

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Kaliumkanalexpression auf adulten murinen neuronalen
Progenitorzellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Michaela Dewes

aus St. Wendel

Datum der Promotion: 04.09.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Zusammenfassung.....	VI
Abstract.....	VII
1. Einleitung.....	8
1.1. Stammzellen.....	8
1.1.1. Adulte Neurogenese.....	9
1.1.2. Adulte Neurogenese <i>in vivo</i>	9
1.1.2.1. Die Subventrikuläre Zone.....	9
1.1.3. Adulte Neurogenese <i>in vitro</i>	11
1.1.4. Regulation der Neurogenese.....	12
1.2. Kaliumkanäle.....	12
1.2.1. Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle.....	13
1.2.2. Einwärtsgerichtete Kaliumkanäle.....	15
1.2.3. Tandemporen Kaliumkanäle.....	16
1.3. Kaliumkanäle und ihr Einfluss auf die Proliferation von neuronalen Progenitorzellen.....	17
2. Aufgabenstellung.....	19
3. Material und Methoden.....	20
3.1. Materialien.....	20
3.1.1. Geräte und Verbrauchsgegenstände.....	20
3.1.2. Chemikalien.....	21
3.1.3. Medien und Ansätze.....	24
3.1.3.1. Zellkultur.....	24
3.1.3.2. Färbungen.....	25
3.1.3.2. Western Blot.....	25
3.1.4. Antikörper.....	26
3.1.4.1. Primärantikörper.....	26
3.1.4.2. Sekundärantikörper.....	27

3.1.5.	Kits	28
3.2.	Methoden.....	28
3.2.1.	Der Inzuchtstamm C57BL/6	28
3.2.2.	Isolation der neuronalen Vorläuferzellen aus der murinen SVZ	28
3.2.3.	Subkultivierung der Neurosphären.....	29
3.2.4.	Differenzierungsassay	30
3.2.5.	Proliferationsassay	31
3.2.6.	Microarray Analyse	32
3.2.7.	Immunzytochemie	33
3.2.8.	Perfusionsfixation und Immunhistochemie.....	33
3.2.9.	ABC-DAB/Ni-Färbung	34
3.2.10.	Western Blot	35
3.2.10.1.	Proteinisolierung	35
3.2.10.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	35
3.2.10.3.	SDS – Page.....	35
3.2.10.4.	Blotten	36
3.2.11.	Nukleofektion.....	36
4.	Ergebnisse	38
4.1.	Der Neurosphärenassay	38
4.2.	Der Differenzierungsassay	39
4.3.	Kaliumkanalgenexpression der NPCs	40
4.4.	Immunhistochemische Untersuchung der Kaliumkanalexpression	41
4.4.1.	Kv-Kaliumkanäle	43
4.4.2.	Kir-Kaliumkanäle.....	45
4.4.3.	K2P-Kaliumkanäle	49
4.5.	Proliferation - Pilotversuch	53
5.	Diskussion	55
5.1.	Expression von Kaliumkanälen auf neuronalen Vorläuferzellen	55
5.1.1.	Kaliumkanal-mRNA Expression adulter neuronaler Vorläuferzellen	55
5.1.2.	Expression von Kir-Kaliumkanälen auf Proteinebene	55

5.1.3.	Expression von Kv- Kaliumkanälen auf Proteinebene	57
5.1.4.	Expression von K2P- Kaliumkanälen auf Proteinebene	58
5.2	Einfluss von Kaliumkanälen auf die Proliferation von NPCs.....	59
5.3	Korrelation der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Daten	60
5.4	Faktoren, die die Expression der Kaliumkanäle beeinflussen	62
5.5.	Die Rolle der Kaliumkanäle in der Neurogenese.....	62
	Literaturverzeichnis.....	64
	Eidesstattliche Versicherung	72
	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	73
	Lebenslauf.....	74
	Publikationsliste	76
	Danksagung.....	77

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
B27	Serumfreier Zusatz
<i>BCA</i>	<i>Bicinchoninic Acid Assay</i>
<i>BMP</i>	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BO	Bulbus olfactorius
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
<i>Cp</i>	<i>Crossing points</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<i>DCX</i>	<i>Doublecortin</i>
DMSO	Dimethylsuloxid
DNase	Desoxyribonuklease
<i>EBSS</i>	<i>Essential balanced salt solution</i>
<i>EGF</i>	<i>Epidermal growth factor</i>
<i>EGFR</i>	<i>EGF receptor</i>
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast growth factor</i>
E	Effizienz
E_k	Kaliumgleichgewichtspotential
E_{rel}	relative Effizienz
<i>bFGF</i>	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
FKS	Fötale Kälberserum
GADPH	Glycerol III Phosphatdehydrogenase
<i>GFAP</i>	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
<i>HSV-TK</i>	<i>Herpes simplex virus thymidine kinase</i>
KA-Kanal	A-Type Kaliumkanal
K_{ca}	Calcium-aktivierte Kaliumkanäle
KDR-Kanal	<i>delayed rectifying</i> Kaliumkanal
Kir	Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle
Kv	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle
K2P	Tandemporen Kaliumkanäle

<i>LGE</i>	<i>Lateral ganglionic eminence</i>
<i>M-MLV</i>	<i>Molony Murine Leukemia virus</i>
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NBMA	Neurobasalmedium A
NPC	Neuronale Progenitorzellen
P	Pore
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-A	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Albumin
<i>PDGF</i>	<i>Platelet-derived growth factor</i>
<i>PDGFRα</i>	<i>PDGF receptor alpha</i>
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohaemagglutinin
<i>PGC</i>	<i>Periglomerular cell</i>
PLL	Poly-L-Lysin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>RIP</i>	<i>Receptor-interacting-protein</i>
RMS	Rostraler migratorischer Strom
RMP	Ruhemembranpotential
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGZ	Subgranuläre Zone
<i>siRNA</i>	<i>Small interfering RNA</i>
SURx	Sulfonylharnstoffrezeptoren
SVZ	Subventriculäre Zone
SYBR Green I	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1 <i>H</i> -chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
VZ-SVZ	Ventrikulärzone-Subventrikulärzone

Zusammenfassung

Neuronale Progenitorzellen (NPCs) sind die Quelle für neue Neurone und Gliazellen im adulten Gehirn. Die meisten NPCs finden sich in der subventrikulären Zone (SVZ) und der subgranulären Schicht des Gyrus Dentatus, wo sie zur Plastizität des Gehirns beitragen. Um ihr Reparaturpotential im Gehirn zu nutzen, ist es von großer Wichtigkeit die Moleküle zu identifizieren, welche Wachstum, Migration und Differenzierung regulieren. Kaliumkanäle sind vielversprechende Kandidatenmoleküle für die Regulation der NPCs. Sie sind wichtige Komponenten in der Signaltransduktion und besitzen eine hohe Diversität. Somit sind sie ideal um komplexe Vorgänge wie Proliferation und Differenzierung zu steuern. Zum heutigen Zeitpunkt gibt es nur wenige Arbeiten über die Distribution der Kaliumkanäle auf den NPCs und ihren Einfluss auf die Proliferation dieser Zellen.

In dieser Arbeit wurde die Expression ausgewählter spannungsgesteuerter (Kv) Kaliumkanäle, einwärtsgerichteter (Kir) Kaliumkanäle und Tandemporenkaliumkanäle (K2P) auf NPCs in der SVZ adulter Mäuse analysiert. Die mittels Immunhistochemie gewonnenen Daten wurden *in vitro* bestätigt und durch Western Blots ausgewählter Kaliumkanäle ergänzt. Im Microarray wurde darüber hinaus die Genexpression der Kanäle untersucht. Selektierte Kaliumkanalkandidaten wurden durch semispezifische Kaliumkanalblocker gehemmt und hiernach das Proliferationsverhalten der NPCs im Proliferationsassay getestet.

Somit gelang eine umfangreiche Expressionsanalyse verschiedener Kaliumkanäle auf neuronalen Vorläuferzellen. Hierbei zeigte sich ein differenziertes Expressionsmuster der Kanäle auf den Nestin-positiven Vorläuferzellen der SVZ, den DCX-positiven frühen Neuronen der SVZ sowie den subependymalen Zellen. Ähnliche Daten zeigten sich auch im Neurosphärenassay. Die Expression einzelner Kaliumkanäle wie Kir6.1, Kir3.2, Kv1.6 und Kir2.4 zeigte hierbei ein besonders interessantes Expressionsmuster. Weiterhin fand sich der Trend, dass die Proliferation der NPCs durch Zugabe von Tertiapin, einem Blocker des Kanals Kir3.2, gehemmt werden konnte.

Diese Ergebnisse legen eine Rolle der Kaliumkanäle für die komplexe Regulation von Proliferation und Differenzierung der NPCs nahe. Es werden jedoch weitere Studien benötigt um diese Beziehung besser zu verstehen und so geben die Ergebnisse dieser Arbeit Anstöße für neue, vielversprechende Herangehensweisen.

Abstract

Neural progenitor cells (NPCs) are a source of new neurons and glia in the adult brain. Most NPCs reside in the forebrain subventricular zone (SVZ) and in the subgranular zone of the dentate gyrus where they contribute to the plasticity of the adult brain. To use their potential for repair it is essential to identify the molecules that regulate their growth, migration and differentiation. Potassium channels are promising molecular candidates for NPC regulation as they are important components of signal transduction and their diversity is ideal to cover the complex functions required for cell proliferation and differentiation. There is increasing evidence that potassium channels influence cell growth and neurogenesis, however, very little is known regarding potassium channel distribution in NPCs and their influence on the proliferation of NPCs.

In this thesis the expression of a variety of voltage-gated (Kv), inwardly rectifying (Kir) and two-pore (K2P) potassium channels was explored in the SVZ of adult mice. The data obtained by immunocytochemical analysis were confirmed in neurosphere cultures. Furthermore Western blots for selected potassium channels as well as microarrays analyzing the gene expression of potassium channels were performed in the neurosphere cultures. Selected potassium channels were functionally disabled using semi specific potassium channel blockers. In the proliferation assay the influence of these blockers on the cell proliferation was tested.

This thesis is a comprehensive analysis of the expression of potassium channels on neural progenitor cells. It reveals a differential expression pattern of potassium channels in nestin-positive SVZ precursor cells, early SVZ doublecortin-positive neurons and (sub)ependymal cells. These data were confirmed in the neurosphere cultures. Some potassium channel proteins, such as Kir6.1, Kir3.2, Kv1.6 und Kir2.4, showed an interesting expression pattern. Furthermore the trend was shown that Tertiapin, a blocker of the potassium channel Kir3.2 could inhibit the proliferation of the NPCs.

These data suggest a role of potassium channels in the complex regulation of NPC proliferation and differentiation. Further studies are required to elucidate the relationship between potassium channels and neurogenesis in the SVZ. The results of this thesis promise to provide new approaches for regulating NPC proliferation or migration in the brain.

1. Einleitung

1.1. Stammzellen

Stammzellen werden durch zwei wesentliche Eigenschaften ausgezeichnet: Zum Einen die Fähigkeit, sich durch symmetrische Zellteilung selbst zu erneuern und somit die Stammzellpopulation zu vergrößern und zum Anderen die Fähigkeit, durch asymmetrische Teilung spezifische Zelltypen zu generieren. Im Rahmen der asymmetrischen Teilung entstehen jeweils eine neue Stammzelle und eine Tochterzelle, welche in ihrem Differenzierungspotential eingeschränkt ist. Nach ontogenetischem Alter sowie dem Differenzierungspotential werden Stammzellen in totipotente, pluripotente, multipotente oder unipotente Stammzellen unterteilt.

Tabelle 1: Einteilung der Stammzellen

Potenz	Differenzierungspotential	Beispiel
Totipotent	kann sich in einen gesamten Organismus differenzieren	Eizelle
Pluripotent	kann sich in jeden Zelltyp, jedoch nicht in einen Organismus differenzieren	embryonale Stammzelle
Multipotent	kann sich in verschiedene Zelllinien differenzieren	neuronale Stammzelle
Unipotent	kann sich nur in eine Zelllinie differenzieren	Muskel-Stammzelle

Es lassen sich weiterhin zwei Arten von Stammzellen unterscheiden. Die embryonalen Stammzellen finden sich in der inneren Zellmasse der Blastozyste und sind pluripotent. Adulte Stammzellen hingegen lassen sich im Laufe der gesamten Ontogenese in verschiedenen Geweben und Organen nachweisen. Ihr Differenzierungspotenzial ist dem der embryonalen Stammzellen unterlegen. Unlängst gelang es, eine dritte Gruppe von Stammzellen zu generieren – die induzierten Stammzellen. Takahashi u.a. verwendeten murine Fibroblasten um dort das Genom vier spezifischer Transkriptionsfaktoren einzubringen, wodurch die Fibroblasten die Eigenschaften pluripotenter Stammzellen erlangten (Takahashi und Yamanaka 2006).

1.1.1. Adulte Neurogenese

Bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts bestand die Meinung, dass Neurogenese nur während der Embryonalphase im Säugetier stattfindet. In den 60er Jahren gelang es Joseph Altman postnatale Neurogenese in Ratte und Katze nachzuweisen. So nutzte er radioaktiv markiertes Thymidin um Zellen, welche sich in Teilung befinden, zu markieren und später mittels Autoradiographie darzustellen. Altmann fand proliferierende Zellen mit neuronalen Charakteristika in Hippocampus, Bulbus olfaktorius und Neokortex (Altman und Das 1966). Dennoch dauerte es bis in die 90er Jahre bis die adulte Neurogenese auch in Primaten und Menschen allgemein anerkannt war und die neuronale Stammzellforschung mit neuen Methoden wie dem Nutzen von Bromdesoxyuridin (BrdU), der Immunhistochemie und der Konfokalmikroskopie in großem Maße begann (E Gould u. a. 1999; Eriksson u. a. 1998).

1.1.2. Adulte Neurogenese *in vivo*

Zum heutigen Zeitpunkt gibt es zwei allgemein akzeptierte Hirnareale, in welchen adulte Neurogenese stattfindet: den Gyrus dentatus im Hippocampus und die Subventrikulärzone (Gage 2000; Zhao, Deng, und Gage 2008; Kriegstein und Alvarez-Buylla 2009). In der subgranulären Zone des Gyrus dentatus des Hippocampus entstehen aus neuronalen Progenitorzellen die Körnerzellen, welche sich in die bestehenden neuronalen Schaltkreise integrieren (Kempermann u. a. 2004). Die subventrikuläre Zone befindet sich in der lateralen Wand der Seitenventrikel. Hier proliferieren die neuronalen Vorläuferzellen und generieren Neuroblasten. Im Nagetier migrieren diese in einer von Astrozyten gesäumten Kette zum Bulbus olfaktorius (BO). Dort wandern sie sternförmig zu den Glomeruli olfactorii, wo sie sich in verschiedene Subtypen von Interneuronen differenzieren (Lois und Alvarez-Buylla 1994). Neben der SVZ und dem Gyrus dentatus werden auch andere Hirnareale wie beispielsweise der Neokortex, Hypothalamus und Amygdala als Ort adulter Neurogenese diskutiert (*reviewed* durch Gould 2007; Emsley u. a. 2005).

1.1.2.1. Die Subventrikuläre Zone

Es werden ständig neue Erkenntnisse zum Aufbau der SVZ gewonnen. Zum Seitenventrikel hin und somit in direktem Kontakt zum Liquor stehen die Ependymzellen, welche sich nicht teilen. Weiterhin werden sich langsam teilende B Zellen, die neuronalen Vorläuferzellen, und die sich aus Ihnen entwickelnden, schnell teilenden C Zellen unterschieden. B Zellen tragen die Charakteristika astrozytärer Zellen und lassen sich aufgrund unterschiedlicher Morphologie und

anatomischer Lage in B1 und B2 Zellen unterteilen. B1 Zellen finden Anschluss an das Liquorsystem und haben darüber hinaus Kontakt zu Blutgefäßen und allen anderen Zellen der SVZ. B2 Zellen haben keinen Anschluss an das Ventrikelsystem (Riquelme, Drapeau, und Doetsch 2008). C Zellen, auch *transient amplifying cells* genannt, generieren die jungen Neuroblasten. Diese Neuroblasten, auch Typ A Zellen genannt, migrieren entlang des rostralen migratorischen Stroms (RMS) hin zum BO. Aufgrund des Kontaktes der Vorläuferzellen zum Ventrikelsystem präferieren es manche Autoren den Begriff Subventrikulärzone auf den Begriff Ventrikulärzone-Subventrikulärzone (VZ-SVZ) zu erweitern (Ihrle und Alvarez-Buylla 2011).

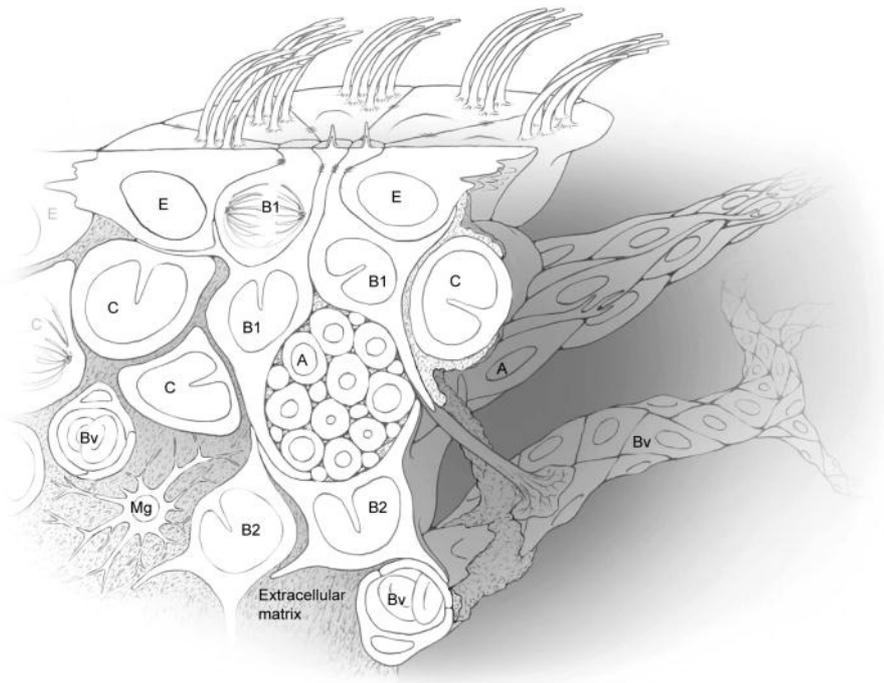


Abbildung (Abb.) 1 Architektur der VZ-SVZ: Angrenzend an den Liquorraum finden sich die Ependymzellen (E). Auch B1 Zellen finden im Gegensatz zu B2 Zellen Anschluss an das Ventrikelsystem (B1 und B2). Aus den B Zellen entwickeln sich die C Zellen oder auch *transient amplifying cells* genannt (C). Die Neuroblasten, Typ A Zellen, wandern entlang des RMS zum BO (A). Weitere Bestandteile der VZ-SVZ sind die Mikroglia (Mg) sowie die Blutgefäße (BV) (Grafik aus Ihrle und Alvarez-Buylla 2011).

1.1.3. Adulte Neurogenese *in vitro*

Der Neurosphärenassay ist ein weit verbreitetes Instrument zur Untersuchung neuronaler Vorläuferzellen. Er beruht auf der für Stammzellen charakteristischen Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Unter speziellen Konditionen proliferieren die Stammzellen wohingegen differenzierte Zellen absterben. Somit gelingt es, die Vorläuferzellen selektiv zu isolieren und weiter zu kultivieren. Bereits 1992 beschrieben Reynold und Weiss den Neurosphärenassay (Reynolds und Weiss 1992). Essentielle Grundlagen sind ein Serum-freies Medium, eine nicht-haftende Unterlage und der Wachstumsfaktor *Epithelial Growth Factor (EGF)*. Unter diesen Bedingungen bilden sich aus einem dem murinen Striatum entnommenen Zellgemisch die sogenannten Neurosphären. Dies sind Zellhaufen aus aneinander haftenden proliferierenden Zellen. Ab einer bestimmten Größe, welche nach ca. 21 Zellteilungen erreicht ist, lösen sich die Neurosphären von der Oberfläche der Kulturschale und schwimmen im Medium. Kultiviert man die Neurosphären über mehrere Generationen steigt die Anzahl der proliferierenden neuroepithelialen Stammzellen. Die differenzierten Zellen hingegen sterben ab und ihre Anzahl verringert sich. Dennoch bestehen die Neurosphären aus einer heterogenen Gruppe von Zellen. So befinden sich neben den Stammzellen auch in ihrem Differenzierungspotential limitierte Vorläuferzellen sowie bereits differenzierte Zellen und Zelldebris. Unter Berücksichtigung dieser Heterogenität wird in dieser Arbeit der Begriff neuronale Vorläuferzellen für die untersuchten Zellen des Neurosphärenassays verwendet. Eine weitere Eigenschaft neuronaler Vorläuferzellen kann im Neurosphärenassay untersucht werden – die Multipotenz der Stammzellen. Bereits Gritti u.a. zeigten 1996, dass *beta Fibroblast Growth Factor (bFGF)* ein potenter Wachstumsfaktor für NPCs ist und es wurde beschrieben, dass der Entzug von *bFGF* sowie das Übertragen der Zellen auf eine haftende Unterlage die Differenzierung der Zellen nach sich zog (Gritti u. a. 1996). Somit entstehen aus NPCs im „Differenzierungsassay“ Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten. Zur Charakterisierung der Zellen in der SVZ sowie im Neurosphärenassay können verschiedene Kriterien zur Hand genommen werden. So geben Morphologie, Proliferationsverhalten und Proteinexpression Auskunft über die Identität der Zellen. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, welche zur Charakterisierung der verschiedenen Zellen dienen, waren neben denen für Kaliumkanäle, DCX zur Darstellung der Neuroblasten, Nestin zur Darstellung neuronaler Vorläuferzellen, *Glial fibrillary acidic protein (GFAP)* zur Darstellung von Astrozyten sowie *Receptor interacting protein (RIP)* zur Darstellung von Oligodendrozyten.

1.1.4. Regulation der Neurogenese

Schofield stellte 1978 die Hypothese auf, dass Stammzellen sich in sogenannten Stammzellnischen aufhalten (Schofield 1978). Die Stammzellnische beschreibt hier nicht nur einen spezifischen anatomischen Ort, sondern auch das *Microenvironment* in welchem lokale und systemische Faktoren integriert werden (*reviewed* von Scadden 2006), um sich so dem unterschiedlichen Bedarf an neuen Stammzellen anzupassen. Im Gehirn stellt u.a. die SVZ eine einzigartige Stammzellnische dar. Zellulärer Bestandteil sind hier Ependymzellen, Astrozyten, Mikroglia, Endothelzellen sowie die neuronalen Progenitorzellen. Diese integrieren die vielen Signalmoleküle wie Morphogene, Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter. *FGF* und *EGF* fördern beispielsweise nicht nur *in vitro* (Reynolds und Weiss 1992) die Proliferation von Stammzellen sondern auch *in vivo* (Kuhn u. a. 1997). Jede Zelle übernimmt hier spezifische Aufgaben. So bilden Ependymzellen eine Barriere zum Liquorraum, durch welche sie selektiv Ionen und Signalstoffe transportieren können (Sawamoto u. a. 2006). Astrozyten sind durch ihren Kontakt zu allen Komponenten der Nische zentral an der Regulation der Neurogenese beteiligt (Riquelme, Drapeau, und Doetsch 2008). Neben den lokalen Informationen gelangen jedoch auch systemische Signale in die SVZ. So wirken sich verschiedenste Umwelteinflüsse auf die Neurogenese aus. Mäuse beispielsweise, welche in einer abwechslungsreichen Umgebung gehalten werden, zeigten eine verstärkte Neurogenese im Hippocampus (Kempermann, Kuhn, und Gage 1997). Auch Erkrankungen wirken sich auf die Neurogenese aus. Epileptische Anfälle führen zu einer verstärkten Proliferation von NPCs im Gyrus dentatus (Parent u. a. 1997). Die Kommunikationswege sind hier vielfältig. So bilden Blutgefäße einen wichtigen Weg für systemische Signale und zirkulierende Zellen. Informationen gelangen ebenfalls via axonalem Transport in die Nische wie beispielsweise Dopamin, welches aus der Substantia nigra in die SVZ gelangt wo es die Proliferation der NPCs fördert (Höglinger u. a. 2004). Die genaue Integration der multiplen Signalwege in der SVZ ist bis dato jedoch nur ansatzweise verstanden.

1.2. Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind für Kaliumionen selektiv durchgängige Poren in der Zellmembran. Sie sind mit bisher über 75 bekannten Genen (Jenkinson 2006) die größte Gruppe von Ionenkanälen. Kaliumkanäle finden sich auf fast allen pro- und eukaryotischen Zellen und sind wesentlich am Aufbau des Ruhemembranpotentials beteiligt, in erregbaren Zellen spielen sie eine wichtige Rolle im Erregungsprozess. Sie können durch Spannung oder durch Liganden (z. B. Calicum oder Adenosintriphosphat (ATP)) gesteuert werden. Im menschlichen Körper sind Kaliumkanäle

u.a. an der Regulation der Herzfrequenz, endokrinen Vorgängen wie der Insulinausschüttung, dem Elektrolyttransport über Epithelien oder der Kontrolle der Neurotransmitterausschüttung beteiligt (Shieh u. a. 2000).

