

Differentielle Expression und Funktion eines
glialen Kaliumkanals ($K_{ir}4.1$, KCNJ10) im
Rückenmark und Bedeutung in einem
neurodegenerativen Krankheitsmodell

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Melanie Kaiser, geb. Handschuh
aus Wilhelmshaven

Göttingen, den 26.05.2008

D7

Referent:

Professor Dr. Rüdiger Hardeland
Institut für Zoologie, Anthropologie und Entwicklungsbiologie
Abteilung Stoffwechselfysiologie
Berliner Strasse 28
37073 Göttingen

Koreferent:

Professor Dr. Reinhard Jahn
Max Planck Institut für biophysikalische Chemie
Abteilung Neurobiologie
Am Fassberg 11
37077 Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2008

FÜR SASCHA

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis	1
1.1.	Abkürzungsverzeichnis	3
2.	Einleitung	6
2.1.	Die Gliazellen des zentralen Nervensystems	6
2.2.	Ionenselektive Kaliumkanäle	14
2.2.1.	Einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle (K_{ir} -Kanäle)	15
2.2.2.	Gliale K_{ir} -Kanäle und Expression im Rückenmark	18
2.3.	Kaliumabhängige Regulation der astroglialen Zellschwellung	21
2.3.1.	Koexpression von $K_{ir}4.1$ und Aquaporin 4	22
2.3.2.	Bedeutung von $K_{ir}4.1$ bei der glialen Zellschwellung im ZNS	23
2.4.	Amyotrophe Lateralsklerose: Ursachen und Mechanismen	26
2.4.1.	Genetische Faktoren bei der ALS	28
2.4.2.	Gliazellen und ALS: Die Umgebung der Motoneurone spielt eine wichtige Rolle	32
2.4.3.	Erhöhte Vulnerabilität von Motoneuronen	35
3.	Zielsetzung	37
4.	Material und Methoden	38
4.1.	Material	38
4.1.1.	Chemikalien, Medien und Puffer	38
4.1.2.	Gebrauchswaren	38
4.1.3.	Geräte	38
4.1.4.	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	38
4.1.5.	Sterilisation	39
4.1.6.	Verwendete Mauslinien	39
4.1.7.	Eukaryontische Zelllinien	42
4.1.8.	Primer	43
4.1.9.	Antikörper	43
4.1.10.	Datenbanken/Software	45
4.2.	Methoden	45
4.2.1.	Genotypisierung	45
4.2.2.	Anlegen primärer glialer Mischkulturen aus Rückenmarksgewebe	46
4.2.3.	Kultivierung der Zelllinie NSC34 und Zelltodanalyse	47
4.2.4.	Histologische, immunhistochemische und immunzytochemische Methoden	49
4.2.5.	Western Blot Analyse	52
4.2.6.	Modellsystem für die Zellschwellung am Beispiel astrozytärer Zellen im Rückenmark der Maus	56
5.	Ergebnisse	60
5.1.	Kontrolle der Spezifität der Antikörper für das $K_{ir}4.1$ -Protein und das Aquaporin 4-Protein	60
5.1.1.	Anti- $K_{ir}4.1$ -Antikörper	60

5.1.2.	Anti-AQP4 Antikörper	61
5.2.	Analyse der entwicklungsabhängigen Expression von K _{ir} 4.1 im Rückenmark der Maus	62
5.3.	Funktionelle Analyse der K _{ir} 4.1-Untereinheit in einem Modell für die Schwellung von Gliazellen	69
5.3.1.	Kolokalisierte Expression von K _{ir} 4.1 und AQP4	69
5.3.2.	Rolle von K _{ir} 4.1 im Schwellungsverhalten von Astrozyten im Rückenmark	73
5.4.	Analyse von K _{ir} 4.1 in einem chronischen ALS-Krankheitsmodell	77
5.4.1.	Expression von K _{ir} 4.1 im Rückenmark und Kleinhirn in Abhängigkeit von der Schwere des Erkrankungsgrades	77
5.4.2.	Reduktion der K _{ir} 4.1-Proteinmenge in SOD1 ^{G93A} -Tieren	79
5.4.3.	Analyse der Proteinmengen der astrozytären Proteine GFAP und AQP4	83
5.4.4.	Auswirkung der Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf die Motoneuron-Zelllinie NSC34	83
5.4.5.	Expression von K _{ir} 4.1 im menschlichen Rückenmark	85
6.	Diskussion	88
6.1.	Bedeutung des komplexen zellspezifischen Expressionsmusters von K _{ir} 4.1	88
6.2.	Spielt K _{ir} 4.1 im Rückenmark eine Rolle beim Kaliumvermittelten Transport von Wasser?	93
6.2.1.	K _{ir} 4.1 und AQP4 kolokalisieren in der grauen Substanz des Rückenmarks	93
6.2.2.	K _{ir} 4.1-Kanäle regulieren das Schwellungsverhalten von astroglialen Endfüßen	96
6.3.	Verlust des K _{ir} 4.1-Kanals im SOD1 ^{G93A} -Mausmodell für ALS	99
6.3.1.	Die K _{ir} 4.1-Expression ist im ALS-Mausmodell spezifisch im Ventralhorn des Rückenmarks reduziert	100
6.3.2.	Eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration induziert Zelltod in der Motoneuron-Zelllinie NSC34	104
7.	Zusammenfassung/Summary	108
7.1.	Zusammenfassung	108
7.2.	Summary	109
8.	Anhang	111
8.1.	Abbildungsverzeichnis	111
8.2.	Referenzen	113
8.3.	Danksagung	141
8.4.	Lebenslauf und wissenschaftliche Publikationen	142
8.4.1.	Lebenslauf	142
8.4.2.	Publikationen	143
8.4.3.	Poster und Abstractveröffentlichungen	143

1.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
A2B5	Abkürzung für ein neuronales Antigen in der Plasmamembran
AK	Antikörper
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	Alpha (α)-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat (α – <i><u>a</u>mino-3-<u>h</u>ydroxy-5-<u>m</u>ethyl-4-<u>i</u>soxazole <u>p</u>ropionic <u>a</u>cid</i>)
AP	Analyseprobe
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
ATP	Adenosintriphosphat
BaCl	Bariumchlorid
BCA	Bicinchonin Säure (<i><u>b</u>icinchoninic <u>a</u>cid</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i><u>b</u>ovine <u>s</u>erum <u>a</u>lbumine</i>)
CaCl ₂	Kalziumchlorid (<i><u>c</u>alcium <u>c</u>hloride</i>)
CNPase	2'-3'-zyklische Nukleotid Phosphodiesterase (<i>2'-3'-<u>c</u>yclic <u>n</u>ucleotide <u>p</u>hosodiesterase</i>)
CV	Deckgläschen (<i><u>c</u>overslip</i>)
DAPI	4'6-Diamidino -2-Phenylindol
DGC	Dystrophin-Glykoprotein-Komplex (<i><u>d</u>ystrophin-<u>g</u>lycoprotein <u>c</u>omplex</i>)
DGM	Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke
DM	Differenzierungsmedium
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (<i><u>D</u>ulbecco's <u>m</u>odified <u>e</u>agle <u>m</u>edium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i><u>d</u>esoxyribonucleic <u>a</u>cid</i>)
DNase 1	Endonuklease, die DNA unspezifisch in Di-, Tri-, und Oligonukleotide mit 5'Phosphat- und 3'Hydroxylenden spaltet
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DsRed	rot fluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma sp.</i>
DTT	Dithiotreitol
EAAT	exzitatorischer Aminosäure-Transporter (<i><u>e</u>xcitatory <u>a</u>mino <u>a</u>cid <u>t</u>ransporter</i>)
ECL	<i><u>e</u>nhanced <u>c</u>hemoluminescens</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i><u>e</u>thylene <u>d</u>iamine <u>t</u>etraacetic <u>a</u>cid</i>)
EGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein (<i><u>e</u>nhanced <u>g</u>reen <u>f</u>luorescent <u>p</u>rotein</i>)
E _K	Gleichgewichtspotential für Kalium (<i><u>e</u>quilibrium potential for <u>p</u>otassium (<u>K</u>⁺)</i>)
EtOH	Ethanol
FALS	familiäre ALS
FENS	<i><u>F</u>ederation of <u>E</u>uropean <u>N</u>eurosciences</i>
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (<i><u>f</u>ibroblast <u>g</u>rowth <u>f</u>actor</i>)
FGFR	Fibroblastenwachstumsfaktor Rezeptor (<i><u>f</u>ibroblast <u>g</u>rowth <u>f</u>actor <u>r</u>eceptor</i>)
FKS	fetales Kälberserum
FTD	Frontotemporale Demenz
FTDP	Frontotemporale Demenz mit Parkinson
GABA	gamma (γ)-Aminobuttersäure (<i><u>\gamma</u>-<u>a</u>mino <u>b</u>utyric <u>a</u>cid</i>)
GFAP	saures Gliafaserprotein (<i><u>g</u>lial <u>f</u>ibrillary <u>a</u>cidic <u>p</u>rotein</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i> (<i><u>g</u>reen <u>f</u>luorescent <u>p</u>rotein</i>)

GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter (menschliches Homolog: EAAT1)
GLT1	glialer Glutamat-Transporter 1 (menschliches Homolog: EAAT2)
GWP	Gewebelysat Western Blot Proben
h	Stunde (<i>hour</i>), human (im Fall von hGFAP, hSOD1)
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung (<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)
HCl	Salzsäure (37%ige Lösung von Chlorwasserstoff in Wasser)
HGNC	<i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
H ₂ O _{dd}	zweifach destilliertes Wasser
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HZ	Heterozygot
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IRK1	einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal 1 (<i>inwardly rectifying K⁺ channel 1</i>)
IUPHAR	<i>International Union of Pharmacology</i>
IZC	Immunzytochemie
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
K _{ir}	einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal (<i>inwardly rectifying potassium (K) channel</i>)
KO	ausgeschaltetes Gen (<i>Knock-Out</i>)
K _v	spannungsgesteuerter Kaliumkanal (<i>voltage gated potassium (K⁺) channel</i>)
LMD	<i>lower motoneuron disease</i>
LP	Ladepuffer
MBP	basisches Myelinprotein (<i>myelin basic protein</i>)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MPI	Max Planck Institut
mSOD1	mutierte SOD1
n	Anzahl (<i>number of elements</i>)
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Enzym in der Plasmamembran, das unter Spaltung von ATP drei Natriumionen zellauswärts und zwei Kaliumionen zelleinwärts transportiert
NaOV	Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)
Na ₂ PP	Dinatriumpyrophosphat (Na ₂ H ₂ P ₂ O ₇)
NGF	Nervenwachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat (<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>)
NWG	Neurowissenschaftliche Gesellschaft Göttingen
P	postnataler Tag
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLP	Proteolipid-Protein
PLSM	(2)-Photonen Laser Mikroskopie
PM	Proliferationsmedium
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P/S	Penizillin/Streptomycin-Lösung

Ran	Abkürzung für ein neuronales Oberflächenantigen in Ratten (<i>rat nuclear antigen</i>)
RL	Ringerlösung
RLB	Ringerlösung mit Barium
RMP	Ruhemembranpotential
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROMK	Kaliumkanal des äußeren Nierenmarks (<i>renal outer medulla K⁺ channel</i>)
RVD	Regulatorische Volumenreduktion (<i>regulatory volume decrease</i>)
SDS	Natriumdodezylsulfat
SI	Internationales Einheitensystem (<i>Système international d'unités</i>)
SOD	Superoxid-Dismutase
Tab	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermomophilus Aquaticus</i>
TEMED	N,N,N,N-Tetra-Methyl-Ethylen-Diamin
Tgn/tgn	Transgen
TM	transmembran
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethansulfonsäure
ÜL	Überlagerung
UV	ultraviolettes Licht
V _m	Membranpotential (<i>membrane voltage</i>)
WB	Western Blot
WBP	Western Blot Puffer
WHO	Welt-Gesundheits-Organisation (<i>world health organisation</i>)
WT/wt	Wildtyp
VAPB	(Vesikel-assoziiertes Membranprotein) -assoziiertes Protein B (<i>vesicle-associated membran protein</i>) - <i>associated protein B</i>)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VSOAC	Volumen-sensitiver Kanal für organische Anionen (<i>volume sensitive organic anion channel</i>)
ZNS	zentrales Nervensystem
ZS	Ziegenserum
ZWB	Zellkulturlysate Western Blot Proben

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich deutsche Fachbegriffe verwendet. In Einzelfällen, sofern kein geeigneter deutscher Fachbegriff vorhanden war oder durch diesen keine eindeutige Beschreibung möglich war, wurden englische Fachbegriffe verwendet. Englische Begriffe sowie Wörter anderer Fremdsprachen wurden kursiv geschrieben. Bei Abkürzungen, die sich im Deutschen und Englischen unterscheiden, wurden die Buchstaben der Abkürzung durch Unterstreichung im englischen Begriff kenntlich gemacht. Markenprodukte wurden ohne Kennzeichnung als solche bezeichnet. Dimensionen wurden dem Internationalen Einheitensystem (SI) entsprechend angegeben.

2. Einleitung

2.1. Die Gliazellen des zentralen Nervensystems

Im menschlichen Zentralnervensystem (ZNS) finden sich hauptsächlich zwei Zelltypen: Neurone und Gliazellen. Ein Großteil der neurowissenschaftlichen Forschung konzentrierte sich in der Vergangenheit auf die elektrisch aktiven Zellen, die Neurone. Nach ihrer Entdeckung durch Rudolf Virchow Mitte des neunzehnten Jahrhunderts wurden Gliazellen, die den Neuronen beim Menschen zahlenmäßig im Verhältnis von etwa 9:1 gegenüberstehen, lange Zeit lediglich als Struktur- und Stützgerüst des Nervensystems angesehen. Dies und das Fehlen adäquater Methoden zur Identifizierung, Darstellung und funktionalen Untersuchung der Zellen führte dazu, dass Gliazellen zunächst nur wenig erforscht wurden. Heute jedoch ist bekannt, dass Gliazellen nicht nur passive Strukturelemente darstellen, sondern u.a. aktive Rollen in der Entwicklung und Regeneration des ZNS sowie bei der Regulation und Modulation der synaptischen Aktivität übernehmen (Booth et al., 2000, Araque et al., 2001, Haydon, 2001, Doetsch, 2003, Allen und Barres, 2005).

Im ZNS unterscheidet man zwei Hauptgruppen von Gliazellen, die Mikroglia und die Makroglia. Die Mikrogliazellen, auch Hortega-Zellen oder Mesoglia genannt, sind nach mehrheitlicher Ansicht mesodermalen Ursprungs und übernehmen im ZNS u.a. die Abräumfunktion von Makrophagen des peripheren Nervensystems. Mikrogliazellen durchwandern kontinuierlich das ZNS als einzelne, ungekoppelte Zellen. Treffen sie auf Zelltrümmer, sterbende Zellen, Viren oder Bakterien, werden sie aktiviert, proliferieren und erfüllen ihre phagozytierende Funktion (siehe Reviews von Gehrman et al., 1995, Aloisi, 2001). Zu der Makroglia zählen die Ependymzellen, Radialglia, Oligodendrozyten und Astrozyten. Ependymzellen grenzen die flüssigkeitsgefüllten Hohlräume des ZNS (Ventrikel und Zentralkanal) in einer einzelligen Schicht vom umliegenden Gewebe ab. So trennen sie die in Kammern verteilte Hirnflüssigkeit vom Gewebe. Die Radialglia tritt vorübergehend in den meisten Hirnregionen während der Neurogenese auf. In Geweben mit geschichteter Architektur, wie z.B. dem Kortex, dienen sie als Leitstruktur für die neuronale Migration. Man geht davon aus, dass die Zellen während der Entwicklung verschwinden oder zu Astrozyten differenzieren (Schmechel und Rakic, 1979, Voigt, 1989). Im adulten ZNS findet man

Radialglia in der Retina in Form von Müllerzellen, im Kleinhirn in Form der Bergmannglia und im Hippocampus (Eckenhoff und Rakic, 1984, Rickmann et al., 1987, Kettenmann und Ransom, 2004). Neuere Studien postulieren, dass Radialglia im adulten Gewebe möglicherweise als neuronale Stammzellen fungieren und zur Bildung von Neuronen beitragen (siehe Reviews von Fricker-Gates, 2006, Bonfanti und Peretto, 2007, Pinto und Gotz, 2007). Die aus dem Ektoderm abgeleiteten Oligodendrozyten umwickeln mit ihren membranösen Ausläufern die Axone der Neurone und bilden die multilamellöse Myelinschicht (siehe Review von Baumann und Pham-Dinh, 2001), die als Isolator die schnelle saltatorische Erregungsleitung ermöglicht. Die myelinisierenden Oligodendrozyten der weißen Substanz werden auch als interfazikulär bezeichnet. Daneben existieren in der grauen Substanz perineurale Oligodendrozyten (Satellitenoligodendrozyten). Diese sind möglicherweise an der Regulation der direkten Umgebung von Neuronen beteiligt (Penfield, 1932, Ludwin, 1984, Ludwin, 1997).

Astrozyten stellen eine sehr heterogene Gruppe dar und können nach verschiedenen Kriterien klassifiziert werden. Basierend auf den Beobachtungen von Santiago Ramón y Cajal wurden zunächst zwei Gruppen unterschieden: protoplasmatische und fibröse Astrozyten. Erstere produzieren eine geringe Menge des Intermediärfilamentproteins GFAP (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*) und befinden sich vornehmlich in der grauen Substanz. Sie haben viele verzweigte Ausläufer mit denen sie Synapsen umschließen. Fibröse Astrozyten sind reich an GFAP und finden sich hauptsächlich in der weißen Substanz. Sie haben dünne, wenig verzweigte oder unverzweigte Ausläufer, die u.a. an den Ranvier'schen Schnürringen enden (Peters, 1976, Zenker, 1994). Es ist davon auszugehen, dass sich diese beiden morphologischen Ausprägungsformen nicht exakt trennen lassen und dass es Übergangsformen gibt. Die frühen Arbeiten von Raff und Kollegen (Raff et al., 1983, Miller und Raff, 1984, Miller et al., 1989, Raff, 1989) unterschieden Astrozyten ausgehend von Untersuchungen am optischen Nerven der Ratte entsprechend ihrer Oberflächenantigene nach Typ 1 (Ran2⁺, GFAP⁺, FGFR3⁺, A2B5⁻) und Typ 2 (A2B5⁺, GFAP⁺, FGFR3⁻, Ran2⁻) (A2B5, neuronales Plasmamembran Antigen; Ran2, *rat neuronal antigen 2*; FGFR3, *fibroblast growth factor receptor 3*). Heute werden Astrozyten vermehrt basierend auf Ergebnissen funktioneller Studien gruppiert, z.B. hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften (Kaliumströme) und Antwort auf Glutamat (Matthias et al., 2003, Grass et

al., 2004, Wallraff et al., 2004). Einige Studien unterscheiden die so genannten 'passiven' Astrozyten, welche Glutamat-Transporter exprimieren und über *gap-junctions* gekoppelt sind, von 'komplexen' Astrozyten, die nicht gekoppelt sind und keine Glutamat-Transporter besitzen (Sontheimer und Waxman, 1993, Kressin et al., 1995, D'Ambrosio et al., 1998, Matthias et al., 2003). Die Literatur hierzu ist allerdings kontrovers. Grass et al. wiesen z.B. im Hirnstamm eine Astrozytenpopulation nach, die ungekoppelt ist aber dennoch eine, wenn auch geringe, Antwort auf die Aktivierung von Glutamat-Transportern zeigt (Grass et al., 2004). Die Diskussion wurde dadurch verstärkt, dass eine unterschiedliche Expression von GFAP in maturer komplexer Glia nachgewiesen wurde (Walz, 2000, Matthias et al., 2003, Fiacco und McCarthy, 2004). Dies hat zu dem Vorschlag geführt, die komplexen Gliazellen als eigenständigen Zelltyp neben den klassischen Astrozyten, Oligodendrozyten und der Mikroglia zu führen. Die astrozytäre Linie besitzt vermutlich eine Vielzahl von gewebespezifischen Subtypen mit spezifischer Funktion, was dadurch unterstützt wird, dass die Zellen in verschiedenen Hirnarealen unterschiedliche Gene aktivieren (Bachoo et al., 2004).

Die Funktionen, die Astrozyten unter physiologischen, pathophysiologischen und regenerativen Bedingungen übernehmen sind vielfältig (Fedoroff, 1986). Strukturell dienen sie als Migrationsschienen für wandernde Neurone während der Entwicklung des ZNS. Im ausdifferenzierten Gewebe sind sie für die Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Architektur notwendig. Ihre Fähigkeit zur Produktion und Speicherung von Glykogen macht sie zu wichtigen Energielieferanten für Neurone. Daneben stellen sie bestimmten Neuronen Glutamin zur Synthese des Neurotransmitters Glutamat zur Verfügung (siehe Reviews von Belin und Hardin, 1991, Danbolt, 2001). Weiterhin sind sie an der Aufrechterhaltung und Modulation der Blut-Hirn-Schranke (Coomber und Stewart, 1986) beteiligt. Die neuere Forschung zeigt, dass Astrozyten neben diesen unterstützenden Aufgaben weitere wichtige Funktionen übernehmen. So wird Astrozyten eine Rolle in der Immunabwehr zugesprochen. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass sie an der Regulation des zerebralen Blutflusses beteiligt sind (siehe Reviews von Ridet et al., 1997, Hirase, 2005, sowie die Studie von Takano et al., 2006).

Die wohl interessanteste wechselseitige Beeinflussung gehen Astrozyten mit Neuronen ein, mit denen sie in komplexer Weise zusammenarbeiten (Newman, 2003b, Newman, 2003a, Newman, 2004, Newman und Volterra, 2004). Astrozyten besitzen Transporter für Neurotransmitter (Largo et al., 1996, Bergles und Jahr, 1997, Bergles et al., 1999). Mittels dieser nehmen sie die in den synaptischen Bereichen freigesetzten Transmitter auf und kontrollieren so die elektrische Aktivität. Sehr viele Neurotransmitter-Rezeptoren, die auf Neuronen beschrieben sind, werden ebenfalls von Astrozyten exprimiert. Hierzu zählen z.B. AMPA-Rezeptoren (AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionic acid), NMDA-Rezeptoren (NMDA, N-methyl-D-aspartic acid), GABA-Rezeptoren (GABA, γ -amino butyric acid) und Glyzin-Rezeptoren (Pastor et al., 1995, Schipke et al., 2001, Matthias et al., 2003, Grass et al., 2004). Astrozyten sind zwar nicht im klassischen Sinne elektrisch aktiv, sie besitzen jedoch eine ihnen eigene Form der Erregbarkeit. So ist es ihnen möglich, auf neuronal freigesetzte Transmitter durch kurze transiente Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration oder durch Kalzium-Oszillationen zu antworten (siehe Reviews von Deitmer et al., 1998, Verkhratsky et al., 1998, Araque et al., 2001, Haydon, 2001). Die intensive Kopplung über *gap-junctions* ermöglicht den Astrozyten einen Transport des Kalzium-Signals über mehrere 100 μ M (Cornell-Bell et al., 1990, Charles et al., 1991). Neben der Signalweiterleitung über *gap-junctions* wird angenommen, dass Astrozyten über die Freisetzung von Mediatoren in benachbarten Astrozyten eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration auslösen. Auf diese Weise könnte das Kalzium-Signal ebenfalls im Netzwerk der Astrozyten weitergeleitet werden (siehe Cotrina und Nedergaart, 2005). Astrozyten verarbeiten das Signal komplex und spiegeln nicht nur die elektrische Aktivität wider. Sie sind in der Lage, unterschiedliche Antworten auf unterschiedliche Transmitterstoffe zu produzieren und können zwischen verschiedenen Signalwegen unterscheiden, die den gleichen Transmitter verwenden. Als Antwort setzen Astrozyten eine Reihe von Signalmolekülen frei, die zusammenfassend als Gliotransmitter bezeichnet werden. Hierzu zählen z.B. Glutamat, D-Serin, ATP (ATP, Adenosintriphosphat) und TNF- α (TNF, Tumor Nekrose Faktor) (siehe Reviews von Perea und Araque, 2005, Araque, 2006). Durch Freisetzung dieser Stoffe beeinflussen Astrozyten die neuronale Aktivität. Aus diesen Erkenntnissen wurde das physiologische Konzept der Tripartite-Synapse entwickelt, das erstmals 1999 vorgestellt wurde (Araque et al., 1999). Die Tripartite-Synapse

besteht aus den prä- und postsynaptischen Strukturen der Synapse sowie den Fortsätzen der Astrozyten. Neuere Studien zeigen, dass die Fortsätze der Astrozyten im Bereich der Synapse hoch motil sind. Die Zellen bilden Lamellopodien entlang der Oberfläche der Neurone und vorübergehende filopodienartige Fortsätze (Hirrlinger et al., 2004). Die genaue Funktion dieser Membranfortsätze ist bisher nicht geklärt. Jedoch ist zu vermuten, dass diese den Astrozyten eine schnelle morphologische Reaktion auf veränderte Umgebungsbedingungen ermöglichen und eine Rolle bei der Umorganisation von Synapsen spielen. Hieraus ergeben sich komplexe Interaktions- und Modulationsmöglichkeiten zwischen Neuronen und Astrozyten, insbesondere auf der Ebene der Synapsen (Araque et al., 2001, Haydon, 2001, Mazzanti et al., 2001, Piet et al., 2004, Zhang und Haydon, 2005).

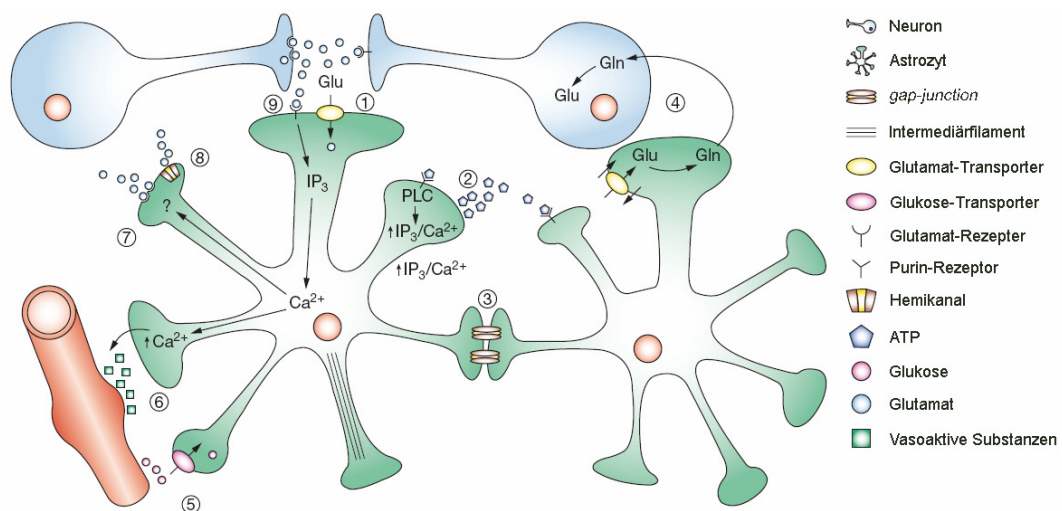


Abb. 1: Funktion von Astrozyten im adulten gesunden Gewebe. (1) Aufnahme von Neurotransmittern (z.B. Glutamat) aus den synaptischen Bereichen. (2) Kommunikation zwischen Astrozyten über ATP-Freisetzung und Bindung an Purin-Rezeptoren auf benachbarten Astrozyten. Dieser Signalweg führt über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und Bildung von Inositoltriphosphat (IP3) zur Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern. (3) *Gap-junction* Kommunikation zwischen Astrozyten. (4) Glutamat-Glutamin-Zyklus. Bereitstellung von Glutamin für Neurone. (5) Aufnahme von Glukose aus dem Gefäßsystem. (6) Regulation des zerebralen Blutflusses über Freisetzung vasoaktiver Substanzen. (7) Freisetzung von Gliotransmittern, hier Glutamat. Die genauen Mechanismen sind noch unklar. (8) Glutamat-Freisetzung über Hemikanäle. (9) Glutamat-Bindung an Glutamat-Rezeptoren, hier mit Wirkung auf das Gefäßsystem über Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in Astrozyten (siehe 6). Gln = Glutamin, Glu = Glutamat, Ca_2^+ = Kalzium. (verändert übernommen aus Maragakis und Rothstein, 2006, gestattet durch Maximillian Publisher Ltd.)

Astrozyten übernehmen weiterhin eine wichtige Funktion in der Kontrolle der extrazellulären Ionenkonzentrationen. Elektrisch aktive Nervenzellen setzen u.a. größere Mengen an Kalium frei. Eine ungesteuerte Akkumulation von Kalium im Extrazellulärraum könnte zu einer

chronischen Depolarisation der Neurone und ebenfalls der Gliazellen führen. Es wurde daher postuliert, dass Kalium an Orten hoher Konzentration passiv aufgenommen und an Orten niedriger Konzentration gemäß dem Kalium-Konzentrationsgradienten in Blutgefäße abgegeben wird (siehe Abb. 2). Diese Hypothese gründet sich auf Experimente, die 1966 von Orkand et al. und Kuffler et al. am optischen Nerven von Amphibien durchgeführt wurden. Astrozyten eignen sich aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften ausgezeichnet für diesen Mechanismus: Sie sind intensiv über *gap-junctions* gekoppelt und besitzen eine hohe Kaliumleitfähigkeit (Kuffler et al., 1966). In der Retina wurde die Kaliumpufferung unter dem Begriff '*potassium siphoning*' für Müllerzellen postuliert (Newman et al., 1984) und ist dort mittlerweile gut untersucht und weitgehend akzeptiert (Newman, 1986b, Newman, 1986a, Newman und Reichenbach, 1996, Kofuji und Newman, 2004, Pannicke et al., 2005a, Bringmann et al., 2006, Reichenbach et al., 2007).

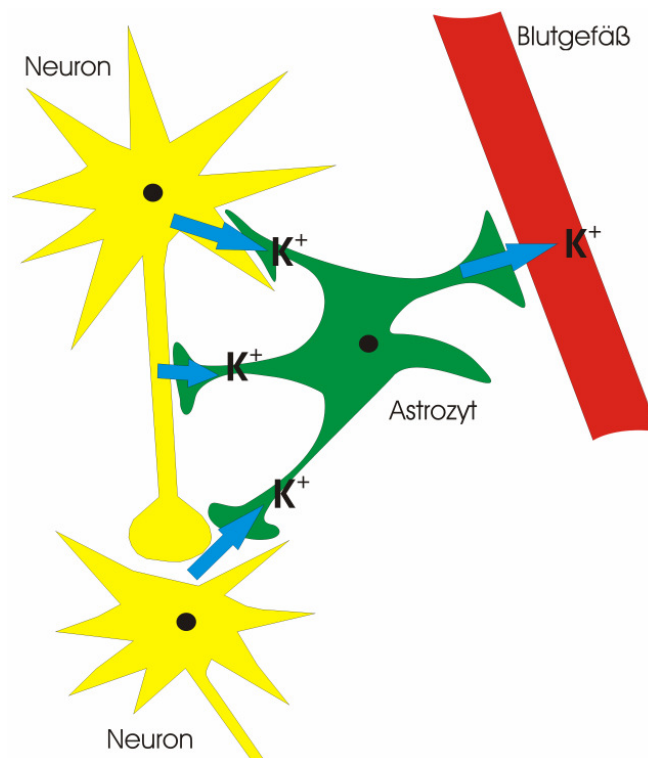


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der Kaliumpufferung durch Astrozyten. Elektrisch aktive Neurone (gelb) setzen Kalium frei. Astrozyten (grün) nehmen dieses durch kaliumselektive Kanäle auf und geben es an umliegende Gefäße (rot) ab. Die blauen Pfeile symbolisieren die Aufnahme von Kalium durch Astrozyten. K^+ = Kaliumionen.

Aufgrund der vielfältigen essentiellen Aufgaben der Astrozyten ist es nahe liegend, dass sie eine Rolle bei akuten oder chronischen pathologischen Veränderungen des ZNS spielen. Astrozyten (und auch Mikrogliazellen)

antworten auf Verletzungen des ZNS mit einer komplexen Reaktion, die sowohl morphologische als auch metabolische Veränderungen der Zellen bewirkt. Dieses Phänomen wird als reaktive Gliose oder Astroglieose bezeichnet. Bei Astrozyten kommt es im Zuge dieser Reaktion zu einer Vergrößerung des Zellvolumens (Hypertrophie) und zu einer verstärkten Produktion von GFAP, wobei die Rolle der GFAP-Erhöhung noch unklar ist (siehe Review von Ridet et al., 1997). Starke Schädigungen können zudem eine Zellproliferation auslösen. Die genaue Funktion reaktiver Astrozyten ist weitgehend unverstanden und es gibt kontroverse Ansichten bezüglich einer zytoprotektiven bzw. schädigenden Auswirkung der Astroglieose. Studien in einem Mausmodell haben jedoch gezeigt, dass die Unterbindung der reaktiven Astroglieose nach Verletzung zu einer Desintegration des Gewebes, Einwanderung von Leukozyten, Tod von Neuronen und Oligodendrozyten sowie zur Beeinträchtigung der Motorik führt (Bush et al., 1999, Faulkner et al., 2004). Möglicherweise formen die reaktiven Astrozyten einen abgeschlossenen Bereich, indem sie das geschädigte Areal gegen das umliegende Gewebe abgrenzen, um dieses zu schützen und seine Funktion zu erhalten (Bush et al., 1999, Faulkner et al., 2004). Derartige 'gliale Narben' können auch negative Folgen haben, da sie die Regeneration von Axonen beeinträchtigen. Die verschiedenen protektiven oder schädigenden Auswirkungen einer Astrozytose sind in dem Artikel von Sofroniew, 2005 zusammengefasst dargestellt.

Astrozyten spielen weiterhin eine Rolle bei Erkrankungen des ZNS. So wird eine Beeinträchtigung der Neuron-Astrozyt Interaktion bei Epilepsie (Kang et al., 2005, Tian et al., 2005) und Schizophrenie vermutet (Tsai et al., 1998, Hashimoto et al., 2005). Eine veränderte Neuron-Glia Kommunikation wird ebenfalls bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Alzheimer, Parkinson, der Huntington Erkrankung und der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) diskutiert. Dies ist ausführlich in Review-Artikeln beschrieben (Leigh und Swash, 1991, Schipper, 1996, Meda et al., 2001, Cotrina und Nedergaard, 2002, Minagar et al., 2002, Sofroniew, 2005, Maragakis und Rothstein, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Astrozyten, die *in vitro* eine mutierte Form des Proteins Presenilin exprimieren, welches bei Alzheimer eine Rolle spielt, eine veränderte Kalziumantwort auf Glutamat zeigen (Johnston et al., 2006). Diese Zellen reagieren im Vergleich zu unmutierten Zellen bereits auf viel geringere ATP- und Glutamatkonzentrationen mit induzierten Kalzium-Oszillationen. Es wird vermutet, dass diese Beeinträchtigung der Kommunikation neben anderen Faktoren, auf noch nicht völlig geklärte

Weise zu neuronalen Fehlfunktionen und neuronalem Zelltod führt. Einige der genannten Erkrankungen sind mit speziellen Proteinablagerungen in Neuronen assoziiert (siehe Abb. 3). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Proteinaggregate auch in Astrozyten akkumulieren. Somit könnten sie die Funktionen der Zellen negativ beeinflussen, beispielsweise durch Beeinträchtigung der zytoskelettalen Organisation und von Transportvorgängen. Bei den Erkrankungen Huntington, Parkinson und der ALS wird eine veränderte Expression von astrozytären Glutamat-Transportern diskutiert (siehe Abb. 3). Die extrazelluläre Akkumulation von Glutamat wird im Rahmen der Exzitotoxizitäts-Hypothese (siehe Abschnitt 2.4.2.) mit dem neuronalen Zelltod in Verbindung gebracht (Lievens et al., 2001, Howland et al., 2002, Guo et al., 2003, Maragakis und Rothstein, 2004).

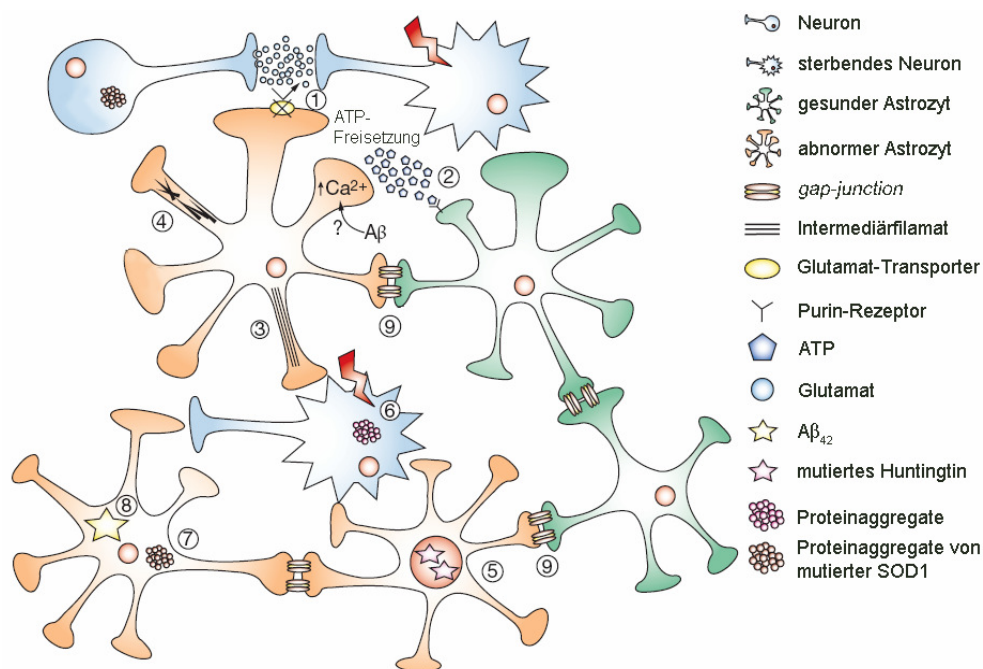


Abb. 3: Mögliche Rolle von Astrozyten in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen. (1) Beeinträchtigung astroglialer Glutamat-Transporter führt zu exzitotoxischen Phänomenen. (2) Alzheimer: Amyloid- β kann evtl. die ATP-Freisetzung durch Astrozyten erhöhen und den Signaltransfer über *gap-junctions* stören. (3) GFAP-Hochregulation, Bedeutung für neurodegenerative Erkrankungen bisher weitgehend unverstanden. (4) Alexander Erkrankung: Mutationen in GFAP bewirken eine Beeinträchtigung der Organisation der Intermediärfilamente. (5) Parkinson: Mutiertes Huntingtin bildet in Astrozyten intrazelluläre Aggregate. (6) Neurone, die von abnormen Astrozyten umgeben sind, bilden Proteinaggregate und Veränderungen der axonalen Struktur. Dies erhöht die Sensibilität gegenüber Schädigungen. (7) ALS: Akkumulation von mutierter Superoxid-Dismutase (SOD1). (8) Alzheimer: Amyloid- β 2-positive Ablagerungen in Astrozyten. (9) Kommunikation zwischen gesunden und abnormen Astrozyten beeinflusst gesunde Astrozyten negativ. $A\beta$ = Amyloid- β , GFAP = saures Gliafaserprotein. Ca_2^+ = Kalzium. (verändert übernommen aus Maragakis und Rothstein, 2006, gestattet durch Maximillian Publisher Ltd.)

2.2. Ionenselektive Kaliumkanäle

Um ihre verschiedenen Funktionen ausführen zu können benötigen Gliazellen, wie alle anderen Zellen, den Aufbau eines Ionengradienten über die semipermeable Zellmembran. Dieser bildet u.a. die Grundlage für Einstellung und Erhalt des Ruhemembranpotentials (RMP), elektrische Aktivität, Transportvorgänge und Sekretion. Ermöglicht wird der Aufbau dieses Gradienten durch spezialisierte Transmembranproteine, die Ionenkanäle. Diese erlauben, überwiegend mit hoher Selektivität für einzelne Ionen, den Durchtritt eines oder mehrerer bestimmter Ionen. Die Benennung der Kanäle erfolgt nach ihrer Ionenselektivität. Passive Ionenkanäle (von manchen Autoren auch 'Leckkanäle' genannt) sind dauerhaft geöffnet und ermöglichen Ionen den Durchtritt entsprechend des elektrochemischen Gradienten. Die Leitfähigkeit der meisten Kanäle wird jedoch durch Öffnen und Schließen in Abhängigkeit von bestimmten Signalen gesteuert (Membranspannung, Liganden, mechanische Reize, Kanalmodifikation durch Phosphorylierung, Temperatur, u.w.) (Kandel et al., 2000, Hille, 2001).

Kaliumkanäle sind unter den Ionenkanälen die häufigsten und werden von nahezu allen lebenden Organismen und Zellen exprimiert. Sie übernehmen wichtige Funktionen bei der Regulation des Membranpotentials, der Feinregulation und Repolarisationsphase des Aktionspotentials und in der Kontrolle der Kaliumhomöostase. Ein funktioneller Kaliumkanal besteht aus vier homomeren oder heteromeren Untereinheiten, die eine zentrale Pore umgeben (siehe Reviews von Lagrutta et al., 1996, Isomoto et al., 1997, Nichols und Lopatin, 1997). Die allgemein anerkannte Grundstruktur (Lu et al., 2001) der Untereinheiten aller Kaliumkanäle besteht aus zwei transmembranen Proteinhelizes, die durch eine extrazelluläre Schleife (P, *pore-loop*, Poren-Schleife) verbunden sind. Diese Struktur bezeichnet man als 2TM/P (2TM/P, 2 transmembrane domain/pore-loop). Die Carboxy- und Aminotermi der Helizes befinden sich intrazellulär. Die Untereinheiten der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle (K_v , *voltage gated potassium (K^+) channels*) und Kalzium-aktivierten Kaliumkanäle (K_{Ca} , *calcium activated potassium (K^+) channels*) setzen sich aus dieser Grundstruktur (hier S5 und S6 genannt) und vier weiteren Helizes (S1-S4) zusammen (6TM/P). Bei den K_v bilden die Helizes S1-S4 die spannungssensitiven Domänen mit dem Spannungssensor (S4). 8TM/2P- und 4TM/2P-Kanäle bestehen aus Kombinationen von 6TM/P und 2TM/P bzw. aus zwei 2TM/P (Biggin

et al., 2000). Diese Kanaltypen besitzen zwei P-Schleifen und daher 2 Poren. Sie bilden vermutlich Dimere, keine Tetramere. Bei den 4TM/2P-Domänen Kanälen handelt es sich z.T. um die klassischen passiven Leckkanäle. Diese werden auch als 2P-Domänen Kanäle (zusammen mit den 8TM/2P) bezeichnet und sind Gegenstand neuerer Forschung. Die einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanäle (K_{ir} , *inwardly rectifying potassium* (K^+) *channels*) bestehen aus vier Untereinheiten, die sich jeweils aus zwei membranspannenden Helizes, welche durch die P-Schleife verbunden sind, zusammensetzen. Die Expression und Funktion des glialen K_{ir} 4.1-Kanals im Rückenmark der Maus ist Thema dieser Dissertation.

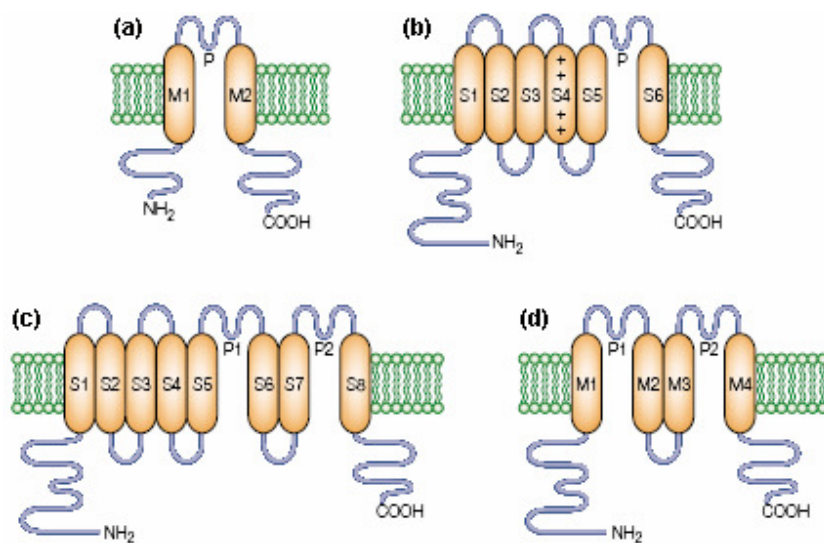


Abb. 4: Klassifikation von Kaliumkanälen. (a) 2TM/P-Kanäle (Struktur der K_{ir} - Kanäle). (b) 6TM/P-Kanäle. (c) 8TM/2P-Kanäle. (d) 4TM/2P-Kanäle. In den 2TM/P- und 4TM/2P-Kanälen werden die Transmembranhelizes mit M1-M2, bzw. M1-M4 bezeichnet, in den 6TM/P- und 8TM/2P-Kanälen mit S1-S6 bzw. S1-S8. S4 = spannungssensitives Segment der 6TM/P-Kanäle, NH_2 = Aminoterminus, $COOH$ = Carboxyterminus, P = Poren-Schleife (Abbildung unverändert übernommen aus Choe, 2002, gestattet durch Maximillian Publisher Ltd.)

2.2.1. Einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle (K_{ir} -Kanäle)

Als klassische Funktion der K_{ir} ist in neuronalen Zellen die Konstanthaltung des Ruhemembranpotentials in Abhängigkeit vom Gleichgewichtspotential (E_K , *equilibrium potential for potassium* (K^+)) für Kalium beschrieben. Auf diese Weise kontrollieren die Kanäle die Schwelle zur Auslösung des Aktionspotentials und die Frequenz repetitiver Aktionspotentiale (Hille, 1992, Lu, 2004). Auch in den nicht-erregbaren Gliazellen sind K_{ir} an der Ausbildung und Konstanthaltung des RMP beteiligt. Neben dieser Rolle haben K_{ir} eine Reihe weiterer Funktionen, deren Erforschung noch lange nicht abgeschlossen ist. So

wird ihnen eine Beteiligung bei Proliferation und Differenzierung, der neuronalen Signalübertragung, Freisetzung von Neurotransmittern, Hormonsekretion, Regulation des zerebralen Blutflusses und der Kontrolle des Elektrolytgleichgewichts zugesprochen (Hille, 1992, Arcangeli et al., 1993, Arcangeli et al., 1995, Lagrutta et al., 1996, Isomoto et al., 1997, Reimann und Ashcroft, 1999, Neusch et al., 2003). Die funktionelle Vielfalt der Kanäle ist u.a. durch Heteromerisierung verschiedener Kanaluntereinheiten erklärbar, wodurch die Kanaleigenschaften modifiziert werden (Schulte und Fakler, 2000, Tucker et al., 2000, Xu et al., 2000, Cui et al., 2001). Hinzu kommt, dass die einzelnen Kanaluntereinheiten durch alternatives Spleißen verändert werden können. Die ersten beiden Gene, die für K_{ir} -Kanäle kodieren, ROMK (*renal outer medulla K^+ channel*) und IRK1 (*inwardly rectifying K^+ -channel 1*), wurden 1993 isoliert (Ho et al., 1993, Kubo et al., 1993). Damit eröffnete sich das Feld für eine ausgedehnte Erforschung der Struktur, Expression und Funktion der K_{ir} -Kanäle. Zur Untersuchung der spezifischen Kanalfunktionen wurden verschiedene *Knock-In* oder *Knock-Out* Mausmodelle generiert (Signorini et al., 1997, Kofuji et al., 2000, Miki et al., 2001, Neusch et al., 2001, Marcus et al., 2002, Miki et al., 2002, Neusch et al., 2003).

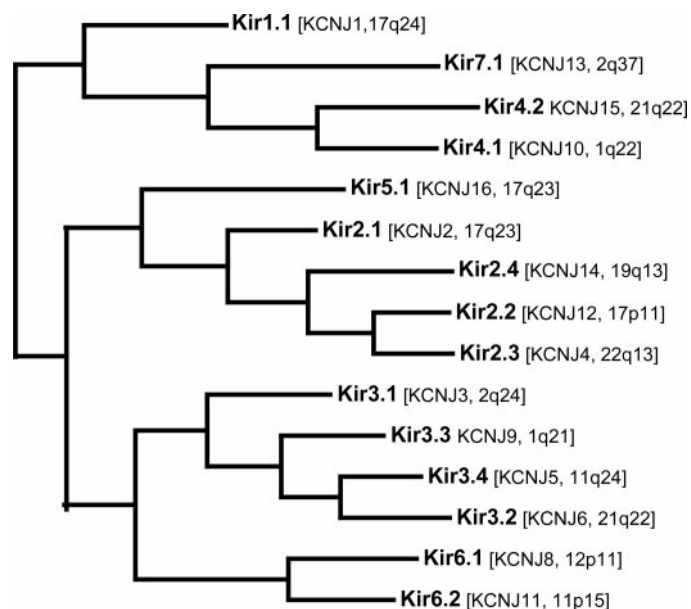


Abb. 5: Phylogenetischer Stammbaum der K_{ir} -Familie. Vergleich der Aminosäuresequenz und phylogenetische Analyse der 15 bekannten Mitglieder der K_{ir} -Familie. Die Genbezeichnungen sind nach IUPHAR und HGNC zusammen mit dem Genlocus angegeben. Stand 2005. (Abbildung unverändert übernommen aus Kubo et al., 2005)

Derzeit werden K_{ir} nach ihren molekularen und elektrophysiologischen Eigenschaften in sieben Gruppen (K_{ir1-7}) eingeteilt (Kubo et al., 2005). Einige Veröffentlichungen gruppieren die Kanäle basierend auf Sequenzhomologie in 6 Subgruppen, dort werden Mitglieder der $K_{ir1.0}$ - und $K_{ir4.0}$ -Familie zusammengefasst (Reimann und Ashcroft, 1999).

Der Kanaltyp der einwärts-gleichrichtenden Kanäle wurde 1949 elektrophysiologisch erstmals von Katz im Skelettmuskel beschrieben. Katz bezeichnete diese Kanäle als 'anomal', da sich die Ionenströme der Kanäle unter experimentellen Bedingungen von den bis dahin bekannten auswärts-gleichrichtenden K_V -vermittelten Kaliumströmen unterschieden. Die Kanäle zeigen eine nicht lineare Strom-Spannungsbeziehung, reagieren auf Hyperpolarisation mit einer Erhöhung der Leitfähigkeit und auf Depolarisation mit einer Abnahme der Leitfähigkeit. Bei weiterer Depolarisation blockieren sie (siehe Abb. 6). Daraus leitet sich der Name 'einwärts-gleichrichtend' ab, da sich die Strom-Spannungskurve graphisch bei zunehmender Depolarisation einwärts aufrichtet (*to rectify*, deutsch: aufrichten). Die Namensgebung ist jedoch etwas irreführend und als historisch zu sehen, da man den Namen lediglich in Analogie zu den auswärts-gleichrichtenden K_V eingeführt hat. Aufgrund ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften können schwach rektifizierende K_{ir} (siehe unten) Kaliumströme sowohl auswärts als auch einwärts leiten. Sie leiten Kaliumströme negativ von E_K besser in Einwärtsrichtung als Auswärtsströme positiv von E_K . *In vivo* hängt die Richtung des Ionenstroms vom Konzentrationsgradienten für Kalium ab. In Neuronen und Gliazellen ist das Membranpotential unter physiologischen (Ruhe-) Bedingungen positiver als E_K , so dass K_{ir} -Kanäle Kalium aus der Zelle transportieren. Damit stabilisieren sie funktionell das Ruhemembranpotential.

Der spannungsabhängige Block bei zunehmend positiven Potentialen von E_K ist durch eine Blockade der Kanäle durch Magnesium und/oder die positiv geladenen Polyamine Spermin, Spermidin und Putreszin bedingt (siehe Reviews von Doupnik et al., 1995, Nichols und Lopatin, 1997, Oliver et al., 2000, Lu, 2004). Diese binden an bestimmte Regionen des Kanals im Bereich der M2-Membranregion und (nicht bei allen K_{ir}) im Bereich des Carboxyterminus. Man unterscheidet zwischen Kanälen mit stark und schwach rektifizierender Komponente. Bei stark rektifizierenden K_{ir} nimmt die Leitfähigkeit für Kaliumströme bei Depolarisation stärker ab als bei schwach rektifizierenden K_{ir} (siehe Abb. 6). Stark rektifizierende K_{ir} ,

wie z.B. ROMK1, besitzen im M2-Segment sehr konservierte Bereiche negativ geladener Aminosäurereste, die eine hohe Affinität zu blockierenden Ionen haben. Schwach gleichrichtende K_{ir} hingegen weisen hier Aminosäuren mit neutralen Resten auf, die eine geringe Bindungsaffinität haben (Lu, 2004). Die schwache Gleichrichtung resultiert wahrscheinlich aus einem Block durch Magnesium, während die starke Gleichrichtung zusätzlich Polyamine erfordert und zu einem nahezu vollständigen Block führt. Die Blockade trägt in elektrisch aktiven Zellen zur Ausbildung der Schwelle des Aktionspotentials bei und ist u.a. für die lange Depolarisationsphase des Herzmuskel-Aktionspotentials wichtig.

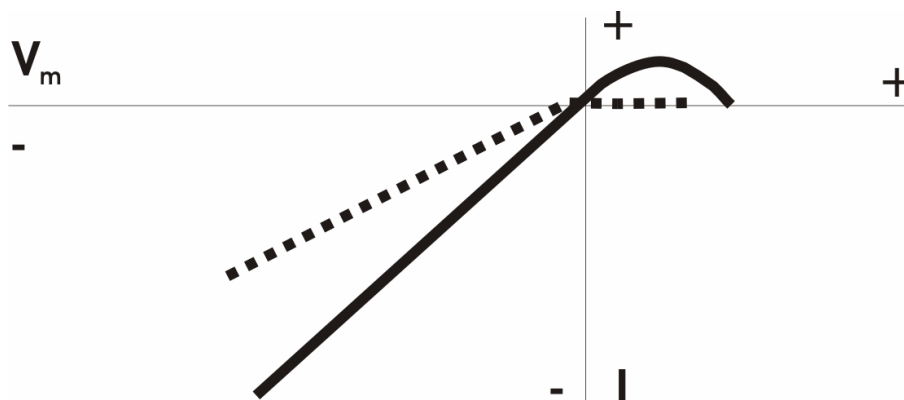


Abb. 6: Exemplarische Strom-Spannungsbeziehung eines stark und eines schwach einwärts-gleichrichtenden K_{ir} . Schwach einwärts-gleichrichtende K_{ir} (—) zeigen bei Potentialen positiver als E_K einen Auswärtsstrom, bis es zu einem spannungsabhängigen Block kommt. Stark einwärts-gleichrichtende K_{ir} (....) hingegen zeigen keinen oder nahezu keinen Auswärtsstrom bei Potentialen positiver als E_K . V_m = Membranpotential, I = Strom

Eine Übersicht zu molekularen Informationen, Leitfähigkeit, Steuerung und Expression der K_{ir} findet sich in der Arbeit von Kubo et al., 2005. Eine Reihe menschlicher Erkrankungen sind mit Mutationen in den Genen für bestimmte Mitglieder dieser Familie assoziiert (siehe Reviews von Abraham et al., 1999, Neusch et al., 2003). Zu diesen zählen das seltene Bartter-Syndrom Typ 2 ($K_{ir}1.1$), die persistente hyperinsulinämische infantile Hypoglykämie ($K_{ir}6.2$) und das Andersen-Syndrom ($K_{ir}2.1$) (Plaster et al., 2001, Preisig-Müller et al., 2002).

