

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuroanatomie

Prof. Dr. Gabriele M. Rune

Untersuchungen zur Expression präsynaptisch lokalisierter Kaliumkanäle im Tractus perforans

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Henning Klapetke

geboren in Itzehoe, Schleswig-Holstein

Hamburg, 2012

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:
Prof. Dr. rer. nat. R. Bender**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:
Prof. Dr. rer. nat. E. Förster**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:
PD Dr. rer. nat. R. Bähring**

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis.....	IV–VII
1	Einleitung.....	1
1.1	Gegenstand der Arbeit.....	1
1.2	Anatomische Grundlagen: Der Hippokampus.....	2
1.3	Die Funktion präsynaptischer Ionenkanäle.....	5
1.3.1	Allgemeines.....	5
1.3.2	Kaliumkanäle.....	6
1.3.3	Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv-Kanäle).....	7
1.3.4	Kv1-Kanäle.....	8
1.3.5	HCN-Kanäle.....	9
2	Fragestellung.....	11
3	Material und Methoden.....	12
3.1	Material.....	12
3.1.1	Arbeitsmaterialien, Geräte.....	12
3.1.2	Software.....	15
3.1.3	Chemikalien.....	15
3.1.4	Lösungen.....	18
3.1.5	Antikörper.....	23
3.1.5.1	Primärantikörper.....	23
3.1.5.2	Sekundärantikörper.....	23
3.2	Methoden.....	24
3.2.1	Eingesetzte Tiere.....	24
3.2.2	Behandlung der Tiere/Fixierung.....	24
3.2.2.1	Entwicklungsreihe.....	24
3.2.2.2	Gewinnung von organotypischen Gewebekulturen.....	25

3.2.3	Organotypische Gewebekultur.....	26
3.2.3.1	Herstellung der Gewebekulturen.....	26
3.2.3.2	Modulation neuronaler Aktivität.....	26
3.2.3.3	Deafferenzierung.....	27
3.2.4	Immunhistochemische Färbungen.....	28
3.2.4.1	Fixierung der Gewebekulturen für Immunhistochemie.....	28
3.2.4.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	29
3.2.4.3	Immunfärbung für Lichtmikroskopie.....	30
3.2.5	Western Blot.....	31
3.2.5.1	Proteinaufbereitung aus Gewebe.....	31
3.2.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	32
3.2.5.3	SDS-PAGE.....	32
3.2.5.4	Western Blot.....	33
3.2.6	Auswertung.....	34
3.2.6.1	Bildanalyse.....	34
3.2.6.1.1	Lichtmikroskopische Auswertung.....	34
3.2.6.1.2	Immunfluoreszenz-Auswertung.....	34
3.2.6.1.3	Western Blot-Auswertung.....	37
3.2.6.2	Statistik.....	38
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Altersabhängige Expression von Kv1.2 in der Molekularschicht.....	39
4.2	Altersabhängige Expression von Kvβ2 in der Molekularschicht.....	41
4.3	Vergleich der entwicklungsabhängigen Expression von Kv1.2/Kvβ2 und HCN1.....	43
4.4	Etablierung eines <i>in vitro</i> -Modells.....	44
4.4.1	Kv1.2-Expression: Vergleich <i>in vivo/in vitro</i> und präsynaptische Lokalisation.....	44
4.4.2	Modulation neuronaler Aktivität.....	46

4.5	Aktivitätsabhängige Veränderungen der Kv1.2 Expression in der Molekularschicht <i>in vitro</i>	47
4.5.1	Immunhistochemie: Aktivitätsmodulation mittels Kainsäure/TTX.....	47
4.5.2	Western Blot: Aktivitätsmodulation mittels Kainsäure/TTX	50
5	Diskussion	52
5.1	Entwicklungsabhängige Expression von Ionenkanälen im Tractus perforans der Ratte	52
5.2	Entwicklungsabhängige Expression kennzeichnet trisynaptischen Schaltkreis.....	53
5.3	Regulation der Kv1.2-Expression durch neuronale Aktivität	54
5.4	Mögliche synaptische Interaktionspartner von Kv1.2.....	55
5.5	Deafferenzierung	57
6	Zusammenfassung	58
7	Abbildungsverzeichnis	59
8	Literaturverzeichnis.....	60
9	Tabellenverzeichnis	66
10	Danksagung.....	67
11	Lebenslauf	68
12	Eidesstattliche Versicherung.....	69

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin/Biotinyl-Peroxidase-Komplex
ADAM	„A Disintegrin And Metalloprotease domain“
AMPA-Rezeptor	„ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionic acid“-Rezeptor; Untergruppe von Glutamatrezeptoren
Anti-GAPDH	Anti-Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua ad inject.	Aqua ad injectabilia, Wasser für Injektionszwecke
äMS	äußere Molekularschicht
B	Bild
bidest.	bidestillata, zweifach destilliert
BK	„big potassium“; Untergruppe von Calcium-aktivierten Kaliumkanälen
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CA	Cornu ammonis
cm	Zentimeter
Cy3	Carbocyanin 3
D2	Dopaminrezeptor 2
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DDT	Dithiothreitol
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
ECL-Lösung	„enhanced chemiluminescence“-Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure; „Ethylenediaminetetraacetic acid“
EK	entorhinaler Kortex
et al.	et alii, und andere
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
g	Gramm

GABA	γ -Aminobuttersäure; „gamma-Aminobutyric acid“
GB	Gygabyte
GD	Gyrus dentatus
Gly	Glycin
h	Stunden
HBSS	„Hank’s Balanced Salt Solution“
HCl	Salzsäure; „Hydrochloric acid“
HCN	hyperpolarisationsaktivierte und durch zyklische Nukleotide regulierbare Kanäle; „hyperpolarisation activated cyclic nucleotide gated“
Hil	Hilus
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
I _A	schnell inaktivierende A-Typ-Ströme
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IK	„intermediate conductance potassium“; Untergruppe von Calcium-aktivierten Kaliumkanälen
iMS	innere Molekularschicht
Ka	Kainsäure
KCNK	„tandem-pore domain“-Kaliumkanäle
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
Kir	einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle; „inward rectifier“
Kv	spannungsabhängige Kaliumkanäle; „voltage activated K ⁺ channel“
Kv1	„Shaker“-verwandte Kaliumkanäle
Kv2	„Shab“-verwandte Kaliumkanäle
Kv3	„Shaw“-verwandte Kaliumkanäle
Kv4	„Shal“-verwandte Kaliumkanäle
Kv β	β -Untereinheit eines spannungsabhängigen Kaliumkanals; „voltage activated K ⁺ channel β subunit“
l	Liter
laEK	lateraler entorhinaler Kortex
LGI1	„leucine-rich glioma inactivated 1“

LSM	Laser-Scan-Mikroskop; „Laser Scanning Microscope“
LTD	Langzeitdepression; „long-term depression“
LTP	Langzeitpotenzierung; „long-term potentiation“
M	molar
M	Mittelpunkt
mA	Milliampère
meEK	medialer entorhinaler Kortex
MEM	„Minimum Essential Medium“
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mMS	mittlere Molekularschicht
MS	Molekularschicht
n	Anzahl der Stichproben
Na ²⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NGS	normales Ziegenserum; „normal goat serum“
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
P	postnatal
p	„probability“; englisch für Wahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung; „phosphate buffered saline“
PBS-T	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PC	Personal Computer
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus hydrogenii; negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Phe	Phenylalanin
RIPA	„Radio Immunoprecipitation Assay“
RNA	„ribonucleic acid“; Ribonukleinsäure
S	Segment
SDS	Natriumdodecylsulfat; „sodium dodecyl sulfat“

SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese; „sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“
SK	„small conductance potassium“; Untergruppe von Calcium- aktivierten Kaliumkanäle
sog.	so genannt
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylaethylendiamin
TIFF	„Tagged Image File Format“
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
Triton X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-Polyethylen-Glycol
TTX	Tetrodotoxin
Tyr	Tyrosin
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
x	-fach, Faktor der Vergrößerung
°C	Grad Celcius
λ	Lambda
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
%	Prozent

1 Einleitung

1.1 Gegenstand der Arbeit

Seine bemerkenswerte Bedeutung für Lern- und Gedächtnisprozesse macht den Hippokampus zu einem zentralen Objekt der neurobiologischen Forschung (zur Übersicht: Squire 2004). Am medialen Rand des Gyrus parahippocampalis (im Lobus temporalis) gelegen, erhält der Hippokampus Informationen über alle sensorischen Wahrnehmungen des Gehirns. Diese Informationen erreichen den Hippokampus aus dem entorhinalen Kortex (EK) kommend über den Tractus perforans, dessen Axone im Ammonshorn (Cornu ammonis, CA) und im Gyrus dentatus (GD) enden. Dabei spielen Synapsen zwischen dem Tractus perforans und den Körnerzellen des Gyrus dentatus eine besondere Rolle. Diese Synapsen stellen die erste Station eines trisynaptischen Pfades durch den Hippokampus dar (Blackstad et al. 1970, Andersen et al. 1971), in dem die eingehende sensorische Information „bewertet“, d. h. für die Gedächtnisbildung aufbereitet wird. Zu diesem Zweck sind diese Synapsen mit zahlreichen Mechanismen zur synaptischen Plastizität ausgestattet (Kelly et al. 2000, Bramham 2007), die sowohl postsynaptisch (in den Dendriten der Körnerzellen) als auch präsynaptisch (in den Axonterminalen des Tractus perforans) aktiv sein können.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem bestimmten Aspekt der Plastizität an den Tractus perforans-Körnerzell-Synapsen: einer altersabhängigen Expression von präsynaptisch aktiven Ionenkanälen. So konnte in einer früheren Arbeit von Bender et al. (2007) gezeigt werden, dass Hyperpolarisations-aktivierte und durch zyklische Nukleotide modulierbare (HCN-) Ionenkanäle im Tractus perforans präsynaptisch und bevorzugt in jungen Entwicklungsstadien exprimiert werden. Die Expressionsstärke schien darüber hinaus von neuronaler Aktivität abhängig zu sein. Zur charakteristischen Ausstattung von Synapsen des Tractus perforans gehören –neben HCN-Kanälen – jedoch auch Kaliumkanäle vom Kv1-Typus (hauptsächlich Kv1.2; Trimmer und Rhodes 2004), deren Funktion sich von der Funktion der HCN-Kanäle (HCN: depolarisierend, Kv: hyperpolarisierend) wesentlich unterscheidet und über deren altersabhängige Expression und Regulation bislang wenig bekannt ist. Untersucht wurden daher in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Wie ist das zeitliche Expressionsmuster von Kv1.2-Kanälen im Tractus perforans während der Entwicklung der Ratte?
2. Wie ist das zeitliche Expressionsmuster der für den axonalen Transport der Kv1.2-Kanäle notwendigen β -Untereinheit Kv β 2?
3. Wird die Expression von Kv1.2-Kanälen im Tractus perforans aktivitätsabhängig reguliert?

1.2 Anatomische Grundlagen: Der Hippokampus

Der Hippokampus liegt im Temporallappen an der medialen Wand des Seitenventrikels als paarig angelegte Struktur (siehe Abb. 1). Sein temporales Endstück bildet eine tatenähnliche Struktur (Pes hippocampi). Nach dorsokraniel zieht er, gemäß der Rotationsbewegung der Hemisphären während der embryonalen Entwicklung, bogenförmig zum kaudalen Ende des Balkens (Corpus callosum). Von ihm ausgehend zieht als zentrale Bahn des limbischen Systems der Fornix zu den ventral gelegenen Corpora mamillaria. Im Vergleich zum Menschen befindet sich der Hippokampus der Ratte in Folge einer unterschiedlichen phylogenetischen Entwicklung weiter kranial und somit lateral des Corpus callosum. Trotz makroskopischer Unterschiede kann der mikroskopische Aufbau, d.h. die neuronalen Verbindungen des Hippokampus, als vergleichbar angesehen werden. Zum menschlichen Hippokampus gibt es dazu jedoch vergleichsweise wenige Untersuchungen.

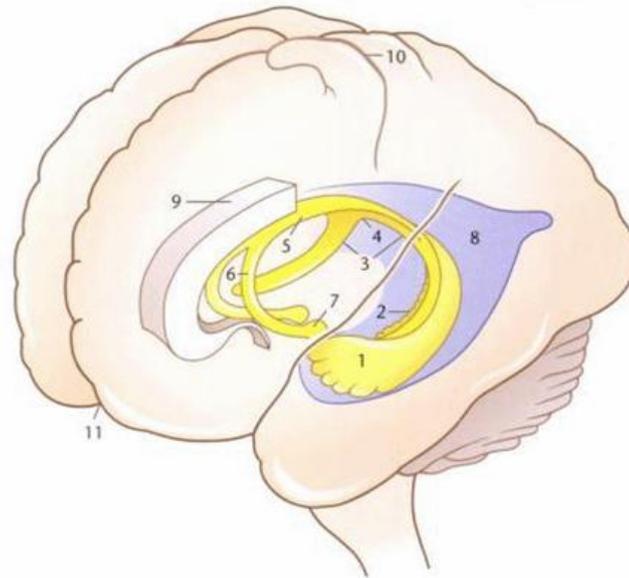


Abb. 1: Lage des Hippokampus und des Fornix in den Hemisphären.

1 Pes hippocampi 2 Gyrus dentatus 3 Crura fornix 4 Commissura fornix 5 Corpus fornix 6 Columnae fornix 7 Corpora mamillaria 8 Hinterhorn des Seitenventrikels 9 Corpus callosum 10 Sulcus centralis 11 Fissura longitudinalis cerebri (Trepel 2008).

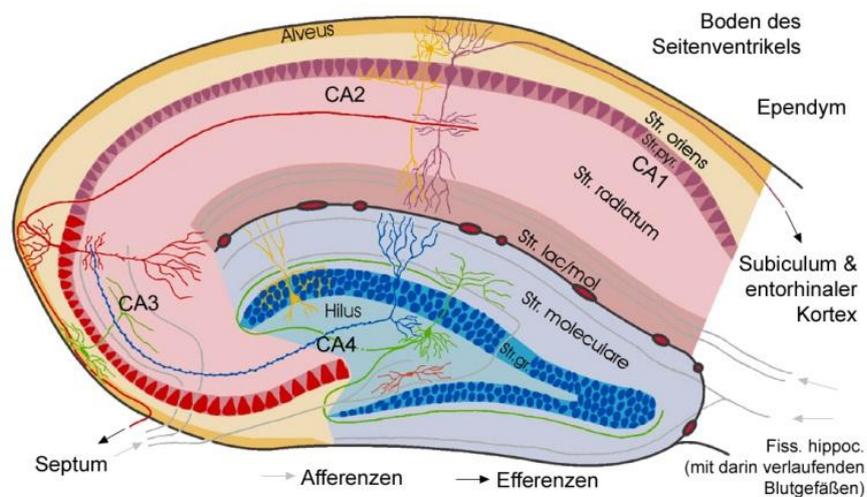
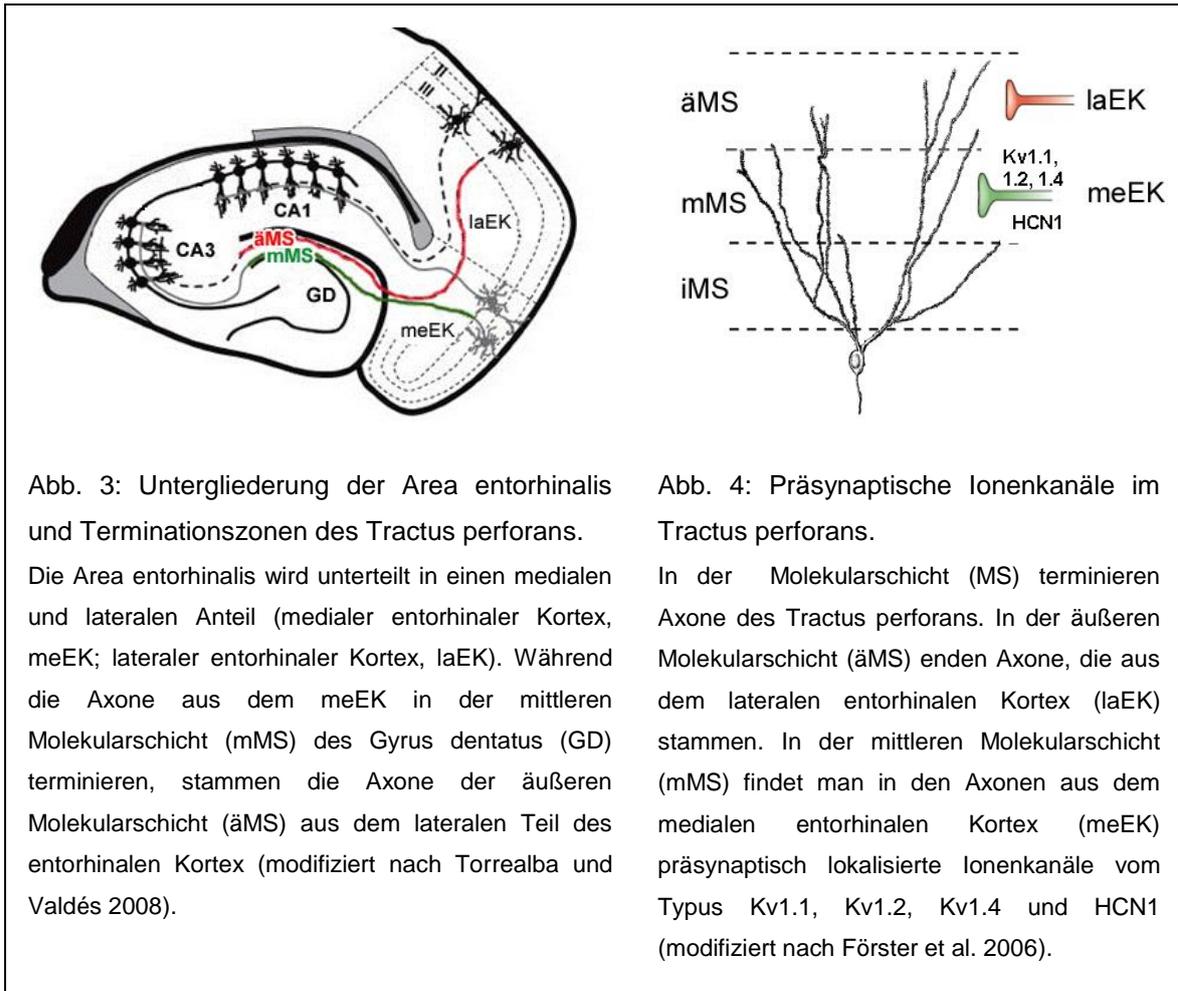


Abb. 2: Frontalschnitt durch den Hippokampus.

Dargestellt ist die Regionen- und Schichtengliederung mit den wichtigsten Zelltypen und Faserverbindungen. Zu erkennen sind der Gyrus dentatus (Blautöne) und das Cornu ammonis (Rottöne). Im Gyrus dentatus unterscheidet man Hilus, Str. granulosum (Körnerzellschicht) und Str. moleculare (Molekularschicht). Das Cornu ammonis wird in die vier Felder CA1–CA4 unterteilt. Als Schichtung unterscheidet man hier Str. oriens, Str. pyramidale, Str. radiatum und Str. lacunosum-moleculare. Zur Hippokampusformation wird weiterhin das Subiculum zugerechnet (modifiziert nach einem Bild des veterinärmedizinischen Instituts der Universität Leipzig).