Die Röntgenkristallstruktur eines Kaliumkanals wurde 1998 zum ersten Mal beschrieben (Doyle u. a. 1998). Es handelte sich um den Kanal KscA des Bakteriums *Streptomyces lividans* und war ein wesentlicher Schritt im Verständnis von Struktur und Funktion der Kanäle. Kaliumkanäle setzen sich aus Untereinheiten, den sogenannten *Alpha Units*, zusammen. Die *Alpha Units* bestehen aus den die Membran durchspannenden Transmembrandomänen (TM) und den P-Segmenten, welche die Pore bilden. Um einen funktionellen Kanal bilden zu können, lagern sich *Alpha Units* zu Tetrameren oder Dimeren zusammen, in deren Mitte eine wassergefüllte Pore entsteht. An deren engster Stelle bilden die Schleifenstrukturen der P-Segmente den Selektivitätsfilter für Kalium, durch welchen die Kaliumionen entlang des elektrochemischen Gradienten die Zellmembran passieren. Dieser besitzt die stark konservierte Aminosäuresequenz Thr, Val, Gly, Tyr, Gly (Doyle u. a. 1998; Morais-Cabral, Zhou, und MacKinnon 2001). Zusätzlich können sich *Beta Units* an die Kaliumkanalkomplexe lagern. Dies sind zytoplasmatische Proteine, die eine hohe Sequenzhomologie zu Enzymen aus der Gruppe der Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) (NAD(P)H) -abhängigen Oxidoreduktasen haben (McCormack und McCormack 1994). Sie beeinflussen die physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des Kaliumkanals. Nach Anzahl der Transmembrandomänen der Alpha Untereinheiten sowie nach Art der Aktivierung werden die Kaliumkanäle in vier Gruppen eingeteilt. Zum einen gibt es die Calcium-aktivierten Kaliumkanäle (KCa), welche Untereinheiten mit 6 oder 7 TM besitzen. Zum anderen gibt es die einwärtsgerichteten Kanäle, die Tandemporenkanäle und die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle, welche in dieser Arbeit näher beschrieben werden.

1.2.1. Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle

Die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle bestimmten wesentlich die Erregbarkeit von Zellen beispielsweise in Herz, Skelettmuskel und Hirn. Sie modellieren Frequenz, Form und Größe des Aktionspotentials und sind somit u.a. an der Neurotransmitterausschüttung und Muskelkontraktion beteiligt (*reviewed* von McKeown u. a. 2008). Der erste geklonte Kv-Kanal war der spannungsabhängige *shaker* Kanal der *Drosophila* (Papazian u. a. 1987). Heute sind 40 für Kv-Kanäle kodierende Gene bekannt, die Familie lässt sich in zwölf Unterfamilien (Kv1-12) unterteilen. Kv-Kanäle besitzen Alpha Untereinheiten mit sechs Transmembrandomänen (S1-

S6). Sowohl N- als auch C- Terminus sind intrazellulär lokalisiert. Zwischen der fünften und der sechsten Transmembrandomäne befindet sich die Porendomäne (P) (Abb.2). Vier 6TM/P Untereinheiten bilden das Tetramer eines Kanals.

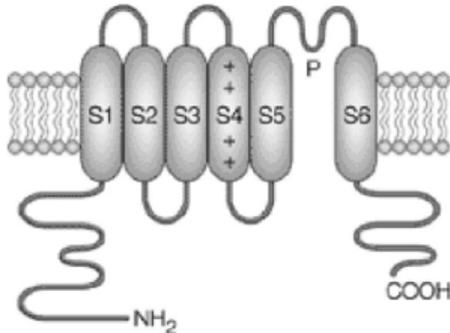


Abb. 2 Alpha Untereinheit eines spannungsgesteuerten Kaliumkanals (Abbildung aus Choe 2002).

Kv-Kanäle öffnen bei Membranpotentialen, welche positiver als das Ruhemembranpotential sind. Hierdurch bewirken sie einen Kaliumionenausstrom, was zur Repolarisation beiträgt. Die Möglichkeit auf Spannung zu reagieren ist durch die Transmembrandomänen S1-S4 gegeben. Von besonderer Bedeutung ist die vierte Transmembrandomäne – hier befinden sich an jeder dritten Stelle positiv geladene Aminosäuren (Arginin, Lysin), welche als Spannungssensor dienen (Liman u. a. 1991). Ändert sich die Transmembranspannung, führt dies zu Konformationsänderungen, was zum Öffnen bzw. Schließen des Kanals führt (Sands, Grottesi, und Sansom 2006). Am Aminosäureterminus liegt die Tetramerisierungsdomäne T1, welche die Kompatibilität der unterschiedlichen Untereinheiten festlegt. Es lassen sich nur Untereinheiten der gleichen Subfamilie kombinieren (Pfaffinger und DeRubeis 1995). Eine Ausnahme bilden die elektrisch stummen Kanäle Kv5, 6, 8 und 9, welche nur funktionsfähige Kanäle bilden, wenn sie mit Kv2 oder Kv3 assemblieren (Stocker, Hellwig, und Kerschensteiner 1999; Post, Kirsch, und Brown 1996). Die in unseren Experimenten untersuchten Kaliumkanäle gehören der Gruppe Kv1 und Kv4 an. Die Kanäle der Kv1 Familie sind weit im ZNS verbreitet, wo sie die Erregbarkeit von Neuronen beeinflussen. So zeigten Knockout Mäuse für Kv1.1 spontanes Auftreten epileptischer Anfälle sowie strukturelle Änderungen im ZNS (Smart u. a. 1998). Mitglieder der Kv4 Familie sind sowohl im ZNS als auch auf Herzmuskelzellen exprimiert. Kv4.2 beispielsweise wirkt im Bereich der Hinterhörner des Rückenmarks schmerzmodulierend (Hu u. a. 2006).

1.2.2. Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle

Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle sind essentiell an der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials von Zellen und der Regulierung des Aktionspotentials beteiligt. Bereits 1949 wurden die ersten einwärtsgleichrichtenden Kaliumleitfähigkeiten von Bernhard Katz im Skelettmuskel beschrieben. Es dauerte jedoch bis zum Jahr 1993 bis mittels Expressionsvektoren die ersten cDNA Klone von Kir1.1 und Kir2.1 aus dem Mark der Rattenniere bzw. aus murinen Makrophagen erstellt wurden (Ho u. a. 1993; Kubo u. a. 1993). Zum heutigen Zeitpunkt sind 15 für Kir-Kanäle kodierende Gene bekannt, es lassen sich sieben Subfamilien untergliedern (Kir1-7) (Doupnik, Davidson, und Lester 1995). Die Alpha Untereinheiten der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle besitzen zwei Transmembrandomänen (M1-M2), zwischen denen sich die extrazellulär gelegene porenformende Region (H5) befindet, die auch den Selektivitätsfilter beinhaltet. N- und C- Terminus liegen auf der zytoplasmatischen Seite (Abb 3).

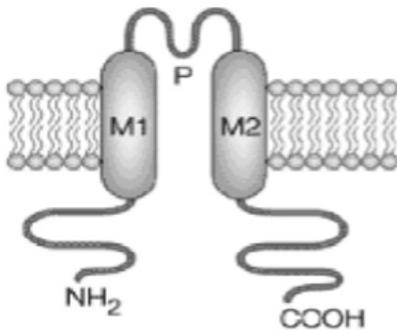


Abb. 3 Alpha Untereinheit eines einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanals (Abbildung aus Choe 2002)

Ihren Namen erhielten die Kanäle aufgrund der Eigenschaft Kaliumionen präferentiell nach intrazellulär fließen zu lassen (Hagiwara und Takahashi 1974). Liegt das Ruhemembranpotential negativ vom Kaliumgleichgewichtspotential (E_K) ist ein großer Ionenstrom über die Membran möglich. Der Fluss verringert sich, wenn das Ruhemembranpotential positiv von E_K wird - dem physiologischen Zustand über den meisten Säugetierzellmembranen. Diese Eigenschaft resultiert aus der Blockade der Kaliumionenpassage bei Depolarisation durch intrazelluläre Polyamine (z.B. Spermine) und Magnesium (Lopatin, Makhina, und Nichols 1995). Kir-Kanäle sind unterschiedlich starke Einwärtsgleichrichter, was durch Unterschiede in den Aminosäuren der Transmembrandomäne M2 bedingt ist (Wible u. a. 1994; Lu und MacKinnon 1994). Um einen funktionsfähigen Kaliumkanal zu bilden, lagern sich die Kir-Kanäle zu Homo- oder Heterotetrameren zusammen. Letztere werden zwischen Mitgliedern derselben Subfamilie

gebildet. Eine Ausnahme bilden hier Kir4.1 und Kir5.1 welche sich ebenfalls zusammen lagern können (*reviewed* von Hibino u. a. 2010). Einwärtsgerichtete Kaliumkanäle übernehmen vielfältige Rollen im menschlichen Körper. Vertreter der Kir2 Familie werden im Myokard und im Gehirn exprimiert (Stonehouse u. a. 1999). Im Herzen sind sie an der Aufrechterhaltung der Plateauphase sowie der schnellen Phase der Repolarisation beteiligt (Wang u. a. 1998). Die Expression von Kir3 Kanälen im Gehirn ist bereits mehrfach beschrieben (Lesage u. a. 1994; C. Karschin u. a. 1996). Hier spielen sie eine wichtige Rolle als Zielstruktur für G-Protein vermittelte Funktionen (A. Karschin 1999). Vertreter der Kir4 und Kir5 Familie sind im distalen Tubulus der Niere und auf Astrozyten exprimiert (Lourdel u. a. 2002; Hibino u. a. 2004). In der Niere wird ihnen eine Rolle bei der Rückresorption von Natrium zugeschrieben. Im zentralen Nervensystem tragen sie dazu bei, das Kaliumgleichgewicht zwischen Intra- und Extrazellulärraum zu regulieren (*reviewed* von Hibino u. a. 2010). Mitglieder der Kir6 Familie sind ATP-sensitive Kaliumkanäle. Sie bilden funktionelle Oktamere, welche aus vier Kir6 Untereinheiten und vier Beta Untereinheiten, den Sulfonylharnstoffrezeptoren (SURx), bestehen. In den Beta-Zellen des Pankreas wird vornehmlich Kir6.2/SUR1 exprimiert. Eine Erhöhung des Blutzuckergehaltes bedingt die Erregung der Zellmembran. Hierdurch kann die Insulinfreisetzung reguliert werden (*reviewed* von Ashcroft und Gribble 1999).

1.2.3. Tandemporen Kaliumkanäle

Die Tandemporen Kaliumkanäle sind verantwortlich für die sogenannten Leck- oder Hintergrundströme und stabilisieren somit das Ruhemembranpotential von Zellen. Leckströme wurden bereits vor über 50 Jahren am Nerven beschrieben (Hodgkin und Huxley 1952). Ihr molekulares Korrelat wurde jedoch erst 1995 mit dem Klonieren des ersten Tandemporen Kaliumkanals identifiziert. Hierbei handelte es sich um TOK1 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, ein Kanal der zwei Poren und acht Transmembrandomänen besitzt (Ketchum u. a. 1995; Reid u. a. 1996). Mit der Identifikation von TWIK1 wurde 1996 der erste Tandemporen Kaliumkanal der Säugetiere entdeckt. Dieser wies die typische 4TM/2P Struktur auf (Lesage u. a. 1996). Bisher sind über 50 kodierende Gene für die 4TM/2P Untereinheiten bekannt. Die Tandemporen Kaliumkanäle lassen sich in sechs Subfamilien untergliedern. Neben den vier Transmembrandomänen (M1-M4) unterscheiden sich die Untereinheiten von den Alpha Untereinheiten anderer Kaliumkanäle durch eine zweite Pore (P1 und P2) (Abb. 4). 4TM/2P Units dimerisieren um einen Kanal zu bilden.

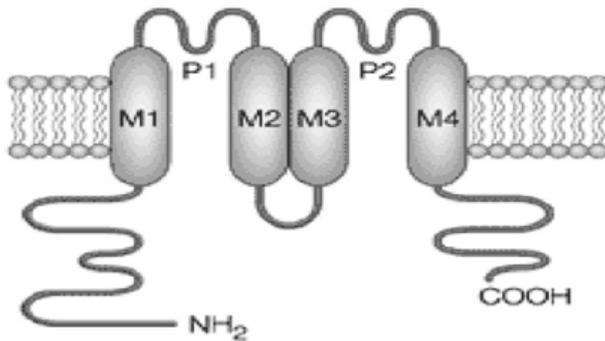


Abb. 4 Alpha Untereinheit eines Tandemporen Kaliumkanals (Abbildung aus Choe 2002)

Tandemporenkanäle formen Homomere. Für TASK1/TASK3 konnte jedoch auch die Bildung eines Heteromers nachgewiesen werden (Czirják und Enyedi 2002). Elektrophysiologisch zeigen Tandemporenkanäle ein Verhalten welches als offene Gleichrichtung oder auch *Goldman-Hodgin-Katz-Rectification* bezeichnet wird. Die Kanäle werden durch eine Vielzahl von Faktoren moduliert wie beispielsweise pH (Duprat u. a. 1997), Temperatur (Kang, Choe, und Kim 2005) oder ungesättigte Fettsäuren (Honoré u. a. 2002). Auch Pharmaka wie volatile Anästhetika beeinflussen die Kanäle (Patel u. a. 1999; Sirois u. a. 2000). Die physiologische Rolle der Tandemporen Kanäle ist Gegenstand aktueller Forschung. Mit Hilfe von Knockout Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass TASK1 und TASK3 Kanäle an der Regulation der Aldosteronsekretion in der Nebennierenrinde beteiligt sind (Davies u. a. 2008). Weiterhin vermitteln TASK1 und TASK3 die durch volatile Anästhetika hervorgerufene Hypnose und Immobilisation (Meuth u. a. 2003). TASK1, TASK3 und TREK1 sind auf den Hinterwurzelganglien des Rückenmarkes exprimiert, wo sie eine Rolle bei der Wahrnehmung von Schmerz und Temperatur einnehmen (Kang, Choe, und Kim 2005; Cooper, Johnson, und Rau 2004).

1.3. Kaliumkanäle und ihr Einfluss auf die Proliferation von neuronalen Progenitorzellen

Kaliumkanäle sind interessante molekulare Kandidaten zur Beeinflussung der Proliferation neuronaler Stammzellen, da sie wichtige Komponenten von Signaltransduktionskaskaden fast aller Säugetierzellen sind. Die Möglichkeit zahlreiche zellbiologische Prozesse zu steuern beruht u.a. auf der hohen Diversität der Kanäle. Darüber hinaus erhöht die Bildung von Heteromeren und die Möglichkeit, sich mit Beta Untereinheiten zusammen zu lagern die Variabilität der Kanäle. Alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikation z.B. durch Phosphorylierung oder Ubiquitinierung erweitern die Eigenschaften der Kanäle (*reviewed* von Wulff, Castle, und

Pardo 2009). Die Expression von Kaliumkanälen zeigt eine breite räumliche Heterogenität. Der Kaliumkanal Kv1.5 beispielsweise wird im Herz allein in den Myozyten des Atriums exprimiert, nicht jedoch im Ventrikel. Somit stellt er einen interessanten Angriffspunkt für Antiarrhythmika ohne (Neben)wirkungen am Ventrikel dar (Blaauw u. a. 2004). Auch zeitlich ist die Expression der Kanäle unterschiedlich reguliert. So beschreiben Furlan u.a., dass im Laufe der Entwicklung des Rückenmarks der Maus, spezielle Kaliumkanäle zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten exprimiert werden (Furlan u. a. 2005). Es gibt immer mehr Publikationen, welche den essentiellen Einfluss von Kaliumkanälen auf die Zellproliferation und –differenzierung belegen. Anfang der 70er Jahre stellte Larence D. Cone, Jr eine Theorie vor, welche besagte, dass Unterschiede in Ionenkonzentrationen und die damit einhergehenden Membranpotentialdifferenzen die Regulation von DNA Synthese und somit der Mitose von Zellen beeinflussen (Cone 1971). DeCoursey u.a. konnten 1984 erstmals einen Zusammenhang zwischen der Aktivität von Kaliumkanälen und der Proliferation von Zellen demonstrieren. So konnten Zellen, welche zuvor durch das Mitogen Phytohaemagglutinin (PHA) stimuliert wurden durch klassische Kaliumkanalblocker in der Proliferation gehemmt werden (DeCoursey u. a. 1984). Seither gibt es immer mehr Belege, dass Zellwachstum und –reifung durch Kaliumkanäle beeinflusst werden (MacFarlane und Sontheimer 2000; Gallo u. a. 1996). Von besonderer Wichtigkeit sind die Kaliumkanäle an Checkpunkten des Zellzyklus (Wonderlin und Strobl 1996). Für die G2/M Transition beispielsweise konnte eine erhöhte Aktivität der EAG Kanäle gezeigt werden (Pardo u. a. 1998). Es gibt bereits erste Arbeiten, welche den Einfluss von Kaliumkanälen auf die Neurogenese beschreiben. Am umfassendsten haben dies Yasuda u.a. beschrieben, welche sowohl Kv- als auch Kir-Kanäle untersucht haben. Hierbei beschrieben sie, dass die Kir-Kanäle notwendig für den Erhalt des Ruhemembranpotentials muriner NPCs sind. Die Blockade der Kanäle mit Barium konnte darüber hinaus eine Proliferation der Zellen bewirken (Yasuda u.a. 2007). Weiterhin zeigte sich, dass die Differenzierung von NPCs in Neuroblasten in der SVZ von Mäusen mit einer Änderung des Ruhemembranpotentials sowie der Herabregulation der Kir-Kanal Expression einhergeht (Yasuda u.a. 2008).

2. Aufgabenstellung

Der Einsatz von NPCs ist eine vielversprechende Therapiemöglichkeit für neurodegenerative Erkrankungen, Multiple Sklerose oder Schlaganfall (Pluchino u.a. 2003, Hofstetter u.a. 2005). Die genauen Mechanismen, durch welche Membranpotential und Ionenkanäle die Proliferation von Vorläuferzellen regulieren sind heute jedoch nur in Ansätzen bekannt. Die Expression ausgewählter Kaliumkanäle auf neuronalen Vorläuferzellen ist bereits *in vitro* (Liebau u. a. 2006) sowie *in vivo* (Yasuda, Bartlett, und Adams 2008) beschrieben. Auch der Einfluss von Kaliumkanälen auf die Proliferation von NPCs ist bereits untersucht worden (Yasuda, Bartlett, und Adams 2008). Eine detaillierte Analyse der Kaliumkanalexpression sowie eine Funktionsanalyse auf murinen NPCs existiert jedoch aktuell noch nicht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die bereits vorliegenden Daten zu verifizieren und zu erweitern. Hierzu wurde die Expression von spannungsabhängigen, einwärtsgerichtenden und Tandemporen Kaliumkanälen in der adulten murinen SVZ sowie *in vitro* im Neurosphärenassay mit Genexpressions- und immunhistochemischen Studien untersucht. Es zeigte sich eine heterogene Expression der Kanäle, so dass Kandidatenkanäle selektiert wurden, um diese weiter hinsichtlich ihrer Rolle für die Proliferation der neuronalen Vorläuferzellen zu beschreiben.

Daraus leiten sich mehrere Fragestellungen ab, die im Rahmen dieser Doktorarbeit experimentell geprüft werden sollen.

1. *Welche Kaliumkanäle werden in der murinen SVZ exprimiert?*
2. *Lassen sich ähnliche Expressionsmuster in vitro (Neurosphären) nachweisen?*
3. *Welchen Einfluss haben ausgewählte Kaliumkanäle auf die Proliferation der NPCs in vitro?*
4. *Welche weiteren Faktoren beeinflussen die Neurogenese in der SVZ und im Neurosphärenassay?*

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte und Verbrauchsgegenstände

Bio Photometer	Eppendorf
Blot System Trans-Blot®	Bio Rad
Chirurgische Einmalskalpelle	Braun
Einmalpipetten	Eppendorf
Einmal-Injektions-Kanüle 17, 24 G x 1	Braun
Eismaschine AF-80	Scotsman
Elektrophoresesystem	Bio Rad
Falcon konisches Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Bioscience
Falcon Rundbodenröhrchen (14 ml)	BD Bioscience
Filtereinheit, gebrauchsfertig, 0,2 µm	Whatman
Fluoreszenzmikroskop DM-RA2	Leica
Fotopapier	Kodak
Gel Blotting Papier GB005	Whatman
Heizblock VMS-A	VWR International
Kryoröhrchen	Sarstedt
Kryostat HM 560 Cryo Star	ThremoScientific
Latex Untersuchungshandschuhe, puderfrei	Charité
Light Cycler ®	Roche
Neubauer Zählkammer	Roth
Nitrozellulosemembran	Roth
Nukleofektionsgerät Nucleofector® II	Amaxa
Parafilm	Brand/Merz & Co
Pasteuripette, Glas	Roth

pH-Meter (pH 100)	VWR International
Pipettenspitzen	Sarstedt
Präparationsmikroskop Leica Zoom 2000TM	Leica
Protein LoBind Tube 0,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Reagenzglasschüttler REAX Control	Heidolph
Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml	Bioscience
Spritzen 1, 2, 5, 10, 20, 50 ml	Bioscience
Sayk Kammer	AnToMe Gmbh
Sterilbank: Biowizard Typ KR 130 BW	Kojair Tech Oy
Vaccu-Hand Control	Vacuubrand GmbH + Co. KG
Vacuum Pumpsystem BVC 21	Vacuubrand GmbH + Co. KG
Wage Competence CP225D	Sartorius
Wasserbad SW 22	Julabo Labortechnik
Zellkulturflaschen „ <i>ultra low attachment</i> “ 75cm ²	Corning
Zellkulturplatten „ <i>ultra low attachment</i> “ 6 well	Corning
Zellinkubator MCO-18AUV	Sanyo Electric Co
Zellkulturplatte, 24 well	BD Bioscience
Zentrifuge Universal 32R	Hettich Zentrifugen

3.1.2. Chemikalien

Agitoxin-2	Alomone Labs
Ammoniumnickelsulfat	Sigma
Avidin-Biotin Komplex (Elite ABC)	Vector Laboratories
B27 Supplement w/o Retinsäure	Invitrogen (Gibco)
Bicinchoninic acid assay (BCA Proteinassay)	Pierce, Thermo-Scientific, Perbio Science
Borate Puffer	Sigma

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU)	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Western Blotting Luminolreagenz: sc-2048	Santa Cruz
Cystein	Sigma
3,3'-Diaminobenzindin (DAB)	Sigma
Dimethylsuloxid (DMSO)	Sigma
RNase free DNase set	Qiagen
Essential balanced salt solution (EBSS)	Invitrogen (Gibco)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
<i>EGF</i>	Invitrogen (Gibco)
<i>FGF2</i>	Invitrogen (Gibco)
Elite A (Avidin)	Vector Laboratories
Elite B (Biotinylierte Peroxidase)	Vector Laboratories
Ethanol	Baker
FluorSave™ Reagent Mounting Medium	Calbioch
Entellan	Merck
Formalinlösung (10%)	Sigma
Fötale Kälberserum (FKS)	Lonza
Glycin	Sigma
Glycerol	Sigma
HEPES	Biochrom AG
Hexan	Roth
Imidazol	Sigma
Isofluran	Abbot
Isopropanol	Roth
Kaleidoskop-Proteinmarker	Bio-Rad

Ketamin	Bela-Pharm
Glibenclamid	Sigma
L-Glutamin	Biochrom AG
Lysepuffer für Western Blot	New England Biolabs
Methanol	Sigma
2-Mercaptoethanol	Merck
Milchpulver	Roth
Mini Protease Inhibitor Cocktail	New England Biolabs
<i>Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase M-MLV</i>	Promega
NaCl	Sigma
Natriumazid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Neurobasal A Medium (NBMA)	Invitrogen (Gibco)
Nitrozellulosemembran	Roth
<i>Normal Donkey Serum</i>	Sigma
<i>Normal Goat Serum</i>	Sigma
Ovomukoid	Biozol
Papain	Worthington
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS w/o)	Invitrogen
Poly-L-Lysin	Biochrom AG
Salzsäure	Sigma
Spermine	Sigma
Sucrose	Sigma
TEMED	Roth

Tertiapin	Alomone Labs
Triton X-100	Sigma
Trizol	Gibco BRL
Tris-base	Sigma
Tris – Hydrochlorid	Roth
Tween 20	Sigma
Tryptan – blue 0,5 %	Euroclone
VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI	Vectashield
Wasserstoffperoxid 30%	Merck
Xylazinhydrochlorid 2%	Bayer
Xylol	Baker

3.1.3. Medien und Ansätze

3.1.3.1. Zellkultur

Zellkulturmedium	NBMA Medium Glutamin B 27 ohne Retinol	48,5 ml 0,5 ml 1,0 ml
Zellkulturmedium mit Wachstumsfaktoren	+ <i>EGF</i> + <i>FGF-2</i>	20 ng/ml 10 ng/ml
Papain-DNase-Lösung	Papain Cystein EDTA EBSS	23,5 mg 4,5 mg 4,5 mg In 25 ml EBSS
	30 min belüften, dann Zugabe von:	
	0,1 % DNase	0,25 ml
Ovomukoidlösung	Ovomukoid	10 mg In 14 ml Zellkulturmedium

3.1.3.2. Färbungen

Primärantikörperlösung	<i>Normal Goat/Donkey Serum</i> Triton X-100	1 ml 30 µl In 10 ml PBS
Sekundärantikörperlösung (PBS-A)	BSA	400 mg In 40 ml PBS
Avidin-Biotin Komplex	PBS-A Elite A Elite B	5 ml 5 µl 5 µl
DAB-Lösung	DAB 50 mg/ml in H ₂ O Tris-Puffer 1 M Imidazol 1 M	25 µl 125 µl 25 µl In 2,5 ml H ₂ O
Borate Puffer, pH 8,5	Boratex	38,1 g In 1 l H ₂ O

3.1.3.2. Western Blot

Lysepuffer	20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 150 mM NaCl 1 mM Na ₂ EDTA 1 mM EGTA 1% Triton 2,5 mM Natriumpyrophosphat 1 mM β-Glycerophosphat 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 µg/ml Leupeptin supplementiert mit Mini Protease Inhibitor Cocktail und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	
Probenpuffer	0,652 M Tris-HCL, pH 6,8 SDS-Lösung 10 % Glycerol Aqua bi-dest Bromphenolblau 0,8 % β-Mercaptoethanol	2 ml 1 ml 2 ml 3,9 ml 100 µl 1 ml
5x Laufpuffer (5x Lämmli)	Glycin Tris-Base SDS	140 g 30 g 5 g ad 1l Aqua bidest

TBST	0,05 % Tween 20 1 M Tris-HCL pH 8 5 M NaCl	1 ml 20 ml 60 ml Ad 2 l Aqua bidest
Trenngel 12 % Acrylamidkonzentration	30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid 1,88 M Tris-HCl pH 8,8 0,5 % SDS Aqua bidest TEMED 10% Ammoniumpersulfat – Lsg.	2,4 ml 1,2 ml 1,2 ml 1,2 ml 5 µl 30 µl
Sammelgel 5 %	30% Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid 0,625 M Tris/HCl pH 6,8 0,5 % SDS Aqua bidest TEMED 10% Ammoniumpersulfat – Lsg.	0,33 ml 0,4 ml 0,4 ml 0,87 ml 2 µl 10 µl
Transferpuffer	1xLämmli Methanol	160 ml 40 ml