2.2.2. Gliale K_{ir} -Kanäle und Expression im Rückenmark

Gliale K_{ir} sind in den letzten Jahren mehr und mehr in das Interesse der Forschung geraten. Die Expression der verschiedenen K_{ir} in Gliazellen ist tabellarisch im Review von Butt und Kalsi, 2006 zusammengefasst. In der vorliegenden Arbeit steht die Untersuchung der ATP-abhängigen $K_{ir}4.1$ -Untereinheit (KCNJ10 nach HGCN, Synonyme: KAB-2, $K_{ir}1.2$, Bir10,

BIRK-10, BIRK-1, KCNJ13-PEN) im Vordergrund. Außerhalb des ZNS ist eine Expression von $K_{ir}4.1$ in der basolateralen Membran des renalen Epithels im distalen Tubulus der Niere beschrieben (Ito et al., 1996), in der apikalen Membran der Parietalzellen der Darmmukosa (Fujita et al., 2002) und in Intermediärzellen der Cochlea (Ando und Takeuchi, 1999, Marcus et al., 2002, Rozengurt et al., 2003). In letzteren ist $K_{ir}4.1$ am Aufbau des endokochlearen Potentials beteiligt.

Im ZNS wird $K_{ir}4.1$ hauptsächlich in Gliazellen beschrieben (Takumi et al., 1995, Tada et al., 1997, Higashi et al., 2001), es gibt jedoch auch Studien, die eine neuronale Expression postulieren (Bredt et al., 1995, Jiang et al., 2001, Li et al., 2001). $K_{ir}4.1$ wird verstärkt im Bereich von Blutgefäßen und Synapsen detektiert (Higashi et al., 2001). Die astrogliale Expression von $K_{ir}4.1$ wird in diversen unabhängigen Studien gezeigt (Poopalasundaram et al., 2000, Higashi et al., 2001, Kalsi et al., 2004, Olsen et al., 2006). Weiterhin wird $K_{ir}4.1$ in retinalen Müllerzellen (Ishii et al., 1997, Nagelhus et al., 1999) und in der Bergmannglia (Takumi et al., 1995, Poopalasundaram et al., 2000, Higashi et al., 2001) des Kleinhirns nachgewiesen. Einige Studien (Poopalasundaram et al., 2000) weisen dabei darauf hin, dass $K_{ir}4.1$ eventuell nicht von allen Astrozyten-Subtypen exprimiert wird. Bezüglich der Expression von $K_{ir}4.1$ auf Oligodendrozyten gibt es kontroverse Studien. Higashi et al., 2001 konnten kein $K_{ir}4.1$ auf Oligodendrozyten nachweisen, wohingegen die Studie von Neusch et al., 2001 eine Expression zeigt und diese durch elektrophysiologische Daten verifiziert. Die oligodendrogliale Expression von $K_{ir}4.1$ wird weiterhin durch die Daten von Kalsi et al., 2004 und durch die kürzlich erschienene Studie von Djukic et al., 2007 bestätigt.

Neben der klassischen Rolle in der Generation des RMP scheint $K_{ir}4.1$ in den verschiedenen glialen Zellen spezifische weitere Funktionen zu erfüllen. Es wird vermutet, dass $K_{ir}4.1$ an der Regulation der Differenzierung von Oligodendrozyten beteiligt ist. Mit dem Beginn des Differenzierungsprozesses kommt es in diesen Zellen zu einer Hochregulation von K_{ir} -Kanälen (Sontheimer et al., 1989, Barres et al., 1990b, Glassmeier und Jeserich, 1995, Knutson et al., 1997). In dem (in dieser Arbeit verwendeten) $K_{ir}4.1$ -KO-Mausmodell zeigt sich bei homozygoten Tieren ($K_{ir}4.1$ -KO) *in vitro* eine Beeinträchtigung der Entwicklung der Oligodendrozyten, die morphologisch bipolar, aufgeschwollen und immatur erscheinen. *In situ* können schwere Dysmyelinisierungen (Neusch et al., 2001) gezeigt werden, was eine Rolle

für $K_{ir}4.1$ in der Initiation der Myelinisierung vermuten lässt. Elektrophysiologisch zeichnen sich Oligodendrozyten von $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren *in vitro* durch einen Verlust K_{ir} -Strömen, ein depolarisiertes Membranpotential, einen hohen Eingangswiderstand sowie eine verminderte Gesamtleitfähigkeit der Membran aus (Neusch et al., 2001). Die molekularen Fehlschritte einer vermuteten Differenzierungsstörung von Oligodendrozyten sowie die konkrete Rolle von $K_{ir}4.1$ im Entwicklungsprozess der Oligodendrozyten sind jedoch bisher nicht bekannt.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften und das Expressionsmuster von $K_{ir}4.1$ haben zu der Annahme geführt, dass $K_{ir}4.1$ an der Aufnahme von Kalium bei dem einleitend beschriebenen postulierten Mechanismus der Kaliumpufferung durch Astrozyten beteiligt ist. Wegweisend waren dabei Experimente, die von Kofuji et al., 2000 an der Retina von $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren durchgeführt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die P1-Welle, die allgemein akzeptiert den Kaliumtransport in der Retina widerspiegelt, in $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren fehlt. Neben den Müllerzellen der Retina exprimieren Astrozyten in anderen ZNS-Regionen, wie z.B. dem Rückenmark, ebenfalls $K_{ir}4.1$. Das Membranpotential von Gliazellen ist unter physiologischen Bedingungen nur etwas positiver als E_K , so dass die Kaliumströme auswärts gerichtet sind. Eine lokale Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration nach elektrischer Aktivität bewirkt eine Verschiebung von E_K , so dass dieses positiver wird als das Membranpotential der Astrozyten. $K_{ir}4.1$ -Kanäle können unter solchen Bedingungen Kalium in die Zelle aufnehmen. Es wird vermutet, dass Kalium innerhalb des Astrozyten bzw. über mehrere *gap-junction*-gekoppelte Astrozyten in den Bereich perivaskulärer Fortsätze transportiert wird. In diesem Bereich ist der Konzentrationsgradient für Kalium nach außen gerichtet, so dass Kalium an das Gefäßsystem abgegeben wird. Wasser und Chlorid können entlang dem aufgebauten elektrochemischen Gradienten folgen (Barres et al., 1990a, Sontheimer, 1994, Takumi et al., 1995).

Neuere Studien in der Retina lassen eine differenzierte Aufgabenteilung verschiedener K_{ir} -Kanäle vermuten. Müllerzellen exprimieren in den Membranbereichen, die an das Neuropil grenzen, verstärkt $K_{ir}2.1$. $K_{ir}4.1$ wird vorwiegend auf den Endfüßen der Müllerzellen in Kontakt mit dem Glaskörper und mit Blutgefäßen nachgewiesen (Kofuji et al., 2002). Auf Basis der Verteilung und elektrophysiologischen Charakteristiken der

beiden K_{ir} -Kanäle wurde postuliert, dass Kalium im Neuropil von den Müllerzellen über $K_{ir}2.1$ aufgenommen und über $K_{ir}4.1$ an Blutgefäße oder in den Glaskörper abgegeben wird (Kofuji et al., 2002). Andere Studien schlagen vor, dass Kalium in die Müllerzellen über $K_{ir}4.1/K_{ir}5.1$ -Heteromere aufgenommen werden könne, während die Abgabe über $K_{ir}4.1$ -Homomere erfolgen soll (Ishii et al., 2003). $K_{ir}4.1/K_{ir}5.1$ -Heteromere sind im Gegensatz zu $K_{ir}4.1$ -Homomeren stark sensibel gegenüber Veränderungen des intrazellulären pH-Werts. Diese Eigenschaft begünstigt die Aufnahme von Kalium im Bereich des Neuropils (Ishii et al., 2003, Hibino et al., 2004). Es gibt jedoch kontroverse Studien hinsichtlich der Expression von $K_{ir}5.1$ in der Retina (Kofuji et al., 2002, Raap et al., 2002). Studien an der ischämischen Retina (Iandiev et al., 2006) lassen weiterhin vermuten, dass $K_{ir}2.1$ in der Kaliumaufnahme durch Müllerzellen eher relevant ist als $K_{ir}4.1/K_{ir}5.1$ -Heteromere.

2.3. Kaliumabhängige Regulation der astroglialen Zellanschwellung

Die Funktionalität des ZNS ist entscheidend abhängig von der Kontrolle des Ionenmilieus. Astrozyten sind in der Lage, extrazelluläre Veränderungen der einzelnen Ionenkonzentrationen und Osmolarität wahrzunehmen und auf diese zu reagieren. Sie beantworten einen Abfall der extrazellulären Osmolarität mit einer Volumenzunahme. Eine dauerhafte Zellanschwellung wäre fatal. Die Zellarchitektur und damit die strukturellen Aufgaben der Astrozyten werden durch die Schwellung beeinträchtigt (Hallows et al., 1996). Durch die Veränderung des Transmembran-Gradienten werden die vielfältigen regulatorischen und modulatorischen Funktionen der Astrozyten negativ beeinflusst. Die Schwellung führt weiterhin zu einer Reduktion des zerebralen Blutflusses, wodurch es zu einer Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung des Gewebes kommt. Astrozyten verfügen über komplexe Regulationsmechanismen, um ihr Ausgangsvolumen wieder herzustellen (Pasantes-Morales et al., 1993, Moran et al., 1994, Pasantes-Morales et al., 1994a, Pasantes-Morales et al., 1994b). Diesen Prozess bezeichnet man als regulatorische Volumenreduktion (RVD, *regulatory volume decrease*) (siehe Reviews von Pasantes-Morales, 1996, Lang et al., 1998, O'Neill, 1999).

K_{ir} -Kanäle könnten eine Rolle bei den Volumen-regulatorischen Prozessen innerhalb der Astrozyten spielen. Die Aufnahme von Kalium

bei dem postulierten Mechanismus der Kaliumpufferung führt durch die Veränderung des osmotischen Gradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum zu einer kompensatorischen Wasseraufnahme. Ebenso wäre es denkbar, dass die Abgabe von Kalium über K_{ir} zur Volumenreduktion nach Schwellung beitragen könnte. Die Bewegung von Wasser erfolgt passiv in Abhängigkeit vom osmotischen Gradienten. K_{ir} - Kanäle selbst erlauben keinen (signifikanten) Transport von Wasser. Bereits in den 50er Jahren wurde postuliert, dass der schnelle Transport von Wasser über die Zellmembran nicht allein durch Diffusion (Sidel und Solomon, 1957), sondern vielmehr durch einen Kanal-vermittelten Transport zu erklären sei.

2.3.1. Koexpression von $K_{ir}4.1$ und Aquaporin 4

Die Existenz von Wasserkanälen, heute Aquaporine (AQP) genannt, wurde erstmalig in der Membran roter Blutkörperchen nachgewiesen (Agre et al., 1987, Denker et al., 1988). Mittlerweile sind 11 verschiedene Subtypen (AQP0-10) in Säugetieren bekannt. Verkman et al., 2005 listen in ihrem Review 13 Subtypen unter Einbezug der kürzlich entdeckten Gene für zwei AQP-ähnliche Kanäle (AQP11 und AQP12) auf. Diese unterscheiden sich von den bekannten AQP v.a. durch eine spezielle Sequenz in einem charakteristischen Aminosäuremotif der AQP aus. Ein AQP-Kanal ist aus einer Polypeptidkette aufgebaut, die die Membran 6-mal durchspannt und eine zentrale Pore bildet. Für AQP1 konnte gezeigt werden, dass dieser Kanal Tetramere bildet (Verbavatz et al., 1993), dieser Aufbau wird auch für die anderen AQP angenommen. Jede Untereinheit des Tetramers bildet dabei eine separate Wasserpore. Auf Basis ihrer Sequenz und Funktion werden die AQP in den meisten Studien in zwei Unterfamilien unterteilt. Dies sind Aquaporine, die hauptsächlich permeabel für Wasser sind und Aquaglyzeroporine, die zusätzlich permeabel einige kleine gelöste Stoffe, insbesondere Glycerol, sind. Im ZNS von Nagetieren ist die Expression von AQP1, 3, 4, 5, 8 und 9 beschrieben (siehe Review von Badaut et al., 2002). AQP4 ist im ZNS quantitativ am häufigsten exprimiert und am besten untersucht. Es wird primär auf Astrozyten detektiert, auch auf Endothelzellen und Ependymzellen, nicht aber auf Neuronen (Nielsen et al., 1997, Nagelhus et al., 1998). AQP4 zeigt eine polarisierte Expression. Es wird vornehmlich auf Fortsätzen der Astrozyten nachgewiesen, die sich in der Nähe von Kapillaren, im Neuropil oder nahe der Hirnhäute befinden (Nielsen et al., 1997). Interessanterweise zeigen $K_{ir}4.1$ und AQP4 in einigen Geweben

eine sehr ähnliche Verteilung. Zum Beispiel konnte in der Membran der Müllerzellen der Retina eine starke und kolokalisierte Expression von $K_{ir}4.1$ und AQP4 in den Fortsätzen gezeigt werden, die Blutgefäße umgeben oder in der Nähe des Übergangs zum Glaskörper verlaufen (Nagelhus et al., 1998). $K_{ir}4.1$ und AQP4 werden dort zusammen in einem Multiproteinkomplex, dem Dystrophin-Glykoprotein-Komplex (DGC, *dystrophin glycoprotein complex*), exprimiert und positioniert, wobei sie aber vermutlich unabhängig voneinander über unterschiedliche Mechanismen in diesen Komplex integriert werden (Connors et al., 2004, Guadagno und Moukhles, 2004, Nagelhus et al., 2004, Noel et al., 2005, Connors und Kofuji, 2006). Die Koexpression der beiden Kanalproteine führte mehrere wissenschaftliche Gruppen zu der Hypothese, dass der Transport von Kalium über $K_{ir}4.1$ und Wasser über AQP4, zumindest in der Retina, funktionell gekoppelt sei. Der experimentelle Beweis hierfür wurde jedoch bisher nicht erbracht.

2.3.2. Bedeutung von $K_{ir}4.1$ bei der glialen Zellschwellung im ZNS

Die Anschwellung von Gliazellen ist eine zentrale Ursache der Ausbildung zerebraler Ödeme. Klassisch wird zwischen zwei Formen von Hirnödemen unterschieden: vasogen und zytotoxisch (Klatzo, 1967). Pathophysiologisch treten das vasogene und zytotoxische (in der neueren Literatur als zelluläres Ödem bezeichnet) Ödem in der Regel nie in ihrer Reinform auf. Beide Phänomene beruhen auf einem Ungleichgewicht im Wassertransport, die molekularen Mechanismen und Konsequenzen unterscheiden sich jedoch und sind bisher nicht vollständig erforscht.

Das vasogene Ödem zeichnet sich primär durch den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und einer damit verbundenen Akkumulation von Flüssigkeit inklusive Plasmabestandteilen im Extrazellulärraum aus. Astrozyten nehmen Plasmaproteine und überschüssige Elektrolyte auf und erhalten so die neuronale Homöostase. Sekundär kann es zu einer Zellschwellung von Astrozyten kommen, da der Stoffaufnahme ein osmotischer Wassereinstrom folgt. Beim zellulären Ödem ist die intrazelluläre Akkumulation von Flüssigkeit das primäre Charakteristikum und tritt unabhängig von einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke auf. Auch Neurone, aber vorwiegend Astrozyten sind betroffen. Ausgelöst wird das zelluläre Ödem, in Kombination oder einzeln, durch eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran für Natrium und Kalium, ein Energiedefizit durch eine Beeinträchtigung der Na^+/K^+ -ATPase oder eine anhaltende Aufnahme osmotisch wirksamer Substanzen. Das veränderte osmotische

Gleichgewicht zwischen Extra- und Intrazellulärraum führt zu einem Einstrom von Wasser in die Zelle (siehe Reviews von Kempfski, 2001, Kimelberg, 2004, Papadopoulos et al., 2004, Unterberg et al., 2004).

In der Literatur der letzten Jahre finden sich vermehrt Hinweise darauf, dass Veränderungen im Expressionsmuster von $K_{ir}4.1$ -Kanälen möglicherweise an der osmotischen Zellschwellung bei Krankheitsprozessen mit Ödembildung beteiligt sein könnten. In der Retina wird die Expression von $K_{ir}4.1$ -Kanälen in Müllerzellen nach transienter Ischämie reduziert. Dies wurde auch bei retinalen Ödemen beobachtet, die durch Entzündung ausgelöst werden (Pannicke et al., 2005a, Pannicke et al., 2005b). Astrogliale Tumore der Klasse WHO2 (WHO, *world health organisation*) zeigen eine Umverteilung von $K_{ir}4.1$, was mit einem milden zellulären Ödem korreliert ist. In Glioblastomen der Klasse WHO4 kommt es zusätzlich zu einer Redistribution von AQP4 (Warth et al., 2004, Warth et al., 2005). Saadoun et al., 2003 zeigten eine Hochregulation von $K_{ir}4.1$ und AQP4 unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen und stellten die Hypothese auf, dass Kaliumpufferung und Wassertransport unter physiologischen Bedingungen gekoppelt sind und bei der Ödementstehung entkoppelt werden.

Sehr eindrucksvoll wurde die putative Rolle von $K_{ir}4.1$ beim retinalen Ödem aufgezeigt. In postischämischen Müllerzellen ist eine Reduktion von $K_{ir}4.1$ sowohl elektrophysiologisch, proteinbiochemisch und immunhistochemisch detektierbar (Pannicke et al., 2004, Pannicke et al., 2005a, Pannicke et al., 2005b, Iandiev et al., 2006, Wurm et al., 2006a, Wurm et al., 2006b). Die Expression des stark einwärts-gerichteten $K_{ir}2.1$ Kanals ist unverändert (Iandiev et al., 2006). Die Reduktion von $K_{ir}4.1$ geht mit Ausbildung eines zellulären Ödems in Müllerzellen einher.

Bringmann et al., 2005 postulierten ein Modell zur Anschwellung von Müllerzellen nach einer Ischämie, dass z.T. auf dem von Kofuji et al., 2000 gezeigten Expressionsmuster der beiden Kanäle $K_{ir}4.1$ und $K_{ir}2.1$ basiert (Abb. 7, Normalzustand, vergleiche Abschnitt 2.2.2.). Unter ischämischen Bedingungen kommt es zu einer Übererregung der Neurone, diese setzen große Mengen Glutamat und Kalium frei, was zur Öffnung neuronaler Natriumkanäle führt, über welche Natrium in die Neurone gelangt. Dies löst einen osmotischen Nachstrom von Wasser aus und resultiert in einer Anschwellung der Neurone (Abb. 7, Ischämie I). Der persistente Natriumeinstrom in die Neurone und die erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration bewirken eine chronische Depolarisation der

Neurone (Abb. 7, Ischämie II), wodurch spannungsgesteuerte Kalziumkanäle geöffnet werden. Kalzium strömt in die Neurone und löst den apoptotischen Zelltod der Neurone aus. In der postischämischen Retina sind die auswärts-gerichteten Kaliumströme stark vermindert (Pannicke et al., 2005a). Dies wird ausgelöst durch die Reduktion des $K_{ir}4.1$ -Kanalproteins (Pannicke et al., 2004). Da die Menge der $K_{ir}2.1$ -Kanäle unverändert bleibt, kann Kalium weiter in die Zellen aufgenommen werden. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation von Kalium in den Müllerzellen, die dieses aufgrund des Mangels an $K_{ir}4.1$ -Kanälen nicht freisetzen können. Wasser strömt durch den aufgebauten osmotischen Gradienten in die Müllerzellen ein, wodurch es zu einer Zellanschwellung kommt (Abb. 7, Postischämie).

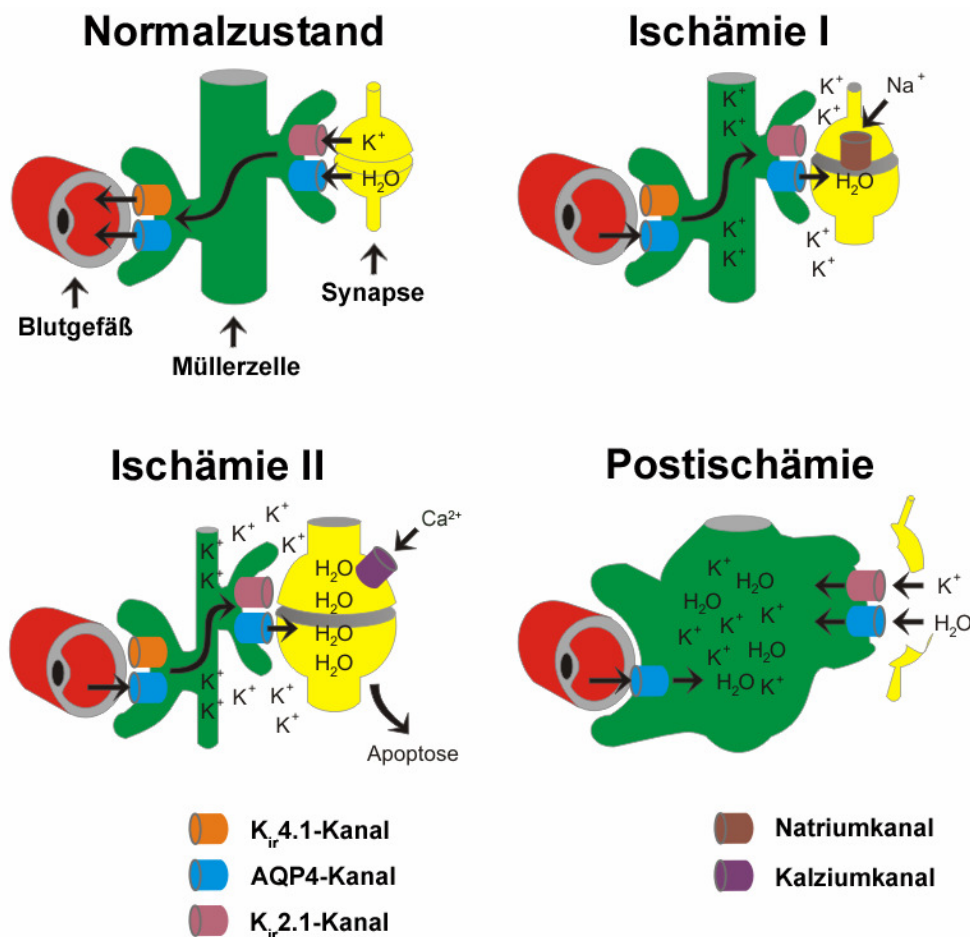


Abb. 7: Schematische Darstellung der Rolle von $K_{ir}4.1$ bei der Schwellung von Müllerzellen in der postischämischen Retina. Die Erklärung des gezeigten Modells findet sich im obigen Text. Neurone sind zur Vereinfachung nur durch Darstellung einer Synapse repräsentiert. K^+ = Kaliumionen, Na^+ = Natriumionen, Ca^{2+} = Kalziumionen, H_2O = Wasser (verändert übernommen aus Bringmann et al., 2005)

2.4. Amyotrophe Lateralsklerose: Ursachen und Mechanismen

Störungen der Expression und Funktion sowie strukturelle Abberationen von Ionenkanälen sind mit einer Vielzahl pathologischer Prozesse assoziiert (Abraham et al., 1999, Benatar, 2000, Neusch et al., 2003, Graves und Hanna, 2005) und können auch bei neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielen. So sind z.B. Veränderungen in der Expression von Natriumkanälen im Kleinhirn bei der Multiplen Sklerose beschrieben (siehe Reviews von Waxman et al., 2000, Waxman, 2005).

Aufgrund der vielfältigen Funktionen, die K_{ir} -Kanäle übernehmen ist es nahe liegend, dass auch sie eine Rolle bei Erkrankungen des ZNS spielen können. Es gibt Hinweise darauf, dass K_{ir} -Kanäle bei der Entstehung von Epilepsie beteiligt sind (Bordey und Sontheimer, 1998, Schroder et al., 2000, Schroder et al., 2002, Steinhauser und Seifert, 2002). Eine chronische Übererregung von Motoneuronen wird bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) diskutiert. Eine beeinträchtigte Kaliumhomöostase könnte zu einer solchen Übererregung beitragen. Die Untersuchung von $K_{ir4.1}$ in einem Mausmodell für die ALS war daher ein weiterer wichtiger Punkt der vorliegenden Dissertation.

Das Krankheitsbild der ALS, auch bekannt unter dem Namen Lou Gehrig's Krankheit (nach dem 1941 verstorbenen deutschstämmigen US-Baseball-Spieler Heinrich Ludwig ‚Lou‘ Gehrig) wurde 1869 erstmals von dem französischen Neurobiologen Jean Martin Charcot beschrieben (Charcot und Joffray, 1869). Die ALS ist die häufigste motorische Systemerkrankung mit einer jährlichen Neuerkrankungsrate (Inzidenz) von etwa 1-3/100000 Einwohnern pro Jahr (Annegers et al., 1991, McGuire et al., 1996, Traynor et al., 1999, Walling, 1999), die mit zunehmendem Alter ansteigt. Durchschnittlich sind etwa 4-6/100000 Menschen an ALS erkrankt (Prävalenz). ALS ist derzeit nicht heilbar. Es gibt physiotherapeutische Ansätze, die zu einer Verbesserung des Befindens beitragen. Weiterhin sind Medikamente (z.B. Riluzol) im Einsatz, die zu einer geringfügigen Verlangsamung des Krankheitsverlaufs führen. Neuere Studien befassen sich mit der Möglichkeit gentherapeutischer Maßnahmen zur Gabe neurotrophischer Faktoren oder Stammzelltherapie (siehe Review von Hedlund et al., 2007).

Symptomatisch äußert sich die ALS anfänglich durch erhöhte Müdigkeit, Krämpfe und Muskelschwäche. Es kommt zu unkontrollierten

Muskelzuckungen (Faszikulationen), übersteigerten Reflexen (z.B. Kaumuskelreflex) und Muskelschwund (Atrophie). In der Regel beginnt die Krankheit lokal mit einer einseitigen Schwächung von Unterarm und Hand, seltener auch der Beine und setzt sich dann progressiv fort. Die Schließmuskeln von Blase und Darm sowie die Augenmuskeln (außer in sehr seltenen Fällen) sind im Verlauf der Erkrankung nicht betroffen. In den Endstadien führt meistens die Lähmung der Atemmuskulatur, oft einhergehend mit einer Lungenentzündung, zum Tod. Die Überlebenszeit ist unterschiedlich, sie liegt zwischen wenigen Monaten und 3-5 Jahren, in seltenen Fällen länger (Guiloff und Goonetilleke, 1995, Westarp, 1995, Dengler et al., 1999, Dengler, 2003, Meyer, 2007).

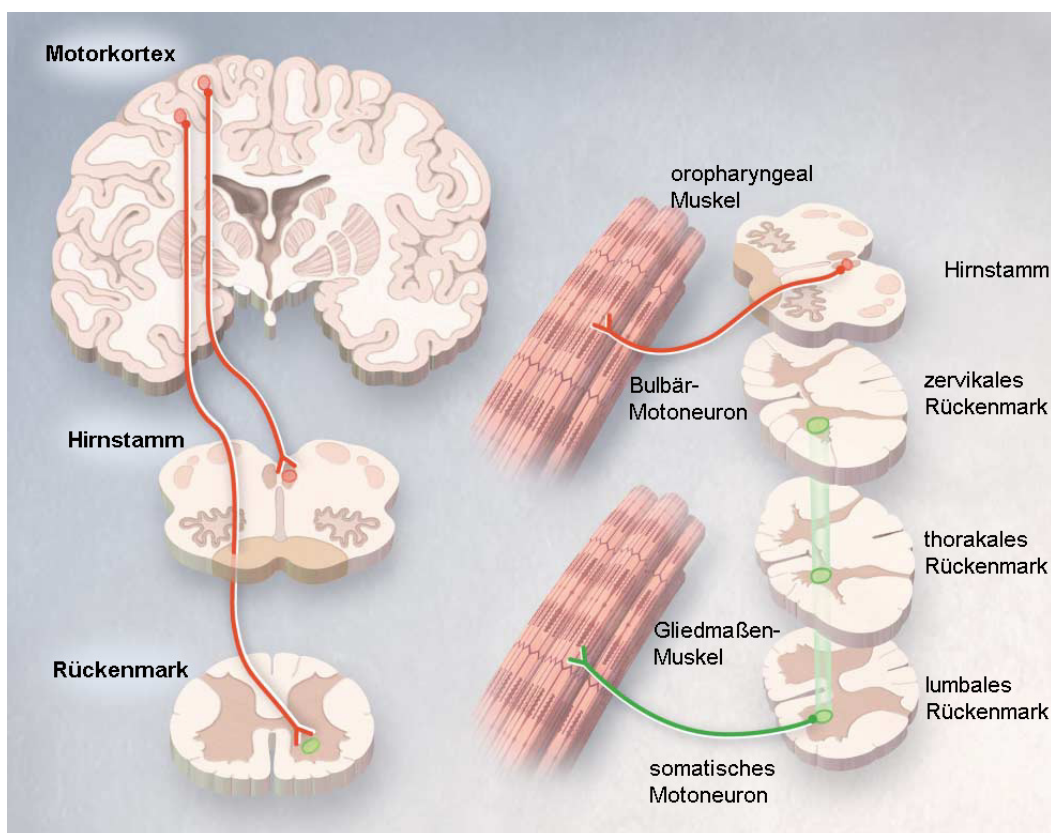


Abb. 8: Motoneurone sind bei der ALS selektiv betroffen. Die Degeneration von Motoneuronen des motorischen Kortex führt zu Spastik, gesteigerten Reflexen, erhöhtem Muskeltonus und Babinski-Reflex (pathologischer Reflex). Degeneration der zweiten Motoneurone (Hirnstamm und Rückenmark) führen v.a. zu Muskelschwäche und Atrophie sowie Muskelkrämpfen und Faszikulationen. Bei einigen Formen der ALS beginnt diese anfänglich mit Behinderungen der Kau- und Sprechmuskulatur (Bulbär). (verändert übernommen aus Rowland und Shneider, 2001)

Auf zellulärer Ebene ist die Krankheit spezifisch durch eine Degeneration von Motoneuronen der Hirnrinde (primärer motorischer Kortex), des Hirnstamms und des Rückenmarks (sog. zweites motorisches Neuron) charakterisiert (Tandan und Bradley, 1985a, Tandan und Bradley, 1985b). Die phänotypische Symptomatik ist verschieden, je nachdem welches

System stärker betroffen ist. Der Zellverlust wird in unterschiedlichem Ausmaß begleitet von einer massiven Astrogliose (Leigh und Swash, 1991), einer abnormen Struktur von Neurofilamenten und intrazellulären Proteinablagerungen (Carpenter, 1968, Hirano et al., 1984a, Leigh et al., 1991, Gonatas et al., 1992). Spätere Stadien zeichnen sich durch den Verlust von Myelinfasern in den kortikospinalen Trakten und der Ventralwurzel aus (Delisle und Carpenter, 1984).

ALS ist eine komplexe, multifaktorielle Krankheit, die durch Zusammenwirkung genetischer und Umwelt-assoziiertes (Risiko-)Faktoren bedingt ist und deren Ursache bisher nur ansatzweise verstanden ist. Es werden mehrere Mechanismen der Motoneurondegeneration diskutiert, darunter oxidativer Stress, mitochondriale Schädigungen, Misorganisation des Zytoskeletts, Beeinträchtigung des intrazellulären Transports, Proteinablagerungen, entzündliche Prozesse, Reduktion von Wachstumsfaktoren sowie Beeinträchtigung der Motoneuron-Glia Interaktion und der extrazellulären Glutathionhomöostase (Westarp, 1995, Shaw und Ince, 1997, Dengler et al., 1999, Beckman et al., 2001, Watanabe et al., 2001, Howland et al., 2002, Dengler, 2003, Guegan und Przedborski, 2003, Van Den Bosch et al., 2006).

2.4.1. Genetische Faktoren bei der ALS

Man unterscheidet zwischen der sporadischen ALS (90-95% der ALS Fälle), bei der die Krankheit ohne ersichtlichen erblichen Hintergrund auftritt und der erblichen familiären ALS (FALS, 5-10% der ALS Fälle). Klinisch sind diese beiden Formen nahezu nicht zu unterscheiden, obwohl es Unterschiede in der Pathologie gibt. Veränderungen des genetischen Materials sind sowohl für die sporadische ALS als auch FALS (siehe Review von Gros-Louis et al., 2006) beschrieben. Es ist jedoch ungeklärt, ob die bei der ALS gefundenen Mutationen ursächlich an der Krankheitsentstehung beteiligt sind. Dennoch bietet die genaue Analyse genetischer Variationen möglicherweise eine Grundlage zur Entwicklung spezifischer Therapien, denn die betroffenen Mechanismen sind ggf. auch bei einer nicht vererbbarer Erkrankung relevant.

Zurzeit sind Mutationen in 11 Genloci in Familien oder Einzelfällen beschrieben, die mit der Entstehung von ALS in Verbindung gebracht werden (siehe Reviews von Boillee et al., 2006, Gros-Louis et al., 2006, Neusch et al., 2007). Es werden dabei verschiedene Ausprägungen der ALS und ALS-assoziiertes Erkrankungen unterschieden: Die klassische

Form mit einer im hohen Alter einsetzenden Motoneurondegeneration, jugendliche Formen mit früh einsetzender Erkrankung (*juvenile ALS*), mit Demenz-assoziierte Formen wie ALS-FTD (FTD, frontotemporale Demenz) und ALS-FTDP (FTD mit Parkinson) und atypische Formen, wie die progressive LMD (*lower motorneuron disease*).

Etwa 20% der FALS-Fälle (Rosen et al., 1993, Pramatarova et al., 1995, Andersen et al., 1997, Cudkowicz et al., 1997, Orrell et al., 1997, Orrell et al., 1999) und 2-7% der sporadischen ALS-Fälle (Jones et al., 1994a, Jones et al., 1994b, Andersen et al., 1995, Jackson et al., 1997) sind mit Mutationen auf dem Chromosom 21 assoziiert (Siddique et al., 1989, Siddique et al., 1991). Die Mutationen liegen innerhalb des Gens, welches für das Enzym Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase (SOD1) kodiert (Rosen et al., 1993). Es sind bisher 120 Mutationen im SOD1-Gen bekannt, die mit der Entstehung von ALS in Verbindung gebracht werden (aktuelle Informationen unter alsod.org). SOD1 ist ein homodimeres Protein mit einem Molekulargewicht von 32 kD, welches ubiquitär im Zytosol, Kern und Intermembranbereich der Mitochondrien lokalisiert ist (siehe Review von Shaw, 2005). Jedes Monomer bindet ein Zinkatom und ein Kupferatom, die Monomere sind mittels einer Disulfidbrücke verbunden. Die Oxidoreduktase ist ein Enzym des antioxidativen Abwehrsystems der Zellen und katalysiert vornehmlich (Singh et al., 1998) die Umwandlung von Superoxid zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid (Fridovich, 1986, Halliwell und Gutteridge, 1999), wobei das gebundene Kupfer zunächst reduziert und anschließend oxidiert wird. Das bei der Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid wird von dem Enzym Katalase zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt.

Zur Untersuchung der Toxizität der mutierten SOD1 (mSOD1) wurden verschiedene transgene Mausmodelle entwickelt. Es handelt sich dabei um die SOD1-Mutanten G85R, G37R, und G93A, bei denen Glyzin gegen Arginin bzw. bei der G93A-Mutante gegen Alanin ausgetauscht ist (Gurney, 1994, Ripps et al., 1995, Wong et al., 1995, Bruijn und Cleveland, 1996). Entgegen dem klinischen Verlauf der ALS beim Menschen sind die ersten Symptome im Tiermodell in einer Schwächung der Hinterbeine zu finden, je nach Mausmodell beginnend in einem Alter von 3-12 Monaten. Dies geht einher mit einer mehr oder weniger starken Astroglie, Aktivierung von Mikroglia und Degeneration von Motoneuronen. Trotz der zunächst symptomatischen Unterschiede ist die Pathologie im Tiermodell der menschlichen ALS in vielen Punkten sehr

ähnlich (siehe Review von Bruijn et al., 2004). Daher eignen sich die Mausmodelle als Untersuchungssystem für die Analyse der molekularen Veränderung der Erkrankung. Neben diesen Mausmutanten wird mit SOD1-KO-Mausmodellen und *in vitro* Systemen (Transfektion von mSOD1) gearbeitet.

Es gibt eine Vielzahl an Hypothesen bezüglich des veränderten Wirkungsspektrums der mSOD1. Dazu zählen u.a. oxidative Schädigungen, Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion, Störung des proteasomalen Abbaus durch Akkumulation von mSOD1 und die Beeinträchtigung der extrazellulären Glutathomöostase (Roy et al., 1998, Kruman et al., 1999, Trotti et al., 1999, Jaarsma et al., 2001, Howland et al., 2002, Liu et al., 2004). Es kann ausgeschlossen werden, dass Mutationen, die zu einem Funktionsverlust des Enzyms führen, an der Entstehung der Pathologie SOD1-assoziiertes ALS beteiligt sind (Gurney et al., 1994, Cleveland und Liu, 2000, Beckman et al., 2001). Dies wird dadurch bestätigt, dass SOD1-KO Mäuse keine Motoneuron-Erkrankung entwickeln (Chan et al., 1990, Dal Canto und Gurney, 1994, Reaume et al., 1996). Vermutlich erlangt die mSOD1 neue, toxische Funktionen (*gain of function* Mutation). Da es sich um ein Enzym des antioxidativen Schutzsystems handelt, liegt die Vermutung nahe, dass die Mutationen eine Funktionsumkehrung bewirken und zu einer vermehrten Produktion zelltoxischer, reaktiver Sauerstoffverbindungen führen (Wiedau-Pazos et al., 1996, Beal et al., 1997, Bruijn et al., 1997a, Crow et al., 1997, Estevez et al., 1999). In verschiedenen experimentellen Ansätzen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Toxizität der mSOD1 nicht primär durch oxidative Schädigungen ausgelöst wird (siehe Review von Cleveland und Rothstein, 2001).

Eine weitere Hypothese geht davon aus, dass intrazelluläre Proteinaggregate von mSOD1 toxisch wirken könnten (Bruijn et al., 1997b, Bruijn et al., 1998, Watanabe et al., 2001, Hart, 2006). mSOD1 Ablagerungen wurden in Neuronen und z.T. auch in Astrozyten in Mausmodellen nachgewiesen (Bruijn et al., 1998). Es wird vermutet, dass Ablagerungen oder fehlgefaltete Proteine den proteasomalen Abbau beeinträchtigen bzw. überlasten. Sie könnten an Hilfsproteine des proteolytischen Abbaus und der Proteinfaltung binden und diese so ihrer eigentlichen Funktion in der Zelle entziehen. Ein *in vitro* Modell lieferte Hinweise, die diese Vermutung unterstützen. mSOD1 induzierte in diesem Modell die spezifische Ausbildung von toxischen Proteinaggregaten in

Motoneuronen. Die Erhöhung der Level des Hitzeschockproteins HSP70 (Hilfsprotein für das Proteasom) konnte die Aggregatbildung und Toxizität reduzieren (Durham et al., 1997, Bruening et al., 1999). Auch nicht mSOD1-assoziierte ALS geht in vielen Fällen mit Proteinablagerungen (z.B. Ubiquitin) einher, so dass diese möglicherweise ein zentraler Punkt der Erkrankung sein könnten. Es ist jedoch, wie auch bei anderen Erkrankungen, die mit Proteinablagerung assoziiert sind bisher unklar, ob Ablagerungen die Erkrankung initiieren oder sekundär auftreten.

Für Motoneuron-Erkrankungen sind weiterhin Mutationen in den Genen für die Proteine Alsin, Senataxin und VAPB (VAPB, (*vesicle-associated membrane protein*)-associated *protein* *B*) beschrieben, für die es bisher noch keine Tiermodelle zur Untersuchung gibt. Alsin ist ein Nukleotidaustauschfaktor für GTPasen (Bischoff und Ponstingl, 1991, Hentati et al., 1994, Hentati et al., 1998, Yang et al., 2001) und hat wahrscheinlich eine regulatorische Funktion in der Organisation des Zytoskeletts und des Vesikeltransports (Otomo et al., 2003, Kunita et al., 2004). Senataxin ist vermutlich an der RNA-Prozessierung beteiligt (Chen et al., 2004). VAPB spielt u.a. eine Rolle bei Transportvorgängen zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat (Nishimura et al., 2004a, Nishimura et al., 2004b, Nishimura et al., 2005).

Mutationen in den Genen für zytoskelettale Struktur- und Transportproteine, wie Neurofilamente, Peripherin und Dynactin, werden als weitere Risikofaktoren für die Entwicklung von ALS angesehen, wobei deren Relevanz bei der Erkrankung kontrovers diskutiert wird. Ein abnormaler Aufbau und eine Ansammlung von Neurofilamenten ist bei FALS, sporadischer ALS (Carpenter, 1968, Chou und Fakadej, 1971, Hirano et al., 1984b, Hirano, 1991, Garcia et al., 2006) und SOD1-transgenen Mausmodellen beschrieben (Dal Canto und Gurney, 1994, Gurney et al., 1994, Bruijn et al., 1997b). Mutationen des Transportproteins Dynactin in der Untereinheit p150 führen zu einer Degeneration von Motoneuronen im Tiermodell (LaMonte et al., 2002, Hafezparast et al., 2003) und können bei einer atypischen Form der ALS (Puls et al., 2003) nachgewiesen werden. Weiterhin löst die Überexpression der Hauptisoform des Intermediärfilamentproteins Peripherin in Mausmodellen eine Degeneration von Motoneuronen aus, die mit einer abnormalen Strukturierung des NF-Netzwerks assoziiert ist (Beaulieu et al., 1999). Auch Mutationen der angiogenetischen Proteine VEGF (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) und Angiogenin werden

als Risikofaktoren in der ALS angesehen. Eine genauere Übersicht zu Mutationen, die mit ALS assoziiert sind, findet sich in Review-Artikeln (Shaw, 2005, Boillee et al., 2006, Gros-Louis et al., 2006, Neusch et al., 2007).

Neben genetischen Faktoren werden Umwelteinflüsse (chronische Exposition gegenüber Neurotoxinen, Schwermetallen), Autoimmunreaktionen und virale Infektionen als Ursache der ALS diskutiert (Johnson und Brooks, 1984, Roelofs-Iverson et al., 1984, Spencer et al., 1986, Drachman und Kuncl, 1989, Appel et al., 1995, Smith et al., 1996, Cox und Sacks, 2002). Weiterhin wird die Reduktion von Expression und Funktion astroglialer Glutamat-Transporter als eine mögliche Ursache der Erkrankung angesehen. Dieser wichtige Aspekt wird in den folgenden Abschnitten genauer betrachtet.

2.4.2. Gliazellen und ALS: Die Umgebung der Motoneurone spielt eine wichtige Rolle

Die massive Degeneration von Motoneuronen im Verlauf der ALS führte zunächst dazu, die Krankheit ausschließlich auf pathologische Veränderungen in diesem Zelltyp zurückzuführen. Heute ist jedoch bekannt, dass auch Einflüsse aus umliegenden Zellen einen großen Einfluss auf den Untergang der Motoneurone haben. In zwei unabhängigen Arbeiten mit verschiedenen SOD1-transgenen Mausmodellen (G37R, G93A, G85R) konnte gezeigt werden, dass eine ausschließlich neuronale Expression der mSOD1 in dem untersuchten Zeitfenster von bis zu 1.5 Jahren nicht zu einer Degeneration von Motoneuronen führt (Pramatarova et al., 2001, Lino et al., 2002). Eine sehr eindrucksvolle Studie an Mauschimären beschreibt, dass Motoneurone, die mSOD1 exprimieren, aber von nicht-neuronalen Zellen mit dem unmutierten Enzym umgeben sind, vor dem Tod bewahrt werden können. Nicht-neuronale Zellen, die mSOD1 exprimieren und mit Motoneuronen benachbart sind, die das unmutierte Enzym bilden, können die Degeneration dieser Motoneurone auslösen (Clement et al., 2003).

In Geweben von ALS-Patienten und in transgenen Mausmodellen kann eine Proliferation und Aktivierung von Mikroglia gezeigt werden (Engelhardt und Appel, 1990, Kawamata et al., 1992, Ince et al., 1996, Hall et al., 1998, Alexianu et al., 2001, Henkel et al., 2004). Diesen Zellen wird eine wichtige Relevanz in der Progression der Erkrankung zugeschrieben (siehe Review von McGeer und McGeer, 2002). Aktivierte

Mikrogliazellen setzen proinflammatorische Zytokine, wie z.B. TNF- α und Interleukine, Glutamat und reaktive Sauerstoffspezies frei, die direkt oder indirekt neurotoxisch wirken können (Alexianu et al., 2001, Almer et al., 2002, Hensley et al., 2002, zur Rolle der Mikroglia in der ALS siehe auch Review von Neusch et al., 2007).

Astrozyten interagieren komplex mit Neuronen (siehe Abschnitt 2.1.). Sowohl in menschlichen Geweben als auch in mSOD1-assoziierten Mausmodellen ist eine reaktive Astroglieose beschrieben (Kushner et al., 1991, Nagy et al., 1994, Hirano, 1996, Schipper, 1996, Bruijn et al., 1997b, Hall et al., 1998, Howland et al., 2002). Diese Zellen setzen eine Vielzahl von Mediatoren frei (siehe Review von Barbeito et al., 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass Astrozyten durch Faktoren aktiviert werden, die u.a. von geschädigten Motoneuronen freigesetzt werden (Cassina et al., 2002, Cassina et al., 2005). So induziert die Abgabe von Fibroblastenwachstumsfaktor 1 (FGF-1, *fibroblast growth factor 1*) aus Motoneuronen die verstärkte Produktion von Nervenwachstumsfaktor (NGF, *nerve growth factor*) durch Astrozyten. NGF ist ein Faktor, der das Überleben von Motoneuronen fördert, jedoch kann NGF abhängig vom Rezeptor auch Zelltod auslösen. Geschädigte Motoneurone reexprimieren den NGF-'Todesrezeptor' p75^{NTR} (Neurotrophin p75-Rezeptor) (Ernfors et al., 1989, Koliatsos et al., 1991, Seeburger et al., 1993). Dieser Rezeptor wird entwicklungsabhängig nach der Erstellung dauerhafter synaptischer Verbindung zwischen Motoneuron und Muskel herunterreguliert (Carpenter, 1968). Ergebnisse in mSOD1-assoziierten-Modellen belegen, dass Astrozyten über Freisetzung von NGF den apoptotischen Zelltod von Motoneuronen auslösen können (Pehar et al., 2004, Domeniconi et al., 2007). NGF ist im Rückenmark bei einigen ALS-Patienten erhöht (Anand et al., 1995) und p75^{NTR} kann in Motoneuronen bei ALS-Patienten nachgewiesen werden (Seeburger et al., 1993, Lowry et al., 2001).

Eine sehr wichtige Funktion der Astrozyten ist es, Neurotransmitter aufzunehmen, die durch elektrisch aktive Neurone freigesetzt werden. Im Rahmen der Pathologie der ALS wird dabei v.a. diskutiert, dass die reduzierte Aufnahme des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat zu degenerativen Prozessen in Motoneuronen beitragen kann. Der Begriff Exzitotoxizität (*excitotoxicity*) definiert die Überstimulation von Rezeptoren für exzitatorische Aminosäuren und die daraus resultierende neuronale Degeneration (Olney, 1978). Klassisch wird dies durch eine Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration auf 2-5 μ M ausgelöst oder, im Falle

der langsamen Exzitotoxizität, durch eine verstärkte Reaktion einer geschwächten Postsynapse auf normale Glutamatmengen (siehe Reviews von Meldrum und Garthwaite, 1990, Doble, 1999). Glutamat-Transporter sind z.T. ebenfalls Kalzium-permeabel, so dass die verstärkte Aktivierung der Rezeptoren zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration beiträgt, was mit degenerativen Prozessen in Verbindung gebracht wird (Carriedo et al., 2000, Van Den Bosch et al., 2000, Urushitani et al., 2001). Interessant ist, dass sowohl für ca. 60% der sporadischen ALS-Fälle und auch bei der FALS und in einigen Tiermodellen, wenn auch dort kontrovers diskutiert, eine Reduktion des glialen Glutamat-Transporters EAAT2/GLT1 beschrieben ist (EAAT2, *excitatory amino acid transporter 2*, im Tier auch GLT1, *glutamate transporter 1*) (Rothstein et al., 1995, Fray et al., 1998, Sasaki et al., 2000, Bendotti et al., 2001, Deitch et al., 2002, Howland et al., 2002). Erhöhte Glutamatlevel konnten in der Zerebrospinalflüssigkeit von Patienten in einigen, aber nicht allen Studien nachgewiesen werden (Perry et al., 1990, Rothstein et al., 1990, Shaw et al., 1995) und könnten mit der Erkrankung in Verbindung stehen. Die Glutamat-Exzitotoxizitäts-Hypothese wird dadurch untermauert, dass SOD^{G93A}-Mäuse, die GLT1 überexprimieren, einen verzögerten Krankheitsbeginn zeigen (Guo et al., 2003). Mutationen im Gen für EAAT2/GLT1 konnten bisher nicht aussagekräftig mit der Erkrankung korreliert werden, es werden z.T. oxidative Schädigungen des Transporters diskutiert (Blanc et al., 1998, Trotti et al., 1999, Rao et al., 2003). Das verstärkte Auftreten einer speziellen Form der ALS in Guam in Zusammenhang mit der Aufnahme eines AMPA-agonistischen Neurotoxins (Spencer et al., 1986, Ross et al., 1987, Copani et al., 1991, Cox und Sacks, 2002) und die Wirksamkeit des anti-exzitotoxischen Medikaments Riluzol in der ALS Therapie (Bensimon et al., 1994, Lacomblez et al., 1996, Mohammadi et al., 2001, He et al., 2002, Albo et al., 2004) liefern weiterhin Beweise für die Relevanz der Glutamat-Exzitotoxizität in der ALS.

Die Rolle der Oligodendrozyten in der ALS ist zurzeit weitgehend unklar (siehe Review von Neusch et al., 2007), obwohl die Degeneration myelinhaltiger Fasern in den kortikospinalen Trakten und Ventralwurzeln (Delisle und Carpenter, 1984) schon längere Zeit bekannt ist.

2.4.3. Erhöhte Vulnerabilität von Motoneuronen

Die komplexen pathologischen Veränderungen bei der ALS werfen die Frage auf, weshalb vorwiegend Motoneurone im Verlauf der Erkrankung degenerieren. Motoneurone sind anfälliger gegenüber einer Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration, da sie im Vergleich zu anderen Neuronen einen geringeren Anteil der Untereinheit GluR2 in ihren AMPA-Rezeptoren exprimieren (Rothstein et al., 1993, Carriedo et al., 1996, Saroff et al., 2000, Van Den Bosch et al., 2000), wodurch diese stärker Kalzium-permeabel sind (Hollmann et al., 1991, Gorter et al., 1997, Pellegrini-Giampietro et al., 1997). Zusätzlich besitzen die in der ALS betroffenen Motoneurone (nicht alle Motoneurone) nur geringe Mengen Kalzium-bindender Proteine (Ince et al., 1993, Alexianu et al., 1994). Diese beiden Faktoren tragen dazu bei, dass Motoneurone anfälliger gegenüber einer Kalzium-induzierten Apoptose sind (Palecek et al., 1999, Vanselow und Keller, 2000, von Lewinski und Keller, 2005).

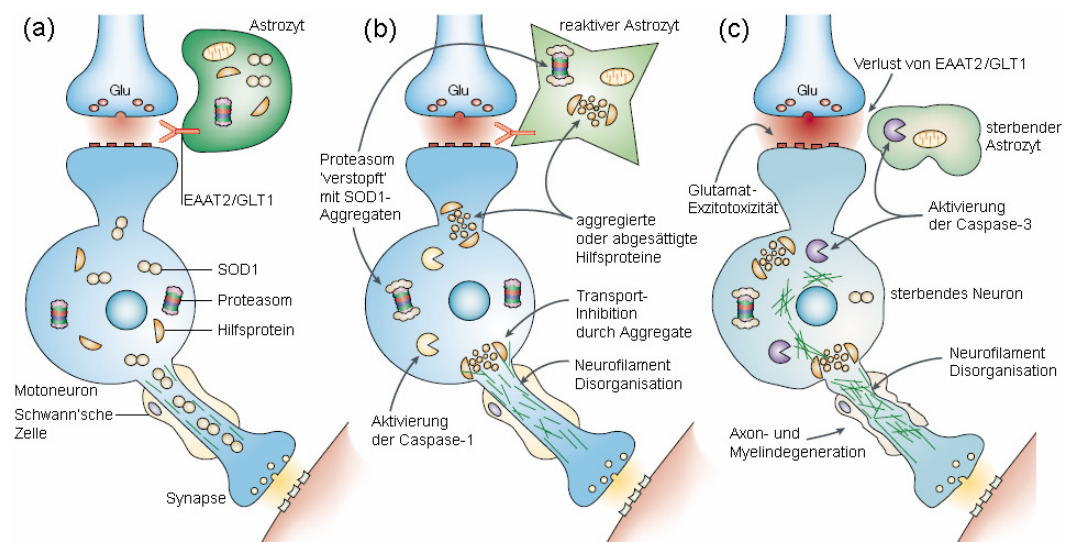


Abb. 9: Die verschiedenen toxischen Effekte der mSOD1 bei der Degeneration von Motoneuronen. (a) Gesunde Motoneurone im Rückenmark oder Hirnstamm erhalten Signale von Interneuronen oder Neuronen aus dem Motorkortex und leiten diese an den Muskel weiter. (b) Im Verlauf der Erkrankung aggregiert mSOD1 in Neuronen und Astrozyten. Dies führt zur Übersättigung der Hilfsproteine für die Proteinfaltung und das Proteasom. Der proteasomale Abbau wird überlastet. Die Organisation der Neurofilamente und die Transportvorgänge in Neuronen werden durch Proteinaggregate beeinträchtigt. Caspase-1 wird aktiviert. (c) Der kombinierte Effekt von Inhibierung der Hilfsproteine und dem Proteasom sowie die Behinderung zellulärer Transportvorgänge schädigen die Neurone chronisch. Axone und Myelin degenerieren. In Astrozyten kommt es zu einer Reduktion der Aktivität und/oder Expression astrozytärer Glutamat-Transporter. Die extrazelluläre Glutamatakkumulation löst exzitotoxische Phänomene aus. Die exzitotoxischen Effekte und weiteren Schädigungen führen in Neuronen und Astrozyten zur Aktivierung der Caspase-3, wodurch es letztendlich zum Absterben der Motoneurone und Astrozyten kommt. (verändert übernommen aus Cleveland und Rothstein, 2001)

Weiterhin ist es denkbar, dass die stark metabolisch aktiven Motoneurone sensibler auf oxidativen Stress und ihre langen Axone vulnerabler auf zytoskelettale Veränderungen reagieren. Ein zusätzlicher Risikofaktor ist, dass Motoneurone große Mengen an SOD1 exprimieren (Pardo et al., 1995, Shaw et al., 1997) und somit massiv den Folgen der Auswirkungen von Mutationen des Enzyms ausgesetzt sind. Motoneurone gehören zudem zu den Zellen des ZNS, die sich in der Regel nicht mehr replizieren, wodurch sich Schädigungen im Laufe der Zeit ansammeln. In den mSOD1-assoziierten Formen der ALS sterben die Motoneurone sehr wahrscheinlich apoptotisch über die Aktivierung der Caspase-Kaskade (Martin, 1999). Es ist Gegenstand aktueller ALS-Forschung, ob Motoneurone bei ALS generell einen apoptotischen Zelltod zeigen, da in einigen Studien bei sporadischer ALS ein nicht-apoptotischer Zelltod nachgewiesen wurde (He und Strong, 2000).