Der Hippokampus ist als Teil des Archikortex – im Gegensatz zum Neokortex – dreischichtig gegliedert (siehe Abb. 2). Eine Schicht exzitatorischer Prinzipalzellen (Pyramiden- oder Körnerzellen) wird dabei nach oben (pial, d.h. zur Pia mater hin) und unten (alvear, d.h. zu einem dem Ependym anliegenden Axonbündel, dem „Alveus“, hin) von relativ zellarmen Schichten mit in der Regel GABAergen Interneuronen begrenzt. Im Cornu ammonis wird die alveare Schicht „Stratum oriens“ genannt, während die piale Schicht auf Grund unterschiedlicher axonaler Eingänge noch weiter in ein „Stratum radiatum“ und ein „Stratum lacunosum-moleculare“ unterteilt wird. Im Gyrus dentatus spricht man pial von einer Molekularschicht (Stratum moleculare) und alvear vom „Hilus“ (Hil). Zwischen beiden Schichten liegt die Körnerzellschicht (Stratum granulosum, KZS). In der Molekularschicht terminieren die afferenten Axone aus dem entorhinalen Kortex sowie assoziative und kommissurale Verbindungen aus dem Hippokampus in streng schichtenspezifischer Weise. Im Stratum moleculare des Gyrus dentatus beispielsweise enden in der inneren Schicht (innere Molekularschicht, iMS) assoziative und kommissurale Axone aus dem Hilus. In der mittleren (mittlere Molekularschicht, mMS) und äußeren Schicht (äußere Molekularschicht, äMS) hingegen terminiert der im entorhinalen Kortex entspringende Tractus perforans und bildet dort Synapsen mit den Körnerzellen aus. Hier findet man noch eine weitere Untergliederung (siehe Abb. 3 und 4): Axone aus dem medialen Anteil des entorhinalen Kortex (meEK) terminieren ausschließlich in der mittleren Schicht (mMS), Axone aus dem lateralen Anteil des entorhinalen Kortex (laEK) ausschließlich in der äußeren Schicht (äMS). Die beiden Anteile des Tractus perforans unterscheiden sich – neben der Schichtenspezifität ihrer Eingänge – auch physiologisch. So findet man bestimmte Ionenkanäle (z. B. Kv- oder HCN-Kanäle) speziell in der mittleren Schicht, der Terminationszone des Tractus perforans aus dem medialen entorhinalen Kortex (Wang et al. 1994, Maletic-Savatic et al. 1995, Veh et al. 1995, Cooper et al. 1998, Monaghan et al. 2001, Bender et al. 2007; siehe Abb. 4).



1.3 Die Funktion präsynaptischer Ionenkanäle

1.3.1 Allgemeines

Die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran ist für hydrophile Ionen undurchlässig. Transmembranäre Ionenkanäle können jedoch durch polare Aminosäuren eine Umgebung schaffen, durch die bestimmte Ionen mit ihrer Hydrathülle hindurch treten können. Die geladenen Ionen folgen dabei dem elektrochemischen Gradienten. Ionenkanäle sind durch einen Selektivitätsfilter immer nur für eine oder wenige Ionenarten durchlässig. Generell unterscheidet man ligandengesteuerte und spannungsgesteuerte Ionenkanäle. Zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen zählen z. B. alle ionotropen Neuro-transmitter-Rezeptoren. Sie sind folglich bevorzugt an Stellen zu finden, an denen Neurotransmitter ausgeschüttet werden, d. h. in der Umgebung von Synapsen. Spannungsgesteuerte Ionenkanäle haben hingegen sehr unterschiedliche

Funktionen: Sie können – je nach Aufgabe – im Soma, in den Dendriten, im Axon (z. B. an den Ranvier'schen Schnürringen) oder direkt an den Axonterminalen lokalisiert sein. Generell beeinflussen beide, sowohl liganden- als auch spannungsgesteuerte Ionenkanäle, das Membranpotenzial der Neurone. Abhängig von vorherrschenden Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle kann der durch Öffnung der Kanäle entstehende Ionenstrom depolarisierend oder hyperpolarisierend wirken.

1.3.2 Kaliumkanäle

Die Gruppe der Kaliumkanäle stellt die größte Gruppe an Subtypen innerhalb der Ionenkanäle dar. Diese Vielfalt beruht zum einen auf der großen Anzahl von codierenden Genen für die Untereinheiten aber auch auf alternativem Spleißen, RNA-Editing oder posttranslationaler Prozessierung. Kaliumkanäle findet man in jeder Zelle. Sie bestimmen maßgebend die elektrischen Eigenschaften biologischer Membranen. Da in der Regel die Kaliumkonzentration innerhalb der Zelle höher als außerhalb ist (Ausnahme: Haarzellen der Cochlea), bewirkt eine Öffnung der Kanäle einen Ausstrom von Kalium und damit eine Hyperpolarisation der Zellmembran. In Neuronen ist dieser Vorgang u. a. verantwortlich für die Repolarisierung des Membranpotenzials nach einem Aktionspotenzial. Typische Kaliumkanäle bestehen aus vier α -Untereinheiten, die sich zu einem Tetramer zusammenlagern und so einen Kanal bilden. Nach der Anzahl der transmembranären Domänen einer jeden α -Untereinheit und der Porendomänen unterscheidet man vier große Familien (siehe Tab. 1):

Tab. 1: Einteilung der Kaliumkanäle (nach Chung et al. 2010).

Familie	Subfamilie	Anzahl der transmembranären Domänen	Anzahl der Poreinheiten
Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv)	Kv1–Kv12	6	1
Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (Kir)	Kir1–Kir7	2	1
„tandem-pore domain“-Kaliumkanäle	KCNK1–KCNK18	4	2
Calcium-aktivierte Kaliumkanäle	BK, SK, IK	6	1

Um die hohe Selektivität für Kalium zu gewährleisten, besitzen alle Kaliumkanäle die spezifische Aminosäuresequenz Thr-X-Gly-Tyr/Phe-Gly (X steht für eine beliebige Aminosäure), welche auch als „Kaliumsignatur“ bezeichnet wird. Mutationen in dieser Abfolge können die Selektivität für Kalium beeinträchtigen (Heginbotham et al. 1994).

1.3.3 Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv-Kanäle)

Allein beim Menschen konnten bislang über 40 verschiedene Gene nachgewiesen werden, die für den Aufbau von Kv-Kanälen verantwortlich sind. Zu den vier wichtigsten Subtypen zählen Kv1 (Shaker), Kv2 (Shab), Kv3 (Shaw) und Kv4 (Shal). Die Bezeichnung „Shaker“ stammt dabei vom sog. Shaker-Gen der *Drosophila melanogaster*, welches für deren Zittern („shaking“) nach Äther-Exposition mit verantwortlich ist. Diese Subtypen bilden homotetramere Kanäle oder sind zu heterotetrameren Kanälen zusammengelagert, was die Vielfalt der Kaliumkanäle noch erhöht (Ruppersberg et al. 1990).

Alle spannungsabhängigen Kaliumkanäle bestehen aus vier α -Untereinheiten. Jede davon ist wiederum aus sechs transmembranären Helices aufgebaut, die mit S1 bis S6 bezeichnet werden. S1 bis S4 bilden die Spannungssensordomäne, S5

und S6 bilden die Porendomäne. Das N-terminale Ende von S1 und das C-terminale Ende von S6 liegen dabei intrazellulär (Yellen 2002). Am N-terminalen Ende findet man eine mögliche Interaktionssequenz mit einer β -Untereinheit sowie eine Domäne, die für die Tetramerisierung verantwortlich ist (Gulbis et al. 2002).

Neben α -Proteinen gibt es noch drei Familien von β -Untereinheiten (Kv β 1.n, Kv β 2.1 und Kv β 3.1; Pongs et al. 1999). Diese interagieren mit den Kv1-Kanälen in 1:1-Stöchiometrie durch Bindung an das N-terminale Ende der α -Untereinheit. Sie können die Kv1-Kanäle in Bezug auf Expressivität und Inaktivierungsverhalten beeinflussen (Sewing et al. 1996). Für Kv β 1.n wurden die drei Untertypen Kv β 1.1, Kv β 1.2 und Kv β 1.3 nachgewiesen (England et al. 1995).

1.3.4 Kv1-Kanäle

Kv1-Kanäle sind vorwiegend axonal lokalisiert. Ihre Funktion besteht im Wesentlichen in der Regulation neuronaler Aktivitätsraten. Man findet sie im Bereich des Axonhügels (Aktionspotenzialinitiation; Wang et al. 1994, Kole et al. 2007), der Ranvier'schen Schnürringe (Aktionspotenzialleitung; Chiu et al. 1980, Wang et al. 1994, Mi et al. 1995) und in den Axonterminalen (Regulation der Neurotransmitterfreisetzung; Wang et al. 1994, Dodson et al. 2003). Leitfähigkeiten dieser Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation neuronaler Aktivitätsraten im auditorischen und thalamokortikalen System (Manis und Marx 1991, Popratiloff et al. 2003), in vestibulären Neuronen (Gamkrelidze et al. 1998) sowie in neokortikalen und hippocampalen Pyramidenzellen (Wu und Barish 1992, Bekkers und Delaney 2001). Funktionell werden sie den „Low-voltage-activated“-Kanälen und den „Delayed-rectifier“-Kanälen zugerechnet. Durch Assemblierung mit einer β -Untereinheit können sich allerdings die Kanaleigenschaften dramatisch verändern. So kommt es zur Umbildung in einen A-Typ-Kanal mit schnell-inaktivierenden Eigenschaften (Rettig et al. 1994, Trimmer und Rhodes, 2004). Seit einiger Zeit ist bekannt, dass Kv1-Kanäle (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4) auch im Tractus perforans präsynaptisch exprimiert werden (Rettig et al. 1992, Sheng et al. 1992, Sheng et al. 1994, Wang et al. 1994, Veh et al. 1995, Maletic-Savatic et al. 1995, Rhodes et al. 1995, Rhodes et al. 1997, Cooper et al. 1998, Monaghan et al. 2001). Kv1.2 stellt dabei die dominierende α -

Untereinheit dar (Trimmer und Rhodes 2004). Ihre axonale Lokalisation ist jedoch essentiell von der Anwesenheit von Kv β 2-Untereinheiten abhängig (Campomanes et al. 2002).

1.3.5 HCN-Kanäle

Hyperpolarisationsaktivierte und durch zyklische Nukleotide regulierbare Kanäle (HCN-Kanäle) sind strukturell verwandt mit den Kv1-Kanälen (Robinson und Siegelbaum 2003). Auch sie enthalten 6 Transmembrandomänen, mit einem Spannungssensor lokalisiert in S4. In einem Kv-Kanal sind hier sieben basische Aminosäurereste lokalisiert, während man in den HCN-Kanälen neun basische Reste findet (Vemana et al. 2004), wodurch sich der Kanal bei Hyperpolarisation und nicht bei Depolarisation der Membran öffnet. Außerdem sind HCN-Kanäle „nichtselektive Kationenkanäle“. Es kommt daher bei Öffnung – auf Grund des elektrochemischen Gradienten bei negativem Membranpotenzial – zum Einstrom von Na²⁺-Ionen, d.h. zu einer Depolarisierung („funny“ oder „queer“ current; Pape 1996). Im Hippokampus stabilisieren solche Ströme das Ruhemembranpotenzial und tragen zu synchronisierter neuronaler Aktivität bei (Pape 1996, Robinson und Siegelbaum 2003). Es existieren vier Isoformen der HCN-Kanäle (HCN1–4), die sich als homo- oder heterotetramere Kanäle mit unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften ausbilden können (Robinson und Siegelbaum 2003). Der Arbeitsgruppe Bender gelang es vor einiger Zeit nachzuweisen, dass HCN-Kanäle vom HCN1-Typus präsynaptisch in den Axonterminalen des medialen Tractus perforans exprimiert werden (Bender et al. 2007). Präsynaptische Expression von HCN-Kanälen war bis dahin im Kortex nur in GABAergen Interneuronen beschrieben. Die präsynaptische HCN1-Expression im Tractus perforans stellt somit den ersten Nachweis in exzitatorischen Axonterminalen des Kortex dar. Erste funktionelle Befunde lassen vermuten, dass die Aktivität präsynaptischer HCN-Kanäle der Funktion von Kv1-Kanälen entgegenwirkt, da HCN-Kanal-Aktivierung eine Depolarisation, Aktivierung von Kv-Kanälen jedoch eine Hyperpolarisation der Membran bewirkt. Interessanterweise zeigt jedoch die präsynaptische Expression von HCN1 einen ungewöhnlichen Zeitverlauf: Sie ist besonders hoch im Tractus perforans sehr junger Ratten, nimmt dann jedoch mit zunehmenden Alter stetig ab. Es kann somit eine Entwicklungsabhängigkeit der

Expression vermutet werden. Des Weiteren zeigten *in vitro*-Experimente, dass die Expression von HCN1 im Tractus perforans sensitiv auf Änderungen der neuronalen Aktivität reagiert (Bender et al. 2007). Es kann also auch eine Aktivitätsabhängigkeit vermutet werden.

2 Fragestellung

Angesichts einer Entwicklungs- und Aktivitätsabhängigkeit der präsynaptischen Expression von HCN1-Kanälen im Tractus perforans stellt sich die Frage, ob für die ebenfalls präsynaptisch im Tractus perforans lokalisierten Kanäle vom Kv1-Typus ähnliche Regulationsmechanismen existieren. Um diese Frage zu untersuchen, wurden folgende Experimente durchgeführt:

1. Es wurde anhand einer Entwicklungsreihe über mehrere Altersstufen der zeitliche Verlauf der Expression von Kv1.2 und seiner für den axonalen Transport essentiellen β -Untereinheit Kv β 2 in der Molekularschicht bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit dem Zeitverlauf der Expression von HCN1-Kanälen verglichen.
2. Es wurde ein *in vitro*-System (organotypische Gewebekultur) für die Untersuchung von Regulationsprozessen der präsynaptischen Kv1-Expression etabliert und dieses System für die Untersuchung aktivitätsabhängiger Expressionsänderungen eingesetzt. Für die genannte Fragestellung wurden überprüfend Western Blots als Alternativmethode angefertigt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Arbeitsmaterialien, Geräte

Acryl-Küvetten (10 mm Schichtdicke)	SARSTEDT
Brutschrank, 37°C	MEMMERT
Blottingkammer	BIO-RAD
CO ₂ -Inkubator, 37°C	HERAEUS
Cutfix Surgical Disposable Scalpel	B. BRAUN
Deckgläser, 24 x 60 mm	MARIENFELD
Desinfektionsmittel (Sterillium)	BODE
Elektrophorese-Apparatur, Mini-Protean® 3 cell	BIO-RAD
ep TIPS Standard, verschiedene Größen	EPPENDORF
Falcon Röhrchen, 15 und 50 ml	GREINER BIO-ONE
Färbekästen nach Hellendahl (Küvetten)	CARL ROTH
Feuchtkammer	EIGENBAU UKE
Film	AGFA
Filterpapier	SCHLEICHER-SCHÜLL
Folienstifte	FARBER-CASTELL
Foto-Kassette	AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH
Gefrierschrank, -25°C und -80°C	LIEBHERR
Gewebehäcksler, Tissue Chopper	H. SAUR
Gewebeschneider (Kryostat), HM 560	MICROM

Heidemannspatel	AESFULAP DE
konfokales Laser-Scan-Mikroskop, LSM Axiovert 100 Microsystem	CARL ZEISS
Kosmetiktücher, Clou Prestige	WEPA PROFESSIONAL
Kühlschrank, 4°C	BOSCH/LIEBHERR
Kühl-Zentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5417R	EPPENDORF
Kulturmembran, Millicell-CM	MILLIPORE
Lichtmikroskop	OLYMPUS/ZEISS
Macintosh-PC (OS 9.1)	APPLE
Microtome Blade S35	FEATHER
Mikroskop Axioskop 2, HBO 100	CARL ZEISS
Mikroskop Axiovert 200M	CARL ZEISS
Nitrocellulose-Membran, Nitrocell Protran	WHATMAN
Objektträger SuperFrost/Plus	ASSISTANT
Parafilm M	PECHINEY PLASTIC PACKAGING
Pasteurpipetten	ASSISTENT
Perfundiergerät, Masterflex L/S Economy Drive	COLE PARMER
pH-Meter	KNICK
Photometer, Eppendorf Bio Photometer	EPPENDORF
Pinsel	DA VINCI/PELIKAN
Pinzette	MERCK
Pipetten 100 und 2500 ml	EPPENDORF
Pipetten 20, 100, 200 und 1000 µl	GILSON

Pipettenspitzen für Pipetus 5, 10 und 25 ml	BECTON DICKINSON LAB.
Pipetus Akku	HIRSCHMANN LABORGER.
Potter-Röhrchen, Mortar & Pestie 0,1 ml Without Handle	MORTAR & PESTILE
Reagenzgefäße 1,5 und 2 ml	EPPENDORF
Rüttler MS2 Minishaker	IKA
Scanner, Scanjet 8300	HP
Schere	FINE SCIENCE TOOLS
Serologische Pipetten	FALCON
Sicherheitswerkbank Stufe 2	HERAEUS
Spannungsgenerator, Electrophoresis constant power supply EPS 3000/150	AMERSHAM PHARMACIE BIOTECH
Stericup Filter Units	MILLIPORE
Untersuchungshandschuhe Peha-soft satin	HARTMANN
USB-Stick Cruzer 8 GB	SANDISK
Vortex Genie 2	SCIENRIFIC INDUSTRIES
Waage	METTLER
Zentrifuge, Universal 32R	HETTICH
Zellkulturplatte, Falcon Multiwell Cell Culture Plate, 6-well	FALCON
Zellkulturschale	FALCON

3.1.2 Software

AxioVision 3.1	CARL ZEISS
Excel 2000	MICROSOFT
ImageJ Vers. 1.43f	WAYNE RASBAND (NIH), public domain
LSM Carl Zeiss	CARL ZEISS
Openlab 3.1.5	IMPROVISION
Photoshop CS3 Extended	ADOBE
Graph Pad Prism 4.00	GRAPHPAD SOFTWARE
Windows XP	MICROSOFT
Word 2010	MICROSOFT

3.1.3 Chemikalien

Aceton	BAKER
Acrylamid, 30 %	BIO-RAD LABORATORIES
Ammoniumchlorid	SIGMA-ALDRICH
Ammoniumpersulfat	SIGMA-ALDRICH
Aqua ad iniectabilia, 1 Liter	BAXTER DEUTSCHLAND
Bradford-Reagenz, Bio Rad Protein Assay	BIO-RAD LABORATORIES
Bromphenolblau	MERCK
BSA (bovines Serumalbumin)	SIGMA-ALDRICH
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	VECTOR LABORATORIES
DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol)	SIGMA-ALDRICH
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK

DTT (Dithiothreitol)	MERCK
ECL-Lösung („enhanced chemiluminescence“-Lösung), Pierce ECL Western Blotting substrate	THERMO SCIENTIFIC
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), 0,5 M	MERCK
Einbett-Medium, Dako Mounting Medium	DAKO
Einbett-Medium, Eukitt Mounting Medium	KINDLER
Entwicklerlösung	KODAK
Essigsäure	MERCK
Ethanol, absolut	MERCK
Fixierlösung	KODAK
Gefriermedium, Tissue Tek	SAKURA
Glycerin	SIGMA-ALDRICH
Glycin, 150 mM	APOTHEKE UKE
Glucose, 50 %	FRESENIUS KABI
HBSS („Hank’s Balanced Salt Solution“)	GIBCO
HCl (Salzsäure), 25 %, 1 M und 2 M	MERCK
Kainsäure	SIGMA-ALDRICH
Ketamin	GRÄUB
L-Glutamin, 200 mM	SIGMA-ALDRICH
MEM (Minimum Essential Medium)	GIBCO
Milchpulver	HEIRLER
Molekulargewichts-Marker	FULL-RANGE RAINBOWS
Natriumbicarbonat-Lösung, 7,5 %	SIGMA-ALDRICH

Natriumchlorid (NaCl)	MERCK
Natriumchlorid-Lösung, 0,9 %	MERCK
Natriumdeoxycholat	SIGMA-ALDRICH
Natriumdodecylsulfat	CARL ROTH
Natriumhydroxid (NaOH)	MERCK
Nickelsulfat	MERCK
normales Ziegenserum (NGS, „Normal Goat Serum“)	SIGMA-ALDRICH
NP40 Alternative, 10 %	CALBIOCHEM
Penicillin-Streptomycin-Lösung	GIBCO
PFA (Paraformaldehyd)	MERCK
Pferdeserum	GIBCO
Ponceau-Rot	MERCK
Protease-Inhibitor, Protease-Inhibitorenmix complete	ROCHE
Rompun	BAYER
Saccharose	MERCK
TEMED (Tetramethylaethylendiamin)	BIO-RAD LABORATORIES
Tetrodotoxin (TTX)	SIGMA-ALDRICH
Tris (Trishydroxymethylaminomethan), 1 M (pH 7,5), 1,5 M (pH 8,8)	CARL ROTH
Tris-Base, 25 mM	CARL ROTH
Tris-HCl, 0,5 M (pH 6,8)	CARL ROTH
Triton X-100	USB

Trockeneis	HUMANGENETIK DES UKE
Tween-20	SIGMA-ALDRICH
Vectastain ABC Kit PK-6100	VECTOR
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	MERCK
Xylolersatz XEM-200	VOGEL

3.1.4 Lösungen

Anästhesie-Injektionslösung:

- 2,4 ml Ketamin
- 1,6 ml Rompun
- mit Natriumchlorid-Lösung (0,9 %) bis auf 20 ml Volumen aufgefüllt
- 0,8–1,2 ml/Tier

Blockierpuffer für Western Blot:

- 30 ml Tween
- 100 ml 10fach phosphatgepufferte Salzlösung (10fach PBS)
- Aqua ad inject., ad 1000 ml
- 5 % Milchpulver

Blockierungslösung für Immunhistochemie:

- 0,3 % Triton X-100
- 3 % Normales Ziegenserum (NGS)
- in phosphatgepufferten Salzlösung (PBS)

Färbelösung:

- 0,5 % Ponceau-Rot
- 5 % Essigsäure
- in Aqua dest.

Inkubationsmedium:

- 25 ml Minimal Essential Medium (MEM), 2fach konzentriert, steril
- 1 ml L-Glutamin (200 mM), steril
- 580 µl Natriumbicarbonat-Lösung (7,5 %), steril
- 25 ml „Hank's Balanced Salt Solution“, steril
- 25 ml Pferdeserum, steril
- 1 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung, steril
- 1250 µl Glucose (50 %), steril
- 19 ml Aqua dest., steril
- Titration bis pH 7,25 mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl

Laufpuffer (1fach Laemmli-Puffer):

- 30 g Tris-Base
- 144 g Glycin
- 10 g Natriumdodecylsulfat, 10 %
- Aqua ad inject., ad 1000 ml

Paraformaldehyd (PFA) 2 %:

- 2 g PFA
- in 100 ml PBS lösen

Perfusionslösung:

- 2,5 % Paraformaldehyd (PFA)
- in PBS gelöst
- auf den pH Wert 7,4 einstellen mit zunächst 1 ml HCl (25 %), dann mit 1 M HCl

phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):

- 17,8 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
- 16 g NaCl
- in 1,8 l Aqua dest. lösen
- den pH auf 7,4 einstellen mit zunächst 1 ml HCl (25 %), dann mit 2 M HCl
- auf 2 l mit Aqua dest. auffüllen

phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween (PBS-Tween):

- 100 ml PBS
- 30 ml Tween-20
- Aqua ad inject., ad 1000 ml

Präparationsmedium:

- 50 ml Minimal Essential Medium (MEM), steril, 2fach konzentriert
- 1 ml Glutamin, 200 mM, steril
- 48 ml Aqua dest.
- Titration bis pH 7,35 mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl

Probenpuffer (5fach Laemmlipuffer):

- 1,54 g Dithiothreitol (DTT), 0,5 M
- 2 g Natriumdodecylsulfat, 10 %
- 8 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8)
- 10 ml Glycerin
- 1 Spatelspitze Bromphenolblau

RIPA-Puffer:

- 1,5 ml 5 M NaCl, 150 mM
- 2,5 ml 1 M Tris, 50 mM, pH 7,5
- 5 ml NP-40 (10 %), 1 %
- 250 µl Natriumdodecylsulfat (20 %), 0,1 %
- 2,5 ml Natriumdeoxycholat (10 %), 0,5 %
- 0,5 ml 0,5 M EDTA, 5 mM
- Protease-Inhibitor (Protease Inhibitorenmix complete)
- Aqua dest., ad 50 ml

Saccharose-Lösung 25 %:

- 25 g Saccharose
- in 100 ml PBS lösen

Sammelgel:

- 1375 μ l Aqua dest.
- 425 μ l Acrylamid (30 %)
- 625 μ l 0,5 M Tris, pH 6,8
- 25 μ l Natriumdodecylsulfat (10 %)
- 25 μ l Ammoniumpersulfat (10 %)
- 2 μ l Tetramethylaethylendiamin
- 25 μ l Bromphenolblau

Semidry-Transfer-Puffer, pH 8,3:

- 3,03 g 25mM Tris-Base
- 14,4 g 150 mM Glycin
- 100 ml Ethanol (10 %)
- Aqua bidest., ad 1000 ml

Spülpuffer:

- 0,9 % NaCl
- in Aqua dest.

Trenngel 10 % (für Molekulargewichte 50–100 kDa):

- 2 ml Aqua dest.
- 6,6 ml Acrylamid (30 %)
- 1,25 ml 1,5 M Tris, pH 8,8
- 50 μ l Natriumdodecylsulfat, 10 %
- 50 μ l Ammoniumpersulfat, 10 %
- 2 μ l Tetramethylaethylendiamin

Waschpuffer für Western Blot (Milchpulver (5 %)- PBS-Tween):

- 2 g Milchpulver
- 38 ml PBS-Tween

3.1.5 Antikörper

3.1.5.1 Primärantikörper

polyklonaler Anti-HCN1 aus Kaninchen	CHEMICON
monoklonaler Anti-Kv1.2 aus Maus (nicht affinitätsgereinigt)	NEUROMAB
monokloner Anti-Kv1.2 aus Maus (affinitätsgereinigt)	NEUROMAB
monoklonaler Anti-Kv β 2 aus Maus	NEUROMAB
polyklonaler Anti-c-Fos aus Kaninchen	SANTA CRUZ BIOTECH
monoklonaler Anti-GAPDH aus Maus	AMBION

3.1.5.2 Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege, Cy3-markiert	JACKSON IMMUNO RES.
Anti-Maus-IgG aus Ziege, Cy3-markiert	JACKSON IMMUNO RES.
Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege, Biotin-markiert	VECTOR LABORATORIES
Anti-Maus-IgG aus Ziege, Biotin-markiert	VECTOR LABORATORIES
Anti-Maus-IgG aus Ziege, Peroxidase-markiert	PIERCE

3.2 Methoden

3.2.1 Eingesetzte Tiere

Bei den Experimenten zur aktivitätsabhängigen Expression wurden Ratten des Zuchtstamms WISTAR verwendet, welche durch die zentrale Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bereitgestellt wurden. Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten, Wasser und Futter standen ihnen *ad libitum* zur Verfügung. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den geltenden gesetzlichen Bestimmungen durchgeführt. Für die Versuche zur entwicklungsabhängigen Expression wurden 10, 17 und 50 Tage alte Tiere (P10, P17 und P50) verwendet. Für die Versuche zur aktivitätsabhängigen Expression und zur Deafferenzierung wurden 3 Tage alte Tiere (P3) verwendet.

3.2.2 Behandlung der Tiere/Fixierung

3.2.2.1 Entwicklungsreihe

Die Präparation erfolgte aus praktischen Gründen unter semisterilen Bedingungen. Für die Entwicklungsreihe wurde den Tieren zunächst eine Anästhesielösung intraperitoneal injiziert. Diese enthielt das Narkotikum Ketamin (100mg/kg KG) und das Muskelrelaxans Rompun (5 mg/kg KG). Nach Wirkungseintritt wurden die Tiere in Rückenlage mit Kanülen fixiert. Mit einem Skalpell wurde die Bauchhöhle ventral von kaudal nach kranial eröffnet und das Diaphragma durchtrennt, so dass die Herzspitze sichtbar wurde. Nun wurde das rechte Atrium inzidiert und zeitgleich eine Kanüle in den linken Ventrikel gestochen. Aus dieser Kanüle wurde mittels eines Perfusors Spülungspuffer (0,9 % NaCl) in den linken Ventrikel injiziert. Durch das noch schlagende Herz verteilte sich der Spülungspuffer in den tierischen Blutkreislauf, während das Blut des Tieres über den inzidierten rechten Vorhof nach außen abfließen konnte. Nach etwa 5 min war das Blut vollständig ersetzt, was durch ein Aufhellen der Leber angezeigt wurde. Daraufhin wurde der Spülungspuffer durch eine Perfusionslösung (2,5 % PFA) ersetzt und das Tier für weitere 5–15 min perfundiert. Hierdurch wurde eine erste Fixierung des Gehirns gewährleistet.

Nach abgeschlossener Perfusion wurde die Ratte zunächst mit einer geraden Schere dekapitiert und die Haut über der Schädelkalotte reseziert. Nach median-sagittaler Eröffnung des Schädeldaches konnte nach zwei weiteren lateralen Entlastungsschnitten das Gehirn mit einem Heidemannspatel entnommen werden.

Das entnommene Gehirn wurde für 4 h in einem 50 ml Falcon Röhrchen in 2,5 % PFA nachfixiert und danach über Nacht in einem 50 ml Falcon Röhrchen in 25 % Saccharose gelagert. Abschließend wurden die gesammelten Gehirne in Parafilm M eingewickelt und bei -80°C eingefroren.

Zur Vorbereitung auf die immunhistochemischen Färbungen mussten die Gehirne geschnitten werden. Hierzu wurden zunächst der Hirnstamm sowie das Kleinhirn mit einem Skalpell entfernt. Anschließend wurde das tiefgefrorene Gehirn kranial durch Gefriermedium auf einer Einspannungsunterlegscheibe fixiert und von kaudal nach kranial mit einem Gewebeschneider (Kryostat, HM560, Microm) in $30\ \mu\text{m}$ dünne Scheiben bei -18°C geschnitten. Die bis zum Erreichen des Hippokampus abgetragenen Gewebeschnitte wurden verworfen. Die Gewebeschnitte, in denen der Hippokampus zu erkennen war, wurden schließlich mit einem Heidemannspatel in mit PBS gefüllten Falcon Zellkulturplatten (sog. „6-wells“) gesammelt.

3.2.2.2 Gewinnung von organotypischen Gewebekulturen

Für die Gewinnung organotypischer Gewebekulturen wurden 3 Tage alte Tiere (P3) zunächst dekapitiert. Die Schädelkalotte musste dann mit einer feinen geraden Schere median-sagittal eröffnet werden. Nach zwei lateralen Entlastungsschnitten konnte mit Hilfe eines Heidemannspatels das Gehirn entnommen werden und auf einen mit PBS getränkten Schwamm gelegt werden. Anschließend wurden Kleinhirn und Hirnstamm mittels Skalpell entfernt und beide Hemisphären in einem Sagittalschnitt voneinander getrennt. Nun war der Hippokampus zu erkennen und konnte herauspräpariert werden.

3.2.3 Organotypische Gewebekultur

3.2.3.1 Herstellung der Gewebekulturen

Die Herstellung der Gewebekulturen erfolge nach der Methode von Heimrich und Frotscher (1994).

Mit einem Gewebehäcksler wurden die Hippokampi in longitudinal ausgerichtete 400 µm dünne Gewebeschnitte („Slices“) geschnitten. Nach Transferierung in eine mit Präparationsmedium (4°C) gefüllte Glasschale mittels Heidemannspatels wurden die Schnitte unter lichtmikroskopischer Kontrolle in benachbarte Pärchen unterteilt. Durch diese morphologisch kontrollierte Unterteilung wurde sichergestellt, dass für jede experimentell behandelte Kultur eine geeignete Kontrollkultur zur Verfügung stand. Abgesehen vom experimentellen Eingriff wurden Kontrolle und Schwesterkultur unter identischen Bedingungen gehalten. Anschließend wurde jeder Gewebeschnitt auf eine mit Präparationsmedium benetzte Kulturmembran (Millicell-CM, Millipore) aufgetragen. Das überschüssige Präparationsmedium wurde mit einer Glaspipette abgesaugt. Unter sterilen Bedingungen wurden Zellkulturplatten (Falcon Multiwell Cell Culture Plate, 6-well) mit je 1 ml Inkubationsmedium pro Kavität befüllt und die Kulturmembranen hineingelegt, so dass die Kulturen von unten durch die Kulturmembranen begrenzt waren und durch das Inkubationsmedium ernährt werden konnten. Zueinander gehörige Pärchen wurden in untereinander liegenden Kavitäten positioniert. Die Kulturen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ für insgesamt 14 Tage inkubiert. Das Inkubationsmedium wurde alle zwei Tage abgesaugt und durch neues ersetzt.

3.2.3.2 Modulation neuronaler Aktivität

Am 13. Tag der Inkubation wurde die neuronale Aktivität mit Kainsäure stimuliert bzw. mit TTX inhibiert. Die zu einem Pärchen gehörige Schwesterkultur blieb unbehandelt, um als topographisch unmittelbar benachbarte Kontrolle zu dienen. Für die Stimulation von neuronaler Aktivität wurde 6 µM Kainsäure eingesetzt. Pro Kultur und Kavität wurde 1 ml dieser Lösung zugegeben und die Kulturen anschließend für 3 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Hiernach wurde die

Kainsäure durch frisches Inkubationsmedium ersetzt und die Kulturen für einen weiteren Tag inkubiert.

Die Inhibition neuronaler Aktivität wurde mit 0,5 μM TTX durchgeführt. Pro Kultur und Kavität wurde ebenfalls 1 ml dieser Lösung zugegeben und die Kulturen für 24 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Dazu wurden exemplarisch Kulturen für 3 h mit entweder Kainsäure oder Kainsäure + TTX inkubiert. Die Kulturen wurden sofort nach Ablauf der 3 h fixiert und auf die Expression des „immediate early gene“ cFos hin untersucht (Bullitt 1990).

3.2.3.3 Deafferenzierung

In diesem Experiment wurde am 12. Tag der Inkubation jeweils eine Kultur eines Pärchens deafferenziert. Hierfür wurden die Kulturen dem Brutschrank entnommen und in mit Präparationsmedium benetzte Glasschälchen transferiert. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle konnte mit einem feinen Spatel der entorhinale Kortex gründlich vom Hippokampus getrennt werden. So wurden alle Afferenzen zum Hippokampus beseitigt (siehe Abb. 5). Anschließend wurden die deafferenzierten Kulturen sowie die dazugehörigen Kontrollen für weitere 2 Tage nach in 3.2.3.1 beschriebenen Bedingungen inkubiert.

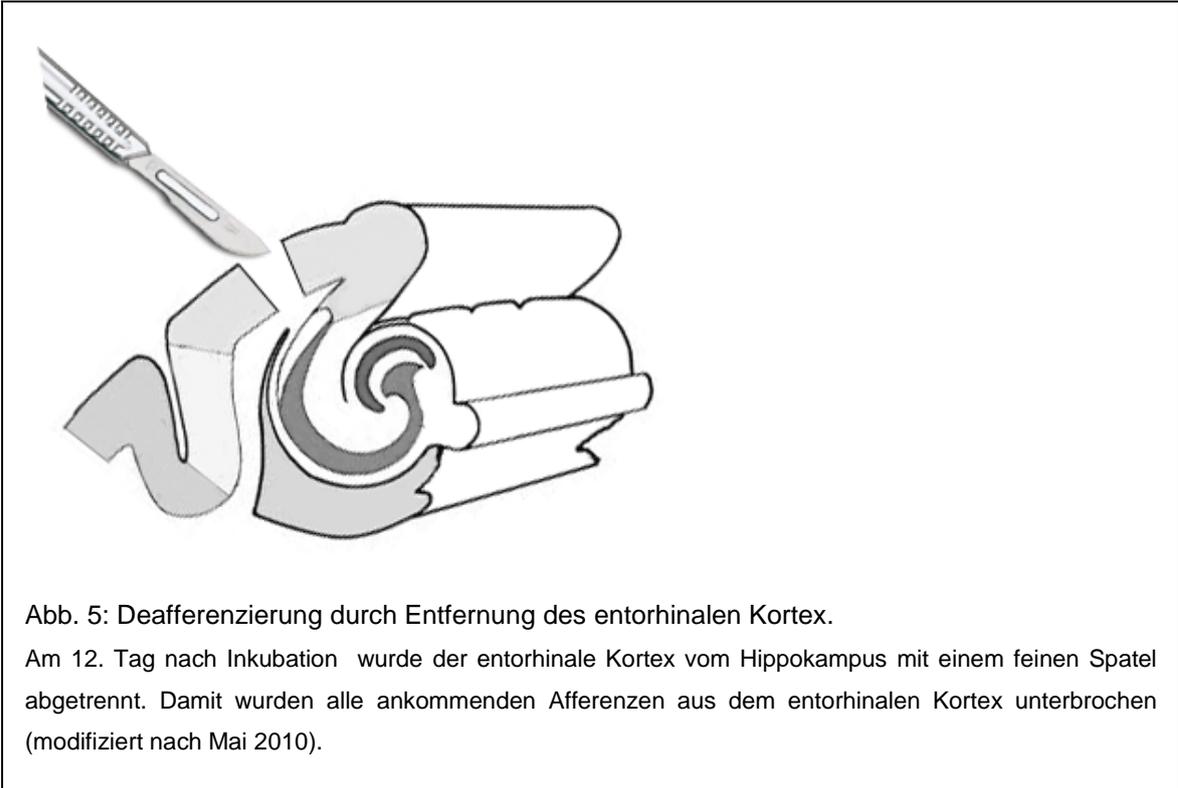


Abb. 5: Deafferenzierung durch Entfernung des entorhinalen Kortex.

Am 12. Tag nach Inkubation wurde der entorhinale Kortex vom Hippokampus mit einem feinen Spatel abgetrennt. Damit wurden alle ankommenden Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex unterbrochen (modifiziert nach Mai 2010).