3.1.4. Antikörper

3.1.4.1. Primärantikörper

(Konzentrationsangaben für die Fluoreszenzfärbung)

Aktin [1:1000] goat	Santa Cruz Biotechnology
BrdU [1:500] rat	AbD Serotec
DCX [1:500] rabbit/goat	Santa Cruz Biotechnology
GFAP [1:200] rabbit	Dako
Kir1.1 [1:100] rabbit	Alomone
Kir2.1 [1:250] rabbit	(Prüss u. a. 2005)
Kir2.2 [1:100] rabbit	(Prüss u. a. 2005)
Kir2.3 [1:100] rabbit	(Prüss u. a. 2005)
Kir2.4 [1:1000] rabbit	(Prüss u. a. 2005)
Kir3.1 [1:500] rabbit	(Eulitz u.a. 2007a)
Kir3.2 [1:200] rabbit	(Eulitz u.a. 2007a)

Kir4.1 [1:1000] rabbit	Chemicon
Kir4.2 [1:50] rabbit	Alomone
Kir5.1 [1:100] rabbit	provided by Dr. Veh
Kir6.1 [1:700] rabbit	(Thomzig u. a. 2005)
Kir6.2 [1:100] rabbit	(Thomzig u. a. 2005)
Kir7.1 [1:2000] rabbit	(Derst u. a. 2001a)
Kv1.1 [1:1000] rabbit	(Veh u. a. 1995)
Kv1.4 [1:100] rabbit	(Veh u. a. 1995)
Kv1.5 [1:150] rabbit	generously provided by Prof. H.G. Knaus, (Koschak u. a. 1998)
Kv1.6 [1:500] mouse	NeuroMab
Kv2.1 [1:100] rabbit	Sigma
Kv4.2 [1:500] rabbit	NeuroMab
Kv4.3 [1:500] rabbit	NeuroMab
Nestin [1:200] rat	Chemicon
RIP [1:5000] mouse	Chemicon
TASK1 [1:100] rabbit	Alomone
TASK3 [1:100] goat	Santa Cruz Biotechnology
TWIK1 [1:200] rabbit	Santa Cruz Biotechnology
TWIK2 [1:100] rabbit	Alomone
TREK1 [1:1000] goat	Santa Cruz Biotechnology
TREK2 [1:500] rabbit	Santa Cruz Biotechnology
TRAAK [1:250] goat	Santa Cruz Biotechnology

3.1.4.2. Sekundärantikörper

Alexa Fluor goat α -rabbit 488 IgG [1:500]	Invitrogen
Alexa Fluor goat α -rat 488 IgG [1:500]	Molecular Probes
Alexa Fluor donkey α -rabbit 594 IgG [1:500]	Invitrogen

Alexa Fluor donkey α -goat 594 IgG [1:500]	Molecular Probes
Alexa Fluor donkey α -mouse 594 IgG [1:500]	Invitrogen
Donkey α -goat IgG HRP-konjugiert [1:10000]	GE Healthcare
Goat α -mouse IgG HRP-konjugiert [1:5000]	Santa Cruz
Donkey α -rabbit IgG HRP-konjugierte [1:1000]	Cell Signaling
Biotinylierter goat α -rabbit IgG [1:2000]	Vector Laboratories

3.1.5. Kits

GeneChip Mouse Genome 430A 2.0 oligonucleotide microarray	Affymetrix
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce

3.2. Methoden

3.2.1. Der Inzuchtstamm C57BL/6

Der Inzuchtstamm C57BL/6 wurde 1921 von C.C. Little durch Paarung von Tieren aus Abby Lathrops Zucht entwickelt. Die in unseren Experimenten verwendeten Tiere stammen von Charles River, Bad Königshofen. Sie wurden in den Tierställen des Instituts für experimentelle Neurologie der Charité Universitätsmedizin nach den Richtlinien für Versuchstiere gehalten. Für Experimente dieser Doktorarbeit wurden 8-10 Wochen alte, männliche C57Bl/6 Mäuse verwendet.

3.2.2. Isolation der neuronalen Vorläuferzellen aus der murinen SVZ

Die Isolation, Kultivierung und Differenzierung der Progenitorzellen erfolgte nach dem Protokoll von Galli u.a. (Galli, Gritti, und Vescovi 2008). Die murinen NPCs wurden aus der subventrikulären Zone, welche sich in der lateralen Wand der Seitenventrikel befindet, isoliert.

Pro Ansatz wurden 3-5 Mäuse verwendet. Diese wurden mit Isofluran anästhesiert und dekapitiert. Das Gehirn wurde aus der Kalotte präpariert und zweimal in eiskaltem 1 x PBS gespült. Hiernach wurde eine dünne Schicht um die Seitenventrikel präpariert, welche die SVZ beinhaltete. Diese wurde in kleine Stücke geschnitten und in ein Falcon-Röhrchen mit der Papain-DNase-Lösung überführt. Darin wurden die Stücke für 30 min bei 37 °C im Wasserbad enzymatisch verdaut. Das weitere Vorgehen beinhaltete die dreimalige mechanische Dissoziation

der Gewebestücke. Zunächst wurden diese für 10 min bei 100 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die verbliebenen Zellen wurden in 3 ml Ovomukoidlösung resuspendiert und durch eine im Bunsenbrenner abgerundete Pasteurpipette aus Glas zum ersten Mal mechanisch dissoziiert. Hiernach erfolgte die erneute Zentrifugation der Gewebestücke für 10 min bei 100 g. Nach Absaugen des Überstandes unter Belassen von 500 µl konnte das Pellet mit einer 200 µl Eppendorfpipette zum zweiten Mal mechanisch dissoziiert werden. Im letzten Schritt wurden die Zellen nach Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium bei 15 g für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Zellen in Zellkulturmedium mit Wachstumsfaktoren resuspendiert. Nun konnte die Zellsuspension in einer Dichte von $3,5 \times 10^3$ Zellen in 2 ml Medium mit Wachstumsfaktoren pro *well* ausgesät werden. Es wurden *ultra low attachment 6-well* Platten verwendet um ein Anheften der Zellen an die Platten zu verhindern. Die Zellen wurden dann bei 37 °C und 5 % CO₂ Luftgehalt inkubiert.

3.2.3. Subkultivierung der Neurosphären

Um neuronale Vorläuferzellen über mehrere Generationen zu kultivieren, wurde serumfreies Medium mit den Wachstumsfaktoren *EGF* und *FGF*, *ultra low attachment flasks* und eine geringe Zelldichte in den *wells* verwendet. Unter diesen Bedingungen proliferieren die neuronalen Vorläuferzellen unter Bildung von Neurosphären, wohingegen differenzierte Zellen sterben. Im Rahmen der Passagen wurden die Neurosphären mechanisch dissoziiert, wodurch sich der Zellverband auflöst. Durch erneute Kultivierung der Zellen entstanden dann neue Generationen von Neurosphären mit einer erhöhten Anzahl von NPCs. Der Abstand zwischen den Passagen betrug 7 Tage. Zum Zeitpunkt der Passage lag die Größe der Sphären zwischen 100 µm und 300 µm.

Zur Passage der Zellen wurden diese zunächst in ein Falconröhrchen aufgenommen und bei 100 g für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde bis auf einen ca. 250 µl großen Rest verworfen und die Zellen mit einer 200 µl Eppendorf Pipette mechanisch dissoziiert. Nach Bestimmen der Zellzahl sowie Identifikation toter Zellen mit Hilfe von Trypan in der Neubauer Zählkammer wurden die Zellen in einer Dichte von $3,5 \times 10^3$ Zellen in 2 ml Medium mit Wachstumsfaktoren pro *well* ausplattiert. Die Zellen wurden dann bei 37 °C und 5 % CO₂ Luftgehalt inkubiert. Am Tag 4 nach der Passage wurden 0,7 ml Medium mit Wachstumsfaktoren pro *well* zu den Zellen gegeben. Die Experimente wurden mit Neurosphären der Passage 3-4 durchgeführt.

3.2.4. Differenzierungsassay

Aufgrund der Multipotenz der Stammzellen können sich diese unter geeigneten Bedingungen in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren. In den Experimenten dieser Arbeit wurde die Differenzierung durch ein Überführen der Zellen auf eine haftende Unterlage sowie den Entzug von Wachstumsfaktoren induziert. Der Entzug der Wachstumsfaktoren erfolgte sukzessiv, um ein frühzeitiges Sterben der Zellen zu verhindern.

Um adhärenzte Bedingung für die Differenzierung zu gewährleisten, wurden Glasplättchen mit einem Durchmesser von 12 mm in eine 24 *well* Zellkulturplatte gegeben. Dort wurden sie für 2h bei Raumtemperatur (RT) mit 500 µl 5 % Poly-L-Lysin beschichtet, danach 3 Mal mit 1 x PBS gewaschen und schließlich mit 500 µl Medium bedeckt. Die Neurosphären wurden in ein Falcontube überführt, für 10 min bei 100 g zentrifugiert und das Medium bis zu einem Überstand von ca. 250 µl abgesaugt. Hiernach wurden die Neurosphären mit einer 200 µl Eppendorfpipette dissoziiert. Die Zellen wurden in der Neubauer Zählkammer gezählt und in einer Dichte von 20.000 Zellen in 150 µl Medium pro *well* auf die Glasplättchen gegeben. Die Konzentration von *EGF* und *FGF-2* betrug für 4 Tage 1/5 der Aufgangskonzentration, nach 4 Tagen wurde das Medium durch wachstumsfaktorfreies Medium ersetzt. Die Zellen wurden an Tag 4 oder an Tag 7 mit 4 % PFA in PBS für 12 min fixiert und dann 2 Mal mit 1 x PBS gewaschen. Hiernach konnten sie immunhistochemisch behandelt werden.

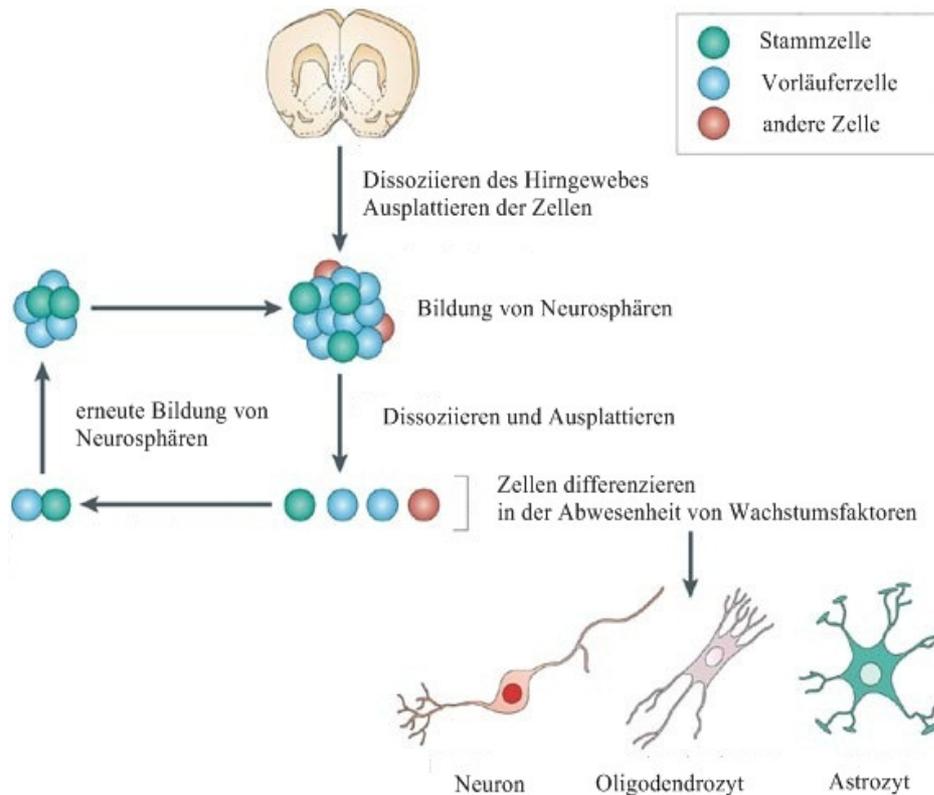


Abb. 5 zeigt schematisch die Isolation und Kultivierung/Subkultivierung neuronaler Progenitorzellen. Die Zellen differenzieren in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren und auf einer adhärennten Unterlage in Astrozyten, Neurone und Oligodendrozyten. Modifiziert nach Chojnacki u.a. (Chojnacki, Mak, und Weiss 2009).

3.2.5. Proliferationsassay

Die Proliferationsrate der Zellen unter dem Einfluss verschiedener Kaliumkanalblocker wurde mittels BrdU-Assay bestimmt. BrdU ist ein chemisches Analog des Thymidins und wird während der S-Phase des Zellzyklus in neugebildete DNA eingebaut. Somit dient es als Marker für proliferierende Zellen.

Zunächst wurden die Zellen mit 20 μ M BrdU für eine Stunde inkubiert. Hiernach wurde der BrdU-haltige Mediumüberstand verworfen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. In der Sayk-Kammer wurden die im Medium schwebenden Neurosphären auf einen Objektträger gebracht. Hierzu wurden die Neurosphären zunächst in ein Falconröhrchen transferiert und für 10 min bei 100 g zentrifugiert. Das überschüssige Medium wurde entfernt, jedoch so viel belassen, dass pro Sayk-Kammer 700 μ l Medium mit 10.000 Zellen eingefüllt werden konnte. In der Sayk-Kammer wurde mit Hilfe eines Filterpapiers das Medium aufgesogen, die Zellen hingegen verbleiben als Sediment auf dem Objektträger. Nun erfolgten drei Waschschr

PBS. Daraufhin wurden die Zellen für 20 min mit 4 % PFA auf dem Objektträger fixiert. Hiernach wurde das PFA durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt.

Zur Darstellung des BrdUs wurden die Objektträger zunächst für 30 min mit 2 M Salzsäure behandelt um die DNA zu denaturieren. Nach Entfernen der Salzsäure wurden die Objektträger drei Mal mit Boratpuffer und hiernach drei Mal mit PBS gewaschen. Nach einer 30-minütigen Präinkubation in der Primärantikörperlösung wurde der Anti-BrdU Erstantikörper für 36 h auf den Objektträger gegeben. Nach erneutem 3-fachem Waschen mit PBS und Präinkubation in PBS-A für eine Stunde konnte der Zweitantikörper hinzugegeben und für 12 h inkubiert werden. Die Zellen auf dem Objektträger wurden dann mit DAPI Medium fixiert und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Um die Proliferationsrate in % zu bestimmen wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Proliferationsrate in \%} = \frac{\text{Anzahl der proliferierenden Zellen (BrdU positiv)}}{\text{Anzahl der gesamten Zellen (DAPI positiv)}} \times 100$$

Die Kaliumkanalblocker wurden 24 h vor Zugabe von BrdU zu den Zellen hinzugegeben. Hierzu wurden folgende finale Konzentrationen verwendet: 10 nM Spermine, 1 µM Glibenclamid, 20 nM Agitoxin, 200 nM Tertiapin.

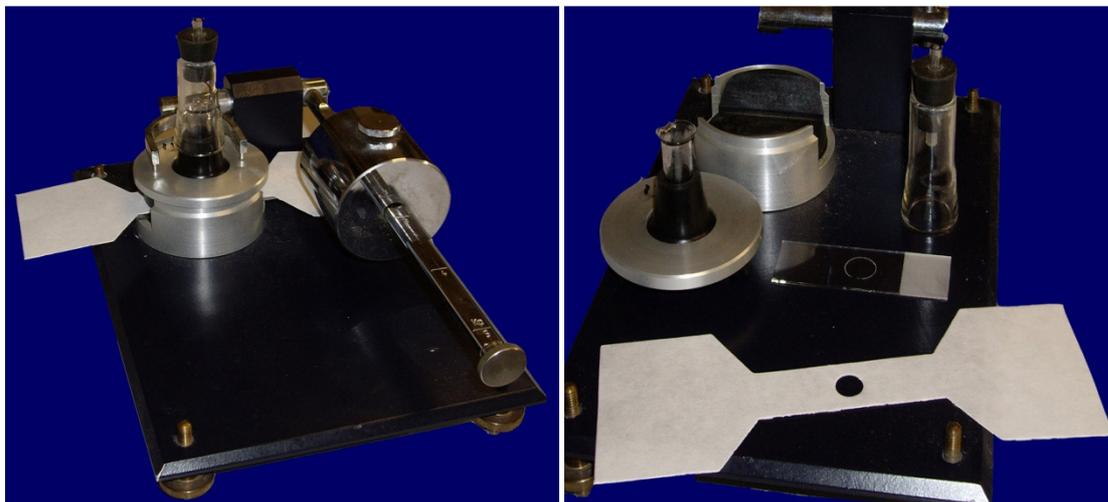


Abb. 6 zeigt die Sayk Kammer. In der Sayk-Kammer wird mit Hilfe eines Filterpapiers das Medium aufgesogen, die Zellen hingegen verbleiben als Sediment auf dem Objektträger.

3.2.6. Microarray Analyse

Mit Hilfe eines DNA-Microarray kann die mRNA einer Vielzahl von Genen simultan bestimmt werden. Zunächst wird die mRNA in cDNA transkribiert. Die Detektion erfolgt dann über

komplementäre Hybridisierung der mit Radioisotopen oder Fluoreszenzfarbstoffen markierten cDNA mit den Sonden des DNA-Arrays.

Um die Genexpression der Kaliumkanäle zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten zu analysieren, wurden Zellen einer identischen Subkultur am 0. Tag (Neurosphären) sowie nach 7 Tagen Differenzierung geerntet. Diese NPCs wurden dann pelletiert und die gesamte RNA wurde mit Hilfe von Trizol aus dem Gewebe extrahiert. Die RNA aus drei verschiedenen Versuchsansätzen wurde gepoolt. Insgesamt wurden dann 5 µg RNA für den *GeneChip Mouse Genome 430A 2.0 Oligonucleotide Microarray* eingesetzt. Mit dem Chip kann das Expressionsniveau von über 14.000 gut charakterisierten Mausgenen analysiert werden. Die Markierung der RNA, Hybridisierung sowie die Berechnung der Geneexpressionslevel wurden anhand des Herstellerprotokolls im Labor für funktionelle Genomforschung durchgeführt. Das Experiment wurde von Kollegen im Labor für funktionelle Genomforschung durchgeführt.

3.2.7. Immunzytochemie

Das Prinzip der Immunzytochemie beruht auf der Verwendung von spezifischen Antikörpern. Bei der hier verwendeten indirekten Immunzytochemie detektiert der Primärantikörper ein bestimmtes Protein auf einer Zelle. Mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist, wird der Primärantikörper sichtbar gemacht. Zunächst wurden die auf dem Objektträger/Glasplättchen fixierten Zellen drei Mal mit PBS gewaschen, gefolgt von einer 30-minütigen Präinkubation in der Primärantikörperlösung. Der Primärantikörper wurde in der Primärantikörperlösung aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Objektträger drei Mal mit PBS gewaschen und für 30 min mit PBS-A geblockt. Der ebenfalls in PBS-A gelöste Sekundärantikörper wurde nun für 8 h bei 4 °C hinzugegeben. Die Objektträger wurden anschließend mit PBS gewaschen und im Dunkeln mit *Vectashield Mounting Medium mit DAPI* eingebettet. Die Färbungen konnten unter dem Fluoreszenz- oder Konfokalen Mikroskop bewertet werden. Als Negativkontrollen dienten Färbungen, bei denen der Primärantikörper weggelassen wurde.

3.2.8. Perfusionsfixation und Immunhistochemie

Die adulten Mäuse wurden mit 0,6 mg/ml Xylazin und 3 mg/ml Ketamin intraperitoneal tief anästhesiert und nach Verlust des Schmerzempfindens thorakotomiert. Nun wurde das rechte Atrium inzidiert sowie der linke Ventrikel mit einer Spritze punktiert. Durch diese wurden die Tiere zunächst mit 20 ml PBS und hiernach mit 20 ml 4 % Paraformaldehyd transkardial

perfundiert. Die Hirne wurden entnommen und für weitere 24 h in 4 % PFA nachfixiert und anschließend in 30 % Succrose kryokonserviert. Nach Absinken der Hirne in der Succroselösung wurden sie bei -70 °C in Hexan Schock-Gefroren. Das gefrorene Gewebe konnte dann am Kryostaten in 20 µm große Scheiben geschnitten werden, welche in 30 % Succrose aufbewahrt wurden. Für die Immunhistochemie erfolgten Waschschrte, Präinkubation sowie Behandlung mit dem Primär- und Sekundärantikörper wie im Protokoll für Immunzytochemie beschrieben. Die Hirnschnitte schwebten hierbei frei in den *wells* von 24-*well* Platten. Die Schnitte wurden anschließend mit *FluorSaveTM Mounting Medium* auf einen Objektträger gebracht und wurden unter dem Fluoreszenz- oder Konfokalen Mikroskop befundet. Als Negativkontrollen dienten auch hier Färbungen mit dem sekundären Antikörper ohne Verwendung des Primärantikörpers.

3.2.9. ABC-DAB/Ni-Färbung

Die Darstellung des Primärantikörpers erfolgt bei dieser Methode mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und dem Farbstoff DAB.

Zunächst wurden die Schnitte 3 Mal für 10 min in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Präinkubation für 30 min in Primärantikörperlösung bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper wurde in der Primärantikörperlösung so verdünnt, dass er, im Vergleich zur Fluoreszenzfärbung, in der halben Konzentration vorlag. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach drei erneuten Waschschrten mit PBS 30 min in PBS-A blockiert. Der biotinylierte Sekundärantikörper wurde ebenfalls in PBSA aufgenommen, zu den Schnitten gegeben und für 8 h bei 4°C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrten mit PBS wurde der Avidin-Biotin Komplex hinzugegeben, welcher für weitere 6 h inkubierte. Nach drei Waschgängen mit PBS wurden die Schnitte für 15 min in 350 µl DAB-Lösung und 0.3 % Ammoniumnickelsulfat präinkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 0,015 % Wasserstoffperoxid gestartet und je nach Färbeverhalten des Schnittes nach bis zu 3 Minuten durch Absaugen der Lösung und Zugabe von PBS gestoppt. Nachdem die Schnitte mit PBS gewaschen wurden, konnten sie auf Objektträger gebracht werden, wo sie an der Luft für ca. 30 min trockneten. Hiernach erfolgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe und in Xylol für 10 Minuten. Danach wurden die Schnitte mit Entellan[®] eingedeckt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

3.2.10. Western Blot

3.2.10.1. Proteinisolierung

Die Neurosphären wurden geerntet, in 1,5 ml große Eppendorf-Gefäße überführt und mit 500 µl eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Das PBS wurde bei 300 g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert und die Zellen mit 200 µl Lysepuffer für 10 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde anschließend bei 21000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfgefäße aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aliquotes bei – 20 °C gelagert.

3.2.10.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mittels BCA Protein Assay bestimmt. In Rahmen der Biuret Reaktion reagieren Proteine in alkalischer Lösung mit Cu^{2+} Ionen und es entsteht ein farbiger Komplex. Die hierdurch hervorgerufene Absorptionsänderung ist proportional zur Proteinkonzentration.

Um das Maß der Farbreaktion zu quantifizieren wurde eine Eichkurve mit bovinem Serumalbumin hergestellt. Hierzu wurde das Albumin in 8 verschiedenen Konzentrationen (2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0 mg/ml) in eine 96 well Mikrotiterplatte gegeben. Das Proteinlysate wurde in geeigneter Verdünnung mit 200 µl Reagenz A+B des Herstellerkits versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Am ELISA-Photometer wurden nun die Extinktionen bei 550 nm gemessen. Die Konzentration der Proteinprobe konnte dann anhand des Albuminstandards ermittelt werden.

3.2.10.3. SDS – Page

Die SDS-Page wird zur Trennung von Proteingemischen verwendet. Als Trennmedium dient ein Polyacrylamidgel, welches sich in einer Elektrolytlösung befindet. Die Proteinproben werden mit SDS (Natriumdodecylsulfat) behandelt, einem anionischen Tensid, welches die Eigenladung der Proteine überdeckt, so dass diese eine einheitliche negative Ladung erhalten. An das Gel wird eine elektrische Spannung angelegt, was die Wanderung der Proteine in Richtung Kathode zur Folge hat. Das Gel wirkt nun wie ein Sieb – kleine Proteine wandern schneller als große. Somit können die Proteine anhand ihrer Größe getrennt werden.

Zunächst wurden die Proteinproben 1:1 mit dem Probenpuffer gemischt und für 3 min bei 95 °C denaturiert. Danach wurden 20 µg Proteinprobe pro Laufreihe auf das 12%-ige Polyacrylamidgel aufgetragen. Hierbei wurde die diskontinuierliche SDS-Page angewendet – die Proben wurden im Sammelgel aufkonzentriert, die Trennung erfolgte im Trenngel. Die Proben wurden mittels

Elektrophorese bei 120 V für 60 – 90 min in 1x Lämmli Puffer getrennt. Die Laufgeschwindigkeit konnte mittels eines Kaleidoskop Proteinmarkers überprüft werden. Dieser diente später auch der Zuordnung der Größe der Proteine.

3.2.10.4. Blotten

Mit Hilfe des Western Blots können die zuvor in der SDS-PAGE getrennten Proteine durch senkrechtes Anlegen einer elektrischen Spannung von dem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen werden. Der Nachweis der Proteine erfolgt nun mit spezifischen Antikörpern.