3. Zielsetzung

Zielsetzung dieser Dissertation ist es, die Expression und Funktion der $K_{ir}4.1$ -Untereinheit glialer einwärts-gleichrichtender Kaliumkanäle (K_{ir}) im Rückenmark der Maus zu untersuchen sowie die Bedeutung von $K_{ir}4.1$ in einem transgenen Mausmodell der ALS zu verstehen.

Zunächst sollte in einer Expressionsstudie die zeitliche und zellspezifische Lokalisation von $K_{ir}4.1$ -Kanälen im Rückenmark der Maus analysiert werden. Transgen fluoreszierende Mäuse dienen der zellspezifischen Proteinlokalisierung.

In einem weiteren Ansatz erfolgte die Untersuchung der funktionellen Bedeutung von $K_{ir}4.1$ für Zellschwellung (und Ödembildung) in Astrozyten durch einen kombinierten Einsatz transgener Maustechnologie und 2-Photonen-Lasermikroskopie im Rückenmark der Maus.

Ein abschließender Schwerpunkt der Studie lag in der Untersuchung eines etablierten Krankheitsmodells für die neurodegenerative Motoneuronenerkrankung Amyotrophe Lateralsklerose. In diesem Krankheitsmodell sind astrogliale Zellen vermutlich entscheidend am Zelltod von Motoneuronen beteiligt.

Im Detail sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Auf welchen Zelltypen und zu welchem Zeitpunkt ist die $K_{ir}4.1$ -Kanaluntereinheit im Rückenmark exprimiert?
- 2) Welche Bedeutung haben $K_{ir}4.1$ -Kanäle für die Kalium-gesteuerte Volumenregulation astroglialer Zellen?
- 3) Ist das $K_{ir}4.1$ -Protein pathophysiologisch an der Entstehung der Motoneurondegeneration im $SOD1^{G93A}$ -Mausmodell für die ALS beteiligt?

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Chemikalien, Medien und Puffer

Standardlaborchemikalien wurden von handelsüblichen Firmen wie Amersham Biosciences, Freiburg; BD Falcon, Heidelberg; BioRad, München; Biozym, Hessisch Oldendorf; Carl Roth, Karlsruhe; Eppendorf, Hamburg; Invitrogen, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; Roche, Penzberg; Serva, Heidelberg und Sigma-Aldrich, Seelze bezogen. Standardpuffer und Lösungen wie PBS, TBST, TAE und Ringer-Lösung wurden aus den jeweiligen Chemikalien selbst hergestellt. Gebrauchsfertige Puffer wurden von PAA, Cölbe und Invitrogen, Karlsruhe bezogen.

Zellkulturmedien (DMEM mit L-Glutamin, DMEM/Ham's F12 mit L-Glutamin) zur Kultivierung eukaryontischer Zellen stammten von PAA, Cölbe. Vor Gebrauch wurden hitzeinaktiviertes (10 Minuten bei 37°C und 50 Minuten bei 56°C) fetales Kälberserum (FKS, PAA, Coelbe) und 1% (v/v) Penizillin/Streptomycin-Lösung (P/S = 100 U/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomyzinsulfat, PAA, Coelbe) zugesetzt. Spezielle Zusätze sind in den jeweiligen Kapiteln aufgeführt.

4.1.2. Gebrauchswaren

Gebrauchswaren, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden bei handelsüblichen Firmen wie BD Falcon, Heidelberg; Eppendorf, Hamburg; Greiner, Solingen; Nunc, Wiesbaden; Menzel-Gläser, Braunschweig; Sartorius, Göttingen und Schott AG, Mainz bestellt.

4.1.3. Geräte

Soweit nicht anders angegeben wurden Standardlaborgeräte der Firmen Biometra GmbH, Göttingen; Dosch, Heidelberg; Eppendorf, Hamburg; Heraeus, Hanau; Sartorius, Göttingen; Schütt, Göttingen; VWR, Darmstadt und Zeiss, Jena verwendet.

4.1.4. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Invisorb-DNA Tissue HTS 96-Kit / C	Invitex, Berlin
Invisorb Spin Tissue Mini Kit	Invitex, Berlin
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Düsseldorf
BCA Kit	Pierce, Rockford, IL, USA

4.1.5. Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen und Gebrauchsmaterialien erfolgte sofern erforderlich im Dampfdruckautoklaven für 20 Minuten bei 121 °C und ca. 10^5 Pascal. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengrösse: 0.1 – 0.2 µm).

4.1.6. Verwendete Mauslinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der Tierhaltungseinheit des Max-Planck-Instituts (MPI) für Experimentelle Medizin, Göttingen gezüchtet und entsprechend den deutschen und den Richtlinien der Europäischen Union für Versuchstiere gehalten. Wildtypmäuse wurden entweder in der Tierhaltungseinheit gezüchtet oder von Charles River Laboratories, Bad Königshofen, sowie Jackson Laboratories, Bar Harbor-Maine, USA bezogen.

Der am MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen eingeführte Liniencode der Arbeitsgruppe Neurogenetik für verschiedene transgene Mauslinien wurde in dieser Arbeit übernommen.

Zur Visualisierung von Astrozyten und Oligodendrozyten wurden z.T. transgene Mauslinien verwendet. In der Linie TgN(hGFAP-EGFP) wird EGFP unter Kontrolle des humanen GFAP-Promotors exprimiert. Die verschiedenen Stammlinien werden durch einen 4-Buchstabencode unterschieden. GFEX bedeutet hier: GF = GFAP-Promotor; E = EGFP-Protein; X = Stammlinie, in diesem Fall Stammlinien A und C. Die Linie A wurde (unter anderem Namen) von Nolte et al., 2001 beschrieben. Die Linie GFEC wurde am MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen, Abteilung Neurogenetik erstellt und charakterisiert. Sie zeigt ein nahezu identisches Expressionsverhalten von EGFP zu der von Nolte et al. beschriebenen Linie. In der Linie TgN(mPLP-DsRed1) wird DsRed1 unter Kontrolle des murinen PLP-Promotors exprimiert. PRDB steht für: P = PLP-Promotor; RD = DsRed1; X = Stammlinie, hier B. Die Expression von PLP in dieser Linie wurde in Hirrlinger, 2006 beschrieben.

Stamm C57/Bl6

Der Inzuchtstamm C57/Bl6 wurde von C.C. Little im Jahr 1921 entwickelt und stammt ursprünglich aus einer Zucht von Abby Lathrop. Aus diesem entstanden auch die Stämme C57BR und C57L. Die Stämme 6 und 10 wurden 1937 separiert. C57/Bl6 Mäuse wurden für proteinbiochemische und immunhistochemische Analysen verwendet.

Wildtypstamm B6SJL

Die B6SJL Tiere wurden von Janvier, Le Genest-St-Isle, Frankreich bezogen. Es handelt sich bei dieser Linie um eine Kreuzung der Linien C57Bl6/J und SJL F1. Die B6SJL-Linie ist fruchtbarer als die beiden Ausgangslinien. Die Linie diente als Kreuzungspartner für die SOD1^{G93A} - Linie (siehe nächster Abschnitt).

Stamm SOD1^{G93A}

Der Stamm B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J, im Folgenden SOD1^{G93A} genannt, wurde ursprünglich von Jackson Laboratory, Bar Harbor-Maine, USA bezogen und am MPI gehalten (Gurney, 1994, Gurney et al., 1994). Es handelt sich um Tiere, die transgen eine mutierte humane Kupfer/Zink-Superoxiddismutase (hSOD1) exprimieren. In dieser ist Glyzin zu Alanin im Codon 93 substituiert. Die transgenen Tiere wurden in einem hemizygoten Status erhalten, indem männliche transgene SOD1^{G93A} - Tiere mit B6SJL-Weibchen verpaart wurden.

Transgene SOD1^{G93A} -Mäuse wurden als Mausmodell für ALS verwendet, da diese Tiere eine Degeneration von Motoneuronen und einige klinische Symptome zeigen, die ebenfalls im Krankheitsverlauf der ALS bei Menschen auftreten (Deng et al., 1993, Gurney et al., 1994, Wong et al., 1995, Gurney et al., 1996, Gurney, 1997, Gurney et al., 1998).

Die Stadieneinteilung der Tiere erfolgte anhand des Krankheitsstatus. Asymptomatischen Tiere (> Tag 60, P60) zeigten keinerlei Krankheitserscheinungen. Als präsymptomatisch wurden Tiere bezeichnet, die phänotypisch noch keine Anzeichen motorischer Störungen zeigten (Alter P60-P90). Früh symptomatisch wurden Tiere genannt, bei denen sich eine beginnende motorische Störung der Hinterbeine in Form einer Gangunsicherheit (Gangataxie) abzeichnete. Tiere mit deutlicher Lähmung von mindestens einem Hinterbein wurden als spät symptomatisch klassifiziert. Tiere mit kompletter Lähmung beider Hinterbeine, Lähmung von mindestens einem Vorderbein und Verlust des Aufrichtereflexes waren der Gruppe Endstadium zugeordnet. Der Aufrichtereflex (*righting reflex*) tritt normalerweise bei gesunden Tieren auf, wenn diese auf die Seite gelegt werden und sich wieder aufrichten. Tiere im Endstadium oder Tiere mit einem Gewichtsverlust von mehr als 15% wurden getötet. Für immunhistologische Untersuchungen wurden als Kontrolltiere nicht-transgene (ntg) Tiere aus der SOD1^{G93A} -Linie (ntg-SOD1^{G93A}) eingesetzt. Für proteinbiochemische Analysen wurden wt-

SOD1-Tiere (s.u.) und ntg-SOD1^{G93A} -Tiere als Kontrollen untersucht. Die in dieser Arbeit eingesetzten Tiere zeigten erste Krankheitssymptome etwa mit P85-P90 und erreichten das Endstadium der Erkrankung etwa mit P120-P140. Dies entsprach den Angaben von Jackson Laboratory, die auf einem B6SJL-Hintergrund 50% Überleben nach 128.9±9.1 Tagen angeben. Die Stadieneinteilung beruhte auf den klinisch festgestellten phänotypischen Veränderungen und zeigte daher eine Variabilität, was zu Überlappungen zwischen den einzelnen Stadien führen kann.

Stamm wt-SOD1

Der Stamm B6SJL-Tg(SOD1)2Gur/J, im Folgenden wt-SOD1 genannt, wurde ursprünglich von Jackson Laboratories, Bar Harbor-Maine, USA bezogen und trägt als frühere Linienbezeichnung den Namen N1029 (Gurney, 1994, Gurney et al., 1994). Diese transgene Linie trägt das normale Allel des humanen SOD1-Gens. Die quantitative Expression des SOD1-Proteins ist identisch zu dem der SOD1^{G93A} -transgenen Linie, obwohl die Anzahl der Kopien des Transgens in der SOD1^{G93A} -Linie höher ist. Die Tiere wurden von Dr. vet. Bettina Holtmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Sendtner (Institut für Klinische Neurobiologie, Universität Würzburg) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Die Präparation der Gewebe erfolgte in Würzburg, die anschließenden proteinbiochemischen Analysen wurden am Universitätsklinikum Göttingen in den Laboren der Arbeitsgruppe Neurologie durchgeführt.

Stamm K_{ir}4.1

Die Generierung der K_{ir}4.1-Mauslinie ist in Kofuji et al., 2000 beschrieben. Tiere mit homozygoter Inaktivierung des K_{ir}4.1-Gens werden im Folgenden mit K_{ir}4.1-KO bezeichnet. Kontrolltiere, die zwei gesunde Allele mit dem K_{ir}4.1-Gen enthalten, werden als K_{ir}4.1-WT abgekürzt, heterozygote Tiere mit K_{ir}4.1-HZ. Die Abkürzung KO wird nicht kursiv dargestellt.

Zur zellulären Markierung von Astrozyten und/oder Oligodendrozyten wurden K_{ir}4.1-HZ-Tiere mit verschiedenen transgenen Mauslinien verkreuzt. Um die verschiedenen Linien zu unterscheiden wurde in Anlehnung an die Linienbezeichnungen der Arbeitsgruppe Neurogenetik (MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen) ein 4-Buchstabencode verwendet. Der Name der Linie setzt sich dabei aus den Buchstaben KIR für die K_{ir}4.1-Mauslinie und einem weiteren Buchstaben (A, C, K, B, M) zur

Unterscheidung der Kreuzungspartner aus den fluoreszenten transgenen Linien zusammen. Die Ursprungslinie wurde unter dem Namen KIRA geführt. Die weiteren Verkreuzungen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tab. 1: Aufstellung der verwendeten KIRX-Stämme

LINIECODE	VERKREUZUNG	MARKIERTE ZELLTYPEN/ FLUORESZENZMARKER
KIRA	KIRA x KIRA	unmarkiert
KIRC	KIRA x GFEC	Astrozyten/EGFP
KIRK	KIRA x GFEA	Astrozyten/EGFP
KIRB	KIRA x PRDB	Oligodendrozyten/DsRed
KIRM	KIRC x KIRB	Astrozyten/EGFP Oligodendrozyten/DsRed

Anmerkung: Tiere ab der F2-Generation wurden für diese Arbeit verwendet. Die Verkreuzung mit den transgenen Linien hatte keine Auswirkung auf den Krankheitsphänotyp der $K_{i,4.1}$ -Stammlinie.

4.1.7. Eukaryontische Zelllinien

NSC34

Die NSC34-Zelllinie ist eine embryonale Neuroblastom-Zelllinie aus der Maus (Cashman et al., 1992, Durham et al., 1993) und diente als *in vitro* Modellsystem zur Untersuchung von Kaliumtoxizität im Rückenmark. Kultivierte Zellen zeigen zwei unterschiedliche Phänotypen. Es finden sich kleine, undifferenzierte Zellen, die die Fähigkeit zur Proliferation besitzen. Daneben existieren größere Zellen mit Motoneuron-ähnlicher Morphologie und z.T. auch Physiologie (u.a. Fähigkeit zur Generation von Aktionspotentialen). Unter geeigneten Kulturbedingungen lässt sich das Verhältnis proliferierender zu differenzierten Zellen zugunsten differenzierter Zellen verschieben.

Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. J. Weishaupt, Universität Göttingen zur Verfügung gestellt.

4.1.8. Primer

Tab. 2: Verwendete Primer

GEN	SENSE/FORWARD	ANTISENSE/REVERSE
K _{ir} 4.1 (1)	5'GATCTATGGACGACCTT CATTGACATGCAATGG3'	5'GGCTGCTCTCATCTACCACATG GTAGAAAGTCAGG3'
K _{ir} 4.1 (2)	5'ATCGCCTTCTATCGCCT TCTTGACGAGTTCTTC3'	5'GGCTGCTCTCATCTACCACATG GTAGAAAGTCAGG3'
GFP	5'ATCGCCAGTCTAGCCCA CTC3'	5'CACTGCACGCGTAGGTC3'
DsRed	5'CGCCGACATCCCCGACT ACAA3'	5'GCGGCCGCTACAGGAACAGGT3'
SOD1	5'CATCAGCCCTAATCCAT CTGA3'	5'CGCGACTAACAATCAAAGTGA3'

Anmerkung: Bei der PCR für das K_{ir}4.1-Gen werden zwei sense- (1, 2) und ein antisense-Primer verwendet. Durch die Kombination von sense-Primer 1 und antisense-Primer wird ein Teil des K_{ir}4.1-Wildtypgens amplifiziert. Durch die Kombination des sense-Primers 2 und des antisense-Primers wird ein Teil des KO-Konstruktes amplifiziert.

4.1.9. Antikörper

Die für die immunhistochemische, immunzytochemische und proteinbiochemische Analysen verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in den Tabellen 3, 4, 5 und 6 aufgeführt.

Tab. 3: Primärantikörper für die Immunzytochemie und Immunhistochemie

ANTIGEN	aus SPEZIES	HERSTELLER	VERDÜNNUNG
K _{ir} 4.1	Kaninchen	Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel	1:100 (IZC) 1:200 (IHC)
K _{ir} 4.1*	Kaninchen	Kofuji et al., 2000	1:200
AQP4 (H-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:250
CNP	Maus	Chemicon, Temecula, CA, USA	1:500
MBP	Kaninchen	DakoCytomation, Hamburg	1:400
GFAP	Maus	Dako Cytomation	1:50

(* Freundlicherweise von Herrn Dr. Paolo Kofuji (Minnesota, USA) zur Verfügung gestellt.)

Tab. 4: Sekundärantikörper für die Immunzytochemie und Immunhistochemie

BEZEICHNUNG	aus SPEZIES	HERSTELLER	VERDÜNNUNG
Alexa488-gekoppelter anti-Maus IgG (H+L)	Ziege	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	1:500
Alexa488-gekoppelter anti-Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	Molecular Probes	1:500
Cy3-gekoppelter anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Dianova, Hamburg	1:500 – 1:1000
Cy3-gekoppelter anti-Ziege-IgG	Esel	Dianova	1:500 – 1:1000
Cy3-gekoppelter anti-Kaninchen IgG	Esel	Dianova	1:500 - 1:1000
Cy5-gekoppelter anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Dianova	1:500 – 1:1000
Cy5-gekoppelter anti-Ziege-IgG	Esel	Dianova	1:500 - 1:1000
Alkaline Phosphatase-gekoppelter anti-Kaninchen IgG	Ziege	Dako, Hamburg	1:500

Tab. 5: Primärantikörper für den Western Blot

BEZEICHNUNG	aus SPEZIES	HERSTELLER	VERDÜNNUNG
K _i 4.1	Kaninchen	Alomone Laboratories	1:1000
GFAP	Ratte	Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA	1:1000
AQP4 (H-80)	Kaninchen	Santa Cruz	1:2500
Tubulin	Maus	Sigma, Seelze	1:5000

Tab. 6: Sekundärantikörper für den Western Blot

BEZEICHNUNG	aus SPEZIES	HERSTELLER	VERDÜNNUNG
HRP-gekoppelter anti-Ratte IgG	Ziege	Santa Cruz	1:2500
HRP-gekoppelter anti-Maus IgG	Ziege	Santa Cruz	1:2500
HRP-gekoppelter anti-Maus IgG	Schaf	Amersham Biosciences, Little Chalfont, England	1:5000
HRP-gekoppelter anti-Kaninchen IgG	Ziege	Santa Cruz	1:2500

4.1.10. Datenbanken/Software

Die Literatursuche wurde mit Hilfe des Internetservice des *National Center for Biotechnology Information* (Internetadresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Die digitale Bearbeitung von Bildmaterial erfolgte mit der Zeiss LSM-Image-Software oder AxioVs40LE 4.5.0.0 (© Zeiss, Jena) sowie mit Adobe®Photoshop® 7.0 (© Adobe® Systems GmbH). Graphiken wurden mit Corel®Draw™11 (© Corel® Corporation) erstellt. Daten (Quantifizierungen Western Blot, Zelltodanalyse, Daten aus dem Schwellungsmodell) wurden mit dem Programm Microsoft®Excel 2002 SP3 (© Microsoft Corporation) verarbeitet. Die Berechnung der Zellvolumina und Zellanschwellungen erfolgte mit der NIH Software Image J 1.37v. Statistische Analysen (*ANOVA, T-Test, Newman-Keuls Test*) wurden mit GraphPad Prism® 6 (© GraphPad Software, Inc.) angefertigt. Referenzen wurden mit dem Programm Endnote® 7.0.0 (© Thomson ISI ResearchSoft) archiviert. Die gesamte Arbeit wurde in Microsoft®Word 2002 SP3 (© Microsoft Corporation) erstellt.

4.2. Methoden

4.2.1. Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Tiere wurde ein ca. 0.5 cm großes Schwanzstück verwendet und bei -20°C gelagert. Die Schwanzbiopsie zur Verpaarung geplanter Tiere erfolgte 3-4 Wochen nach dem Absetzen vom Muttertier. Von Tieren, die zur Gewebeentnahme getötet wurden, wurde ebenfalls ein Schwanzstück zur Genotypisierung entnommen.

Präparation genomischer DNA aus Mausgewebe

Genomische DNA wurde aus Schwanzgewebe mit dem Invisorb-Kit (Invitek, Berlin) oder QIAamp Tissue Kit (Qiagen, Düsseldorf) nach Angaben des jeweiligen Herstellers gewonnen und bei 4°C gelagert. Für die Genotypisierung wurde routinemäßig 1 µl DNA eingesetzt. Die DNA-Präparation wurde selbst oder durch die Arbeitsgruppe Neurogenetik, MPI für Experimentelle Medizin durchgeführt.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde nach Standardprotokollen in einem DNA Engine TETRAD 2 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die verwendeten Primer wurden am MPI für

Experimentelle Medizin, Göttingen, Abteilung Molekulare Neurobiologie hergestellt.

Tab. 7: Reaktionsansatz für die PCR

	K_{ir}4.1 [µL]	DsRED, EGFP, SOD1[µL]
H ₂ O _{dd}	12.0	13.3
dNTP (2 mM)	2	2
10-fach <i>Red-Taq</i> -Puffer	2	2
Primer 1 (5 µM)	1	1
Primer 2 (5 µM)	1	1
Primer 3 (5 µM)	1	0
<i>Red-Taq</i> -Polymerase	1	0.7

Anmerkung. Die PCR für den Nachweis des K_{ir}-Genotyps liefert ein klares Ergebnis bei Verwendung von 1 µl Polymerase, für die anderen PCRs sind 0.7 µl ausreichend.

Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 1.5% (w/v) Agarosegelen. Die Agarose (Seakem LE Agarose, BioRad, München) wurde in TAE (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8) durch Kochen zur Lösung gebracht und nach Zusatz von Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml) in einen Gelschlitten gegossen. Die Probenfächer wurden durch das Einsetzen verschiedener Gelkämme in den Gelschlitten erstellt. Der Schlitten wurde in eine Flachgelkammer gelegt und mit Laufpuffer (TAE) bedeckt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 160 V (5-10 V/cm) (Spannungsgerät: Pharmacia GmbH, Heidelberg). Die Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA ermöglichte nach der Elektrophorese die Visualisierung der Banden auf einem UV-Illuminator (Intas UV-Systeme, Heidelberg). Als Größenmarker diente der 1 kb Marker (Fermentas, St. Leon-Rot). Gelkammer, Kämme und Schlitten wurden von der institutseigenen Werkstatt des MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen hergestellt.

4.2.2. Anlegen primärer glialer Mischkulturen aus Rückenmarksgewebe

Glasscoverslip- und Kulturgefäßbeschichtung

Glasscoverslips (CV) und Kulturgefäße wurden mit Poly-L-Lysin (PLL, Sigma-Aldrich, Seelze) in einer Konzentration von 100 µg/ml in H₂O_{dd} für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die beschichteten Gefäße und Coverslips wurden anschließend zweimal mit H₂O_{dd} gewaschen und unmittelbar danach für die Aussaat verwendet.

Gewebepräparation und Zellkultur

Tiere im Alter von P0-P4 wurden dekapitiert, das Rückenmark präpariert, dieses von Dura und Gefäßen befreit und in eiskaltem HBSS (PAA, Cölbe) in Stücke von ca. einem Millimeter zerteilt. Die Gewebestücke wurden in 4 ml Verdauungslösung (0.25% (w/v) Trypsin, 0.25 mg/ml DNase1 (Sigma-Aldrich, Seelze) in HBSS) gebracht und 10-15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Verdauers erfolgte durch zwei Waschschriffe mit Medium (DMEM, 10% (v/v) FKS, 1% (v/v) P/S). Anschließend wurden die Zellen durch Titration aus dem Gewebeverband gelöst. Die Suspension wurde für 10 Minuten bei 900 rpm bei RT zentrifugiert und das Zellpellet in 1-2 ml Medium resuspendiert. (optional: Befanden sich in der Zellsuspension noch viele Geweberückstände, so wurde das Pellet einmal mit Rinderserumalbumin (BSA, 5% (w/v) (Sigma-Aldrich, Seelze) in HBSS) gewaschen.) Die Zellzahl wurde in einer Neubauerzählkammer bestimmt.

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden die Zellen in einer Dichte von 10000/cm² in einem Volumen von 50 µl Medium auf PLL-beschichteten Glascoverslips (Durchmesser = 15 mm) in Zellkulturschalen (21.5 cm²) ausgesät. Nach einer Anheftzeit von einer Stunde wurden 6 ml Zellkulturmedium hinzugegeben. Für proteinbiochemische Analysen mittels Western Blot erfolgte eine Aussaat von 250000 Zellen (Dichte ca. 10000/cm²) auf Zellkulturschalen (21.5 cm² Kulturfläche). Um die Proliferation der Astrozyten abzuschwächen, erfolgte am nächsten Tag ein Wechsel auf Medium mit einer geringeren Konzentration an FKS (DMEM, 1% (v/v) FKS, 1% (v/v) P/S). Alle drei Tage wurde das Medium zur Hälfte durch frisches Medium ersetzt. Die Kultivierung fand bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ statt.

4.2.3. Kultivierung der Zelllinie NSC34 und Zelltodanalyse

Kultivierung proliferierender NSC34-Zellen

Kryokonservierte Aliquots der Zelllinie wurden schnell aufgetaut und in 10 ml Proliferationsmedium (PM, DMEM, 10% (v/v) FKS, 1% (v/v) P/S) auf unbeschichteten Kulturschalen (Kulturoberfläche 56.7 cm²) ausgesät (Passage 0). Nach einer Regenerations- und Proliferationszeit von 10-15 Tagen wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit ca. 5 ml frischem Medium abgospült und abzentrifugiert (RT, 1 Minute, 1000 rpm). Das Zellpellet wurde in 2 ml PM aufgenommen, resuspendiert und 100 µl erneut auf einer Kulturschale (Kulturoberfläche 150 cm²) in 25 ml PM

ausgesät (Passage 1). Die restliche Zellsuspension wurde kryokonserviert (siehe 4.2.3.2). Sobald die Zelldichte Subkonfluenz erreichte, wurden die Zellen erneut passagiert. Proliferierende Zellen wurden maximal 6 Wochen passagiert um zu gewährleisten, dass keine Veränderungen der Ausgangslinie auftraten. Bei allen Kultivierungen wurde alle drei Tage das PM zur Hälfte durch frisches PM ersetzt. Der Inkubator wurde mit 5% (v/v) CO₂ begast und auf 37°C eingestellt.

Kryokonservierung von NSC34-Zellen

Von Passage 0 wurde das restliche Pellet erneut abzentrifugiert (RT, 1 Minute, 1000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem Gemisch aus 10% (v/v) DMSO und 90% (v/v) FKS aufgenommen (Menge je nach Zelldichte), in Kryogefäße überführt und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden die Aliquots für zwei Stunden bei -20°C eingefroren und für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zelltodanalyse von NSC34-Zellen

Für die Auszählung apoptotischer Zellkerne wurden NSC34-Zellen für ca.10-14 Tage in Differenzierungsmedium (DM, DMEM/Ham'S F12, 1% (v/v) FKS, 1% (v/v) P/S, 1% (v/v) MEM-NEAA) gehalten, um einen Neuronen-ähnlichen Phänotyp zu gewährleisten. Das PM wurde alle drei Tage zu 50% durch frisches PM ersetzt. Für Versuche wurden die Zellen in einer Dichte von 10000/cm² auf CV (Durchmesser = 15 mm) ausgesät. Um sicherzustellen, dass die Versuchsergebnisse nicht durch stressbedingte Veränderungen durch die Aussaat beeinflusst wurden, wurden sämtliche Versuche erst nach erneuter Kultivierung für 24 h in DM begonnen. Um eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration zu simulieren, erfolgte ein Zusatz von Kaliumchlorid (KCl, Stock 1 M in H₂O_{dd}) zum Medium. Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten (24 h, 48 h, 72 h und 120 h) mit KCl (7.5 mM, 10 mM und 25 mM) behandelt. In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Zellen 120 h mit 10 mM KCl und 1 µM BaCl sowie 25 mM KCl und 1 µM BaCl koinkubiert. Bei Kontrollzellen erfolgte in beiden Versuchsreihen nur ein Mediumwechsel. Nach den jeweiligen Versuchsendpunkten wurden die bewachsenen CV mit 4% (w/v) Paraformaldehyd für 15 Minuten bei RT fixiert und mit PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12.13 mM Na₂HPO₄(H₂O)₂, 1.46 mM KH₂PO₄, pH 7.4) gewaschen. Anschließend erfolgte die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI durch Einbetten der CV mit einem Fertigeinbettmedium (*Vectashield® Mounting Medium with DAPI*, Vector Laboratories, Burlingham, CA, USA).

Die apoptotischen Kerne wurden in drei zufällig ausgesuchten Unterbereichen eines Zähllokulars auf je zwei Coverslips mit einem 40er Objektiv mit einem Axioplan 2 (Zeiss, Jena) ausgezählt. Um individuelle Zählfehler zu eliminieren, wurden die Zählungen von einer unabhängigen Person verblindet durchgeführt.

4.2.4. Histologische, immunhistochemische und immunzytochemische Methoden

Ganzkörperfixierung von Mäusen durch Perfusion

Nach Anästhesie des Tieres (> P7) mit Ether wurde der Brustkorb geöffnet, das Herz freigelegt, eine Kanüle in die linke Herzkammer eingeführt und ein Schnitt im rechten Vorhof gesetzt. Die Kanüle war mit einer Peristaltikpumpe verbunden (Heraeus SR70, Flussrate 0.2-0.5 ml/s, Heraeus, München). Nach dem Ausspülen des Blutes mit HBSS erfolgte eine Perfusion mit Paraformaldehyd (PFA, 4% (w/v) in PBS, pH 7,4) für mindestens 5 Minuten (bis P20) bzw. 10 Minuten (adulte Tiere). Der knöcherne Rückenmarkskanal und das Gehirn wurden entnommen und über Nacht bei 4°C in PFA nachfixiert. Danach erfolgte die Freilegung des Gewebes aus dem knöchernen Kanal unter dem Stereomikroskop in PBS. Die Gewebe wurden mehrfach mit PBS gewaschen und in PBS bei 4°C bis zur Einbettung gelagert (maximal 7 Tage).

Immersionsfixierung von Gewebe

Für die Immersionsfixierung wurden die Tiere (< P7) durch Dekapitation getötet, das Gehirn und der knöcherne Rückenmarkskanal freipräpariert und über Nacht in PFA (10% (w/v) in PBS) fixiert. Anschließend wurde das Rückenmarksgewebe freipräpariert. Die Gewebe wurden mehrfach in PBS gewaschen und in PBS bei 4°C bis zur Einbettung gelagert (maximal 7 Tage). Anmerkung: Um zu gewährleisten, dass die unterschiedlichen Fixierungsmethoden keinen Einfluss (qualitativ und quantitativ) auf die Ergebnisse hatten, wurden exemplarisch einzelne Tiere < P7 perfundiert und einzelne Tiere > P7 (max. P20) immersionsfixiert. Es ergab sich kein relevanter Unterschied bei immunhistologischen Analysen.

Paraffineinbettung der Gewebe und Herstellung von Paraffinschnitten

Die Gewebe wurden mindestens eine Stunde gewässert und in 70% EtOH überführt. Die Einbettung erfolgte in einem Gewebeeinbettautomaten (Shandon-Elliott, Frankfurt) nach folgendem Programm: eine Stunde 80%

(v/v) EtOH, zweimal eine Stunde 96% (v/v) EtOH, dreimal eine Stunde 100% (v/v) EtOH, dreimal 45 Minuten Chloroform und dreimal zwei Stunden Paraffin (Paraplast Plus, Roth, Karlsruhe). Danach wurden die Gewebe sofort in flüssigem Paraffin auf einer kalten Metallplatte in einem rechteckigen Metallrahmen eingebettet, die Paraffinblöcke im Kühlschrank erkaltet, beschriftet und bei RT gelagert. Die Paraffinblöcke wurden zur Anfertigung von Schnitten auf Paraffin-getränkte Holzblöcke aufgebracht und in das Mikrotom (1130 Biocat, Reichert und Jung, Nussloch) eingespannt. Es wurden Schnitte von 8 µM Dicke angefertigt, die in einem Wasserbad bei ca. 40 °C geglättet und auf Objektträger gezogen wurden. Die Trocknung der Schnitte erfolgte auf einer Wärmeplatte bei ca. 40-50 °C. Fertige Schnitte wurden bei RT gelagert.

Kryoeinbettung und Herstellung von Kryoschnitten

Die entnommenen Gewebe wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Das gefrorene Gewebe wurde in ein Kryomikrotom (CM3050S, Leica, Wetzlar) auf einen Schneideaufsatz gelegt und luftblasenfrei in Kryomatrix (Thermo Shandon, Pittsburgh, USA) eingebettet. Es wurden Schnitte von 12 µm Dicke hergestellt und auf Objektträger (*SuperFrost®Plus*, Menzel, Braunschweig) gezogen, welche auf einer Wärmeplatte bei ca. 40 °C eine Stunde getrocknet und anschließend bei -80 °C gelagert wurden.

Immunhistochemische Analyse von Paraffinschnitten:

Standardprotokoll

Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte in einer absteigenden Xylol-Alkoholreihe: zweimal 10 Minuten 100% (v/v) Xylol, zweimal zwei Minuten 100% (v/v) EtOH, je zwei Minuten 96%, 70% und 50% (v/v) EtOH. Danach wurden die Schnitte in PBS überführt und (sofern nicht anders angegeben) zunächst für 10 Minuten bei 55 °C sowie für 10 Minuten bei 95 °C mit Antigen-Demaskierungslösung (*Antigen Unmasking Solution*, Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA) inkubiert. Nach Abkühlung auf RT wurden die Objektträger außerhalb der Schnitte leicht getrocknet und die Schnitte mit einem Fettstift (*DAKO Cytomation Pen*, Dako, Hamburg) umrandet. Die Permeabilisierung der Schnitte erfolgte für 20 Minuten bei RT in PBS mit Triton-X-100 (0.2% (v/v)) und Serum (10% (v/v), Ziege oder Esel). Zur weiteren Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte 30 Minuten (außer bei Verwendung von Sekundärantikörpern aus Esel) mit Milchpulverlösung (5% (w/v) in PBS) behandelt. Die Inkubation

mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht in PBS mit Serum (1% (v/v)) bei 4°C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal 15 Minuten mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei RT in einer feuchten Kammer mit dem Sekundärantikörper in PBS mit Serum (1% (v/v)) inkubiert und erneut dreimal 15 Minuten mit PBS gewaschen. Die Nissl-Färbung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Zur Visualisierung der Zellkerne erfolgte eine 5-minütige Behandlung mit DAPI (2 µg/ml in PBS, Merck, Darmstadt). Die Schnitte wurden dreimal 5 Minuten gewaschen und mit Einbettmedium (*ImmuMount*, Thermo Shandon, Pittsburgh, USA) eingedeckt und bei 4°C bis zur Auswertung gelagert. Die digitale Analyse erfolgte an einem Zeiss Axiovert 200M LSM 510 (Zeiss, Jena) durch konfokale Mikroskopie.

Neurofuchsinfärbung auf humanen Paraffinschnitten

Um das Zielprotein zu demaskieren, wurden die humanen Paraffinschnitte nach der Entparaffinierung 7-mal 5 Minuten bei 700 Watt in 1 M Zitratpuffer (pH 6) erhitzt. Nach Abkühlung erfolgte ein einstündiger Blockierungsschritt mit 0.5% (w/v) Casein (Sigma-Aldrich, Seelze). Danach wurden die Schnitte zunächst 1.5 Stunden bei RT mit dem Primärantikörper anti-K_{ir}4.1 (1:100) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Alkaline Phosphatase-gekoppelter Antikörper verwendet, der bei RT für 1.5 Stunden auf die Schnitte gegeben wurde. Als Substrat für die Alkaline Phosphatase diente ein Gemisch aus 6.3 µl Neurofuchsin (5% (w/v), Sigma-Aldrich, Seelze), 16 µl Natriumnitrit (4% (w/v), Sigma-Aldrich, Seelze), 2 ml Naphthol-AS-Biphosphat (Sigma-Aldrich, Seelze), 20 µl N, N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt) und 3 ml Tris-HCl (0.05 M, pH 8.7) mit Levamisol (1 mM, Sigma-Aldrich, Seelze). Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin/Hämalaun (saures Hämalaun nach Mayer, Carl Roth, Karlsruhe) für 7-10 Minuten gegengefärbt und eingedeckt. Die Neurofuchsinfärbung wurde freundlicherweise durch die Gruppe von PD Dr. med. Walter Schulz-Schäffer, Neuropathologie, Universitätsklinikum Göttingen, durchgeführt. Das Schnittmaterial für weitere selbst durchgeführte Färbungen wurde ebenfalls von der Gruppe zur Verfügung gestellt.

Immunhistochemische Analyse von Kryoschnitten

Die Objektträger wurden eine Stunde bei 37°C erwärmt und die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift (*DAKO Cytomation Pen*, Dako, Hamburg)

umrandet. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gestellt und nach dem Standardprotokoll (ohne Demaskierung) weiterbehandelt.

Immunzytochemische Analyse von Zellkulturen

Die Fixierung von Zellkulturen auf CV erfolgte in PFA (4% (w/v) in PBS) für 15 Minuten bei RT. Nach zwei 10-minütigen Waschschritten in PBS wurden die Zellen 5 Minuten in Glyzinslösung (0.1% (w/v) in PBS) inkubiert und anschließend mit einem Gemisch aus Triton-X-100 (0.3% (v/v)), Glyzin (0.1% (w/v)) und Serum (10% (v/v), aus Ziege oder Esel) in PBS für 10 Minuten permeabilisiert. Die CV wurden auf der bewachsenen Seite über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer mit dem Primärantikörper in PBS mit Serum (1% (v/v)) in einem Gesamtvolumen von 30 µl inkubiert. Die CV wurden danach dreimal 15 Minuten gewaschen und bei RT mit dem Sekundärantikörper in PBS mit Serum (1% (v/v)) unter Lichtausschluss behandelt, erneut dreimal 15 Minuten gewaschen und mit Einbettmedium (*Vectashield® Mounting Medium with DAPI*, Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA) eingedeckt. Für den K_i4.1-AK und den AQP4-AK wurde die Spezifität der AK durch Präadsorption an das vom Hersteller mitgelieferte Kontrollantigen bestätigt. Dazu wurden 2 µl der AK mit einem 5-fachen Gewichtsüberschuss von Kontrollantigen für eine Stunde bei RT in PBS (Gesamtvolumen für K_i4.1 396 µl, für AQP4 495 µl) auf einem Rotator inkubiert. Nach Zentrifugation (5 Minuten, 13000 rpm) wurde dem Überstand 1% (v/v) Serum zugesetzt. 30 µl pro Coverslip dieser Lösung wurden eingesetzt und die Färbung analog zu dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die digitale Analyse erfolgte an einem Zeiss Axiovert 200M LSM 510 (Zeiss, Jena) durch konfokale Mikroskopie.

4.2.5. Western Blot Analyse

Herstellung und Behandlung von Gewebelysaten

Für den WBP wurde zunächst ein zweifach Konzentrat (zweifach WBP) aus 100 mM Tris (Stock 1 M, pH 7.5), 2% (v/v) Triton-X-100, 10 mM EDTA (Stock 0.5 M, pH 8.0) und 20 mM NaF hergestellt (Lagerung 4 °C). Der Gebrauchspuffer setzte sich aus 50% (v/v) zweifach WBP, 2.5 mM Na₂PP (Stock 100 mM), 1 mM NaOV (Stock 100 mM), 1 mM PMSF (Stock 100 mM), 1 mM DTT (Stock 100 mM) und einfach-konzentriertem Protease-Inhibitorengemisch (*Complete Mini tablets*, Stock 25-fach, nach Angaben des Herstellers in H₂O_{dd} angesetzt, Roche Diagnostics, Penzberg) zusammen. Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit H₂O_{dd} erreicht.

Na₂PP, NaOV, PMSF, DTT und das Protease-Inhibitorengemisch wurden als Aliquots hergestellt, bei -20°C gelagert und unmittelbar vor Versuchsbeginn frisch in den jeweiligen Mengen zugesetzt.

Tiere wurden zunächst mit 7% Chloralhydrat (Sigma-Aldrich, Seelze) intraperitoneal betäubt und nach negativem Test von Schmerzreflexen dekapitiert, dann erfolgte eine rasche Gewebeentnahme (gesamtes Rückenmark oder getrennt nach Zervikal- und Lumbalmark ohne Thorakalmark). Die Gewebe wurden mit Hilfe eines Glashomogenisators in WBP homogenisiert und die Homogenate für eine Stunde auf Eis inkubiert, um die enthaltenen Proteine aus den Lipidanteilen zu lösen. Anschließend wurden die Homogenate für 15 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert, die Überstände (GWP: Gewebelysat Western Blot Proben) in neue Gefäße überführt und die sedimentierten Bestandteile verworfen. (Anmerkung: Das Sediment ist weitgehend frei von Proteinen. Einzelne Ergebnisse wurden unter Einbezug des Sediments wiederholt, es ergab sich kein signifikanter Unterschied.) Die GWP wurden aliquotiert und bei -20°C oder -80°C (längerfristige Aufbewahrung) gelagert. Alle Präparationsschritte erfolgten auf Eis.

Der Proteingehalt der GWP wurde mit dem BCA-Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) bestimmt. Die Reaktionslösung wurde nach den Angaben des Herstellers erstellt. Die Bestimmung erfolgte in einem Volumen von 200 µl in einer 96-well Platte. In einem dreifach Ansatz wurde je 1 µl der GWP in je ein well der vorbereiteten Platte gegeben und mit der Reaktionslösung vermischt. Für den Blindwert wurde je 1µl WBP verwendet. Nach 30 Minuten wurde die Extinktion bei 530 nm photometrisch gemessen. Der Proteingehalt wurde anhand einer Eichreihe (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 und 40 µg BSA) ermittelt, die bei jeder Analyse analog mitbestimmt wurde. Das im WBP enthaltene DTT (reduzierender Charakter) hatte einen konstanten aber geringen Einfluss auf die Analyse, so dass dieser vernachlässigbar war.

Für den Western Blot wurden die zu vergleichenden GWP zunächst auf den gleichen Proteingehalt (30 µg) eingestellt. Dazu wurde die einzusetzende GWB-Menge mit 6-fach Ladepuffer (6-fach LP: 30% (v/v) Glycerin, 350 mM Tris (pH 6.8), 10% (w/v) SDS, 0.6 M DTT) versetzt, und mit H₂O_{dd} auf identische Volumina in allen Proben aufgefüllt um eine einfache Konzentration des LP zu erhalten. Die Proben wurden anschließend für 10 Minuten bei 70°C (für die Analyse des K_{ir}4.1-Proteins

und des AQP4-Proteins) oder 95 °C (alle weiteren Analysen) gekocht, auf Eis abgekühlt und kurz an zentrifugiert.

Herstellung und Behandlung von Zellkulturlysaten

Das Medium wurde vorsichtig von den Zellkulturschalen abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Pro Kulturschale (Kulturoberfläche 21.5 cm²) wurden 200 µl einfach-konzentrierter LP (durch Verdünnung mit H₂O_{dd} aus 6-fach LP erstellt) gegeben und der Zellrasen mit einem Kulturschaber abgelöst. Die Lysate (ZWP: Zellkulturlysate Western Blot Proben) wurden in Eppendorfgefäße überführt und 10 Minuten bei 95 °C erhitzt, abgekühlt und bei -20 °C (-80 °C für längerfristige Lagerung) gelagert.

SDS beeinflusst aufgrund seines stark reduzierenden Charakters die Proteinanalyse nach BCA zu stark. Deshalb wurde für Zellkulturlysate die Bestimmung nach Neuhoff verwendet. Zunächst wurde eine Eichreihe von 0.1-10 µg/µl BSA in einfach-konzentriertem LP erstellt. Von jeder Konzentration wurden dreimal 5 µl auf eine Zellulose-Azetat-Folie (Sartorius, Göttingen) pipettiert. Danach wurde die Folie 30-45 Minuten getrocknet und 5 Minuten in der Färbelösung geschwenkt. Die Färbelösung setzte sich zusammen aus 0.5% (w/v) Amidoschwarz (Serva, Heidelberg) in einem Gemisch aus 90% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure-Lösung (50% (v/v) Essigsäure in H₂O_{dd}). Zur Entfernung der überschüssigen Färbelösung wurde die Folie dreimal 5 Minuten mit Entfärbelösung (90% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure-Lösung) behandelt. Die einzelnen Auftragspunkte wurden gleichmäßig aus der feuchten Folie ausgeschnitten, in Eppendorfgefäßen getrocknet und mit 1 ml DMSO versetzt. Als Referenz diente ein Stück Folie gleicher Größe, auf das 5 µl einfach-konzentrierter LP aufgetragen und das entsprechend behandelt wurde. Die Eppendorfcaps wurden bis zur vollständigen Auflösung der Folie auf einem Schüttler geschüttelt. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 630 nm in einem Photometer (CE 1021, Cecil Instruments, Cambridge, UK). Die ZWP wurden zur Bestimmung des Proteingehaltes analog behandelt und die Proteinkonzentration aus der Eichgeraden errechnet. Die ZWP wurden in entsprechender Menge direkt für die Elektrophorese verwendet.

Gelelektrophorese und Elektrotransfer

Proteine können nach ihrer molaren Masse mit der Methode der SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden. Die Wahl der

Acrylamidkonzentration des (Trenn-) Gels richtet sich nach dem Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins. Das Trenngel wurde zur Konzentrierung der Proteinbanden mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet. Es wurden Gelgießstände der Firma Biorad verwendet.

Tab. 8: Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel (Angaben für jeweils zwei Gele)

	SAMMELGEL	TRENNGEL			
		8%	10%	12%	15%
Acrylamid (40 % (w/v)) – Bisacrylamid (0.8 % (w/v)) – Mischung	0.5 ml	2 ml	2.5 ml	3 ml	3.75 ml
1.5 M Tris pH 8.8 mit 0.4% (w/v) SDS	-	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
0.5 M Tris pH 6.8 mit 0.4% (w/v) SDS	1.25 ml	-	-	-	-
H ₂ O _{dd}	3.25 ml	5.5 ml	5 ml	4.5 ml	3.75 ml
APS (10% (w/v)), Serva, Heidelberg)	30 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED (Sigma-Aldrich, Seelze)	15 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

Als Protein-Größenmarker wurde der *Precision Plus Protein™ Standard, Kaleidoscope™* (BioRad, München) verwendet. Die aufgetragenen Proben wurden elektrophoretisch (Laemmli, 1970) für 1h–1.5 h (je nach Konzentration des Gels) bei 30 mA konstantem Strom pro Gel in Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.5) aufgetrennt und dann bei 100 V für 1h-1.5 h bei 4°C in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, pH 8.3) auf eine Nitrozellulosemembran (Protean™, 0.45 µM, Schleicher und Schüll, Dassel) transferiert (Towbin et al., 1979). Der Transfer wurde durch die reversible Färbung der Membran mit Ponceau S (0.1% (w/v) in 5% Essigsäure in H₂O_{dd}, Serva, Heidelberg) verifiziert und der Farbstoff in TBST (20 mM Tris, 140 mM NaCl, Tween (0.1% (w/v))) ausgewaschen. Danach wurde die Membran eine Stunde bei RT mit Milchpulverlösung (5% (w/v) in TBST) blockiert und anschließend mit dem Primärantikörper in Milchpulverlösung bzw. BSA-Lösung (5% (w/v) in TBST) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal 15 Minuten mit TBST gewaschen und für 1h bei RT mit dem Sekundärantikörper in Milchpulverlösung behandelt. Nach Waschen in TBST (dreimal 15 Minuten) erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden auf einem Film (*Hyperfilm ECL*, Amersham Biosciences, Little Chalfont, England) mit Hilfe des ECL-Systems (ECL, *Enhanced Chemoluminescent* Detektionssystem, Amersham Biosciences) nach Angaben des

Herstellers. Für den K_{ir}4.1-AK und den AQP4-AK erfolgte zusätzlich eine Überprüfung der Spezifität der AK durch Präadsorption an das vom Hersteller mitgelieferte Kontrollantigen. Dazu wurden 5 µl des AK (K_{ir}4.1) bzw. 2 µl (AQP4) mit einem 5-fachen Gewichtsüberschuss des Kontrollantigens für eine Stunde bei RT in 500 µl TBST auf einem Rotator inkubiert. Nach Zentrifugation (5 Minuten, 13000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und dieser mit Milchpulverlösung auf 5 ml aufgefüllt und analog zu obigem Protokoll verwendet.

Für quantitative Auswertungen wurde der Film mit einem handelsüblichen Scanner eingescannt und die Datei im Tiff-Format gespeichert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels der Quantity One® Software (BioRad, München). Es wurden dabei nur Proben und Kontrollen auf einem Blot direkt verglichen. Proben unterschiedlicher Filme (sofern nötig) konnten durch Normierung der Kontrolle auf 100% zueinander in Relation gesetzt werden. Die Daten wurden als Prozent der Kontrollen (100%) dargestellt. Es wurden nur Filme für die Quantifikation verwendet, auf denen die Schwärzung der Kontrollbanden unterhalb der Sättigung lag.

4.2.6. Modellsystem für die Zellschwellung am Beispiel astrozytärer Zellen im Rückenmark der Maus

K_{ir}4.1-WT- und K_{ir}4.1-KO-Tiere mit grün fluoreszierenden Astrozyten im Alter von P7-P10 wurden mit Isofluran anästhesiert und dekapitiert. Ca. ein Zentimeter des zervikalen Rückenmarkkanals wurde entfernt und in eiskalte Ringerlösung gebracht (RL: 125 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 25 mM Glucose in H₂O_{dd}; begast mit 95% (v/v) Sauerstoff und 5% (v/v) Kohlenstoffdioxid, pH 7.4). Das Gewebe wurde vorsichtig ohne Verletzung aus dem Wirbelkanal gelöst und auf einen vorbereiteten Agarblock geklebt (Loctite 454), der das Gewebe während des Schneidevorgangs stützte. Der Agarblock wurde auf eine Teflonplatte aufgeklebt. Mit einem Vibratom VT 1000S mit vibrierender Klinge (Leica, Wetzlar) wurden transverse Schnitte von 300 µM Dicke angefertigt. Die Aufbewahrung der Schnitte erfolgte in eiskalter RL in Schnittkammern (Anfertigung durch die Werkstätten des MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen) auf Netzhaltern, um eine kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff von beiden Seiten zu gewährleisten.

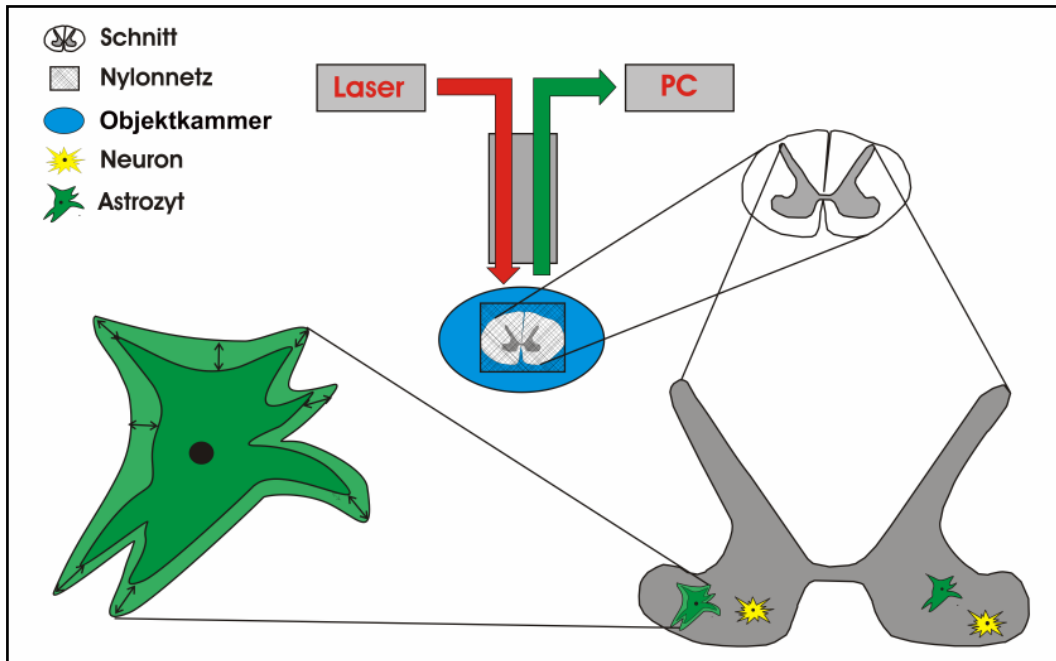


Abb. 10: Versuchsaufbau für die Schwellungsexperimente. Die Schnitte wurden in einer Objektkammer durch ein Nylonnetz fixiert und kontinuierlich superfundiert. Das Fluoreszenzsignal von Astrozyten in der grauen Substanz des Ventralhorns wurde durch das Prinzip der 2PLSM detektiert: Zwei Photonen von niedrigem Energiestatus, die zeitgleich auftreffen werden benötigt, um das Fluorophor anzuregen. Die Bilddaten wurden digital (PC) gespeichert und dargestellt. Die Pfeile in der Darstellung des Astrozyten deuten die Volumenveränderungen an.