3.2.4 Immunhistochemische Färbungen

3.2.4.1 Fixierung der Gewebekulturen für Immunhistochemie

Nach insgesamt 14 Tagen Inkubationszeit wurden die Kulturen zunächst mit PBS (37°C) und anschließend mit PBS (4°C) gespült. Hiernach wurden die Kulturen in 2,5 % PFA (4°C) überführt und für 24 h, im Kühlschrank (4°C) gelagert, fixiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Kulturen wiederum mit PBS (4°C) gespült und in 25 % Saccharose (4°C) gelagert. Nach 2 h wurde diese Lösung erneuert, die Kulturen von den Kulturmembranen gelöst und auf Deckgläschen überführt. Angeordnet wurden die Gewebeschnitte immer so, dass Kontrolle und behandelte Kultur nebeneinander lagen. Sie wurden mit „A“ und „B“ beschriftet. Zur Verblindung der folgenden Experimente wurde die Zuordnung, d.h. Art der Behandlung und Kontrolle, durch eine an den folgenden Arbeitsschritten nicht beteiligte Person, notiert. Überschüssige Saccharose-Lösung wurde um die Kultur herum mit Zellstoff entfernt und ein Tropfen Gefriermedium auf die Schnitte gegeben. Unmittelbar danach wurden die Deckgläschen in einem Isolierkasten zum Schnellfrost auf Trockeneis gelegt und dann zur weiteren Verwendung tiefgefroren (-80°C).

Für die Immunhistochemie mussten 20 µm dünne Gewebeschnitte angefertigt werden um eine optimale Antikörperbindung zu erreichen. Hierfür wurden die Schnittkulturen zunächst auf einer Einspannunterlegscheibe in Gefriermedium fixiert und anschließend mittels Gewebeschnneider (HM 560, Microm) geschnitten. Die Schnitte wurden mittels Spatel in mit PBS (Raumtemperatur) befüllte Kavitäten von Falcon Zellkulturplatten überführt und dann mit einem feinen Pinsel auf einen Objektträger aufgetragen. Bei der vorangehenden Vorbereitung der Objektträger war darauf zu achten, dass diese mit einem Zellstofftuch und ein wenig Druck abgerieben wurden, um die Oberflächenspannung zu verringern. Danach wurde der Objektträger mit einem Tropfen Aqua dest. benetzt. Die Anordnung der Gewebeschnitte war immer so, dass jeweils zwei behandelte und zwei unbehandelte Gewebeschnitte eines zueinander gehörigen Kultur-Pärchens dicht beieinander lagen. Auf diese Weise wurden mindestens zwei Objektträger bestückt. Anschließend wurden die Objektträger bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

3.2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die folgenden Versuchsteile wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Arbeitsschritte außerhalb der Feuchtkammern wurden unter ständiger Bewegung in Küvetten durchgeführt, um eine Artefakt-freie Färbung zu gewährleisten.

Die getrockneten Gewebeschnitte wurden zunächst für 20 min mit 2 % PFA nachfixiert und anschließend in PBS für 5 min gewaschen. Daraufhin folgte in einer Feuchtkammer die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der Gewebeschnitte. Dazu wurden die Objektträger für 30 min mit jeweils 400 µl einer Lösung aus PBS, 0,3 % Triton X-100 und 3 % NGS benetzt. Nach abgießen der Flüssigkeit wurde der Primärantikörper hinzugegeben. Die Gewebeschnitte wurden hierfür mit 400 µl/Objektträger einer Lösung aus PBS, 0,3 % Triton X-100 und dem nicht affinitätsgereinigten monoklonalen Antikörper gegen Kv1.2 aus der Maus (1:50) benetzt. Die Inkubationszeit in der Feuchtkammer betrug 24 h. Es schlossen sich zwei Waschrinne mit PBS von jeweils 10 min an. Danach wurden die Objektträger mit jeweils 400 µl einer Lösung aus PBS und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG aus der Ziege (1:800) inkubiert. Ab der Zugabe

des lichtempfindlichen Sekundärantikörpers war darauf zu achten, dass die Objektträger ständig abgedunkelt wurden. Nach 3 h Inkubationszeit wurden die Objektträger erneut in PBS für 5 min gewaschen. Hiernach wurden die Objektträger mit jeweils 500 µl einer Lösung aus PBS und dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (1:1000) inkubiert. Nach 1 min wurde die Lösung wieder abgegossen und es folgte eine abschließende Spülung der Objektträger in einer Küvette mit Aqua dest. für 5 min. Nun wurden die Objektträger abgedunkelt bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich mit Einbett-Medium (Dako Mounting Medium, Dako) eingedeckelt. Bis zur Aushärtung dieses Mediums wurden die Objektträger im Kühlschrank (4°C) gelagert und konnten am folgenden Tag ausgewertet werden.

3.2.4.3 Immunfärbung für Lichtmikroskopie

Der Ablauf der Immunfärbung für Lichtmikroskopie ist bis inklusive der beiden Waschungen nach Zugabe des Primärantikörpers redundant mit dem der Immunfluoreszenzfärbung.

Als Antikörper fanden hier Verwendung:

- monoklonaler Anti-Kv1.2 (affinitätsgereinigt) aus Maus, 1:200
- monoklonaler Anti-Kv1.2 (nicht affinitätsgereinigt) aus Maus, 1:50
- monoklonaler Anti-Kvβ2 aus Maus, 1:200
- polyklonaler Anti-HCN1 aus Kaninchen, 1:400
- polyklonaler Anti-c-Fos aus Kaninchen: 1:500

Dann wurden die Objektträger mit jeweils 400 µl einer Lösung aus PBS und einem für den Primärantikörper spezifischen biotinylierten Sekundärantikörper (Anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege, 1:250) benetzt und 24 h in der Feuchtkammer inkubiert. Es schloss sich ein weiterer Waschgang mit PBS für 15 min an. Anschließend wurden die Objektträger mit jeweils 500 µl einer Lösung benetzt, die Streptavidin enthielt, an das das Enzym Peroxidase gekoppelt war (Vectastain ABC Kit PK-6100, Vector). Das Streptavidin bindet dabei fest an das mit dem Sekundärantikörper verbundene Biotin. Nach einer Inkubationszeit von 10

min in der Feuchtkammer folgte ein weiterer Waschgang mit PBS von 10 min. Nun wurde die optisch kontrollierte Färbung mit 0,7 % Diaminobenzidin-Lösung in PBS und 0,3 % H₂O₂ durchgeführt. Durch Waschungen wurde die Färbereaktion dann gestoppt. Mittels einer aufsteigenden Alkoholkonzentrationsreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol, jeweils 5 min) wurden die Präparate dehydriert und in Xylol equilibriert. Abschließend folgte noch das Eindeckeln mittels Einbett-Medium (Eukitt Mounting Medium, Kindler).

3.2.5 Western Blot

3.2.5.1 Proteinaufbereitung aus Gewebe

Für die Western Blot-Analyse wurde nach Abschluss der experimentellen Behandlung der Gyrus dentatus aus den Kulturen durch einen Schnitt entlang der Fissura hippocampi (siehe Abb. 2) herausgetrennt. Das dadurch gewonnene Gewebe von einer Membran mit identisch behandelten Kulturen (ca. 3–5) wurde zunächst in einem sterilen Eppendorf-Gefäß gesammelt und tief gefroren.

Für die weitere Bearbeitung musste im nächsten Schritt das zu bestimmende Protein aus dem Gewebe extrahiert werden. Hierfür wurden die Gewebe-Kulturen nach Modulation neuronaler Aktivität (TTX, Kainsäure oder unbehandelte Kontrolle) in einem Eppendorf-Gefäß abgewogen und anschließend mit sechsfacher Menge RIPA-Puffer (engl. für „Radio-Immunoprecipitation Assay“-Puffer) und Proteaseinhibitor (Protease-Inhibitorenmix complete, Roche) versetzt. Das Gemisch wurde nun in ein Potter-Röhrchen gegeben und auf Eis homogenisiert. Nach Pipettierung in ein Eppendorf-Gefäß musste das Homogenisat bei gelegentlichem Umschwenken 20 min lang auf Eis gekühlt werden. Es folgte eine Zentrifugierung bei 4°C mit maximaler Leistung. Das abgetrennte Pellet konnte verworfen werden. Vom Überstand wurden 8–10 µl für die Proteinbestimmung nach Bradford abgenommen und für die Weiterbehandlung mit Aqua dest. verdünnt (1:100). Die übrige Proteinlösung konnte bei Bedarf in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert werden.

3.2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976).

Für die Eichung wurde Bovines Serumalbumin (BSA, 0,5 µg/µl) verwendet und eine Standardreihe erstellt (0 µl, 2,5 µl, 5 µl, 10 µl, 15 µl und 20 µl). Jede Probe wurde mit Aqua dest. auf 20 µl aufgefüllt. Die Proteinbestimmung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und ermöglichte eine Konzentrationsbestimmung im linearen Bereich der BSA-Eichgeraden von 1–10 µg Protein/ml. Analog wurde für die zu bestimmende Probenlösung verfahren und eine Standardreihe (0 µl, 2,5 µl, 5 µl, 10 µl, 15 µl und 20 µl) angesetzt. Zur Auffüllung auf 20 µl wurde RIPA-Puffer verwendet. Anschließend wurden Küvetten mit einer Lösung aus je 800 µl Aqua bidest. und 200 µl Bradford-Reagenz befüllt und die BSA- und Probenlösungen zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm das Absorptionsmaximum gemessen und der Proteingehalt über die BSA-Standardkurve errechnet. Dabei wurde von 3 gleichbehandelten Proben der Mittelwert bestimmt.

3.2.5.3 SDS-PAGE

Die SDS-Page (engl. für sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt.

Zunächst wurden Polyacrylamidgele hergestellt. Die Glasplatten, zwischen denen das Gel gegossen wurde, mussten mit 96 % EtOH gereinigt und in den Gelgießrahmen eingespannt werden. Dann wurde das Trenngel mit einer Pipette zwischen die Glasscheiben gegeben und mit 500 µl Aqua bidest. überschichtet um eine glatte Trennschicht zu erhalten. Anschließend polymerisierte das Gel 30 min aus. Nach dieser Zeit wurde das Wasser entfernt, durch das Sammelgel ersetzt und der Probenkamm eingeführt. Dieser konnte nach weiteren 30 min entfernt werden, so dass Probenaschen (Slots) entstanden. Die Proteinproben wurden nun im Verhältnis 5:1 mit einem Probenpuffer (5fach Laemmli-puffer) versetzt. Für jeden Slot sollten 20 µl Proteinlösung zu Verfügung stehen. Die Lösung wurde 5 min durch Erhitzung denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Nun wurden die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. Die äußere und innere Kammer

der Zelle wurde mit je der gleichen Menge Laufpuffer (1fach Laemmli-puffer) befüllt. Der Flüssigkeitsspiegel der äußeren Kammer betrug ca. 2 cm, die innere Kammer war bis zum oberen Rand befüllt. Nach Durchspülung der Probenaschen mit Probenpuffer konnten die Proteinlösungen eingefüllt werden. Der erste Slot enthielt den Molekulargewichtsmarker. Die Auftrennung erfolgte bei 180 V, 150 mA und 55 min.

3.2.5.4 Western Blot

Nach dem Lauf wurden die Gele ohne Verzögerung aus der Apparatur entnommen und nach dem Semidry-Blot-System „geblottet“.

Das Sammelgel wurde abgeschnitten. Dann wurden je zwei dicke und dünne Filterpapiere für die Gelgröße zurechtgeschnitten und zusammen mit der Nitrocellulose-Membran in Semidry-Transfer-Puffer 2–3 min eingeweicht. Die Schutzfolien der Nitrocellulose-Membran konnten jetzt abgelöst werden. Das Gel musste ebenfalls kurz mit Semidry-Transfer-Puffer gespült werden. „Gebloftet“ wurde bei 35 V und 150 mA für 60 min.

Nach Ablauf der Zeit wurde eine unspezifische Proteinfärbung mit der Färbelösung Ponceaurot in Essigsäure (0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure) durchgeführt und nach 1 min mit Aqua dest. zur Entfärbung gespült. Nun wurden die Lagen der Molekulargewichtsmarker zur besseren Orientierung mit einem Bleistift nachgezeichnet. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h bei Raumtemperatur in einem Blockierpuffer (Milchpulver, PBS-T) gegeben und mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Verwendet wurden monoklonale Antikörper gegen Kv1.2 aus der Maus (1: 200) sowie monoklonale Antikörper gegen GAPDH aus der Maus als Positivkontrolle (1:10000). Verdünnungsmedium war der Waschpuffer (Milchpulver, PBS-T). Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal je 10 min mit PBS-T gewaschen und mit dem Sekundärantikörper 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Sekundärantikörper war Anti-Maus-IgG aus der Ziege mit Peroxidase gekoppelt. Die Verdünnung (1:5000) erfolgte mit Waschpuffer (Milchpulver, PBS-T) bei Vorverdünnung 1:1 mit Glycerol.

Nach drei weiteren Waschvorgängen von jeweils 10 min in PBS-T wurde mit der Entwicklung des Blots begonnen.

Unter Rotlicht wurde er mit 2 ml Elektrolumineszenz-Lösung (ECL-Lösung, je 1 ml „Enhancer“ und „Developer“) benetzt und für 1–2 min inkubiert. Hiernach wurde der Blot mit Zellstoff vorsichtig trocken gewischt und zwischen zwei transparente Folien in eine Entwickler-Kassette eingelegt. Das erste Foto wurde für 2 min belichtet, jedes weitere je nach Ergebnis einige Minuten länger. Anschließend wurde das Bild mit Entwickler und Fixierer entwickelt.

3.2.6 Auswertung

3.2.6.1 Bildanalyse

3.2.6.1.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Die lichtmikroskopischen Färbungen wurden mit einer ZEISS Axiocam HRc des Mikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss) und dem zugehörigen Programm Axiovision 3.1 bei einheitlichen Einstellungsparametern digital fotografiert. Es wurden exemplarische Übersichtsaufnahmen von Hippokampus in 100x und 200x Vergrößerung sowie Detailaufnahmen der Molekularschicht in 400x Vergrößerung angefertigt. Anschließend wurden die Aufnahmen mit Adobe Photoshop bearbeitet.

3.2.6.1.2 Immunfluoreszenz-Auswertung

Zunächst wurden die Präparate durch das Axioskop 2 (HBO 100, Carl Zeiss) bei einer Wellenlänge von 370 nm für DAPI betrachtet, um die Molekularschicht zu detektieren. Anschließend konnte der Erfolg einer Cy3-Färbung bei einer Wellenlänge von 546 nm bewertet werden. Exemplarisch wurden mit der ZEISS Axiocam HRc digitale Aufnahmen gemacht. Geeignete Gewebeschnitte wurden markiert. Es war darauf zu achten die Belichtungszeit so kurz wie möglich zu halten. Anschließend konnten an einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (LSM Axiovert 100 Microsystem, Carl Zeiss) Aufnahmen der Molekularschicht gemacht werden. Da die Intensitäten der Färbungen zwischen den verschiedenen

Experimentreihen zum Teil deutlich voneinander abwichen, musste für jede Experimentreihe zunächst allgemeingültige optimale Parameter für Helligkeit, Kontrast und Blende („pinhole“) ermittelt werden. Damit konnte gewährleistet werden, dass alle Bilder einer Experimentreihe nach identischen Einstellungen fotografiert wurden. Experimentübergreifend wurde jedoch stets die Einstellung so gewählt, dass das aufgenommene Bild dem Durchschnitt von 8 Bildern entsprach („average“ = 8).

Um die richtige Lokalisation zu finden, war es notwendig, sich mit dem entsprechenden Filter für DAPI zu orientieren. Dann wurden von jedem Gewebeschnitt jeweils drei Aufnahmen der Molekularschicht mit dem Filter für Cy3 gemacht um die Variabilität gering zu halten. Die Anordnung dieser Aufnahmen war wie folgt zu wählen (siehe Abb. 6):

Zunächst wurde der Mittelpunkt M1 der Länge der angeschnittenen Körnerzellschicht ermittelt. Auf dieser Höhe wurde ein Bild B1 der Molekularschicht aufgenommen. Nun wurde die Länge der beiden Strecken vom Mittelpunkt bis zu den beiden Enden der Körnerzellschicht bestimmt. Auf der Höhe der beiden Mittelpunkte M2 und M3 wurde nun die Bilder B2 und B3 der Molekularschicht gemacht.

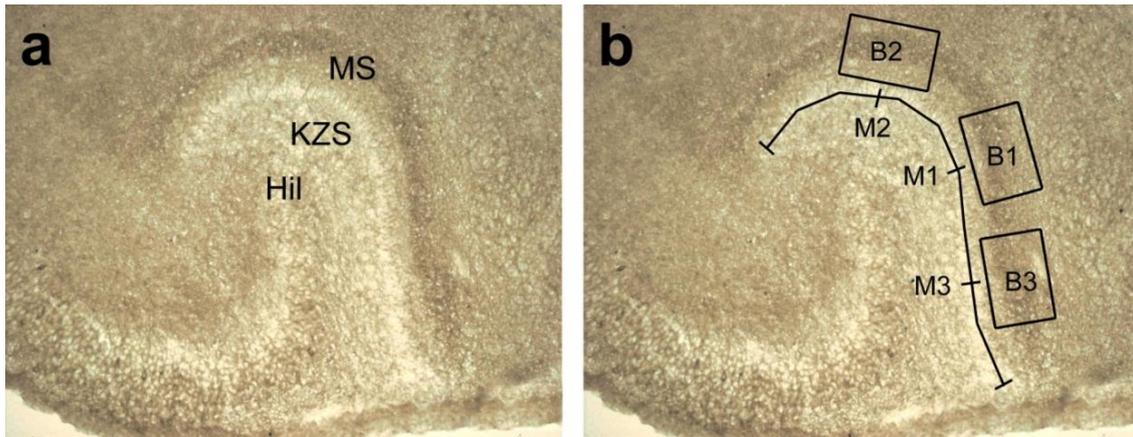


Abb. 6: Methodische Anordnung der Bildanalyse.

Gezeigt ist eine Übersichtsaufnahme des Gyrus dentatus einer 3 Tage (P3) alten Ratte (a). Dabei handelt es sich um einen immunhistochemischen Nachweis von Kv1.2. Zu erkennen sind Hilus (Hil), Körnerzellschicht (KZS) und Molekularschicht (MS). Im gleichen Bild wie in a wurde eine exemplarische Lokalisation der Aufnahmen eingezeichnet (b). Zunächst wurde die Länge der Körnerzellschicht abgeschätzt (durchgehende schwarze Linie) und deren Mittelpunkt M1 bestimmt. Dieser Punkt teilt die KZS in zwei Hälften. Nun wurden die Mittelpunkte M2 und M3 der beiden Hälften bestimmt. Die Aufnahmen B1–B3 wurden nun in der Molekularschicht gemacht, und zwar jeweils auf Höhe der bestimmten Mittelpunkte M1–M3. Die tatsächliche Färbung zum Zeitpunkt dieses Arbeitsschrittes war eine Cy3-Färbung. Färbung: DAB. Vergrößerung: 200x.