Die Proteine wurden bei 200 mA für 45-60 min mittels *Semidry*-Verfahren auf die Nitrozellulosemembran gebロットet. Dafür wurden Gel und Whatmann Blotting Papier in Transferpuffer getränkt und wie folgt von Anode zu Kathode geschichtet: 2 Lagen Whatmann Blotting Papier, Gel, Membran, 2 Lagen Whatmann Blotting Papier. Nach dem Transfer wurde die Membran drei Mal für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen und dann mit 5%-igem Milchpulver in TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Der Primärantikörper wurde in 3% Milchpulver in TBST gelöst und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte nach drei Waschschritten mit TBST die Zugabe des *horseradish peroxidase* (HRP) -konjugierten Sekundärantikörper in 1% Milchpulver in TBST für 2h. Nachdem die Membran weitere drei Male in TBST gewaschen wurde, konnte der Blot mithilfe des Chemilumineszenz Reagenz auf einem Kodak-Fotofilm entwickelt werden. Die Belichtungszeit betrug 2-10 min.

3.2.11. Nukleofektion

Die Nukleofektion wurde nach dem Protokoll für murine neuronale Stammzellen des Herstellers (Amaya biosystems) durchgeführt. Bei der Nukleofektion wird durch einen elektrischen Impuls eine reversible Porenbildung in der Zellmembran induziert. Hierdurch kann extrazelluläre DNA beispielsweise in Form von Plasmiden in die Zelle aufgenommen werden. Weiterhin werden für jede Zelllinie optimierte Puffer verwendet um zum einen die Transfektionsrate zu erhöhen aber auch die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen zu optimieren.

Zunächst wurden die cDNAs von Kir2.1 und Kir2.3 in den pEGFP-C1 Vektor geklont (Clontech, Hamburg, Germany). Zur Transfektion des so gewonnenen Plasmids wurden die Neurosphären geerntet, für 10 min bei 100 g zentrifugiert und das überstehende Medium verworfen. Es wurden 4×10^6 Zellen zusammen mit Plasmid DNA (5,6 µg für Kir2.1 und 4,5 µg für Kir2.3) und 100 µl Nukleofektionslösung des Herstellers in eine Amaya zertifizierte Küvette gegeben. Nun erfolgte die Elektroporation im Nukleofektionsgerät mit dem Programm A-33. Hiernach konnten 3×10^4

Zellen in 2 ml Medium mit Wachstumsfaktoren pro *well* in den *ultra low attachment* Kulturflasks ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert werden.

4. Ergebnisse

4.1. Der Neurosphärenassay

Nach dem Protokoll von Galli u.a. (Galli, Gritti, und Vescovi 2008) gelang es, die NPCs über mehrere Generationen zu kultivieren. Unter Verwendung der Wachstumsfaktoren *FGF* und *EGF* proliferierten die NPCs und bildeten Neurosphären (Abb. 7). Die Zellen der Sphären zeigten morphologisch keine neuronalen oder astrozytären Charakteristika. Wie bereits von Reynolds und Weiss (Reynolds und Weiss 1992) beschrieben, waren in der immunzytochemischen Charakterisierung die Mehrzahl der Zellen in der Sphäre positiv für Nestin, einen Marker für neuroepitheliale Stammzellen (Abb. 8 A). Übereinstimmend mit der Annahme, dass die neuronalen Progenitorzellen astrozytären Ursprungs sind, war die Mehrzahl Nestin-positiver Zellen auch immoreaktiv für GFAP (Abb. 8 B/C). Die gemeinsame Expression von GFAP und Nestin als Zeichen für neuronale Vorläuferzellen wurde bereits *in vitro* von Yasuda u.a. (Yasuda, Bartlett, und Adams 2008) und mehrfach *in vivo* beschrieben (Ming und Song 2005; Riquelme, Drapeau, und Doetsch 2008).

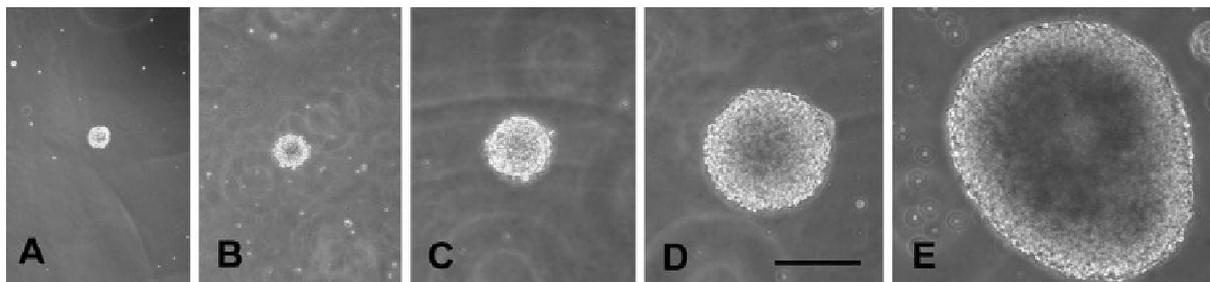


Abb. 7 Die aus der subventrikulären Zone isolierten neuronalen Vorläuferzellen proliferieren im Neurosphärenassay und bilden primäre Neurosphären (A-E). Diese nehmen zunächst an Größe zu (A-C) um sich ab einer bestimmten Anzahl von Zellen (nach ca. 21 Zellteilungen) von der Unterlage zu lösen und frei im Medium zu schweben (D-E).

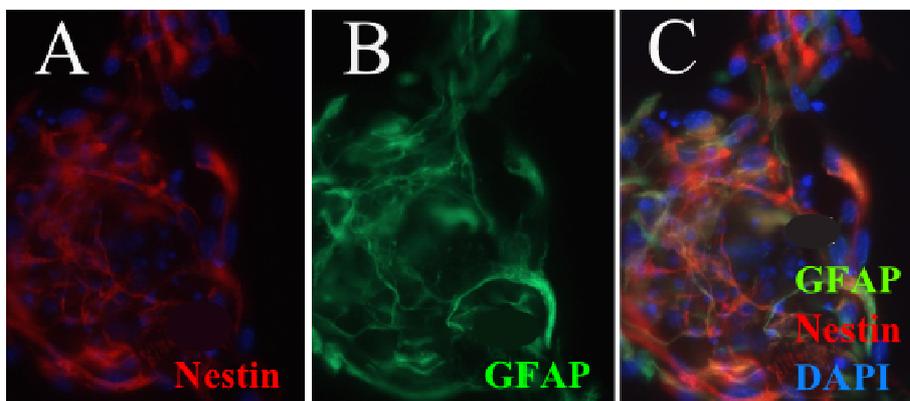


Abb. 8 Die immunhistochemische Färbung der Zellen in den Neurosphären zeigt, dass die Mehrzahl der Zellen immunoreaktiv für Nestin (A) und GFAP (B) ist. Vergrößerung 1:100.

4.2. Der Differenzierungsassay

Die Zellen der Neurosphären differenzieren sich bei Entzug der Wachstumsfaktoren sowie Überführung auf eine haftende Unterlage. Nach vier Tagen der Differenzierung zeigte sich in der immunzytochemischen Untersuchung folgendes Verhältnis: GFAP/Nestin-positive Zellen 95% (Abb. 9 A, Abb. 10), DCX-positive Zellen 2% (Abb. 9 B) sowie RIP-positive Zellen 1% (Abb 9 C).

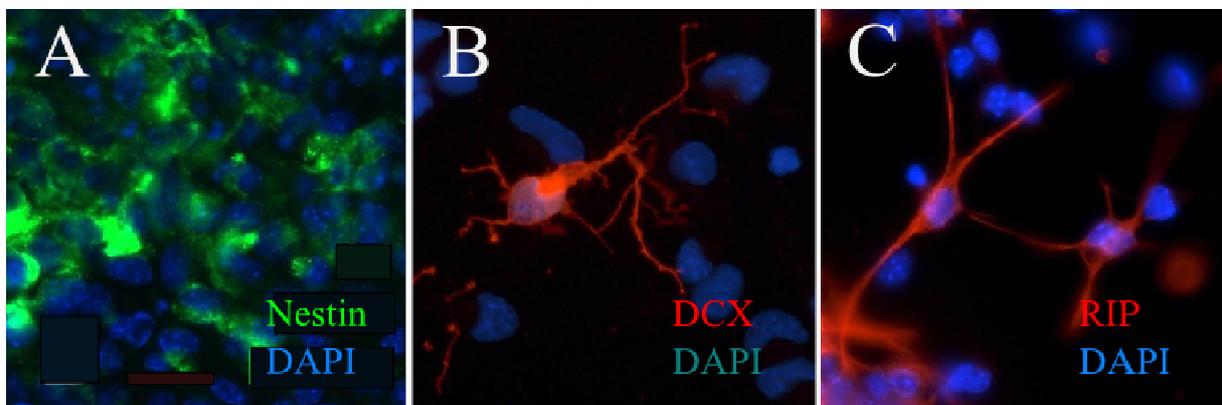


Abb. 9 Neuronale Stammzellen differenzieren sich in Nestin-positive Zellen (A), DCX-positive Zellen (B) sowie RIP-positive Zellen (C). Die Zellen dieser Abbildung befinden sich am 4. Tag der Differenzierung. A Vergrößerung 1:100, B und C Vergrößerung 1:400.

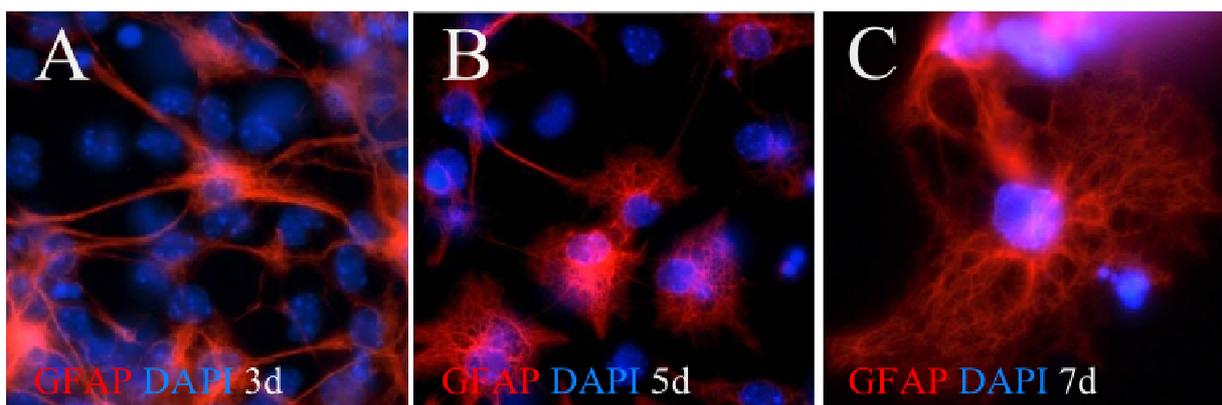


Abb. 10 GFAP-positive Zellen stellen in den ersten Tagen der Differenzierung die Mehrzahl von Zellen in der Neurosphäre dar (A-C). Vergrößerung A und B 1:200, C 1:400.

4.3. Kaliumkanalgenexpression der NPCs

Der Microarray wurde freundlicherweise durch Kollegen im Labor für funktionelle Genomforschung durchgeführt. Um die Expression der Kaliumkanalgene der NPCs zu untersuchen, wurde ein Microarray genutzt. Hierbei wurde mRNA verwendet, welche zum Einen aus undifferenzierten Zellen der Neurosphären und zum Anderen aus Zellen nach 7d Differenzierung extrahiert wurde. Aufgrund der Heterogenität der Neurosphären war die Zellpopulation jedoch nicht homogen und so befanden sich auch post-mitotische Zellen sowie in ihrem Differentierungspotential eingeschränkte Vorläuferzellen in der untersuchten Zellpopulation. Im Microarray zeigten sich viele, jedoch nicht alle Kaliumkanalgene. Kir2.4, Kir7.1 und TASK3 fehlten beispielsweise (Abb. 11). Einige Mitglieder der Kaliumkanalklassen zeigten wiederum besonders hohe Transkriptionslevel wie Kir4.1, KCa2.2, TREK1, Kv4.2 und Kv3.1 (Abb. 11).

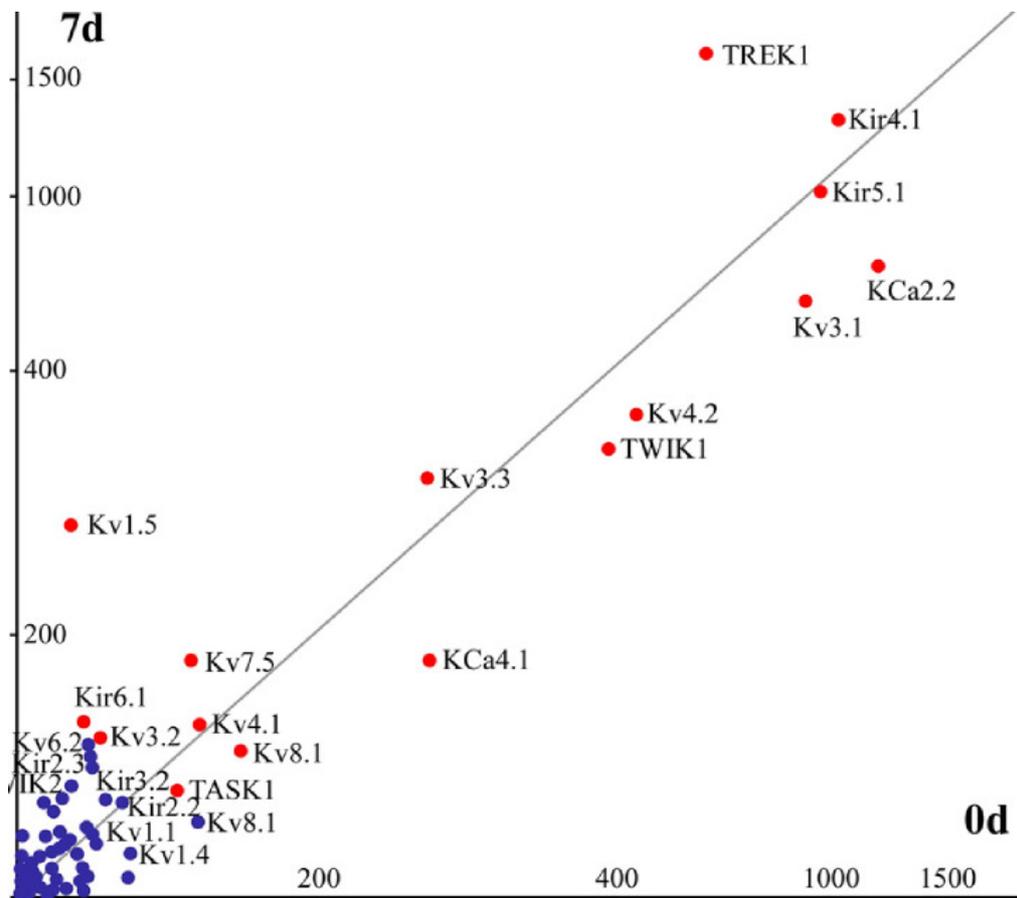


Abb. 11 Genexpression von Kaliumkanälen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der NPC-Differenzierung (0 d und 7 d). Die X/Y-Achse zeigt die relative Häufigkeit der jeweiligen mRNA. Die blauen Punkte repräsentieren die Abwesenheit der Kanal-mRNA, während die roten Punkten für die Anwesenheit stehen.

4.4. Immunhistochemische Untersuchung der Kaliumkanalexpression

Die immunhistochemische Untersuchung der Expression von Kaliumkanälen wurde zum Einen an den Vorläuferzellen im Neurosphärenassay durchgeführt. Hier wurden Zellen nach 4 Tagen Differenzierung genutzt. Zum Anderen wurde die Expression der Kanäle *in vivo* an Hirnschnitten, welche die Seitenventrikel beinhaltenen, analysiert. Neben der sich an der lateralen Wand der Seitenventrikel befindlichen subventrikulären Zone wurde die Expression selektierter Kanäle weiter entlang des RMS bis hin zum BO verfolgt (Abb. 12).

Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Kaliumkanäle wurde hauptsächlich durch das Vorhandensein spezifischer Antikörper bestimmt. So kamen neben einigen kommerziellen Antikörpern auch durch kompetitiven ELISA, Western Blotting sowie immunhistochemische Absorptionstests charakterisierte Antikörper zum Einsatz (Veh u. a. 1995; Prüss u. a. 2005; Thomzig u. a. 2005).

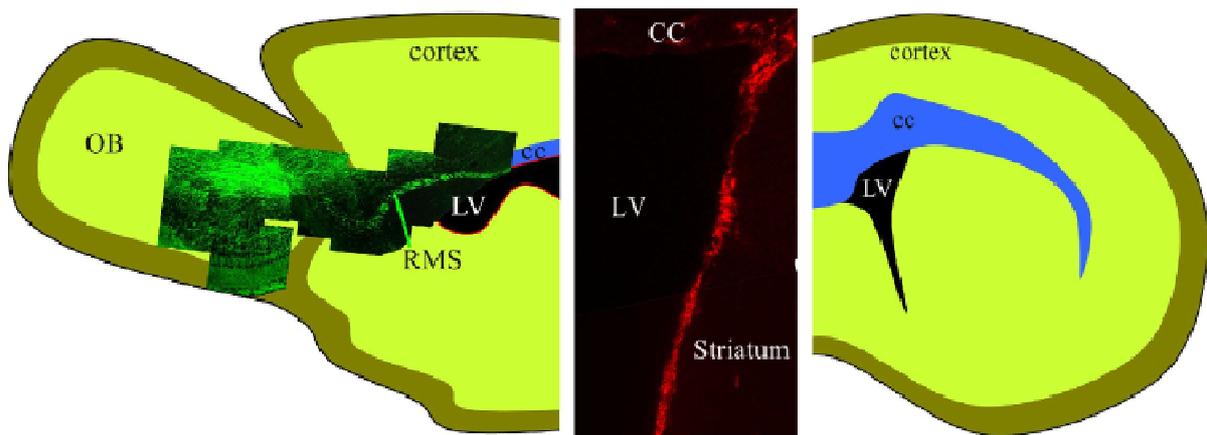


Abb. 12 Im sagittalen Schnitt durch das Maushirn lässt sich der Weg der Neuroblasten vom Seitenventrikel über den Rostralen Migratorischen Strom zum Bulbus Olfactorius darstellen. Die Neuroblasten wurden durch immunhistochemische Färbung von DCX dargestellt. cc-Corpus Callosum, LV-Seitenventrikel, OB-Bulbus Olfactorius, RMS-Rostraler Migratorischer Strom

Tabelle 2 Übersicht über die Expression der in dieser Arbeit immunhistochemisch untersuchten Kaliumkanäle in der subventrikulären Zone sowie im Neurosphärenassay

Kanal	SVZ			Neurosphärenassay		
	DXC	Nestin	Subependym	DXC	Nestin	GFAP
Kv1.1	-	-	-	-	-	-
Kv1.4	-	-	-	-	-	-
Kv1.5	-	-	-	-	-	-
Kv1.6	+	-	-	-	-	-
Kv4.2	-	-	+	-	-	-
Kv4.3	-	-	-	-	-	-
Kir1.1	-	-	-	-	-	-
Kir2.1	-	-	-	-	-	-
Kir2.2	-	-	-	-	-	-
Kir2.3	-	-	-	-	-	-
Kir2.4	+	+	+	+	+	+
Kir3.1	-	-	-	-	-	-
Kir3.2	-	-	+	-	-	-
Kir4.1	-	+	+	-	+	+
Kir4.2	-	-	-	-	-	-
Kir5.1	-	-	+	-	-	-
Kir6.1	-	+	+	-	+	+
Kir6.2	-	-	-	-	-	-
Kir7.1	-	-	+	-	-	+
TASK1	-	-/+	+	-	+	+
TASK3	-	-/+	+	+	+	+
TWIK1	-	-	+	-	-	-
TWIK2	-	-	+	-	-	-
TREK1	+	-	+	-	+	+
TREK2	-	-	+	-	-	-
TRAAK	-	-	-	-	-	-

4.4.1. Kv-Kaliumkanäle

Obwohl im Microarray mehrere Kv-Kanalgene detektiert werden konnten (Abb. 11), waren nur wenige Kv-Kanäle mittels Immunhistochemie in der adulten SVZ detektierbar (Tabelle 2). In der Gruppe der hier untersuchten spannungsgesteuerten Kaliumkanäle zeigten Kv1.6 sowie Kv4.2 Immunoreaktivität in der subventrikulären Zone.

So konnte Kv1.6 in der SVZ (Abb. 13 A) und dem proximalen Teil des RMS (Abb. 13 B) auf DCX-positiven Zellen nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf des RMS zeigten diese Zellen jedoch keine Immunoreaktivität mehr für den Kanal (Abb. 13 C). Die Expression von Kv1.6 blieb auf DCX-positive Zellen beschränkt (Abb. 13 A) und konnte nicht auf Nestin-positiven Zellen nachgewiesen werden (Abb. 13 B). Die Expression von Kv4.2 beschränkte sich auf die subependymalen Zellen entlang der Wand des Seitenventrikels (Abb. 14 A-C'').

Immunhistochemisch hob sich der Kanal deutlich von den DCX-positiven Neuroblasten ab, welche in der subventrikulären Zone angesiedelt sind (Abb. 14 B-C''). Weder Kv4.3 (Abb. 15 A) noch Kv1.2 (Abb. 16 A) ließen sich immunhistochemisch in der subventrikulären Zone oder im Neurosphärenassay nachweisen. Dennoch gelang es, die zerebrale Expression beider Kanäle im selben Hirnschnitt nachzuweisen. So zeigte sich für Kv1.2 eine Expression auf kortikalen Neuronen (Abb. 16 B), Kv4.3 konnte in der Raphe und im Kortex nachgewiesen werden (Abb. 15 B - C''). Somit diente für Kv4.3 und Kv2.1 derselbe Hirnschnitt als Positivkontrolle des Antikörpers. Die Kanäle Kv1.1, Kv1.4 und Kv1.5 konnten weder im Hirnschnitt noch in den Neurosphären detektiert werden.

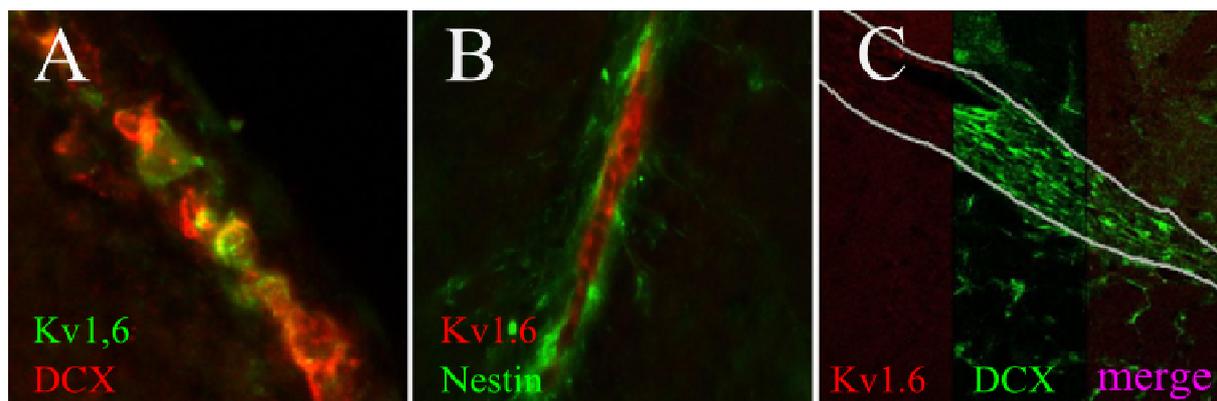


Abb. 13 Die Proteinexpression von Kv1.6 lässt sich auf DCX-positiven Zellen der SVZ (A) sowie im proximalen RMS (B) nachweisen, nicht jedoch im distalen RMS (C) Vergrößerung A 1:200, Vergrößerung B und C 1:100.

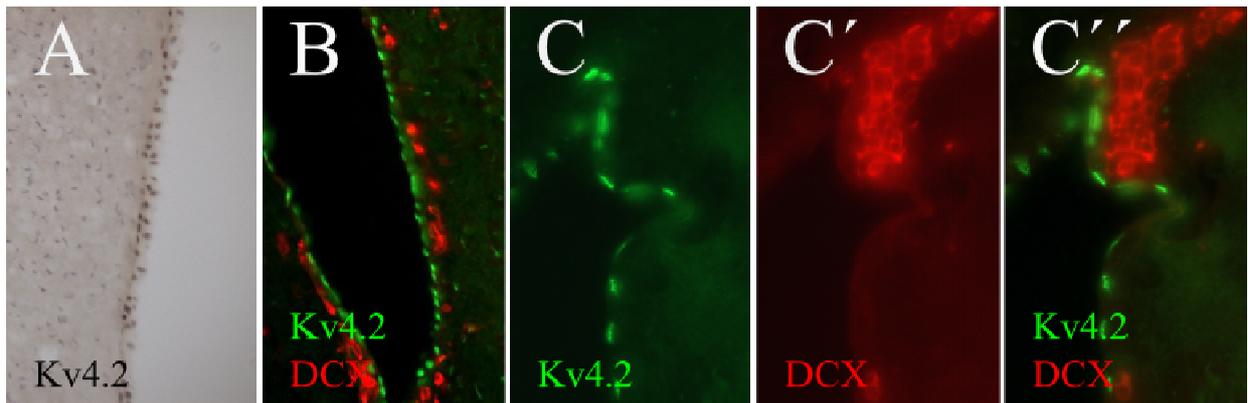


Abb. 14 Der Kaliumkanal Kv4.2 konnte auf den subependymalen Zellen des Seitenventrikels nachgewiesen werden (Abb. A-C), nicht jedoch auf DCX-positiven Zellen (Abb. B-C''). Vergrößerung A und C-C'' 1:200, Vergrößerung B 1:100.