Die Dokumentation des zellulären Schwellungsverhaltens wurde mit einem 40er Wasserimmersionsobjektiv an einem Axioskop FS2 Mot, LSM 510NLO (Zeiss, Jena), ausgestattet mit einem Argon-Helium-Neon Titanium Sapphire Laser (Coherent Mira 900, Coherent), mittels konfokaler 2-Photonen Lasermikroskopie (2PLSM) durchgeführt. Der Laser wurde auf 890 nm eingestellt, wodurch EGFP angeregt werden konnte. Es wurden Astrozyten, z.T. in Kontakt mit umliegenden Blutgefäßen, in der grauen Substanz des Ventralhorns in einer Tiefe von 20-100 μm analysiert. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die Messungen nicht an Zellen, die durch den Schneidprozess geschädigt wurden, durchgeführt wurden. Weiterhin wurde gewährleistet, dass die verwendeten Superfusionslösungen die Zellen ohne große Verzögerung erreichten (Ausschluss isovolumetrischer Volumenregulation). Alle Messungen fanden bei Raumtemperatur statt. Die Schnitte wurden während der Versuchsdurchführung mit einem Nylonnetz in der Objektkammer fixiert und in Position gehalten. Die Objektkammer war mit einer Rollerpumpe (PCD 31.2 Pumpe, Matson, Flussgeschwindigkeit etwa 20 ml/min) mit zwei Zuflüssen und einem Abfluss verbunden, wodurch eine kontinuierliche Perfusion des Gewebes mit Flüssigkeit und Sauerstoff

gewährleistet wurde. Zu Beginn jeder Messung wurden die Schnitte ca. eine Stunde in RL (im Folgenden normosmolare Lösung genannt) equilibriert. Schnitte mit starken irreversiblen Zellanschwellungen, ausgelöst durch Schädigungen während des Schneideprozesses, wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen. Die Versuche wurden mit folgenden Lösungen durchgeführt: normosmolar, hypoosmolar (RL mit 30% (v/v) H_2O_{dd}) und hypoosmolar mit Bariumchlorid (RL mit 30% (v/v) H_2O_{dd} und 1 M Bariumchlorid). Bariumchlorid ($BaCl$) wurde verwendet, um K_{ir} -Kanäle zu blockieren. Es gibt bisher keine spezifischen Blocker für die $K_{ir}4.1$ -Kanaluntereinheit. Der Vergleich der Ergebnisse für $K_{ir}4.1$ -WT- mit $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren ermöglichte jedoch Rückschlüsse auf die Beteiligung von $K_{ir}4.1$. Nach dem Wechsel von zwei Lösungen wurde vor der Aufzeichnung eines neuen Datensatzes eine Minute gewartet, um einen kompletten Lösungsaustausch zu gewährleisten (siehe LW, Abb. 11). Weiterhin wurde die zu analysierende Zelle vor jeder Aufzeichnung auf die Mitte refokussiert. Vor der Superfusion mit hypoosmolarer Lösung mit $BaCl$ erfolgte eine Gabe von normosmolarer Ringerlösung mit $BaCl$. Dies stellte sicher, dass unter der Bedingung 'hypoosmolar und $BaCl$ ' der Effekt der hypoosmolaren Lösung auf bereits blockierte K_{ir} -Kanäle erfolgte.

Zu ausgewählten Zeitpunkten wurde das astrozytäre Schwellungsverhalten digital als Bildstapel (*Stack*) aufgezeichnet. Ein Bildstapel bestand dabei aus einer Abfolge von 32 zweidimensionalen Einzelaufnahmen (vertikale Achse $1.50 \mu m$) verschiedener Ebenen über einen Bereich von $48 \mu m$. Jedes zweidimensionale Bild hatte eine Größe von 512×512 Pixeln. Die Voxelgröße (dreidimensionales Äquivalent zu einem Pixel) lag zwischen $0.12 \times 0.12 \times 1.50 \mu m$ und $0.24 \times 0.24 \times 1.50 \mu m$. Die Erfassungsdauer für einen Bildstapel betrug ca. zwei Minuten.

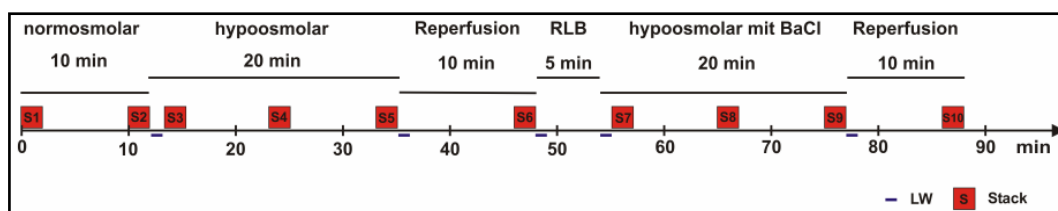


Abb. 11: Darstellung des Versuchsprotokolls. Zunächst erfolgte eine 10-minütige Superfusion mit normosmolarer Lösung, anschließend wurde 20 Minuten hypoosmolare Lösung gegeben, gefolgt von einer erneuten 10-minütigen Superfusion mit normosmolarer Lösung. Anschließend erfolgte zusätzlich eine 5-minütige Gabe von normosmolarer Lösung mit Barium, gefolgt von einer 20-minütigen Superfusion mit hypoosmolarer Lösung mit Barium. Abschließend wurde das Gewebe erneut 10 Minuten mit normosmolarer Lösung reperfundiert. Zu ausgewählten Zeitpunkten (Pfeile, stacks) wurde das Schwellungsverhalten digital analysiert. RLB = normosmolare Lösung mit 1M Bariumchlorid ($BaCl$), LW = Lösungswechsel, S = Bildstapel (*stack*), min = Minuten.

Die Bildbearbeitung und morphometrischen Messungen wurden mit der NIH Software ImageJ durchgeführt. Die durch den Photomultiplier verursachten Hintergrundstörungen wurden mittels der Software herausgerechnet, sie lagen in einem Bereich von 5-20 auf einer Grauskala mit den Werten 0-255. Die Größe der Zellsomata wurde durch Ausmessung (μm^2) einzelner Zellen in einer Maximal-Intensität-Projektion (MIP, *maximum intensity projection*) ermittelt. Eine MIP ist eine zweidimensionale Darstellung der Überlagerung aller Einzelebenen eines Bildstapels. Die Ausmessung der astrozytären Fortsätze wurde in der Weise vorgenommen, dass ein definierter Bereich in einem konstanten Abstand von 5 μM von einem Zellsoma festgelegt wurde, indem die Fluoreszenzintensität oberhalb der Schwelle erfasst wurde. Die Ergebnisse für die verschiedenen osmotischen Bedingungen wurden mit der Autoschwellenfunktion von ImageJ analysiert, gefolgt von der Anwendung der Partikelanalysefunktion (stellt den Bereich in Prozent dar, der Pixel oberhalb der Schwelle enthält). Die Darstellung der Werte erfolgte als Flächenprozent der Kontrolle, die 100% gesetzt wurde. Die Daten wurden z.T. in Zusammenarbeit mit Pajam Dibaj, Arbeitsgruppe PD Dr. Neusch, Abteilung Neurologie, Georg-August Universität Göttingen erarbeitet.

5. Ergebnisse

5.1. Kontrolle der Spezifität der Antikörper für das K_{ir}4.1-Protein und das Aquaporin 4-Protein

5.1.1. Anti-K_{ir}4.1-Antikörper

Der anti-K_{ir}4.1-Antikörper (Alomone Laboratories, Israel) wurde gegen ein synthetisches Peptid (Aminosäurencode KLEESLREQAEKEGSALSV) hergestellt, was den Aminosäuren 356-375 des K_{ir}4.1-Proteins aus der Ratte entspricht. Dieser Antikörper (AK) konnte in verschiedenen Studien erfolgreich (Connors und Kofuji, 2002, Guadagno und Moukhles, 2004, Noel et al., 2005, Neusch et al., 2006) zur Detektion des K_{ir}4.1-Proteins in murinem Gewebe eingesetzt werden und ist aufgrund der starken Homologie auch zur Anwendung in menschlichem Gewebe nutzbar.

Zur Kontrolle des Bindeverhaltens des AK wurden gemischte gliale Kulturen vom Rückenmark der Maus aus der KIRB-Linie (Oligodendrozyten mit transgener Expression eines roten Fluoreszenzfarbstoffs) angelegt. Diese Kulturen wurden mit dem anti-K_{ir}4.1-AK nach einem Standardprotokoll gefärbt. In Einklang mit früheren Studien (Neusch et al., 2001) konnte eine starke Expression des K_{ir}4.1-Proteins auf kultivierten Oligodendrozyten nachgewiesen werden (Abb. 12; a, b). Wurde der anti-K_{ir}4.1-AK an das Kontrollantigen präadsorbiert, fand keine Bindung an das Zielprotein statt (Abb 12; e, f). In Kulturen von K_{ir}4.1-KO-Tieren konnte keine K_{ir}4.1-Immunfärbung gezeigt werden. Diese beiden Ergebnisse sprechen für eine spezifische Bindung des anti-K_{ir}4.1-AK an das K_{ir}4.1-Protein. Ein K_{ir}4.1-Kanal baut sich entweder aus einem Homotetramer oder einem Heterotetramer mit anderen K_{ir}-Kanaluntereinheiten auf. In murinen Gewebelysaten erkannte der anti-K_{ir}4.1-AK mehrere Banden im Bereich von 160-200 kD. Diese entsprechen der tetrameren Form des Kanals sowie möglichen höhermolekularen Proteinkomplexen (Abb. 12; h, Multimere) mit potentiellen Bindepartnern. Dazu können andere K_{ir}-Kanaluntereinheiten, Aquaporine und Syntrophine zählen (Connors et al., 2004, Nagelhus et al., 2004, Noel et al., 2005). Um 80-85 kD wurde die dimere Form des Kanals detektiert und bei etwa 40 kD die monomere Kanaluntereinheit. In einigen Fällen erkannte der anti-K_{ir}4.1-AK eine unspezifische Bande oberhalb von 85 kD, die auch nach Präadsorption des K_{ir}4.1-AK an das Kontrollantigen detektiert werden konnte. Das gleiche Ergebnis wurde in Gewebelysaten

von $K_{ir}4.1$ -defizienten Tieren mit dem anti- $K_{ir}4.1$ -AK (nicht gezeigt) erzielt. Diese Bande ist für die qualitativen und quantitativen Ergebnisse dieser Arbeit nicht relevant und deshalb zu vernachlässigen.

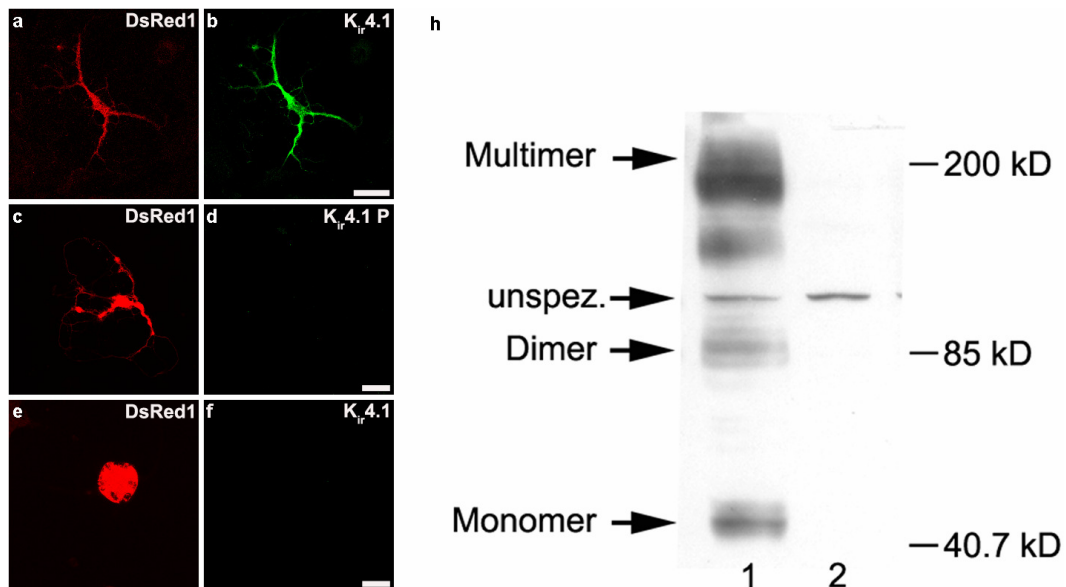


Abb. 12: Bindeverhalten des anti- $K_{ir}4.1$ -Antikörpers. (a, b) In gemischten glialen Kulturen der KIRB-Linie detektiert der anti- $K_{ir}4.1$ -AK die Expression von $K_{ir}4.1$ (b, grün, Alexa488) auf Oligodendrozyten (a, rot, mPLP-DsRed1). (c, d) Präadsorption des anti- $K_{ir}4.1$ -AK an das Kontrollantigen. (e, f) Kulturen von $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren sind $K_{ir}4.1$ -negativ. Oligodendrozyten aus $K_{ir}4.1$ -negativen Tieren sind *in vitro* aufgeschwollen (e). $K_{ir}4.1P$ = anti- $K_{ir}4.1$ -AK an Kontrollantigen präadsorbiert. Skalierung 30 μm (a, b), 50 μm (c, d), 20 μm (e, f). (h) Der anti- $K_{ir}4.1$ -AK detektiert im Western Blot (Spur 1) vornehmlich 4 Banden. Nach Präadsorption des anti- $K_{ir}4.1$ -AK an das Kontrollantigen verbleibt eine unspezifische Bande (Spur 2). unspez. = unspezifische Bande.

5.1.2. Anti-AQP4 Antikörper

In dieser Arbeit wurden zwei anti-AQP4-AK (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) eingesetzt. Für den immunhistochemischen und immunzytochemischen Nachweis der Expression wurde ein in Ziege hergestellter anti-AQP4-AK (H-19) verwendet, der gegen die Aminosäuren 280-320 des menschlichen AQP4-Proteins gerichtet ist. Abbildung 13 zeigt den immunzytochemischen Nachweis des AQP4-Proteins auf Astrozyten in einer gemischten glialen Kultur des Rückenmarks von Tieren aus der KIRC-Linie (Astrozyten mit transgener Expression eines grünen Fluoreszenzfarbstoffs). In kultivierten Astrozyten konnte eine relativ gleichmäßige Proteinexpression gezeigt werden. Durch Präadsorption des anti-AQP4-AK an das Kontrollantigen wurde die Bindung des AK an das Zielprotein verhindert, was für eine spezifische Detektion von AQP4 durch den anti-AQP4-AK (H-19) spricht. Im Western Blot wurde der anti-AQP4-AK H-80 verwendet, der gegen die Aminosäuren 244-323 des menschlichen AQP4-Proteins gerichtet ist

(Abb. 13; Einsatzbild). In Rückenmarksllysaten von Mäusen detektierte dieser anti-AQP4-AK hauptsächlich eine starke Bande um 30 kD (neben weiteren Banden im höhermolekularen Bereich, nicht gezeigt), die dem monomeren AQP4-Protein entsprach. Präadsorption des Antikörpers an das Kontrollantigen verhinderte eine Bindung des AK an das AQP4-Protein in Gewebelysaten.

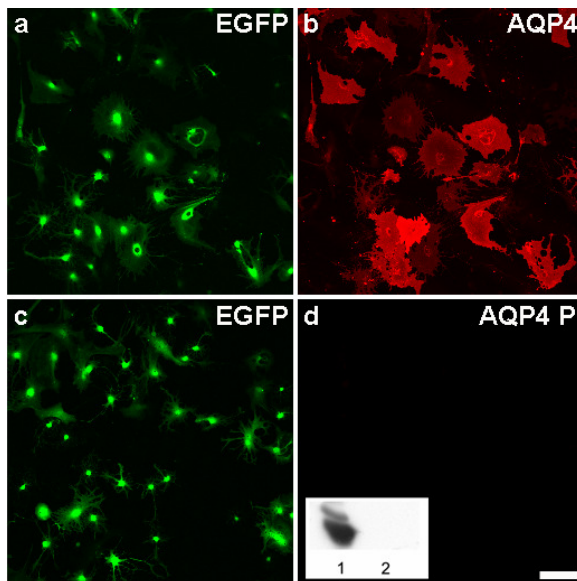


Abb. 13: Test der Spezifität der anti-AQP4-Antikörper. (a, b) In gemischten glialen Kulturen bindet der anti-AQP4-AK (H-19) an das AQP4-Protein (b, rot, Cy3) auf Astrozyten (a, grün, hGFAP-EGFP). (c, d) Präadsorption des anti-AQP4-AK (H-19) an das Kontrollantigen. AQP4 P = AQP4-AK an Kontrollantigen präadsorbiert. Anmerkung: In Kultur sind nicht alle Astrozyten AQP4-positiv. Skalierung 100 μ m. Im Western Blot (Einsatzbild in d) detektiert der anti-AQP4-AK (H-80) eine starke Bande um 30 kD (Spur 1). Spur 2 zeigt die Präadsorption des anti-AQP4-AK an das Kontrollantigen.

5.2. Analyse der entwicklungsabhängigen Expression von $K_{ir}4.1$ im Rückenmark der Maus

Es gibt in der Literatur unterschiedliche Daten (siehe 2.2.2.) hinsichtlich der Expression von $K_{ir}4.1$ in Gliazellen (Poopalasundaram et al., 2000, Higashi et al., 2001, Neusch et al., 2001, Kalsi et al., 2004). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine zeitliche und zellspezifische Analyse der Expression von $K_{ir}4.1$ im Rückenmark der Maus durchgeführt. Dies diente zudem dazu, die Ergebnisse in einem chronischen Krankheitsmodell für die Motoneuron-Erkrankung ALS (5.4.) einem spezifischen Zelltyp zuordnen zu können.

Zunächst wurde die Expression von $K_{ir}4.1$ in gemischten glialen Kulturen des Rückenmarks von Mäusen aus der KIRM-Linie untersucht. Diese Tiere exprimieren DsRed unter der Kontrolle des murinen PLP-Promotors und EGFP unter Kontrolle des humanen GFAP-Promotors (siehe 4.1.6). Dabei wurden die Ergebnisse einer früheren Arbeit (Neusch et al., 2001) bestätigt. In Oligodendrozyten konnte eine starke Expression von $K_{ir}4.1$ gezeigt werden (Abb. 14; a, b), während in (jungen) Astrozyten (Abb. 14;

c, d) kein $K_{ir}4.1$ nachgewiesen werden konnte. In älteren Kulturen (nicht gezeigt) wurde eine Hochregulation von $K_{ir}4.1$ auf Astrozyten beobachtet.

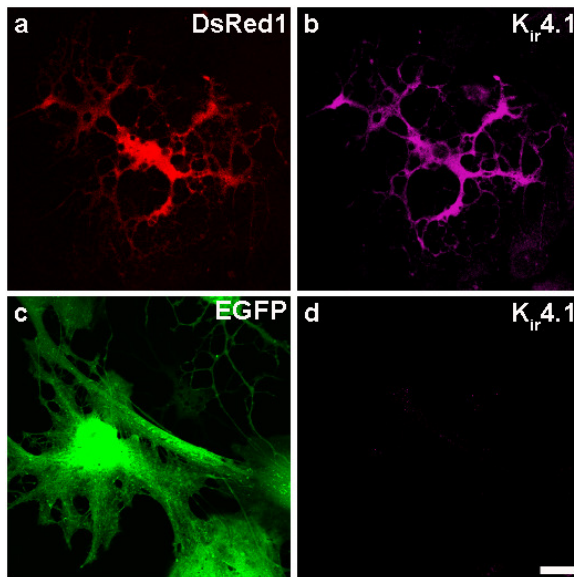


Abb. 14: Expression von $K_{ir}4.1$ in gemischten glialen Kulturen des Rückenmarks der Maus. (a, b) Oligodendrozyten (a, rot, mPLP-DsRed1) sind immunpositiv für $K_{ir}4.1$ (b, magenta, Cy5). Der Zellkörper und die primären Fortsätze zeigen eine etwas stärkere Expression als die feinen Zellfortsätze (Anmerkung: Dies ist auch in verschiedenen Ebenen nachweisbar). (c, d) In jungen Astrozyten (c, grün, hGFAP-EGFP) kann nach einer Woche Kultivierung kein $K_{ir}4.1$ (d) detektiert werden. Skalierung 20 μm

Um Aussagen über die potentielle Funktion eines Proteins machen zu können ist es hilfreich, dessen Expression im Gewebeverband zu kennen. In Interaktion mit anderen Zellen erfüllen Gliazellen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstatus des Gewebes besondere Aufgaben. Hierfür benötigen sie spezielle Proteine, so dass Gliazellen *in situ* und in Abhängigkeit von ihrem Alter andere Proteine in ihre Membran einbauen als *in vitro*. Aus diesem Grunde wurde die Expression von $K_{ir}4.1$ -Kanälen immunhistologisch in Paraffinschnitten aus dem Rückenmark zu verschiedenen postnatalen Zeitpunkten analysiert. Zusätzlich wurde die Proteinmenge von $K_{ir}4.1$ im Western Blot in Abhängigkeit vom Alter untersucht.

Früh postnatal wurde das $K_{ir}4.1$ -Protein vorwiegend auf Zellkörpern im Bereich der weißen Substanz detektiert (Abb. 15; a). Um P7 wurde eine verstärkte, diffuse $K_{ir}4.1$ -Immunfärbung in der grauen Substanz gezeigt, in der weißen Substanz konnte ebenfalls eine $K_{ir}4.1$ -Expression nachgewiesen werden (Abb. 15; b). Mit zunehmendem Alter der Tiere verstärkte sich die Diskrepanz zwischen der starken $K_{ir}4.1$ -Immunfärbung in der grauen Substanz und abnehmender Detektion des Proteins in der weißen Substanz (Abb. 15; b-e). In adultem Gewebe konnte in der weißen Substanz nur noch ein sehr schwaches Signal für $K_{ir}4.1$ nachgewiesen werden, während die graue Substanz stark $K_{ir}4.1$ -immunpositiv war.

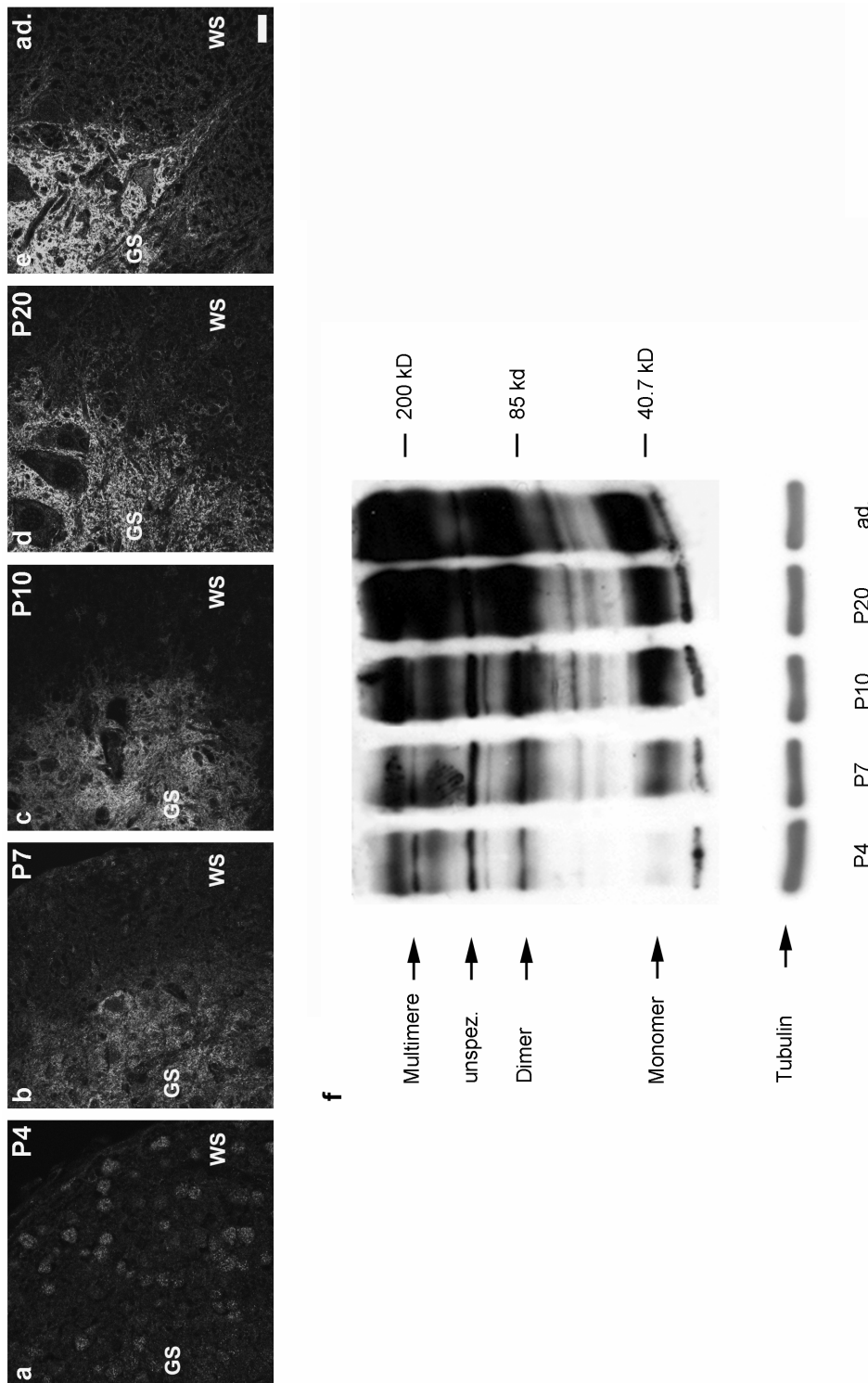


Abb. 15: Immunhistologische und proteinbiochemische Analyse der Expression von K_{ir}4.1 im Rückenmark der Maus. (a-e) Immundetektion von K_{ir}4.1 auf Paraffinquerschnitten verschiedener Alterstufen. Um P4 wird K_{ir}4.1 vornehmlich auf Zellkörpern in der weißen Substanz detektiert (a). Ab P7 kann eine Verstärkung des K_{ir}4.1-Immunsignals in der grauen Substanz nachgewiesen werden (b), während in der weißen Substanz mit zunehmendem Alter eine Abnahme der K_{ir}4.1-Immundefärbung zu verzeichnen ist (c-e). GS = Graue Substanz, WS = Weiße Substanz, Skalierung 20 µm (b-e), 10 µm (a). (f) Western Blot Analyse der K_{ir}4.1-Proteinmenge im Zeitverlauf von P4-adult. Um P4 sind vornehmlich das Monomer sowie das Dimer schwach nachweisbar. Zwischen P7 und P10 nimmt die Expression höhermolekularer Formen zu und es wird ein Bandenmuster erhalten, das nur quantitativ unterschiedlich zu adulten Tieren ist. Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. ad. = adult

Die entwicklungsabhängige Verstärkung der Expression des $K_{ir}4.1$ -Proteins in der grauen Substanz korrelierte mit einer fortschreitenden Erhöhung der Menge des $K_{ir}4.1$ -Proteins im Western Blot (Abb. 15; f) mit zunehmendem Alter der Tiere. Am vierten postnatalen Tag konnte eine schwache Bande für das $K_{ir}4.1$ -Monomer und das $K_{ir}4.1$ -Dimer nachgewiesen werden. Weiterhin wurde ein Immunsignal im höhermolekularen Bereich detektiert, welches den in Abbildung 12 h gezeigten $K_{ir}4.1$ -Komplexen entspricht. Bei sieben Tage alten Tieren konnten Monomer, Dimer und höher-molekulare Komplexe von $K_{ir}4.1$ deutlich nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Entwicklung kam es nur noch zu einer Zunahme des Immunsignals für alle Banden (siehe auch Kaiser et al., 2007, Abb. 1; f).

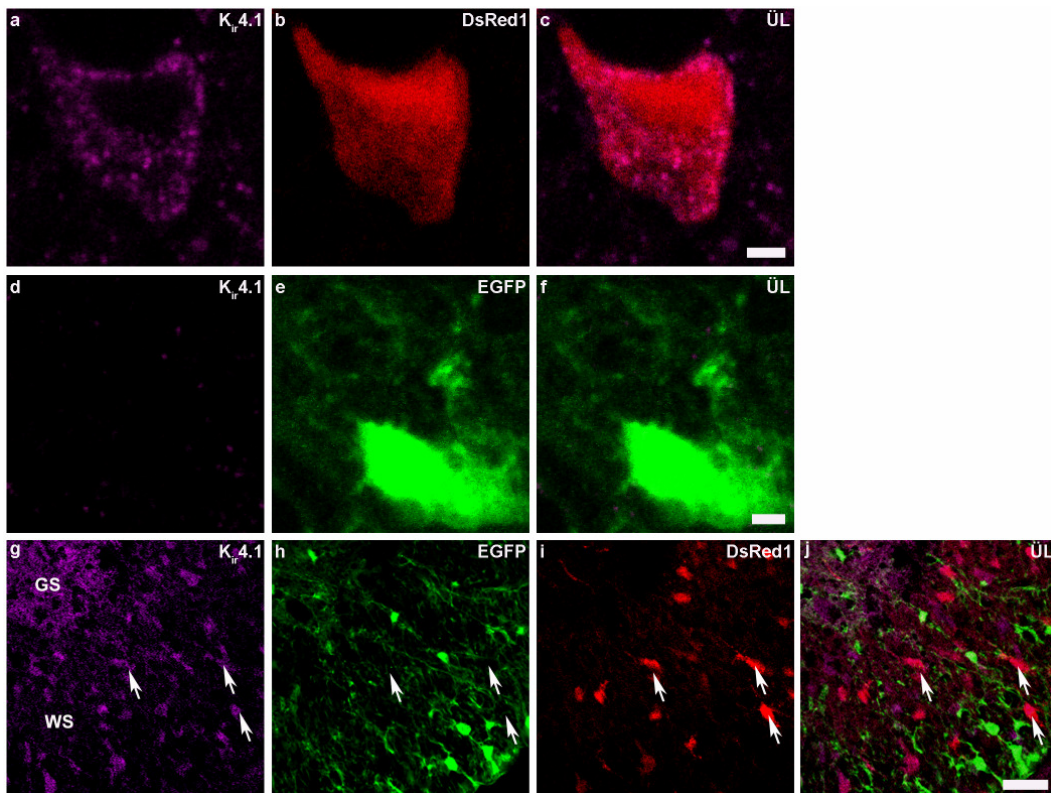


Abb. 16: Zelluläre Expression von $K_{ir}4.1$ *in situ* im Rückenmark der Maus. (a-f) In früh-postnatalen Gewebe (P1-P7) wird das $K_{ir}4.1$ -Protein (a, magenta, Cy5) auf Zellkörpern von PLP-positiven Oligodendrozyten (b, rot, mPLP-DsRed1) in der weißen Substanz nachgewiesen, während Astrozyten (e, grün, EGFP) immunnegativ sind (d). (g-j) Ab etwa dem postnatalen Tag 7-9 kann in der grauen Substanz eine Überlappung (j) der $K_{ir}4.1$ -Immunfärbung (g) mit dem Astrozytennetzwerk (h) nachgewiesen werden. Oligodendrozyten (i) in der weißen Substanz des Rückenmarks exprimieren $K_{ir}4.1$ (Pfeile) auf ihren Zellkörpern, Astrozyten hingegen sind immunnegativ. GS = graue Substanz, WS = Weiße Substanz, ÜL = Überlagerung. Skalierung 2 μ M (a-f), 20 μ m (g-j)

Durch Untersuchung von Mäusen, die transgen verschiedene Fluoreszenzproteine zur Zellidentifikation exprimieren, war es möglich, das in Abbildung 15 gezeigte $K_{ir}4.1$ -Immunsignal spezifisch den

unterschiedlichen Zelltypen zuzuordnen. In der ersten postnatalen Woche wurde das $K_{ir}4.1$ -Protein überwiegend auf Zellkörpern von Oligodendrozyten in der weißen Substanz nachgewiesen (Abb. 16; a-c). Astrozyten der weißen Substanz hingegen exprimieren immunhistochemisch kein $K_{ir}4.1$ (Abb. 16; d-f). Das in der zweiten postnatalen Woche zunehmende Immunsignal für $K_{ir}4.1$ in der grauen Substanz konnte Astrozyten zugeordnet werden (Abb. 16; g-j). Im Gegensatz zu Oligodendrozyten, die $K_{ir}4.1$ -Kanäle verstärkt auf dem Zellkörper exprimieren, war das Signal in der grauen Substanz vornehmlich mit dem astrozytären Netzwerk in den perineuralen Bereichen assoziiert.

In adulten Tieren konnte ebenfalls eine starke Expression von $K_{ir}4.1$ (Abb. 17; a) im astrozytären Netzwerk (Abb. 17; b) der grauen Substanz des Rückenmarks gezeigt werden. In einigen Fällen konnte eine leichte $K_{ir}4.1$ -Immunfärbung auf astrozytären Fortsätzen, die aus der grauen Substanz in die weiße Substanz reichten, detektiert werden. Eine Zellkörper-assoziierte astrozytäre Färbung konnte in der weißen Substanz nicht oder nur schwach detektiert werden. Blockierungsexperimente mit dem Kontrollantigen zeigten zudem, dass in der weißen Substanz (im Gegensatz zur grauen Substanz) ein schwaches Signal auf diesen Zellen zurückblieb, so dass dieses Immunsignal evtl. auf unspezifische Bindungen zurückzuführen ist. In der weißen Substanz waren bei höherer Vergrößerung (nicht gezeigt) vereinzelt $K_{ir}4.1$ -positive Zellkörper erkennbar, deren Fluoreszenzsignal nicht mit EGFP überlappte. Insgesamt war das $K_{ir}4.1$ -Immunsignal jedoch stark reduziert. Die Vergrößerung eines Ausschnitts aus Abbildung 17 verdeutlicht den Unterschied des $K_{ir}4.1$ -Immunsignals an der Grenze zwischen der grauen und weißen Substanz. Einige Autoren beschreiben, dass eine starke Bindung des CNP-AK an das Zielprotein ggf. das Bindeverhalten anderer AK negativ beeinflussen kann. Ein analoges Färbemuster wurde jedoch auch erhalten, wenn die $K_{ir}4.1$ -Immunfärbung separat durchgeführt wurde (nicht gezeigt, vergleiche auch Kaiser et al. 2006, Abb. 4).

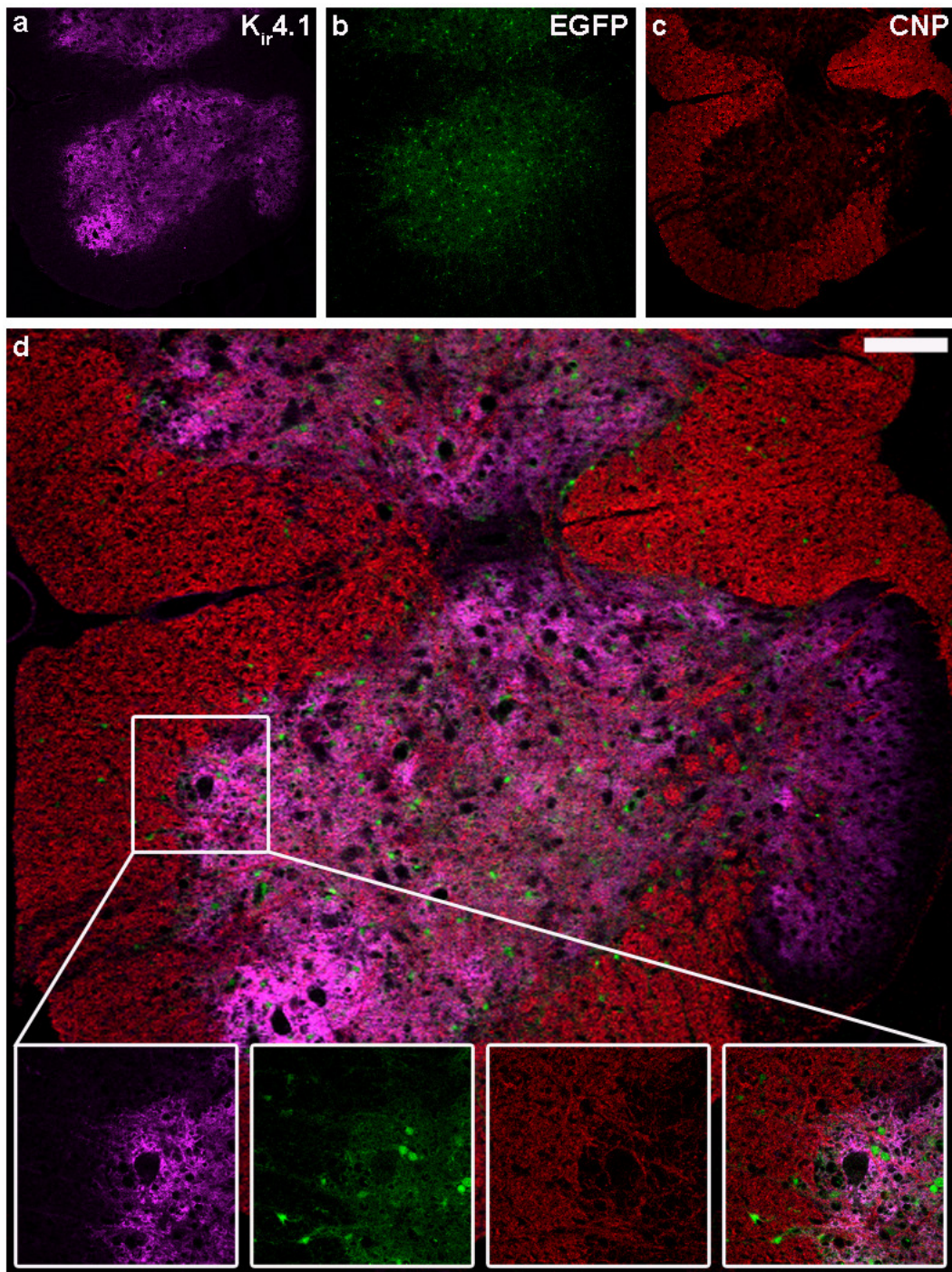


Abb. 17: K_{ir}4.1-Expression im adulten Rückenmark der Maus. (a-d) Im adulten Rückenmark wird das K_{ir}4.1-Protein (a, magenta, Cy5) hauptsächlich im astrozytären Netzwerk (b, grün, EGFP) der grauen Substanz nachgewiesen. In der weißen Substanz, markiert durch eine CNP-Färbung (c, rot, Cy3), wird kaum K_{ir}4.1-Immunsignal detektiert. Die Vergrößerungen zeigen einen Ausschnitt am Übergang zwischen weißer und grauer Substanz aus der Überlagerung (d). Anmerkung: Die CNP-Färbung stellt kompaktes Myelin dar. Zellkörper können nicht markiert werden. Skalierung 100 µm

Neuronale Zellen exprimieren K_{ir}-Kanäle. Bezüglich der Expression der K_{ir}4.1-Kanaluntereinheit in Neuronen gibt es voneinander abweichende Studien (siehe 2.2.2.). Für die weiterführenden Experimente, insbesondere für die Untersuchung der Rolle der K_{ir}4.1-Kanaluntereinheit

bei der Motoneuron-Erkrankung ALS (Abschnitt 5.4.) war es erforderlich zu ermitteln, ob Motoneurone im Rückenmark der Maus immunpositiv oder immunnegativ für $K_{ir}4.1$ sind. Abbildung 18 zeigt den Nachweis des $K_{ir}4.1$ -Proteins im astroglialen Netzwerk, welches spinale Motoneurone eng umschließt, während die Motoneurone selbst keine Färbung für das $K_{ir}4.1$ -Protein aufweisen.

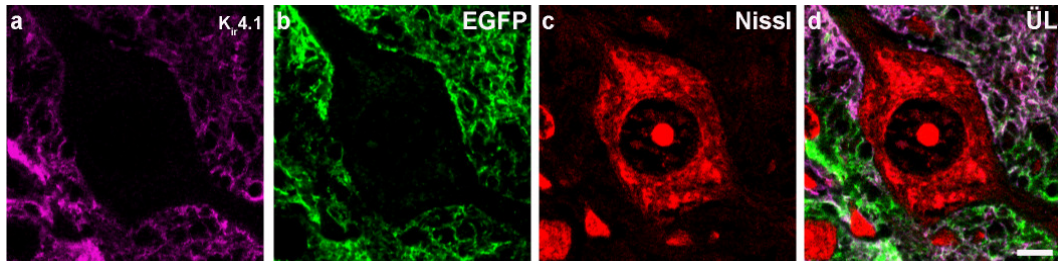


Abb. 18: $K_{ir}4.1$ wird nicht auf Motoneuronen exprimiert. Spinale Motoneurone wurden durch die Nissl-Färbung (c, rot) markiert. Es lässt sich auf Motoneuronen kein Immunsignal für $K_{ir}4.1$ (a, magenta, Cy5) detektieren. Die Motoneurone werden von einem dichten Netzwerk von $K_{ir}4.1$ -immunpositiven astrozytären Fortsätzen (b, grün, EGFP) umgeben. Anmerkung: Die Nissl-Färbung detektiert ebenfalls Zellkerne von Gliazellen, die jedoch aufgrund ihrer geringeren Größe deutlich von den Motoneuronen unterscheidbar sind. ÜL = Überlagerung. Skalierung 10 μ m

Funktional sind $K_{ir}4.1$ -Kanäle sehr wahrscheinlich an der Kaliumpufferung durch Astrozyten beteiligt (siehe 2.2.2). In Korrelation mit dieser postulierten Funktion zeigen hochauflösende Aufnahmen (Abbildung 19; a-c), dass das $K_{ir}4.1$ -Protein verstärkt auf perivaskulären Endfüßen von Astrozyten detektiert werden konnte. Die $K_{ir}4.1$ -Immunfärbung wies dabei das charakteristische punktförmige ('patchy') Färbemuster auf.

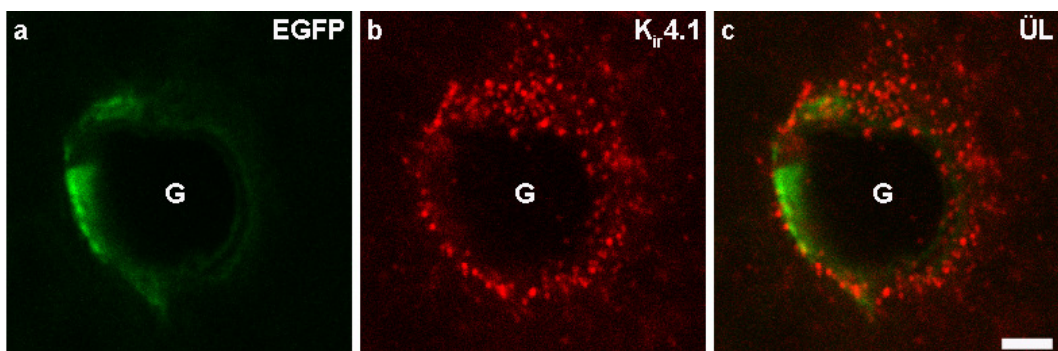


Abb. 19: Detektion des $K_{ir}4.1$ -Proteins auf perivaskulären Endfüßen von Astrozyten im Rückenmark. $K_{ir}4.1$ (b, rot, Cy3) wird auf Fortsätzen von Astrozyten (a, grün, EGFP) exprimiert, die spinale Blutgefäße (G) eng umschließt. Die hochauflösende Darstellung zeigt ein punktförmiges Signal, wobei es sich vermutlich um einzelne Kanalcluster handelt. ÜL = Überlagerung. Skalierung 2 μ m

5.3. Funktionelle Analyse der K_{ir}4.1-Untereinheit in einem Modell für die Schwellung von Gliazellen

Studien an der Retina zeigen, dass eine postischämisch auftretende verminderte Expression von K_{ir}4.1 eine Anschwellung von Müllerzellen auslöst (Pannicke et al., 2004, Iandiev et al., 2006, Reichenbach et al., 2007). K_{ir}4.1 könnte demnach eine Rolle bei der Volumenregulation von Gliazellen spielen. Eine verminderte Expression oder Funktionsfähigkeit des Kanals könnte weiterhin unter pathologischen Bedingungen an Zellanschwellungen oder sogar der Ausbildung von Ödemen beteiligt sein. Das sehr ähnliche Expressionsmuster von K_{ir}4.1 und AQP4 hat zudem zu der Vermutung geführt, dass die (hypothetisierte) Kalium-getriebene Volumenveränderung der Gliazellen durch Wassertransport über AQP4 vermittelt wird (Nagelhus et al., 1999, Higashi et al., 2001, Nagelhus et al., 2004, Oshio et al., 2004, Connors und Kofuji, 2006, Olsen et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst analysiert, ob das Expressionsmuster von K_{ir}4.1 und AQP4 im Rückenmark grundsätzlich eine funktionelle Kopplung vermuten lässt. In einem Modellsystem unter Ausnutzung K_{ir}4.1-defizienter Mäuse wurde weiterhin untersucht, ob die Expression der K_{ir}4.1-Kanaluntereinheit einen Einfluss auf das Schwellungsverhalten von Astrozyten im Rückenmark hat.

5.3.1. Kolokalisierte Expression von K_{ir}4.1 und AQP4

Zunächst wurde ermittelt, auf welchen Zelltypen des Rückenmarks AQP4 exprimiert wird. Aufgrund der leichten experimentellen Handhabung wurden die Untersuchungen zuerst an Zellkulturen durchgeführt. Abbildung 20 (a, c) zeigt, dass Oligodendrozyten *in vitro* immunnegativ für das AQP4-Protein waren, Astrozyten hingegen zeigten ein AQP4-Immunsignal (Abb. 20; b, c). Die AQP4-Immunfärbung verteilte sich relativ gleichmäßig über den gesamten Zellkörper der Astrozyten und zeigte keine erkennbare Häufung. Das Färbemuster von K_{ir}4.1-WT-Tieren unterschied sich nicht von dem von K_{ir}4.1-KO-Tieren. Im Western Blot (Einsatzbild in Abb. 20; h) konnten keine quantitativen Unterschiede in der Menge des AQP4-Proteins zwischen K_{ir}4.1-WT- und K_{ir}4.1-KO-Tieren nachgewiesen werden. Die Inaktivierung des K_{ir}4.1-Gens hatte keine Auswirkung auf die Expression des AQP4-Proteins.

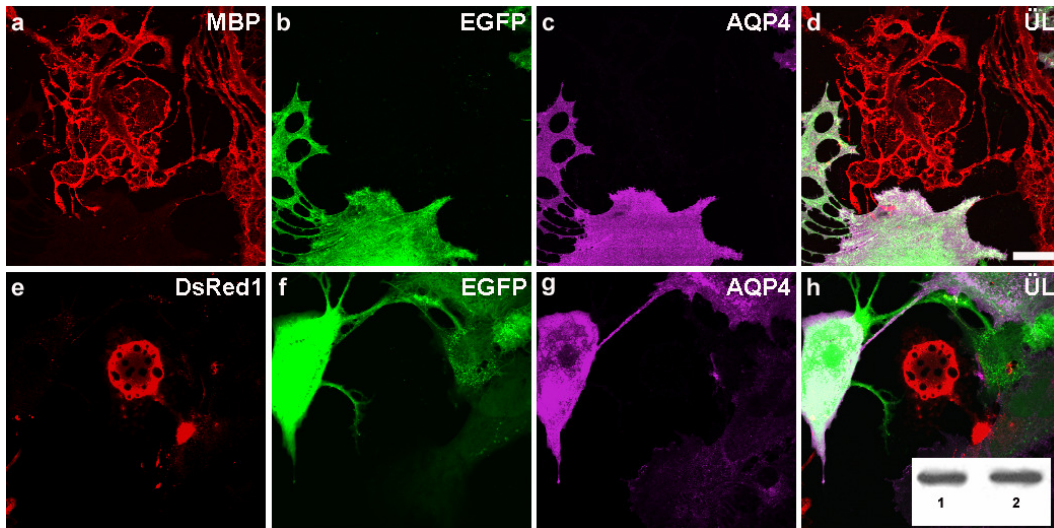


Abb. 20: Die Expression des AQP4-Proteins *in vitro* ist unabhängig von der genetischen Inaktivierung des $K_{ir}4.1$ -Gens. AQP4 (c und g, magenta, Cy5) wird auf Astrozyten (b und f, grün, EGFP) von $K_{ir}4.1$ -WT-Tieren (a-d) als auch von $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren (e-h) detektiert. Oligodendrozyten (a, rot, Cy3 (MBP); e, DsRed1) sind weder in $K_{ir}4.1$ -WT- noch $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren immunpositiv für das AQP4-Protein. Anmerkung: In Kultur exprimieren nicht alle Astrozyten AQP4 (siehe g), dies ist jedoch unabhängig vom $K_{ir}4.1$ -Genotyp. ÜL = Überlagerung. Skalierung 20 μ m. Der Einsatz in (h) zeigt den Nachweis gleichbleibender Proteinmengen in Kulturlysaten von $K_{ir}4.1$ -WT- (Spur 1) und $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren (Spur 2) im Western Blot.

Die funktionellen Untersuchungen der Rolle von $K_{ir}4.1$ im Schwellungsverhalten von Astrozyten wurden in dieser Arbeit im Schnittgewebe durchgeführt. Einleitend wurde beschrieben, dass verschiedene Studien eine funktionelle Kopplung von $K_{ir}4.1$ und AQP4 postulieren. Aus diesem Grund, und weil die Protein-Expression *in vitro* anders als *in situ* verteilt sein kann, wurde im Folgenden eine immunhistologische Untersuchung für das AQP4-Protein an Paraffin- bzw. Kryoschnitten durchgeführt. Im Rahmen dieser Experimente wurde analysiert, ob das $K_{ir}4.1$ -Protein und das AQP4-Protein im Rückenmark der Maus kolokalisieren.

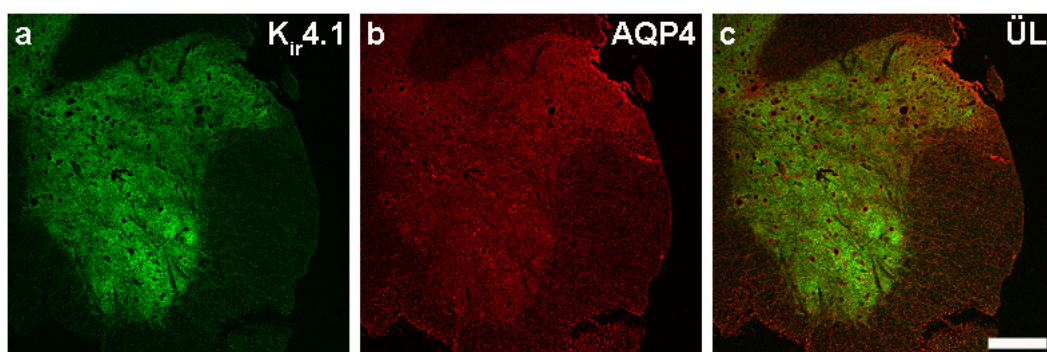


Abb. 21: Kolokalisierte Expression des $K_{ir}4.1$ -Proteins und des AQP4-Proteins im Rückenmark der Maus. In Kryoquerschnitten des Rückenmarks (P14) werden Immunsignale für $K_{ir}4.1$ (a, grün, ALEXA488) und AQP4 (b, rot, Cy3) vorwiegend in der grauen Substanz detektiert. Die Überlagerung (c) zeigt, dass beide Membranproteine kolokalisiert sind. ÜL = Überlagerung. Skalierung 200 μ m

Abbildung 21 zeigt eine Doppelfärbung für $K_{ir}4.1$ und AQP4 im Rückenmarksgewebe. Beide Proteine waren verstärkt in der grauen Substanz lokalisiert, in der Überlagerung erkennt man das überlappende Expressionsmuster beider Proteine. Dieses Muster fand sich auch in adulten Tieren (siehe auch Abb. 22).

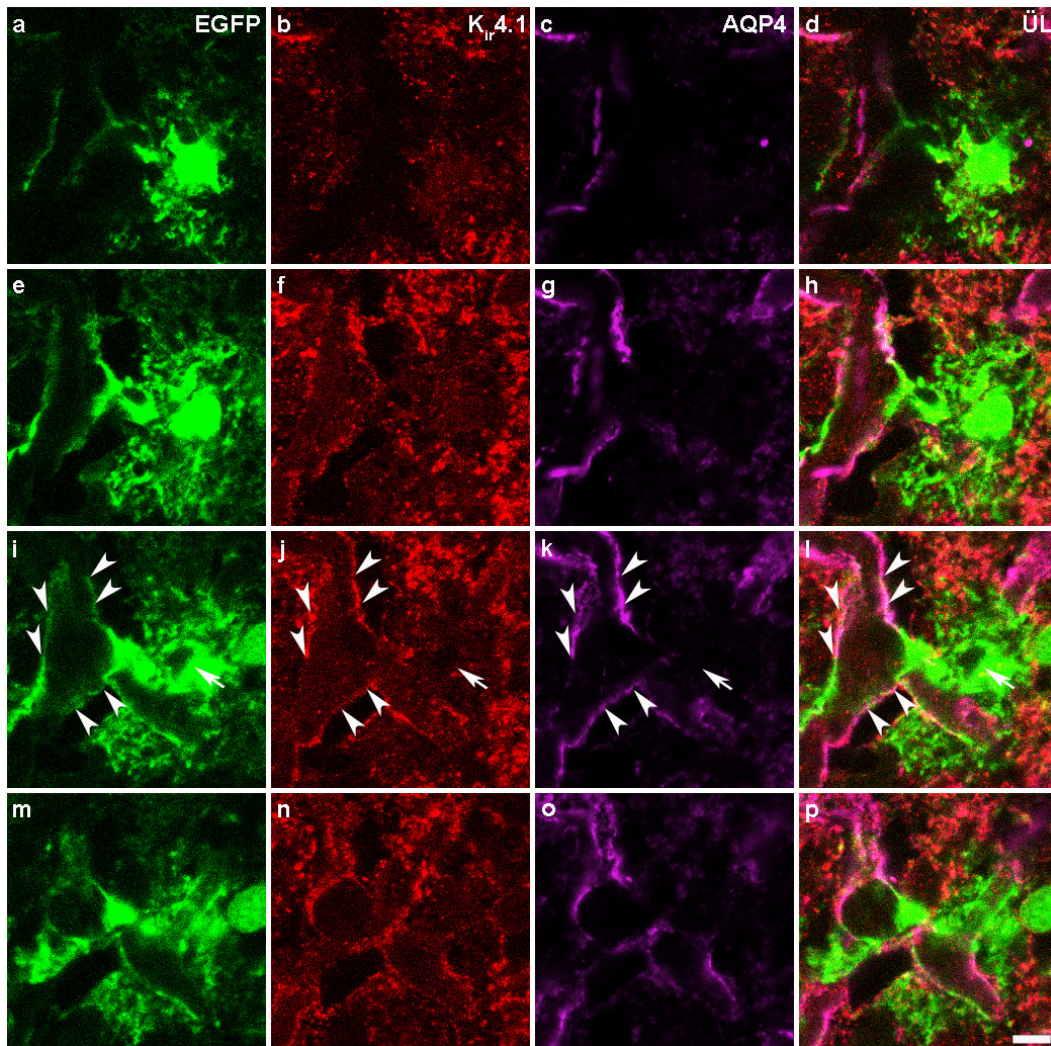


Abb. 22: Subzelluläre Verteilung von $K_{ir}4.1$ und AQP4 im adulten Ventralhorn der Maus. Das $K_{ir}4.1$ -Protein (rot, Cy3) wird wie das AQP4-Protein (magenta, Cy5) verstärkt auf den Fortsätzen von Astrozyten (grün, EGFP) nachgewiesen, die Blutgefäße umschließen. In der Überlagerung (d, h, l, p) ist erkennbar, dass die Expression beider Proteine weitgehend überlappend ist (siehe Pfeilspitzen in i-l). Auf dem Zellkörper sind $K_{ir}4.1$ -Kanäle und AQP4-Kanäle nur schwach exprimiert (Pfeile in i-l). Abstand zwischen den konfokalen Ebenen je 2 μm . ÜL = Überlagerung. Skalierung 5 μm

In Abbildung 22 ist die Vergrößerung einer Immundetektion des $K_{ir}4.1$ -Proteins und des AQP4-Proteins auf einem Astrozyten in Kontakt mit einem Blutgefäß im Ventralhorn des Rückenmarks der Maus gezeigt. Es handelt sich dabei um die Darstellung mehrerer konfokaler Ebenen über einen Bereich von insgesamt 6 μm . Das $K_{ir}4.1$ -Immunsignal zeigte im Gewebe das charakteristische diffuse, punktförmige Färbemuster. Sowohl

K_{ir}4.1 als auch AQP4 wurden verstärkt auf den Zellfortsätzen von Astrozyten detektiert, die das Blutgefäß umschließen. In den überlagerten Aufnahmen ist eine starke Überlappung beider Signale erkennbar. In der Abfolge der konfokalen Ebenen ist weiterhin ersichtlich, dass der Zellkörper weitgehend frei von einer Expression beider Proteine war.