Die aufgenommenen Bilder wurden nun in Bezug auf Farbintensität und Helligkeit der mittleren Molekularschicht quantitativ ausgewertet (siehe Abb. 7). Das Programm Openlab 3.1.5 (Improvisation) wies einem definierten Bereich hinsichtlich beider Parameter einen absoluten Zahlenwert zu. Je heller der Bereich war, desto höher war der Zahlenwert. Das bedeutet, je ausgeprägter die Immunreaktivität (Proteinexpression), desto höher ist der Wert. Um subjektive Einflüsse noch weiter zu verringern, wurden auf jedem Bild 5 Felder der definierten Größe 30 x 30 Pixel markiert. Insgesamt wurden also von jedem Schnittpräparat 15 Felder à 30 x 30 Pixel analysiert. Openlab legte dann automatisch eine Excel-Tabelle an, in der nach Intensität der 15 Felder ein summierter absoluter Zahlenwert berechnet wurde.

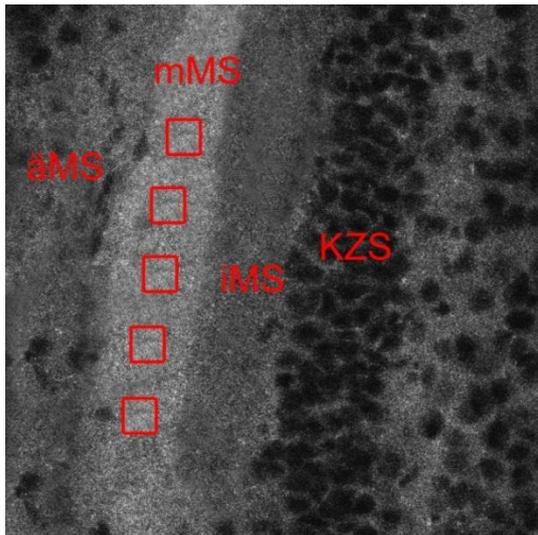


Abb. 7: Auswertungsbereiche für die Bearbeitung mit dem Programm Openlab.

Bei dem Bild handelt es sich um eine Aufnahme Cy3-markierter Kv1.2-Kanäle im Gyrus dentatus mit dem LSM in 400x Vergrößerung. Zu erkennen sind Körnerzellschicht (KZS), innere Molekularschicht (iMS), mittlere Molekularschicht (mMS) und äußere Molekularschicht (äMS). Der Nachweis präsynaptisch lokalisierter Kv1.2-Kanäle erfolgte in der mittleren Molekularschicht. In jeder Aufnahme wurden 5 Felder der definierten Größe 30 x 30 Pixel markiert und deren Intensität bzw. Helligkeit ausgewertet.

3.2.6.1.3 Western Blot-Auswertung

Die Bildanalyse der Western Blots erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ Vers. 1.43f (Abramoff et al. 2004). Um die Bilder quantitativ auszuwerten mussten sie zunächst als TIFF-Format eingescannt werden. Die Software berechnete über ein Dichteverteilungsdiagramm die Grau-Intensität der untersuchten Protein-Bande und gab sie als absoluten Zahlenwert aus. Anders als bei der immunhistochemischen Analyse, wo einzelne Kulturen untersucht wurden ($n = 1$: eine Kultur), spiegelt dieser Wert die Kv1.2-Expression in mehreren (3–5) von einer Membran gesammelten Kulturen wieder ($n = 1$: alle Kulturen von einer Membran; siehe auch 3.2.5.1). Zur Normalisierung wurde dieser Wert durch den korrespondierenden Wert der GAPDH-Bande geteilt.

3.2.6.2 Statistik

Für die immunhistochemischen Versuche zur aktivitätsabhängigen Regulation wurden die Gewebekulturen für einen „paired t-test“ verblindet. Dieses geschah durch Zuweisung der Buchstaben „A“ oder „B“, ohne dass die Bedeutung dieser Buchstaben dem Experimentator bekannt war. D.h. die experimentelle Behandlung der Kultur wurde mir erst nach Abschluss der Auswertung bekannt gegeben. Für die Western Blots wurde ein „unpaired t-test“ angewendet.

Die statistische Auswertung erfolgte dann mit Hilfe von Excel und Graph Pad Prism.

Für die Auswertung wurden zuerst alle Einzelmesswerte aus einer Kultur addiert und ein Durchschnittswert berechnet. Die Durchschnittswerte aus den Kulturen derselben Behandlungsgruppe (Kainsäure, TTX oder unbehandelt) wurden dann in eine Excel-Tabelle übertragen und Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Standardfehler (SE) und Irrtumswahrscheinlichkeit (p) berechnet. Der Mittelwert der unbehandelten Kontrollkulturen wurde als 100 % angesetzt. Die Werte der Kainsäure- bzw. TTX-behandelten Kulturen wurden als % von der Kontrolle angegeben.

4 Ergebnisse

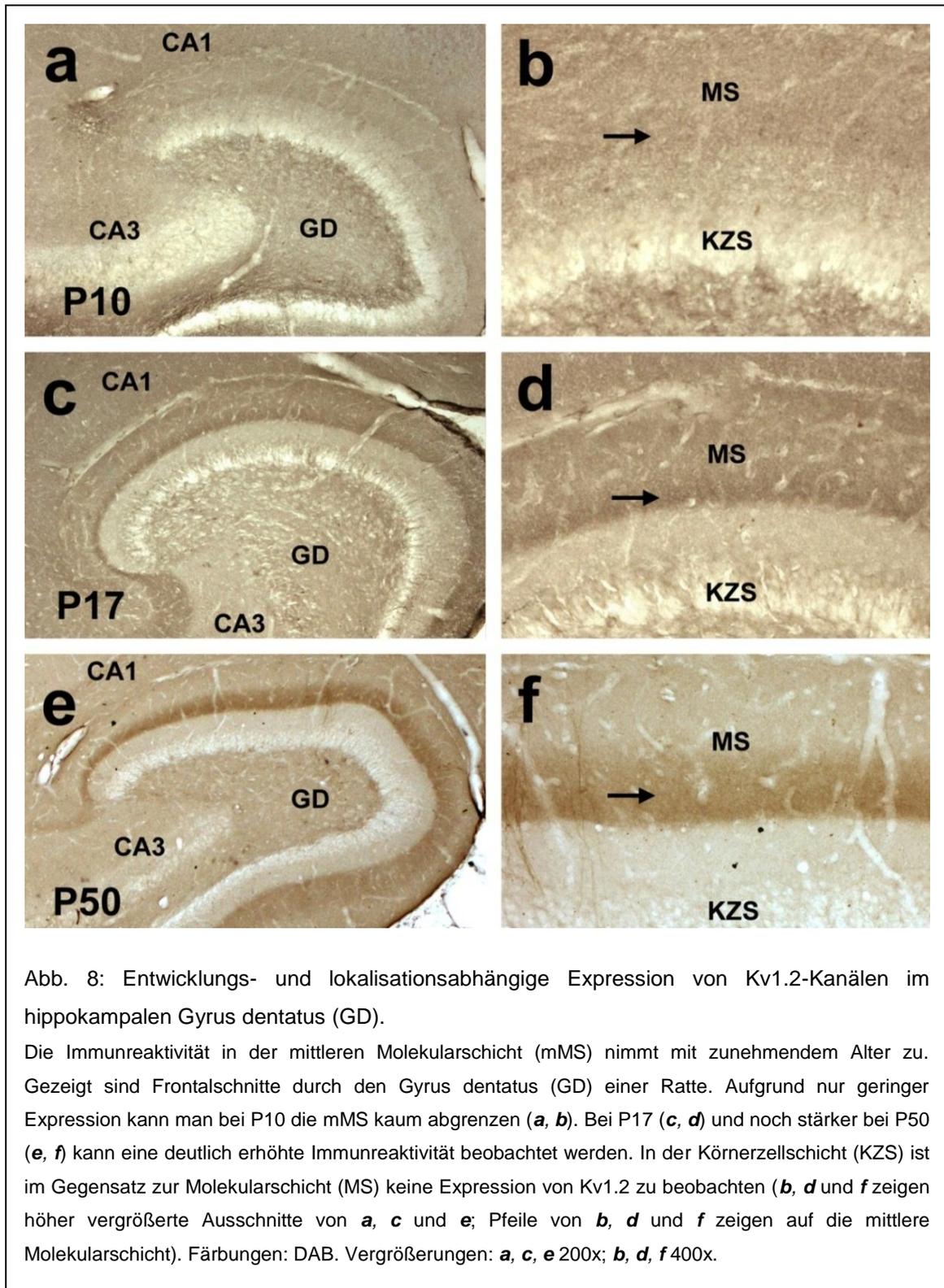
4.1 Altersabhängige Expression von Kv1.2 in der Molekularschicht

Zur Beantwortung der eingangs genannten Fragestellung führte ich zuerst eine Entwicklungsstudie zur Expression von Kv1.2 in der Molekularschicht des Gyrus dentatus der Ratte durch. In der mittleren Molekularschicht (mMS) des Gyrus dentatus terminieren diejenigen Fasern des Tractus perforans, die dem medialen entorhinalen Kortex entspringen (Wang et al. 1994, Maletic-Savatic et al. 1995, Veh et al. 1995, Cooper et al. 1998).

Untersucht wurden die Altersstufen P10, P17 und P50. In den Übersichtsaufnahmen konnte man den Gyrus dentatus und das Cornu ammonis mit seinen Anteilen CA1–CA4 gut erkennen. Der entorhinale Kortex mit dem medialen und lateralen Anteil war ebenfalls meist eindeutig vom Gyrus dentatus zu unterscheiden, da die trennende Fissura hippocampalis sehr prominent erschien.

Schon bei geringer Vergrößerung war es möglich Körnerzellschicht und Molekularschicht voneinander abzugrenzen, da der Farbkontrast sehr groß war. Abhängig vom Alter der Ratte fand man eine besonders stark ausgeprägte Immunreaktivität von Kv1.2 in der mittleren Molekularschicht (mMS), während man in der angrenzenden äußeren und inneren Molekularschicht (äMS, iMS) eine deutlich geringere Protein-Expression registrierte. Wenn man nun die Expressionsstärke im Laufe der Entwicklung betrachtete, konnte man erkennen, dass die Immunreaktivität auf Kv1.2 in der mMS zunahm (Abb. 8a–f). Man kann daher annehmen, dass eine entwicklungsrelevante Expressionszunahme von Kv1.2 innerhalb der Molekularschicht lediglich im unmittelbaren Bereich der Tractus perforans-Körnerzell-Synapse auftritt. Beteiligt sind nur Neurone des Tractus perforans, die aus dem medialen Anteil des entorhinalen Kortex projizieren.

Die Körnerzellschicht und CA3 hingegen erschienen nur gering gefärbt. Im Vergleich zum übrigen Hippokampus-Gewebe wurde hier sogar auffällig wenig Kv1.2 exprimiert. Diese Beobachtung scheint entwicklungsunabhängig zu sein.



4.2 Altersabhängige Expression von Kv β 2 in der Molekularschicht

Analog zu den Ergebnissen für Kv1.2 konnte auch für die Kv β 2-Untereinheit dieses Kanals gezeigt werden, dass die Expressionsdichte in gleicher Weise entwicklungsabhängig war (Abb. 9). Im Verlauf der Altersstufen P10, P17 und P50 konnte eine deutliche Zunahme der Immunreaktivität auf die Kv β 2-Untereinheit beobachtet werden. Die zytoplasmatische Kv β 2-Untereinheit ist wichtig für den axonalen Transport der Poren-bildenden Kv1.2- α -Untereinheit (Campomanes et al. 2002). Es fällt auf, dass sich wie auch bei Kv1.2 die Expression relativ streng auf die mMS beschränkt hat, also auch hier auf den unmittelbaren Bereich der Tractus perforans-Körnerzell-Synapse.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass eine entwicklungsabhängige Expressionszunahme der Kv β 2-Untereinheit auch in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus und in CA3 zu finden war. Dieses steht im Widerspruch zu früheren Untersuchungen von Rhodes et al. (1997), bei denen keine Immunreaktivität gefunden werden konnte. Anders also als bei Kv1.2 konnte in diesen beiden Regionen eine besonders ausgeprägte Expression gefunden werden. Besonders in der frühen Entwicklungsphase (P10–P17) konnte eine Expressionszunahme gezeigt werden (Abb. 9 a–d).

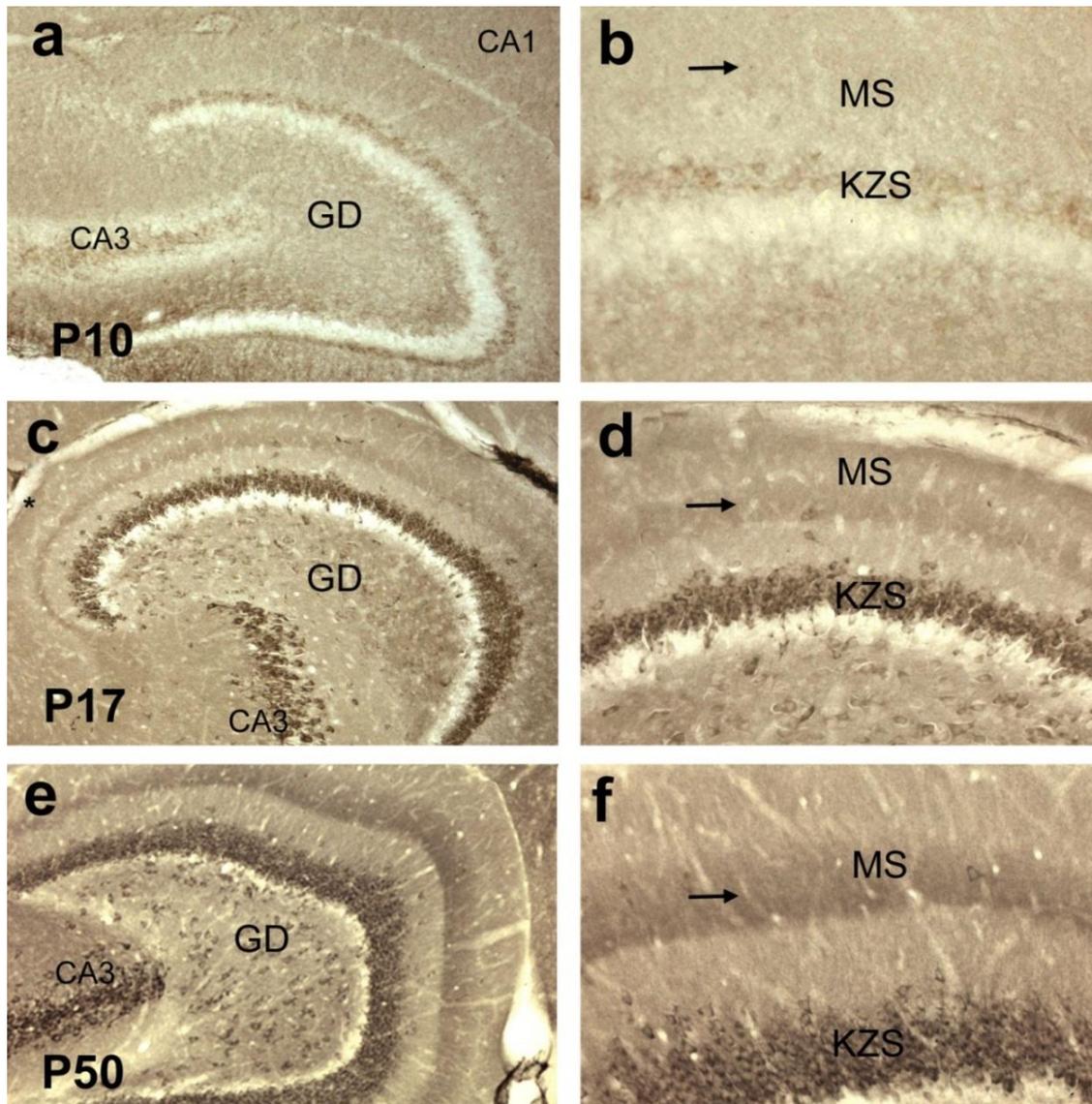


Abb. 9: Entwicklungs- und lokalisationsabhängige Expression der Kv β 2-Untereinheit im hippocampalen Gyrus dentatus (GD).

Gezeigt sind Frontalschnitte durch den Gyrus dentatus von Ratten der Alterstufe P10, P17 und P50. Vergleichbar zu den Ergebnissen für Kv1.2 war bei P10 kaum Immunreaktivität für Kv β 2 in der Molekularschicht (MS) zu erkennen (**a, b**). Die Immunreaktivität nahm jedoch – wie bei Kv1.2 – mit dem Alter (**c–f**) deutlich zu (Pfeile zeigen auf die mittlere Molekularschicht; **b, d und f** zeigen höher vergrößerte Ausschnitte aus **a, c** und **e**). Im Gegensatz zu Kv1.2 war eine Expression von Kv β 2 nicht auf die Molekularschicht beschränkt. Starke Immunreaktivität fand sich auch in der Körnerzellschicht (KZS) des Gyrus dentatus sowie in der CA3-Region. Färbungen: DAB. Vergrößerungen: **a, c, e** 200x; **b, d, f** 400x.

4.3 Vergleich der entwicklungsabhängigen Expression von Kv1.2/Kv β 2 und HCN1

Um die Expression von Kv1.2 und Kv β 2 in der Molekularschicht mit der Expression von HCN1 zu korrelieren, wurden an Schnitten derselben Tiere (P10, P17 und P50) auch die Expression von HCN1 untersucht (Abb. 10a–d). Der präsynaptisch lokalisierte HCN1-Kanal hat im Vergleich zum hyperpolarisierenden Kanal Kv1.2 depolarisierende Eigenschaften.

In der untersuchten Region erschien die Immunreaktivität in der mMS deutlich prominenter als in der äMS und iMS. Ähnlich wie von Bender et al. (2007) beschrieben, zeigte HCN1 einen zu Kv1.2 und der Kv β 2-Untereinheit gegenläufigen entwicklungsabhängigen Expressionsverlauf.

Eine leichte Expression von HCN1 fand sich – allerdings nur bei jungen Tieren – auch in der Körnerzellschicht.