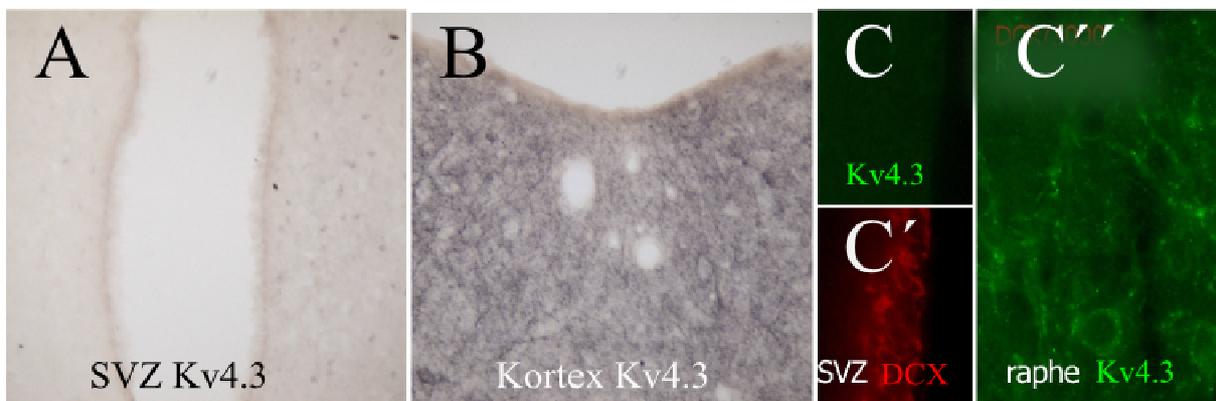


Abb. 15 In der subventrikulären Zone wird Kv4.3 nicht exprimiert (A/C). Im Kortex (B) sowie in der Raphe (C'') besteht jedoch eine starke Immunoreaktivität. Vergrößerung A und B 1:100, C und C'1:200, C'' 1:400.

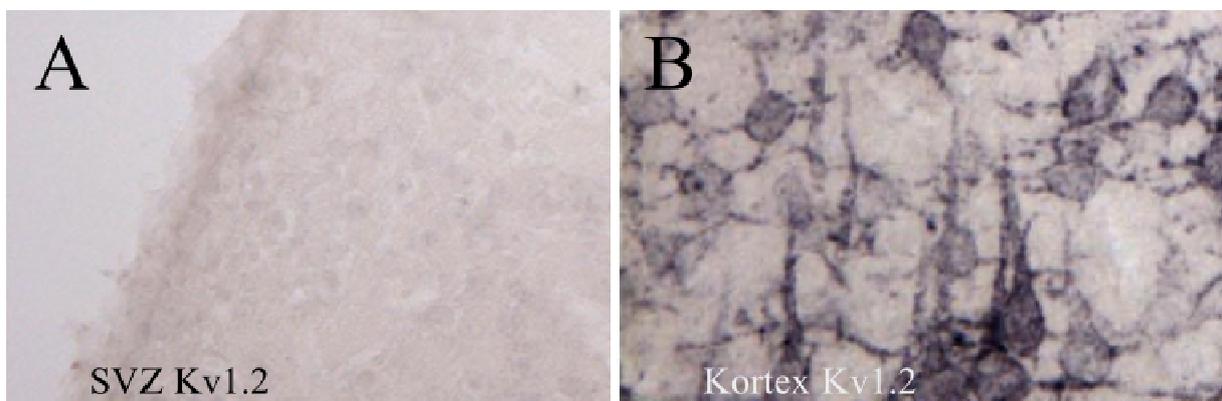


Abb. 16 Kv1.2 wird nicht in der SVZ exprimiert (A). Als Positivkontrolle dienten kortikale Neurone desselben Hirschnitts (B). Vergrößerung A 1:200, B 1:400.

4.4.2. Kir-Kaliumkanäle

Die Expression von Kir-Kanälen auf den neuronalen Vorläuferzellen zeigte ein differenziertes Muster. Viele der Kanäle (Kir1.1, Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3, Kir3.1, Kir4.2, Kir6.2) konnten weder in der SVZ noch in den Neurosphären detektiert werden. Um falsch negative Ergebnisse zu minimieren wurden zahlreiche Positivkontrollen durchgeführt. So konnten beispielsweise Kir2.1 und Kir2.3 weder in der SVZ noch in den Neurosphären nachgewiesen werden (Abb. 17 A/ Abb. 18 A). Nach der Transfektion der Neurosphären mit einem Plasmid zur Überexpression von Kir2.1 bzw. Kir2.3 Fusionsprotein mit GFP konnten die Kanäle auf den NPCs detektiert werden (Abb. 17 B/ Abb. 18 C). Darüber hinaus diente, für ausgewählte Kir-Kanäle, der jeweilige Hirnschnitt als interne Positivkontrolle. So zeigte sich eine Immunoreaktivität für Kir2.3 auf kortikalen Neuronen (Abb. 18 B), nicht jedoch auf den Zellen der SVZ (Abb. 18 A). Das Expressionsmuster des Kanals Kir2.4 in den Neurosphären entsprach dem Expressionsmuster in der SVZ. In den Neurosphären zeigte sich eine Expression auf den Nestin- und GFAP-positiven Vorläuferzellen (Abb.19 D). Darüber hinaus zeigten einige DCX-positive Zellen die Expression des Kanals (Abb.19 E). In der SVZ war Kir2.4 ebenfalls auf den Nestin-positiven Zellen am lateralen Rande des Seitenventrikels exprimiert (Abb.19 A). Auch DCX-positive Zellen wiesen Kir2.4-Immunoreaktivität auf, jedoch nicht alle (Abb.19 A/B). Die Westernblotanalyse mit Neurosphären der 3. Passage konnte Kir2.4 auf Proteinebene nachweisen (Abb. 19 C). Die Kanäle Kir6.1 und Kir4.1 zeigen ein ähnliches Expressionsmuster. In der SVZ waren die Kanäle auf subependymalen Zellen sowie Nestin- und GFAP- positiven Zellen exprimiert (Abb. 20 A/B und Abb. 21 A/B), jedoch nicht auf den DCX-positiven Neuroblasten (Abb. 20 C und Abb. 21 C). Dieses Muster lässt sich ebenfalls in den Neurosphären bestätigen (Abb. 20 D/E und Abb. 21 D-F). Kir3.2 und Kir5.1 zeigen in der SVZ ein ähnliches Verteilungsmuster. Hier sind sie auf der endymalen Zellschicht zu finden, welche den Seitenventrikel auskleidet. Auf DCX-positiven Zellen konnten die Kanäle nicht detektiert werden (Abb. 22 A-C und Abb. 23 A/B). Kir7.1 wird auf den endymalen Zellen sowie den Zellen des Plexus Choroideus exprimiert, nicht jedoch auf DCX-positiven Zellen (Abb. 24 A).

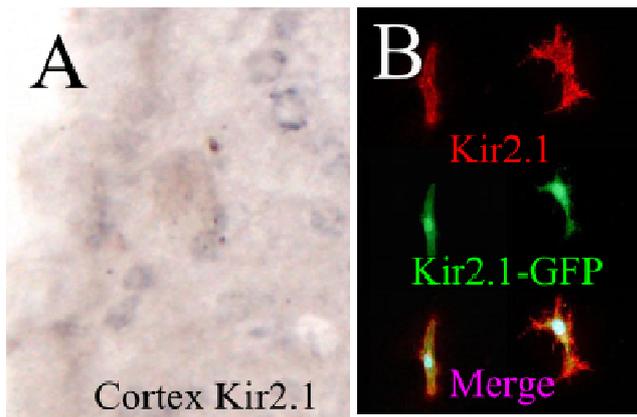


Abb. 17 Kir2.1 wird weder in der SVZ noch auf neuronalen Stammzellen exprimiert. Überexprimiert man den Kanal jedoch (B) kann er detektiert werden. Auch im Kortex fand sich Immunoreaktivität (A). Vergrößerung 400-fach. B 1:100.

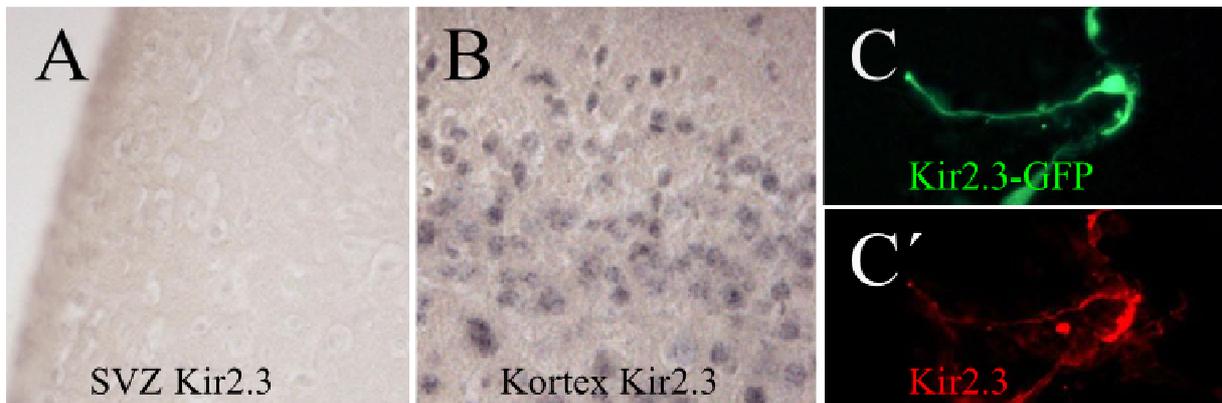
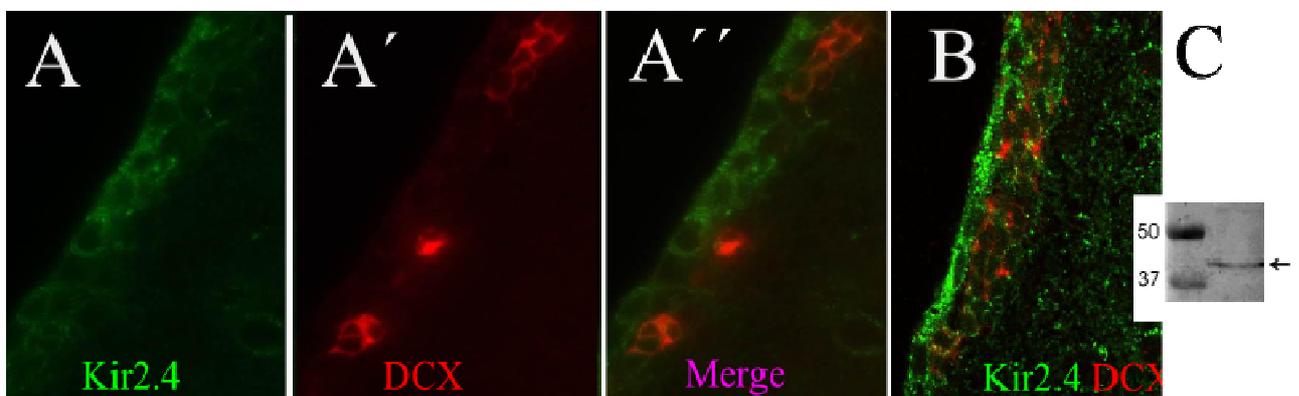


Abb. 18 Es zeigt sich keine Expression von Kir2.3 in der subventrikulären Zone (A). Als Positivkontrolle dient im selben Schnitt der Kortex, wo sich Kir2.3 auf Neuronen detektieren lässt (B). Nach erfolgreicher Transfektion mit Kir2.3-GFP gelingt der Nachweis von Kir2.3 auf den NPCs (C/C'). Vergrößerung A und B 1:200, C und C' 1:400.



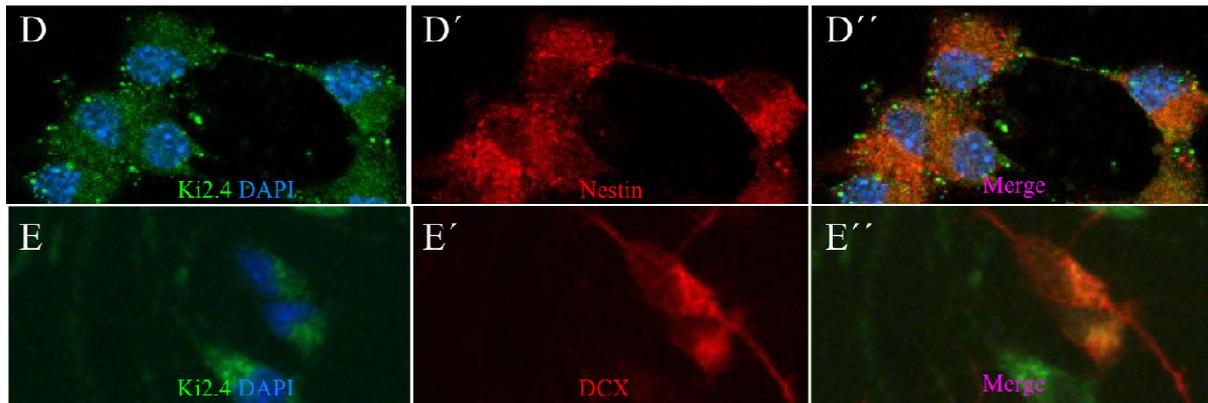


Abb. 19 Kir2.4 ist in der SVZ sowohl auf subependymalen Zellen (B) als auch auf Neuroblasten exprimiert (A). Auch im Western Blot konnte Kir2.4 auf Proteinebene nachgewiesen werden (C). Ein ähnliches Verhalten zeigt sich in den Neurosphären, wo der Kanal auf Nestin- und DCX-positiven Zellen nachgewiesen werden konnte (D/E). Vergrößerung A-B 1:200, Vergrößerung D-E'' 1:400.

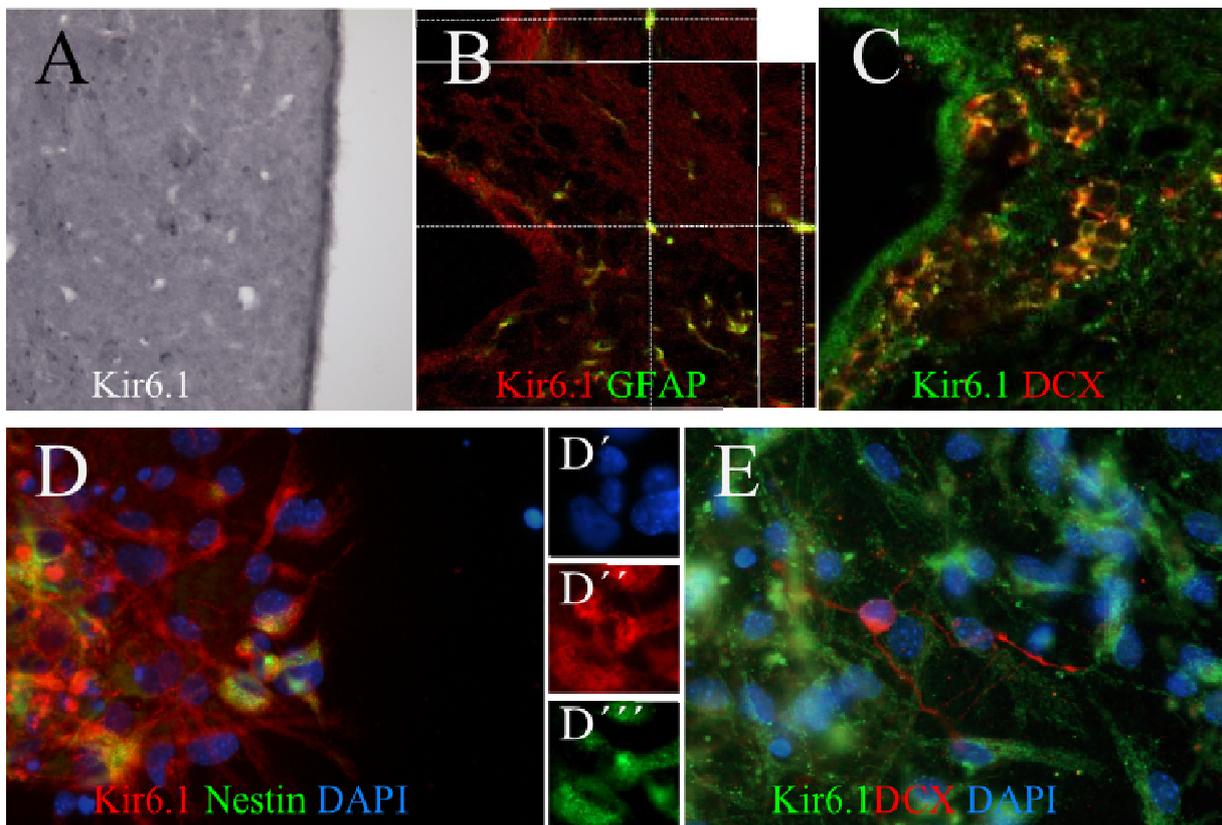


Abb. 20 Kir 6.1 ist in der subventrikulären Zone auf den subependymalen und GFAP-positiven Zellen exprimiert, nicht jedoch auf DCX-positiven Neuroblasten (A-C). In den Neurosphären zeigt sich ein ähnliches Expressionsmuster: Kir6.1 lässt sich auf GFAP- und Nestin-positiven Zellen nachweisen (D), nicht jedoch auf den DCX-positiven neuronalen Vorläufern (E). Vergrößerung Abb. A/B/C 1:200, D-E 1:400.

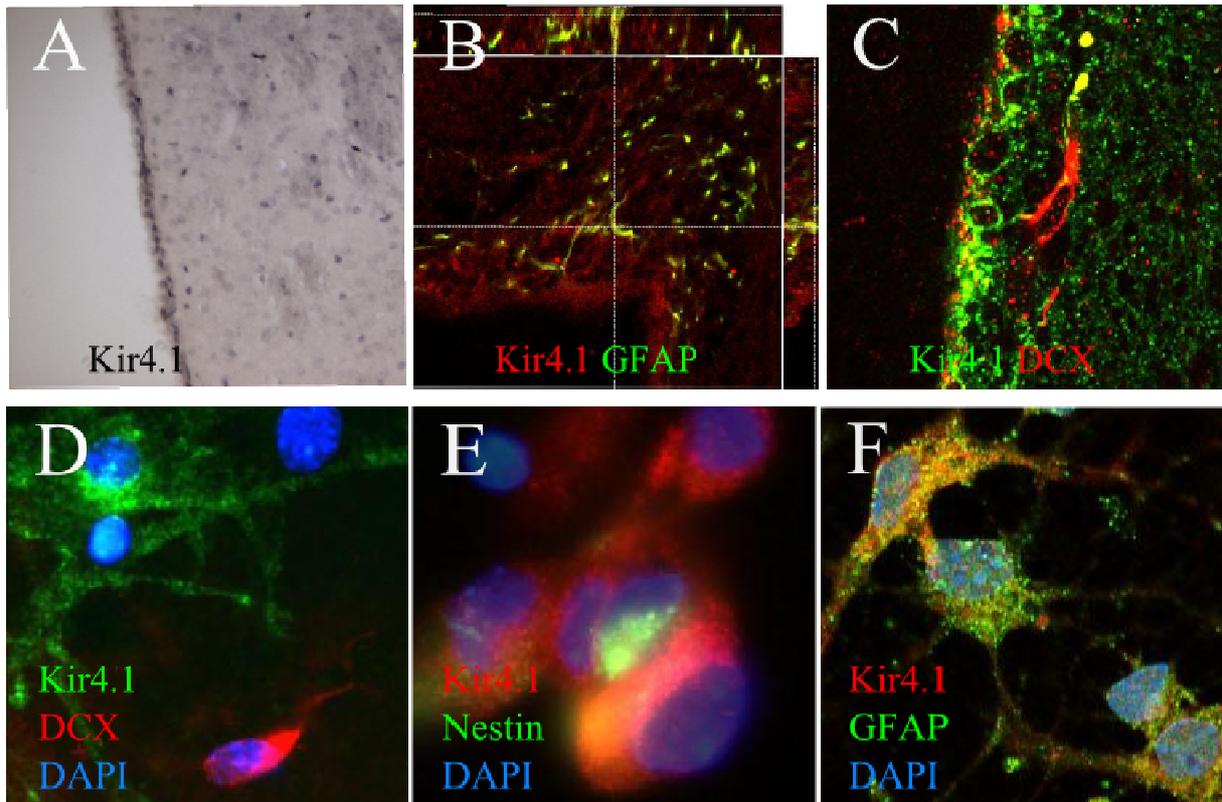


Abb. 21 Kir 4.1 wird auf den endymalen sowie GFAP-positiven Zellen der SVZ, nicht jedoch auf DCX-positiven Zellen exprimiert (A-C). In den Neurosphären wird der Kanal auf Nestin- und GFAP-positiven Vorläuferzellen exprimiert (E/F). Auf DCX-positiven Zellen wurde der Kanal nicht detektiert (D). Vergrößerung A 1:100, B und C 1:200, D-F 1:400.

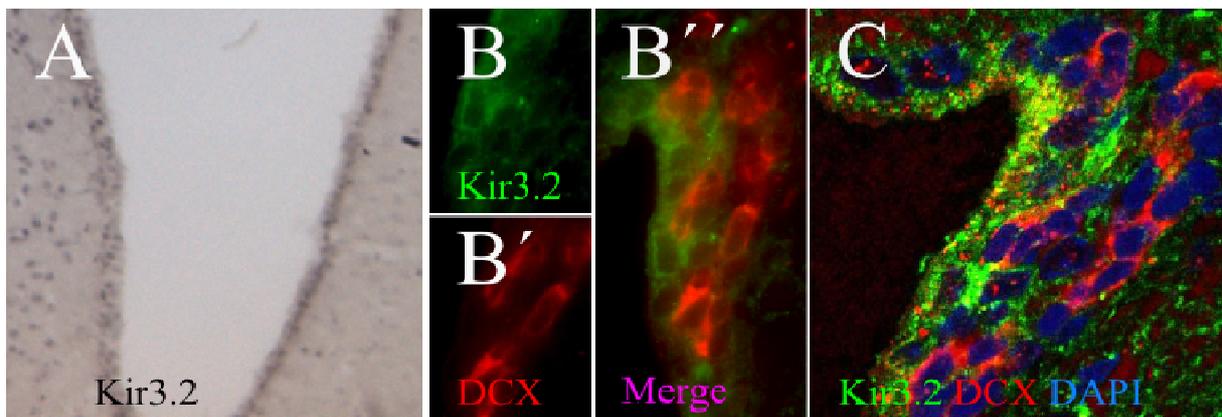


Abb. 22 Kir3.2 wird in der subventrikulären Zone ausschließlich auf endymalen Zellen exprimiert (A-C). Vergrößerung A 1:100, B-C 1:200.

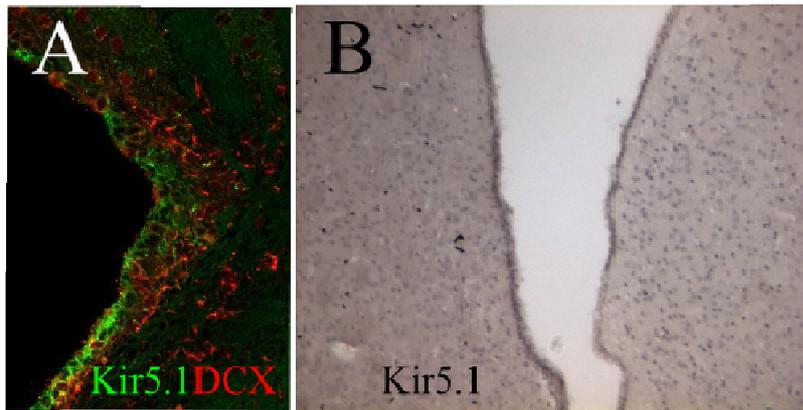


Abb. 23 Kir5.1 ist ein Kanal, welcher in der subventrikulären Zone auf ependymalen Zellen exprimiert wird. DCX-positive Zellen exprimieren den Kanal nicht (A/B). Vergrößerung A 1:200, B 1:100.

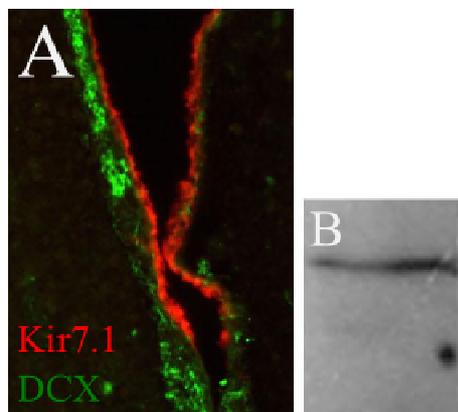


Abb. 24 Kir7.1 zeigt eine starke Immunoreaktivität auf ependymalen Zellen (A). Im Western Blot konnte der Kanal ebenfalls nachgewiesen werden (B). Vergrößerung A 1:100.

4.4.3. K2P-Kaliumkanäle

In der SVZ werden die K2P-Kanäle insbesondere auf den subependymal gelegenen Zellen exprimiert. TASK1 zeigt hierüber hinaus ein interessantes Expressionsmuster. Neben der Expression in der SVZ lässt sich der Kanal im RMS bis in den BO verfolgen (Abb. 25 D-G). Hier zeigte sich eine Kolo-kalisation von TASK1 mit GFAP-positiven Astrozyten (Abb. 25 B), welche die DCX-positiven Neuroblasten säumen, welche entlang des RMS zum BO migrieren. Dabei ist der Kanal strikt auf den GFAP –positiven Zellen vorhanden und nicht auf DCX-positiven Zellen zu finden (Abb. 25 D-G). Auch in der Zellkultur wird er auf GFAP-positiven Zellen exprimiert (Abb. 25 H). In der SVZ sowie in der Zellkultur findet sich darüber hinaus eine Lokalisation auf Nestin-positiven Zellen (Abb. 25 C/I). TREK1 ist als einziger K2P-Kanal sowohl auf den subependymalen Zellen als auch auf den DCX-positiven Zellen der Ventrikelseitenwand exprimiert (Abb. 26 A/B). Auch in der Zellkultur lässt er sich auf GFAP-

und Nestin-positiven Zellen nachweisen (Abb. 26 C/D). TASK3 findet sich in der SVZ sowohl auf Nestin-positiven Zellen als auch auf den subependymalen Zellen (Abb. 27 A/C). Auch in der Zellkultur ist der Kanal auf den Nestin-positiven Vorläuferzellen lokalisiert (Abb. 27 F). Als einziger K2P-Kanal wird er auf 7 Tage differenzierten Neuroblasten exprimiert (Abb. 27 D). TWIK2 (Abb. 28 A), TREK2 (Abb. 28 C) sowie TWIK1 (Abb. 28 D) zeigten eine Expression auf den subependymalen Zellen der SVZ, eine Expression in der Zellkultur konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. TRAAK konnte weder in der SVZ noch in der Zellkultur detektiert werden.