Zudem wurde analysiert, ob die Inaktivierung des K_{ir}4.1-Gens in K_{ir}4.1-KO-Tieren eine Auswirkung auf die Expression oder die Membraninsertion des AQP4-Proteins hat. *In situ* hat die fehlende Expression des K_{ir}4.1-Proteins keinen Einfluss auf die Membranexpression von AQP4 in Astrozyten (Abb. 23; d-f, siehe auch Dibaj et al., 2007, Abb. 4; b-g). Das AQP4-Protein wurde ebenfalls in K_{ir}4.1-KO-Tieren verstärkt auf (astrozytären) Fortsätzen in engem Kontakt mit Blutgefäßen nachgewiesen. Des Weiteren waren die Proteinmengen des AQP4-Proteins in Rückenmarkslysaten von K_{ir}4.1-KO-Tieren und K_{ir}4.1-WT-Tieren identisch. Dieses Ergebnis bildet die Grundlage für die Aussage, dass die im folgenden Modell gewonnenen Daten nicht auf eine veränderte Expression des AQP4-Proteins zurückzuführen sind. Rückschlüsse hinsichtlich der Funktionalität von AQP4 können aus den Daten nicht gezogen werden.

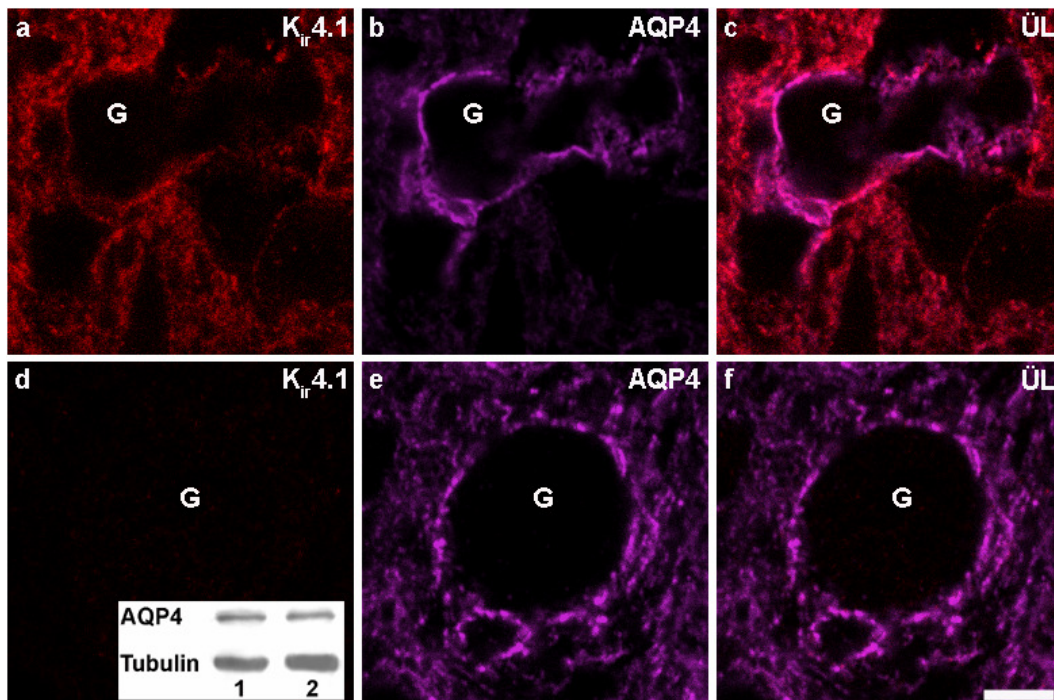


Abb. 23: Die Expression von AQP4 auf astrozytären Fortsätzen ist unabhängig vom K_{ir}4.1-Genotyp *in situ*. Nachweis von AQP4 (b, e, magenta, Cy5) und K_{ir}4.1 (a, d, rot, Cy3) auf Kryoschnitten von K_{ir}4.1-WT- (a-c) und K_{ir}4.1-KO-Tieren (d-f) und proteinbiochemische Analyse des AQP4-Proteins (Einsatzbild in d). In K_{ir}4.1-KO-Tieren wird AQP4 unverändert im Bereich von Blutgefäßen exprimiert (e und f). Das Einsatzbild in (d) zeigt keine quantitativen Unterschiede zwischen der AQP4-Proteinmenge in K_{ir}4.1-KO-Tieren (Spur 2) und K_{ir}4.1-WT-Tieren (Spur 1). Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. G = Gefäß. UL = Überlagerung. Skalierung 5 μm

5.3.2. Rolle von $K_{ir}4.1$ im Schwellungsverhalten von Astrozyten im Rückenmark

Das zelluläre Ödem im Rückenmark ist vorwiegend durch eine Zellanschwellung von Gliazellen gekennzeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Anschwellung von Astrozyten durch die Gabe einer hypotonen Extrazellulärlösung experimentell simuliert. Dieses Modellsystem wurde bereits 2004 von Pannicke et al. in der (postischämischen) Retina angewendet. Es wurden Lebendquerschnitte aus dem Ventralhorn des zervikalen Rückenmarks von $K_{ir}4.1$ -WT- und $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren angefertigt und mittels 2-PLSM vergleichend analysiert.

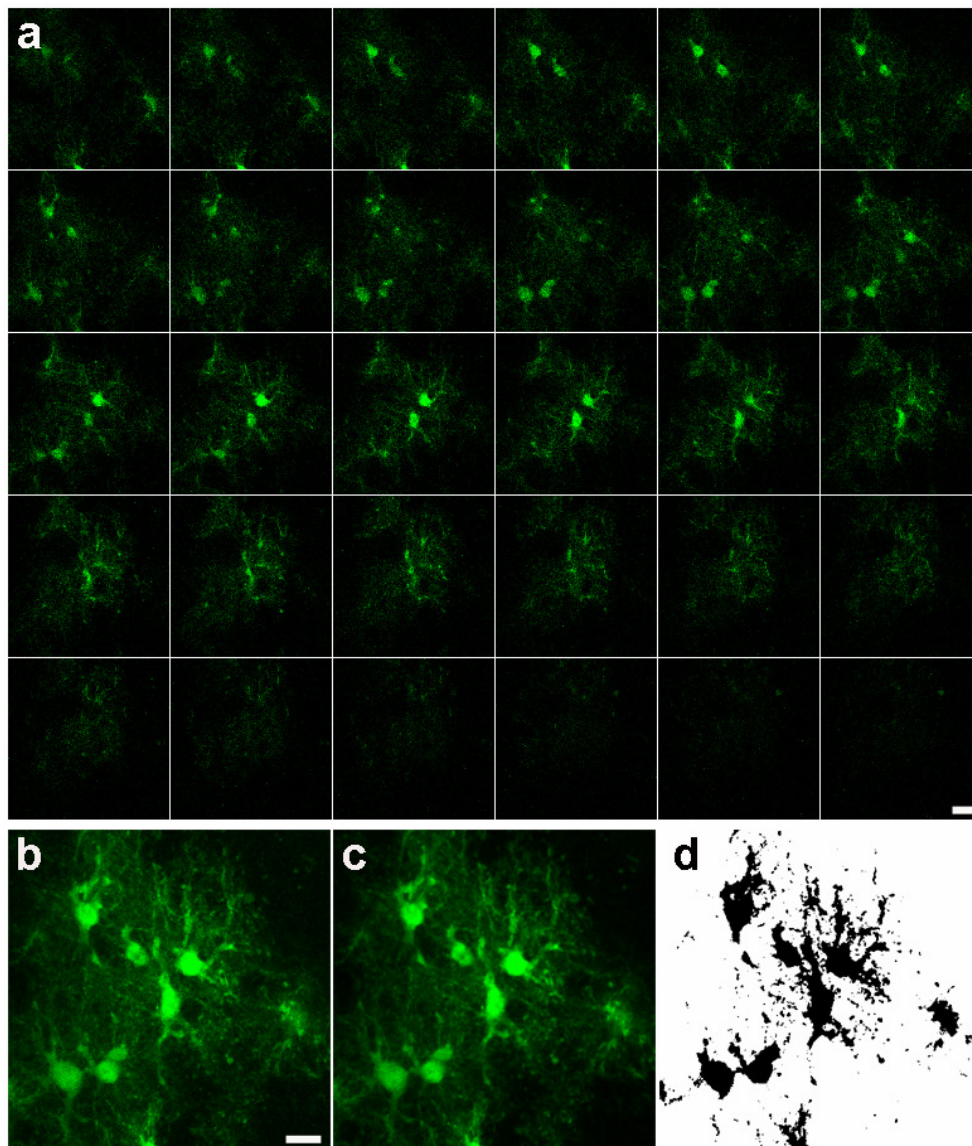


Abb. 24: Exemplarische Darstellung der Datenbearbeitung der Schwellungsexperimente. In der Abfolge der Einzelbilder (a) sind 30 Einzelebenen einer Messung unter normosmolaren Bedingungen gezeigt. (b) stellt die MIP dieser Ebenen dar, in (c) ist die MIP nach dem Filterungsprozess dargestellt. (d) zeigt die verbleibende Information als schwarz/weiß Darstellung nach Setzung einer automatischen Schwelle durch das Programm Image J. Skalierung 10 μm

In Abbildung 24 ist eine exemplarische Auswertung eines Bildstapels dargestellt. 30 Einzelebenen (für die Auswertung wurden in der Regel 32 Ebenen verwendet) wurden zu einer MIP (Abb. 24; b) überlagert, die mit dem Programm Image J gefiltert (Abb; 24, c) wurde. Die überschwelligen Signale lieferten die Basis (Abb. 24; d) für die quantitative Auswertung.

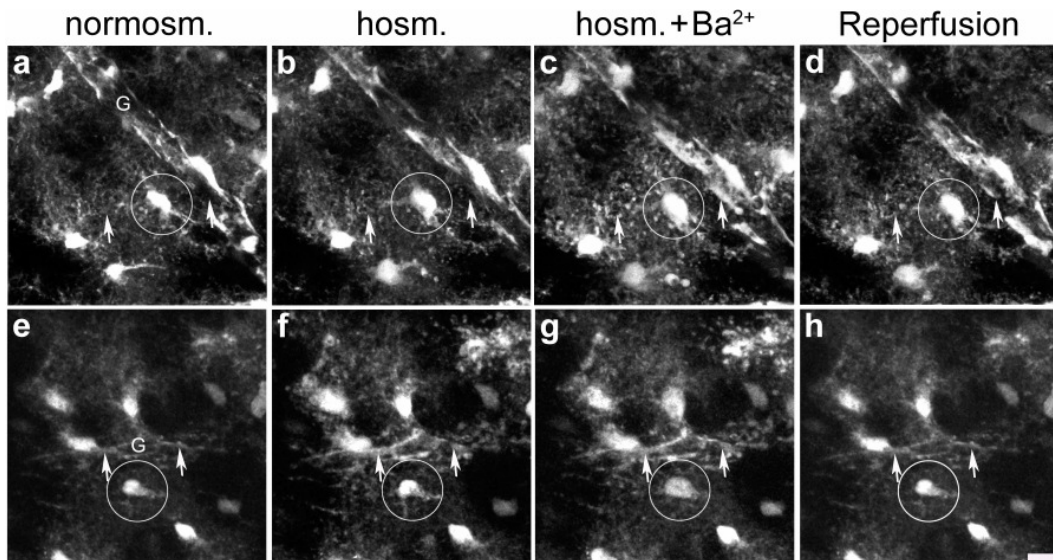


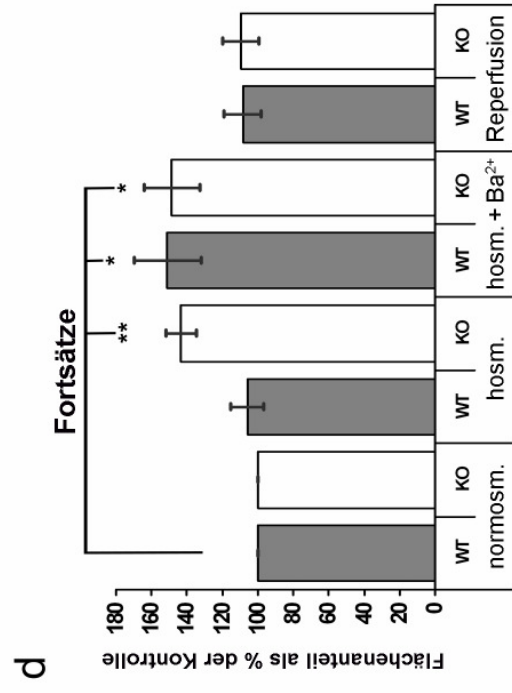
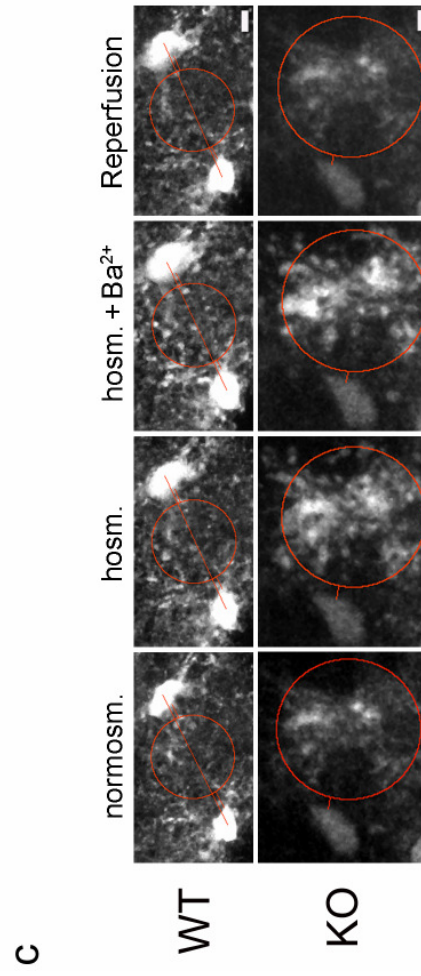
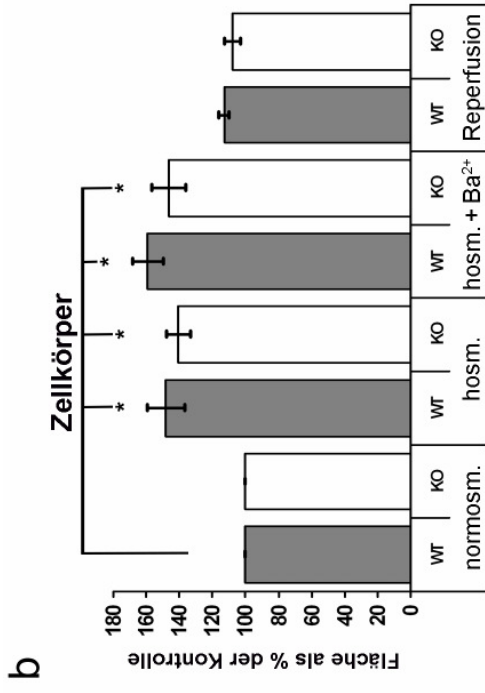
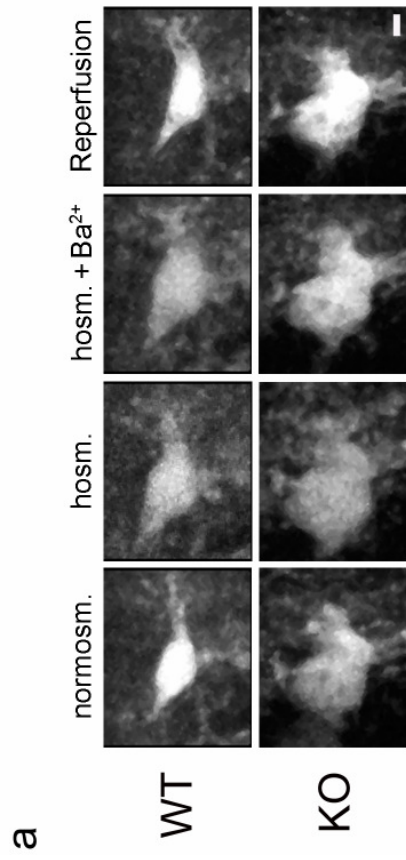
Abb. 25: Darstellung des Schwellungsverhaltens von Astrozyten nach hypoosmolarem osmotischem Stress. MIP nach 20 Minuten Lösungsapplikation. Die Superfusion mit hypoosmolarer Extrazellulärlösung löst in $K_{ir}4.1$ -WT-Tieren (a-d) eine Anschwellung des Zellsomas (b) und in $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren (e-f) **zusätzlich** eine Aufschwellung der glialen Fortsätze (f) aus. Eine Blockade mit Barium ($100 \mu\text{M}$) unter hypoosmolaren Bedingungen bewirkt eine Fluoreszenzzunahme in den Fortsätzen der Astrozyten von $K_{ir}4.1$ -WT-Tieren (c) auf ein vergleichbares Niveau wie in der $K_{ir}4.1$ -KO-Maus unter (f) beobachtet wurde, während das astrozytäre Netzwerk von $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren (g) keine weitere Zunahme der Fortsatzschwellung zeigt. (d, h) Sowohl in $K_{ir}4.1$ -WT- als auch $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren sind die Anschwellungen durch Superfusion mit normosmolarer Lösung reversibel. Zellkörper sind durch Kreise, Fortsätze durch Pfeile hervorgehoben. normosm. = normosmolar, hosm. = hypoosmolar, Skalierung $30 \mu\text{m}$

In den Übersichtsaufnahmen in Abbildung 25 sind MIP der erfassten Bildserien für $K_{ir}4.1$ -WT- und $K_{ir}4.1$ -KO-Tiere veranschaulicht. Dargestellt sind die Ergebnisse nach jeweils 20 Minuten Superfusion mit den jeweiligen Lösungen. Unter normosmolaren Bedingungen konnte über einen Zeitverlauf von 10 Minuten keine Schwellung beobachtet werden. Applikation von hypoosmolarer Lösung führte bereits nach wenigen Minuten (maximal 5, nicht gezeigt) zu einem Aufschwellen der astrozytären Zellkörper sowohl von $K_{ir}4.1$ -WT- als auch $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren. Astrozyten $K_{ir}4.1$ -defizienter Mäuse zeigten unter diesen Bedingungen **zusätzlich** eine Schwellung der astrozytären Fortsätze. Die zeitgleiche Applikation von hypoosmolarer Lösung und Barium bewirkte in $K_{ir}4.1$ -WT-Astrozyten eine Zunahme der Fluoreszenz im astrozytären Netzwerk, die

vergleichbar mit der Reaktion von $K_{ir}4.1$ -KO-Astrozyten auf hypoosmolare Lösung ohne Bariumblockade war. Bei Astrozyten aus $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren bewirkte die zusätzliche Blockade durch Barium keinen weiteren Anstieg des Fluoreszenzsignals. Die Zellanschwellungen waren durch eine 10-minütige Reperfusion mit normosmolarer Lösung vollständig reversibel.

In Abbildung 26 sind die Größenveränderungen der astrozytären Zellkörper und Somata vergrößert und separat gezeigt. Das Schwellungsverhalten der Zellen unter den verschiedenen osmotischen und pharmakologischen Bedingungen wurde statistisch einzeln für die Somata und Fortsätze analysiert. Unter hypoosmolaren Bedingungen kam es zu einer ca. 40%igen Größenzunahme der astrozytären Zellkörper sowohl von $K_{ir}4.1$ -WT- als auch $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren, die sich signifikant vom Kontrollwert ($K_{ir}4.1$ -WT-Astrozyten unter normosmolaren Bedingungen) unterschied. Die gleichzeitige Gabe von Barium und hypoosmolarer Lösung führte bei beiden Testgruppen nicht zu einer weiteren signifikanten Veränderung der Somagröße. Die Reperfusion mit normosmolarer Lösung bewirkte unabhängig vom $K_{ir}4.1$ -Genotyp der Astrozyten eine Rückkehr zum Kontrollniveau. Im Gegensatz zu den Fortsätzen von $K_{ir}4.1$ -WT-Tieren zeigten die Fortsätze von $K_{ir}4.1$ -KO-Astrozyten eine ca. 40%ige Anschwellung unter hypoosmolaren Bedingungen, die signifikant unterschiedlich vom Kontrollzustand war. Wurde Barium zusammen mit hypoosmolarer Lösung gegeben, so kam es auch in $K_{ir}4.1$ -WT-Tieren zu einer signifikanten Aufschwellung der astrozytären Zellfortsätze. Bei den astrozytären Fortsätzen von $K_{ir}4.1$ -defizienten Tieren hatte die Applikation von Barium keinen weiteren steigernden Effekt auf die Schwellung. Die statistische Analyse zeigte weiterhin, dass die Größenveränderungen durch eine Reperfusion mit normosmolarer Lösung fast vollständig reversibel waren.

Abb. 26: Schwellung der Zellkörper und Fortsätze von Astrozyten aus dem ventralen Rückenmark in Abhängigkeit vom $K_{ir}4.1$ -Genotyp. Exemplarische Darstellung des Schwellungsverhaltens eines Astrozytenzellkörpers (a) sowie des astrozytären Netzwerks (c). Die Auswertung in (b) zeigt eine signifikante Schwellung astrozytärer Zellkörper nach Applikation hypoosmolarer Lösung in gesunden und $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren, die durch gleichzeitige Gabe von Barium nicht zunimmt. $K_{ir}4.1$ -KO-Tiere zeigen nach hypoosmolarem osmotischem Stress zudem eine signifikante Fluoreszenzzunahme im astrozytären Netzwerk, die in gesunden Tieren nur durch eine zusätzliche Applikation von Barium erreicht werden kann. Fallzahl Zellkörper = 8, Fortsätze = 12. Angabe der Werte als Mittelwert \pm Standardfehler. Als Kontrollbedingung wurde der Status unter normosmolaren Bedingungen (als 100% gesetzt) gewählt und die Ergebnisse als % der Kontrollbedingung dargestellt. Der umrandete Bereich in (c) stellt den definierten Analysebereich für die statistische Auswertung in (d) dar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$. Für die statistische Auswertung der Mittelwerte aus den gebildeten Paaren wurde der Student's t-Test ('paired T-Test') verwendet und nachfolgend die verschiedenen Gruppen mit ANOVA analysiert. normosm. = normosmolar, hosm. = hypoosmolar



5.4. Analyse von $K_{ir}4.1$ in einem chronischen ALS-Krankheitsmodell

ALS ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung des motorischen Systems, die derzeit nicht heilbar ist. Es existieren familiäre Formen der ALS, die mit Mutationen des Gens für die SOD1 (Rosen et al., 1993) verbunden sind. Es ist nicht hinreichend bekannt, wie diese Mutationen zur Entstehung von ALS führen können. Jedoch ist erwiesen, dass die alleinige Expression einer mSOD1 in Motoneuronen nicht ausreichend ist, um eine Degeneration von Motoneuronen auszulösen (Pramatarova et al., 2001, Lino et al., 2002). Vermutlich kommt es zu einer Beeinträchtigung der Neuron-Glia Interaktion, in deren Folge die Motoneurone degenerieren. Astrozyten, die mit ihren Ausläufern die Synapsen der Neurone eng umgeben, stehen in vielseitiger Wechselwirkung mit Neuronen. Es gibt überzeugende Hinweise, dass $K_{ir}4.1$ in Astrozyten an der Kaliumpufferung beteiligt ist. Eine verminderte Expression oder Funktionsbeeinträchtigung von $K_{ir}4.1$ könnte zu einer extrazellulären Kaliumerhöhung führen, die wiederum mit dem Tod von Motoneuronen in der ALS assoziiert sein könnte.

Es gibt verschiedene mSOD1-transgene (mSOD1, mutierte SOD1) Tiermodelle zur Analyse der SOD1-assoziierten familiären Formen der ALS. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde das Tiermodell der SOD1^{G93A}-Maus verwendet. In diesem Tiermodell kommt es im Gegensatz zum Krankheitsverlauf beim Menschen zunächst zu einer Beeinträchtigung der hinteren Extremitäten, weshalb die Untersuchung der lumbalen Abschnitte des Rückenmarks im Vordergrund der Versuche dieser Arbeit stand. In verschiedenen Experimenten wurde ermittelt, ob es immunhistochemisch und/oder proteinbiochemisch zu einer Veränderung der $K_{ir}4.1$ -Expression kommt. In einem *in vitro* Kultursystem wurde weitergehend untersucht, ob eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration zu einer Beeinflussung der Überlebensfähigkeit von Motoneuronen führt.

5.4.1. Expression von $K_{ir}4.1$ im Rückenmark und Kleinhirn in Abhängigkeit von der Schwere des Erkrankungsgrades

Zur Analyse der Expression des $K_{ir}4.1$ -Proteins wurden Paraffinquerschnitte von 8 μm Dicke aus lumbalen Regionen des Rückenmarks hergestellt. Diese wurden nach Standardprotokollen mit

dem anti-K_{ir}4.1-AK behandelt. Es wurden mindestens 10 Schnitte für die jeweiligen Krankheitsstadien mit den respektiven Kontrollen verglichen. In der grauen Substanz des Ventralhorns von ntg-SOD1^{G93A}-Tieren konnte eine starke Immunreaktivität für das K_{ir}4.1-Protein detektiert werden. Früh symptomatische SOD^{G93A}-Tiere zeigten eine leichte Reduktion der Expression von K_{ir}4.1 in der grauen Substanz des Ventralhorns, während die Expression im Dorsalhorn unverändert blieb (Abb. 27; b, e). Im Endstadium ist im Ventralhorn der Tiere eine starke Abnahme der Immunreaktivität für K_{ir}4.1 zu verzeichnen, während das Dorsalhorn schwächer betroffen ist (Abb. 27 c, f). Um abzusichern, dass es sich bei dem Ergebnis nicht um eine artifizielle Färbung durch den verwendeten Antikörper handelte, wurden Kontrolluntersuchungen an Schnitten der gleichen Tiere (und anderer) mit einem nicht-kommerziellen anti-K_{ir}4.1-AK (Kofuji et al., 2000) entsprechend des Standardprotokolls durchgeführt. Mit diesem Antikörper konnten die Ergebnisse reproduziert werden (Abb. 27; g). Zusätzlich wurde untersucht, ob die reduzierte Expression des K_{ir}4.1-Proteins mit der Krankheitsdynamik im Ventralhorn assoziiert ist oder auch in unbetroffenen Hirnregionen auftritt. Dazu wurden Paraffinschnitten vom Kleinhirn von gesunden Tieren und Tieren im Endstadium der Erkrankung hergestellt und analysiert. Es konnte kein nennenswerter Expressionunterschied von K_{ir}4.1 zwischen ntg-SOD1^{G93A}-Mäusen und SOD1^{G93A}-Tieren im Endstadium der Erkrankung gezeigt werden (Abb. 27; h, i).

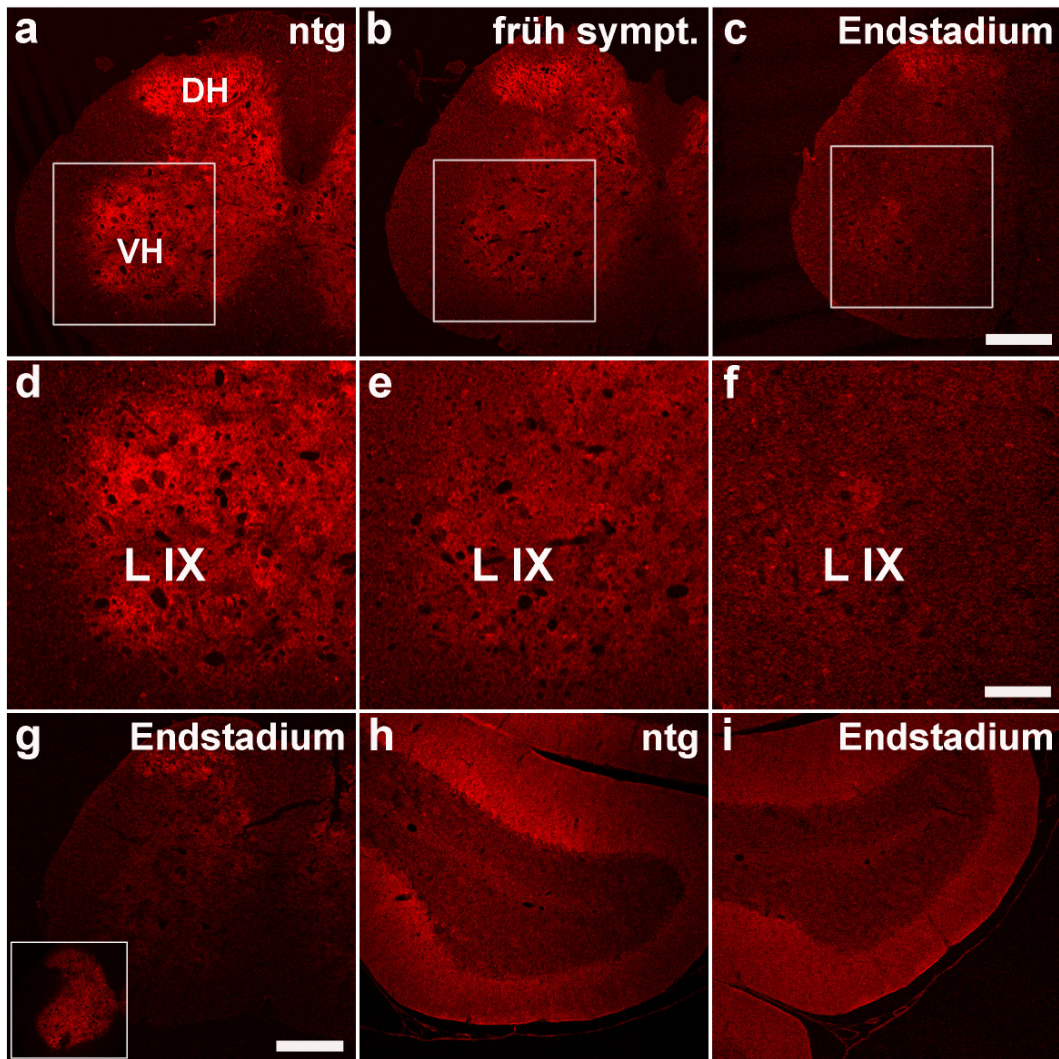


Abb. 27: K_{ir}4.1-Expressionsanalyse in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium. Gesunde Tiere zeigen eine starke Immunreaktivität für K_{ir}4.1 in der grauen Substanz (a) des Lumbalmarks. Im Krankheitsverlauf (b, c) kommt es zu einer zunehmenden Reduktion der K_{ir}4.1-Expression im Ventralhorn (VH), während das Dorsalhorn (DH) auch noch im Endstadium (c) K_{ir}4.1-immunpositiv ist. (d-e) Vergrößerte Ausschnitte aus dem Ventralhorn im Bereich der Lamina IX (L IX) verdeutlichen die sukzessive Expressionsabnahme der punktförmigen K_{ir}4.1-Immunfärbung. (g) Reproduktion des Ergebnisses mit einem nicht-kommerziellen anti-K_{ir}4.1-AK. Das Einsatzbild zeigt die Färbung im gesunden Tier. (h-i) Im Kleinhirn kommt es bei der Erkrankung nicht zu einer Expressionsreduktion des K_{ir}4.1-Proteins. Es wurden mindestens 10 Schnitte für die jeweiligen Krankheitsstadien im Rückenmark und jeweils 3 Schnitte aus dem Kleinhirn analysiert. ntg = ntg-SOD1^{G93A}, sympt. = symptomatisch, Skalierung 200 µm (a-c, g), 100 µm (d-f, h, i)

5.4.2. Reduktion der K_{ir}4.1-Proteinmenge in SOD1^{G93A}-Tieren

Mittels einer proteinbiochemischen Analyse durch Western Blots von Lysaten aus Rückenmarksgewebe wurde die in der Immunhistochemie nachgewiesene Reduktion der K_{ir}4.1-Proteinmenge (semi)-quantitativ erfasst. Gleichzeitig sollte mit diesem Ansatz genauer charakterisiert werden, ob der Grad der Proteinreduktion in Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung steht. Weiterhin wurde untersucht, ob es zur

Reduktion der monomeren oder multimeren Untereinheiten des Kanals kommt.

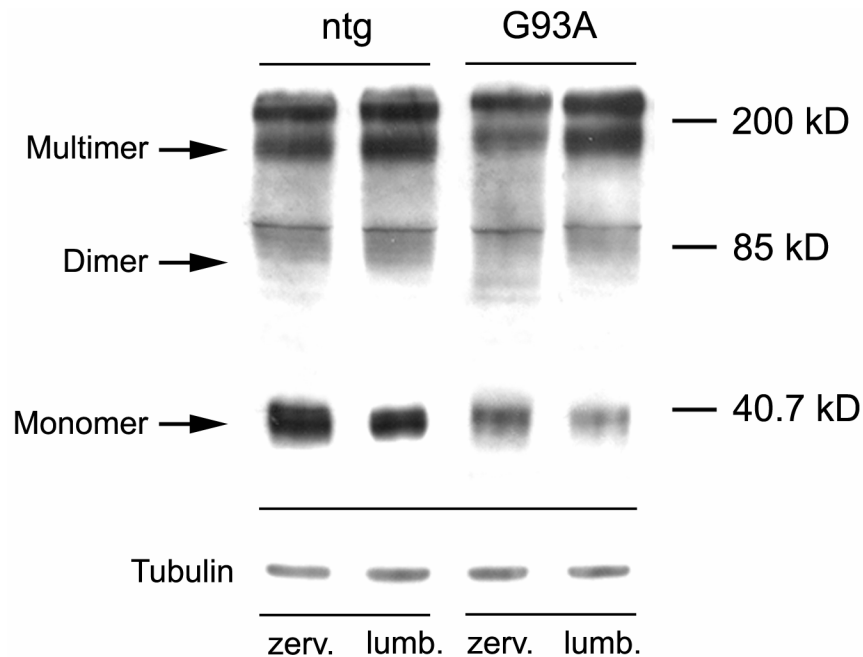


Abb. 28: Proteinbiochemische Analyse der K_{ir}4.1-Proteinmenge in Rückenmarkslysaten. Im Zervikalmark und im Lumbalmark kommt es bei 120 Tage alten SOD1^{G93A}-Tieren zu einer Reduktion des K_{ir}4.1-Monomers. Tubulin diente als Ladekontrolle. ntg = ntg-SOD1^{G93A}-Tiere, G93A = SOD1^{G93A}-Tiere, zerv. = zervikal, lumb. = lumbal

Abbildung 28 zeigt eine vergleichbare Abnahme der Menge des K_{ir}4.1 Monomers sowohl im Zervikal- als auch im Lumbalmark in adulten SOD1^{G93A}-Tieren im Vergleich zu gesunden ntg-SOD1^{G93A} Kontrolltieren. Die erkennbare leichte Reduktion von höhermolekularen Komplexen im Zervikalmark konnte über eine größere Fallzahl sowohl im Zervikalmark als auch im Lumbalmark als nicht signifikant nachgewiesen werden. Für weitere Analysen wurden im Folgenden Lysate des lumbalen Rückenmarks untersucht.

Es wurde überprüft, ob die Reduktion der K_{ir}4.1-Menge ursächlich mit der Mutation des SOD1-Gens in Verbindung steht oder durch die Überexpression des SOD1-Proteins ausgelöst wird (wt-SOD1-Kontrolle). Hierzu wurden Proteinlysate aus dem lumbalen Rückenmark von adulten (100-120 Tage alten) wt-SOD1-Tieren, ntg-SOD1^{G93A}-Tieren und SOD^{G93A}-Tieren miteinander verglichen (Abb. 29; a, b). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Menge des K_{ir}4.1-Proteins in wt-SOD1 Tieren und ntg-SOD1^{G93A}-Tieren nicht signifikant unterschiedlich ist. Die quantitative Auswertung der Ergebnisse belegt, dass die K_{ir}4.1-

Proteinmenge bei Tieren im Krankheitsendstadium im Vergleich zu wt-SOD1- und ntg-SOD1^{G93A}-Tieren um ca. 60-70 % reduziert ist.

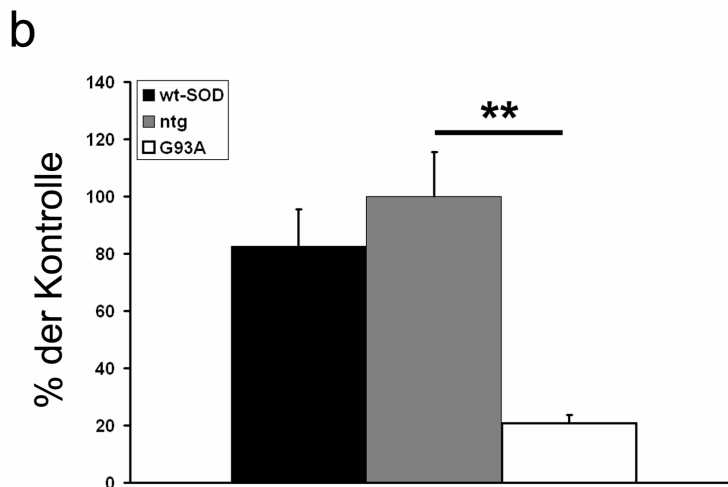
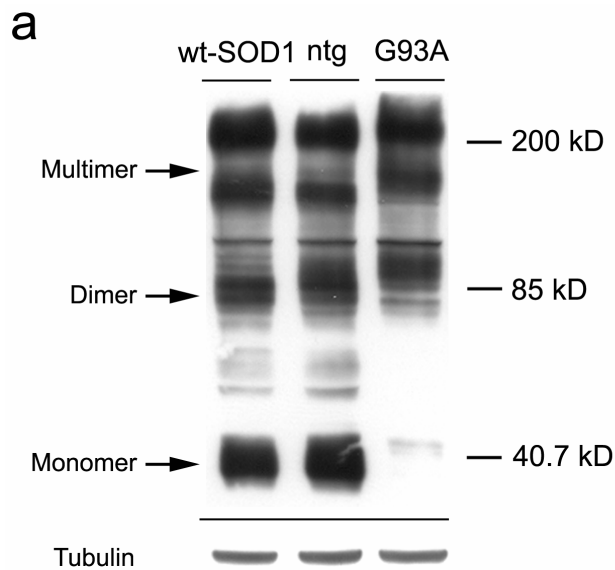


Abb. 29: Die Abnahme der K_{ir}4.1-Proteinmenge ist nicht durch die ubiquitäre Expression des SOD1-transgenen Proteins bedingt. (a) K_{ir}4.1-Proteinmenge im lumbalen Rückenmark von wt-SOD1-, ntg-SOD1^{G93A}- und SOD1^{G93A}-Tieren. (b) Quantitative Auswertung von (a). Die K_{ir}4.1-Proteinmengen von wt-SOD1-Tieren und ntg-SOD1^{G93A}-Tieren zeigen keinen wesentlichen Unterschied, während die Menge an K_{ir}4.1 in SOD1^{G93A}-Tieren signifikant unterschiedlich zur Kontrollsituation ist. Fallzahl = 3. Die Kontrolle (ntg) wurde 100% gesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. **p < 0.01 (ANOVA mit *Newman-Keuls-Test*). Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet, ntg = ntg-SOD1^{G93A}, G93A = SOD1^{G93A}

ALS ist eine fortschreitende Erkrankung. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die beobachtete Reduktion des K_{ir}4.1-Proteins mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Da der höhermolekulare Bereich biochemisch schwer aufzulösen ist, wurde für die quantitative densitometrische Analyse die Reduktion des Monomers erfasst. Dies

entspricht der experimentellen Vorgehensweise einer früheren Publikation zur GLUT1-Expression (Howland et al., 2002). In asymptotischen SOD1^{G93A}-Tieren (Alter 30-60 Tage) konnte keine signifikante Reduktion des K_{ir}4.1-Monomers (Abb. 30; a, b) nachgewiesen werden. Präsymptomatische Tiere (Alter 80-90 Tage) hingegen zeigten eine Reduktion des K_{ir}4.1-Monomers. Bei früh symptomatischen, spät symptomatischen und Tieren im Endstadium kam es zu einer deutlichen Abnahme der K_{ir}4.1-Proteinmenge um bis zu ca. 70%. Die quantitative Auswertung der Ergebnisse bestätigt eine fortschreitende Abnahme der K_{ir}4.1-Proteinmenge im lumbalen Rückenmark von SOD1^{G93A}-Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren.

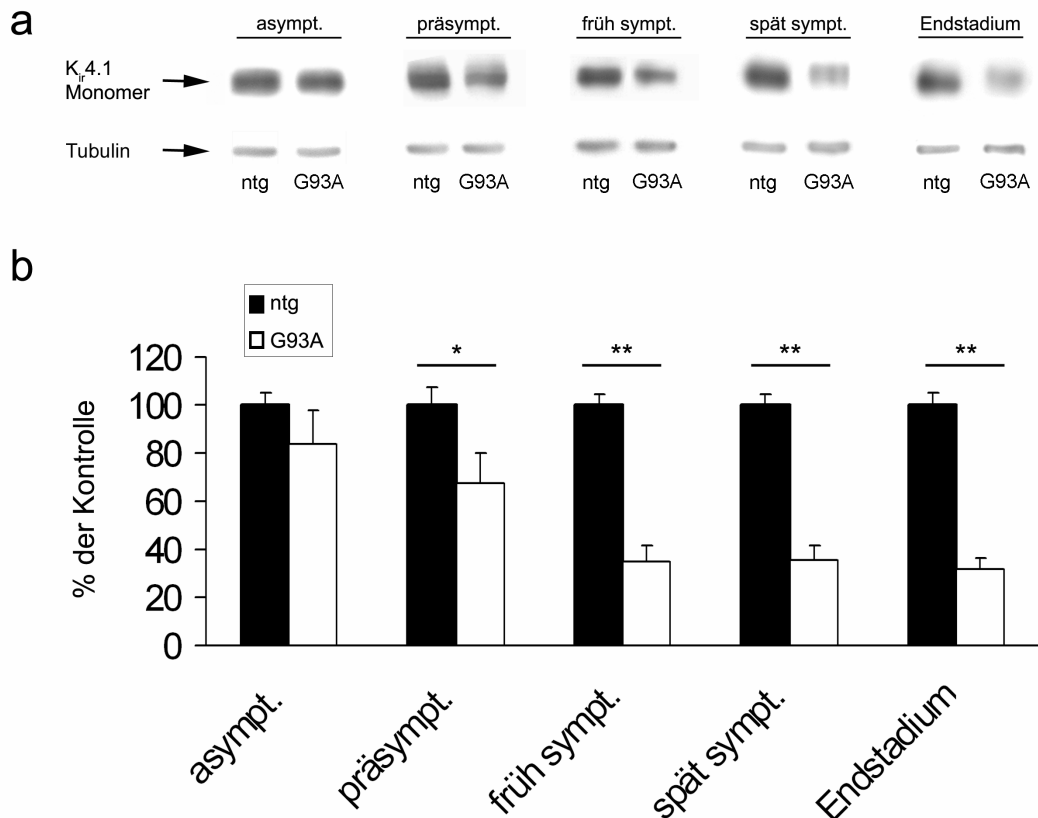


Abb. 30: Voranschreitende Reduktion des K_{ir}4.1-Proteins im Krankheitsverlauf. (a) Die Western Blot Analyse zeigt, dass die Abnahme der Menge des K_{ir}4.1-Proteins mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. n = 3 (asympt., präsympt., spät sympt.), n = 9 (früh sympt., Endstadium). (b) Quantitative Analyse der Proteinreduktion. Bereits vor Beginn der phänotypischen Symptomatik kommt es zu einer signifikanten K_{ir}4.1-Proteinreduktion, im Endstadium ist die Menge an K_{ir}4.1 im Vergleich zu gesunden Tieren bis zu ca. 70% reduziert. Für die densitometrische Auswertung wurden ausschließlich die Banden des K_{ir}4.1-Monomers aus lumbalen Proben verwendet. Es wurden die Werte von mindestens drei verschiedenen Experimenten auf einer Membran gemittelt. Die Kontrolle (ntg) wurde 100% gesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. *p < 0.05, **p < 0.01 (Anova mit Newman-Keuls Test). ntg = ntg-SOD1^{G93A}, G93A = SOD1^{G93A}, asympt. = asymptotisch, sympt. = symptomatisch.

5.4.3. Analyse der Proteinmengen der astrozytären Proteine GFAP und AQP4

Eine Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen ist mit einer reaktiven Astroglieose verbunden. Im Rahmen dieser Reaktion verändern Astrozyten sowohl ihre Morphologie als auch ihren Metabolismus und erfüllen vermutlich z.T. andere Funktionen als im gesunden Gewebe. Es wäre denkbar, dass die Expression von Membranproteinen in reaktiven Astrozyten generell verändert ist. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich die Proteinexpression der astrozytären Proteine GFAP sowie AQP4 als weitere Marker für adulte Astrozyten in Abhängigkeit vom Erkrankungsgrad untersucht. AQP4 wird im Rückenmark überwiegend auf Astrozyten exprimiert. Es konnte eine Zunahme des GFAP-Proteins in erkrankten Tieren gezeigt werden, was für eine reaktive Astroglieose spricht. Die Expression von AQP4 stieg mit zunehmendem Erkrankungsgrad ebenfalls leicht an. Dies belegt, dass gliale Zellen weiterhin und in unverändertem Maß AQP4-Membranproteine exprimieren und unterstützt einen spezifischen Verlust von Kir4.1-Proteinen.

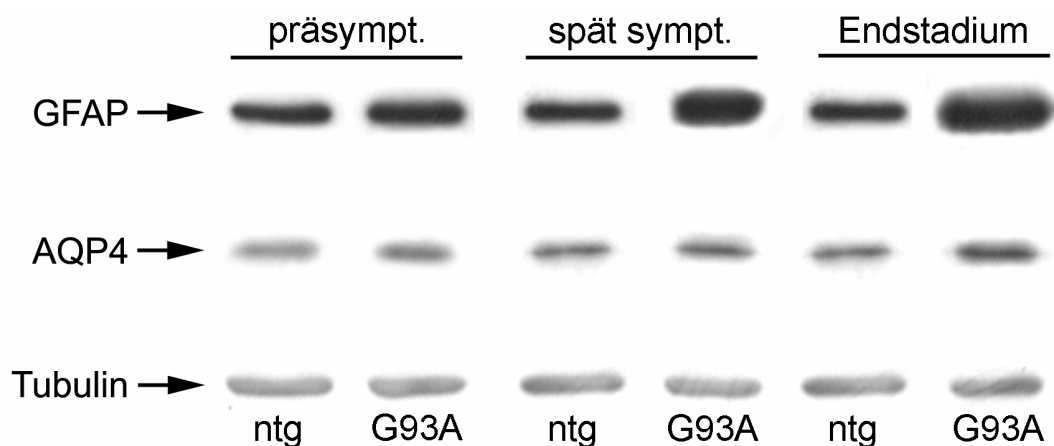


Abb. 31: Proteinbiochemische Analyse der astrozytären Proteine GFAP und AQP4. Western Blot von Rückenmarkslysaten. Die Menge des GFAP-Proteins nimmt im Verlauf der Erkrankung zu. Die AQP4-Proteinmenge ist bei Tieren im Endstadium ebenfalls leicht erhöht. Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. n = 3. sympt. = symptomatisch, ntg = ntg-SOD1^{G93A}, G93A = SOD1^{G93A}

5.4.4. Auswirkung der Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf die Motoneuron-Zelllinie NSC34

Die beobachtete fortschreitende Reduktion des Kir4.1-Proteins im SOD^{G93A}-Mausmodell für die ALS wirft die Frage auf, ob die verminderte Expression von Kir4.1-Kanälen *in vivo* zur Pathologie der Erkrankung beitragen könnte. Es wird u.a. vermutet, dass eine Akkumulation von

Glutamat im synaptischen Kompartiment durch die daraus resultierende Depolarisation zum Tod von Motoneuronen beiträgt.

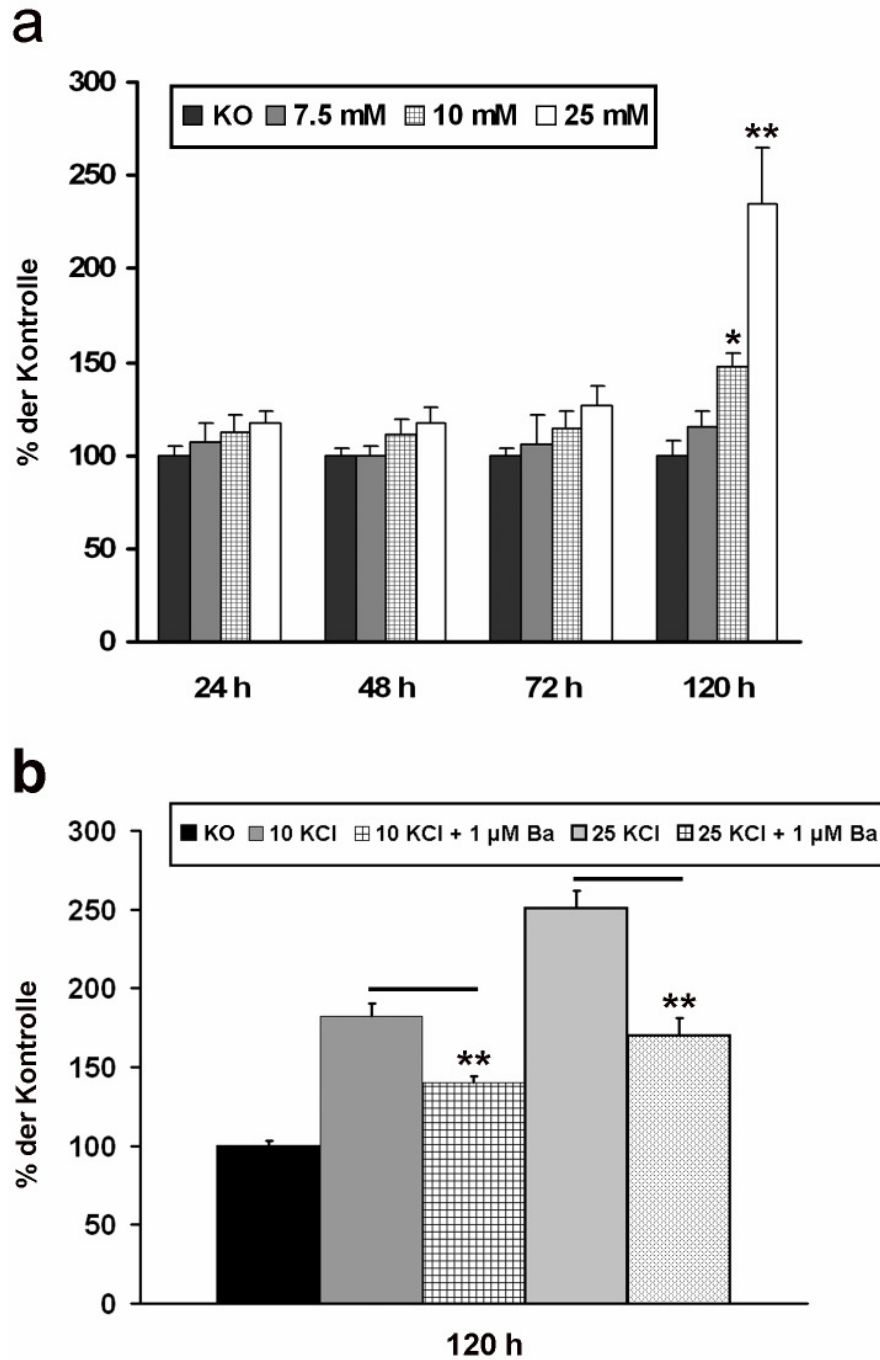


Abb. 32: Statistische Auswertung der Kalium-Exzitotoxizitätsexperimente in Kultur. (a, b) Auszählung apoptotischer Zellkerne. (a) NSC34-Zellen wurden für 24, 48, 72 und 120 Stunden verschiedenen Kaliumkonzentrationen ausgesetzt. Die Inkubation mit 10 und 25 mM KCl bewirkt ein signifikantes Absterben der Zellen nach 120 h. (b) Die Koapplikation von Barium (1 μ M) und KCL (10, 25 mM) nach 120 Stunden Inkubation reduziert den durch KCl ausgelösten Zelltod. Angabe der Werte als % der apoptotischen Zellen der Kontrolle (100%) \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA mit *Newman-Keuls-Test*).

Unter der Annahme, dass Astrozyten an der Abpufferung von extrazellulärem Kalium beteiligt sind, wurde in dieser Arbeit die folgende Hypothese aufgestellt: Die gezeigte Reduktion der Expression des $K_{ir}4.1$ -Proteins führt zu einer Beeinträchtigung der Kaliumpufferungsfunktion der Astrozyten und zu einer anhaltenden extrazellulären Akkumulation von Kalium. Dies wirkt zytotoxisch auf Motoneurone und kann ihren Tod bewirken. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde ein *in vitro* Zellkulturmodell etabliert, indem die Motoneuron-ähnliche Zelllinie NSC34 chronisch (24, 48, 72 und 120 Stunden) einer ansteigenden extrazellulären Kaliumkonzentration (7.5, 10, 25 mM) ausgesetzt wurde. Dieses Versuchsmodell simuliert die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration *in vivo*. Es konnte nachgewiesen werden, dass NSC34-Zellen mit Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration in den programmierten Zelltod (Apoptose) übergehen. Bereits nach 24 h Inkubationszeit mit KCl kommt es tendenziell zu einem konzentrationsabhängigen Zelltod der NSC34-Zellen. Dieser Effekt verstärkte sich bei längeren Inkubationszeiten (48 und 72h). Eine signifikante Zunahme des Zelltodes konnte nach 120h Inkubation mit 10 und 25 mM KCl gezeigt werden. In einer weiteren Versuchsreihe wurden NSC34-Zellen 120 Stunden mit 10 bzw. 25 mM KCl und Barium (1 μ M) koinkubiert. Die Applikation von Barium führte zu einer signifikanten Blockade des Kalium-induzierten Zelltodes.

