

Funktion und Expression von Kv-Kanälen und Neurotransmitter-Rezeptoren auf der Mikroglia

DISSERTATIONSSCHRIFT

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

dem Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

von

Dipl.-Biol. Ulrike Pannasch

geboren am 27.06.1978 in Dresden

Gutachter:

1. Prof. Dr. F.G. Rathjen
Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin
Developmental Neurobiology
Robert Rössle Str. 10
13125 Berlin
2. Prof. Dr. H.Kettenmann
Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin
Zelluläre Neurowissenschaften
Robert Rössle Str. 10
13125 Berlin

Tag der Disputation: 14.07.2006

Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Helmut Kettenmann für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Unterstützung meiner Arbeit sowie die Bereitstellung der hervorragenden technischen Möglichkeiten. Ebenso möchte ich Dr. Katrin Färber für die Betreuung meiner Arbeit sowie die Unterstützung bei der Lösung vielfältiger Probleme und für die umfangreiche Hilfe bei der Durchführung der Experimente danken.

Einen ganz großen Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Zelluläre Neurowissenschaften, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Insbesondere möchte ich Dr. Carola Schipke und Dr. René Jüttner danken, die mir viele Hilfestellungen bei praktischen sowie theoretischen Problemen gegeben haben. Für die technische Unterstützung danke ich Irene Haupt für die Hilfe bei Arbeiten in der Zellkultur und Christiane Grass. Für Hilfe bei allen mechanischen, technischen und elektrischen Problemen gilt mein Dank Horst Kagelmaker und Rainer Kröber. Ganz besonders möchte ich meinem Bruder danken.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Ontogenese der Mikroglia	1
1.2	Funktion der Mikroglia.....	3
1.3	Die Aktivierung der Mikrogliazellen.....	5
1.4	Neurotransmitter-Rezeptoren auf Mikroglia	6
1.5	Ionenkanäle der Mikroglia	9
1.5.1	Kalium-Kanäle.....	10
1.5.2	Kalzium-Kanäle.....	13
1.5.3	Chlorid-Kanäle	13
2	Zielsetzung der Dissertation	14
3	Material und Methoden	16
3.1	Verwendete Tiere.....	16
3.1.1	Konstruktion des Kv1.5 Knockouts.....	16
3.1.2	Herstellung der <i>Kcna5</i> -Null Maus (Kv1.5 ^{-/-} Maus).....	17
3.2	Mikrogliazellkulturen	18
3.2.1	Serumhaltiges DMEM.....	18
3.2.2	Präparation der Mikrogliazellkulturen.....	18
3.3	Präparation von Gewebeschnitten	19
3.4	Patch-clamp-Technik.....	20
3.4.1	Experimenteller Aufbau des Messstands	20
3.4.2	Die Patch-clamp-Technik in Kultur und im akuten Hirnschnitt.....	22
3.4.3	Verwendete Spannungsprotokolle.....	22
3.5	Stimulation mit Antisense-Oligonukleotiden.....	26
3.6	Messung der Stickstoffmonoxid-Freisetzung.....	27
3.7	Bestimmung des Proteingehalts	27
3.8	Messung der Zellproliferation mit Hilfe des BrdU ELISA	27
3.9	Expressionsanalyse mit Hilfe der RT-PCR.....	28
3.10	Läsion des Nervus Fazialis.....	30
3.11	Immunhistochemische Charakterisierung.....	32
3.12	Statistische Auswertung	32
4	Ergebnisse	34
4.1	Die Rolle der Kv1.5 und Kv1.3 Kaliumkanäle in der Mikroglia.....	34
4.1.1	Die Expression von Kv1.5 und Kv1.3 RNA.....	34

4.1.2	Einfluss des Kv1.5 und Kv1.3 Kanals auf den LPS induzierten auswärtsrektifizierenden K ⁺ Strom	35
4.1.3	Kinetische Charakteristika des Kaliumauswärtsstroms.....	41
4.1.4	Der Kv1.5 Kanal reguliert die NO-Freisetzung	44
4.1.5	Kv1.5 und Kv1.3 Kanäle modulieren die Proliferation in Mikroglia Erreur ! Signet non défini.	
4.1.6	Induktion der Proliferation von Mikroglia durch Fazialisnerv-Axotomie in Kv1.5 ^{-/-} Tieren	48
4.2	Expression von Neurotransmitter-Rezeptoren auf Mikrogliazellen.....	50
4.2.1	RT-PCR Analyse zur Identifikation von Neurotransmitter-Rezeptoren in Mikroglia.....	54
4.2.2	Transmitter-Rezeptor-Expression von kultivierten Mikroglia... Erreur ! Signet non défini.	
4.2.3	Transmitter-Rezeptor-Expression von Mikroglia im akuten Hirnschnitt Erreur ! Signet non défini.	
5	Diskussion	73
5.1	Kv1.5 und Kv1.3 Kanäle modulieren essentielle Funktionen aktivierter Mikroglia.....	73
5.1.1	Der prominente K ⁺ Auswärtsstrom aktivierter Mikroglia fließt möglicherweise durch Kv1.3/Kv1.5 Heteromere	73
5.1.2	Kv1.5 Kanal-Expression moduliert die NO-Freisetzung.....	76
5.1.3	Kv1.5 und Kv1.3 spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus..	77
5.2	Neurotransmitter-Rezeptoren auf Mikroglia	79
5.2.1	Vergleich der verwendeten Zellmodelle	79
5.2.2	Neurotransmitter induzierte Stromantworten in Mikroglia Erreur ! Signet non défini.	
6	Zusammenfassung	83
7	Summary	84
8	Tabellen.....	85
9	Literaturverzeichnis	88
10	Abkürzungsverzeichnis	100
11	Publikationen und Posterbeiträge	102
12	Curriculum Vitae.....	104