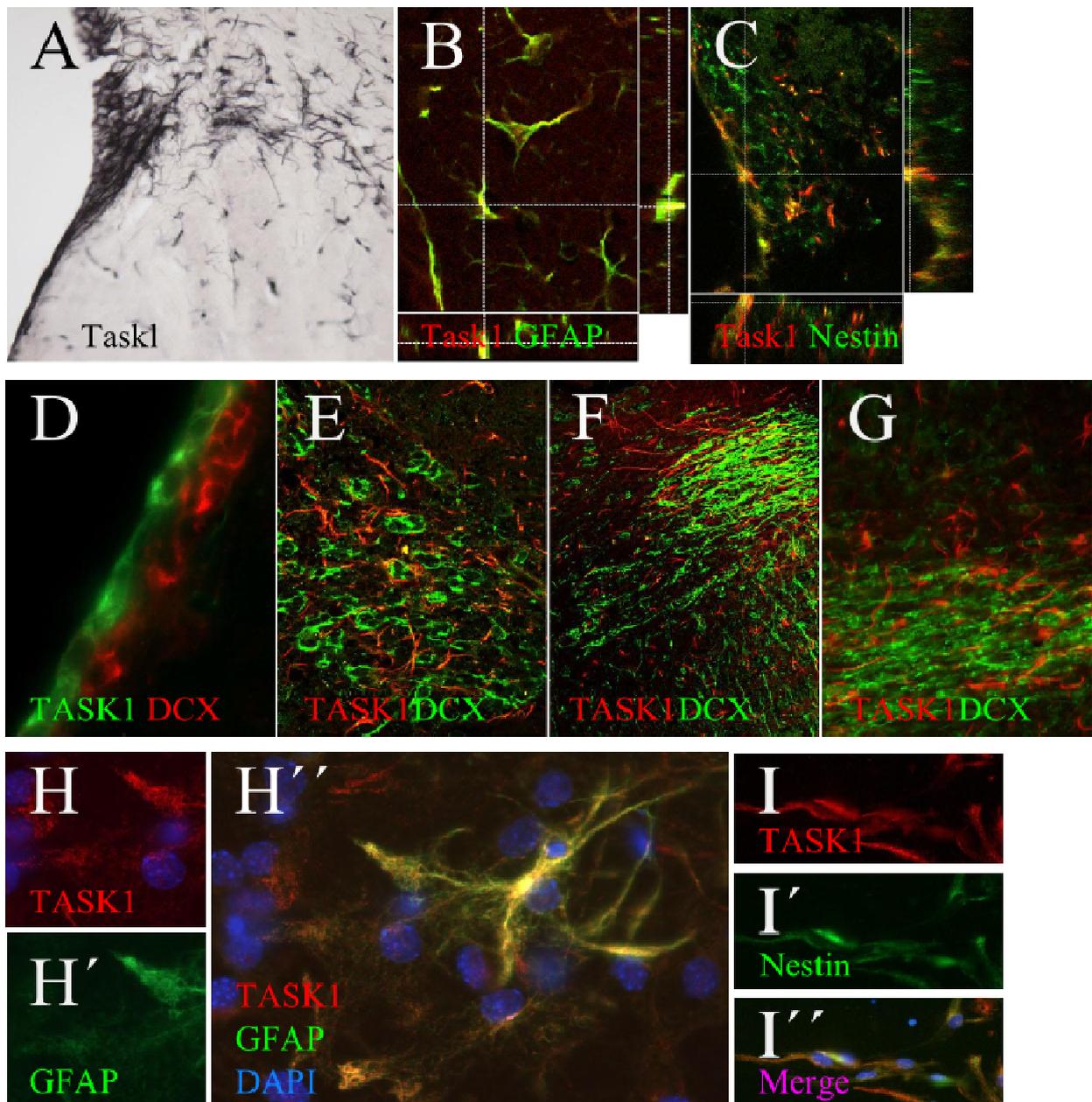


Abb. 25 Die neuronalen Vorläuferzellen migrieren von der SVZ (A/D) über den RMS (E) in den BO (F) wo sie sich radiär auffächern (G) und zu Interneuronen differenzieren. TASK1 ist auf subependymalen

Zellen und Nestin-positiven Zellen exprimiert (A/C/D), sowie auf den GFAP-positiven astrozytären Zellen, welche die Neuroblasten im RMS und BO umschließen (E/F). Hierbei ist TASK1 strikt von DCX-positiven Zellen getrennt. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch in der Zellkultur: GFAP- sowie Nestin- positive Zellen sind immunoreaktiv für TASK1 (H/I). Vergrößerung A 1:100, C/E/F/G 1:200, B/D-I'' 1:400

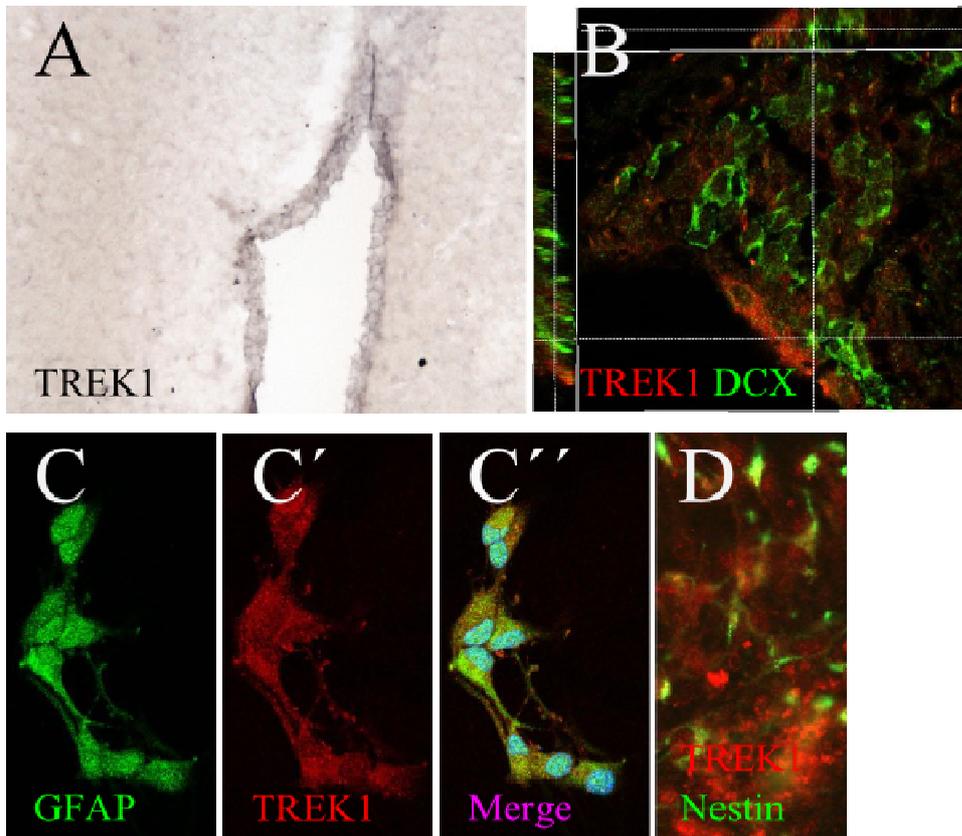
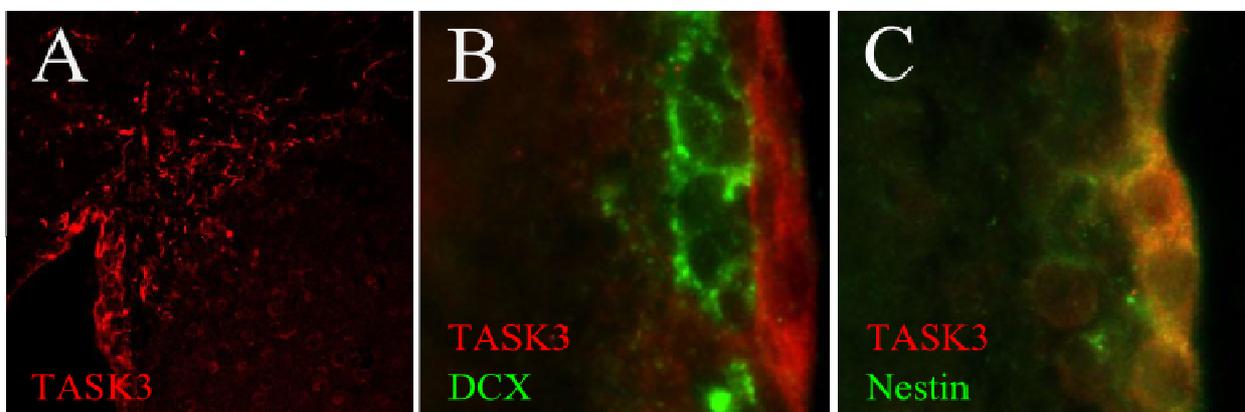


Abb. 26 In der SVZ ist TREK1 sowohl auf subependymalen Zellen als auch auf DCX-positiven Zellen exprimiert. In den der Zellkultur zeigte sich der TREK1 kolokalisiert mit Nestin und GFAP. Vergrößerung A 1:100, B und D 1:200, C 1:400.



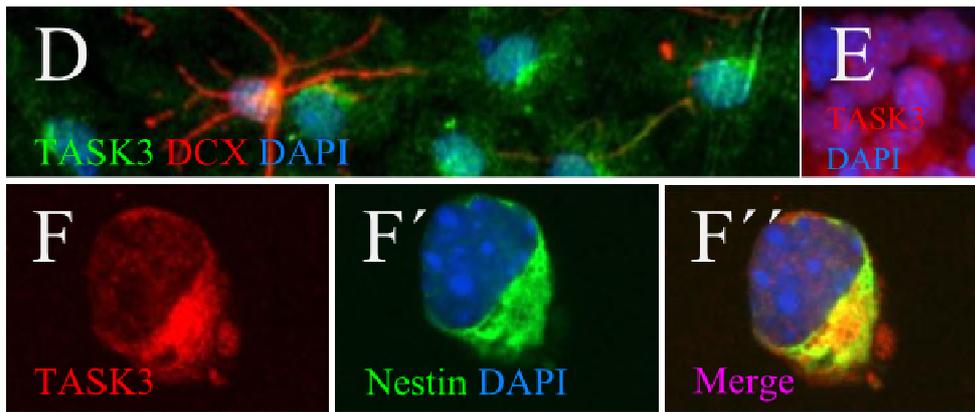


Abb. 27 TASK3 ist in der SVZ auf den subependymalen Zellen und in der Neuroblastenzone exprimiert (A). Hierbei ist der Kanal nicht auf DCX-positiven Zellen detektierbar (B). Vielmehr findet sich TASK3 auf Nestin-positiven Zellen in der SVZ (C). Auch in der Zellkultur findet sich TASK3 auf noch undifferenzierten Neurosphären (E), sowie den Nestin-positiven Vorläuferzellen (F). In den frühen DCX-positiven Neuronen ließ sich TASK3 ebenfalls nachweisen (D). Vergrößerung A 1:100, B und C 1:200, D-F 1:400.

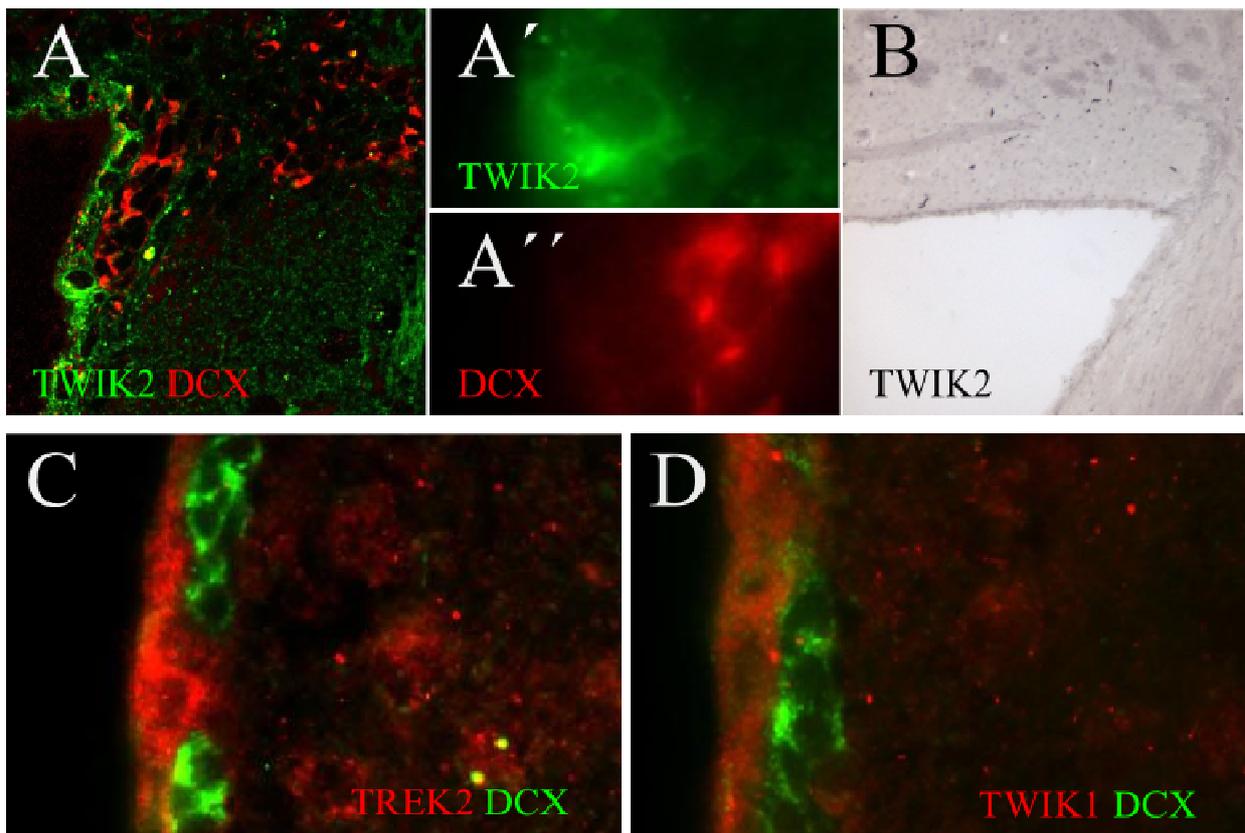


Abb. 28 TWIK2 (A/B), TREK2 (C), TWIK1 (D) sind in der SVZ auf subependymalen Zellen exprimiert, grenzen sich jedoch distinkt von den DCX-positiven Zellen ab. Vergrößerung A/C/D 1:200, B 1:100, A' und A'' 1:400.

4.5. Proliferation - Pilotversuch

Um die Rate der proliferierenden Zellen zu bestimmen wurde der Proliferationsassay genutzt. Hierbei markierte BrDU die sich in Teilung befindenden, also proliferierenden Zellen. Diese wurden dann mit der durch DAPI markierten Gesamtzellzahl ins Verhältnis gesetzt.

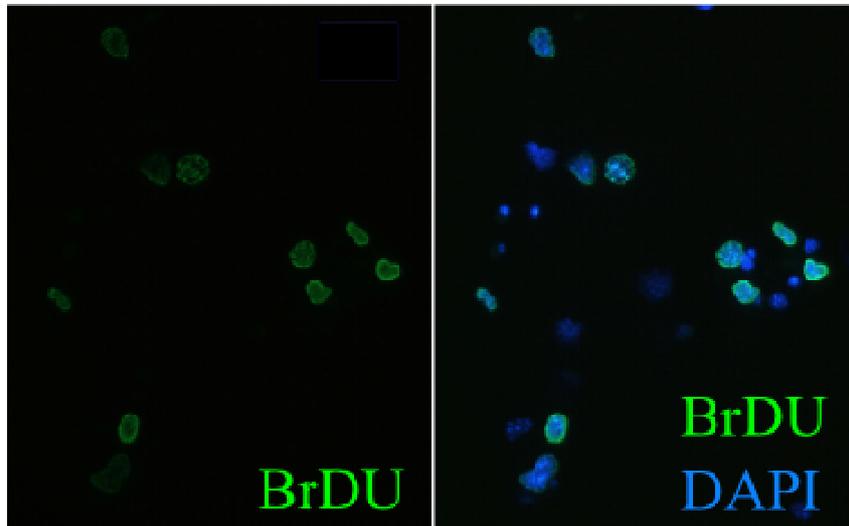


Abb.29 BrDU markiert die sich in Teilung befindenden Zellen, DAPI als Marker für Zellkerne, markiert die Gesamtzellzahl.

Zunächst wurden vier Kaliumkanäle selektiert, welche in den vorangegangenen Charakterisierungen *in vitro* sowie *in vivo* eine Expression auf den Vorläuferzellen zeigten. Um den Einfluss dieser Kaliumkanäle auf die Stammzellen zu untersuchen wurden die jeweiligen Kaliumkanalblocker zu den proliferierenden Zellen gegeben und für eine Stunde inkubiert. Hiernach wurden die Proliferationsraten berechnet. Insgesamt wurde dieses Experiment dreimal durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Pilotversuch, für aussagekräftige Ergebnisse benötigt es mehrfache Wiederholungen.

Kir2.4 wurde durch den Kaliumkanalblocker Spermin blockiert. Der Kaliumkanalblocker Glibenclamid wurde zur Blockade von Kir6.1 verwendet. Agitoxin inhibierte Kv1.6. Durch Tertiapin konnte der Kaliumkanal Kir3.2 blockiert werden. Als Kontrolle dienten NPCs, welche ohne Kaliumkanalblocker proliferierten.

Abbildung 30 zeigt die Proliferationsraten der NPCs unter dem Einfluss verschiedener Kaliumkanalblocker. Es zeigt sich, dass die Proliferationsrate zwischen 10 % und 15 % lag. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied in den Proliferationsraten zwischen den unterschiedlichen Kaliumkanalblockern erkennen. Es zeigt sich jedoch der Trend, dass die Proliferation unter der Zugabe von Tertiapin gehemmt wird. Weiterhin zeigt sich (hier nicht dargestellt), dass die Proliferationsraten zu unterschiedlichen Versuchstagen verschieden hoch

waren. Dies kann verschiedene Ursachen haben wie beispielsweise Unterschiede in den Konditionen des Proliferationsassays (geringe Abweichungen in der Konzentration der Wachstumsfaktoren oder der Zusammensetzung des Nährmediums).

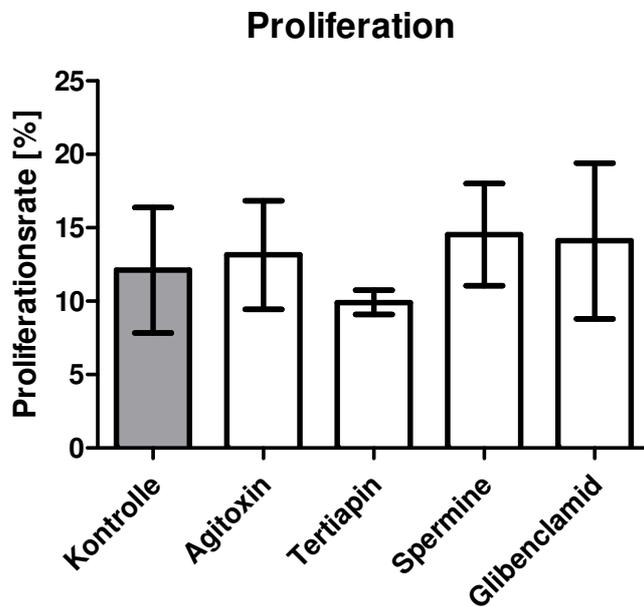


Abb. 30 zeigt die Proliferationsraten (Y-Achse) der NPCs unter dem Einfluss verschiedener Kaliumkanalblocker (X-Achse) sowie der Kontrollgruppe, welcher kein Blocker zugesetzt wurde.

5. Diskussion

5.1. Expression von Kaliumkanälen auf neuronalen Vorläuferzellen

In den Experimenten dieser Arbeit wurde die Expression von Kaliumkanälen aus drei großen Kaliumkanalklassen auf neuronalen Vorläuferzellen im Neurosphärenassay sowie in der SVZ analysiert. Hierbei zeigte sich ein differenziertes Expressionsmuster. Basierend auf der Kaliumkanalexpression lassen sich drei Zellgruppen unterscheiden. Zunächst lässt sich feststellen, dass die Nestin-positiven Vorläuferzellen der SVZ viele Kaliumkanäle, insbesondere die der Kir- und K2P-Familie, exprimieren. Zweitens exprimieren DCX-positive neuronale Vorläuferzellen nur wenige Kaliumkanäle wie beispielsweise Kv1.6 und Kir2.4. Letztlich ließen sich einige Kanäle an ganz spezifischen Orten nachweisen wie z.B. TASK1 auf den Astrozyten, welche den RMS flankieren.

5.1.1. Kaliumkanal-mRNA Expression adulter neuronaler Vorläuferzellen

Es gibt bereits einige Studien, welche die mRNA Expression von Kaliumkanälen der NPCs verschiedener Spezies beschreiben. Diese sind weitgehend übereinstimmend mit den Daten aus dem in dieser Arbeit durchgeführten Microarray. So konnte die mRNA Expression von Kv3.1 in murinen mesencephalen NPCs detektiert werden (Liebau u. a. 2006). Die Kv3.1 und Kv3.3 mRNA Expression ist für NPCs des Neuralrohrs von embryonalen Ratten beschrieben (Cai u. a. 2004). Die mRNA von Kv4.2 sowie Kv1.6 konnte in NPCs von humanem fetalen Hirn detektiert werden (Schaarschmidt u. a. 2009). Weiterhin konnte die mRNA von Kir4.1 in NPCs der adulten murinen SVZ nachgewiesen werden (Yasuda, Bartlett, und Adams 2008). Die genannten Kanäle zeigen auch im Microarray dieser Arbeit eine hohe mRNA Expression (Abb. 10). Nicht jede mRNA wird in ein funktionsfähiges Protein umgeschrieben. Dennoch zeigt sich zwischen den Daten aus dem Microarray und der Expressionsanalyse auf Proteinebene eine weitgehende Übereinstimmung. Im Microarray fanden sich für TREK1 und TWIK1 eine hohe relative Häufigkeit, beide Kanäle finden sich auf subependymalen Zellen der SVZ, TREK1 auch auf den doublecortin-positiven Zellen der SVZ. Bei den Kir-Kanälen findet sich im Microarray eine hohe relative Häufigkeit für Kir4.1 und Kir5.1. Diese beiden Kanäle finden sich ebenfalls auf subependymalen Zellen der SVZ, Kir4.1 zusätzlich auf den Nestin-positiven Zellen der SVZ.

5.1.2. Expression von Kir-Kaliumkanälen auf Proteinebene

Von den in dieser Arbeit immunhistochemisch untersuchten Kir-Kanälen ließen sich einige in der SVZ als auch im Neurosphärenassay nachweisen (Tabelle 2). Es ist bekannt, dass das

hyperpolarisierte Ruhemembranpotential der NPCs der SVZ auf eine hohe Kaliumleitfähigkeit zurückzuführen ist. Diese hohe Kaliumleitfähigkeit ist auf Ba²⁺-sensitive einwärtsgerichtete Kaliumkanäle zurückzuführen (Yasuda, Bartlett, und Adams 2008). Übereinstimmend mit zuvor publizierter Literatur konnte Kir5.1 auf den Nestin-positiven Vorläuferzellen der SVZ nachgewiesen werden (Yasuda, Bartlett, und Adams 2008). Yasuda u.a. fanden darüber hinaus die Expression von Kir4.1 auf GFAP/Nestin- und GFAP/GLAST-positiven NPCs sowie auf ependymalen Zellen (Yasuda und Adams 2010). Auch in dieser Arbeit konnte Kir4.1 auf subependymalen und Nestin-positiven Zellen nachgewiesen werden. Kir-Kanäle formen aus homomeren oder heteromeren Untereinheiten den Kaliumkanal. Kir4.1 spielt eine wichtige Rolle in Gliazellen für das Kaliumgleichgewichtspotential und kann zusammen mit Untereinheiten von Kir5.1 oder Kir2.1 heteromere Kanäle bilden (Olsen und Sontheimer 2008). Auch zeigt sich die Verteilung des Kanals nicht nur im Zellkörper der NPCs sondern auch bis hin zu den Fortsätzen, welche z.B. mit Blutgefäßen in Verbindung stehen. Dies unterstützt die These, dass Kir4.1 in homomerer Form oder in heteromerer Assoziation mit Kir5.1 eine entscheidende Rolle für die NPCs einnimmt. So könnte der Kanal den Zellen als Sensor für die Kaliumkonzentration der Umwelt dienen und deren Änderung in Plasma oder Liquor mit Änderungen im Membranpotential verknüpfen. Änderungen der Kaliumkonzentration z.B. im Rahmen einer Ischämie, können so zu Änderungen im Membranpotential führen, was wiederum zu einer vermehrten Proliferation der Zellen führen könnte (Yasuda und Adams 2010). Ein besonderes Expressionsmuster zeigte Kir2.4. Der Kanal ließ sich sowohl im Neurosphärenassay als auch in der SVZ auf Vorläuferzellen als auch Neuroblasten nachweisen. Für Kir2.4 ist eine Expression auf Motorneuronzellen der Hirnnervenkerne des Hirnstamms beschrieben (Töpert u. a. 1998), in der Arbeit von Prüss u.a. konnte eine weite Verbreitung von Kir2.4 auf den Neuronen des Rattenhirns nachgewiesen werden. Auch hier fand sich der Kanal insbesondere auf den Motoneuronen des Hirnstamms (Prüss u. a. 2005). Eine funktionelle Rolle wird dem Kanal (zusammen mit anderen Kanälen der Kir2 Familie) in der Temporallappenepilepsie zugewiesen. Hier wurde eine Hochregulation des Kanals auf den Körnerzellen am Ort der Ammonshornsklerose gefunden. Dies könnte im Rahmen eines lokalen Adaptationsmechanismus zu einer verminderten Erregbarkeitsschwelle führen (Young u. a. 2009). Auch Kir6.1 zeigt ein interessantes Expressionsprofil. So ist der Kanal auf Nestin-positiven Vorläuferzellen exprimiert, nicht jedoch auf Neuroblasten. Somit scheint seine Proteinexpression im Laufe der Neurogenese reguliert und ggf. von Wichtigkeit für diese zu sein. Ein Hinweis hierfür gibt die Arbeit von Yang u.a.. Hier wurde zunächst gezeigt, dass adulte NPCs des Hippocampus Kir6.1 exprimieren. Durch Iptakalim, einem ATP-sensitivem Kaliumkanalöffner, konnte die adulte hippocampale

Neurogenese durch das Öffnen von Kir6.1 Kaliumkanälen angeregt werden (Yang u. a. 2012). Ein sehr spezifisches Expressionsmuster konnte für Kir7.1 nachgewiesen werden. So fand sich der Kanal allein auf ependymalen Zellen des Seitenventrikels. In einer Arbeit von Hasselblatt u.a. wurde diese spezifische Expression weiter untersucht hinsichtlich der Nutzbarkeit als diagnostischen Marker für Plexus Choroideus Tumore. So fand sich Kir7.1 auf normalem Plexus choroideus, Plexus choroideus Papillomen und Plexus choroideus Karzinomen, nicht jedoch auf 100 anderen primären Hirntumoren und Hirnmetastasen. Somit schlägt die Arbeitsgruppe Kir7.1 als Marker für Plexus choroideus Karzinome vor (Hasselblatt u. a. 2006).