5.4.5. Expression von $K_{ir}4.1$ im menschlichen Rückenmark

Die SOD^{G93A}-Mauslinie wurde auf Basis einer Mutation entwickelt, die in einigen Fällen der FALS nachgewiesen wurde. Ergebnisse, die im Tiermodell gewonnen werden, sollen Rückschlüsse auf die molekularen Veränderungen einer im Menschen auftretenden Erkrankung zulassen und helfen, den Erkrankungsprozess zu verstehen. Im Idealfall könnte dies zur Entwicklung therapeutischer Maßnahmen zur Milderung der Symptomatik führen bzw. dazu, das Fortschreiten der Erkrankung zu stoppen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Expression des $K_{ir}4.1$ -Proteins im menschlichen Rückenmark immunhistochemisch und proteinbiochemisch analysiert, um zu untersuchen, ob das Expressionsmuster vergleichbar mit dem in der Maus ist.

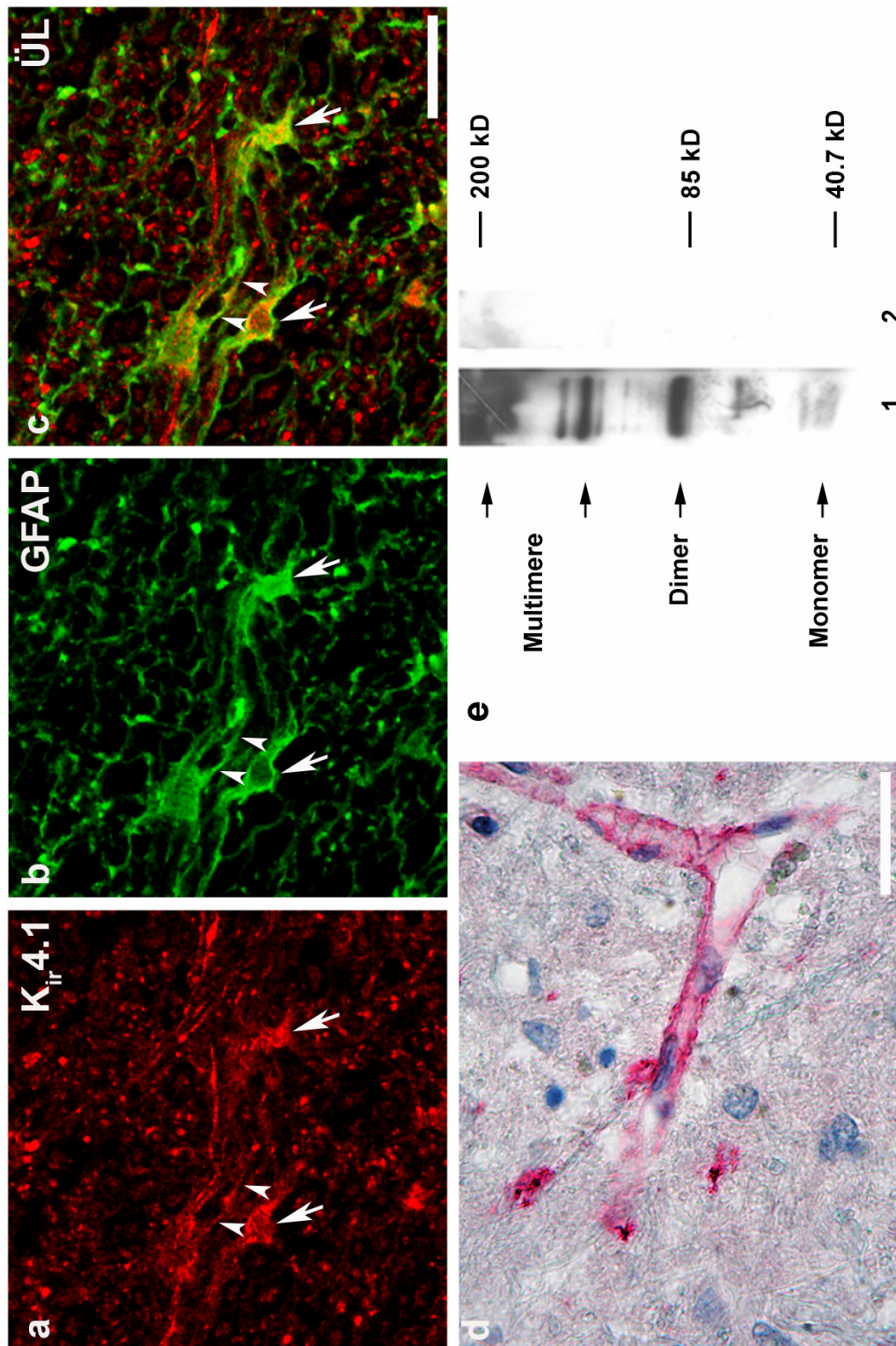


Abb. 33: Expression von Kir4.1 auf GFAP-positiven Astrozyten im menschlichen Rückenmark. (a-c) GFAP-positive (b, grün, Alexa488) Astrozyten in der grauen Substanz exprimieren auf ihren Zellkörpern (Pfeile) und Fortsätzen (Pfeilspitzen) Kir4.1 (a, rot, Cy3). (d) Die Neurofuchsinfärbung zeigt eine Kir4.1-Expression auf glialen Fortsätzen, die in engem Kontakt mit Blutgefäßen stehen. (e) Das charakteristische Bandenmuster für Kir4.1 kann in Lysaten aus dem menschlichen Rückenmark nachgewiesen werden (Spur 1). (Spur 2) Präadsorption des Kir4.1-AK an das Kontrollantigen. Anmerkung: Abbildung (b) sowie das Gewebe zur Western Blot Analyse wurden freundlicherweise von PD Dr. Walter Schulz-Schäffer, Abt. Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt. ÜL = Überlagerung. Skalierung 30 µm (a-c), 10 µm (d)

Die Anfärbung des Markerproteins GFAP erlaubte die Identifikation von astroglialen Zellen im menschlichen postmortalen Gewebe. Es konnte eine Überlappung der Immunreaktivität für das Kir4.1-Protein und das GFAP-Protein auf astrozytären Zellkörpern und Fortsätzen detektiert werden. Analog zu den Ergebnissen im Rückenmark der Maus wird Kir4.1 stark auf glialen Endfüßen an Gefäßen exprimiert. Das Kir4.1-Protein wurde weiterhin in Lysaten des Rückenmarks nachgewiesen. Dabei konnten Banden gefunden werden, die der monomeren (um 45 kD) und dimeren Form (80-90 kD) des Kir4.1-Kanals entsprechen. Das Signal im hochmolekularen Bereich ließ allerdings keine sichere Analyse der Banden zu.

6. Diskussion

Die Untersuchung der Rolle einwärts-gleichrichtender Kaliumkanäle im ZNS ist in den letzten Jahren immer mehr ins Interesse der Forschung geraten. Es ist mittlerweile bekannt, dass diese Kanäle neben ihrer klassischen Aufgabe bei der Regulation des Membranpotentials weitere wichtige Funktionen übernehmen. Es wird ihnen u.a. eine Beteiligung in der Differenzierung von Gliazellen, Modulation der Hormonsekretion und Transmitterfreisetzung im ZNS sowie der pH- und CO₂-Wahrnehmung im Hirnstamm zugesprochen (Tanaka et al., 1995, Tanaka et al., 1996, Neusch et al., 1997, Neusch et al., 2000, Yang et al., 2000, Miki et al., 2001, Neusch et al., 2001, Kalsi et al., 2004, Wu et al., 2004). Basierend auf Expressionsstudien in der Retina und den elektrophysiologischen Charakteristiken der Kanäle wurde weiterhin postuliert, dass K_{ir}-Kanäle an der Kontrolle der extrazellulären Kaliumhomöostase durch Gliazellen beteiligt sind. Daneben mehren sich die Hinweise, dass K_{ir}-Kanäle eine Rolle in der Kalium-vermittelten Regulation der Wasserhomöostase und bei der Anschwellung von Gliazellen unter pathophysiologischen Bedingungen spielen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Expression und Funktion der K_{ir}4.1-Untereinheit im Rückenmark der Maus. Ziel ist es, die Funktion des Kanals in Gliazellen, vornehmlich Astrozyten, unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen besser zu verstehen.

6.1. Bedeutung des komplexen zellspezifischen Expressionsmusters von K_{ir}4.1

In der Literatur gibt es kontroverse Daten bezüglich der Expression von K_{ir}4.1 im ZNS (Bredt et al., 1995, Poopalasundaram et al., 2000, Higashi et al., 2001, Jiang et al., 2001, Li et al., 2001, Neusch et al., 2001). Die Studien wurden in unterschiedlichen ZNS-Bereichen und mit verschiedenen Methoden durchgeführt, dies erklärt zumindest zum Teil die voneinander abweichenden Ergebnisse. Durch einen kombinierten Einsatz von Immunfärbungen und Mäusen mit transgen zellspezifisch-fluoreszierenden Gliazellen konnte in dieser Arbeit das Expressionsmuster der K_{ir}4.1-Kanaluntereinheit im Rückenmark zellspezifisch aufgeschlüsselt werden. Anhand von *in vitro* Daten konnte zunächst gezeigt werden, dass Oligodendrozyten K_{ir}4.1 bereits innerhalb weniger Tage nach Kultivierung

exprimieren. In Astrozyten hingegen wird $K_{ir}4.1$ erst nach 2-wöchiger Kultivierungsdauer nachgewiesen.

In situ ändert sich das Expressionsmuster für $K_{ir}4.1$ innerhalb der ersten beiden postnatalen Wochen deutlich. Früh postnatal wurde die Kanaluntereinheit vorwiegend Zellkörper-assoziiert in der weißen Substanz des Rückenmarks nachgewiesen. Mit zunehmendem Alter der Tiere konnte eine Verminderung des $K_{ir}4.1$ -Immunsignals im Bereich der weißen Substanz gezeigt werden, das schließlich in adulten Tieren kaum noch nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu wurde das $K_{ir}4.1$ -Protein ab dem postnatalen Tag 7 verstärkt in der grauen Substanz detektiert. Dabei erschien das Färbemuster diffus und nicht an Zellkörper gebunden. Die $K_{ir}4.1$ -positiven Zellen in der weißen Substanz des Rückenmarks konnten durch Einsatz transgener Maustechnologie eindeutig als Oligodendrozyten identifiziert werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer Studie von Kalsi et al. aus dem Jahr 2004 am optischen Nerven, in der früh postnatal ebenfalls zunächst ein Soma-assoziiertes $K_{ir}4.1$ -Signal gezeigt werden konnte, das die Autoren Oligodendrozyten zuordneten. Die elektrophysiologischen *in vitro*-Daten von Neusch et al., 2001 befürworten weiterhin die Expression von $K_{ir}4.1$ in Oligodendrozyten. Zudem führte die genetische Inaktivierung des Kanals im Mausmodell in dieser Studie zur Dysmyelinisierung. Vermutlich sekundär kommt es durch den Tod von Gliazellen zu Vakuolisierungen und Demyelinisierungen in der weißen und weniger auch in der grauen Substanz (Neusch et al., 2001). Diese Ergebnisse legen nahe, dass $K_{ir}4.1$ für die korrekte Entwicklung der Oligodendrozyten, den Aufbau und Erhalt des Myelins, zumindest im Rückenmark und im optischen Nerven, essentiell ist. Die meisten Studien (Poopalasundaram et al., 2000, Neusch et al., 2001, Kalsi et al., 2004) zeigten wie die vorliegende Arbeit eine Zellkörper-assoziierte Lokalisation von $K_{ir}4.1$ auf Oligodendrozyten. Das spricht dafür, dass der Kanal hier vermutlich nicht an der Regulation der extrazellulären Kaliumhomöostase beteiligt ist. Dies ist jedoch nicht abschließend geklärt. In einer Studie wurde gezeigt, dass Oligodendrozyten in der weißen Substanz des Kleinhirns $K_{ir}4.1$ exprimierten, Astrozyten hingegen $K_{ir}4.1$ -negativ waren (Poopalasundaram et al., 2000). Die Autoren halten daher eine Funktion von Oligodendrozyten bei der Kaliumpufferung in der weißen Substanz des Kleinhirns für möglich. Sie schränken jedoch ein, dass sie die Expression von $K_{ir}4.1$ nur auf Zellkörpern und bisher nicht auf den Fortsätzen zeigen konnten. Eine Lokalisation des Kanals auf den Fortsätzen könnte für eine Pufferungsfunktion an den Ranvier'schen

Schnürringen sprechen. Auch Menichella et al. 2006 postulierten anhand histologischer Daten, dass Oligodendrozyten womöglich an der Kaliumpufferung im Bereich der Ranvier'schen Schnürringe beteiligt sind. Direkte Beweise wurden jedoch nicht geliefert. Zudem ist die Rolle von Oligodendrozyten in der grauen Substanz des Rückenmarks weitgehend unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein entwicklungsabhängiger Rückgang der $K_{ir}4.1$ -Expression in der weißen Substanz beobachtet. Dies steht im Widerspruch zu der Annahme, $K_{ir}4.1$ habe eine Funktion in der Aufrechterhaltung der Myelinisierung. Möglicherweise regulieren adulte Oligodendrozyten ihr Membranpotential durch andere Mechanismen und $K_{ir}4.1$ spielt in der Aufrechterhaltung der Myelinisierung im Rückenmark keine wesentliche Rolle. Kanäle, die diese Funktionen übernehmen könnten, wären z.B. die 2P-Domänen Kanäle, die jedoch bisher in Oligodendrozyten nicht beschrieben wurden (vergleiche Review von Butt und Kalsi, 2006), wenngleich ihre Expression in Oligodendrozyten deshalb nicht auszuschließen ist. Entgegen der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten Kalsi et al., 2004 in adulten Tieren ein $K_{ir}4.1$ -Signal im optischen Nerven zeigen, bei dem es sich analog zur weißen Substanz des Rückenmarks um eine Ansammlung von myelinisierten Nervenfasern handelt. Ähnlich wiesen Greenwood et al., 2004 $K_{ir}4.1$ auf adulten Oligodendrozyten im *Corpus Callosum* nach. Eine aktuelle Studie von Djukic et al., 2007 zeigt weiterhin, dass Vakuolisierungen der weißen Substanz auch in konditionalen $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren zu finden sind, in denen das Gen spezifisch in Astrozyten und Oligodendrozyten ausgeschaltet ist. Dies und der Nachweis von $K_{ir}4.1$ in myelinhaltigen Strukturen wie dem optischen Nerven und dem *Corpus Callosum* (Greenwood et al., 2004, Kalsi et al., 2004) lassen vermuten, dass der kompakte und lipidreiche Aufbau des Myelins im Rückenmark von adulten Tieren die Demaskierung des Proteins erschwert. Somit besteht die Möglichkeit, dass $K_{ir}4.1$ mit den für diese Arbeit (und bei anderen Autoren, z.B. Higashi et al., 2001) gewählten immunhistochemischen Methoden in der adulten weißen Substanz nicht detektiert werden konnte.

Das $K_{ir}4.1$ -Immunsignal in der grauen Substanz konnte dem astrozytären Netzwerk zugeordnet werden. Etwa ab der zweiten postnatalen Woche war eine starke Hochregulation der $K_{ir}4.1$ -Expression in Astrozyten zu beobachten. Dies deckte sich mit der proteinbiochemischen Analyse des $K_{ir}4.1$ -Proteins, welche eine Zunahme der Gesamtproteinmenge mit

höherem Alter der Tiere zeigte. Das zeitliche Expressionsmuster von $K_{ir}4.1$ auf Astrozyten des Rückenmarks korreliert mit den Ergebnissen von Studien am optischen Nerven, die zunächst eine oligodendrogliale, gefolgt von einer astroglialen $K_{ir}4.1$ -Expression zeigen (Butt und Ransom, 1993, Kalsi et al., 2004). Ein Teil der hier aufgeführten Expressionsanalyse an der Maus wird weiterhin durch eine Studie bestätigt, die von Olsen et al., 2006 an der Ratte durchgeführt und im Verlauf der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit publiziert wurde. U.a. zeigten Olsen et al. eine postnatale Hochregulation von $K_{ir}4.1$ im Rückenmark und bestätigten die Daten dieser Arbeit darin, dass $K_{ir}4.1$ in der zweiten postnatalen Woche vorwiegend in der grauen Substanz auf Astrozyten exprimiert wird. In dieser Arbeit wurde $K_{ir}4.1$ subzellulär vorwiegend auf astrozytären Fortsätzen nachgewiesen, die in Kontakt mit Neuronen oder Blutgefäßen stehen. Dies wird durch mehrere unabhängige Studien in verschiedenen ZNS-Regionen bestätigt (Kofuji et al., 2000, Poopalasundaram et al., 2000, Higashi et al., 2001, Ishii et al., 2003, Kalsi et al., 2004). In Koautorschaft konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich die $K_{ir}4.1$ -Expression in Astrozyten aus dem Hirnstamm innerhalb der ersten beiden postnatalen Wochen vom Zellkörper auf die Fortsätze verlagert (Neusch et al., 2006).

Die zunehmende Expression von $K_{ir}4.1$ in der zweiten postnatalen Woche auf Astrozyten in der grauen Substanz korreliert mit der Zunahme der elektrischen Aktivität im sich entwickelnden ZNS. Eine analoge Hochregulation der Expression von K_{ir} -Kanälen in zeitlicher Abhängigkeit zur neuronalen Aktivität ist z.B. im optischen Nerven, Kleinhirn, Hirnstamm und Innenohr beschrieben (Hibino et al., 1997, Bordey und Sontheimer, 2000, Rozengurt et al., 2003, Kalsi et al., 2004, Neusch et al., 2006). Eine Steigerung der elektrischen Aktivität erfordert eine erhöhte Abpufferung extrazellulärer Kaliumionen, die von den Neuronen freigesetzt werden. Die Expression membranständiger $K_{ir}4.1$ -Kanäle könnte also durch eine erhöhte extrazelluläre Akkumulation von Kalium induziert werden. Der Einfluss neuronaler Aktivität auf die Kanalexpression in Gliazellen konnte bereits früh etabliert werden (vergleiche Review von Barres, 1991). Im peripheren Nervensystem ist weiterhin beschrieben, dass Neurone durch diffusible Faktoren Einfluss auf die Ionenkanalausstattung von Schwannzellen haben (Beaudu-Lange et al., 1998). Die Hochregulation der Expression funktioneller K_{ir} -Kanäle in der Membran von Gliazellen geht zudem mit dem Differenzierungsprozess einher (Kressin et al., 1995, Bordey und Sontheimer, 1997, Bringmann et al., 1999). In einer

astrozytären Gliom-Zelllinie konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von $K_{ir}4.1$ -Kanälen zu Zellzyklusveränderungen, Proliferationsstopp und Beginn der Differenzierung führt. Verschiedene Studien postulieren, dass $K_{ir}4.1$ an der Pufferung erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentrationen beteiligt sei. Diese Funktion von $K_{ir}4.1$ wurde insbesondere in den Müllerzellen der Retina untersucht und gilt dort als etabliert (Orkand et al., 1966, Orkand, 1980, Newman et al., 1984, Newman und Reichenbach, 1996). Im Rückenmark und in anderen Regionen des ZNS konnte die funktionelle Rolle von $K_{ir}4.1$ bisher nicht zufriedenstellend erklärt werden. Die verstärkte Expression von $K_{ir}4.1$ im Rückenmark, insbesondere auf den astrozytären Fortsätzen, zeitgleich mit der Zunahme der neuronalen Aktivität, untermauert die Hypothese, dass $K_{ir}4.1$ hier ebenfalls eine Rolle in der Kaliumpufferung spielt. $K_{ir}4.1$ ist zudem wahrscheinlich im Rückenmark die wesentliche K_{ir} -Kanaluntereinheit von Astrozyten, die an diesem Prozess beteiligt sein kann. Olsen et al., 2006 konnten zeigen, dass $K_{ir}4.1$ sehr wahrscheinlich die hauptsächliche K_{ir} -Untereinheit ist, die im Rückenmark exprimiert wird. Für die morphologische Entwicklung der Astrozyten scheint $K_{ir}4.1$, im Gegensatz zu seiner Funktion bei Oligodendrozyten, keine wesentliche Rolle zu spielen. Astrozyten aus $K_{ir}4.1$ -defizienten Tieren entwickeln sich *in vitro* normal (Abb. 14 und 20). Zudem bilden sie auch im Gewebe Fortsätze aus, mit denen sie Blutgefäße umschließen (Abb. 23 und Dibaj et al., 2007, Abb. 4).

Auf Astrozyten der weißen Substanz konnte kein $K_{ir}4.1$ -Protein nachgewiesen werden, was sich mit den Ergebnissen von anderen Studien deckt (Poopalasundaram et al., 2000, Higashi et al., 2001). Das könnte bedeuten, dass Astrozyten dort entweder nicht an der Kaliumpufferung beteiligt sind oder sie besitzen möglicherweise andere Kanäle, die die Funktionen der $K_{ir}4.1$ -Kanäle übernehmen können. In kultivierten Astrozyten konnten TREK-2-Kanäle aus der Familie der 2P-Domänen Kanäle nachgewiesen werden (Gnatenco et al., 2002). Die Autoren vermuten, dass dieser Kanal unter physiologischen Bedingungen zu einem gewissen Anteil bei der Regulation des Membranpotentials eine Rolle spielt. Bisher wurde dieser Kanal jedoch nicht *in situ* nachgewiesen. Es wäre auch denkbar, dass in $K_{ir}4.1$ -negativen Astrozyten der weißen Substanz die Na^+/K^+ -ATPasen (D'Ambrosio et al., 2002) oder $Na^+/K^+/Cl^-$ -Kotransporter eine größere Rolle bei der Entfernung von Kalium aus dem Extrazellulärraum spielen. Da Astrozyten eine sehr heterogene Zellpopulation darstellen ist es denkbar, dass sie in Abhängigkeit vom

Gewebe unterschiedliche Kanäle exprimieren. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass ähnlich wie bereits erläutert das Myelin den Nachweis behindert.

In einigen wenigen Studien konnte eine neuronale Expression von $K_{ir}4.1$ belegt werden (Bredt et al., 1995, Jiang et al., 2001, Li et al., 2001). In diesen Studien wurde $K_{ir}4.1$ im Hirnstamm oder in kultivierten kortikalen Neuronen nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass Motoneurone im Rückenmark kein $K_{ir}4.1$ exprimieren. Dies korreliert mit einer weiteren Studie im Rückenmark der Ratte (Olsen et al., 2006), in der die Immunsignale für $K_{ir}4.1$ mit dem neuronalen Markerprotein NeuN nicht überlappen. Kultivierte Neurone aus dem Rückenmark exprimieren ebenfalls kein $K_{ir}4.1$ (Neusch et al., 2001).

6.2. Spielt $K_{ir}4.1$ im Rückenmark eine Rolle beim Kalium-vermittelten Transport von Wasser?

Untersuchungen in der Retina belegen eine Koexpression von $K_{ir}4.1$ -Kanälen und dem Wasserkanal AQP4 in der Membran von Müllerzellen im Bereich von Gefäßen und des Glaskörpers. Hieraus leitete sich die Hypothese ab, dass der Kaliumtransport in der Retina vermutlich durch einen Ionen-getriebenen Wassertransport über AQP4 begleitet wird (Nagelhus et al., 1999, Noel et al., 2005, Connors und Kofuji, 2006). Die reduzierte Expression von $K_{ir}4.1$ auf Müllerzellen in der postischämischen Retina und die daraus resultierende Zellanschwellung lassen eine Rolle von $K_{ir}4.1$ in der zellulären Volumenregulation vermuten. Die verstärkte perivaskuläre Expression von $K_{ir}4.1$ -Kanälen im Rückenmark wirft daher die Frage auf, ob $K_{ir}4.1$ -Kanäle in diesem Gewebe eine Komponente der Volumen-regulatorischen Mechanismen von Astrozyten darstellen.

6.2.1. $K_{ir}4.1$ und AQP4 kolokalisieren in der grauen Substanz des Rückenmarks

Die Hypothese einer funktionellen Kopplung von Kalium- und Wassertransport mittels $K_{ir}4.1$ und AQP4 basiert größtenteils auf indirekten Schlussfolgerungen aus Expressionsstudien (Ishii et al., 1997, Nagelhus et al., 1999). Diese Hypothese wurde unterstützt durch Arbeiten, in denen anhand von immunhistologischen Daten und Immunpräzipitation gezeigt werden konnte, dass $K_{ir}4.1$ und AQP4 in der Retina und im Hippocampus mittels des DGC in der Membran positioniert werden (Connors und Kofuji, 2002, Guadagno und Moukhles, 2004, Noel et al.,

2005, Connors und Kofuji, 2006). Die genetische Inaktivierung von dp71, einer Komponente dieses Komplexes, führt zudem zu einer veränderten Verteilung von K_{ir}4.1 und AQP4 in der Retina (Daloz et al., 2003). Komponenten dieses Komplexes sind in Motoneuronen und der Radialglia des Rückenmarks beschrieben (Moukhles und Carbonetto, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte *in vitro* und auch *in situ* eine Expression von AQP4 auf Astrozyten gezeigt werden. *In situ* wurde dabei ein starkes Signal in der grauen Substanz nachgewiesen (Abb. 21). Diese Daten korrelieren mit einer Vielzahl von Studien in anderen Hirnregionen (siehe 2.3.1.). Während der Anfertigung dieser Dissertation publizierten Vitellaro-Zuccarello et al., 2005 eine Studie, die die Daten hinsichtlich der AQP4-Expression im Rückenmark der vorliegenden Arbeit weiter stützt. Die Autoren zeigten ebenfalls ein starkes AQP4-Signal in der grauen Substanz des Rückenmarks und eine polarisierte Expression von AQP4 auf perivaskulären astroglialen Fortsätzen und im Neuropil. In Einklang mit den Daten von Vitellaro-Zuccarello et al. war das AQP4-Signal in der vorliegenden Arbeit auf strahlenförmigen Ausläufern der Astrozyten von der grauen in die weiße Substanz zu erkennen, die den radialen Fortsätzen der Astrozyten entsprechen. In Erweiterung dieser und anderer bisher publizierter Arbeiten zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erstmals, dass AQP4 im Rückenmark der Maus in der grauen Substanz mit K_{ir}4.1 kolokalisiert ist. Auf subzellulärer Ebene sind beide Proteine konzentriert auf astroglialen Endfüßen exprimiert, die in engem Kontakt mit Gefäßen stehen, während die somatische Expression gering ist (Abb. 22). Das Expressionsmuster beider Proteine lässt die Vermutung zu, dass K_{ir}4.1 und AQP4 möglicherweise ähnlich wie in der Retina und im Hippocampus durch den DGC positioniert werden, um ihre spezifischen Funktionen auszuüben. Eine direkte Protein-Protein Interaktion zwischen K_{ir}4.1 und AQP4 ist unwahrscheinlich, da u.a. in AQP4-KO Tieren K_{ir}4.1 weiterhin in der Membran exprimiert wird. Die vorliegende Arbeit liefert einen weiteren Beweis dafür, dass K_{ir}4.1 und AQP4 unabhängig voneinander in die astrozytäre Membran eingebaut werden: Die Inaktivierung des K_{ir}4.1 Gens wirkte sich weder *in vitro* noch *in situ* auf die Membranexpression von AQP4 auf Astrozyten aus, noch beeinflusste sie den Gesamtproteingehalt von AQP4.

Die Ergebnisse der bisher publizierten Expressionsstudien konnten die Frage einer funktionellen Interaktion von K_{ir}4.1 und AQP4 nicht klären. Die Hypothese erscheint jedoch im Hinblick auf die subzelluläre Expression

beider Proteine attraktiv. Indirekte Daten aus Mausmodellen stützen die Hypothese weiterhin. In Syntrophin-KO-Mäusen konnte eine Umorganisation der Expression von AQP4 in hippocampalen Astrozyten gezeigt werden, die zu einer verzögerten Beseitigung von Kalium führt (Amiry-Moghaddam et al., 2003). Eine Umorganisation von AQP4 wird auch bei bestimmten Formen der Epilepsie beobachtet, bei der es zu einer Beeinträchtigung der Wasser- und Kaliumhomöostase kommt (Eid et al., 2005). Binder et al., 2006 zeigten im Hippocampus von AQP4-KO-Tieren eine veränderte Kaliumkinetik. Die Autoren lösten durch Stimulation Anfälle aus, die sich phänotypisch sowohl in Wildtyp-Tieren als auch AQP4-KO-Tieren durch Immobilität der Mäuse äußerten. Anhand der Analyse von Daten aus Elektroenzephalogrammen konnte ermittelt werden, dass die Anfallsdauer in AQP4-KO-Tieren erhöht war. Mittels Kalium-sensitiver Mikroelektroden wiesen die Autoren unveränderte basale und maximale Kaliumlevel, aber eine starke Verzögerung in der Kaliumkinetik nach. Sie postulierten, dass Kalium verzögert aufgenommen und abtransportiert wird, da der begünstigende osmotische Wassertransport über AQP4 in KO-Tieren nicht möglich sei. Die Autoren konnten jedoch keinen direkten Schluss ziehen, dass der hierbei beteiligte Kaliumkanal $K_{ir}4.1$ ist und leiteten dies nur aus der bekannten Literatur ab.

In einer aktuellen Studie (Ruiz-Ederra et al., 2007) wird die Hypothese der funktionellen Interaktion von $K_{ir}4.1$ und AQP4, zumindest in der Retina, in Frage gestellt. Die Autoren untersuchten elektrophysiologisch frisch isolierte Müllerzellen von AQP4-KO- und AQP4-WT-Tieren. Sie stellten eine 4-fach reduzierte osmotische Wasserpermeabilität in KO-Tieren fest. Gleichzeitig waren das Membranpotential der Müllerzellen und der Gesamtkaliumstrom unverändert im Vergleich zu den Kontrollen. Der Kaliumstrom war sensibel gegenüber dem K_{ir} -Kanal Blocker Barium und die Kanaleigenschaften (Öffnungswahrscheinlichkeit, Leitfähigkeit, Gleichrichtung) der K_{ir} -Kanäle in AQP4-defizienten Tieren entsprachen denen der Kontrollen. Die Zellen zeigten zudem unabhängig von der AQP4-Expression eine gleich bleibende Antwort auf lokale Applikation von Kalium. Die Autoren postulierten daher, dass der Wassertransport über AQP4 in retinalen Müllerzellen nicht modulierend auf die Funktion von $K_{ir}4.1$ -Kanälen wirkt. Aufgrund der elektrophysiologischen Daten aus Einzelkanalmessungen schlossen die Autoren relativ sicher eine kompensatorische Hochregulation anderer K_{ir} -Kanäle in AQP4-defizienten Tieren aus. Neue Studien der gleichen Gruppe (Zhang und

Verkman, 2008) sprechen ebenfalls gegen eine funktionelle Modulation von $K_{ir}4.1$ durch AQP4 in Astrozyten aus dem Hippocampus.

Auf Grundlage der in dieser Arbeit dargestellten Expressionsanalyse lassen sich folgende Aussagen zu dieser Problematik machen: Das unveränderte Expressionsmuster von AQP4 im Rückenmark $K_{ir}4.1$ -defizienter Mäuse liefert einen Beweis dafür, dass Genexpression, der Transport zur Membran und Membraninsertion beider Kanäle unabhängig voneinander erfolgt. Dies schließt die Expression von $K_{ir}4.1$ und AQP4 innerhalb eines größeren Proteinkomplexes, vergleichbar mit dem DGC nicht aus, wurde bisher aber noch nicht gezeigt. Die kolokalisierte Expression lässt weitgehend keine Rückschlüsse hinsichtlich einer funktionellen Kopplung von AQP4 und $K_{ir}4.1$ zu. Es ist daher möglich und wahrscheinlich, dass beide Kanäle völlig unabhängig voneinander ihre Funktionen ausüben. Um diese Frage zu klären wäre es hilfreich, in Abhängigkeit vom $K_{ir}4.1$ -Genotyp die Auswirkung spezifischer Blocker für AQP4 auf das elektrophysiologische Verhalten von Astrozyten zu analysieren. Bisher gibt es jedoch keine spezifischen Blocker für AQP4-Kanäle. Alternativ könnte man mit RNA-Interferenz Methoden arbeiten und die Translation der AQP4-mRNA transient abschalten.

6.2.2. $K_{ir}4.1$ -Kanäle regulieren das Schwellungsverhalten von astroglialen Endfüßen

Die Schwellung von Gliazellen ist ein Begleitsymptom unterschiedlicher pathologischer Prozesse, z.B. als Sekundäreffekt eines vasogenen Ödems oder als das klassische zelluläre Ödem, bei dem es zu einer Anschwellung der Gliazellen durch intrazelluläre Akkumulation von osmotisch wirksamen Molekülen kommt (Kempski, 2001, Bringmann et al., 2005, Reichenbach et al., 2007). Gliazellen besitzen diverse regulatorische Mechanismen, um einer solchen Schwellung entgegenzuwirken. Diesen Prozess bezeichnet man als regulatorische Volumenreduktion (RVD, *regulatory volume decrease*). Hierzu zählen u.a. die Öffnung und/oder Aktivierung von Kaliumkanälen der K_{BK} -Klasse (spannungs- und Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle mit großer Leitfähigkeit), K^+/Cl^- -Kotransportern und Anionkanälen (VSOAC, *volume-sensitive organic anion channels*). Die genauen Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand aktueller Forschung (Cardin et al., 1999, Aschner, 2000, Neprasova et al., 2007, Panickar et al., 2007). Prinzipiell kommt es jedoch durch die Abgabe von Kalium, Chlorid und organischen Anionen zu einem nach außen gerichteten osmotischen

Gradienten, der es der Zelle ermöglicht, Wasser abzugeben (siehe Review von O'Neill, 1999).

Es gibt Hinweise darauf, dass $K_{ir}4.1$ bei der Entstehung von retinalen Ödemen eine Rolle spielt (Pannicke et al., 2005a, Pannicke et al., 2005b, Wurm et al., 2006a, Wurm et al., 2006b, Reichenbach et al., 2007). Aufgrund der elektrophysiologischen Eigenschaften von $K_{ir}4.1$ -Kanälen und der beobachteten starken perivaskulären Expression (vergleiche diese Arbeit und Nagelhus et al., 1998, Higashi et al., 2001) könnte der $K_{ir}4.1$ -Kanal über einen auswärts gerichteten Kaliumstrom an der Volumenregulation in Astrozyten beteiligt sein. Auf Basis dieser Hypothese wurde in dieser Arbeit ein Modellsystem in Anlehnung an Pannicke et al., 2004 erstellt, anhand dessen die postulierte funktionelle Rolle von $K_{ir}4.1$ in der astroglialen Schwellung mittels 2-PLSM untersucht wurde. Die Ergebnisse aus diesem Modell zeigten, dass die Zellkörper von Astrozyten unabhängig vom $K_{ir}4.1$ -Genotyp als Reaktion auf eine Herabsetzung der extrazellulären Osmolarität anschwellen. Die Fortsätze der Astrozyten verhielten sich jedoch abhängig von der Expression von $K_{ir}4.1$ unterschiedlich. $K_{ir}4.1$ -WT-Astrozyten waren in der Lage, überschüssiges Wasser aus ihren Fortsätzen wieder abzugeben, während $K_{ir}4.1$ -defiziente Tiere auf Superfusion mit hypoosmolarer Lösung eine prominente Schwellung der Fortsätze zeigten. Dieses Ergebnis ist dadurch zu erklären, dass Wasser aufgrund des veränderten osmotischen Gradienten in die Zelle eindringt. Astrozyten, die funktionelle $K_{ir}4.1$ -Kanäle exprimieren, können über die Abgabe von Kalium aus ihren Fortsätzen einen Gradienten aufrichten, der es ihnen ermöglicht, dass überschüssige Wasser wieder abzugeben. Dies ist $K_{ir}4.1$ -defizienten Astrozyten unter den dargestellten Bedingungen nicht möglich.

Aus diesem Modellsystem konnten zwei Schlussfolgerungen gezogen werden: (1) $K_{ir}4.1$ -Kanäle sind nicht direkt an der Regulation des Volumens der Zellkörper von Astrozyten beteiligt, bzw. spielen hier nur eine untergeordnete Rolle. Dieses korreliert mit den Ergebnissen der Expressionsstudie, in der gezeigt werden konnte, dass die Somaexpression von $K_{ir}4.1$ gering ist. Möglicherweise haben am Zellkörper andere Kaliumkanäle eine regulatorische Funktion, beispielsweise die bereits angeführten 2P-Domänen Kanäle (Gnatenco et al., 2002). (2) $K_{ir}4.1$ -Kanäle regulieren hingegen das Volumen astrozytärer Fortsätze und Endfüße. Die Elektrolyt-gesteuerte Abgabe von Wasser ist

abhängig von der Expression funktioneller $K_{ir}4.1$ -Kanäle. Die immunhistologischen $K_{ir}4.1$ -Daten von Astrozyten stützen diese Funktion.

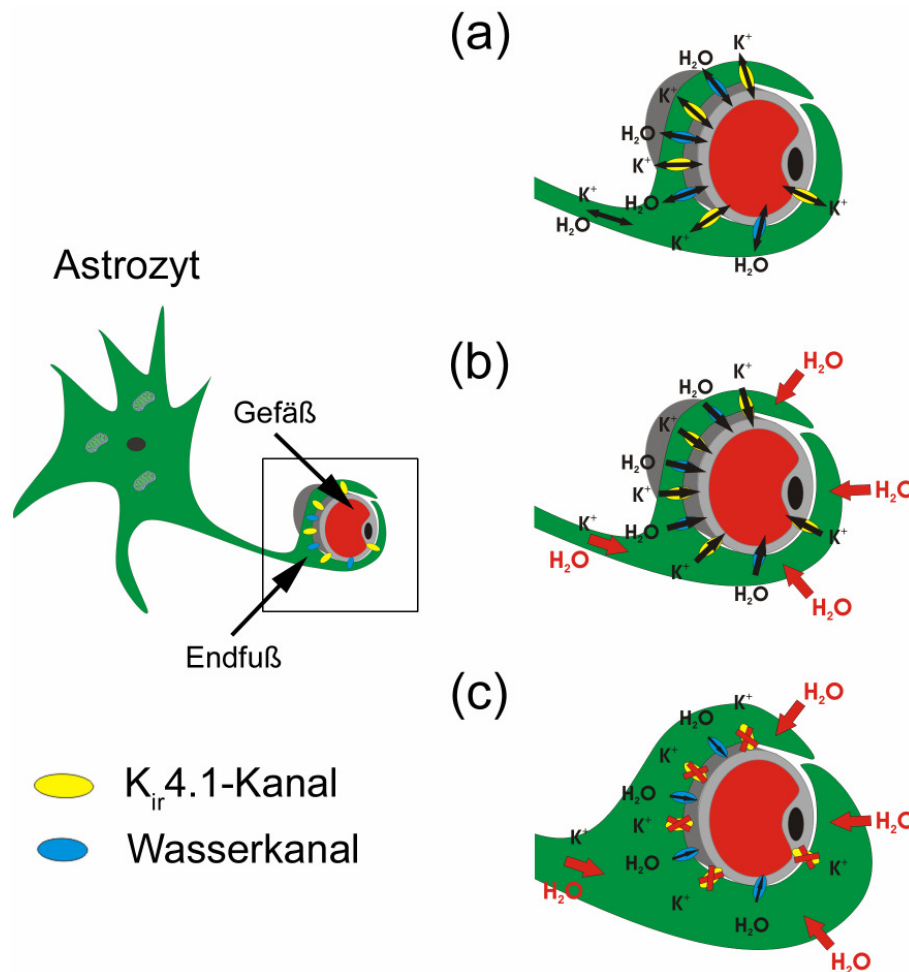


Abb. 34: Postulierte Rolle von $K_{ir}4.1$ in der Volumenregulation von astroglialen Endfüßen. (a) Unter physiologischen Bedingungen leiten $K_{ir}4.1$ -Kanäle Kalium entlang des E_K einwärts oder auswärts. Wasser folgt dem osmotischen Gradienten über Wasserkanäle (vermutlich überwiegend über AQP4-Wasserkanäle). (b) Unter pathophysiologischen Bedingungen (z. B. im Rahmen eines Ödems) kann über eine Kalium-getriebene Wassersekretion eine kompensatorische Volumenregulation erfolgen, die ein Anschwellen von astroglialen Endfüßen verhindert und Abgabe von Wasser in die Mikrovaskulatur ermöglicht. (c) Eine Reduktion der Expression oder eine gestörte Funktion astroglialer $K_{ir}4.1$ -Kanäle beeinträchtigt die Kalium-vermittelte Volumenregulation über astrogliale Endfüße und führt zu deren Anschwellung durch Wasserakkumulation. K^+ = Kaliumionen, H_2O = Wasser. (a), (b) und (c) stellen Vergrößerungen der in der linken Graphik hervorgehobenen Endfußregion dar.

Dieses Ergebnis wirft ein neues Licht auf die Rolle von $K_{ir}4.1$ -Kanälen unter pathophysiologischen Bedingungen, in denen es zu einer Akkumulation von Flüssigkeit im Gewebe kommt. Astrozyten stellen das osmotische Gleichgewicht wieder her, indem sie Ionen aufnehmen und so einen Gradienten für die Aufnahme von Flüssigkeit aus dem Gewebe

schaffen. Eine dauerhafte Anschwellung der Astrozyten würde zu einer Funktionsbeeinträchtigung sowohl der Astrozyten als auch durch Vergrößerung des extrazellulären Raums zur Störung neuronaler Zellen führen. Dem wirken komplexe Mechanismen (RVD) entgegen, die zur Regeneration des Ursprungsvolumens führen. In der vorliegenden Arbeit wird auf Basis der experimentellen Daten postuliert, dass Astrozyten im Rahmen dieser Vorgänge über ihre Fortsätze Kalium und Wasser über intrazellulären Transport an die Endfüße transportieren und dort an umliegende Gefäße abgeben. Die schnelle Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit ist abhängig von der Expression funktionsfähiger $K_{ir}4.1$ -Kanäle in der Membran der astrozytären Fortsätze und Endfüße. Unter Berücksichtigung dieses Postulats würde eine Reduktion der Funktion oder verminderte Expression von $K_{ir}4.1$ diesen kompensatorischen Prozess unter pathophysiologischen Bedingungen negativ beeinflussen. Bei einem spinalen Trauma könnte dies beispielsweise zu einer Verstärkung des Ödems und Reduktion des Extrazellulär-raums beitragen, was in der Folge sekundäre Schädigungen neuronaler und axonaler Strukturen hervorrufen könnte.

6.3. Verlust des $K_{ir}4.1$ -Kanals im $SOD1^{G93A}$ -Mausmodell für ALS

Die neurodegenerative Erkrankung ALS ist durch einen selektiven Tod von Motoneuronen gekennzeichnet. Die molekularen Grundlagen dieser multifaktoriellen Krankheit sind Gegenstand intensiver Forschung und noch weitgehend unbekannt. Verschiedene Pathomechanismen werden diskutiert. Es gibt mehrere gut gestützte Hinweise aus ALS-Mausmodellen und Studien der menschlichen Erkrankung, dass eine veränderte extrazelluläre Glutathomöostase zu einer chronischen Depolarisation von Motoneuronen mit nachfolgender Degeneration beiträgt (Rothstein et al., 1990, Rothstein et al., 1995, Shaw et al., 1995, Fray et al., 1998, Sasaki et al., 2000, Howland et al., 2002). Ausgehend von diesem vorgeschlagenen Pathomechanismus wurde in der vorliegenden Arbeit folgende Überlegung angestellt: $K_{ir}4.1$ ist sehr wahrscheinlich die hauptsächliche K_{ir} -Kanaluntereinheit von Astrozyten im Rückenmark (Olsen et al., 2006). Studien insbesondere an der Retina schreiben dem Kanal eine Funktion in der Abpufferung von neuronal freigesetztem Kalium zu (Nagelhus et al., 1999, Kofuji et al., 2002, Ishii et al., 2003, Noel et al., 2005). Die in dieser Arbeit (und anderen) gezeigte subzelluläre

Expression speziell auf astrozytären Fortsätzen legt nahe, dass der Kanal diese Rolle auch im Rückenmark übernehmen könnte. Eine unkontrollierte Akkumulation von Kalium im Extrazellulärraum könnte die neuronalen Funktionen ähnlich einer Glutamatakkumulation negativ beeinflussen. Es wurde daher im Sinne eines translationalen Ansatzes untersucht, ob $K_{ir}4.1$ -Kanäle eine Rolle in der Pathogenese der ALS spielen und möglicherweise exzitotoxische Phänomene auslösen.

6.3.1. Die $K_{ir}4.1$ -Expression ist im ALS-Mausmodell spezifisch im Ventralhorn des Rückenmarks reduziert

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Reduktion der $K_{ir}4.1$ -Expression im Ventralhorn des Rückenmarks von $SOD1^{G93A}$ -Mäusen nachgewiesen, die mit dem Erkrankungsgrad korreliert. Das Dorsalhorn war weniger stark betroffen. Auf proteinbiochemischer Ebene zeigte sich eine Reduktion des monomeren $K_{ir}4.1$ -Proteins. Bendotti et al., 2001 wiesen ähnlich der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine vorwiegende Reduktion der Monomere des GLT1-Proteins in Mäusen nach. Vermutlich lassen sich die höhermolekularen Kanalstrukturen aufgrund der Interaktion von $K_{ir}4.1$ mit anderen Proteinen schwerer auflösen. Die Reduktion des $K_{ir}4.1$ -Proteins setzte bereits kurz vor Ausprägung der ersten Krankheitssymptome im Mausmodell ein. Auf funktioneller Ebene ist davon auszugehen, dass die verminderte $K_{ir}4.1$ -Expression hauptsächlich zwei Folgen hat: (1) Eine direkte Auswirkung auf das Membranpotential der Astrozyten und (indirekt) der Neurone sowie (2) eine Beeinträchtigung der astrozytären Kalium-Pufferungseigenschaften.

In zwei unabhängigen Studien am Hippocampus (Djukic et al., 2007) und am Rückenmark (Olsen et al., 2006) konnte gezeigt werden, dass $K_{ir}4.1$ -defiziente Astrozyten ein depolarisiertes Membranpotential aufweisen, ähnlich wie es in kultivierten Oligodendrozyten (Neusch et al., 2001) aus dem Rückenmark der Maus belegt wurde. Ein depolarisiertes Membranpotential führt wahrscheinlich zu einer generellen Beeinträchtigung des transmembranösen Stofftransports. Astrozyten nehmen z.B. mittels der Transporter EAAT1/GLAST und EAAT2/GLT1 (Torp et al., 1994, Lehre et al., 1995) den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat auf, der sonst nach neuronaler Aktivität im synaptischen Spalt akkumulieren würde, verstoffwechseln diesen und liefern die Produkte für eine Neusynthese von Glutamat zurück an die Neurone (Laake et al., 1995, Magistretti et al., 1999). In einer *in vitro* Studie (Kucheryavykh et al., 2007) konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Expression

funktioneller $K_{ir}4.1$ -Kanäle in der Membran kortikaler Astrozyten die Aufnahme von Glutamat behindert. Djukic et al. lieferten 2007 in einer Studie an einer konditionalen $K_{ir}4.1$ -KO-Maus den experimentellen Beweis hierfür an Astrozyten aus hippocampalen Schnitten. Bordey und Sontheimer, 2003 wiesen in einer *in situ* Studie nach, dass die Aufnahme von Glutamat in Bergmanngliazellen des Kleinhirns durch Depolarisation behindert wird. Die Depolarisation verschiebt den elektrochemischen Gradienten und vermindert so die Glutamataufnahme, die an den gleichzeitigen Transport von Natrium gebunden ist. Die extrazelluläre Akkumulation von Glutamat wirkt exzitotoxisch (Choi, 1987, Choi, 1988, Choi, 1995) auf Neurone und trägt vermutlich zur neuronalen Degeneration bei (Carriedo et al., 2000, Urushitani et al., 2001). Dies wird z.B. beim Schlaganfall und Trauma vermutet (Choi, 1988, Lipton und Rosenberg, 1994, Rothstein et al., 1995). Gleichzeitig ist denkbar, dass eine chronisch depolarisierte Membran zu einer Inaktivierung und Degradation spannungsabhängiger Transporter wie EAAT2/GLT1 oder der Na^+/K^+ -ATPase auf Gliazellen beitragen könnte. Rothstein und Kollegen zeigten erhöhte Glutamatmengen in der Zerebrospinalflüssigkeit von ALS-Patienten, wobei noch unklar ist, ob dies auf einer Beeinträchtigung von Glutamat-Transportern oder einer verminderten Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase beruht. Weiterhin wurde eine reduzierte Aktivität und Expression des menschlichen Glutamat-Transporters EAAT2 nachgewiesen (Rothstein et al., 1990, Rothstein et al., 1992, Rothstein et al., 1995). In Studien an mSOD1-assoziierten Tiermodellen konnte ebenfalls eine reduzierte Expression von GLT1 belegt werden (Bruijn et al., 1997b, Bendotti et al., 2001, Howland et al., 2002). Hier gibt es jedoch kontroverse Studien (Sasaki et al., 2001, Deitch et al., 2002). Die genauen Mechanismen, die zu der verminderten Aktivität und/oder Expression von EAAT2/GLT1 führen, sind ungeklärt. In mSOD1-assoziierten Mausmodellen führte z.B. die Wasserstoffperoxid-vermittelte Oxidation des Carboxyterminus von GLT1 zu einer verminderten Aktivität von GLT1 (Trotti et al., 1999). In einer *in vitro* Transfektionsstudie wurde eine verstärkte Internalisation und Abbau von GLT1 in einer mSOD^{G93A} - Zelllinie nachgewiesen, was vermutlich ebenfalls auf Modifikationen des zytosolischen Carboxyterminus von GLT1 zurückzuführen ist (Vanoni et al., 2004). Weiterhin werden Veränderungen auf genetischer Ebene diskutiert, hier gibt es jedoch kontroverse Ansichten (Bristol und Rothstein, 1996, Aoki et al., 1998, Lin et al., 1998, Bendotti et al., 2001). Inwieweit und ob die durch $K_{ir}4.1$ -Reduktion postulierte Membrandepolarisation die

Aktivität und Expression von GLUT1 im SOD^{G93A}-Mausmodell tatsächlich beeinflusst ist unklar. Weiterhin ist nicht bekannt, ob eine veränderte K_{ir}4.1-Expression die Glutamat-Transporter beeinflusst oder umgekehrt. Denkbar ist auch, dass beide Proteine unabhängig voneinander beeinflusst werden und dass sich die Effekte (siehe auch nächster Absatz) gegenseitig verstärken.

Aktuelle Studien aus dem Jahr 2007 erbrachten erstmals aussagekräftige Beweise dafür, dass ein Verlust oder eine Herabregulation von K_{ir}4.1-Kanälen zu einer verminderten Aufnahme von Kalium durch Astrozyten führt. Dies konnte *in situ* (Djukic et al., 2007) im Hippocampus gezeigt werden, sowie *in vitro* in kortikalen Astrozyten (Kucheryavykh et al., 2007). Ältere Studien belegen weiterhin, dass die Blockade von K_{ir}-Kanälen eine bis zu dreifache Erhöhung der basalen extrazellulären Kaliumkonzentration bewirkt (Gabriel et al., 1998, Jauch et al., 2002). Diese Daten untermauern die Hypothese dieser Arbeit, dass die Reduktion von K_{ir}4.1 über eine extrazelluläre Akkumulation von Kalium zu einer Degeneration von Motoneuronen beitragen kann. Neben K_{ir}4.1-Kanälen sind weitere Transportproteine in der Lage, Kalium aufzunehmen und so die Kaliumhomöostase zu regulieren. Dazu gehören die Na⁺/K⁺-ATPasen. D'Ambrosio et al., 2002 konnten im Hippocampus zeigen, dass die Na⁺/K⁺-ATPase und K_{ir}-Kanäle unterschiedliche Funktionen in der Regulation der extrazellulären Kaliumhomöostase in den verschiedenen Phasen der neuronalen Aktivität übernehmen. Die Autoren definierten die extrazelluläre Kaliumkonzentration bei Stimulation pyramidaler Neurone mit niedriger Frequenz von 0.05 Hz als Basallevel. Hochfrequente Stimulation (>0.01 Hz) führte zu einer extrazellulären Kaliumakkumulation. In ihrer Studie konnten die Autoren nachweisen, dass der basale Kaliumlevel durch eine kombinierte Aktivierung neuronaler und glialer Na⁺/K⁺-ATPasen sowie durch gliale K_{ir} reguliert wird. Während hochfrequenter Stimulation transportiert jedoch die Na⁺/K⁺-ATPase den Großteil des extrazellulär akkumulierten Kaliums ab, K_{ir}-Kanäle spielen hier nur eine untergeordnete Rolle. Durch die verzögerte Inaktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase nach Beendigung der elektrischen Aktivität kommt es zu einem 'überschießenden' Abtransport von Kalium, wodurch die extrazelluläre Kaliumkonzentration unter den Basallevel sinkt. Gliale K_{ir}-Kanäle sind im Hippocampus spezifisch dafür zuständig, diesen Abfall durch Extrusion von Kalium auszugleichen. Im respiratorischen Netzwerk des Hirnstammes konnte in Koauthorschaft (Neusch et al., 2006) gezeigt werden, dass der Ausgleich der überschießenden Reaktion der Na⁺/K⁺-

ATPase auch hier durch gliale K_{ir} -Kanäle vermittelt wird. Weiterhin sind K_{ir} -Kanäle im Hirnstamm an der Regulation des basalen Kaliumlevels beteiligt. Durch den Einsatz der $K_{ir}4.1$ -KO-Mauslinie konnte spezifisch belegt werden, dass der (hauptsächlich) zuständige K_{ir} in beiden Fällen hierfür $K_{ir}4.1$ ist. Die Ergebnisse dieser beiden Studien widersprechen partiell der Hypothese, dass $K_{ir}4.1$ eine Rolle bei der Aufnahme von überschüssig neuronal freigesetztem Kalium spielt. Diese Funktion wird dem Kanal u.a. in den Müllerzellen der Retina zugesprochen. Es ist jedoch durchaus möglich, dass $K_{ir}4.1$ in der Retina, dem Hippocampus und dem Hirnstamm unterschiedliche Aufgaben erfüllt. Zudem zeigten beide Studien, dass K_{ir} -Kanäle (Hirnstamm $K_{ir}4.1$) den basalen Kaliumlevel durch Aufnahme von Kalium in Gliazellen kontrollieren. Diese Aufgabe übernehmen die Kanäle aller Wahrscheinlichkeit auch im synaptischen Kompartiment. D'Ambrosio et al. wiesen auf die Wichtigkeit dieser Funktion unter pathophysiologischen Bedingungen hin, bei denen der basale Kaliumwert erhöht ist, wie z.B. bei einigen Formen der Epilepsie. Dies könnte u.a. mit einer Reduktion funktioneller K_{ir} -Kanäle in Verbindung stehen. Diese Hypothese ist besonders im Hinblick auf die ALS interessant, denn eine Reduktion der glialen $K_{ir}4.1$ -Kanäle könnte hier zu einer langsamen Erhöhung der basalen Kaliumkonzentration beitragen und somit Motoneurone chronisch depolarisieren.