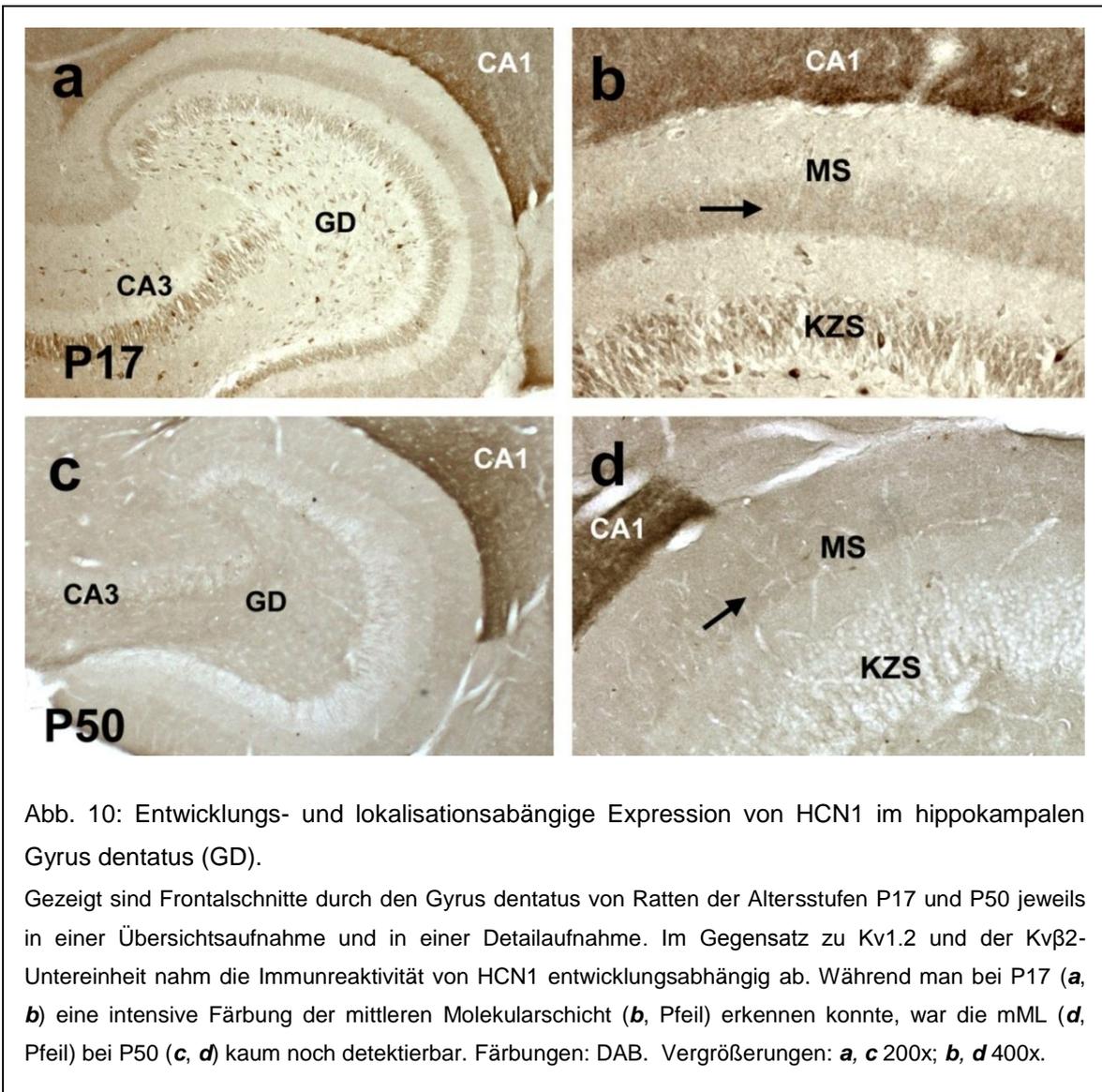


Abb. 10: Entwicklungs- und lokalisationsabhängige Expression von HCN1 im hippocampalen Gyrus dentatus (GD).

Gezeigt sind Frontalschnitte durch den Gyrus dentatus von Ratten der Altersstufen P17 und P50 jeweils in einer Übersichtsaufnahme und in einer Detailaufnahme. Im Gegensatz zu Kv1.2 und der Kv β 2-Untereinheit nahm die Immunreaktivität von HCN1 entwicklungsabhängig ab. Während man bei P17 (**a**, **b**) eine intensive Färbung der mittleren Molekularschicht (**b**, Pfeil) erkennen konnte, war die mML (**d**, Pfeil) bei P50 (**c**, **d**) kaum noch detektierbar. Färbungen: DAB. Vergrößerungen: **a**, **c** 200x; **b**, **d** 400x.

4.4 Etablierung eines *in vitro*-Modells

4.4.1 Kv1.2-Expression: Vergleich *in vivo/in vitro* und präsynaptische Lokalisation

Um die Regulation der Kv1.2-Expression experimentell untersuchen zu können wurde ein Gewebekultur-Modell etabliert. Dazu wurde zuerst überprüft, ob das Expressionsmuster *in vitro* dem *in vivo* entsprach.

Auch für das Gewebekultur-Modell konnte gezeigt werden, dass Kv1.2 in der mMS, also im Bereich der Tractus perforans-Körnerzell-Synapse, besonders stark

exprimiert wurde (Abb. 11a, b). Es konnte somit für die weiteren Untersuchungen als geeignet angesehen werden.

Um die genaue Lokalisation von Kv1.2 innerhalb der Tractus perforans-Körnerzell-Synapse zu untersuchen (also prä- oder postsynaptisch) wurde ein Deafferenzierungs-Versuch durchgeführt. In der Nativkultur konnte nach 14 Tagen *in vitro* ein immunhistochemisches Band in der mMS gezeigt werden (Abb. 11a, b). Nach 12 Tagen *in vitro* wurden nun alle ankommenden Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex durchtrennt. Zwei Tage nach Deafferenzierung konnte ein Verlust des Bandes in der mMS beobachtet werden (Abb. 11c, d). Die vollständige Integrität des Tractus perforans scheint somit eine wichtige Voraussetzung zu sein Kv1.2 in der Tractus perforans-Körnerzell-Synapse zu exprimieren. Weiterhin deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Kanal seinen Ursprung in Neuronen des Tractus perforans hat und somit präsynaptisch lokalisiert ist. Zur Bestätigung dieser Annahme könnten elektronenmikroskopische Untersuchungen hilfreich sein.

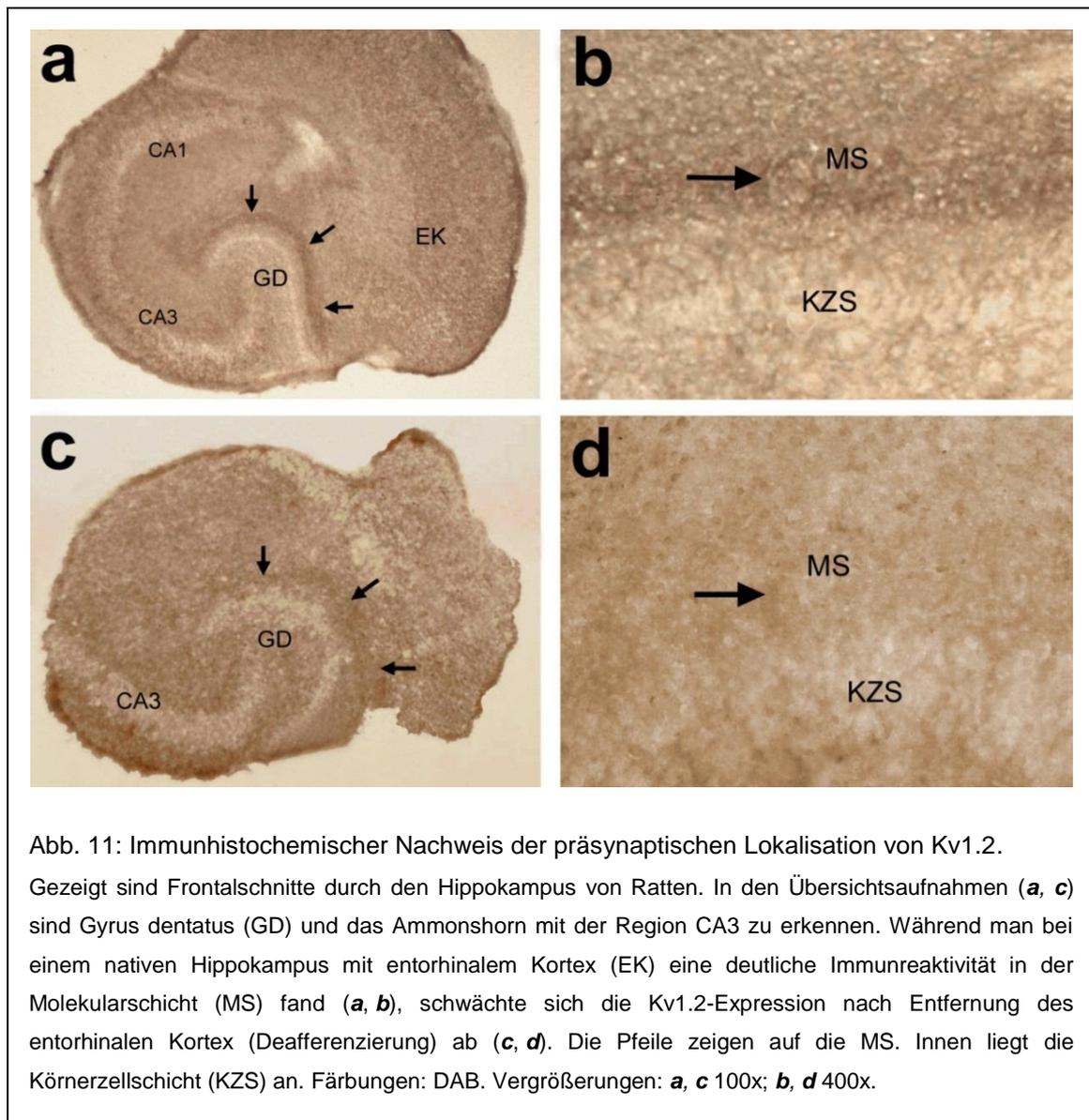


Abb. 11: Immunhistochemischer Nachweis der präsynaptischen Lokalisation von Kv1.2.

Gezeigt sind Frontalschnitte durch den Hippokampus von Ratten. In den Übersichtsaufnahmen (**a**, **c**) sind Gyrus dentatus (GD) und das Ammonshorn mit der Region CA3 zu erkennen. Während man bei einem nativen Hippokampus mit entorhinalen Kortex (EK) eine deutliche Immunreaktivität in der Molekularschicht (MS) fand (**a**, **b**), schwächte sich die Kv1.2-Expression nach Entfernung des entorhinalen Kortex (Deafferenzierung) ab (**c**, **d**). Die Pfeile zeigen auf die MS. Innen liegt die Körnerzellschicht (KZS) an. Färbungen: DAB. Vergrößerungen: **a**, **c** 100x; **b**, **d** 400x.

4.4.2 Modulation neuronaler Aktivität

Für die Etablierung des *in vitro*-Systems wurde weiterhin neuronale Aktivität *in vitro* erzeugt. Anhand der Expression von c-Fos konnte die neuronale Aktivität dargestellt werden. C-Fos gehört zu der Gruppe der frühen Gene („immediate early genes“) und zeigt als etablierter Marker frühe neuronale Aktivität an (Bullitt 1990).

Als Exzitotoxin wurde Kainsäure verwendet, als Inhibitor neuronaler Aktivität der Natrium-Kanal-Blocker Tetrodotoxin (TTX). Die Untersuchungen mit Kainsäure

ergaben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine deutliche Zunahme der c-Fos-Expression (Abb. 12a, b).

Um den inhibierenden Effekt von TTX zu überprüfen, wurde die neuronale Aktivität mit Kainsäure stimuliert, gleichzeitig jedoch TTX zugegeben. Dies führte zu einer deutlich reduzierten Expression von cFos in Gyrus dentatus und CA3-Region (Abb. 12c). Ein Effekt von TTX auf die Aktivität in unbehandelten Kulturen konnte nicht nachgewiesen werden, da in diesen die über cFos darstellbare Grundaktivität nur sehr gering war.

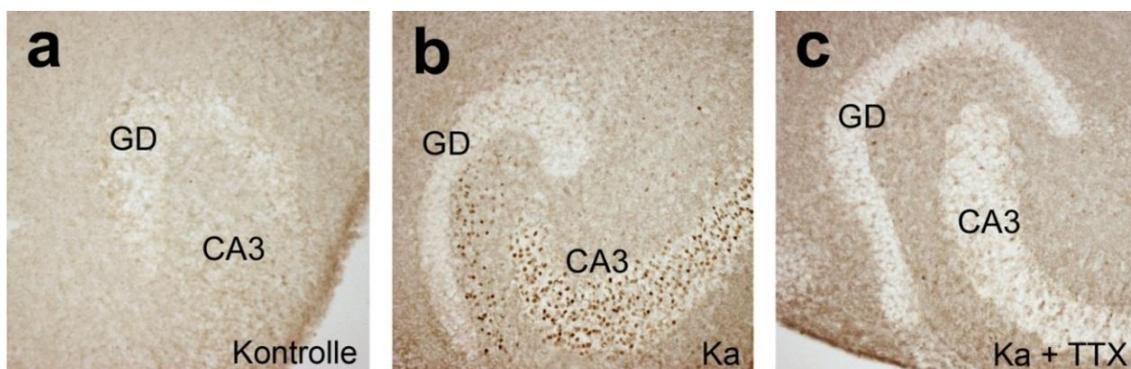


Abb. 12: Induktion/Inhibition von neuronaler Aktivität *in vitro* mit Kainsäure/TTX

Gezeigt sind Frontalschnitte durch den Gyrus dentatus von Ratten. Zum Nachweis neuronaler Aktivität wurde die c-Fos-Expression dargestellt (a–c). Nach Inkubation mit Kainsäure (b) nahm die Aktivität in Gyrus dentatus (GD) und CA3 deutlich zu. Nach Inkubation mit Kainsäure und gleichzeitiger Aktivitätsinhibition mit TTX (c) war die Immunreaktivität im Vergleich zur Kainsäure-behandelten Kultur (b) deutlich reduziert. Färbungen: DAB. Vergrößerungen: 100x.

4.5 Aktivitätsabhängige Veränderungen der Kv1.2 Expression in der Molekularschicht *in vitro*

4.5.1 Immunhistochemie: Aktivitätsmodulation mittels Kainsäure/TTX

Zur quantitativen Untersuchung der Kv1.2-Expression nach Induktion und Inhibition neuronaler Aktivität wurde an den stimulierten bzw. inhibierten Gewebekulturen eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (siehe Abb. 13a–c). Die Stärke des Fluoreszenzsignals korreliert mit der Immunreaktivität von Kv1.2.

Die graphische Auswertung ergab, dass die Immunreaktivität nach Kainsäure-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %) im Mittel 110 % betrug ($n = 22$, $SE = 8,3 \%$, $p = 0,32$; siehe Abb. 13d).

Die entsprechenden Ergebnisse nach Aktivitätsinhibition mit TTX überraschten. So war die Immunreaktivität noch ausgeprägter. In Bezug auf die unbehandelte Kontrollkultur (100 %) war sie um 33 % erhöht ($n = 18$, $SE = 18,9 \%$, $p = 0,108$; siehe Abb. 13e). Zwar konnten die Auswertungen beider Versuchsreihen keine statistische Signifikanz zeigen, es war jedoch ein deutlicher Trend zu erkennen.

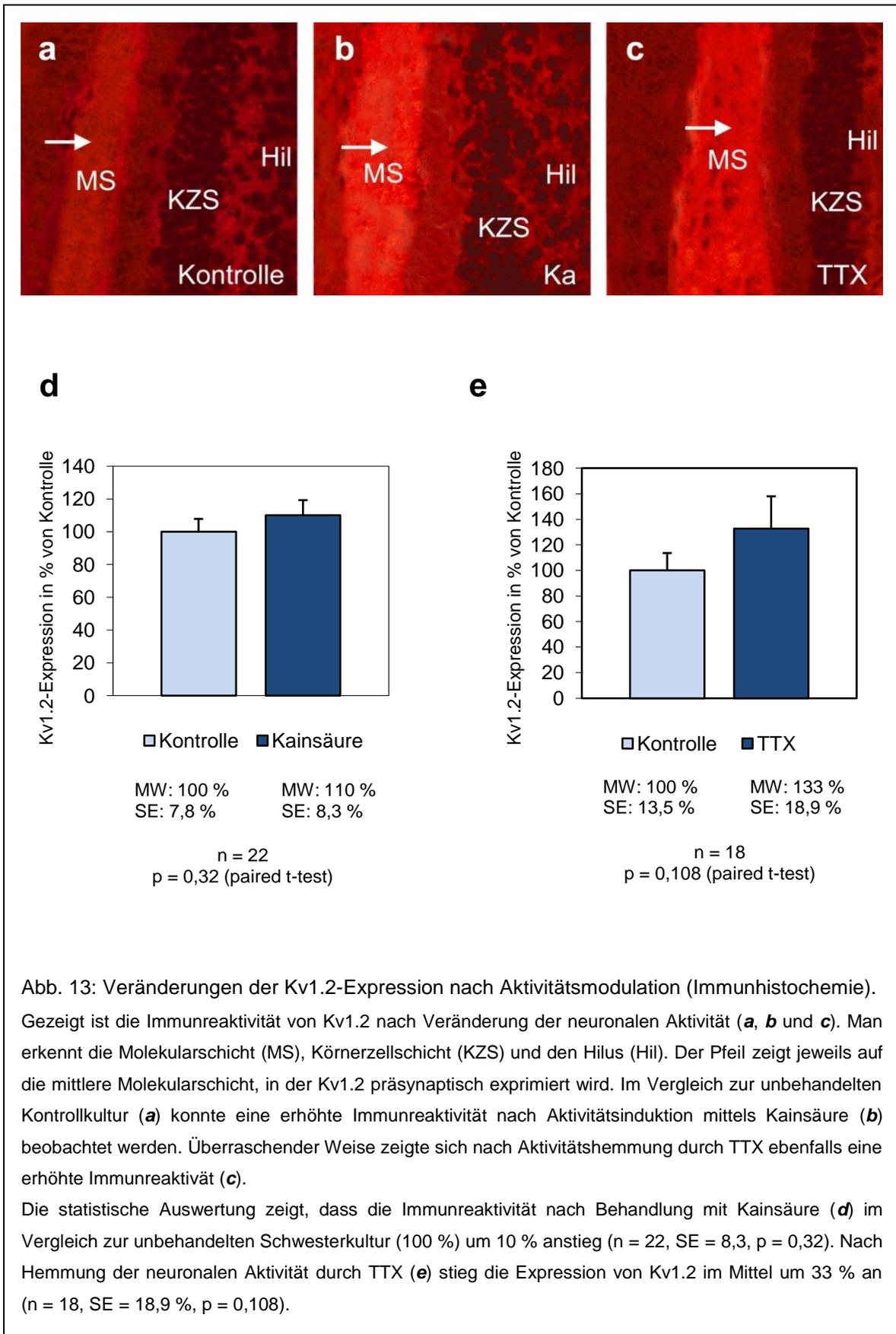


Abb. 13: Veränderungen der Kv1.2-Expression nach Aktivitätsmodulation (Immunhistochemie). Gezeigt ist die Immunreaktivität von Kv1.2 nach Veränderung der neuronalen Aktivität (**a**, **b** und **c**). Man erkennt die Molekularschicht (MS), Körnerzellschicht (KZS) und den Hilus (Hil). Der Pfeil zeigt jeweils auf die mittlere Molekularschicht, in der Kv1.2 präsynaptisch exprimiert wird. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur (**a**) konnte eine erhöhte Immunreaktivität nach Aktivitätsinduktion mittels Kainsäure (**b**) beobachtet werden. Überraschender Weise zeigte sich nach Aktivitätshemmung durch TTX ebenfalls eine erhöhte Immunreaktivität (**c**).

Die statistische Auswertung zeigt, dass die Immunreaktivität nach Behandlung mit Kainsäure (**d**) im Vergleich zur unbehandelten Schwesterkultur (100 %) um 10 % anstieg (n = 22, SE = 8,3, p = 0,32). Nach Hemmung der neuronalen Aktivität durch TTX (**e**) stieg die Expression von Kv1.2 im Mittel um 33 % an (n = 18, SE = 18,9 %, p = 0,108).