5.1.3. Expression von Kv-Kaliumkanälen auf Proteinebene

Übereinstimmend mit der Arbeit von Yasuda u.a. zeigte sich auch in dieser Arbeit, dass die durch Kv-Kanäle vermittelten Ionenströme durch eine geringe Anzahl von Kv-Kanälen vermittelt werden (Tabelle 2). Bei Yasuda u.a. wie auch in dieser Arbeit konnten Kv1.1, Kv1.4, Kv1.5, Kv4.3 und Kv4.2 nicht auf adulten murinen NPCs nachgewiesen werden. Bei Yasuda u.a. fand sich jedoch Kv3.1 (Yasuda, Bartlett, und Adams 2008). In dieser Arbeit zeigt Kv1.6 eine Immunoreaktivität auf den DCX-positiven Zellen der SVZ und dem frühen RMS. Eine weitere Untersuchung, ob der Kanal auch einen funktionellen Einfluss auf die Entwicklung der Neuroblasten hat, erscheint interessant, auch unter dem Aspekt, dass er auf den Nestin-positiven Zellen nicht detektiert werden konnte. Kv4.2 wurde in dieser Arbeit auf den subependymalen Zellen der SVZ exprimiert. Die Expression von Kv4.2 ist durch Schaarschmidt u.a. auf embryonalen humanen NPCs beschrieben, wo der Kanal für die Kv-Ströme verantwortlich ist (Schaarschmidt u. a. 2009). Kv-Kaliumkanäle nehmen darüber hinaus eine Funktion bei der Anästhesie durch volatile Anästhetika ein. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere Kv1.1, Kv1.3, und Kv1.6 in den Nuclei medialis des Thalamus durch volatile Anästhetika beeinflusst werden. So zeigten sich verspätete Aktionspotentiale und eine verminderte Rate an Entladungen der Thalamusneurone nach Applikation von Sevofluran im Hirnschnitt der Maus. Durch Applikation von ShK-186, einem selektiven Kv1.3 Inhibitor, konnte dieser Effekt verhindert werden (Lioudyno u. a. 2013). Die Expression der Kv-Kanäle scheint darüber hinaus zwischen Spezies und Hirnregionen zu variieren, da sich zwischen verschiedenen Studien Differenzen in der Expression der Kv-Kanäle zeigten. So fanden sich auf embryonalen NPCs der Ratte neben Kv3.1 auch Kv1.3 und Kv4.1 auf Transkriptionsebene sowie Kv1.3 und Kv3.1 auf Proteinebene (Liebau u. a. 2006). In einer Arbeit von Smith u.a. mit den gleichen Zellen wurden Kv2.1 und Kv4.3 auf Proteinebene exprimiert (Smith, Rosenheimer, und Kalil 2008). In einer Arbeit mit

humanen embryonalen NPCs fanden sich die Kv-Kanalfamilien 1–4 mit Ausnahme von Kv1.4, Kv3.2 und Kv3.3 auf Proteinebene (Schaarschmidt u. a. 2009).

5.1.4. Expression von K2P- Kaliumkanälen auf Proteinebene

Die Expression der Tandemporenkanäle auf neuronalen Stammzellen ist bisher kaum in der Literatur diskutiert worden. In dieser Arbeit wird die Distribution von TASK1 entlang des Seitenventrikels, des RMS bis hin zum Bulbus Olfactorius gezeigt. Zu jedem Zeitpunkt ist TASK1 mit GFAP kolokalisiert und strikt von den DCX-positiven Neuroblasten getrennt. Die distinkte anatomische Lokalisation von TASK1 suggeriert einen funktionellen Zusammenhang zwischen den TASK1-exprimierenden Astrozyten und den Neuroblasten. Die Expression von TASK1 an der Ventrikelwand sowie seine Kolokalisation mit GFAP ist bereits mehrfach beschrieben (Kindler u. a. 2000) Khanjan u.a. zeigen weiterhin, dass TASK1 besonders auf Zellen lokalisiert ist, welche verschiedene Hirnkompartimente voneinander trennen. So konnte TASK1 Immunoreaktivität auf den Ependymzellen des IV. Ventrikels, also an der Liquor-Hirn-Schranke, gefunden werden. Weiterhin fand sich der Kanal auf Gliazellen, welche die Wand von Blutgefäßen säumen, also an der Blut-Hirn-Schranke. Auch die Meningen exprimieren TASK1. Die Arbeitsgruppe schlägt vor, dass TASK1 im Zusammenspiel mit anderen Transportern und Kanälen aufgrund dieser speziellen Lokalisationen essentiell an der Aufrechterhaltung des Kaliumgleichgewichts und somit für Vitalität und Funktion von Neuronen verantwortlich ist. Dies wiederum könnte TASK1 als einen Schlüsselpunkt in Verständnis und ggf. Therapie für Erkrankungen, in welchen die natürlichen Grenzen wie z.B. die Blut-Hirn-Schranke, zerstört werden, etablieren. Hierzu zählen u.a. Multiple Sklerose oder zerebrale Ischämien (Kanjhan u. a. 2010). Für diese Arbeit kann unter diesem Gesichtspunkt die These formuliert werden, dass TASK1-exprimierende Astrozyten ein günstiges *Microenvironment* für die Neuroblasten schaffen.

Ähnlich wie Kv1.6 ist TREK1 auf den DCX-positiven NPCs, nicht jedoch den Nestin-positiven Vorläuferzellen exprimiert, was eine enge Regulation im Laufe der Neurogenese nahelegt. Die Regulation der hippocampalen Neurogenese durch TREK1 ist bereits beschrieben und wird als Ansatzpunkt für neue Antidepressiva genutzt (Mazella u. a. 2010). Auch TREK1 wird ähnlich wie TASK1 eine Rolle bei der Trennung von Hirnkompartimenten, in diesem Fall der Blut-Hirn-Schranke, zugesprochen. Bittner u.a. konnten zeigen, dass eine Blockade von TREK1 eine vermehrte Leukozytenmigration durch die Blut-Hirn-Schranke zur Folge hat, eine Aktivierung das Gegenteil erzielte. Im Tiermodell konnte weitergehend gezeigt werden, dass TREK1-defiziente Mäuse nach Induktion einer experimentellen Autoimmunen Encephalitis (EAE)

schwerere Krankheitsverläufe zeigten als Vergleichsmäuse. Interessanterweise ließ sich die Schwere u.a. durch die Gabe von Leinsamenöl, welches u.a. die TREK1 aktivierenden Omega-3-Fettsäuren enthält, lindern. Somit ist TREK1 ebenfalls ein potentieller Angriffspunkt zur Behandlung von Erkrankungen, welche auf Defekten der Blut-Hirn-Schranke basieren (Bittner u. a. 2013). TWIK1 und TREK2 zeigen eine Expression auf den subependymalen Zellen der SVZ und tragen hier ggf. zum *Microenvironment* der Stammzellnische bei. TASK3 zeigte eine beinahe ubiquitäre Expression auf den neuronalen Stammzellen sowie in der SVZ. Eine Überexpression des Kanals wird in Verbindung mit dem Entstehen einzelner humaner Carcinome wie z.B. Mamma Carcinom gebracht (Pei u. a. 2003).

5.2 Einfluss von Kaliumkanälen auf die Proliferation von NPCs

Um den Einfluss einzelner Kaliumkanäle auf die Proliferation der NPCs zu untersuchen, wurden Kanäle selektiert, welche in den vorangegangenen immunhistochemischen Färbungen auf den NPCs oder Neuroblasten exprimiert waren. Diese wurden mit Kaliumkanalblockern in ihrer Funktion gehemmt und die Proliferationsraten im Proliferationsassay bestimmt. Um eine Aussage bezüglich der verschiedenen von uns verwendeten Kaliumkanalblocker auf die NPCs zu machen bedarf es einer größeren Fallzahl. Somit ist dieses Experiment als Pilotexperiment zu werten. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch den Trend, dass die Proliferation unter der Zugabe von Tertiapin gehemmt wird. In weiterführenden Experimenten ist es darüber hinaus sinnvoll, zunächst eine Dosis-Wirkungs-Kurve für NPCs zu etablieren. So wurde zwar die übliche Dosierung der Kanalblocker beachtet, diese kann jedoch für die NPCs im speziellen abweichen. Somit könnten die Blocker gar nicht (bei zu niedriger Dosis) oder toxisch (bei zu hoher Dosis) gewirkt haben. Weiterhin sind die verwendeten Kaliumkanalblocker nicht alle spezifisch. Tertiapin beispielsweise blockiert neben Kir3.2 auch Kir3.1, Kir3.4 und Kir1.1.. Somit könnten die gemessenen Effekte auch durch andere Kanäle ausgelöst worden sein. Eine spezifische Möglichkeit, die Rolle der Kanäle zu untersuchen, wäre beispielsweise mit der Technik der siRNA im Rahmen des posttranskriptionellen Gen-Silencing. Hierbei kann einzelsträngige RNA, insbesondere also Messenger-RNA, die die zum Leitstrang der siRNA komplementäre Nukleotidsequenz enthält, in ihrer Translation zum Protein verhindert werden.

Es gibt bereits erste Arbeiten zum Einfluss von Kaliumkanälen auf die Proliferation von murinen NPCs. Am umfassendsten haben dies Yasuda u.a. untersucht, welche sowohl den Einfluss von Kv- als auch Kir-Kanälen untersucht haben. Hierbei beschreiben sie, dass die Kir-Kanal abhängige Depolarisation des Ruhemembranpotentials notwendig für eine Progression muriner

NPCs im Zellzyklus ist. So konnte durch die Blockade der Kanäle mit einer niedrigen Konzentration von Barium eine leichte Depolarisation und Wachstumsfaktor-abhängige Proliferation der Zellen bewirkt werden. Dieser Effekt ließ sich auch durch eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration erzielen, was nahe legt, dass die Depolarisation der Mechanismus ist, über welchen die Proliferation getriggert wird. Eine starke Depolarisation z.B. durch höhere Konzentrationen von Barium, hatte hingegen einen geringeren Effekt auf die Proliferation. Somit scheint es insbesondere ein bestimmtes Membranpotential zu sein, welches das Wachstum fördert (Yasuda und Adams 2010). Die Kv-Kanäle konnten durch TEA blockiert werden, was die durch Wachstumsfaktoren induzierte Proliferation der Zellen stoppte (Yasuda, Bartlett, und Adams 2008). Neben der Arbeit von Yasuda gibt es jedoch auch weitere, teilweise widersprüchliche Untersuchungen zu Kv-Kanälen und der Zellproliferation. So zeigten Schaarschmidt u.a., dass die Proliferation von humanen embryonalen NPCs von der Aktivierung von Kv-Kanälen (insbesondere Kv4.2) abhängt (Schaarschmidt u. a. 2009). Im Gegensatz hierzu zeigen Liebau u.a. eine negative Korrelation zwischen der Aktivität von Kv-Kanälen und der Zellproliferation bei embryonalen NPCs der Ratte (Liebau u. a. 2006). Der Unterschied könnte an den unterschiedlichen Spezies liegen, sollte jedoch weiter untersucht werden.

Der genaue Mechanismus, durch den die Kaliumkanäle die Zellproliferation beeinflussen, ist jedoch aktuell noch nicht bekannt. Zum einen sind Änderungen im Ruhemembranpotential ein wichtiger Schritt in der Zellzyklusprogression, was bereits Wonderlin und Strobel 1996 beschrieben (Wonderlin und Strobl 1996). Aber auch die Regulation des Zellvolumens durch Kaliumkanäle ist als Mechanismus zur Kontrolle der Proliferation beschrieben worden (Rouzaire-Dubois und Dubois 1998). Die Wirkung von TEA könnte beispielsweise über das Zellvolumen vermittelt werden, da TEA das Membranpotential nicht verändert. So könnte TEA das Zellvolumen durch eine Änderung des Kaliumeffluxes beeinflussen und somit die Zellproliferation beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass ein hypertonisches Medium, welches zu einer Zellschwellung führt, auch zu einer verminderten NPC Proliferation führte (Yasuda, Bartlett, und Adams 2008).

5.3 Korrelation der *in vitro* und *in vivo* Daten

Der Vergleich der Kaliumkanalproteinexpression auf den neuronalen Vorläuferzellen im Neurosphärenassay sowie in der SVZ legt nahe, dass das Expressionsmuster *in vitro* zum großen Teil erhalten ist. So ist die Expression von Kir4.1, Kir2.4, Kir6.1, Kir7.1, TASK3 und TASK1 und die Abwesenheit der Expression vieler Kir- und Kv-Kanäle sowohl in der Zellkultur als auch in den Hirnschnitten nachweisbar (Tabelle 2). Yasuda u.a. zeigten 2008, dass adulte, aus der SVZ

gewonnene NPCs im Neurosphärenassay ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften besitzen wie die von Liu u.a. 2006 charakterisierten NPCs der SVZ in Hirnschnitten (Liu u. a. 2006; Yasuda, Bartlett, und Adams 2008). Nichts desto trotz sollten die erhobenen Daten kritisch betrachtet werden. So hat der Neurosphärenassay seine Limitationen unter dessen Gesichtspunkt die erhobenen Daten gesehen werden müssen. Die Zellen in den Neurosphären sind heterogen, es finden sich neuronale Vorläuferzellen jedoch auch abgestorbene Zellen, differenzierte Zellen und Vorläuferzellen anderer Zelllinien wie beispielsweise der astrozytären Zelllinie. Um die tatsächlichen NPCs zu identifizieren, wäre ein exklusiver Marker für eben diese Zellen wichtig. Hier gibt es bereits Arbeiten, es zeigt sich jedoch die Schwierigkeit, einen Marker zu finden welcher allein die NPCs detektiert, jedoch nicht nur eine Untergruppe markiert. CD133 ist beispielsweise ein potentieller Marker für NPCs. Zusammen mit GFAP wird er als Marker für NPCs beschrieben (Fischer u. a. 2011). Auch ist die morphologische Zuordnung in den Neurosphären schwierig, da die Zellen hier undifferenziert und durch Wachstumsfaktoren stimuliert sind. Hier könnte die Analyse der Zellorganellen mittels Elektronenmikroskopie hilfreich sein (Gil-Perotín u. a. 2013). Somit sollte die Anzahl an Stammzellen in den Neurosphären nicht überschätzt werden (Rietze und Reynolds 2006). Es ist also möglich, dass für NPCs spezifische Kaliumkanal-mRNA im Microarray nicht detektiert wurde. Darüber hinaus führen nicht alle mRNA-Transkripte zur Proteinexpression. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit sowohl ein mRNA-Screening im Microarray als auch die Detektion auf Proteinebene durchgeführt. Wenn Antikörper zu keiner Immunoreaktivität führten, wurden Positivkontrollen wie Western Blot Analyse von Hirn- sowie NPC-Proteinhomogenaten durchgeführt.

Weiterhin ist kritisch anzumerken, dass manche Antikörper für Zelllinienmarker nur eingeschränkt spezifisch für die jeweiligen Zelltypen sind. So zeigt sich beispielsweise, dass es neben den Nestin-positiven Vorläuferzellen, weitere Zellen im Gehirn gibt, welche den Marker exprimieren. Diese Zellen haben die Charakteristika von Neuronen und lassen sich in Hirnregionen finden, welche insbesondere für höhere kognitive Fähigkeiten verantwortlich sind (Hendrickson u. a. 2011). GFAP ist auf neuronalen Stammzellen jedoch auch auf nicht-germinalen Astrozyten exprimiert. Somit sollten Daten, welche aus den Experimenten *in vitro* hervorgehen und als Modell für die Funktionsweise und Differenzierung der Zellen *in vivo* dienen, kritisch betrachtet werden.

5.4 Faktoren, die die Expression der Kaliumkanäle beeinflussen

Die in dieser Arbeit erhobenen Angaben zur Expression von Kaliumkanälen auf neuronalen Vorläuferzellen können nicht ohne weiteres auf andere Stamm- und Vorläuferzellen übertragen werden. So zeigt der Vergleich der aktuellen Literatur Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies und/oder den Hirnarealen, aus welchem die Zellen isoliert wurden. Beispielsweise konnte Kv3.1 auf den embryonalen NPCs des Rattenmittelhirns nachgewiesen werden (Liebau u. a. 2006), nicht jedoch auf den embryonalen NPCs der SVZ von Ratten (Smith, Rosenheimer, und Kalil 2008). Kv4.1 ist auf den NPCs des Gyrus Dentatus exprimiert und könnte dort die Proliferation beeinflussen (Shi u. a. 2007), auf humanen embryonalen NPCs konnte der Kanal nicht nachgewiesen werden (Schaarschmidt u. a. 2009). Unterschiede in den Protokollen zur Zellkultivierung sind eine weitere mögliche Ursache für die genannten Diskrepanzen, so variieren die veröffentlichten Protokolle in der Menge an Wachstumsfaktoren oder Zusätzen wie beispielsweise B27 (serumfreies Supplement). Zwischen adulten und embryonalen Stammzellen gibt es weiterhin Unterschiede. So z.B. in der Reaktion auf die Blockade von Kaliumkanälen. So konnte durch Tetraethylammonium die Proliferation von embryonalen NPCs erhöht werden (Liebau u. a. 2006), die Proliferationsrate adulter NPCs sank hingegen (Yasuda, Bartlett, und Adams 2008).

5.5. Die Rolle der Kaliumkanäle in der Neurogenese

Es gibt immer mehr Hinweise, dass Kaliumkanäle eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Neuronen als auch Gliazellen einnehmen (Ribera 1999; Liebau u. a. 2006; Yasuda und Adams 2010). Bereits in der frühen Entwicklung des Gehirns, der embryonalen Neurogenese, werden Kaliumkanäle zu bestimmten Zeitpunkten an spezifischen Orten exprimiert (Ribera und Spitzer 1992). Hier sind insbesondere Kv-Kanäle von Wichtigkeit (Ribera 1999). Adulte NPCs exprimieren vornehmlich KDR-Kanäle. Dies sind Kv-Kanäle, welche sensitiv für Tetraethylammonium (TEA) sind (Liu u. a. 2006). Neonatale NPCs zeigen hingegen Ströme, welche sowohl von KDR- als auch von KA-Kanälen vermittelt werden. KA-Kanäle sind Kv-Kanäle welche 4-Aminopyridine sensitiv sind (Cesetti u. a. 2009). Dies zeigt, dass die Expression der Kanäle in der Neurogenese unterschiedlich reguliert wird. Auch in humanen embryonalen NPCs konnte gezeigt werden, dass sich die Kaliumkanalexpression in der embryonalen Entwicklung stark verändert. So war initial insbesondere der Kanal Kv4.2 exprimiert, dessen Expression im Verlauf deutlich abnahm und von anderen (*delayed-rectifier* Kanälen) abgelöst wurde. Die Blockade von Kv4.2 führte in weiteren Untersuchungen zu einer

Inhibition der Proliferation der Zellen (Schaarschmidt u. a. 2009). Aber auch die Rolle der Kanäle in der adulten Neurogenese ist bereits mehrfach untersucht. So z.B. durch Yasuda u.a. welche die Rolle der Kir-Kanal abhängigen Depolarisation des Ruhemembranpotentials als notwendig für eine Progression muriner NPCs im Zellzyklus beschreiben (Yasuda, Bartlett, und Adams 2008).

Die spezifische Lokalisation einiger in dieser Arbeit untersuchter Kaliumkanäle könnte eine spezielle Funktion des jeweiligen Kanals reflektieren. So könnte die Expression von Kv1.6, welche auf die Neuroblasten des proximalen RMS limitiert ist, mit den neu beschriebenen glutaminergen Neuronen des Bulbus Olfactorius korrespondieren (Brill u. a. 2009). Auch TASK1, der auf den Astrozyten, welche die Neuroblasten im RMS flankieren exprimiert ist, könnte Einfluss auf Proliferation und Migration der Neuroblasten haben.

Manchen Kanälen konnte bereits eine spezifische Funktion zugewiesen werden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Kv1.3 im Rahmen einer Hirnbestrahlung hochreguliert wird und zur Aktivierung von Mikroglia und Mikroglia-vermittelter Neurotoxizität führt. Dieser Effekt konnte durch pharmakologische Blockade des Kanals reduziert werden. Somit ergibt sich hier ein therapeutischer Ansatz, die Aktivierung von Mikroglia und die durch sie hervorgerufene Neurotoxizität zu verringern (Peng u. a. 2014).

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit eine umfangreiche Expressionsanalyse verschiedener Kaliumkanäle aus drei großen Kaliumkanalklassen auf neuronalen Vorläuferzellen. Hier ließen sich potentiell wichtige Kaliumkanäle identifizieren, welche im Rahmen weiterer Untersuchungen Antworten auf die Frage nach der Rolle von Kaliumkanälen in der Stammzellnische geben könnten. Die Identifikation wichtiger Kaliumkanäle ist von großer Bedeutung um das Potential verschiedener Kaliumkanalmodulatoren für die Neurogenese abschätzen zu können. Von besonderer Bedeutung scheint hier die Expression von Tandemporen Kaliumkanälen zu sein, welche bisher noch nicht im Zusammenhang mit der Neurogenese diskutiert wurden, jedoch wichtig für die neuronale Erregbarkeit sind (Goldstein u. a. 2001). Das Wissen über die komplexen Prozesse zur Regulation der Neurogenese ist von essentieller Wichtigkeit für das Verständnis der Hirnentwicklung, der Entwicklung von Hirntumoren und schließlich Grundlage für die Behandlung von neurogenen Schäden im Rahmen neurologischer Erkrankungen oder nach Verletzungen. Weitere Studien werden benötigt um diese Beziehungen zu verstehen und so geben die Ergebnisse dieser Arbeit Anstöße für neue, vielversprechende Herangehensweisen.