Der genaue Beitrag von $K_{ir}4.1$ und der Na^+/K^+ -ATPase bei der Aufnahme von Kalium im Rückenmark ist bisher nicht geklärt. Interessanterweise konnte in der SOD^{G93A} -Maus eine generelle Reduktion aller drei katalytischen Untereinheiten der Na^+/K^+ -ATPase in u.a. Neuronen und Glia gezeigt werden (Ellis et al., 2003). In dem in dieser Arbeit verwendeten Mausmodell sind somit die zwei wesentlichen Membranproteine, die an der Regulation der extrazellulären Kaliumkonzentration beteiligt sind, betroffen. Dies unterstützt die Annahme einer Kaliumakkumulation und führt vermutlich zu einer Störung akuter wie chronischer Mechanismen der extrazellulären, perineuralen Kaliumregulation. Während die Reduktion der Na^+/K^+ -ATPase ubiquitär zu finden ist, konnte eine verminderte Expression von $K_{ir}4.1$ spezifisch im Ventralhorn des Rückenmarks nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass beide Proteine ggf. durch unterschiedliche Mechanismen reduziert werden.

Neben Astrozyten exprimieren ebenfalls Oligodendrozyten $K_{ir}4.1$. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Aussage darüber getroffen

werden, ob Oligodendrozyten in der grauen Substanz $K_{ir}4.1$ exprimieren, so dass letztlich ungeklärt bleibt, ob $K_{ir}4.1$ -defiziente Oligodendrozyten an der ALS-Pathologie in der grauen Substanz beteiligt sind.

Die Ursache der $K_{ir}4.1$ -Reduktion konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Es bleibt unklar, ob es zu einer Veränderung auf genetischer Ebene oder zu einer verstärkten Internalisation mit nachfolgendem Abbau kommt. Es ist unwahrscheinlich, dass die Reduktion der $K_{ir}4.1$ -Kanäle direkt mit der Überexpression der mutierten SOD1 in Verbindung steht. Die mSOD1 wird ubiquitär exprimiert. Die Reduktion des $K_{ir}4.1$ -Proteins wurde jedoch spezifisch im Ventralhorn des Rückenmarks nachgewiesen. Es konnte keine Pathologie im Kleinhirn gezeigt werden, auch das Dorsalhorn des Rückenmarks war schwächer betroffen. Es wäre denkbar, dass Astrozyten im Rahmen einer Gliose als Folge veränderter Genexpression und metabolischer Prozesse ein alteriertes Spektrum von Membranproteinen exprimieren. Der astrogliale Wasserkanal AQP4 konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch in unveränderter Menge im Rückenmark von SOD^{G93A}-Tieren nachgewiesen werden. Eine weitere Studie zeigte ebenfalls eine Reduktion von GLT1 im Ventralhorn des Rückenmarks von SOD^{G93A}-Tieren, während die GLAST-Expression (GLAST, Glutamat-Aspartat-Transporter) sich unverändert zeigte (Bendotti et al., 2001). Dies weist darauf hin, dass im Rahmen der SOD1-vermittelten Astroglieose nur bestimmte Membranproteine in verminderter Form exprimiert werden. Die Überprüfung der $K_{ir}4.1$ -Expression bei weiteren neurodegenerativen Erkrankungen sollte daher Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

6.3.2. Eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration induziert Zelltod in der Motoneuron-Zelllinie NSC34

Im Hinblick auf die subzelluläre Expression von $K_{ir}4.1$ unter physiologischen Bedingungen wird in dieser Arbeit vorgeschlagen, dass die Reduktion von $K_{ir}4.1$ im SOD1^{G93A}-Mausmodell zu einer extrazellulären Kaliumakkumulation führt, welche toxisch auf Motoneurone wirkt. In einem weiteren Schritt wurde daher versucht zu klären, ob eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration zu degenerativen Prozessen von Motoneuronen führt. Dazu wurde die Motoneuron-ähnliche Zelllinie NSC34 steigenden extrazellulären Kaliumkonzentrationen ausgesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine Erhöhung der Kaliumkonzentration um 10 mM, die *in vivo* im synaptischen Kompartiment erreicht werden kann (Gabriel et al., 1998, D'Ambrosio et

al., 2002, Jauch et al., 2002), zum erhöhten Zelltod von NSC34-Zellen nach 120 Stunden führte. Geringere Expositionszeiten führten nicht zu einem signifikanten Absterben der Zellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine chronische Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration motoneuronalen Zelltod induzieren kann. Die Barium-induzierte Reduktion des Kalium-vermittelten Zellsterbens weist darauf hin, dass die Zelltodmechanismen abhängig vom Kaliumeinstrom in die NSC34-Zellen sind. Da es sich um ein *in vitro*-Modell handelt, ist ein direkter Rückschluss auf die Pathomechanismen unter *in vivo*-Bedingungen nicht möglich. Dennoch ist es sehr wahrscheinlich, dass die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration *in vivo* durch Depolarisation der umgebenden Zellen zu einer Beeinträchtigung der neuronalen Funktion führt. Der degenerative Effekt einer Depolarisation auf Motoneurone wurde in einer Vielzahl von Studien belegt (Choi, 1988, Lipton und Rosenberg, 1994, Gabriel et al., 1998, Carriedo et al., 2000, Urushitani et al., 2001, Jauch et al., 2002, Djukic et al., 2007, Kucheryavykh et al., 2007). In einer aktuellen Studie (Djukic et al., 2007) am Hippocampus von $K_{ir}4.1$ -KO-Tieren wurde eine verstärkte synaptische Potenzierung in pyramidalen Neuronen gezeigt. Es ist denkbar, dass eine solchermaßen erhöhte neuronale Aktivität in anderen Geweben langfristig zu degenerativen Prozessen in Neuronen beiträgt. Die Reduktion von $K_{ir}4.1$ stellt einen weiteren Pathomechanismus zur Diskussion, der durch die Kalium-Exzitotoxizität einen wesentlichen Einfluss auf die fortschreitende motoneuronale Degeneration hat. Insbesondere angesichts möglicher kombinierter Effekte durch Beeinträchtigung der Expression von $K_{ir}4.1$, der Na^+/K^+ -ATPase und Glutamat-Transportern erscheinen Störungen der Neuron-Glia Interaktion mit nachfolgender Exzitotoxizität ein wesentlicher pathogenetischer Faktor bei der ALS zu sein.

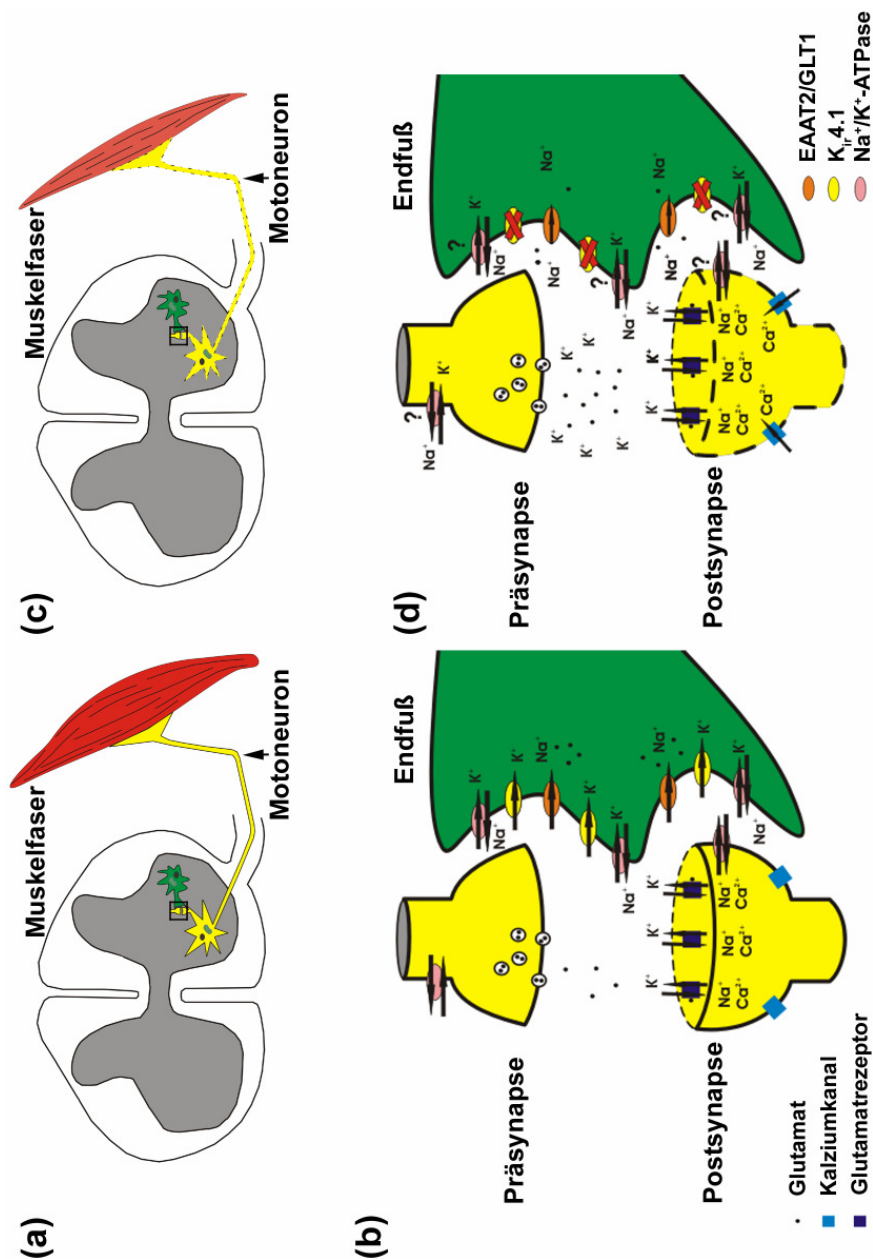


Abb. 35: Exzitotoxizität bei der ALS im Tiermodell. (a, b) Na^+/K^+ -ATPasen und gliale $\text{K}_{\text{ir}}4.1$ -Kanäle nehmen neuronal freigesetztes Kalium auf. Gliale EAAT2/GLT1-Transporter beseitigen Glutamat aus dem synaptischen Bereich. (c, d) Die Reduktion glialer $\text{K}_{\text{ir}}4.1$ -Kanäle führt zu einer extrazellulären Akkumulation von Kalium. Dies bewirkt eine Depolarisation der Motoneurone. In diesen werden spannungsgesteuerte Kalziumkanäle geöffnet, dies trägt zur Degeneration der Motoneurone bei. Gleichzeitig kommt es zu einer Reduktion der Aktivität und Expression von EAAT2/GLT1 (durch $\text{K}_{\text{ir}}4.1$ -vermittelte Depolarisation?). Dies verstärkt die exzitotoxischen Effekte über Kalziumeinstrom durch Glutamatrezeptoren. Im SOD^{G93A} -Mausmodell ist zusätzlich eine verminderte Expression der Na^+/K^+ -ATPase beschrieben, dies verstärkt die extrazelluläre Kaliumakkumulation. (c) Die exzitotoxischen Mechanismen führen zu einer Degeneration der Motoneurone (und präsynaptischen Bereiche) und Muskelschwächung. (b) und (c) stellen Vergrößerungen der unter (a) und (c) hervorgehobenen synaptischen Region dar. Zur Vereinfachung wird die Innervation des Muskels durch die Innervation einer einzelnen Muskelkelfaser durch das respektive Motoneuron dargestellt.

Im Hinblick auf die in dieser Arbeit postulierte Rolle von $K_{ir}4.1$ in der Volumenregulation astrozytärer Fortsätze ergibt sich eine weitere interessante Frage: Könnte die Beeinträchtigung der Volumenregulation durch Reduktion von $K_{ir}4.1$ -Kanälen in der Pathogenese der ALS eine Rolle spielen? Lokale Ionenstrom-vermittelte Volumenveränderungen spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von transienten Zellausstülpungen (Condeelis, 1993, Lauffenburger und Horwitz, 1996, Zierler et al., 2008). Gerade im Bereich der Synapse wurde eine hohe Motilität astrozytärer Fortsätze beobachtet (Hirrlinger et al., 2004). $K_{ir}4.1$ könnte über Einstrom bzw. Ausstrom von Kalium an diesem Prozess über einen Gradientenaufbau beteiligt sein oder indirekt über Veränderungen des RMP weitere Kanäle steuern. Die Reduktion von $K_{ir}4.1$ -Kanälen könnte die dynamische Reorganisation der Fortsätze im synaptischen Bereich und damit die Neuron-Glia Interaktion beeinträchtigen. Da an diesem Prozess eine Vielzahl von Kanälen beteiligt ist, bleibt diese Vermutung rein spekulativ

Ein Großteil der ALS-Erforschung basiert auf der Untersuchung von transgenen Mausmodellen der Erkrankung. Ziel ist es, die Ergebnisse dieser Forschung auf die humane ALS-Erkrankung zu übertragen, ihre Entstehung und den Verlauf zu verstehen. Hieraus ließen sich z.B. Therapieansätze zur Linderung des Krankheitsverlaufs oder ursächlichen Behandlung der Erkrankung erarbeiten. In der vorliegenden Arbeit konnte proteinbiochemisch gezeigt werden, dass $K_{ir}4.1$ im adulten humanen Rückenmark exprimiert wird und dass das Bandenmuster im Western Blot dem der Maus sehr ähnelt. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass $K_{ir}4.1$ auf den Fortsätzen von Astrozyten exprimiert wird. Dies entspricht weitgehend dem Expressionsverhalten in der Maus, so dass vermutet werden kann, dass $K_{ir}4.1$ ebenfalls im menschlichen Rückenmark eine Rolle in der Regulation der Kaliumhomöostase spielt. Eine Reduktion von $K_{ir}4.1$ könnte somit in der menschlichen ALS-Erkrankung zu exzitotoxischen Mechanismen beitragen. Die Analyse der $K_{ir}4.1$ -Expression im Rückenmark von ALS-Patienten konnte in dieser Arbeit nicht vorgenommen werden. Die Krankheitsverläufe sind unterschiedlich und eine sinnvolle Analyse erfordert die Untersuchung eines großen Datensatzes. Dies sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

7. Zusammenfassung/Summary

7.1. Zusammenfassung

Innerhalb des letzten Jahrzehnts wurde immer deutlicher, dass einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle (K_{ir}) neben ihrer klassischen Rolle im Aufbau und der Konstanthaltung des Ruhemembranpotentials weitere zellspezifische Aufgaben erfüllen.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels transgener Maustechnologie gezeigt werden, dass $K_{ir4.1}$ früh postnatal zunächst Zellkörper-assoziiert auf Oligodendrozyten in der weißen Substanz des Rückenmarks exprimiert wird. Im weiteren Verlauf der Entwicklung kommt es zu einer Hochregulation der Proteinexpression auf perivaskulären und perineuralen astrozytären Fortsätzen in der grauen Substanz. Hier konnte die Kolokalisation von $K_{ir4.1}$ und einem Wasserkanal (AQP4) auf astroglialen Endfüßen nachgewiesen werden. Das $K_{ir4.1}$ -Expressionsmuster im Rückenmark legt eine Rolle des Kanals in der Kaliumpufferung und möglicherweise in der Kalium-gesteuerten Volumenregulation nahe.

Basierend auf den Ergebnissen der Expressionsstudie dieser Arbeit wurde die konkrete Hypothese aufgestellt, dass $K_{ir4.1}$ -Kanäle mittels Kontrolle des transmembranösen Kaliumtransports einen Einfluss auf die osmotische Volumenregulation von Astrozyten haben. Anhand eines Modellsystems konnte unter Verwendung konfokaler 2-Photonen-Lasermikroskopie gezeigt werden, dass die genetische Inaktivierung von $K_{ir4.1}$ im Knock-Out-Mausmodell zu einer Beeinträchtigung der Wassersekretion aus astrozytären Fortsätzen mit nachfolgender Schwellung führt. Dies zeigt, dass $K_{ir4.1}$ -Kanäle wesentlich zur Volumenregulation in Astrozyten beitragen und dass der Kalium-sekretorische Volumenausgleich über astrogliale Endfüße vermittelt wird. Eine Beeinträchtigung von Expression oder Funktion astroglialer $K_{ir4.1}$ -Kanäle könnte unter pathophysiologischen Bedingungen zu einer Anschwellung von Astrozyten und Verringerung des extrazellulären Raumes beitragen.

Eine mögliche pathogenetische Bedeutung von glialen $K_{ir4.1}$ -Kanälen bei neurodegenerativen Erkrankungen wurde anhand eines etablierten Tiermodells für die Motoneuronenerkrankung Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) untersucht. Erstmals konnte eine Krankheits-assoziierte, fortschreitende Reduktion der $K_{ir4.1}$ -Expression im Ventralhorn des

Rückenmarks im SOD1-vermittelten ALS-Mausmodell nachgewiesen werden. Die daraus resultierende extrazelluläre Akkumulation von Kalium könnte durch chronische Depolarisation der Membran der Motoneurone zu deren Tod beitragen. Diese Schlussfolgerung unterstützend konnte in einem *in vitro* Modellsystem gezeigt werden, dass eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration neurotoxisch wirkt. Die differentielle Expression von $K_{ir}4.1$ im Rückenmark und die daraus abgeleitete Bedeutung für die Neuron-Glia Interaktion unter physiologischen und pathophysiologischen Aspekten unterstützt die Sichtweise einer dynamischen Interaktion von neuronalen und glialen Zellen im gesunden und kranken Gewebe.

7.2. Summary

In the last decade it became more and more obvious, that inwardly-rectifying potassium channels (K_{ir}), beside their classical role in establishing and maintaining the resting membrane potential, serve additional cell-specific functions.

Using transgene mouse technology the data of this study reveal that in early postnatal days the $K_{ir}4.1$ channel is expressed on oligodendrocyte cell bodies in the spinal cord white matter, whereas subsequently an upregulation of $K_{ir}4.1$ protein expression in gray matter is observed. Here, $K_{ir}4.1$ is mainly associated with the perivascular and perineural astrocytic network, where it colocalizes with a water channel (AQP4). The $K_{ir}4.1$ expression pattern in the spinal cord is therefore suitable for a role in potassium buffering and potassium-driven water homeostasis.

Based on the results of the expression study in this thesis, it was hypothesised that $K_{ir}4.1$ channels have an impact on astrocyte volume regulation by controlling the transmembrane potassium transport. By using a model system based on 2-photon-confocal lasermicroscopy it was shown that the genetic inactivation of $K_{ir}4.1$ in a knock-out mouse model results in impaired water secretion from astrocytic processes and endfeet with subsequent swelling. This reveals that $K_{ir}4.1$ channels are an important component of astrocyte volume regulation and that potassium-secretory volume regulation is attributed to astroglial endfeet. An impairment in $K_{ir}4.1$ expression or function could therefore contribute to astrocyte swelling in pathophysiological conditions.

A possible pathogenetic role for glial $K_{ir}4.1$ -channels in neurodegenerative diseases was investigated using an established animal model for the motoneuron disease Amyotrophic Lateral sclerosis (ALS). This study for the first time provides evidence for a disease-associated, progressive reduction of $K_{ir}4.1$ expression in the ventral horn of the spinal cord in a SOD1 related ALS mouse model. The resulting extracellular accumulation of potassium could contribute to motoneuron death due to chronic membrane depolarisation. In support of this conclusion, an elevated extracellular potassium concentration was proven to be neurotoxic in an *in vitro* model system. The differential expression of $K_{ir}4.1$ in the spinal cord and its specific importance for neuron-glia interaction in physiological and pathophysiological conditions supports the view of a dynamic interaction between neuronal and glial cells in health and disease.

8. Anhang

8.1. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Funktion von Astrozyten im adulten gesunden Gewebe
- Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der Kaliumpufferung durch Astrozyten
- Abb. 3: Mögliche Rolle von Astrozyten in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen
- Abb. 4: Klassifikation von Kaliumkanälen
- Abb. 5: Phylogenetischer Stammbaum der K_{ir} -Familie
- Abb. 6: Exemplarische Strom-Spannungsbeziehung eines stark und eines schwach einwärts-gleichrichtenden K_{ir}
- Abb. 7: Schematische Darstellung der Rolle von $K_{ir4.1}$ bei der Schwellung von Müllerzellen in der postischämischen Retina
- Abb. 8: Motoneurone sind bei der ALS selektiv betroffen
- Abb. 9: Die verschiedenen toxischen Effekte der mSOD1 bei der Degeneration von Motoneuronen
- Abb. 10: Versuchsaufbau für die Schwellungsexperimente
- Abb. 11: Darstellung des Versuchsprotokolls
- Abb. 12: Bindeverhalten des anti- $K_{ir4.1}$ -Antikörpers
- Abb. 13: Test der Spezifität der anti-AQP4-Antikörper
- Abb. 14: Expression von $K_{ir4.1}$ in gemischten glialen Kulturen des Rückenmarks der Maus
- Abb. 15: Immunhistologische und proteinbiochemische Analyse der Expression von $K_{ir4.1}$ im Rückenmark der Maus
- Abb. 16: Zelluläre Expression von $K_{ir4.1}$ *in situ* im Rückenmark der Maus
- Abb. 17: $K_{ir4.1}$ -Expression im adulten Rückenmark der Maus
- Abb. 18: $K_{ir4.1}$ wird nicht auf Motoneuronen exprimiert
- Abb. 19: Detektion des $K_{ir4.1}$ -Proteins auf perivaskulären Endfüßen von Astrozyten im Rückenmark
- Abb. 20: Die Expression des AQP4-Proteins *in vitro* ist unabhängig von der genetischen Inaktivierung des $K_{ir4.1}$ -Gens
- Abb. 21: Kolokalisierte Expression des $K_{ir4.1}$ -Proteins und des AQP4-Proteins im Rückenmark der Maus
- Abb. 22: Subzelluläre Verteilung von $K_{ir4.1}$ und AQP4 im adulten Ventralhorn der Maus
- Abb. 23: Die Expression von AQP4 auf astrozytären Fortsätzen ist unabhängig vom $K_{ir4.1}$ -Genotyp *in situ*
- Abb. 24: Exemplarische Darstellung der Datenbearbeitung der Schwellungsexperimente
- Abb. 25: Darstellung des Schwellungsverhaltens von Astrozyten nach hypoosmotischem osmotischem Stress

- Abb. 26: Schwellung der Zellkörper und Fortsätze von Astrozyten aus dem ventralen Rückenmark in Abhängigkeit vom Kir4.1-Genotyp
- Abb. 27: Kir4.1-Expressionsanalyse in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium
- Abb. 28: Proteinbiochemische Analyse der Kir4.1-Proteinmenge in Rückenmarkslysaten
- Abb. 29: Die Abnahme der Kir4.1-Proteinmenge ist nicht durch die ubiquitäre Expression des SOD1-transgenen Proteins bedingt
- Abb. 30: Voranschreitende Reduktion des Kir4.1-Proteins im Krankheitsverlauf
- Abb. 31: Proteinbiochemische Analyse der astrozytären Proteine GFAP und AQP4
- Abb. 32: Statistische Auswertung der Kalium-Exzitotoxizitätsexperimente in Kultur
- Abb. 33: Expression von Kir4.1 auf GFAP-positiven Astrozyten im menschlichen Rückenmark
- Abb. 34: Postulierte Rolle von Kir4.1 in der Volumenregulation von astroglialen Endfüßen.
- Abb. 35: Exzitotoxizität bei der ALS im Tiermodell

8.2. Referenzen

- Abraham, M. R., Jahangir, A., Alekseev, A. E. und Terzic, A., 1999. Channelopathies of inwardly rectifying potassium channels. *Faseb J.* 13, 1901-1910.
- Agre, P., Saboori, A. M., Asimos, A. und Smith, B. L., 1987. Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen. *J Biol Chem.* 262, 17497-17503.
- Albo, F., Pieri, M. und Zona, C., 2004. Modulation of AMPA receptors in spinal motor neurons by the neuroprotective agent riluzole. *J Neurosci Res.* 78, 200-207.
- Alexianu, M. E., Ho, B. K., Mohamed, A. H., La Bella, V., Smith, R. G. und Appel, S. H., 1994. The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 36, 846-858.
- Alexianu, M. E., Kozovska, M. und Appel, S. H., 2001. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology.* 57, 1282-1289.
- Allen, N. J. und Barres, B. A., 2005. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 15, 542-548.
- Almer, G., Teismann, P., Stevic, Z., Halaschek-Wiener, J., Deecke, L., Kostic, V. und Przedborski, S., 2002. Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. *Neurology.* 58, 1277-1279.
- Aloisi, F., 2001. Immune function of microglia. *Glia.* 36, 165-179.
- Amiry-Moghaddam, M., Williamson, A., Palomba, M., Eid, T., de Lanerolle, N. C., Nagelhus, E. A., Adams, M. E., Froehner, S. C., Agre, P. und Ottersen, O. P., 2003. Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 13615-13620.
- Anand, P., Parrett, A., Martin, J., Zeman, S., Foley, P., Swash, M., Leigh, P. N., Cedarbaum, J. M., Lindsay, R. M., Williams-Chestnut, R. E. und et al., 1995. Regional changes of ciliary neurotrophic factor and nerve growth factor levels in post mortem spinal cord and cerebral cortex from patients with motor disease. *Nat Med.* 1, 168-172.
- Andersen, P. M., Nilsson, P., Ala-Hurula, V., Keranen, M. L., Tarvainen, I., Haltia, T., Nilsson, L., Binzer, M., Forsgren, L. und Marklund, S. L., 1995. Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. *Nat Genet.* 10, 61-66.
- Andersen, P. M., Nilsson, P., Keranen, M. L., Forsgren, L., Hagglund, J., Karlsborg, M., Ronnevi, L. O., Gredal, O. und Marklund, S. L., 1997. Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia. *Brain.* 120 (Pt 10), 1723-1737.
- Ando, M. und Takeuchi, S., 1999. Immunological identification of an inward rectifier K⁺ channel (Kir4.1) in the intermediate cell (melanocyte) of the cochlear stria vascularis of gerbils and rats. *Cell Tissue Res.* 298, 179-183.

- Annegers, J. F., Appel, S., Lee, J. R. und Perkins, P., 1991. Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in Harris County, Texas, 1985-1988. *Arch Neurol.* 48, 589-593.
- Aoki, M., Lin, C. L., Rothstein, J. D., Geller, B. A., Hosler, B. A., Munsat, T. L., Horvitz, H. R. und Brown, R. H., Jr., 1998. Mutations in the glutamate transporter EAAT2 gene do not cause abnormal EAAT2 transcripts in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 43, 645-653.
- Appel, S. H., Smith, R. G., Alexianu, M. F., Engelhardt, J. I. und Stefani, E., 1995. Autoimmunity as an etiological factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol.* 68, 47-57.
- Araque, A., 2006. Astrocyte-neuron signaling in the brain--implications for disease. *Curr Opin Investig Drugs.* 7, 619-624.
- Araque, A., Carmignoto, G. und Haydon, P. G., 2001. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol.* 63, 795-813.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P. und Haydon, P. G., 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208-215.
- Arcangeli, A., Becchetti, A., Mannini, A., Mugnai, G., De Filippi, P., Tarone, G., Del Bene, M. R., Barletta, E., Wanke, E. und Olivotto, M., 1993. Integrin-mediated neurite outgrowth in neuroblastoma cells depends on the activation of potassium channels. *J Cell Biol.* 122, 1131-1143.
- Arcangeli, A., Bianchi, L., Becchetti, A., Faravelli, L., Coronello, M., Mini, E., Olivotto, M. und Wanke, E., 1995. A novel inward-rectifying K⁺ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. *J Physiol.* 489 (Pt 2), 455-471.
- Aschner, M., 2000. Astrocytic swelling, phospholipase A2, glutathione and glutamate: interactions in methylmercury-induced neurotoxicity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 46, 843-854.
- Bachoo, R. M., Kim, R. S., Ligon, K. L., Maher, E. A., Brennan, C., Billings, N., Chan, S., Li, C., Rowitch, D. H., Wong, W. H. und DePinho, R. A., 2004. Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 8384-8389.
- Badaut, J., Lasbennes, F., Magistretti, P. J. und Regli, L., 2002. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22, 367-378.
- Barbeito, L. H., Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Peluffo, H., Viera, L., Estevez, A. G. und Beckman, J. S., 2004. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev.* 47, 263-274.
- Barres, B. A., 1991. Glial ion channels. *Curr Opin Neurobiol.* 1, 354-359.
- Barres, B. A., Chun, L. L. und Corey, D. P., 1990a. Ion channels in vertebrate glia. *Annu Rev Neurosci.* 13, 441-474.
- Barres, B. A., Koroshetz, W. J., Swartz, K. J., Chun, L. L. und Corey, D. P., 1990b. Ion channel expression by white matter glia: the O-2A glial progenitor cell. *Neuron.* 4, 507-524.

- Baumann, N. und Pham-Dinh, D., 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 81, 871-927.
- Beal, M. F., Ferrante, R. J., Browne, S. E., Matthews, R. T., Kowall, N. W. und Brown, R. H., Jr., 1997. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 42, 644-654.
- Beaudu-Lange, C., Despeyroux, S., Marcaggi, P., Coles, J. A. und Amedee, T., 1998. Functional Ca²⁺ and Na⁺ channels on mouse Schwann cells cultured in serum-free medium: regulation by a diffusible factor from neurons and by cAMP. *Eur J Neurosci.* 10, 1796-1809.
- Beaulieu, J. M., Nguyen, M. D. und Julien, J. P., 1999. Late onset of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin. *J Cell Biol.* 147, 531-544.
- Beckman, J. S., Estevez, A. G., Crow, J. P. und Barbeito, L., 2001. Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. *Trends Neurosci.* 24, S15-20.
- Belin, M. F. und Hardin, H., 1991. [Neuron-glia interactions]. *Encephale.* 17, 467-473.
- Benatar, M., 2000. Neurological potassium channelopathies. *Qjm.* 93, 787-797.
- Bendotti, C., Tortarolo, M., Suchak, S. K., Calvaresi, N., Carvelli, L., Bastone, A., Rizzi, M., Rattray, M. und Mennini, T., 2001. Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *J Neurochem.* 79, 737-746.
- Bensimon, G., Lacomblez, L. und Meininger, V., 1994. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med.* 330, 585-591.
- Bergles, D. E., Diamond, J. S. und Jahr, C. E., 1999. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr Opin Neurobiol.* 9, 293-298.
- Bergles, D. E. und Jahr, C. E., 1997. Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron.* 19, 1297-1308.
- Biggin, P. C., Roosild, T. und Choe, S., 2000. Potassium channel structure: domain by domain. *Curr Opin Struct Biol.* 10, 456-461.
- Binder, D. K., Yao, X., Verkman, A. S. und Manley, G. T., 2006. Increased seizure duration in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Acta Neurochir Suppl.* 96, 389-392.
- Bischoff, F. R. und Ponstingl, H., 1991. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature.* 354, 80-82.
- Blanc, E. M., Keller, J. N., Fernandez, S. und Mattson, M. P., 1998. 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, impairs glutamate transport in cortical astrocytes. *Glia.* 22, 149-160.
- Boillee, S., Vande Velde, C. und Cleveland, D. W., 2006. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron.* 52, 39-59.
- Bonfanti, L. und Peretto, P., 2007. Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. *Prog Neurobiol.* 83, 24-36.
- Booth, G. E., Kinrade, E. F. und Hidalgo, A., 2000. Glia maintain follower neuron survival during *Drosophila* CNS development. *Development.* 127, 237-244.

- Bordey, A. und Sontheimer, H., 1997. Postnatal development of ionic currents in rat hippocampal astrocytes in situ. *J Neurophysiol.* 78, 461-477.
- Bordey, A. und Sontheimer, H., 1998. Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci. *Epilepsy Res.* 32, 286-303.
- Bordey, A. und Sontheimer, H., 2000. Ion channel expression by astrocytes in situ: comparison of different CNS regions. *Glia.* 30, 27-38.
- Bordey, A. und Sontheimer, H., 2003. Modulation of glutamatergic transmission by bergmann glial cells in rat cerebellum in situ. *J Neurophysiol.* 89, 979-988.
- Bredt, D. S., Wang, T. L., Cohen, N. A., Guggino, W. B. und Snyder, S. H., 1995. Cloning and expression of two brain-specific inwardly rectifying potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 6753-6757.
- Bringmann, A., Biedermann, B. und Reichenbach, A., 1999. Expression of potassium channels during postnatal differentiation of rabbit Muller glial cells. *Eur J Neurosci.* 11, 2883-2896.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., Osborne, N. N. und Reichenbach, A., 2006. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 25, 397-424.
- Bringmann, A., Uckermann, O., Pannicke, T., Iandiev, I., Reichenbach, A. und Wiedemann, P., 2005. Neuronal versus glial cell swelling in the ischaemic retina. *Acta Ophthalmol Scand.* 83, 528-538.
- Bristol, L. A. und Rothstein, J. D., 1996. Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Ann Neurol.* 39, 676-679.
- Bruening, W., Roy, J., Giasson, B., Figlewicz, D. A., Mushynski, W. E. und Durham, H. D., 1999. Up-regulation of protein chaperones preserves viability of cells expressing toxic Cu/Zn-superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 72, 693-699.
- Bruijn, L. I., Beal, M. F., Becher, M. W., Schulz, J. B., Wong, P. C., Price, D. L. und Cleveland, D. W., 1997a. Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 7606-7611.
- Bruijn, L. I., Becher, M. W., Lee, M. K., Anderson, K. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Sisodia, S. S., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Price, D. L. und Cleveland, D. W., 1997b. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron.* 18, 327-338.
- Bruijn, L. I. und Cleveland, D. W., 1996. Mechanisms of selective motor neuron death in ALS: insights from transgenic mouse models of motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 22, 373-387.
- Bruijn, L. I., Houseweart, M. K., Kato, S., Anderson, K. L., Anderson, S. D., Ohama, E., Reaume, A. G., Scott, R. W. und Cleveland, D. W., 1998. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science.* 281, 1851-1854.

- Bruijn, L. I., Miller, T. M. und Cleveland, D. W., 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci.* 27, 723-749.
- Bush, T. G., Puvanachandra, N., Horner, C. H., Polito, A., Ostefeld, T., Svendsen, C. N., Mucke, L., Johnson, M. H. und Sofroniew, M. V., 1999. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron.* 23, 297-308.
- Butt, A. M. und Kalsi, A., 2006. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med.* 10, 33-44.
- Butt, A. M. und Ransom, B. R., 1993. Morphology of astrocytes and oligodendrocytes during development in the intact rat optic nerve. *J Comp Neurol.* 338, 141-158.
- Cardin, V., Pena-Segura, C. und Pasantes-Morales, H., 1999. Activation and inactivation of taurine efflux in hyposmotic and isosmotic swelling in cortical astrocytes: role of ionic strength and cell volume decrease. *J Neurosci Res.* 56, 659-667.
- Carpenter, S., 1968. Proximal axonal enlargement in motor neuron disease. *Neurology.* 18, 841-851.
- Carriedo, S. G., Sensi, S. L., Yin, H. Z. und Weiss, J. H., 2000. AMPA exposures induce mitochondrial Ca(2+) overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci.* 20, 240-250.
- Carriedo, S. G., Yin, H. Z. und Weiss, J. H., 1996. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci.* 16, 4069-4079.
- Cashman, N. R., Durham, H. D., Blusztajn, J. K., Oda, K., Tabira, T., Shaw, I. T., Dahrouge, S. und Antel, J. P., 1992. Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn.* 194, 209-221.
- Cassina, P., Pehar, M., Vargas, M. R., Castellanos, R., Barbeito, A. G., Estevez, A. G., Thompson, J. A., Beckman, J. S. und Barbeito, L., 2005. Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 93, 38-46.
- Cassina, P., Peluffo, H., Pehar, M., Martinez-Palma, L., Ressia, A., Beckman, J. S., Estevez, A. G. und Barbeito, L., 2002. Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *J Neurosci Res.* 67, 21-29.
- Chan, P. H., Chu, L., Chen, S. F., Carlson, E. J. und Epstein, C. J., 1990. Reduced neurotoxicity in transgenic mice overexpressing human copper-zinc-superoxide dismutase. *Stroke.* 21, III80-82.
- Charcot, J. M. und Joffray, A., 1869. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol Neurolb Pathol.* 2, 744.
- Charles, A. C., Merrill, J. E., Dirksen, E. R. und Sanderson, M. J., 1991. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron.* 6, 983-992.
- Chen, Y. Z., Bennett, C. L., Huynh, H. M., Blair, I. P., Puls, I., Irobi, J., Dierick, I., Abel, A., Kennerson, M. L., Rabin, B. A., Nicholson, G. A., Auer-Grumbach, M., Wagner, K., De Jonghe, P., Griffin, J. W., Fischbeck, K. H., Timmerman, V., Cornblath, D.

- R. und Chance, P. F., 2004. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet.* 74, 1128-1135.
- Choe, S., 2002. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci.* 3, 115-121.
- Choi, D. W., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* 7, 369-379.
- Choi, D. W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1, 623-634.
- Choi, D. W., 1995. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* 18, 58-60.
- Chou, S. M. und Fakadej, A. V., 1971. Ultrastructure of chromatolytic motoneurons and anterior spinal roots in a case of Werdnig-Hoffmann disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 30, 368-379.
- Clement, A. M., Nguyen, M. D., Roberts, E. A., Garcia, M. L., Boillee, S., Rule, M., McMahon, A. P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R. J., Brown, R. H., Jr., Julien, J. P., Goldstein, L. S. und Cleveland, D. W., 2003. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science.* 302, 113-117.
- Cleveland, D. W. und Liu, J., 2000. Oxidation versus aggregation - how do SOD1 mutants cause ALS? *Nat Med.* 6, 1320-1321.
- Cleveland, D. W. und Rothstein, J. D., 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci.* 2, 806-819.
- Condeelis, J., 1993. Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu Rev Cell Biol.* 9, 411-444.
- Connors, N. C., Adams, M. E., Froehner, S. C. und Kofuji, P., 2004. The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J Biol Chem.* 279, 28387-28392.
- Connors, N. C. und Kofuji, P., 2002. Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells. *J Neurosci.* 22, 4321-4327.
- Connors, N. C. und Kofuji, P., 2006. Potassium channel Kir4.1 macromolecular complex in retinal glial cells. *Glia.* 53, 124-131.
- Coomber, B. L. und Stewart, P. A., 1986. Three-dimensional reconstruction of vesicles in endothelium of blood-brain barrier versus highly permeable microvessels. *Anat Rec.* 215, 256-261.
- Copani, A., Canonico, P. L., Catania, M. V., Aronica, E., Bruno, V., Ratti, E., van Amsterdam, F. T., Gaviraghi, G. und Nicoletti, F., 1991. Interaction between beta-N-methylamino-L-alanine and excitatory amino acid receptors in brain slices and neuronal cultures. *Brain Res.* 558, 79-86.
- Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S. und Smith, S. J., 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science.* 247, 470-473.
- Cotrina, M. und Nedergaard, M., 2005. Intracellular calcium control mechanisms in glia. In: Kettenmann, H. and Ransom, B. (Eds.), *Neuroglia.* Oxford University Press, New York, pp. 229-239.

- Cotrina, M. L. und Nedergaard, M., 2002. Astrocytes in the aging brain. *J Neurosci Res.* 67, 1-10.
- Cox, P. A. und Sacks, O. W., 2002. Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology.* 58, 956-959.
- Crow, J. P., Sampson, J. B., Zhuang, Y., Thompson, J. A. und Beckman, J. S., 1997. Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *J Neurochem.* 69, 1936-1944.
- Cudkovicz, M. E., McKenna-Yasek, D., Sapp, P. E., Chin, W., Geller, B., Hayden, D. L., Schoenfeld, D. A., Hosler, B. A., Horvitz, H. R. und Brown, R. H., 1997. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 41, 210-221.
- Cui, N., Giwa, L. R., Xu, H., Rojas, A., Abdulkadir, L. und Jiang, C., 2001. Modulation of the heteromeric Kir4.1-Kir5.1 channels by P(CO₂) at physiological levels. *J Cell Physiol.* 189, 229-236.
- Dal Canto, M. C. und Gurney, M. E., 1994. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol.* 145, 1271-1279.
- Dalloz, C., Sarig, R., Fort, P., Yaffe, D., Bordais, A., Pannicke, T., Grosche, J., Mornet, D., Reichenbach, A., Sahel, J., Nudel, U. und Rendon, A., 2003. Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Hum Mol Genet.* 12, 1543-1554.
- D'Ambrosio, R., Gordon, D. S. und Winn, H. R., 2002. Differential role of KIR channel and Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-pump in the regulation of extracellular K⁽⁺⁾ in rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 87, 87-102.
- D'Ambrosio, R., Wenzel, J., Schwartzkroin, P. A., McKhann, G. M., 2nd und Janigro, D., 1998. Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J Neurosci.* 18, 4425-4438.
- Danbolt, N. C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65, 1-105.
- Deitch, J. S., Alexander, G. M., Del Valle, L. und Heiman-Patterson, T. D., 2002. GLT-1 glutamate transporter levels are unchanged in mice expressing G93A human mutant SOD1. *J Neurol Sci.* 193, 117-126.
- Deitmer, J. W., Verkhratsky, A. J. und Lohr, C., 1998. Calcium signalling in glial cells. *Cell Calcium.* 24, 405-416.
- Delisle, M. B. und Carpenter, S., 1984. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 63, 241-250.
- Deng, H. X., Hentati, A., Tainer, J. A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W. Y., Getzoff, E. D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R. P. und et al., 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science.* 261, 1047-1051.
- Dengler, R., 2003. Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)). Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke (DGM), Freiburg.
- Dengler, R., Ludolph, E. und Zierz, S., 1999. Amyotrophe Lateralsklerose. Thieme, Stuttgart.

- Denker, B. M., Smith, B. L., Kuhajda, F. P. und Agre, P., 1988. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem.* 263, 15634-15642.
- Djukic, B., Casper, K. B., Philpot, B. D., Chin, L. S. und McCarthy, K. D., 2007. Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci.* 27, 11354-11365.
- Doble, A., 1999. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther.* 81, 163-221.
- Doetsch, F., 2003. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci.* 6, 1127-1134.
- Domeniconi, M., Hempstead, B. L. und Chao, M. V., 2007. Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death. *Mol Cell Neurosci.* 34, 271-279.
- Doupnik, C. A., Davidson, N. und Lester, H. A., 1995. The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol.* 5, 268-277.
- Drachman, D. B. und Kuncl, R. W., 1989. Amyotrophic lateral sclerosis: an unconventional autoimmune disease? *Ann Neurol.* 26, 269-274.
- Durham, H. D., Dahrouge, S. und Cashman, N. R., 1993. Evaluation of the spinal cord neuron X neuroblastoma hybrid cell line NSC-34 as a model for neurotoxicity testing. *Neurotoxicology.* 14, 387-395.
- Durham, H. D., Roy, J., Dong, L. und Figlewicz, D. A., 1997. Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56, 523-530.
- Eckenhoff, M. F. und Rakic, P., 1984. Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 223, 1-21.
- Eid, T., Lee, T. S., Thomas, M. J., Amiry-Moghaddam, M., Bjornsen, L. P., Spencer, D. D., Agre, P., Ottersen, O. P. und de Lanerolle, N. C., 2005. Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and K⁺ homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 1193-1198.
- Ellis, D. Z., Rabe, J. und Sweadner, K. J., 2003. Global loss of Na,K-ATPase and its nitric oxide-mediated regulation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci.* 23, 43-51.
- Engelhardt, J. I. und Appel, S. H., 1990. IgG reactivity in the spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol.* 47, 1210-1216.
- Ernfors, P., Henschen, A., Olson, L. und Persson, H., 1989. Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron.* 2, 1605-1613.
- Estevez, A. G., Crow, J. P., Sampson, J. B., Reiter, C., Zhuang, Y., Richardson, G. J., Tarpey, M. M., Barbeito, L. und Beckman, J. S., 1999. Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science.* 286, 2498-2500.
- Faulkner, J. R., Herrmann, J. E., Woo, M. J., Tansey, K. E., Doan, N. B. und Sofroniew, M. V., 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci.* 24, 2143-2155.

- Fedoroff, S., 1986. *Astrocytes: Biochemistry, Physiology, and Pharmacology of Astrocytes*. Academic Press Inc, Orlando.
- Fiacco, T. A. und McCarthy, K. D., 2004. Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*. 24, 722-732.
- Fray, A. E., Ince, P. G., Banner, S. J., Milton, I. D., Usher, P. A., Cookson, M. R. und Shaw, P. J., 1998. The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *Eur J Neurosci*. 10, 2481-2489.
- Fricker-Gates, R. A., 2006. Radial glia: a changing role in the central nervous system. *Neuroreport*. 17, 1081-1084.
- Fridovich, I., 1986. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 58, 61-97.
- Fujita, A., Horio, Y., Higashi, K., Mouri, T., Hata, F., Takeguchi, N. und Kurachi, Y., 2002. Specific localization of an inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, at the apical membrane of rat gastric parietal cells; its possible involvement in K(+) recycling for the H(+)-K(+)-pump. *J Physiol*. 540, 85-92.
- Gabriel, S., Kivi, A., Eilers, A., Kovacs, R. und Heinemann, U., 1998. Effects of barium on stimulus-induced rises in $[K^+]_o$ in juvenile rat hippocampal area CA1. *Neuroreport*. 9, 2583-2587.
- Garcia, M. L., Singleton, A. B., Hernandez, D., Ward, C. M., Evey, C., Sapp, P. A., Hardy, J., Brown, R. H., Jr. und Cleveland, D. W., 2006. Mutations in neurofilament genes are not a significant primary cause of non-SOD1-mediated amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 21, 102-109.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y. und Kreutzberg, G. W., 1995. Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev*. 20, 269-287.
- Glassmeier, G. und Jeserich, G., 1995. Changes in ion channel expression during in vitro differentiation of trout oligodendrocyte precursor cells. *Glia*. 15, 83-93.
- Gnatenco, C., Han, J., Snyder, A. K. und Kim, D., 2002. Functional expression of TREK-2 K⁺ channel in cultured rat brain astrocytes. *Brain Res*. 931, 56-67.
- Gonatas, N. K., Stieber, A., Mourelatos, Z., Chen, Y., Gonatas, J. O., Appel, S. H., Hays, A. P., Hickey, W. F. und Hauw, J. J., 1992. Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol*. 140, 731-737.
- Gorter, J. A., Petrozzino, J. J., Aronica, E. M., Rosenbaum, D. M., Opitz, T., Bennett, M. V., Connor, J. A. und Zukin, R. S., 1997. Global ischemia induces downregulation of Glur2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca²⁺ influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *J Neurosci*. 17, 6179-6188.
- Grass, D., Pawlowski, P. G., Hirrlinger, J., Papadopoulos, N., Richter, D. W., Kirchhoff, F. und Hulsman, S., 2004. Diversity of functional astroglial properties in the respiratory network. *J Neurosci*. 24, 1358-1365.
- Graves, T. D. und Hanna, M. G., 2005. Neurological channelopathies. *Postgrad Med J*. 81, 20-32.
- Greenwood, K., Wilkin, G., Kalsi, A., Virk, H. S. und Butt, A. M., 2004. Developmental expression of the inwardly rectifying potassium channel (Kir) 4.1 in rat and

- mouse CNS. Proceedings of the Proceedings of the Anatomical Society of Great Britain and Ireland, University of Cork. *J. Anat.*, 204, pp. 519-545.
- Gros-Louis, F., Gaspar, C. und Rouleau, G. A., 2006. Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1762, 956-972.
- Guadagno, E. und Moukhles, H., 2004. Laminin-induced aggregation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, and the water-permeable channel, AQP4, via a dystroglycan-containing complex in astrocytes. *Glia.* 47, 138-149.
- Guegan, C. und Przedborski, S., 2003. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Invest.* 111, 153-161.
- Guiloff, R. J. und Goonetilleke, A., 1995. Natural history of amyotrophic lateral sclerosis. Observations with the Charing Cross Amyotrophic Lateral Sclerosis Rating Scales. *Adv Neurol.* 68, 185-198.
- Guo, H., Lai, L., Butchbach, M. E., Stockinger, M. P., Shan, X., Bishop, G. A. und Lin, C. L., 2003. Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum Mol Genet.* 12, 2519-2532.
- Gurney, M. E., 1994. Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 331, 1721-1722.
- Gurney, M. E., 1997. Transgenic animal models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 244 Suppl 2, S15-20.
- Gurney, M. E., Cutting, F. B., Zhai, P., Andrus, P. K. und Hall, E. D., 1996. Pathogenic mechanisms in familial amyotrophic lateral sclerosis due to mutation of Cu, Zn superoxide dismutase. *Pathol Biol (Paris).* 44, 51-56.
- Gurney, M. E., Liu, R., Althaus, J. S., Hall, E. D. und Becker, D. A., 1998. Mutant CuZn superoxide dismutase in motor neuron disease. *J Inherit Metab Dis.* 21, 587-597.
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X. und et al., 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science.* 264, 1772-1775.
- Hafezparast, M., Klocke, R., Ruhrberg, C., Marquardt, A., Ahmad-Annuar, A., Bowen, S., Lalli, G., Witherden, A. S., Hummerich, H., Nicholson, S., Morgan, P. J., Oozageer, R., Priestley, J. V., Averill, S., King, V. R., Ball, S., Peters, J., Toda, T., Yamamoto, A., Hiraoka, Y., Augustin, M., Korthaus, D., Wattler, S., Wabnitz, P., Dickneite, C., Lampel, S., Boehme, F., Peraus, G., Popp, A., Rudelius, M., Schlegel, J., Fuchs, H., Hrabe de Angelis, M., Schiavo, G., Shima, D. T., Russ, A. P., Stumm, G., Martin, J. E. und Fisher, E. M., 2003. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science.* 300, 808-812.
- Hall, E. D., Oostveen, J. A. und Gurney, M. E., 1998. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia.* 23, 249-256.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C., 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press.

- Hallows, K. R., Law, F. Y., Packman, C. H. und Knauf, P. A., 1996. Changes in cytoskeletal actin content, F-actin distribution, and surface morphology during HL-60 cell volume regulation. *J Cell Physiol.* 167, 60-71.
- Hart, P. J., 2006. Pathogenic superoxide dismutase structure, folding, aggregation and turnover. *Curr Opin Chem Biol.* 10, 131-138.
- Hashimoto, K., Engberg, G., Shimizu, E., Nordin, C., Lindstrom, L. H. und Iyo, M., 2005. Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 29, 767-769.
- Haydon, P. G., 2001. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci.* 2, 185-193.
- He, B. P. und Strong, M. J., 2000. Motor neuronal death in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is not apoptotic. A comparative study of ALS and chronic aluminium chloride neurotoxicity in New Zealand white rabbits. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 26, 150-160.
- He, Y., Benz, A., Fu, T., Wang, M., Covey, D. F., Zorumski, C. F. und Mennerick, S., 2002. Neuroprotective agent riluzole potentiates postsynaptic GABA(A) receptor function. *Neuropharmacology.* 42, 199-209.
- Hedlund, E., Hefferan, M. P., Marsala, M. und Isacson, O., 2007. Cell therapy and stem cells in animal models of motor neuron disorders. *Eur J Neurosci.* 26, 1721-1737.
- Henkel, J. S., Engelhardt, J. I., Siklos, L., Simpson, E. P., Kim, S. H., Pan, T., Goodman, J. C., Siddique, T., Beers, D. R. und Appel, S. H., 2004. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol.* 55, 221-235.
- Hensley, K., Floyd, R. A., Gordon, B., Mou, S., Pye, Q. N., Stewart, C., West, M. und Williamson, K., 2002. Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 82, 365-374.
- Hentati, A., Bejaoui, K., Pericak-Vance, M. A., Hentati, F., Speer, M. C., Hung, W. Y., Figlewicz, D. A., Haines, J., Rimmler, J., Ben Hamida, C. und et al., 1994. Linkage of recessive familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 2q33-q35. *Nat Genet.* 7, 425-428.
- Hentati, A., Ouahchi, K., Pericak-Vance, M. A., Nijhawan, D., Ahmad, A., Yang, Y., Rimmler, J., Hung, W., Schlotter, B., Ahmed, A., Ben Hamida, M., Hentati, F. und Siddique, T., 1998. Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers. *Neurogenetics.* 2, 55-60.
- Hibino, H., Fujita, A., Iwai, K., Yamada, M. und Kurachi, Y., 2004. Differential assembly of inwardly rectifying K⁺ channel subunits, Kir4.1 and Kir5.1, in brain astrocytes. *J Biol Chem.* 279, 44065-44073.
- Hibino, H., Horio, Y., Inanobe, A., Doi, K., Ito, M., Yamada, M., Gotow, T., Uchiyama, Y., Kawamura, M., Kubo, T. und Kurachi, Y., 1997. An ATP-dependent inwardly rectifying potassium channel, KAB-2 (Kir4.1), in cochlear stria vascularis of inner ear: its specific subcellular localization and correlation with the formation of endocochlear potential. *J Neurosci.* 17, 4711-4721.
- Higashi, K., Fujita, A., Inanobe, A., Tanemoto, M., Doi, K., Kubo, T. und Kurachi, Y., 2001. An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes

- surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281, C922-931.
- Hille, B., 1992. *Ionic Channels of Excitable Membranes.* Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hille, B., 2001. *Ionic Channels of Excitable Membranes.* Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts.
- Hirano, A., 1991. Cytopathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol.* 56, 91-101.
- Hirano, A., 1996. Neuropathology of ALS: an overview. *Neurology.* 47, S63-66.
- Hirano, A., Donnenfeld, H., Sasaki, S. und Nakano, I., 1984a. Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 43, 461-470.
- Hirano, A., Nakano, I., Kurland, L. T., Mulder, D. W., Holley, P. W. und Saccomanno, G., 1984b. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 43, 471-480.
- Hirase, H., 2005. A multi-photon window onto neuronal-glia-vascular communication. *Trends Neurosci.* 28, 217-219.
- Hirrlinger, J., Hulsman, S. und Kirchhoff, F., 2004. Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *Eur J Neurosci.* 20, 2235-2239.
- Hirrlinger, P. G., Scheller, A., Braun, C., Hirrlinger, J. und Kirchhoff, F., 2006. Temporal control of gene recombination in astrocytes by transgenic expression of the tamoxifen-inducible DNA recombinase variant CreERT2. *Glia.* 54, 11-20.
- Ho, K., Nichols, C. G., Lederer, W. J., Lytton, J., Vassilev, P. M., Kanazirska, M. V. und Hebert, S. C., 1993. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature.* 362, 31-38.
- Hollmann, M., Hartley, M. und Heinemann, S., 1991. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science.* 252, 851-853.
- Howland, D. S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N. J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., DeGennaro, L. J., Cleveland, D. W. und Rothstein, J. D., 2002. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 1604-1609.
- Iandiev, I., Tenckhoff, S., Pannicke, T., Biedermann, B., Hollborn, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A. und Bringmann, A., 2006. Differential regulation of Kir4.1 and Kir2.1 expression in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett.* 396, 97-101.
- Ince, P., Stout, N., Shaw, P., Slade, J., Hunziker, W., Heizmann, C. W. und Baimbridge, K. G., 1993. Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 19, 291-299.
- Ince, P. G., Shaw, P. J., Slade, J. Y., Jones, C. und Hodgson, P., 1996. Familial amyotrophic lateral sclerosis with a mutation in exon 4 of the Cu/Zn superoxide dismutase gene: pathological and immunocytochemical changes. *Acta Neuropathol (Berl).* 92, 395-403.

- Ishii, M., Fujita, A., Iwai, K., Kusaka, S., Higashi, K., Inanobe, A., Hibino, H. und Kurachi, Y., 2003. Differential expression and distribution of Kir5.1 and Kir4.1 inwardly rectifying K⁺ channels in retina. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285, C260-267.
- Ishii, M., Horio, Y., Tada, Y., Hibino, H., Inanobe, A., Ito, M., Yamada, M., Gotow, T., Uchiyama, Y. und Kurachi, Y., 1997. Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, KAB-2/Kir4.1, on mammalian retinal Muller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals. *J Neurosci.* 17, 7725-7735.
- Isomoto, S., Kondo, C. und Kurachi, Y., 1997. Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function. *Jpn J Physiol.* 47, 11-39.
- Ito, M., Inanobe, A., Horio, Y., Hibino, H., Isomoto, S., Ito, H., Mori, K., Tonosaki, A., Tomoike, H. und Kurachi, Y., 1996. Immunolocalization of an inwardly rectifying K⁺ channel, K(AB)-2 (Kir4.1), in the basolateral membrane of renal distal tubular epithelia. *FEBS Lett.* 388, 11-15.
- Jaarsma, D., Rognoni, F., van Duijn, W., Verspaget, H. W., Haasdijk, E. D. und Holstege, J. C., 2001. CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol (Berl).* 102, 293-305.
- Jackson, M., Al-Chalabi, A., Enayat, Z. E., Chioza, B., Leigh, P. N. und Morrison, K. E., 1997. Copper/zinc superoxide dismutase 1 and sporadic amyotrophic lateral sclerosis: analysis of 155 cases and identification of a novel insertion mutation. *Ann Neurol.* 42, 803-807.
- Jauch, R., Windmuller, O., Lehmann, T. N., Heinemann, U. und Gabriel, S., 2002. Effects of barium, furosemide, ouabaine and 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) on ionophoretically-induced changes in extracellular potassium concentration in hippocampal slices from rats and from patients with epilepsy. *Brain Res.* 925, 18-27.
- Jiang, C., Xu, H., Cui, N. und Wu, J., 2001. An alternative approach to the identification of respiratory central chemoreceptors in the brainstem. *Respir Physiol.* 129, 141-157.
- Johnson, R. und Brooks, B., 1984. Possible viral etiology of amyotrophic lateral sclerosis. In: Serratrice, G. et al. (Eds.), *Neuromuscular Disease*. Raven Press, New York, pp. 189-227.
- Johnston, J. M., Burnett, P., Thomas, A. P. und Tezapsidis, N., 2006. Calcium oscillations in type-1 astrocytes, the effect of a presenilin 1 (PS1) mutation. *Neurosci Lett.* 395, 159-164.
- Jones, C. T., Shaw, P. J., Chari, G. und Brock, D. J., 1994a. Identification of a novel exon 4 SOD1 mutation in a sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient. *Mol Cell Probes.* 8, 329-330.
- Jones, C. T., Swingle, R. J. und Brock, D. J., 1994b. Identification of a novel SOD1 mutation in an apparently sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient and the detection of Ile113Thr in three others. *Hum Mol Genet.* 3, 649-650.
- Kaiser, M., Maletzki, I., Hulsmann, S., Holtmann, B., Schulz-Schaeffer, W., Kirchhoff, F., Bahr, M. und Neusch, C., 2006. Progressive loss of a glial potassium channel (KCNJ10) in the spinal cord of the SOD1 (G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 99, 900-912.

- Kalsi, A. S., Greenwood, K., Wilkin, G. und Butt, A. M., 2004. Kir4.1 expression by astrocytes and oligodendrocytes in CNS white matter: a developmental study in the rat optic nerve. *J Anat.* 204, 475-485.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. und Jessel, T. M., 2000. *Principles of Neural Science.* McGraw-Hill, New York.
- Kang, N., Xu, J., Xu, Q., Nedergaard, M. und Kang, J., 2005. Astrocytic glutamate release-induced transient depolarization and epileptiform discharges in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 94, 4121-4130.
- Katz, B., 1949. Les constantes electriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol.* 3, 285-299.
- Kawamata, T., Akiyama, H., Yamada, T. und McGeer, P. L., 1992. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol.* 140, 691-707.
- Kempster, O., 2001. Cerebral edema. *Semin Nephrol.* 21, 303-307.
- Kettenmann, H. und Ransom, B. R., 2004. *Neuroglia.* Oxford University Press, New York.
- Kimelberg, H. K., 2004. Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience.* 129, 851-860.
- Klatzo, I., 1967. Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol.* 26, 1-14.
- Knutson, P., Ghiani, C. A., Zhou, J. M., Gallo, V. und McBain, C. J., 1997. K⁺ channel expression and cell proliferation are regulated by intracellular sodium and membrane depolarization in oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosci.* 17, 2669-2682.
- Kofuji, P., Biedermann, B., Siddharthan, V., Raap, M., Iandiev, I., Milenkovic, I., Thomzig, A., Veh, R. W., Bringmann, A. und Reichenbach, A., 2002. Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. *Glia.* 39, 292-303.
- Kofuji, P., Ceelen, P., Zahs, K. R., Surbeck, L. W., Lester, H. A. und Newman, E. A., 2000. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci.* 20, 5733-5740.
- Kofuji, P. und Newman, E. A., 2004. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience.* 129, 1045-1056.
- Koliatsos, V. E., Crawford, T. O. und Price, D. L., 1991. Axotomy induces nerve growth factor receptor immunoreactivity in spinal motor neurons. *Brain Res.* 549, 297-304.
- Kressin, K., Kuprijanova, E., Jabs, R., Seifert, G. und Steinhauser, C., 1995. Developmental regulation of Na⁺ and K⁺ conductances in glial cells of mouse hippocampal brain slices. *Glia.* 15, 173-187.
- Kruman, II, Pedersen, W. A., Springer, J. E. und Mattson, M. P., 1999. ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Exp Neurol.* 160, 28-39.

- Kubo, Y., Adelman, J. P., Clapham, D. E., Jan, L. Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C. G., Seino, S. und Vandenberg, C. A., 2005. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev.* 57, 509-526.
- Kubo, Y., Baldwin, T. J., Jan, Y. N. und Jan, L. Y., 1993. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature.* 362, 127-133.
- Kucheryavykh, Y. V., Kucheryavykh, L. Y., Nichols, C. G., Maldonado, H. M., Baksi, K., Reichenbach, A., Skatchkov, S. N. und Eaton, M. J., 2007. Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. *Glia.* 55, 274-281.
- Kuffler, S. W., Nicholls, J. G. und Orkand, R. K., 1966. Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol.* 29, 768-787.
- Kunita, R., Otomo, A., Mizumura, H., Suzuki, K., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Hadano, S. und Ikeda, J. E., 2004. Homo-oligomerization of ALS2 through its unique carboxyl-terminal regions is essential for the ALS2-associated Rab5 guanine nucleotide exchange activity and its regulatory function on endosome trafficking. *J Biol Chem.* 279, 38626-38635.
- Kushner, P. D., Stephenson, D. T. und Wright, S., 1991. Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 50, 263-277.
- Laake, J. H., Slyngstad, T. A., Haug, F. M. und Ottersen, O. P., 1995. Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. *J Neurochem.* 65, 871-881.
- Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P. N., Guillet, P. und Meininger, V., 1996. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet.* 347, 1425-1431.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Lagrutta, A. A., Bond, C. T., Xia, X. M., Pessia, M., Tucker, S. und Adelman, J. P., 1996. Inward rectifier potassium channels. Cloning, expression and structure-function studies. *Jpn Heart J.* 37, 651-660.
- LaMonte, B. H., Wallace, K. E., Holloway, B. A., Shelly, S. S., Ascano, J., Tokito, M., Van Winkle, T., Howland, D. S. und Holzbaur, E. L., 2002. Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron.* 34, 715-727.
- Lang, F., Busch, G. L. und Volkl, H., 1998. The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell Physiol Biochem.* 8, 1-45.
- Largo, C., Cuevas, P., Somjen, G. G., Martin del Rio, R. und Herreras, O., 1996. The effect of depressing glial function in rat brain in situ on ion homeostasis, synaptic transmission, and neuron survival. *J Neurosci.* 16, 1219-1229.
- Lauffenburger, D. A. und Horwitz, A. F., 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 84, 359-369.

- Lehre, K. P., Levy, L. M., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J. und Danbolt, N. C., 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci.* 15, 1835-1853.
- Leigh, P. N. und Swash, M., 1991. Cytoskeletal pathology in motor neuron diseases. *Adv Neurol.* 56, 115-124.
- Leigh, P. N., Whitwell, H., Garofalo, O., Buller, J., Swash, M., Martin, J. E., Gallo, J. M., Weller, R. O. und Anderton, B. H., 1991. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. *Brain.* 114 (Pt 2), 775-788.
- Li, L., Head, V. und Timpe, L. C., 2001. Identification of an inward rectifier potassium channel gene expressed in mouse cortical astrocytes. *Glia.* 33, 57-71.
- Lievens, J. C., Woodman, B., Mahal, A., Spasic-Boscovic, O., Samuel, D., Kerkerian-Le Goff, L. und Bates, G. P., 2001. Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 8, 807-821.
- Lin, C. L., Bristol, L. A., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Crawford, T., Clawson, L. und Rothstein, J. D., 1998. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron.* 20, 589-602.
- Lino, M. M., Schneider, C. und Caroni, P., 2002. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci.* 22, 4825-4832.
- Lipton, S. A. und Rosenberg, P. A., 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med.* 330, 613-622.
- Liu, J., Lillo, C., Jonsson, P. A., Vande Velde, C., Ward, C. M., Miller, T. M., Subramaniam, J. R., Rothstein, J. D., Marklund, S., Andersen, P. M., Brannstrom, T., Gredal, O., Wong, P. C., Williams, D. S. und Cleveland, D. W., 2004. Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron.* 43, 5-17.
- Lowry, K. S., Murray, S. S., McLean, C. A., Talman, P., Mathers, S., Lopes, E. C. und Cheema, S. S., 2001. A potential role for the p75 low-affinity neurotrophin receptor in spinal motor neuron degeneration in murine and human amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2, 127-134.
- Lu, Z., 2004. Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. *Annu Rev Physiol.* 66, 103-129.
- Lu, Z., Klem, A. M. und Ramu, Y., 2001. Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature.* 413, 809-813.
- Ludwin, S. K., 1984. The function of perineuronal satellite oligodendrocytes: an immunohistochemical study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 10, 143-149.
- Ludwin, S. K., 1997. The pathobiology of the oligodendrocyte. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56, 111-124.
- Magistretti, P. J., Pellerin, L., Rothman, D. L. und Shulman, R. G., 1999. Energy on demand. *Science.* 283, 496-497.

- Maragakis, N. J. und Rothstein, J. D., 2004. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol Dis.* 15, 461-473.
- Maragakis, N. J. und Rothstein, J. D., 2006. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2, 679-689.
- Marcus, D. C., Wu, T., Wangemann, P. und Kofuji, P., 2002. KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282, C403-407.
- Martin, L. J., 1999. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58, 459-471.
- Matthias, K., Kirchhoff, F., Seifert, G., Huttmann, K., Matyash, M., Kettenmann, H. und Steinhauser, C., 2003. Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci.* 23, 1750-1758.
- Mazzanti, M., Sul, J. Y. und Haydon, P. G., 2001. Glutamate on demand: astrocytes as a ready source. *Neuroscientist.* 7, 396-405.
- McGeer, P. L. und McGeer, E. G., 2002. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 26, 459-470.
- McGuire, V., Longstreth, W. T., Jr., Koepsell, T. D. und van Belle, G., 1996. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in three counties in western Washington state. *Neurology.* 47, 571-573.
- Meda, L., Baron, P. und Scarlato, G., 2001. Glial activation in Alzheimer's disease: the role of Abeta and its associated proteins. *Neurobiol Aging.* 22, 885-893.
- Meldrum, B. und Garthwaite, J., 1990. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci.* 11, 379-387.
- Menichella, D. M., Majdan, M., Awatramani, R., Goodenough, D. A., Sirkowski, E., Scherer, S. S. und Paul, D. L., 2006. Genetic and physiological evidence that oligodendrocyte gap junctions contribute to spatial buffering of potassium released during neuronal activity. *J Neurosci.* 26, 10984-10991.
- Meyer, T., 2007. Genetik der Amyotrophen Lateralsklerose. In: *Management Of Neuromuscular Diseases*, 12 edn. ACRIS Verlag GmbH, München.
- Miki, T., Liss, B., Minami, K., Shiuchi, T., Saraya, A., Kashima, Y., Horiuchi, M., Ashcroft, F., Minokoshi, Y., Roeper, J. und Seino, S., 2001. ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci.* 4, 507-512.
- Miki, T., Suzuki, M., Shibasaki, T., Uemura, H., Sato, T., Yamaguchi, K., Koseki, H., Iwanaga, T., Nakaya, H. und Seino, S., 2002. Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med.* 8, 466-472.
- Miller, R. H., French-Constant, C. und Raff, M. C., 1989. The macroglial cells of the rat optic nerve. *Annu Rev Neurosci.* 12, 517-534.
- Miller, R. H. und Raff, M. C., 1984. Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci.* 4, 585-592.

- Minagar, A., Shapshak, P., Fujimura, R., Ownby, R., Heyes, M. und Eisdorfer, C., 2002. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 202, 13-23.
- Mohammadi, B., Krampfl, K., Moschref, H., Dengler, R. und Bufler, J., 2001. Interaction of the neuroprotective drug riluzole with GABA(A) and glycine receptor channels. *Eur J Pharmacol.* 415, 135-140.
- Moran, J., Maar, T. und Pasantes-Morales, H., 1994. Cell volume regulation in taurine deficient cultured astrocytes. *Adv Exp Med Biol.* 359, 361-367.
- Moukhles, H. und Carbonetto, S., 2001. Dystroglycan contributes to the formation of multiple dystrophin-like complexes in brain. *J Neurochem.* 78, 824-834.
- Nagelhus, E. A., Horio, Y., Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F. M., Nielsen, S., Kurachi, Y. und Ottersen, O. P., 1999. Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia.* 26, 47-54.
- Nagelhus, E. A., Mathiesen, T. M. und Ottersen, O. P., 2004. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience.* 129, 905-913.
- Nagelhus, E. A., Veruki, M. L., Torp, R., Haug, F. M., Laake, J. H., Nielsen, S., Agre, P. und Ottersen, O. P., 1998. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci.* 18, 2506-2519.
- Nagy, D., Kato, T. und Kushner, P. D., 1994. Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res.* 38, 336-347.
- Neprasova, H., Anderova, M., Petrik, D., Vargova, L., Kubinova, S., Chvatal, A. und Sykova, E., 2007. High extracellular K(+) evokes changes in voltage-dependent K(+) and Na (+) currents and volume regulation in astrocytes. *Pflugers Arch.* 453, 839-849.
- Neusch, C., Bahr, M. und Schneider-Gold, C., 2007. Glia cells in amyotrophic lateral sclerosis: New clues to understanding an old disease? *Muscle Nerve.* 35, 712-724.
- Neusch, C., Papadopoulos, N., Muller, M., Maletzki, I., Winter, S. M., Hirrlinger, J., Handschuh, M., Bahr, M., Richter, D. W., Kirchhoff, F. und Hulsmann, S., 2006. Lack of the kir4.1 channel subunit abolishes k⁺ buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular k⁺ regulation. *J Neurophysiol.* 95, 1843-1852.
- Neusch, C., Rozengurt, N., Jacobs, R. E., Lester, H. A. und Kofuji, P., 2001. Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci.* 21, 5429-5438.
- Neusch, C., Runde, D. und Moser, A., 2000. G proteins modulate D2 receptor-coupled K(ATP) channels in rat dopaminergic terminals. *Neurochem Res.* 25, 1521-1526.
- Neusch, C., Schnierle, S. und Moser, A., 1997. Selegiline induces dopamine release through ATP-sensitive potassium channels in the rat caudate-putamen in vitro. *Neurochem Int.* 31, 307-311.

- Neusch, C., Weishaupt, J. H. und Bahr, M., 2003. Kir channels in the CNS: emerging new roles and implications for neurological diseases. *Cell Tissue Res.* 311, 131-138.
- Newman, E. und Reichenbach, A., 1996. The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 19, 307-312.
- Newman, E. A., 1986a. Physiological properties and possible functions of Muller cells. *Neurosci Res Suppl.* 4, S209-220.
- Newman, E. A., 1986b. Regional specialization of the membrane of retinal glial cells and its importance to K⁺ spatial buffering. *Ann N Y Acad Sci.* 481, 273-286.
- Newman, E. A., 2003a. Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci.* 23, 1659-1666.
- Newman, E. A., 2003b. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 26, 536-542.
- Newman, E. A., 2004. Glial modulation of synaptic transmission in the retina. *Glia.* 47, 268-274.
- Newman, E. A., Frambach, D. A. und Odette, L. L., 1984. Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science.* 225, 1174-1175.
- Newman, E. A. und Volterra, A., 2004. Glial control of synaptic function. *Glia.* 47, 207-208.
- Nichols, C. G. und Lopatin, A. N., 1997. Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol.* 59, 171-191.
- Nielsen, S., Nagelhus, E. A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P. und Ottersen, O. P., 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci.* 17, 171-180.
- Nishimura, A. L., Al-Chalabi, A. und Zatz, M., 2005. A common founder for amyotrophic lateral sclerosis type 8 (ALS8) in the Brazilian population. *Hum Genet.* 118, 499-500.
- Nishimura, A. L., Mitne-Neto, M., Silva, H. C., Oliveira, J. R., Vainzof, M. und Zatz, M., 2004a. A novel locus for late onset amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease variant at 20q13. *J Med Genet.* 41, 315-320.
- Nishimura, A. L., Mitne-Neto, M., Silva, H. C., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Kok, F., Oliveira, J. R., Gillingwater, T., Webb, J., Skehel, P. und Zatz, M., 2004b. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet.* 75, 822-831.
- Noel, G., Belda, M., Guadagno, E., Micoud, J., Klocker, N. und Moukhles, H., 2005. Dystroglycan and Kir4.1 coclustering in retinal Muller glia is regulated by laminin-1 and requires the PDZ-ligand domain of Kir4.1. *J Neurochem.* 94, 691-702.
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U. K., Kirchhoff, F. und Kettenmann, H., 2001. GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia.* 33, 72-86.

- Oliver, D., Baukrowitz, T. und Fakler, B., 2000. Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur J Biochem.* 267, 5824-5829.
- Olney, J. W., 1978. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: McGeer, E. G. et al. (Eds.), *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*. Raven Press, New York, pp. 95-121.
- Olsen, M. L., Higashimori, H., Campbell, S. L., Hablitz, J. J. und Sontheimer, H., 2006. Functional expression of Kir4.1 channels in spinal cord astrocytes. *Glia.* 53, 516-528.
- O'Neill, W. C., 1999. Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am J Physiol.* 276, C995-C1011.
- Orkand, R. K., 1980. Extracellular potassium accumulation in the nervous system. *Fed Proc.* 39, 1515-1518.
- Orkand, R. K., Nicholls, J. G. und Kuffler, S. W., 1966. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol.* 29, 788-806.
- Orrell, R. W., Habgood, J. J., Gardiner, I., King, A. W., Bowe, F. A., Hallewell, R. A., Marklund, S. L., Greenwood, J., Lane, R. J. und deBellerocche, J., 1997. Clinical and functional investigation of 10 missense mutations and a novel frameshift insertion mutation of the gene for copper-zinc superoxide dismutase in UK families with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 48, 746-751.
- Orrell, R. W., Habgood, J. J., Malaspina, A., Mitchell, J., Greenwood, J., Lane, R. J. und deBellerocche, J. S., 1999. Clinical characteristics of SOD1 gene mutations in UK families with ALS. *J Neurol Sci.* 169, 56-60.
- Oshio, K., Binder, D. K., Yang, B., Schechter, S., Verkman, A. S. und Manley, G. T., 2004. Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord. *Neuroscience.* 127, 685-693.
- Otomo, A., Hadano, S., Okada, T., Mizumura, H., Kunita, R., Nishijima, H., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Kohiki, E., Suga, E., Yasuda, M., Osuga, H., Nishimoto, T., Narumiya, S. und Ikeda, J. E., 2003. ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet.* 12, 1671-1687.
- Palecek, J., Lips, M. B. und Keller, B. U., 1999. Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord. *J Physiol.* 520 Pt 2, 485-502.
- Panickar, K. S., Jayakumar, A. R., Rama Rao, K. V. und Norenberg, M. D., 2007. Downregulation of the 18-kDa translocator protein: effects on the ammonia-induced mitochondrial permeability transition and cell swelling in cultured astrocytes. *Glia.* 55, 1720-1727.
- Pannicke, T., Iandiev, I., Uckermann, O., Biedermann, B., Kutzera, F., Wiedemann, P., Wolburg, H., Reichenbach, A. und Bringmann, A., 2004. A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina. *Mol Cell Neurosci.* 26, 493-502.
- Pannicke, T., Uckermann, O., Iandiev, I., Biedermann, B., Wiedemann, P., Perlman, I., Reichenbach, A. und Bringmann, A., 2005a. Altered membrane physiology in Müller glial cells after transient ischemia of the rat retina. *Glia.* 50, 1-11.

- Pannicke, T., Uckermann, O., Iandiev, I., Wiedemann, P., Reichenbach, A. und Bringmann, A., 2005b. Ocular inflammation alters swelling and membrane characteristics of rat Muller glial cells. *J Neuroimmunol.* 161, 145-154.
- Papadopoulos, M. C., Saadoun, S., Binder, D. K., Manley, G. T., Krishna, S. und Verkman, A. S., 2004. Molecular mechanisms of brain tumor edema. *Neuroscience.* 129, 1011-1020.
- Pardo, C. A., Xu, Z., Borchelt, D. R., Price, D. L., Sisodia, S. S. und Cleveland, D. W., 1995. Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 954-958.
- Pasantes-Morales, H., 1996. Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metab Brain Dis.* 11, 187-204.
- Pasantes-Morales, H., Alavez, S., Sanchez Olea, R. und Moran, J., 1993. Contribution of organic and inorganic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem Res.* 18, 445-452.
- Pasantes-Morales, H., Murray, R. A., Lilja, L. und Moran, J., 1994a. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. I. Potassium- and chloride-activated permeability. *Am J Physiol.* 266, C165-171.
- Pasantes-Morales, H., Murray, R. A., Sanchez-Olea, R. und Moran, J., 1994b. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. II. Permeability pathway to amino acids and polyols. *Am J Physiol.* 266, C172-178.
- Pastor, A., Chvatal, A., Sykova, E. und Kettenmann, H., 1995. Glycine- and GABA-activated currents in identified glial cells of the developing rat spinal cord slice. *Eur J Neurosci.* 7, 1188-1198.
- Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Castellanos, R., Viera, L., Beckman, J. S., Estevez, A. G. und Barbeito, L., 2004. Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 89, 464-473.
- Pellegrini-Giampietro, D. E., Gorter, J. A., Bennett, M. V. und Zukin, R. S., 1997. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca²⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.* 20, 464-470.
- Penfield, W., 1932. Neuroglia: normal and pathological. In: Penfield, W. (Ed.), *Cytology and Cellular Pathology in the Nervous System*, vol.2. Hoeber, New York, pp. 421-479.
- Perea, G. und Araque, A., 2005. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium.* 38, 375-382.
- Perry, T. L., Krieger, C., Hansen, S. und Eisen, A., 1990. Amyotrophic lateral sclerosis: amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid. *Ann Neurol.* 28, 12-17.
- Peters, A., Palay, S.L., Webster, H.F., 1976. *The Fine Structure of the Nervous System: The Neurons and Supporting Cells.* Saunders, Philadelphia.
- Piet, R., Vargova, L., Sykova, E., Poulain, D. A. und Oliet, S. H., 2004. Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 2151-2155.

- Pinto, L. und Gotz, M., 2007. Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Prog Neurobiol.* 83, 2-23.
- Plaster, N. M., Tawil, R., Tristani-Firouzi, M., Canun, S., Bendahhou, S., Tsunoda, A., Donaldson, M. R., Iannaccone, S. T., Brunt, E., Barohn, R., Clark, J., Deymeer, F., George, A. L., Jr., Fish, F. A., Hahn, A., Nitu, A., Ozdemir, C., Serdaroglu, P., Subramony, S. H., Wolfe, G., Fu, Y. H. und Ptacek, L. J., 2001. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell.* 105, 511-519.
- Poopalasundaram, S., Knott, C., Shamotienko, O. G., Foran, P. G., Dolly, J. O., Ghiani, C. A., Gallo, V. und Wilkin, G. P., 2000. Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, in adult rat CNS. *Glia.* 30, 362-372.
- Pramatarova, A., Figlewicz, D. A., Krizus, A., Han, F. Y., Ceballos-Picot, I., Nicole, A., Dib, M., Meininger, V., Brown, R. H. und Rouleau, G. A., 1995. Identification of new mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet.* 56, 592-596.
- Pramatarova, A., Laganriere, J., Roussel, J., Brisebois, K. und Rouleau, G. A., 2001. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci.* 21, 3369-3374.
- Preisig-Muller, R., Schlichthorl, G., Goerge, T., Heinen, S., Bruggemann, A., Rajan, S., Derst, C., Veh, R. W. und Daut, J., 2002. Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 7774-7779.
- Puls, I., Jonnakuty, C., LaMonte, B. H., Holzbaaur, E. L., Tokito, M., Mann, E., Floeter, M. K., Bidus, K., Drayna, D., Oh, S. J., Brown, R. H., Jr., Ludlow, C. L. und Fischbeck, K. H., 2003. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet.* 33, 455-456.
- Raap, M., Biedermann, B., Braun, P., Milenkovic, I., Skatchkov, S. N., Bringmann, A. und Reichenbach, A., 2002. Diversity of Kir channel subunit mRNA expressed by retinal glial cells of the guinea-pig. *Neuroreport.* 13, 1037-1040.
- Raff, M. C., 1989. Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science.* 243, 1450-1455.
- Raff, M. C., Abney, E. R., Cohen, J., Lindsay, R. und Noble, M., 1983. Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics. *J Neurosci.* 3, 1289-1300.
- Rao, S. D., Yin, H. Z. und Weiss, J. H., 2003. Disruption of glial glutamate transport by reactive oxygen species produced in motor neurons. *J Neurosci.* 23, 2627-2633.
- Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. F., Wilcox, H. M., Flood, D. G., Beal, M. F., Brown, R. H., Jr., Scott, R. W. und Snider, W. D., 1996. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet.* 13, 43-47.
- Reichenbach, A., Wurm, A., Pannicke, T., Iandiev, I., Wiedemann, P. und Bringmann, A., 2007. Muller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.*
- Reimann, F. und Ashcroft, F. M., 1999. Inwardly rectifying potassium channels. *Curr Opin Cell Biol.* 11, 503-508.

- Rickmann, M., Amaral, D. G. und Cowan, W. M., 1987. Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 264, 449-479.
- Ridet, J. L., Malhotra, S. K., Privat, A. und Gage, F. H., 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20, 570-577.
- Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H. und Gordon, J. W., 1995. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 689-693.
- Roelofs-Iverson, R. A., Mulder, D. W., Elveback, L. R., Kurland, L. T. und Molgaard, C. A., 1984. ALS and heavy metals: a pilot case-control study. *Neurology.* 34, 393-395.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X. und et al., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 362, 59-62.
- Ross, S. M., Seelig, M. und Spencer, P. S., 1987. Specific antagonism of excitotoxic action of 'uncommon' amino acids assayed in organotypic mouse cortical cultures. *Brain Res.* 425, 120-127.
- Rothstein, J. D., Jin, L., Dykes-Hoberg, M. und Kuncl, R. W., 1993. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 6591-6595.
- Rothstein, J. D., Martin, L. J. und Kuncl, R. W., 1992. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 326, 1464-1468.
- Rothstein, J. D., Tsai, G., Kuncl, R. W., Clawson, L., Cornblath, D. R., Drachman, D. B., Pestronk, A., Stauch, B. L. und Coyle, J. T., 1990. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 28, 18-25.
- Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A. I., Martin, L. J. und Kuncl, R. W., 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 38, 73-84.
- Rowland, L. P. und Shneider, N. A., 2001. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 344, 1688-1700.
- Roy, J., Minotti, S., Dong, L., Figlewicz, D. A. und Durham, H. D., 1998. Glutamate potentiates the toxicity of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in motor neurons by postsynaptic calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci.* 18, 9673-9684.
- Rozengurt, N., Lopez, I., Chiu, C. S., Kofuji, P., Lester, H. A. und Neusch, C., 2003. Time course of inner ear degeneration and deafness in mice lacking the Kir4.1 potassium channel subunit. *Hear Res.* 177, 71-80.
- Ruiz-Ederra, J., Zhang, H. und Verkman, A. S., 2007. Evidence against functional interaction between aquaporin-4 water channels and Kir4.1 potassium channels in retinal Muller cells. *J Biol Chem.* 282, 21866-21872.
- Saadoun, S., Papadopoulos, M. C. und Krishna, S., 2003. Water transport becomes uncoupled from K⁺ siphoning in brain contusion, bacterial meningitis, and brain tumours: immunohistochemical case review. *J Clin Pathol.* 56, 972-975.

- Saroff, D., Delfs, J., Kuznetsov, D. und Geula, C., 2000. Selective vulnerability of spinal cord motor neurons to non-NMDA toxicity. *Neuroreport*. 11, 1117-1121.
- Sasaki, S., Komori, T. und Iwata, M., 2000. Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)*. 100, 138-144.
- Sasaki, S., Warita, H., Abe, K., Komori, T. und Iwata, M., 2001. EAAT1 and EAAT2 immunoreactivity in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Neuroreport*. 12, 1359-1362.
- Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Matyash, M., Nolte, C., Kettenmann, H. und Kirchhoff, F., 2001. Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *Faseb J*. 15, 1270-1272.
- Schipper, H. M., 1996. Astrocytes, brain aging, and neurodegeneration. *Neurobiol Aging*. 17, 467-480.
- Schmechel, D. E. und Rakic, P., 1979. A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat Embryol (Berl)*. 156, 115-152.
- Schroder, W., Hinterkeuser, S., Seifert, G., Schramm, J., Jabs, R., Wilkin, G. P. und Steinhauser, C., 2000. Functional and molecular properties of human astrocytes in acute hippocampal slices obtained from patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 41 Suppl 6, S181-184.
- Schroder, W., Seifert, G., Huttmann, K., Hinterkeuser, S. und Steinhauser, C., 2002. AMPA receptor-mediated modulation of inward rectifier K⁺ channels in astrocytes of mouse hippocampus. *Mol Cell Neurosci*. 19, 447-458.
- Schulte, U. und Fakler, B., 2000. Gating of inward-rectifier K⁺ channels by intracellular pH. *Eur J Biochem*. 267, 5837-5841.
- Seeburger, J. L., Tarras, S., Natter, H. und Springer, J. E., 1993. Spinal cord motoneurons express p75NGFR and p145trkB mRNA in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res*. 621, 111-115.
- Shaw, P. J., 2005. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 76, 1046-1057.
- Shaw, P. J., Chinnery, R. M., Thagesen, H., Borthwick, G. M. und Ince, P. G., 1997. Immunocytochemical study of the distribution of the free radical scavenging enzymes Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1); MN superoxide dismutase (MN SOD) and catalase in the normal human spinal cord and in motor neuron disease. *J Neurol Sci*. 147, 115-125.
- Shaw, P. J., Forrest, V., Ince, P. G., Richardson, J. P. und Wastell, H. J., 1995. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration*. 4, 209-216.
- Shaw, P. J. und Ince, P. G., 1997. Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 244 Suppl 2, S3-14.
- Siddique, T., Figlewicz, D. A., Pericak-Vance, M. A., Haines, J. L., Rouleau, G., Jeffers, A. J., Sapp, P., Hung, W. Y., Bebout, J., McKenna-Yasek, D. und et al., 1991. Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *N Engl J Med*. 324, 1381-1384.

- Siddique, T., Pericak-Vance, M. A., Brooks, B. R., Roos, R. P., Hung, W. Y., Antel, J. P., Munsat, T. L., Phillips, K., Warner, K., Speer, M. und et al., 1989. Linkage analysis in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 39, 919-925.
- Sidel, V. W. und Solomon, A. K., 1957. Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. *J Gen Physiol*. 41, 243-257.
- Signorini, S., Liao, Y. J., Duncan, S. A., Jan, L. Y. und Stoffel, M., 1997. Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K⁺ channel GIRK2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 923-927.
- Singh, R. J., Karoui, H., Gunther, M. R., Beckman, J. S., Mason, R. P. und Kalyanaraman, B., 1998. Reexamination of the mechanism of hydroxyl radical adducts formed from the reaction between familial amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn superoxide dismutase mutants and H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 6675-6680.
- Smith, R. G., Siklos, L., Alexianu, M. E., Engelhardt, J. I., Mosier, D. R., Colom, L., Habib Mohamed, A. und Appel, S. H., 1996. Autoimmunity and ALS. *Neurology*. 47, S40-45; discussion S45-46.
- Sofroniew, M. V., 2005. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist*. 11, 400-407.
- Sontheimer, H., 1994. Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia*. 11, 156-172.
- Sontheimer, H., Trotter, J., Schachner, M. und Kettenmann, H., 1989. Channel expression correlates with differentiation stage during the development of oligodendrocytes from their precursor cells in culture. *Neuron*. 2, 1135-1145.
- Sontheimer, H. und Waxman, S. G., 1993. Expression of voltage-activated ion channels by astrocytes and oligodendrocytes in the hippocampal slice. *J Neurophysiol*. 70, 1863-1873.
- Spencer, P. S., Nunn, P. B., Hugon, J., Ludolph, A. und Roy, D. N., 1986. Motorneurone disease on Guam: possible role of a food neurotoxin. *Lancet*. 1, 965.
- Steinhauser, C. und Seifert, G., 2002. Glial membrane channels and receptors in epilepsy: impact for generation and spread of seizure activity. *Eur J Pharmacol*. 447, 227-237.
- Tada, Y., Horio, Y., Takumi, T., Terayama, M., Tsuji, L., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. und Kurachi, Y., 1997. Assignment of the glial inwardly rectifying potassium channel KAB-2/Kir4.1 (Kcnj10) gene to the distal region of mouse chromosome 1. *Genomics*. 45, 629-630.
- Takano, T., Tian, G. F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X. und Nedergaard, M., 2006. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci*. 9, 260-267.
- Takumi, T., Ishii, T., Horio, Y., Morishige, K., Takahashi, N., Yamada, M., Yamashita, T., Kiyama, H., Sohmiya, K., Nakanishi, S. und et al., 1995. A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J Biol Chem*. 270, 16339-16346.
- Tanaka, T., Yoshida, M., Yokoo, H., Mizoguchi, K. und Tanaka, M., 1995. The role of ATP-sensitive potassium channels in striatal dopamine release: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav*. 52, 831-835.

- Tanaka, T., Yoshida, M., Yokoo, H., Mizoguchi, K. und Tanaka, M., 1996. ATP-sensitive K⁺ channel openers block sulphiride-induced dopamine release in the rat striatum. *Eur J Pharmacol.* 297, 35-41.
- Tandan, R. und Bradley, W. G., 1985a. Amyotrophic lateral sclerosis: Part 1. Clinical features, pathology, and ethical issues in management. *Ann Neurol.* 18, 271-280.
- Tandan, R. und Bradley, W. G., 1985b. Amyotrophic lateral sclerosis: Part 2. Etiopathogenesis. *Ann Neurol.* 18, 419-431.
- Tian, G. F., Azmi, H., Takano, T., Xu, Q., Peng, W., Lin, J., Oberheim, N., Lou, N., Wang, X., Zielke, H. R., Kang, J. und Nedergaard, M., 2005. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med.* 11, 973-981.
- Torp, R., Danbolt, N. C., Babaie, E., Bjoras, M., Seeberg, E., Storm-Mathisen, J. und Ottersen, O. P., 1994. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci.* 6, 936-942.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76, 4350-4354.
- Traynor, B. J., Codd, M. B., Corr, B., Forde, C., Frost, E. und Hardiman, O., 1999. Incidence and prevalence of ALS in Ireland, 1995-1997: a population-based study. *Neurology.* 52, 504-509.
- Trotti, D., Rolfs, A., Danbolt, N. C., Brown, R. H., Jr. und Hediger, M. A., 1999. SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci.* 2, 848.
- Tsai, G., Yang, P., Chung, L. C., Lange, N. und Coyle, J. T., 1998. D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 44, 1081-1089.
- Tucker, S. J., Imbrici, P., Salvatore, L., D'Adamo, M. C. und Pessia, M., 2000. pH dependence of the inwardly rectifying potassium channel, Kir5.1, and localization in renal tubular epithelia. *J Biol Chem.* 275, 16404-16407.
- Unterberg, A. W., Stover, J., Kress, B. und Kiening, K. L., 2004. Edema and brain trauma. *Neuroscience.* 129, 1021-1029.
- Urushitani, M., Nakamizo, T., Inoue, R., Sawada, H., Kihara, T., Honda, K., Akaike, A. und Shimohama, S., 2001. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated mitochondrial Ca²⁺ overload in acute excitotoxic motor neuron death: a mechanism distinct from chronic neurotoxicity after Ca²⁺ influx. *J Neurosci Res.* 63, 377-387.
- Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E. und Robberecht, W., 2006. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1762, 1068-1082.
- Van Den Bosch, L., Vandenberghe, W., Klaassen, H., Van Houtte, E. und Robberecht, W., 2000. Ca²⁺-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J Neurol Sci.* 180, 29-34.
- Vanoni, C., Massari, S., Losa, M., Carrega, P., Perego, C., Conforti, L. und Pietrini, G., 2004. Increased internalisation and degradation of GLT-1 glial glutamate transporter in a cell model for familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Cell Sci.* 117, 5417-5426.

- Vanselow, B. K. und Keller, B. U., 2000. Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurones from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneuron disease. *J Physiol.* 525 Pt 2, 433-445.
- Verbavatz, J. M., Brown, D., Sabolic, I., Valenti, G., Ausiello, D. A., Van Hoek, A. N., Ma, T. und Verkman, A. S., 1993. Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study. *J Cell Biol.* 123, 605-618.
- Verkhatsky, A., Orkand, R. K. und Kettenmann, H., 1998. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev.* 78, 99-141.
- Verkman, A. S., 2005. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci.* 118, 3225-3232.
- Vitellaro-Zuccarello, L., Mazzetti, S., Bosisio, P., Monti, C. und De Biasi, S., 2005. Distribution of Aquaporin 4 in rodent spinal cord: relationship with astrocyte markers and chondroitin sulfate proteoglycans. *Glia.* 51, 148-159.
- Voigt, T., 1989. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol.* 289, 74-88.
- von Lewinski, F. und Keller, B. U., 2005. Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends Neurosci.* 28, 494-500.
- Walling, A. D., 1999. Amyotrophic lateral sclerosis: Lou Gehrig's disease. *Am Fam Physician.* 59, 1489-1496.
- Wallraff, A., Odermatt, B., Willecke, K. und Steinhauser, C., 2004. Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia.* 48, 36-43.
- Walz, W., 2000. Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. *Glia.* 31, 95-103.
- Warth, A., Kroger, S. und Wolburg, H., 2004. Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol (Berl).* 107, 311-318.
- Warth, A., Mittelbronn, M. und Wolburg, H., 2005. Redistribution of the water channel protein aquaporin-4 and the K⁺ channel protein Kir4.1 differs in low- and high-grade human brain tumors. *Acta Neuropathol (Berl).* 109, 418-426.
- Watanabe, M., Dykes-Hoberg, M., Culotta, V. C., Price, D. L., Wong, P. C. und Rothstein, J. D., 2001. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis.* 8, 933-941.
- Waxman, S. G., 2005. Cerebellar dysfunction in multiple sclerosis: evidence for an acquired channelopathy. *Prog Brain Res.* 148, 353-365.
- Waxman, S. G., Dib-Hajj, S., Cummins, T. R. und Black, J. A., 2000. Sodium channels and their genes: dynamic expression in the normal nervous system, dysregulation in disease states(1). *Brain Res.* 886, 5-14.
- Westarp, M., 1995. Amyotrophe Lateralsklerose. Schattauer Verlag, Stuttgart.
- Wiedau-Pazos, M., Goto, J. J., Rabizadeh, S., Gralla, E. B., Roe, J. A., Lee, M. K., Valentine, J. S. und Bredesen, D. E., 1996. Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 271, 515-518.

- Wong, P. C., Pardo, C. A., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sisodia, S. S., Cleveland, D. W. und Price, D. L., 1995. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*. 14, 1105-1116.
- Wu, J., Xu, H., Shen, W. und Jiang, C., 2004. Expression and coexpression of CO₂-sensitive Kir channels in brainstem neurons of rats. *J Membr Biol*. 197, 179-191.
- Wurm, A., Pannicke, T., Iandiev, I., Buhner, E., Pietsch, U. C., Reichenbach, A., Wiedemann, P., Uhlmann, S. und Bringmann, A., 2006a. Changes in membrane conductance play a pathogenic role in osmotic glial cell swelling in detached retinas. *Am J Pathol*. 169, 1990-1998.
- Wurm, A., Pannicke, T., Iandiev, I., Wiedemann, P., Reichenbach, A. und Bringmann, A., 2006b. The developmental expression of K⁺ channels in retinal glial cells is associated with a decrease of osmotic cell swelling. *Glia*. 54, 411-423.
- Xu, H., Yang, Z., Cui, N., Giwa, L. R., Abdulkadir, L., Patel, M., Sharma, P., Shan, G., Shen, W. und Jiang, C., 2000. Molecular determinants for the distinct pH sensitivity of Kir1.1 and Kir4.1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 279, C1464-1471.
- Yang, Y., Hentati, A., Deng, H. X., Dabbagh, O., Sasaki, T., Hirano, M., Hung, W. Y., Ouahchi, K., Yan, J., Azim, A. C., Cole, N., Gascon, G., Yagmour, A., Ben-Hamida, M., Pericak-Vance, M., Hentati, F. und Siddique, T., 2001. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 29, 160-165.
- Yang, Z., Xu, H., Cui, N., Qu, Z., Chanchevalap, S., Shen, W. und Jiang, C., 2000. Biophysical and molecular mechanisms underlying the modulation of heteromeric Kir4.1-Kir5.1 channels by CO₂ and pH. *J Gen Physiol*. 116, 33-45.
- Zenker, W., 1994. Feinstruktur des Nervengewebes. In: Drenckhahn, D. and Zenker, W. (Eds.), *Benninghoff Anatomie*, vol.2. Urban und Schwarzenberg, München.
- Zhang, H. und Verkman, A. S., 2008. Aquaporin-4 independent Kir4.1 K⁺ channel function in brain glial cells. *Mol Cell Neurosci*. 37, 1-10.
- Zhang, Q. und Haydon, P. G., 2005. Roles for gliotransmission in the nervous system. *J Neural Transm*. 112, 121-125.
- Zierler, S., Frei, E., Grissmer, S. und Kerschbaum, H. H., 2008. Chloride influx provokes lamellipodium formation in microglial cells. *Cell Physiol Biochem*. 21, 55-62.

8.3. Danksagung

Ich möchte mich bei PD Dr. Clemens Neusch für die Bereitstellung des interessanten Themas, Motivation, Unterstützung und kontinuierliche Bereitschaft zur Diskussion bedanken. Herrn Professor Dr. Bähr danke ich für die Aufnahme in sein Forschungslabor.

Bei Herrn Professor Dr. Hardeland bedanke ich mich für die Übernahme des Erstreferats und die weiterführenden Impulse, die aus regelmäßigen Gesprächen hervorgingen. Herrn Professor Dr. Jahn danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ein besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe Neurogenetik am MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen, unter der Leitung von PD Dr. Frank Kirchhoff. Die wöchentlichen Treffen und jährlichen Seminare zusammen mit unserer Arbeitsgruppe, der Arbeitsgruppe Neurophysiologie unter der Leitung von PD Dr. Swen Hülsmann haben zu meiner wissenschaftlichen Weiterbildung beigetragen und die gemeinsame Diskussion war hilfreich bei vielen Experimenten. Weiterhin möchte ich mich für die Bereitstellung der transgenen Mauslinien bedanken sowie für die Benutzung der Labore und Ausstattung der Arbeitsgruppe Neurogenetik (insbesondere das 2-Photonen-Lasermikroskop). Vielen Dank an Anja Scheller, die mich in China mit der aktuellen fachlichen Literatur versorgt hat. Danke an die Tierhaltungseinheit des MPI für Experimentelle Medizin, insbesondere an Daniel Flemming.

Ein weiteres Dankeschön geht an meine Kollegen am Klinikum für die nette Arbeitsatmosphäre. Barbara Müller, Nadine Meyer und Ina Boger danke ich dafür, dass sie sich um allgemeine Bestellungen und Bereitstellung von Grundmaterialien gekümmert haben. Barbara danke ich zudem dafür, dass sie meine Prüfungsunterlagen sicher transportiert hat und für die Schlusskontrolle der Arbeit.

Weiterhin danke ich Payam Dibaj für die Unterstützung bei den Schwellungsexperimenten und die Sendung von Literatur, die für mich im Ausland schwer erhältlich war.

Ein sehr großes Dankeschön geht an Iris Maletzki, die mich während der Zeit im Labor technisch unterstützt hat und zudem bei der Schlusskontrolle sehr behilflich war.

Ein weiterer Dank gilt meinem Ehemann Sascha, der mich auch in schwierigen Phasen immer wieder motiviert hat und kontinuierlich für mich da war.

8.4. Lebenslauf und wissenschaftliche Publikationen

8.4.1. Lebenslauf

Personalien

Nachname	Kaiser
Vorname	Melanie Birgit
Geburtsname	Handschuh
Titel	Diplom-Biologin
Nationalität	deutsch
Geburtsdatum	27.06.1978
Geburtsort	Wilhelmshaven, Deutschland
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

August 1984 bis Juni 1988: Grundschule Altengroden, Wilhelmshaven

August 1988 bis Juli 1990: Orientierungsstufe Altengroden, Wilhelmshaven

August 1990 bis Juni 1997: Gymnasium Käthe Kollwitz, Wilhelmshaven

Wissenschaftliche Ausbildung

Oktober 1997 bis November 2002:

Studium der Biologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

November 2001 bis November 2002:

Diplomarbeit: Einfluss von Stress auf proteolytische Aktivität und Proteolyse von Tau

15. November 2002:

Abschluss Diplom Biologie

seit Februar 2003:

Doktorarbeit mit dem Titel "Differentielle Expression und Funktion eines glialen Kaliumkanals ($K_{ir}4.1$, KCNJ10) im Rückenmark und Bedeutung in einem neurodegenerativen Krankheitsmodell" an der Georg-August-Universität zu Göttingen, am Universitätsklinikum in der Abteilung Neurologie unter der Leitung von Professor Dr. Bähr in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Clemens Neusch

Berufliche Weiterbildung

Teilnahme am Seminar: 'Trouble Shooting Zellkultur' an der IBA Akademie Göttingen

8.4.2. Publikationen

- Papadopoulos, N., Winter, S. M., Härtel, K., **Kaiser, M.**, Neusch, C., und Hülsmann, S., 2008. Possible roles of the weakly inward rectifying K^+ channel Kir4.1 (KCNJ10) in the pre-Bötzing complex. *Adv Exp Med Biol.* 605, 109-113.
- Dibaj, P. *, **Kaiser, M.***, Hirrlinger, J., Kirchhoff, F., und Neusch, C., 2007. Kir4.1 channels regulate swelling of astroglial processes in experimental spinal cord edema. *J Neurochem.* * beide Autoren haben gleichermaßen zu der Studie beigetragen. Bisher nur elektronisch publiziert
- Härtel, K., Singaravelu, K., **Kaiser, M.**, Neusch, C., Hülsmann, S. und Deitmer, J. W., 2007. Calcium influx mediated by the inwardly rectifying K^+ channel Kir4.1 (KCNJ10) at low external K^+ concentration. *Cell Calcium.* 42, 271-280.
- Kaiser, M.**, Maletzki, I., Hülsmann, S., Holtmann, B., Schulz-Schaeffer, W., Kirchhoff, F., Bähr, M. und Neusch, C., 2006. Progressive loss of a glial potassium channel (KCNJ10) in the spinal cord of the SOD1 (G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 99, 900-912.
- Neusch, C., Papadopoulos, N., Müller, M., Maletzki, I., Winter, S. M., Hirrlinger, J., **Handschuh, M.**, Bähr, M., Richter, D. W., Kirchhoff, F. und Hülsmann, S., 2006. Lack of the Kir4.1 channel subunit abolishes K^+ buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K^+ regulation. *J Neurophysiol.* 95, 1843-1852.
- Goldbaum, O., Oppermann, M., **Handschuh, M.**, Dabir, D., Zhang, B., Forman, M. S., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. und Richter-Landsberg, C., 2003. Proteasome inhibition stabilizes tau inclusions in oligodendroglial cells that occur after treatment with ocadaic acid. *J Neurosci.* 23, 8872-8880.

8.4.3. Poster und Abstractveröffentlichungen

- Härtel K., Singaravelu K., **Kaiser M.**, Neusch C., Deitmer J.W., 2007. Calcium influx into astrocytes mediated by the inwardly rectifying K^+ channel Kir 4.1 (KCNQ10) at low external K^+ concentrations. 31. Göttingen-Neurobiologentagung (NWG), Göttingen
- Dibaj P., **Kaiser M.**, Hirrlinger J, Kirchhoff F. und Neusch C., 2007. Co-enrichment of Kir4.1 and AQP4 channels in spinal cord astrocytes suggests coupling of K^+ flux and water transport: swelling experiments using transgenic mouse technology and 2-Photon laser microscopy. 31. Göttinger-Neurobiologentagung (NWG), Göttingen
- Härtel K., Singaravelu K., **Kaiser M.**, Neusch C., Deitmer J.W. und Hülsmann S., 2006. The inwardly rectifying K^+ channel Kir4.1 is involved in a low potassium induced calcium influx into astrocytes. FENS, Wien; Österreich
- Härtel K., Singaravelu K., **Handschuh M.**, Neusch C., Deitmer J.W. und Hülsmann S., 2006. Calcium influx into mouse brainstem astrocytes mediated by the inwardly rectifying K^+ channel Kir4.1. DPG, München
- Handschuh M.**, Szöke K., Hülsmann S., Kirchhoff F., Bähr M. und Neusch C., 2005. Differential cellular expression of aquaporin 4 and 8 in mouse spinal cord cultures and coenrichment with the Kir4.1 channel subunit. 30. Göttinger-Neurobiologentagung (NWG), Göttingen
- Szöke K., Hirrlinger J., **Handschuh M.**, Neusch C., Kirchhoff F. und Hülsmann S., 2005. Glial cells in the respiratory network express functional transporters and receptors for glycine. 30. Göttinger-Neurobiologentagung (NWG), Göttingen

- Papadopoulos N., Neusch C., Maletzki I., **Handschuh M.**, Kirchhoff F. und Hülsmann S., 2005. Inactivation of the Kir4.1 channel subunit abolishes K⁺ siphoning properties in astrocytes of the respiratory network. 30. Göttinger-Neurobiologentagung (NWG), Göttingen
- Hülsmann S., Papadopoulos N., Maletzki I., Winter S.M., **Handschuh M.**, Kirchhoff F. und Neusch C., 2005. Inactivation of the Kir4.1 channel abolishes astroglial K⁺ buffering within the respiratory network. VII. European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Amsterdam; Niederlande
- Handschuh M.**, Maletzki I., Rohde G., Weishaupt JH., Kirchhoff F., Bähr M. und Neusch C., 2005. Loss of a glial Kir channel subunit (Kir4.1) in the spinal cord of the SOD1 (G93A) mouse model for ALS. DGM, Dresden
- Szöke K., Hirrlinger J., **Handschuh M.**, Neusch C., Kirchhoff F. und Hülsmann S., 2005. Glial cells in the respiratory network express functional glycine transporters and receptors. Neurizon, Göttingen
- Szöke K., Hirrlinger J., **Handschuh M.**, Neusch C., Kirchhoff F. und Hülsmann S., 2004. Role of glial cells in the inhibitory synaptic transmission of the respiratory network. 34th Meeting of SFN, San Diego; USA
- Maletzki I., **Handschuh M.**, Rohde G., Weishaupt JH., Kirchhoff F., Bähr M. und Neusch C., 2004. Loss of a glia specific Kir channel subunit (Kir4.1) in the SOD (G93A)-mouse model for ALS: implications for K⁺ excitotoxicity. 34th Meeting of SFN, San Diego; USA
- Handschuh M.**, Maletzki I., Kirchhoff F., Bähr M. und Neusch C., 2004. Colocalisation of the Kir4.1 potassium channel subunit and Aquaporin 8 channels in mature spinal cord oligodendrocytes in vitro and in situ. 34th Meeting of SFN, San Diego; USA
- Szöke K., Hirrlinger J., **Handschuh M.**, Neusch C., Kirchhoff F., und Hülsmann S., 2004. Function of glial cells in the inhibitory synaptic transmission in the respiratory network. FENS, Lissabon; Portugal
- Bauer, NG., **Handschuh, M.**, Oppermann, M., Goldbaum, O., Richter-Landsberg, C., 2003. Inclusion body formation in OLT-t40 oligodendroglial cells. 33th Meeting of SFN, Washington; USA
- Richter-Landsberg C., Oppermann, M., **Handschuh, M.**, Goldbaum, O., 2003. Cytoplasmic inclusions which transiently occur after treatment with okadaic acid in oligodendroglial cells overexpressing tau are stabilized by proteasomal inhibition. 29. Göttinger Neurobiologentagung (NWG), Göttingen
- Handschuh M.**, Goldbaum O., Richter-Landsberg C., 2002. Stress-induced proteasome inhibition and stress protein-induction in glial cells. Cellular signaling in neuroprotection and plasticity – Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Magdeburg