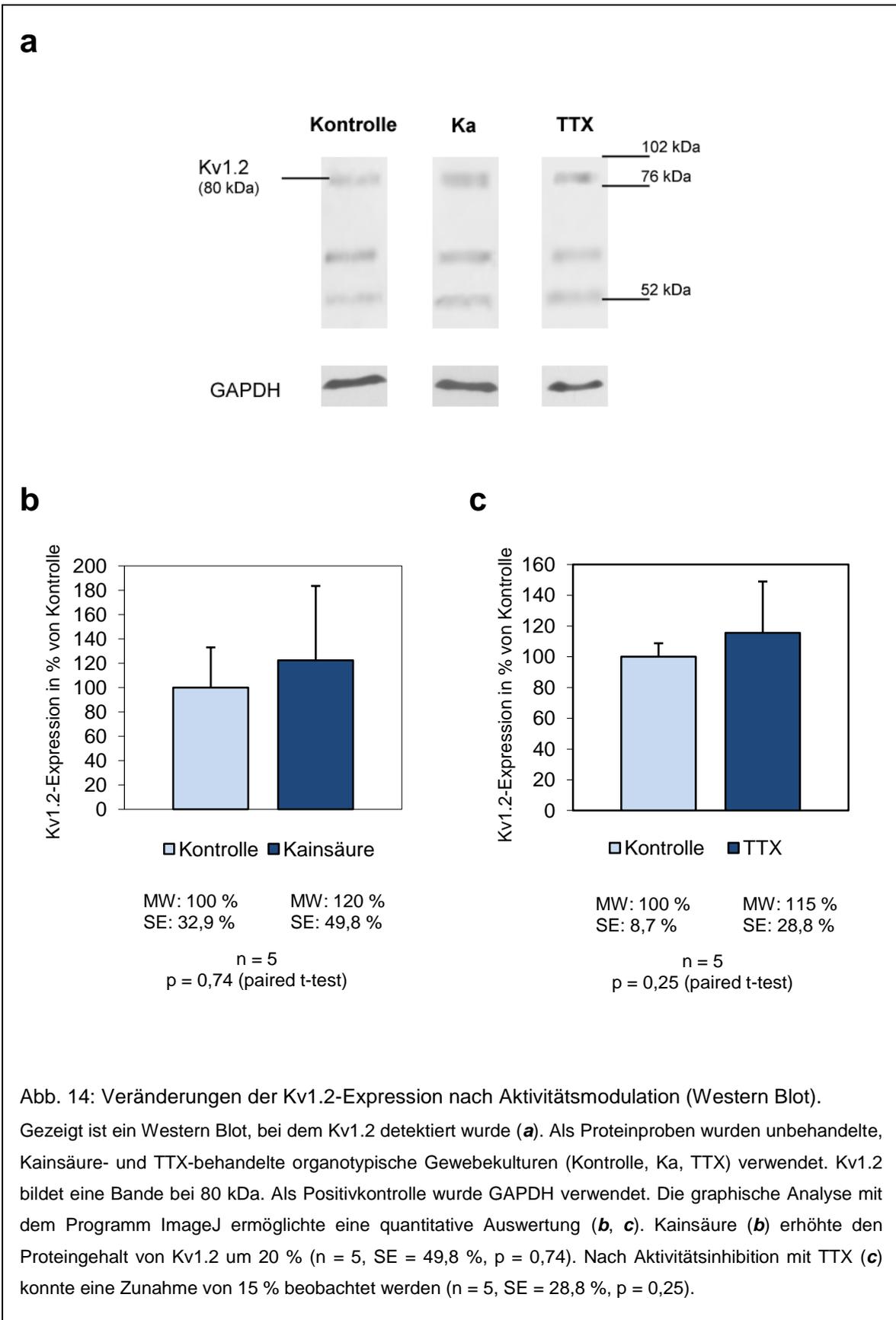
4.5.2 Western Blot: Aktivitätsmodulation mittels Kainsäure/TTX

Als Alternativmethode für einen quantitativen Nachweis wurden Western Blots angefertigt um die Beobachtungen der immunhistochemischen Färbungen zu verifizieren (siehe Abb. 14a).

Untersuchungen zur Immunreaktivität nach Behandlung der Gewebekultur mit dem Exzitotoxin Kainsäure bestätigten den gefundenen Trend. Die Auswertung der Proteinbanden zeigte gegenüber der Kontrollkultur (100%) einen mittleren Proteingehalt von 120 % ($n = 5$, $SE = 49,8 \%$, $p = 0,74$; siehe Abb. 14b).

Die angefertigten Western Blots für die mit TTX behandelten Kulturen konnten ebenfalls die Ergebnisse der immunhistochemischen Versuche bestätigen. Bei einem als 100 % gesetzten Proteingehalt der unbehandelten Schwesterkultur wurde nach Inhibition durch TTX ein mittlerer Proteingehalt von 115 % gefunden ($n = 5$, $SE = 28,8 \%$, $p = 0,25$; siehe Abb. 14c).

Die Bestätigung der Ergebnisse aus den immunhistochemischen Färbungen durch die Alternativmethode Western Blot lässt somit die Vermutung zu, dass trotz fehlender Signifikanz sowohl Kainsäure-induzierte Zunahme als auch TTX-inhibierte Abnahme der neuronalen Aktivität positiv mit der Expressionsdichte von Kv1.2 korrelieren.



5 Diskussion

5.1 Entwicklungsabhängige Expression von Ionenkanälen im Tractus perforans der Ratte

In der vorliegenden Arbeit wurde der Entwicklungsverlauf der Expression präsynaptischer Ionenkanäle im Tractus perforans untersucht. Die Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse von Bender et al. (2007), dass die Expression präsynaptisch lokalisierter HCN1-Kanäle im Tractus perforans entwicklungsabhängig abnimmt. Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Expression von Kv1.2 und der Kv β 2-Untereinheit entwicklungsabhängig zunimmt. Man beobachtet hier also einen inversen Zeitverlauf der Expression, die auf eine funktionelle Kopplung beider Kanaltypen hinweisen könnte. In Bezug auf die synaptische Aktivitätsrate könnte man, unter Berücksichtigung der elektrischen Eigenschaften beider Kanäle (HCN1 depolarisiert, Kv1.2 hyperpolarisiert), zu dem Schluss kommen, dass es im Laufe der Entwicklung zu einer Hyperpolarisation der Axonterminalen des Tractus perforans kommt. Eine mögliche Bedeutung der Hyperpolarisation wäre eine erhöhte elektrische Stabilität der Synapsen; d.h. „reife“ Synapsen haben weniger, dafür selektivere Aktionspotenziale. Noch „unreife“ (d.h. neu gebildete) Synapsen hingegen „feuern“ Aktionspotenziale eher leichter und unspezifischer. Ein möglicher Zusammenhang könnte mit der Ausbildung von Synapsen zu neugebildeten Körnerzellen bestehen. Diese werden lebenslang gebildet (Kempermann und Gage 2000, Cameron und McKay 2001). So findet man insbesondere bei jungen Ratten (P3–P10) eine hohe Neubildung von Körnerzellen, die jedoch mit zunehmender Lebensdauer der Ratten abnimmt, niemals jedoch komplett eingestellt wird (Altman und Bayer 1990). Möglicherweise spielen bei der Etablierung von Synapsen an Körnerzellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien HCN1- und Kv1.2-Kanäle eine wichtige Rolle.

Für die Regulation der subzellulären Lokalisation von Kanälen der Kaliumkanal-Superfamilie ist weiterhin die Expression spezifischer β -Untereinheiten von Bedeutung (Trimmer und Rhodes 2004). Für Kv1.2-Kanäle sind zwei solcher β -Untereinheiten bekannt: Kv β 1 und Kv β 2. Während für Kv β 1 vorwiegend eine Regulation der Kanalkinetik gezeigt wurde (Falk et al. 2003), konnte für die Kv β 2-Untereinheit eine Beteiligung am axonalen Transport der Kv1.2-Kanäle

nachgewiesen werden (Campomanes et al. 2002). Die Interaktion zwischen Kv1.2 und Kv β 2 findet dabei bereits im endoplasmatischen Retikulum statt (Shi et al. 1994, Nagaya und Papazian 1997, Campomanes et al. 2002), wo eine Verbindung mit dem Mikrotubulisystem der Zelle festgelegt wird, die den axonalen Transport einleitet (Gu et al. 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit diesen Befunden, da die Expression von Kv β 2 entwicklungsabhängig mit der Expression von Kv1.2 stark korrelierte. Interessanterweise zeigt Kv β 1 eine gegenläufige Expression. Die Expression dieser Untereinheit ist bei Geburt hoch und nimmt dann ab (Downen et al. 1999).

5.2 Entwicklungsabhängige Expression kennzeichnet trisynaptischen Schaltkreis

Der Tractus perforans ist Teil eines trisynaptischen Schaltkreises (Blackstad et al. 1970, Andersen et al. 1971), in dem sensorische Informationen aufbereitet werden. Der Tractus perforans hat als 1. Neuron seinen Ursprung im entorhinalen Kortex und projiziert in der Molekularschicht auf die Körnerzellen. Die Körnerzellen projizieren als 2. Neuron über die Moosfasern auf Pyramidenzellen in der Region CA3. Diese wiederum senden ihre Axone als Schaffer-Kollateralen (3. Neuron) in die CA1-Region und das Subiculum und von dort zurück in den entorhinalen Kortex.

Immunreaktivität von Kv β 2 wurde außerhalb der Molekularschicht auch noch in der KZS und in CA3 gefunden. Somit ergeben sich Hinweise, dass die entwicklungsabhängige Expression des Proteins nicht nur charakteristisch für die Tractus perforans-Körnerzell-Synapse ist, sondern als allgemeine Beobachtung innerhalb des trisynaptischen Schaltkreises bewertet werden kann. Die Kv1.2-Expression war im Gegensatz zur Expression von Kv β 2 allerdings auf die Terminationszone des Tractus perforans im Gyrus dentatus und in CA1 beschränkt, während für Kv β 2 auch eine Expression in den Körnerzellen und in CA3-Pyramidenzellen beobachtet wurde. Dies deutet darauf hin, dass Kv β 2 auch noch mit anderen Kanälen der Kv1-Familie interagiert, die in diesen Neuronen speziell exprimiert werden (z. B. Kv1.4; Cooper et al. 1998).

5.3 Regulation der Kv1.2-Expression durch neuronale Aktivität

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit Regulationsmechanismen der Kv1.2-Expression im Tractus perforans untersucht. Ein naheliegender Mechanismus ist die Regulation durch neuronale Aktivität. So konnten Drakew et al. (1999) in Gewebekulturen zeigen, dass Tractus perforans-Körnerzell-Synapsen nur mangelhaft ausgebildet werden, wenn die neuronale Aktivität durch TTX blockiert wird. Die Ausbildung dieser Synapsen scheint also mit der Regulation der synaptischen Aktivität zu korrelieren. Übereinstimmend mit dieser Hypothese konnten Bender et al. (2007) zeigen, dass TTX die Expression von HCN1 in den Axonterminalen des Tractus perforans beeinflusst. Die Expression dieser Kanäle war nach Aktivitätsblockade erhöht, was auf eine Depolarisierung des Membranpotenzials hindeutet, möglicherweise als Gegenreaktion zur TTX-Wirkung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auch auf eine Regulation der axonalen Kv1.2-Expression durch neuronale Aktivität hin.

Neuronale Aktivität wurde in Untersuchungen dieser Arbeit durch die Applikation von Kainsäure induziert. In Parallelversuchen wurde in der Gewebekultur vorhandene neuronale Aktivität durch TTX gehemmt. Die Applikation von Kainsäure wurde auf die Dauer von 3 h beschränkt, um toxische Effekte zu vermeiden (Liu et al. 2001, Richichi et al. 2008). TTX wurde hingegen für die Dauer von 24 h appliziert, da bei der verwendeten Konzentration keine toxischen Effekte zu befürchten sind (Bender et al. 2007). 24 h nach Applikation von TTX oder Kainsäure wurden die Gewebekulturen hinsichtlich der Kv1.2-Expression untersucht. Durch diesen frühen Zeitpunkt wurde sichergestellt, dass nur Veränderungen des axonalen Transports (also posttranslational) und keine Expressionsänderungen (prätranslational) für eventuelle Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen als Erklärung in Betracht kommen.

Die Ergebnisse der Kainsäure-Analysen zeigten einen nicht-signifikanten Trend zu einer erhöhten Kv1.2-Expression, die im Einklang mit der Hypothese einer Gegenregulation (vermehrte Kv1.2-Expression bewirkt Hyperpolarisation) steht. Verblüffend waren die Ergebnisse nach Aktivitätsblockade durch TTX. Hier war die Zunahme der Expression noch ausgeprägter als nach Kainsäure-Applikation. Dieses Ergebnis erscheint paradox, da man vermuten könnte, dass es

gegenregulatorisch zu einer Anhebung des Ruhemembranpotenzials kommen müsste durch eine verminderte Expression von Kv1.2. Eine Erklärung könnte sein, dass das TTX – obwohl in einer Dosis gegeben, die mehr als 95 % der Aktionspotenziale blockiert (Denac et al. 2000, Bender et al. 2007) – nicht über die vollen 24 h seine Wirkung entfalten konnte und die neuronale Aktivität sich regenerierte. Dadurch könnte es zu einem „Rebound“-Effekt der Aktivität, wie z.B. von Turrigiano (2008) oder Echevoyen et al. (2007) beschrieben, gekommen sein. Dieser zog eine erhöhte Kv-Expression in den Axonterminalen nach sich mit der Folge einer elektrischen Stabilisierung im Sinne einer reifen Synapse (siehe oben). Ein detaillierteres Verständnis dieses „paradoxen“ Effekts erfordert jedoch weitere Untersuchungen. Diese könnten analoge Versuche mit einem anderen inhibierenden Toxin sein oder TTX in höherer Konzentration. So wurde in Studien von Grosse et al. (2000) eine Abnahme der Kv1.2-Expression in Neuronen des Hippokampus beobachtet. Durchgeführt wurden diese Versuche allerdings nicht wie hier mit 0,5 μM TTX sondern mit 1 μM TTX.

Auffallend war die Diskrepanz der Ergebnisse von Entwicklungsreihe und Aktivitätsmodulation. Während man qualitativ eine sehr deutliche altersabhängige Veränderung von Immunreaktivität beobachten konnte, waren die quantitativen Resultate nach Aktivitätsmodulation weniger eindeutig, d.h. statistisch nicht signifikant. Eine mögliche Erklärung wäre, dass neuronale Aktivität nicht der einzige Entwicklungsfaktor ist. Vielmehr könnte es sich um die Kombination aus neuronaler Aktivität und beispielsweise Genetik handeln.

5.4 Mögliche synaptische Interaktionspartner von Kv1.2

Bei der Manipulation der neuronalen Aktivität in beide Richtungen konnte eine Tendenz beobachtet werden, dass der Kanal Kv1.2 verstärkt exprimiert wurde. Dieses ließe also die Überlegung zu, dass neuronale Aktivität grundsätzlich das Expressionsmuster von Kv1.2 modulieren kann bzw. auf das Expressionsverhalten Einfluss nehmen kann. Aussagen über eine direkte und unmittelbare Abhängigkeit können aufgrund der Ergebnisse nicht sicher gemacht werden. Zu bedenken ist weiterhin, dass andere bisher unbekannte Faktoren von Bedeutung sein könnten. Denkbar wären neben elektrischer Aktivität das

Vorhandensein anderer völlig unbekannter Stimuli wie Milieuänderungen oder auch Interaktionen mit anderen Proteinen, deren Expression sich durch elektrische Aktivität ändert. Aufgrund der Komplexität molekularer Mechanismen im Bereich der Tractus perforans-Körnerzell-Synapse kommen mehrere Interaktionen in Frage. Interaktionspartner können prä-, post- oder transsynaptisch lokalisiert sein.

Neue Befunde legen ganz neue Regulationsmechanismen der präsynaptischen Expression von Kv1.2 über Interaktion mit postsynaptischen Partnern nahe. So beschreiben Untersuchungen von Fukata et al. (2010) einen transsynaptischen Proteinkomplex bestehend aus einem präsynaptischen Kaliumkanal und einem postsynaptischen AMPA-Kanal. Dieser Komplex wird organisiert durch das extrazelluläre antiepileptogene Protein LGI1 (leucine-rich glioma inactivated 1, Fukata et al. 2010). LGI1 stabilisiert den Kaliumkanal durch eine Interaktion mit Kv β 1 (Schulte et al. 2006).

Beteiligt an dieser Interaktion ist möglicherweise auch das postsynaptisch lokalisierte Protein ADAM22 (A-Disintegrin- und Metalloproteinase). LGI1 konnte als extrazellulärer Ligand von ADAM22 identifiziert werden (Fukata et al. 2006). Für ADAM22 und Kv1.2 wurde bereits eine Koexpression gefunden ohne die Kanaleigenschaften des Kaliumkanals zu verändern (Ogawa et al. 2010). Zu dieser Arbeit vergleichende Untersuchungen zur entwicklungsabhängigen Expression von ADAM22 ergaben, dass die Immunreaktivität wie auch bei Kv1.2 und Kv β 2 entwicklungsabhängig zunimmt (Kohrs 2013).

Somit ergeben sich weitere Hinweise darauf, dass Kv1.2, Kv β 2, ADAM22 und LGI1 einen transsynaptischen Proteinkomplex bilden und einer gemeinsamen entwicklungsabhängigen Regulation unterliegen, wobei LGI1 die Signalübertragung im synaptischen Spalt gewährleistet.

Ein weiterer möglicher präsynaptischer Interaktionspartner könnte der Dopaminrezeptor D2 sein. Kürzlich wurde herausgefunden, dass die Dopamin-Freisetzung insbesondere von Kv1.2 beeinflusst wird. So konnte für das Striatum gezeigt werden, dass Kv1.2 mit dem präsynaptischen D2-Rezeptor interagiert (Martel et al. 2011). Analog zu den hier gemachten Beobachtungen zur Aktivitätsinduktion von Kv1.2 konnte in einer Arbeit von Tripathi et al. (2010)

gezeigt werden, dass auch D2 nach Aktivitätsinduktion durch Kainsäure in hippocampalen Neuronen verstärkt exprimiert wurde.

Auch bei der Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) scheint D2 eine bedeutende Rolle zu spielen. In einer Arbeit von Manahan-Vaughan und Kulla (2003) konnte die LTP und LTD an der Tractus perforans-Körnerzell-Synapse dosisabhängig von D2-Rezeptor-Agonisten moduliert werden.

5.5 Deafferenzierung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Afferenzen der Tractus perforans-Körnerzell-Synapse entfernt um Hinweise für die genaue Lokalisation von Kv1.2 (prä- oder postsynaptisch) zu finden. Setzt man eine Läsion im entorhinalen Kortex und provoziert eine Deafferenzierung, simuliert man aber auch einen Pathomechanismus von Morbus Alzheimer (Geddes et al. 1985, Kahle et al. 1993, Aubert et al. 1994, Peterson et al. 1994) und Temporallappenepilepsie (Schousboe et al. 1993, Sloviter 1994). Nach Deafferenzierung konnte eine verminderte Expression von Kv1.2 in der Molekularschicht beobachtet werden, was als Hinweis für die präsynaptische Lokalisierung gewertet werden konnte. Wird dieser Versuch aber als Folge eines pathologischen Prozesses verstanden, so könnte man annehmen, dass eine verminderte Expression Folge dieser Erkrankungen ist. Mögliche Symptome wie Senkung der Reizschwelle (Anhebung des Ruhemembranpotenzials) bei einem Krampfanfall könnten so erklärt werden. Um diese Beobachtung zu verifizieren, müssten weitere Untersuchungen folgen. So könnte man über eine Immunfluoreszenzfärbung die Immunreaktivität von Kv1.2 nach Deafferenzierung quantitativ auswerten.