Literaturverzeichnis

- Altman, J, und G D Das. 1966. „Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions“. *The Journal of comparative neurology* 126 (3): 337–89. doi:10.1002/cne.901260302.
- Ashcroft, F M, und F M Gribble. 1999. „ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease“. *Diabetologia* 42 (8): 903–19. doi:10.1007/s001250051247.
- Bittner, Stefan, Tobias Ruck, Michael K. Schuhmann, Alexander M. Herrmann, Hamid Moha ou Maati, Nicole Bobak, Kerstin Göbel, u. a. 2013. „Endothelial TWIK-Related Potassium Channel-1 (TREK1) Regulates Immune-Cell Trafficking into the CNS“. *Nature Medicine* 19 (9): 1161–65. doi:10.1038/nm.3303.
- Blaauw, Y, H Gögelein, R G Tieleman, A van Hunnik, U Schotten, und M A Allesie. 2004. „‘Early’ class III drugs for the treatment of atrial fibrillation: efficacy and atrial selectivity of AVE0118 in remodeled atria of the goat“. *Circulation* 110 (13): 1717–24. doi:10.1161/01.CIR.0000143050.22291.2E.
- Brill, Monika S, Jovica Ninkovic, Eleanor Winpenny, Rebecca D Hodge, Ilknur Ozen, Roderick Yang, Alexandra Lepier, u. a. 2009. „Adult Generation of Glutamatergic Olfactory Bulb Interneurons“. *Nature Neuroscience* 12 (12): 1524–33. doi:10.1038/nn.2416.
- Cai, Jingli, Aiwu Cheng, Yongquan Luo, Chengbiao Lu, Mark P Mattson, Mahendra S Rao, und Katsutoshi Furukawa. 2004. „Membrane Properties of Rat Embryonic Multipotent Neural Stem Cells“. *Journal of Neurochemistry* 88 (1): 212–26.
- Cesetti, Tiziana, Kirsten Obernier, C. Peter Bengtson, Tatiana Fila, Claudia Mandl, Gabriele Hölzl-Wenig, Kerstin Wörner, Volker Eckstein, und Francesca Ciccolini. 2009. „Analysis of Stem Cell Lineage Progression in the Neonatal Subventricular Zone Identifies EGFR⁺/NG2⁻ Cells as Transit-Amplifying Precursors“. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27 (6): 1443–54. doi:10.1002/stem.74.
- Choe, Senyon. 2002. „Potassium channel structures“. *Nature reviews. Neuroscience* 3 (2): 115–21. doi:10.1038/nrn727.
- Chojnacki, Andrew K, Gloria K Mak, und Samuel Weiss. 2009. „Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both?“. *Nature reviews. Neuroscience* 10 (2): 153–63. doi:10.1038/nrn2571.
- Cone, C D, Jr. 1971. „Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis“. *Journal of theoretical biology* 30 (1): 151–81.
- Cooper, B Y, R D Johnson, und K K Rau. 2004. „Characterization and function of TWIK-related acid sensing K⁺ channels in a rat nociceptive cell“. *Neuroscience* 129 (1): 209–24. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.066.
- Czirják, Gábor, und Péter Enyedi. 2002. „Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits“. *The Journal of biological chemistry* 277 (7): 5426–32. doi:10.1074/jbc.M107138200.
- Davies, Lucinda A, Changlong Hu, Nick A Guagliardo, Neil Sen, Xiangdong Chen, Edmund M Talley, Robert M Carey, Douglas A Bayliss, und Paula Q Barrett. 2008. „TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (6): 2203–8. doi:10.1073/pnas.0712000105.
- DeCoursey, T E, K G Chandy, S Gupta, und M D Cahalan. 1984. „Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis?“. *Nature* 307 (5950): 465–68.
- Derst, C, J R Hirsch, R Preisig-Müller, E Wischmeyer, A Karschin, F Döring, A Thomzig, u. a. 2001a. „Cellular localization of the potassium channel Kir7.1 in guinea pig and human

- kidney“. *Kidney international* 59 (6): 2197–2205. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00735.x.
- Doupnik, C A, N Davidson, und H A Lester. 1995. „The inward rectifier potassium channel family“. *Current opinion in neurobiology* 5 (3): 268–77.
- Doyle, D A, J Morais Cabral, R A Pfuetzner, A Kuo, J M Gulbis, S L Cohen, B T Chait, und R MacKinnon. 1998. „The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity“. *Science (New York, N.Y.)* 280 (5360): 69–77.
- Duprat, F, F Lesage, M Fink, R Reyes, C Heurteaux, und M Lazdunski. 1997. „TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH“. *The EMBO journal* 16 (17): 5464–71. doi:10.1093/emboj/16.17.5464.
- Emsley, Jason G, Bartley D Mitchell, Gerd Kempermann, und Jeffrey D Macklis. 2005. „Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells“. *Progress in neurobiology* 75 (5): 321–41. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.04.002.
- Eriksson, P S, E Perfilieva, T Björk-Eriksson, A M Alborn, C Nordborg, D A Peterson, und F H Gage. 1998. „Neurogenesis in the adult human hippocampus“. *Nature medicine* 4 (11): 1313–17. doi:10.1038/3305.
- Eulitz, Dirk, Harald Prüss, Christian Derst, und Rüdiger W Veh. 2007a. „Heterogeneous distribution of kir3 potassium channel proteins within dopaminergic neurons in the mesencephalon of the rat brain“. *Cellular and molecular neurobiology* 27 (3): 285–302. doi:10.1007/s10571-006-9118-9.
- Fischer, Judith, Ruth Beckervordersandforth, Pratibha Tripathi, Andrea Steiner-Mezzadri, Jovica Ninkovic, und Magdalena Götz. 2011. „Prospective Isolation of Adult Neural Stem Cells from the Mouse Subependymal Zone“. *Nature Protocols* 6 (12): 1981–89. doi:10.1038/nprot.2011.412.
- Furlan, F, L Guasti, D Avossa, A Becchetti, E Cilia, L Ballerini, und A Arcangeli. 2005. „Interneurons transiently express the ERG K⁺ channels during development of mouse spinal networks in vitro“. *Neuroscience* 135 (4): 1179–92. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.06.040.
- Gage, F H. 2000. „Mammalian neural stem cells“. *Science (New York, N.Y.)* 287 (5457): 1433–38.
- Galli, Rossella, Angela Gritti, und Angelo L Vescovi. 2008. „Adult neural stem cells“. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 438: 67–84. doi:10.1007/978-1-59745-133-8_7.
- Gallo, V, J M Zhou, C J McBain, P Wright, P L Knutson, und R C Armstrong. 1996. „Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K⁺ channel block“. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 16 (8): 2659–70.
- Gil-Perotín, Sara, María Duran-Moreno, Arantxa Cebrián-Silla, Mónica Ramírez, Paula García-Belda, und José Manuel García-Verdugo. 2013. „Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone: A Review of the Neurosphere Assay“. *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)* 296 (9): 1435–52. doi:10.1002/ar.22746.
- Goldstein, S A, D Bockenhauer, I O’Kelly, und N Zilberberg. 2001. „Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits“. *Nature reviews. Neuroscience* 2 (3): 175–84. doi:10.1038/35058574.
- Gould, Elizabeth. 2007. „How widespread is adult neurogenesis in mammals?“. *Nature reviews. Neuroscience* 8 (6): 481–88. doi:10.1038/nrn2147.
- Gould, E, A J Reeves, M S Graziano, und C G Gross. 1999. „Neurogenesis in the neocortex of adult primates“. *Science (New York, N.Y.)* 286 (5439): 548–52.
- Gritti, A, E A Parati, L Cova, P Frolichsthal, R Galli, E Wanke, L Faravelli, u. a. 1996. „Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in

- response to basic fibroblast growth factor“. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 16 (3): 1091–1100.
- Hagiwara, S, und K Takahashi. 1974. „The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell“. *The Journal of membrane biology* 18 (1): 61–80.
- Hasselblatt, Martin, Christine Böhm, Lars Tatenhorst, Vinzenz Dinh, Dieter Newrzella, Kathy Keyvani, Astrid Jeibmann, Horst Buerger, Christian H. Rickert, und Werner Paulus. 2006. „Identification of Novel Diagnostic Markers for Choroid Plexus Tumors: A Microarray-Based Approach“. *The American Journal of Surgical Pathology* 30 (1): 66–74.
- Hendrickson, Michael L, Abigail J Rao, Omar N A Demerdash, und Ronald E Kalil. 2011. „Expression of Nestin by Neural Cells in the Adult Rat and Human Brain“. *PloS One* 6 (4): e18535. doi:10.1371/journal.pone.0018535.
- Hibino, Hiroshi, Akikazu Fujita, Kaori Iwai, Mitsuhiko Yamada, und Yoshihisa Kurachi. 2004. „Differential assembly of inwardly rectifying K⁺ channel subunits, Kir4.1 and Kir5.1, in brain astrocytes“. *The Journal of biological chemistry* 279 (42): 44065–73. doi:10.1074/jbc.M405985200.
- Hibino, Hiroshi, Atsushi Inanobe, Kazuharu Furutani, Shingo Murakami, Ian Findlay, und Yoshihisa Kurachi. 2010. „Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles“. *Physiological reviews* 90 (1): 291–366. doi:10.1152/physrev.00021.2009.
- HODGKIN, A L, und A F HUXLEY. 1952. „A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve“. *The Journal of physiology* 117 (4): 500–544.
- Höglinger, Günter U, Pamela Rizk, Marie P Muriel, Charles Duyckaerts, Wolfgang H Oertel, Isabelle Caille, und Etienne C Hirsch. 2004. „Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease“. *Nature neuroscience* 7 (7): 726–35. doi:10.1038/nn1265.
- Ho, K, C G Nichols, W J Lederer, J Lytton, P M Vassilev, M V Kanazirska, und S C Hebert. 1993. „Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel“. *Nature* 362 (6415): 31–38. doi:10.1038/362031a0.
- Honoré, Eric, François Maingret, Michel Lazdunski, und Amanda Jane Patel. 2002. „An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K⁽⁺⁾ channel TREK-1“. *The EMBO journal* 21 (12): 2968–76. doi:10.1093/emboj/cdf288.
- Hu, Hui-Juan, Yarimar Carrasquillo, Farzana Karim, Wonil E Jung, Jeanne M Nerbonne, Thomas L Schwarz, und Robert W Gereau 4th. 2006. „The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity“. *Neuron* 50 (1): 89–100. doi:10.1016/j.neuron.2006.03.010.
- Ihrle, Rebecca A, und Arturo Alvarez-Buylla. 2011. „Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain“. *Neuron* 70 (4): 674–86. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.004.
- Jenkinson, Donald H. 2006. „Potassium channels--multiplicity and challenges“. *British journal of pharmacology* 147 Suppl 1 (Januar): S63–71. doi:10.1038/sj.bjp.0706447.
- Kang, Dawon, Changyong Choe, und Donghee Kim. 2005. „Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK“. *The Journal of physiology* 564 (Pt 1): 103–16. doi:10.1113/jphysiol.2004.081059.
- Kanjhan, Refik, David V Pow, Peter G Noakes, und Mark C Bellingham. 2010. „The Two-Pore Domain K⁺ Channel TASK-1 Is Closely Associated with Brain Barriers and Meninges“. *Journal of Molecular Histology* 41 (6): 315–23. doi:10.1007/s10735-010-9293-3.
- Karschin, Andreas. 1999. „G Protein Regulation of Inwardly Rectifying K⁽⁺⁾ Channels“. *News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 14 (Oktober): 215–20.

- Karschin, C, E Dissmann, W Stühmer, und A Karschin. 1996. „IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain“. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 16 (11): 3559–70.
- Kempermann, Gerd, Sebastian Jessberger, Barbara Steiner, und Golo Kronenberg. 2004. „Milestones of neuronal development in the adult hippocampus“. *Trends in neurosciences* 27 (8): 447–52. doi:10.1016/j.tins.2004.05.013.
- Kempermann, G, H G Kuhn, und F H Gage. 1997. „More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment“. *Nature* 386 (6624): 493–95. doi:10.1038/386493a0.
- Ketchum, K A, W J Joiner, A J Sellers, L K Kaczmarek, und S A Goldstein. 1995. „A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem“. *Nature* 376 (6542): 690–95. doi:10.1038/376690a0.
- Kindler, C H, C Pietruck, C S Yost, E R Sampson, und A T Gray. 2000. „Localization of the Tandem Pore Domain K⁺ Channel TASK-1 in the Rat Central Nervous System“. *Brain Research. Molecular Brain Research* 80 (1): 99–108.
- Koschak, A, R M Bugianesi, J Mitterdorfer, G J Kaczorowski, M L Garcia, und H G Knaus. 1998. „Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by hongotoxin-1, a novel peptide derived from *Centruroides limbatus* venom“. *The Journal of biological chemistry* 273 (5): 2639–44.
- Kriegstein, Arnold, und Arturo Alvarez-Buylla. 2009. „The glial nature of embryonic and adult neural stem cells“. *Annual review of neuroscience* 32: 149–84. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135600.
- Kubo, Y, T J Baldwin, Y N Jan, und L Y Jan. 1993. „Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel“. *Nature* 362 (6416): 127–33. doi:10.1038/362127a0.
- Kuhn, H G, J Winkler, G Kempermann, L J Thal, und F H Gage. 1997. „Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain“. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (15): 5820–29.
- Lesage, F, F Duprat, M Fink, E Guillemare, T Coppola, M Lazdunski, und J P Hugnot. 1994. „Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K⁺ channels in the brain“. *FEBS letters* 353 (1): 37–42.
- Lesage, F, E Guillemare, M Fink, F Duprat, M Lazdunski, G Romey, und J Barhanin. 1996. „TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure“. *The EMBO journal* 15 (5): 1004–11.
- Liebau, Stefan, Christian Pröpper, Tobias Böckers, Frank Lehmann-Horn, Alexander Storch, Stephan Grissmer, und Oliver H Wittekindt. 2006. „Selective blockage of Kv1.3 and Kv3.1 channels increases neural progenitor cell proliferation“. *Journal of neurochemistry* 99 (2): 426–37. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03967.x.
- Liman, E R, P Hess, F Weaver, und G Koren. 1991. „Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel“. *Nature* 353 (6346): 752–56. doi:10.1038/353752a0.
- Lioudyno, Maria I., Alexandra M. Birch, Brian S. Tanaka, Yuri Sokolov, Alan L. Goldin, K. George Chandy, James E. Hall, und Michael T. Alkire. 2013. „Shaker-Related Potassium Channels in the Central Medial Nucleus of the Thalamus Are Important Molecular Targets for Arousal Suppression by Volatile General Anesthetics“. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (41): 16310–22. doi:10.1523/JNEUROSCI.0344-13.2013.
- Liu, Xiuxin, Anna J Bolteus, Daniel M Balkin, Oliver Henschel, und Angélique Bordey. 2006. „GFAP-Expressing Cells in the Postnatal Subventricular Zone Display a Unique Glial

- Phenotype Intermediate between Radial Glia and Astrocytes“. *Glia* 54 (5): 394–410. doi:10.1002/glia.20392.
- Lois, C, und A Alvarez-Buylla. 1994. „Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain“. *Science (New York, N.Y.)* 264 (5162): 1145–48.
- Lopatin, A N, E N Makhina, und C G Nichols. 1995. „The mechanism of inward rectification of potassium channels: ‚long-pore plugging‘ by cytoplasmic polyamines“. *The Journal of general physiology* 106 (5): 923–55.
- Lourdel, Stéphane, Marc Paulais, Françoise Cluzeaud, Marcelle Bens, Masayuki Tanemoto, Yoshihisa Kurachi, Alain Vandewalle, und J Teulon. 2002. „An inward rectifier K(+) channel at the basolateral membrane of the mouse distal convoluted tubule: similarities with Kir4-Kir5.1 heteromeric channels“. *The Journal of physiology* 538 (Pt 2): 391–404.
- Lu, Z, und R MacKinnon. 1994. „Electrostatic tuning of Mg²⁺ affinity in an inward-rectifier K+ channel“. *Nature* 371 (6494): 243–46. doi:10.1038/371243a0.
- MacFarlane, S N, und H Sontheimer. 2000. „Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes“. *Glia* 30 (1): 39–48.
- Mazella, Jean, Olivier Pétrault, Guillaume Lucas, Emmanuel Deval, Sophie Béraud-Dufour, Carine Gandin, Malika El-Yacoubi, u. a. 2010. „Spadin, a Sortilin-Derived Peptide, Targeting Rodent TREK-1 Channels: A New Concept in the Antidepressant Drug Design“. *PLoS Biology* 8 (4): e1000355. doi:10.1371/journal.pbio.1000355.
- McCormack, T, und K McCormack. 1994. „Shaker K+ channel beta subunits belong to an NAD(P)H-dependent oxidoreductase superfamily“. *Cell* 79 (7): 1133–35.
- McKeown, Lynn, Lisa Swanton, Philip Robinson, und Owen T Jones. 2008. „Surface expression and distribution of voltage-gated potassium channels in neurons (Review)“. *Molecular membrane biology* 25 (4): 332–43. doi:10.1080/09687680801992470.
- Meuth, Sven G, Thomas Budde, Tatyana Kanyshkova, Tilman Broicher, Thomas Munsch, und Hans-Christian Pape. 2003. „Contribution of TWIK-related acid-sensitive K+ channel 1 (TASK1) and TASK3 channels to the control of activity modes in thalamocortical neurons“. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (16): 6460–69.
- Ming, Guo-li, und Hongjun Song. 2005. „Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system“. *Annual review of neuroscience* 28: 223–50. doi:10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459.
- Morais-Cabral, J H, Y Zhou, und R MacKinnon. 2001. „Energetic optimization of ion conduction rate by the K+ selectivity filter“. *Nature* 414 (6859): 37–42. doi:10.1038/35102000.
- Olsen, Michelle L., und Harald Sontheimer. 2008. „Functional Implications for Kir4.1 Channels in Glial Biology: From K+ Buffering to Cell Differentiation“. *Journal of Neurochemistry* 107 (3): 589–601. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05615.x.
- Papazian, D M, T L Schwarz, B L Tempel, Y N Jan, und L Y Jan. 1987. „Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*“. *Science (New York, N.Y.)* 237 (4816): 749–53.
- Pardo, L A, A Brüggemann, J Camacho, und W Stühmer. 1998. „Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K+ channels“. *The Journal of cell biology* 143 (3): 767–75.
- Parent, J M, T W Yu, R T Leibowitz, D H Geschwind, R S Sloviter, und D H Lowenstein. 1997. „Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus“. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (10): 3727–38.

- Patel, A J, E Honoré, F Lesage, M Fink, G Romey, und M Lazdunski. 1999. „Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels“. *Nature neuroscience* 2 (5): 422–26. doi:10.1038/8084.
- Pei, Lin, Ofer Wisner, Anthony Slavin, David Mu, Scott Powers, Lily Yeh Jan, und Timothy Hoey. 2003. „Oncogenic Potential of TASK3 (Kcnk9) Depends on K⁺ Channel Function“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (13): 7803–7. doi:10.1073/pnas.1232448100.
- Peng, Ying, Kui Lu, Zichen Li, Yaodong Zhao, Yiping Wang, Bin Hu, Pengfei Xu, u. a. 2014. „Blockade of Kv1.3 Channels Ameliorates Radiation-Induced Brain Injury“. *Neuro-Oncology* 16 (4): 528–39. doi:10.1093/neuonc/not221.
- Pfaffinger, P J, und D DeRubeis. 1995. „Shaker K⁺ channel T1 domain self-tetramerizes to a stable structure“. *The Journal of biological chemistry* 270 (48): 28595–600.
- Post, M A, G E Kirsch, und A M Brown. 1996. „Kv2.1 and electrically silent Kv6.1 potassium channel subunits combine and express a novel current“. *FEBS letters* 399 (1-2): 177–82.
- Prüss, Harald, Christian Derst, Reinhard Lommel, und Rüdiger W Veh. 2005. „Differential distribution of individual subunits of strongly inwardly rectifying potassium channels (Kir2 family) in rat brain“. *Brain research. Molecular brain research* 139 (1): 63–79. doi:10.1016/j.molbrainres.2005.05.006.
- Reid, J D, W Lukas, R Shafaatian, A Bertl, C Scheurmann-Kettner, H R Guy, und R A North. 1996. „The *S. cerevisiae* outwardly-rectifying potassium channel (DUK1) identifies a new family of channels with duplicated pore domains“. *Receptors & channels* 4 (1): 51–62.
- Reynolds, B A, und S Weiss. 1992. „Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system“. *Science (New York, N.Y.)* 255 (5052): 1707–10.
- Ribera, A B. 1999. „Potassium Currents in Developing Neurons“. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868 (April): 399–405.
- Ribera, A B, und N C Spitzer. 1992. „Developmental Regulation of Potassium Channels and the Impact on Neuronal Differentiation“. *Ion Channels* 3: 1–38.
- Rietze, Rodney L, und Brent A Reynolds. 2006. „Neural Stem Cell Isolation and Characterization“. *Methods in Enzymology* 419: 3–23. doi:10.1016/S0076-6879(06)19001-1.
- Riquelme, Patricio A, Elodie Drapeau, und Fiona Doetsch. 2008. „Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain“. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 363 (1489): 123–37. doi:10.1098/rstb.2006.2016.
- Rouzair-Dubois, B, und J M Dubois. 1998. „K⁺ Channel Block-Induced Mammalian Neuroblastoma Cell Swelling: A Possible Mechanism to Influence Proliferation“. *The Journal of Physiology* 510 (Pt 1) (Juli): 93–102.
- Sands, Zara A, Alessandro Grottesi, und Mark S P Sansom. 2006. „The intrinsic flexibility of the Kv voltage sensor and its implications for channel gating“. *Biophysical journal* 90 (5): 1598–1606. doi:10.1529/biophysj.105.072199.
- Sawamoto, Kazunobu, Hynek Wichterle, Oscar Gonzalez-Perez, Jeremy A Cholfin, Masayuki Yamada, Nathalie Spassky, Noel S Murcia, u. a. 2006. „New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain“. *Science (New York, N.Y.)* 311 (5761): 629–32. doi:10.1126/science.1119133.
- Scadden, David T. 2006. „The stem-cell niche as an entity of action“. *Nature* 441 (7097): 1075–79. doi:10.1038/nature04957.

- Schaarschmidt, Grit, Florian Wegner, Sigrid C Schwarz, Hartmut Schmidt, und Johannes Schwarz. 2009. „Characterization of Voltage-Gated Potassium Channels in Human Neural Progenitor Cells“. *PloS One* 4 (7): e6168. doi:10.1371/journal.pone.0006168.
- Schofield, R. 1978. „The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell“. *Blood cells* 4 (1-2): 7–25.
- Shieh, C C, M Coghlan, J P Sullivan, und M Gopalakrishnan. 2000. „Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities“. *Pharmacological reviews* 52 (4): 557–94.
- Shi, Jian, Darryl K Miles, Benjamin A Orr, Stephen M Massa, und Steven G Kernie. 2007. „Injury-Induced Neurogenesis in Bax-Deficient Mice: Evidence for Regulation by Voltage-Gated Potassium Channels“. *The European Journal of Neuroscience* 25 (12): 3499–3512. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05624.x.
- Sirois, J E, Q Lei, E M Talley, C Lynch 3rd, und D A Bayliss. 2000. „The TASK-1 two-pore domain K⁺ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics“. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 20 (17): 6347–54.
- Smart, S L, V Lopantsev, C L Zhang, C A Robbins, H Wang, S Y Chiu, P A Schwartzkroin, A Messing, und B L Tempel. 1998. „Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice“. *Neuron* 20 (4): 809–19.
- Smith, Dean O, Julie L Rosenheimer, und Ronald E Kalil. 2008. „Delayed Rectifier and A-Type Potassium Channels Associated with Kv 2.1 and Kv 4.3 Expression in Embryonic Rat Neural Progenitor Cells“. *PloS One* 3 (2): e1604. doi:10.1371/journal.pone.0001604.
- Stocker, M, M Hellwig, und D Kerschensteiner. 1999. „Subunit assembly and domain analysis of electrically silent K⁺ channel alpha-subunits of the rat Kv9 subfamily“. *Journal of neurochemistry* 72 (4): 1725–34.
- Stonehouse, A H, J H Pringle, R I Norman, P R Stanfield, E C Conley, und W J Brammar. 1999. „Characterisation of Kir2.0 proteins in the rat cerebellum and hippocampus by polyclonal antibodies“. *Histochemistry and cell biology* 112 (6): 457–65.
- Takahashi, Kazutoshi, und Shinya Yamanaka. 2006. „Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors“. *Cell* 126 (4): 663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Thomzig, Achim, Gregor Laube, Harald Prüss, und Rüdiger W Veh. 2005. „Pore-forming subunits of K-ATP channels, Kir6.1 and Kir6.2, display prominent differences in regional and cellular distribution in the rat brain“. *The Journal of comparative neurology* 484 (3): 313–30. doi:10.1002/cne.20469.
- Töpert, C, F Döring, E Wischmeyer, C Karschin, J Brockhaus, K Ballanyi, C Derst, und A Karschin. 1998. „Kir2.4: A Novel K⁺ Inward Rectifier Channel Associated with Motoneurons of Cranial Nerve Nuclei“. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (11): 4096–4105.
- Veh, R W, R Lichtinghagen, S Sewing, F Wunder, I M Grumbach, und O Pongs. 1995. „Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain“. *The European journal of neuroscience* 7 (11): 2189–2205.
- Wang, Z, L Yue, M White, G Pelletier, und S Nattel. 1998. „Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle“. *Circulation* 98 (22): 2422–28.
- Wible, B A, M Tagliatela, E Ficker, und A M Brown. 1994. „Gating of inwardly rectifying K⁺ channels localized to a single negatively charged residue“. *Nature* 371 (6494): 246–49. doi:10.1038/371246a0.

- Wonderlin, W F, und J S Strobl. 1996. „Potassium channels, proliferation and G1 progression“. *The Journal of membrane biology* 154 (2): 91–107.
- Wulff, Heike, Neil A Castle, und Luis A Pardo. 2009. „Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets“. *Nature reviews. Drug discovery* 8 (12): 982–1001. doi:10.1038/nrd2983.
- Yang, Jing-Zhe, Xu Huang, Fang-Fang Zhao, Qiang Xu, und Gang Hu. 2012. „Iptakalim Enhances Adult Mouse Hippocampal Neurogenesis via Opening Kir6.1-Composed K-ATP Channels Expressed in Neural Stem Cells“. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 18 (9): 737–44. doi:10.1111/j.1755-5949.2012.00359.x.
- Yasuda, Takahiro, und David J Adams. 2010. „Physiological Roles of Ion Channels in Adult Neural Stem Cells and Their Progeny“. *Journal of Neurochemistry* 114 (4): 946–59. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06822.x.
- Yasuda, Takahiro, Perry F Bartlett, und David J Adams. 2008. „K(ir) and K(v) channels regulate electrical properties and proliferation of adult neural precursor cells“. *Molecular and cellular neurosciences* 37 (2): 284–97. doi:10.1016/j.mcn.2007.10.003.
- Young, Christina C., Michael Stegen, René Bernard, Martin Müller, Josef Bischofberger, Rüdiger W. Veh, Carola A. Haas, und Jakob Wolfart. 2009. „Upregulation of Inward Rectifier K⁺ (Kir2) Channels in Dentate Gyrus Granule Cells in Temporal Lobe Epilepsy“. *The Journal of Physiology* 587 (Pt 17): 4213–33. doi:10.1113/jphysiol.2009.170746.
- Zhao, Chunmei, Wei Deng, und Fred H Gage. 2008. „Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis“. *Cell* 132 (4): 645–60. doi:10.1016/j.cell.2008.01.033.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Michaela Dewes, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Kaliumkanalexpression auf adulten murinen neuronalen Progenitorzellen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Michaela Dewes hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Prüss H*, Dewes M*, Derst C, Fernández-Klett F, Veh RW, Priller J. „Potassium channel expression in adult murine neural progenitor cells” *Neuroscience*, 2011 Apr 28.

*geteilte Erstautorenschaft

Beitrag im Einzelnen: geteilte Erstautorenschaft, praktische Laborarbeit: Gewinnen und Propagieren der primären Stammzellkulturen, Immunhistochemie, Western Blot, Transfektions-, Proliferations- und Differenzierungsexperimente. Kein Anteil am Durchführen des Micro Array.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Prüss H*, Dewes M*, Derst C, Fernández-Klett F, Veh RW, Priller J. „Potassium channel expression in adult murine neural progenitor cells” *Neuroscience*, 2011 Apr 28;180:19-29. Epub 2011 Feb 15.

*geteilte Erstautorenschaft

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Josef Priller für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Vielen Dank auch für die vielen Ratschläge und stets freundliche Unterstützung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Harald Prüß, dem ich das Thema der Arbeit verdanke, für die tolle Betreuung. Er war zu jedem Zeitpunkt ansprechbar für meine technischen und inhaltlichen Fragen und ein geduldiger und inspirierender Ratgeber.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für molekulare Psychiatrie für die interessante Zeit im Labor bedanken. Mein Dank geht insbesondere an Dr. Franzisko Fernández-Klett für die Hilfe am Konfokalmikroskop. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Chotima Böttcher, Christian Böttcher, Melanie Lange, Jasmin Jamal el-Din, Sonja Blumenau und Katja Blazej für die gute Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Rüdiger Veh und Dr. Christian Derst aus dem Zentrum für Anatomie der Charité Universitätsmedizin für die Bereitstellung der Kaliumkanalantikörper.

Meinen Eltern möchte ich für ihre liebevolle Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit danken. Ebenso gilt ein Dank allen meinen Freunden, die mit Tipps und guten Worten die Arbeit begleitet haben.