. 2018. "Structure of a Human Synaptic GABAA Receptor." *Nature* 559 (7712): 67–72. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0255-3>.
- Zubović, Lorena, Marco Baralle, and Francisco E. Baralle. 2012. "Mutually Exclusive Splicing Regulates the Nav 1.6 Sodium Channel Function through a Combinatorial Mechanism That Involves Three Distinct Splicing Regulatory Elements and Their Ligands." *Nucleic Acids Research* 40 (13): 6255–69. <https://doi.org/10.1093/nar/gks249>.
- Zuker, Michael, and Patrick Stiegler. 1981. "Optimal Computer Folding of Large RNA Sequences Using Thermodynamics and Auxiliary Information." *Nucleic Acids Research* 9 (1): 133–48. <https://doi.org/10.1093/nar/9.1.133>.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich Philipp Follwaczny, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

### **Die Rolle von spannungsgesteuerten, neuronalen Natriumkanälen in der Epileptogenese von Pumilio2 defizienten Mäusen**

eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

München, 26.07.2023

Philipp Follwaczny

---