6 Zusammenfassung

In der mittleren Molekularschicht des Gyrus dentatus terminieren die Axone des Tractus perforans, welche im medialen entorhinalen Kortex ihren Ursprung haben. Hier findet man Kv1-Kanäle, die einer komplexen Regulation unterworfen sind.

Die vorliegende Arbeit untersucht in einer Entwicklungsreihe den zeitlichen Verlauf der Expression von Kv1.2 und seiner für den axonalen Transport essentiellen β -Untereinheit Kv β 2 und vergleicht die Ergebnisse mit der entwicklungsabhängigen Expression von HCN1.

Weiterhin wurde ein *in vitro*-System zur Untersuchung präsynaptischer Kv1.2-Expression etabliert: Es wurde überprüft, ob neuronale Aktivität in einer organotypischen Gewebekultur durch Kainsäure und TTX moduliert werden kann. Kainsäure induziert und TTX inhibiert neuronale Aktivität.

Durch Deafferenzierung der Tractus perforans-Körnerzell-Synapse wurde untersucht, ob Kv1.2 prä- oder postsynaptisch lokalisiert ist.

Schließlich wurde mit immunhistochemischen Methoden untersucht, inwieweit Kainsäure und TTX die Expression von Kv1.2 beeinflussen. Die Ergebnisse wurden durch Western Blots überprüft.

Die Untersuchungen ergaben, dass die Expression von Kv1.2 und Kv β 2 mit zunehmendem Alter ansteigt. Die Expression von HCN1 hingegen nahm entwicklungsabhängig ab, wie es bereits durch Arbeiten von Bender et al. (2007) gezeigt wurde. Es konnte somit ein inverses Expressionsverhalten zwischen beiden Kanälen beobachtet werden. Diese Ergebnisse könnten von Bedeutung für eine sich entwickelnde synaptische Stabilität im Hippokampus sein. Es konnte weiterhin ein geeignetes *in vitro*-System etabliert werden, in dem neuronale Aktivität moduliert werden kann. Es gibt starke Hinweise darauf, dass Kv1.2 präsynaptisch lokalisiert ist. Die Immunreaktivität von Kv1.2 nahm nach Kainsäuregabe zu. Überraschender Weise hat sich die Immunreaktivität nach TTX-Gabe ebenfalls erhöht. Western Blots bestätigten diese (nicht signifikanten) Beobachtungen. Neuronale Aktivität scheint demnach die Expression von Kv1.2 zu beeinflussen und kann als einer von möglichen Entwicklungsfaktoren angenommen werden.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lage des Hippokampus und des Fornix in den Hemisphären.	3
Abb. 2: Frontalschnitt durch den Hippokampus.	3
Abb. 3: Untergliederung der Area entorhinalis und Terminationszonen des Tractus perforans.	5
Abb. 4: Präsynaptische Ionenkanäle im Tractus perforans.	5
Abb. 5: Deafferenzierung durch Entfernung des entorhinalen Kortex.	28
Abb. 6: Methodische Anordnung der Bildanalyse.	36
Abb. 7: Auswertungsbereiche für die Bearbeitung mit dem Programm Openlab.	37
Abb. 8: Entwicklungs- und lokalisationsabhängige Expression von Kv1.2-Kanälen im hippocampalen Gyrus dentatus (GD).	40
Abb. 9: Entwicklungs- und lokalisationsabhängige Expression der Kv β 2-Untereinheit im hippocampalen Gyrus dentatus (GD).	42
Abb. 10: Entwicklungs- und lokalisationsabhängige Expression von HCN1 im hippocampalen Gyrus dentatus (GD).	44
Abb. 11: Immunhistochemischer Nachweis der präsynaptischen Lokalisation von Kv1.2.	46
Abb. 12: Induktion/Inhibition von neuronaler Aktivität <i>in vitro</i> mit Kainsäure/TTX.	47
Abb. 13: Veränderungen der Kv1.2-Expression nach Aktivitätsmodulation (Immunhistochemie).	49
Abb. 14: Veränderungen der Kv1.2-Expression nach Aktivitätsmodulation (Western Blot).	51

8 Literaturverzeichnis

- Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* 11:36-42.
- Altman J, Bayer SA (1990) Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol.* 301(3):365-81.
- Andersen P, Bliss TV, Lomo T, Olsen LI, Skrede KK (1971) Lamellar organization of excitatory hippocampal pathways. *Exp Brain Res.* 13:222-38.
- Aubert I, Poirier J, Gauthier S, Quirion R (1994) Multiple cholinergic markers are unexpectedly not altered in the rat dentate gyrus following entorhinal cortex lesions. *J Neurosci.* 14(5 Pt 1):2476-84.
- Bender RA, Kirschstein T, Kretz O, Brewster AL, Richichi C, Rüschemschmidt C, Shigemoto R, Beck H, Frotscher M, Baram TZ (2007) Localization of HCN1 channels to presynaptic compartments: novel plasticity that may contribute to hippocampal maturation. *J Neurosci.* 27(17):4697-706.
- Bekkers JM, Delaney AJ (2001) Modulation of excitability by α -dendrotoxin-sensitive potassium channels in neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci.* 21:6553-60.
- Blackstad TW, Brink K, Hem J, Jeune B (1970) Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J Comp Neurol.* 138(4):433-49.
- Bramham CR (2007) Control of synaptic consolidation in the dentate gyrus: mechanisms, functions, and therapeutic implications. *Prog Brain Res.* 163:453-71.
- Bullitt E (1990) Expression of c-Fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol.* 296(4):517-30.
- Cameron HA, McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 435(4):406-17.
- Campomanes CR, Carroll KI, Manganas LN, Hershberger ME, Gong B, Antonucci DE, Rhodes KJ, Trimmer JS (2002) Kv beta subunit oxidoreductase activity and Kv1 potassium channel trafficking. *J Biol Chem.* 277(10):8298-305.
- Chiu SY, Ritchie JM (1980) Potassium channels in nodal and internodal axonal membrane of mammalian myelinated fibres. *Nature.* 284(5752):170-1.
- Chung SH, Andersen OS, Krishnamurthy V (2010) *Biological Membrane Ion Channels – Dynamics, Structure, and Application*, Springer Science + Business Media, New York, USA.

- Cooper EC, Milroy A, Jan YN, Jan LY, Lowenstein DH (1998) Presynaptic localization of Kv1.4-containing A-type potassium channels near excitatory synapses in the hippocampus. *J Neurosci.* 18:965-74.
- Denac H, Mevissen M, Scholtysik G (2000) Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362(6):453-79.
- Dodson PD, Billups B, Rusznák Z, Szűcs G, Barker MC, Forsythe ID (2003) Presynaptic rat Kv1.2 channels suppress synaptic terminal hyperexcitability following action potential invasion. *J Physiol.* 550(Pt 1):27-33.
- Downen M, Belkowski S, Knowles H, Cardillo M, Prystowsky MB (1999) Developmental expression of voltage-gated potassium channel β subunits. *Brain Res Dev Brain res.* 117:71-80.
- Drakew A, Frotscher M, Heimrich B (1999) Blockade of neuronal activity alters spine maturation of dentate granule cells but not their dendritic arborization. *Neuroscience.* 94(3):767-74.
- Echegoyen J, Neu A, Graber KD, Soltesz I (2007) Homeostatic plasticity studied using in vivo hippocampal activity-blockade: synaptic scaling, intrinsic plasticity and age-dependence. *PLoS One.* 2(1):e700.
- England SK, Uebele VN, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM (1995) A novel K^+ channel β -subunit (hKv β 1.3) is produced via alternative mRNA splicing. *J Biol Chem.* 270:28531-4.
- Falk T, Kilani RK, Strazdas LA, Border RS, Steidl JV, Yool AJ, Sherman SJ, Förster E, Zhao S, Frotscher M (2003) Developmental regulation of the A-type potassium-channel current in hippocampal neurons: role of the Kvbeta 1.1 subunit. *Nat Rev Neurosci.* 7(4):259-67.
- Förster E, Zhao S, Frotscher M (2006) Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci.* 7(4):259-67.
- Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Brecht DS, Nicoll RA, Fukata M (2006) Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science.* 313(5794):1792-5.
- Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, Watanabe A, Yokoi N, Tabuchi K, Shigemoto R, Nicoll RA, Fukata M (2010) Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(8):3799-804.
- Geddes JW, Monaghan DT, Cotman CW, Lott IT, Kim RC, Chui HC (1985) Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer's disease. *Science.* 230(4730):1179-81.
- Gamkrelidze G, Giaume C, Peusner KD (1998) The differential expression of lowthreshold sustained potassium current contributes to the distinct firing patterns in embryonic central vestibular neurons. *J Neurosci.* 18:1449-64.

- Grosse G, Draguhn A, Höhne L, Tapp R, Veh RW, Ahnert-Hilger G (2000) Expression of Kv1 Potassium Channels in Mouse Hippocampal Primary Cultures: Development and Activity-Dependent Regulation. *J Neurosci.* 20(5):1869-82.
- Gu C, Zhou W, Puthenveedu MA, Xu M, Jan YN, Jan LY (2006) The microtubule plus-end tracking protein EB1 is required for Kv1 voltage-gated K⁺ channel axonal targeting. *Neuron.* 52(5):803-16.
- Gulbis JM, Zhou M, Mann S, MacKinnon R (2002) Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science.* 289(5476):123-7.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J.* 66(4):1061-7.
- Heimrich B, Frotscher M (1994) Slice cultures as a tool to study neuronal development and the formation of specific connections. *Neuroscience Protocols.* 30:1-9.
- Kahle JS, Cotman CW (1993) Synaptic reorganization in the hippocampus: an electrophysiological analysis. *Ann N Y Acad Sci.* 702:61-74.
- Kelly A, Lynch MA (2000) Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Neuropharmacology.* 39(4):643-51.
- Kempermann G, Gage FH (2000) Neurogenesis in the adult hippocampus. *ovartis Found Symp.* 231:220-35; discussion 235-41, 302-6.
- Kohrs S (2013) Regulation der Expression von ADAM22 in der Molekularschicht des Gyrus dentatus. Medizinische Dissertation, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.
- Kole MH, Letzkus JJ, Stuart GJ (2007) Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron.* 55(4):633-47.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227:680-68.
- Liu W, Liu R, Chun JT, Bi R, Hoe W, Schreiber SS, Baudry M (2001) Kainate excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures: evidence for multiple apoptotic pathways. *Brain Res.* 916:239-48.
- Mai JK, Institut für Anatomie I, Heinrich Heine Universität Düsseldorf [Online im Internet.] URL: http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/MedFak/mai/zns/theorie/HHU/Na_Q/img/Qc14-03b1.jpg [Stand: 12.05.2010, 14:37].
- Maletic-Savatic M, Lenn NJ, Trimmer JS (1995) Differential spatiotemporal expression of K⁺ channel polypeptides in rat hippocampal neurons developing in situ and in vitro. *J Neurosci.* 15(5 Pt 2):3840-51.

- Manahan-Vaughan D, Kulla A (2003) Regulation of depotentiation and long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats by dopamine D2-like receptors. *Cereb Cortex*. 13(2):123-35.
- Manis PB, Marx SO (1991) Outward currents in isolated ventral cochlear nucleus neurons. *J Neurosci*. 11:2865-80.
- Martel P, Leo D, Fulton S, Bérard M, Trudeau LE (2011) Role of Kv1 Potassium Channels in Regulating Dopamine Release and Presynaptic D2 Receptor Function. *PLoS One*. 6(5):e20402.
- Mi H, Deerinck TJ, Ellisman MH, Schwarz TL (1995) Differential distribution of closely related potassium channels in rat Schwann cells. *J Neurosci*. 15(5 Pt 2):3761-74.
- Monaghan MM, Trimmer JS, Rhodes KJ (2001) Experimental localization of Kv1 family voltage-gated K⁺ channel alpha and beta subunits in rat hippocampal formation. *J Neurosci*. 21:5973-83.
- Nagaya N, Papazian DM (1997) Potassium channel alpha and beta subunits assemble in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 272(5):3022-7.
- Ogawa Y, Osés-Prieto J, Kim MY, Horresh I, Peles E, Burlingame AL, Trimmer JS, Meijer D, Rasband MN (2010) ADAM22, a Kv1 channel-interacting protein, recruits membrane-associated guanylate kinases to juxtaparanodes of myelinated axons. *J Neurosci*. 30(3):1038-48.
- Pape HC (1996) Queer current and pacemaker: The hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol*. 58:299-327.
- Peterson DA, Lucidi Phillipi CA, Eagle KL, Gage FH (1994) Perforant path damage results in progressive neuronal death and somal atrophy in layer II of entorhinal cortex and functional impairment with increasing postdamage age. *J Neurosci*. 14(11 Pt 2):6872-85.
- Pongs O, Leicher T, Berger M, Roeper J, Bähring R, Wray D, Giese KP, Silva AJ, Storm JF (1999) Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel beta subunits. *Ann N Y Acad Sci*. 30(868):344-55.
- Popratiloff A, Giaume C, Peusner KD (2003) Developmental change in expression and subcellular localization of two Shaker-related potassium channel proteins (Kv1.1 and Kv1.2) in the chick tangential vestibular nucleus. *J Comp Neurol*. 461:466-82.
- Rettig J, Wunder F, Stocker M, Lichtinghageb R, Mastinaux F, Beckh S, Kues W, Pedarzani P, Schröter KH, Ruppertsberg JP, Veh R, Pongs O (1992) Characterization of a Shaw-related potassium channel family in rat brain. *Embryol J*. 11:2473-86.
- Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcey DN, Dolly JO, Pongs O (1994) Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature*. 369(6478):289-94.

- Rhodes KJ, Keilbaugh SA, Barrezueta NX, Lopez KL, Trimmer JS (1995) Association and colocalization of K⁺ channel alpha- and beta-subunit polypeptides in rat brain. *J Neurosci* 15:5360-71.
- Rhodes KJ, Stassle BW, Monaghan MM, Bekele-Areuri Z, Matos MF, Nakahira K, Schechter LE, Trimmer JS (1997) Association colocalization of the Kvbeta1 and Kvbeta2 beta-subunits with Kv1 alpha-subunits in mammalian brain K⁺ channel complexes. *J Neurosci.* 17:8246-58.
- Richichi C, Brewster AL, Bender RA, Simeone TA, Zha Q, Yin HZ, Weiss JH, Baram TZ (2008) Mechanisms of seizure-induced 'transcriptional channelopathy' of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated (HCN) channels. *Neurobiol Dis.* 29(2):297-305.
- Robinson RB, Siegelbaum SA (2003) Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol.* 65:453-80.
- Ruppersberg JP, Schroter KH, Salmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O (1990) Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium channel proteins. *Nature.* 345(6275):535-7.
- Schousboe A, Bachevalier J, Braak H, Heinemann U, Nitsch R, Schroder H, Wetmore C (1993) Structural correlates and cellular mechanisms in entorhinal-hippocampal dysfunction. *Hippocampus.* 3 Spec No:293-301.
- Schulte U, Thumfart JO, Klöcker N, Sailer CA, Bildl W, Biniossek M, Dehn D, Deller T, Eble S, Abbass K, Wangler T, Knaus HG, Fakler B (2006) The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1. *Neuron.* 49(5):697-706.
- Sewing S, Roeper J, Pongs O (1996) Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits. *Neuron.* 16(2):455-63.
- Sheng M, Tsaur ML, Jan YN, Jan LY (1992) Subcellular segregation of two A-type K⁺ channel proteins in rat central neurons. *Neuron.* 9:271-84.
- Sheng M, Tsaur ML, Jan YN, Jan LY (1994) Contrasting subcellular localization of the Kv1.2 K⁺ channel subunit in different neurons of rat brain. *J Neurosci.* 14:2408-17.
- Shi G, Kleinklaus AK, Marrion NV, Trimmer JS (1994) Properties of Kv2.1 K⁺ channels expressed in transfected mammalian cells. *J Biol Chem.* 16;269(37):23204-11.
- Sloviter RS (1994) The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.* 35(6):640-54.
- Squire LR (2004) Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem.* 82(3):171-7.

- Trepel M (2008) Neuroanatomie, Struktur und Funktion, 4. Aufl., Urban & Fischer, München, S. 234.
- Trimmer JS, Rhodes KJ (2004) Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol.* 66:477-519.
- Tripathi PP, Santorufo G, Brillì E, Borelli E, Bozzi Y (2010) Kainic acid-induced seizures activate GSK-3 β in the hippocampus of D2R-/-mice. *Neuroreport.* 21(12):846-50.
- Torrealba F, Valdés JL (2008) The parietal association cortex of the rat. *Biol Res.* 41(4):369-77.
- Turrigiano GG (2008) The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell.* 135(3):422-35.
- Veh RW, Lichtinghagen R, Sewing S, Wunder F, Grumbach IM, Pongs O (1995) Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain. *Eur J Neurosci.* 7(11):2189-205.
- Vemana S, Pandey S, Larsson HP (2004) S4 movement in a mammalian HCN channel. *J Gen Physiol.* 123(1):21-32.
- Veterinärmedizinisches Institut der Universität Leipzig [Online im Internet.] URL: http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/graphic_hippo_alveus.html [Stand: 23.10.2011, 10:23].).
- Wang H, Kunkel DD, Schwartzkroin PA, Tempel BL (1994) Localization of Kv1.1 and Kv1.2, K⁺ channel proteins, to synaptic terminals, somata and dendrites in the mouse brain. *J Neurosci.* 20:114-122.
- Wu RL, Barish ME (1992) Two pharmacologically and kinetically distinct transient potassium currents in cultured embryonic mouse hippocampal neurons. *J Neurosci.* 12:2235-46.
- Yellen G (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature.* 419(6902):35-42.

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilung der Kaliumkanäle	7
--	---

10 Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Roland Bender, der mir freundlicherweise ein äußerst interessantes und anspruchsvolles Thema angeboten hat. Im Laufe der Betreuung durch ihn stand er mir stets mit viel Engagement, Sachverstand und Hilfestellung zur Seite.

Mein zweiter Dank gilt Frau Prof. Dr. Gabriele M. Rune, die mir als Leiterin des Instituts für Neuroanatomie den Zugang für alle notwendigen Materialien und Gerätschaften ermöglichte.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Lars Fester, der mir insbesondere bei technischen Problemen und durch sein Vermögen für gute wissenschaftliche Praxis eine große Hilfe war.

Mein Dank gilt auch der Diplom Pharmazeutin Frau Wiebke Wilkars, die mir durch viel investierte Zeit bei meinen Experimenten geholfen hat und mir stets verständlich komplizierte Sachverhalte erklären konnte.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Bettina Kruck, die mir viele praktische Tipps für meine experimentellen Arbeiten gab.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, meiner Mutter Frau Karin Klapetke und meinem Vater Herrn Hans-Jochen Klapetke, die mir erst durch ihre großzügige finanzielle Unterstützung meine zeitaufwändigen Studien ermöglichten.

Mein abschließender und besonders herzlicher Dank gilt meiner Lebensgefährtin Frau Christiane Candler für ihre wundervolle Art und Unterstützung.

11 Lebenslauf

Lebenslauf entfällt aus Datenschutzgründen.

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: