

Aus der  
Klinik für Neurologie, Direktor: Prof. Dr. W. H. Oertel  
Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

DIE AKTIVIERUNG VON SK-KANÄLEN IN EINEM PARKINSON-  
ZELLMODELL



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften, dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität  
Marburg

vorgelegt von

**Anderson Cleyton Ferreira de Andrade**

**aus Abaetetuba**

Marburg/Lahn 2014

Aus der  
Klinik für Neurologie, Direktor: Prof. Dr. W. H. Oertel  
Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

DIE AKTIVIERUNG VON SK-KANÄLEN IN EINEM PARKINSON-  
ZELLMODELL



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften, dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität  
Marburg

vorgelegt von

**Anderson Cleyton Ferreira de Andrade**  
**aus Abaetetuba**

Marburg/Lahn 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Günter Höglinger/ Prof. Dr. Carsten Culmsee

1. Korreferent: Prof. Dr. Niels Decher

Meinen Eltern

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „DIE AKTIVIERUNG VON SK-KANÄLEN IN EINEM PARKINSON-ZELLMODELL“ in der Klinik für Neurologie unter Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang H. Oertel mit Unterstützung durch Prof. Dr. Günter Höglinger ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde (oder wird) in folgenden Publikationsorganen Höllerhage u.a., 2014 und Dolga u. a., 2014 veröffentlicht.

Marburg, 21. 03.14

Anderson De Andrade

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Parkinson-Krankheit.....	1
1.2 Experimentelle Modellen der Parkinson-Erkrankung .....	4
1.3 Rotenon.....	6
1.4 Kalziumaktivierte Kaliumkanäle.....	8
1.4.1 SK-Kanäle .....	8
1.4.2 Pharmakologie der SK-Kanäle .....	11
<b>2 FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>14</b>
<b>3 MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
3.1 Allgemeine Chemikalien, Reagenzien und Materialien .....	15
3.1.1 Antikörper .....	16
3.1.2 Primer für die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) .....	19
3.1.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen .....	21
3.1.4 Kits und Standards .....	21
3.1.5 Geräte.....	22
3.2 Zellbiologische Methoden.....	22
3.2.1 Zelllinie .....	22
3.2.2 Auftauen der Zellen .....	23
3.2.3 Kultivierung der LUHMES-Zelllinie .....	23
3.2.4 Differenzierung der LUHMES-Zelllinie.....	23
3.2.5 Zellzahlbestimmung.....	24
3.2.6 Kryokonservierung der Zellline .....	25
3.2.7 BrdU-Inkorporations-Assay .....	25
3.3 Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität.....	27
3.3.1 MTT-Test.....	27
3.3.2 ATP-Messung.....	28
3.3.3 DAPI-Kernfärbung .....	28

3.4	Molekularbiologische Methoden.....	29
3.4.1	Isolierung und Reinigung von Gesamt-RNA.....	29
3.4.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	30
3.4.3	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	30
3.4.4	Agarosegelelektrophorese.....	31
3.4.5	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).....	32
3.4.6	Genexpressionsanalyse .....	34
3.5	Detektion und Identifizierung von Proteinen.....	34
3.5.1	Protein-Extraktion und Probenvorbereitung .....	34
3.5.2	Proteinbestimmung.....	35
3.5.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
3.5.4	Lösungen und Puffer für Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot.....	37
3.5.5	Stripping der PVDF Membranen .....	38
3.5.6	Färbung von Acrylamidgelen.....	39
3.5.7	Auswertung.....	40
3.6	Zellfärbungen .....	40
3.6.1	Immunzytochemie .....	40
3.6.2	MitoTracker-Färbung .....	41
3.6.3	Kolokalisierung .....	41
3.6.4	Neuronales Netzwerk .....	42
3.7	Analyse von mitochondrialen Proteinen .....	42
3.7.1	Isolierung der mitochondrialen Fraktion von Neuronen.....	42
3.7.2	Mitochondrienisolation aus Mausgehirn .....	43
3.7.3	Messung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ).....	44
3.8	Statistische Methoden .....	45
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>46</b>
4.1	Charakterisierung des Zellmodells .....	46
4.2	Wachstumsverhalten.....	46
4.2.1	Veränderung der Zellmorphologie nach Tetracyclin-kontrollierter Differenzierung .....	48
4.2.2	Nach der Differenzierung werden LUHMES-Zellen postmitotisch.....	50
4.2.3	Analyse der Expression spezifischer neuronaler und nicht-neuronaler Marker in differenzierten LUHMES-Zellen .....	52
4.3	Expression der SK-Kanäle in LUHMES-Zellen .....	56
4.3.1	Rotenon-Sensitivität in differenzierten humanen dopaminergen Neuronen.....	58
4.3.2	Toxizität des NS309 Kanal-Aktivators in differenzierten humanen Zellen.....	58
4.3.3	Aktivierung der SK-Kanäle verhindert Rotenon-induzierten Zelltod und Auflösung des neuronalen Netzwerks.....	61
4.3.4	Die Blockade von SK-Kanälen antagonisiert die Neuroprotektion gegenüber der Rotenon-Toxizität in menschlichen dopaminergen Zellen.....	62
4.3.5	Rotenon-Neurotoxizität ist für die Reduktion des Proteinspiegels des SK2-Kanals verantwortlich.....	67

4.3.6	Intrazelluläre Lokalisation von SK-Kanal-Untereinheiten in LUHMES-Zellen.....	69
4.3.7	Der SK-Kanal-Aktivator NS309 schwächt den Rotenon-induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ . 72	
4.3.8	Die SK-Kanal-Aktivierung reduziert das mitochondriale Membranpotenzial leicht. ....	72
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
5.1	Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse .....	77
5.2	Das Zellmodell.....	77
5.3	Das Rotenon-Parkinson-Modell .....	79
5.4	SK-Kanäle .....	80
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>86</b>
<b>10</b>	<b>VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER .....</b>	<b>87</b>
<b>11</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>88</b>
<b>12</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>89</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pharmakologie von SK-Kanälen (Pedarzani & Stocker, 2008).....	13
Tabelle 2: Laborchemikalien, Standards und Verbrauchsmaterialien.....	15
Tabelle 3: Primäre Antikörper für Westernblot (WB) und Immunfluoreszenz (IF) .....	16
Tabelle 4: Sekundäre Antikörper .....	18
Tabelle 5: Primer für den Nachweis der mRNA-Expression mittels RT-PCR ...	19
Tabelle 6: 1 X PBS, pH 7.4 .....	21
Tabelle 7: Kits und Standards .....	21
Tabelle 8: Geräte .....	22
Tabelle 9: Wachstumsmedium (WM).....	23
Tabelle 10: Differenzierungsmedium (DM) .....	24
Tabelle 11: Zelldichte.....	24
Tabelle 12: Einfriermedium .....	25
Tabelle 13: BrdU Lösung .....	26
Tabelle 14: 0,1 M Boratpuffer .....	26
Tabelle 15: MTT 2,5 mg/ml Arbeitslösung .....	28
Tabelle 16: Zusammensetzung der RT-PCR Arbeitslösung .....	31
Tabelle 17: 100 pb Leiter Verdünnung.....	31
Tabelle 18: Zusammensetzung des Reaktionsansatz .....	32
Tabelle 19: Zusammensetzung des Reaktionsansatz .....	33
Tabelle 20: Bedingungen für die qPCR .....	33
Tabelle 21: Verwendete Primer-Sonden Mischungen .....	33
Tabelle 22: Zusammensetzung des Lysepuffer Grundmix .....	35
Tabelle 23: Zusammensetzung der Lysepuffer-Arbeitslösung.....	35
Tabelle 24: Zusammensetzung der DTT-Stammlösung 100 mM .....	35
Tabelle 25: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele .....	37
Tabelle 26: 0,5 M Tris pH 6,8.....	37
Tabelle 27: 1,5 M Tris pH 8,8.....	37
Tabelle 28: 10 % Ammoniumpersulfat (APS) .....	37
Tabelle 29: 1x Elektrophorese Puffer.....	37
Tabelle 30: 5 x SDS-Lade Puffer .....	38
Tabelle 31: 1 x Transfer Puffer .....	38
Tabelle 32: 1 x TBS/Tween 20.....	38
Tabelle 33: 5 % Block-Puffer .....	38

Tabelle 34: Antikörper-Verdünnungspuffer .....	38
Tabelle 35: Zusammensetzung des Stripping-Puffers .....	39
Tabelle 36: Coomassie-Färbelösung .....	39
Tabelle 37: Coomassie-Entfärbelösung .....	39
Tabelle 38: MitoTracker® DeepRed 50 µM Stammlösung .....	41
Tabelle 39: Mitochondrienisolationsspuffer I (MI-Puffer I) .....	43
Tabelle 40: Mitochondrienisolationsspuffer II (MI-Puffer II) .....	43
Tabelle 41: Mitochondrienisolationsspuffer .....	44
Tabelle 42: FFE-Puffer .....	44

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Beschleunigungshypothese.....	3
Abbildung 2: Rotenon Strukturformel.....	6
Abbildung 3: Darstellung des chemo-mechanischen „Gating“-Modells von SK-Kanälen.....	9
Abbildung 4: Phylogenetischer Stammbaum und Nomenklatur der kalziumaktivierten Kaliumkanäle.....	10
Abbildung 5: Reduktion von MTT zu Formazan.....	27
Abbildung 6: Wachstumsverhaltender LUHMES-Zellen. ....	47
Abbildung 7: LUHMES-Zellen lassen sich zu Neuronen differenzieren.....	47
Abbildung 8: Lokalisation von $\alpha$ -Synuklein und Synaptophysin in ausdifferenzierten LUHMES Zellen. ....	49
Abbildung 9: Die Differenzierung der LUHMES-Zellen in menschliche post-mitotische dopaminerge Neuronen.....	51
Abbildung 10: Differenzierte LUHMES-Zellen exprimieren spezifische neuronale dopaminerge Marker.....	53
Abbildung 11: LUHMES-Zellen exprimieren für dopaminerge Neuronen spezifische Markergene.....	54
Abbildung 12: Differenzierte LUHMES-Zellen zeigen neuronal-dopaminergen Charakter. ....	55
Abbildung 13: LUHMES-Zellen exprimieren $Ca^{2+}$ -abhängige Kaliumkanäle (SK-Kanäle). ....	
Abbildung 14: Rotenon induziert zeit- und dosisabhängigen Zelltod in LUHMES-Zellen.....	
Abbildung 15: Konzentrations-Toxizitäts-Verhältnis in LUHMES-Zellen nach Inkubation mit Kanal-Modulator NS309. ....	61
Abbildung 16: Aktivierung der SK-Kanäle verhindert Zelltod und neuronalen Netzerfall.....	63
Abbildung 17: Zytoprotektive Wirkung von NS309 nach einer 48 h Behandlung mit Rotenon. ....	64
Abbildung 18: NS309 verhindert den Zerfall des neuritischen Netzwerks in Rotenon-behandelten dopaminergen Zellen. ....	65
Abbildung 19: Rotenon-induzierte Neurotoxizität lässt sich durch Ko-Inkubation mit einem SK-Kanal-Aktivator blockieren. ....	66
Abbildung 20: Rotenon beeinflusst die Expression von SK-Kanälen.....	68
Abbildung 21: Expression von SK-Isoformen in Mitochondrien und Zytoplasma. ....	70
Abbildung 22: Subzelluläre Lage von SK-Isoformen im dopaminergen Zellmodell. ....	71
Abbildung 23: Aktivierung von SK-Kanälen verhindert Kalzium-Dysregulation.....	74

Abbildung 24: Veränderung im mitochondrialen Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) durch Aktivierung von SK-Kanälen in LUHMES-Zellen. ....	75
Abbildung 25: Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) durch Aktivierung von SK-Kanälen. ....	76

# Abkürzungsverzeichnis

*Kursiv = lateinisch-/ englische Bezeichnung*

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
% (w/v)	Gewichtsprozent (Gewicht pro Volumen)
1-EBIO	1-Ethyl-2-benzimidazolone
AHP	Nachhyperpolarisation <i>(afterhyperpolarization)</i>
AMR	<i>ATP Monitoring Reagent</i>
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
BK-Kanäle	<i>Big conductance K<sup>+</sup> Kanäle</i>
BrdU	5-Bromo-2-Desoxyuridin
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre Kalziumkonzentration
CaM	Calmolulin
CaMBD	Calmodulin-Bindedomäne
cDNA	Komplementäre DNS <i>(complementary DNA)</i>
CyPPA	N-Cyclohexyl-N-[2-(3,5-dimethyl-pyr-azol-1-yl)-6-methyl-4-pyrimidinamine
DA	Dopamin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAT	Dopamintransporter
DDC	DOPA-Decarboxylase
ddH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes Wasser <i>(Double-distilled water)</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DM	Differenzierungsmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure <i>(deoxyribonucleic acid)</i>
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EU	Europäische Union
GABA	γ-Aminobuttersäure <i>(gamma-aminobutyric acid)</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIRK2	<i>G-protein-regulated inward-rectifier potassium channel 2</i>
HCl	Hydrogenchlorid
HRP	Meerrettichperoxidase <i>(Horseradish peroxidase)</i>
IF	Immunfluoreszenz

IK-Kanäle	<i>Intermediate conductance K<sup>+</sup> Kanäle</i>
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
MNDA	<i>Myeloid cell nuclear differentiation antigen</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger <i>desoxyribonucleic acid</i> )
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH-Dehydrogenase	Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrat-Dehydrogenase
NRR	<i>Nucleotide Releasing Reagent</i>
NS309	6,7-Dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime
NS8593	<i>(R)-N-(Benzimidazol-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamine</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PLL	Poly-L-Lysin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse transcription PCR</i>
SK-Kanäle	<i>Small conductance K<sup>+</sup> Kanäle</i>
SNpc	<i>Pars compacta</i> der Substantia nigra
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
UCHL1	carboxyterminale Ubiquitin Hydrolase L1
UV	Ultraviolett
VMAT2	Vesikulärer Monoamintransporter 2
WB	Western blot
WM	Wachstumsmedium

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Parkinson-Krankheit

Parkinson Syndrome sind altersbedingte neurodegenerative Erkrankungen. Sie entsteht durch eine Degeneration der dopaminergen Neuronen des nigrostriatalen Systems. In der Altersgruppe der über 50-Jährigen stellen sie die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankungsgruppe mit einer Prävalenz von 1-2% (Shastri, 2001).

Die häufigste Form der Parkinson Syndrome ist das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS), auch Parkinson Krankheit genannt. Außerdem gibt es seltene Formen, die erblich veranlagt sind (familiäres Parkinson-Syndrom). Diese haben genetische Komponenten und werden autosomal-dominant vererbt, was bei etwa 5% der mit IPS diagnostizierten Patienten der Fall ist. Studien haben Mutationen in verschiedenen Genen unterschiedlicher Familien identifiziert. Innerhalb dieser Familien sind Mutationen in den Genen von  $\alpha$ -Synuclein (SNCA), Parkin (PRKN), carboxyterminalem Ubiquitin Hydrolase L1 (UCHL1), PINK1, DJ-1, LRRK2, ATP13A2, VPS35, EIF4G1, FBXO7, PLA2G6 und GBA festgestellt worden, die mit familiären Formen des IPS assoziiert sind (Funke u. a., 2013; Houlden & Singleton, 2012; Lohmann & Brockmann, 2013; Puschmann, 2013; Shastri, 2001).

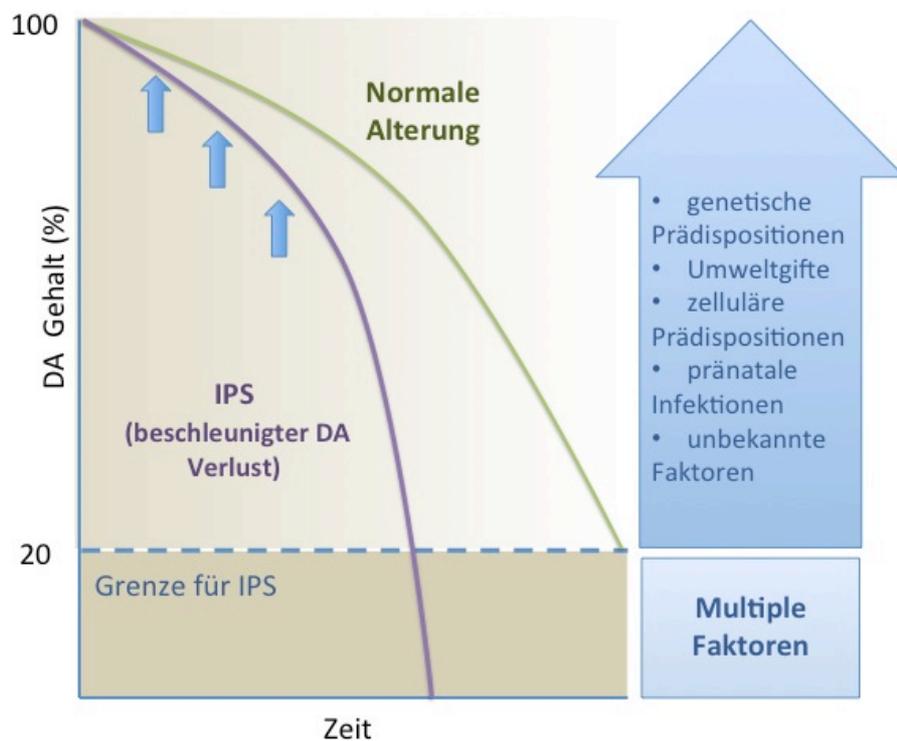
Als klinische Symptome des IPS zeigen sich Ruhetremor, posturale Instabilität, Rigor und Bradykinesie. Das Absterben der Dopamin-produzierenden Nervenzellen in der Substantia nigra und die Nachweisbarkeit von runden zytoplasmatischen Einschlusskörperchen in den Nervenzellen gelten als pathognomonische Merkmale. Letztere werden Lewy-Körperchen genannt und zeigen sich positiv in der Immunfärbung gegen  $\alpha$ -Synuclein und Ubiquitin (Shimohama u. a., 2003).

Aus dem Verlust von Dopamin-produzierenden Neuronen in der *pars compacta* der Substantia nigra (SNpc) resultiert das Defizit von Dopamin (DA) im Striatum. Dieses verursacht ein Ungleichgewicht in den Basalganglien, das zu den typischen Symptomen des IPS führt (Lotharius u. a., 2002). Darüber hinaus sind weitere neuronale Systeme betroffen, wenn auch weniger stark (Jellinger, 1991) wie z.B. die noradrenergen Neuronen des Locus coeruleus, das

dopaminerge mesokortikal-mesolimbische System sowie das cholinerge System des Nucleus basalis.

Auf Basis einer wachsenden Zahl von Studien über die Entstehung des IPS und vor allem mit der Einführung von verschiedenen experimentellen Modellen wurden mehrere Hypothesen über mögliche Mechanismen der Neurodegeneration und des neuronalen Zelltodes formuliert. Oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion, Exzitotoxizität, reduzierte neurotrophe Faktoren, Entzündungen und Funktionsstörungen des lysosomalen und proteasomalen proteolytischen Systems werden als die wichtigsten Mechanismen beschrieben (Dauer & Przedborski, 2003; Olanow & Tatton, 1999).

Es wird angenommen, dass kein einzelner Faktor alleine für die Neurodegeneration von dopaminergen Neuronen bei IPS verantwortlich ist, sondern eine Kombination aus genetischen und umweltbedingten Faktoren. Organische Lösungsmittel, Herbizide, Kohlenmonoxid, Schwefelkohlenstoff, Pestizide und Schwermetalle, werden in epidemiologischen Studien als Stoffe genannt, die das Risiko für die Entwicklung des IPS erhöhen (Di Monte & Lawler, 2001; Olanow & Tatton, 1999). Die Steigerung der altersabhängigen neuronalen Suzeptibilität bei den dopaminergen Nervenzellen und die daraus resultierenden Abnahmen der Dopamin-Konzentration im Mittelhirn stehen in engem Zusammenhang mit der dopaminergen Nervenzellen-Biologie und der Interaktion zwischen den multiplen Faktoren, die zum IPS führen. Dies ist in der Beschleunigungshypothese zusammengefasst, bei der beim IPS der Verlust von dopaminergen Neuronen gegenüber der normalen Alterung beschleunigt ist. In der folgenden Graphik (Abbildung 1).



**Abb. 1: Die Beschleunigungshypothese (nach Collier u. a., 2011).**

Um das Verständnis der Pathophysiologie neurodegenerativer Krankheiten wie des IPS zu erweitern, ist die Entwicklung von geeigneten experimentellen Modellen Voraussetzung, insbesondere für die Weiterentwicklung neuer pharmakologischer Wirkstoffe und Behandlungsstrategien.

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Modelle entwickelt. Diese Modelle werden in folgende drei Kategorien eingeteilt: Umweltfaktoren, synthetische Neurotoxine und häufige Parkinson-assoziierte Mutationen (Blesa u. a., 2012). Die verschiedenen experimentellen Modelle haben wesentlich zu einem verbesserten Verständnis des IPS beigetragen.

## 1.2 Experimentelle Modellen der Parkinson-Erkrankung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Neurotoxin-basiertes *in vitro*-Modell gewählt, um die Rolle der Kalzium-aktivierten Kaliumkanäle zu untersuchen. *In vitro*-Modelle haben bedeutende Vorteile gegenüber Tiermodellen, um die biochemischen und molekularen Eigenschaften einer Krankheit in einem kontrollierten System zu untersuchen. Die Gesamtdauer der Experimente, die Kosten und die Schwierigkeiten bei der Handhabung und Fortpflanzung der Tiere sind primär wirtschaftliche Faktoren, die gegen Experimente mit Tiermodellen sprechen. Generell werden ethische Bedenken gegenüber Tierversuchen in der Forschung immer deutlicher geäußert. Ein weiterer Punkt, der gegen Tiermodelle spricht, ist die Tatsache, dass die Interpretation der Ergebnisse in Tiermodellen oft komplexer ist als in einfachen Zellkulturmethoden.

Die Planung und Durchführung eines Experimentes mit einem Zellkulturmodell bedarf zum einen einer kürzeren Zeitspanne und weist andererseits eine oft höhere Reproduzierbarkeit auf. Dies ermöglicht die Ausführung einer größeren Zahl von Experimenten unter definierten Bedingungen in einem kürzeren Zeitraum.

Obwohl die Zellkultur viele Vorteile bietet, gibt es verschiedene Einschränkungen, wie das kulturbedingt eingeschränkte Überleben von Neuronen oder die Tatsache, dass die Zellen in den meisten Fällen nicht ihre natürlichen neuronalen Netze ausbilden und so nicht zu vollentwickelten Neuronen ausdifferenzieren. Die Zellkulturen für die Parkinson-Forschung haben den Vorteil, dass sie einen nahezu unbegrenzten Zugang für ein schnelles Screening von Wirkstoffkandidaten ermöglichen (Falkenburger & Schulz, 2006).

Dopaminerge Neurone spielen, wie oben beschrieben, eine zentrale Rolle beim IPS. Für die Grundlagenforschung ist die Suche nach einem Zellmodell, das die Pathophysiologie nachbildet, von großer Bedeutung. In diesem Modell ist wünschenswert, dass die Zellen möglichst viele Eigenschaften dopaminerger Neuronen präsentieren.

Eine große Anzahl an Zelllinien aus Mensch und Tier wurde für Studien des IPS entwickelt. Verbreitet ist die Verwendung der humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y. Diese wurde 1970 als Klon der SK-N-SH Zelllinie entwickelt und

seitdem für verschiedene experimentelle Zwecke verwendet. Die SH-SY5Y können mit diversen Protokollen zu DA-Neuronen differenziert werden. Sie werden jedoch auch im undifferenzierten Zustand für die Parkinson-Forschung verwendet. Verfügbare Daten zeigen, dass differenzierte SH-SY5Y Zellen kein geeignetes Zellmodell für die Untersuchung der Neurotoxizität oder Neuroprotektion in der experimentellen Parkinson-Forschung darstellen. Der Grund dafür ist die Unempfindlichkeit der SH-SY5Y-Zellen gegenüber Neurotoxinen im Vergleich zu primären mesencephalen Neuronen. (Xie u. a., 2010). Neben der SH-SY5Y Zelllinie sind auch verschiedene Mäuse- und Ratten-Zelllinien als Modelle beschrieben, diese haben jedoch, wenn man eine menschliche Krankheit nachbilden und erforschen möchte, wegen möglicher Spezies-abhängiger Unterschiede nur einen limitierten Nutzen. Gleiches gilt für Primärkulturen an Nagetierhirnen.

2002 beschrieben Lotharius und ihr Team ein neues Zellmodell zur Parkinson-Erkrankung (Lotharius u. a., 2002), welches seitdem in anderen Arbeitsgruppen erfolgreich etabliert und für ihre jeweiligen Untersuchungen zum IPS verwendet wurde (Christophersen u. a., 2007; Fontaine u. a., 2008; Paul u. a., 2007).

In dem 2002 von Lotharius et al. beschriebenen neuen Zellmodell zur Parkinson-Erkrankung (Lotharius & Brundin, 2002) wurden Zellen aus menschlichen mesencephalen Vorläuferzellen durch eine stabile Transduktion mit dem Onkogen v-myc abgeleitet, dessen Expression in Anwesenheit von Tetracyclin unterdrückt wird (Lotharius u. a., 2005; , 2002), Seitdem wurde das Modell von einigen anderen Arbeitsgruppen erfolgreich etabliert und für ihre jeweiligen Untersuchungen zum IPS verwendet (Christophersen u. a., 2007; Fontaine u. a., 2008; Paul u. a., 2007).

Ungeachtet des seit langem währenden Gebrauchs dieses Zellmodells wurde eine endgültige und genaue Charakterisierung der Zelllinie noch nicht erreicht.

In unserem Labor haben wir uns zunächst bemüht, frühere Berichte zu bestätigen. So beschrieben frühere Arbeiten, dass LUHMES-Zellen zu menschlichen post-mitotischen Neuronen differenziert werden können. Eine Tetracyclin-kontrollierte Differenzierung der Zelllinie hatte in unserm Labor ebenfalls zu einer Veränderung der morphologischen Eigenschaften der Zellen geführt.

### 1.3 Rotenon

Rotenon ist ein Pyranofurochromon-Derivat (Abbildung 2), der Wirkstoff wird aus dem Extrakt von Pflanzen der folgenden Familien gewonnen: Tephrosia, Mundulea, Millettia und Spatholobus (Teixeira u. a., 1984). Es wird seit vielen Jahrhunderten von der Bevölkerung in Afrika, Asien und Südamerika zur Fischerei und als Insektizid verwendet. In Brasilien zum Beispiel wird von den Bewohnern des Amazonasgebietes die Pflanze Timbós (*Paulina pinnata*) gewonnen. Diese ist reich an Rotenon und wird als gestampftes Substrat für den Fischfang eingesetzt. Ins Wasser geschüttet hat es eine lähmende Wirkung auf Fische. Zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts isolierte Nagai Nagayoshi aus der Tubawurzel die Substanz, die seitdem als Rotenon bezeichnet wurde (Fang & Casida, 1997).

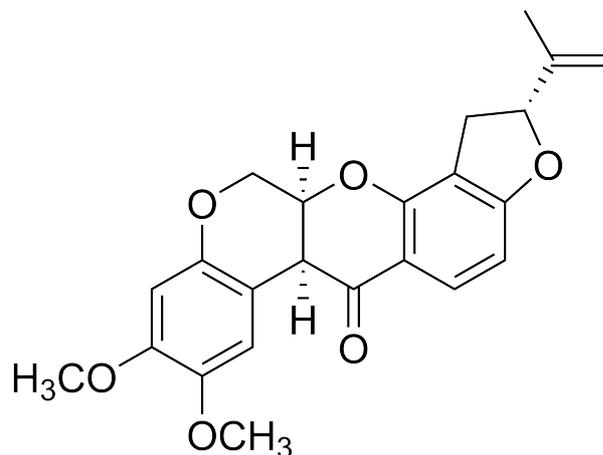


Abb. 2: Rotenon Strukturformel

Das Molekül Rotenon wird durch UV-Strahlen oder in alkalischen Lösungen mit einer Halbwertszeit von 1 bis 3 Tagen abgebaut. Diese Eigenschaften waren entscheidend für die Verbreitung als Insektizid und Pestizid in den Vereinigten Staaten und Europa, wo es entweder in großen landwirtschaftlichen Betrieben oder Gärten im urbanen Raum eingesetzt wurde.

In Deutschland ist Rotenon seit 1987 nicht mehr als Pflanzenschutzmittel zugelassen und in der EU mussten alle Zulassungen für rotenonhaltige Pflanzenschutzmittel ausnahmslos bis zum 30. April 2011 widerrufen werden (2008/317/EG vom 10. April 2008).

Die zelluläre Wirkung von Rotenon basiert auf einer spezifischen Hemmung von Komplex I der Atmungskette (NADH-Dehydrogenase), die sich in der inneren Membran der Mitochondrien befindet. Dies verhindert die Elektroübertragung, was zum Absinken des ATP-Spiegels und letztlich zum Zelltod führt.

Seit 2000 wurden mehrere Studien veröffentlicht, die Auswirkungen von chronischen, systemischen Intoxikationen durch Rotenon in Nagetieren beschreiben und einen Zusammenhang zwischen Rotenon und dem IPS nahelegen.

Betarbet u. a. (2000) charakterisieren die Auswirkungen von Rotenon im Tiermodell. An Lewis Ratten wurde gezeigt, dass über einen Zeitraum von 3-36 Tagen behandelte Tiere eine systemische Hemmung der mitochondrialen Funktion aufwiesen. Gleichzeitig wurde ein selektiver Verlust von DA-Neuronen der Substantia nigra beobachtet. Weiterhin zeigten sie, dass die Behandlung zur Degeneration von dopaminergem axonaler Endigung im Striatum führt. Ähnlich wie bei Menschen mit IPS, wurden auch in Rotenon-behandelten Ratten Inklusionen beobachtet, die ebenfalls reich an  $\alpha$ -Synuclein und Ubiquitin sind.

Verschiedenen Gruppen (Höglinger u. a., 2003; Lapointe u. a., 2004) verwendeten das gleiche Modell und beobachteten eine weniger selektive Neurodegeneration. Neben dem Verlust von dopaminergen Neuronen der SNpc wurde auch eine Degeneration in anderen Regionen festgestellt.

Rotenon wurde auch in verschiedenen Zellmodellen benutzt. Die Wirkung des Rotenon ist in starkem Maß vom Zelltyp abhängig. Bei Experimenten mit primären Zellkulturen aus Mäusen wurde während einer Expositionszeit von 6 Stunden und Konzentration von 5 nM Rotenon eine höhere Sensibilität dopaminergem Neuronen für die Toxizität von Rotenon im Vergleich zu GABAergen Neuronen festgestellt (Marey-Semper u. a., 1995). Eine andere Arbeitsgruppe hatte Langzeitprimärzellkulturen einer chronischen Behandlung mit Dosis von 10 nM bis 1  $\mu$ M Rotenon ausgesetzt. Dies führt zu einer dosis- und zeitabhängigen Zerstörung der SNpc Neuronen, Verlust an ATP und einem Anstieg von oxidativem Stress (Sherer u. a., 2003). Ebenso hat auch chronische orale Ingestion von Rotenon zu Parkinsonähnlicher Pathologie im ZNS von Nagetieren geführt (Pan-Montojo & Funk, 2010).

## 1.4 Kalziumaktivierte Kaliumkanäle

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration ist ein entscheidender Regulator der Zellphysiologie. Abhängig vom biochemischen Mechanismus kann Kalzium unterschiedliche Prozesse in Neuronen beeinflussen, die zentrale Bedeutung für die Entwicklung und Plastizität des Nervensystems haben. Dazu zählen beispielsweise das aktivitätsabhängige Zellüberleben, die Modulation der synaptischen Plastizität und der kalziumvermittelte Zelltod (Wood, 1984). Eine andere Bedeutung kommt der intrazellulären Kalziumkonzentration als Modulator der Kaliumkanäle zu.

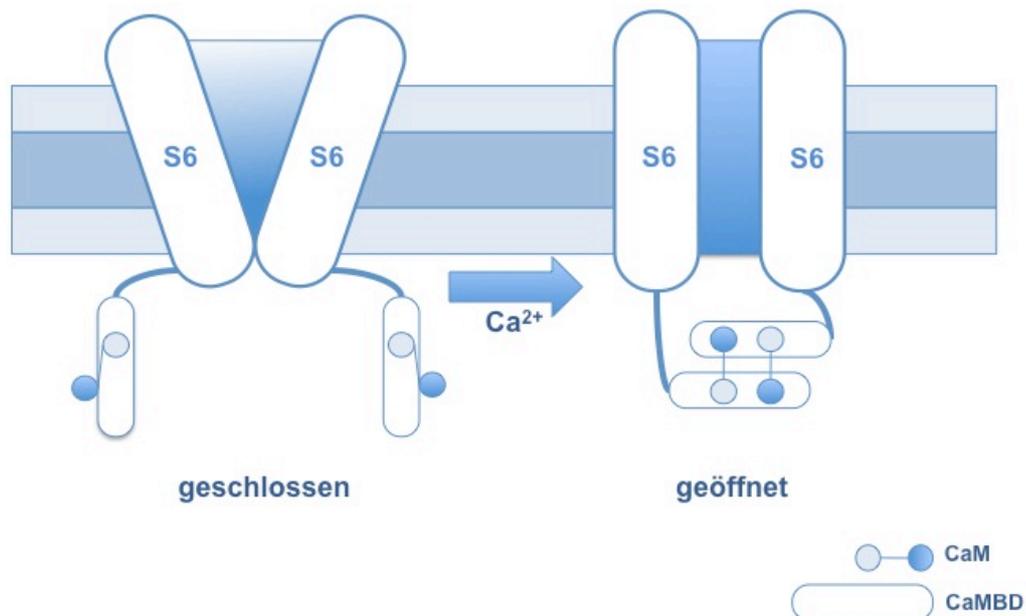
Kalziumaktivierte Kaliumkanäle wurden 1958 erstmals entdeckt (Wood, 1984) und werden aufgrund ihres Einzelkanalwertes der elektrischen Leitfähigkeit, ihrer spezifischen Antwort gegen Toxine und ihrer molekular-biologischen Eigenschaften in drei Untergruppen unterteilt: Big-conductance (BK-), intermediate conductance (IK-) und small conductance (SK-) Kaliumkanäle. Die letzten zeigen in elektrophysiologischen Untersuchungen eine Leitfähigkeit zwischen 10-20 pS und werden wie auch die anderen Klassen der kalziumabhängigen Kaliumkanäle nicht von Spannung beeinflusst (Adelman u. a., 2012).

### 1.4.1 SK-Kanäle

Kalzium-gesteuerte Kaliumkanäle mit „small conductance“ (=SK), also geringer Leitfähigkeit, sind hinsichtlich ihrer funktionellen und biochemischen Eigenschaften bei neurodegenerativen Krankheiten weitgehend unerforscht, im Gegensatz zu den anderen Kaliumkanälen.

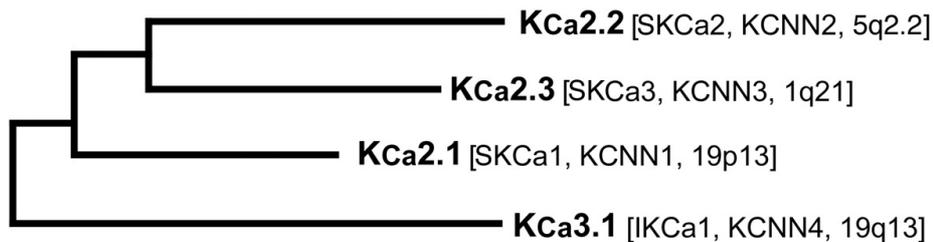
Köhler und Mitarbeiter (1996) haben erstmals diese Kanäle beschrieben als sie noch unbekannte Untereinheiten der Kaliumkanäle von Ratten und menschlichem Hirn kloniert haben. Als Ergebnis der Klonierung wurden drei verschiedene, aber eng verwandte Sequenzen isoliert, die Homologie zu der Porenregion der Kaliumkanäle haben und durch Apamin blockiert werden können (Wei u. a., 2005). Die Empfindlichkeit gegenüber Apamin ist abhängig von zwei Aminosäureresten auf beiden Seiten der Kanalporen der SK-Kanäle. Diese Charakteristik ist Voraussetzung für die Antwort der SK-Kanäle auf d-Tubocurarin.

Bei den dargestellten SK-Kanälen wird der Mechanismus „Öffnen und Schliessen“ der Pore, das sog. „Gating“, in einem chemo-mechanischen Modell zusammengefasst. Das „Gating“ der SK-Kanäle wird durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an CaM (Calmodulin) vermittelt. Dies führt zu einer Dimerisierung von nebeneinander liegenden Unterheiten der CaM (Calmodulin-Bindedomäne) und dadurch zur Konformationsänderungen der S6-Helix im Kanalprotein, die wiederum zum Öffnen der Pore führen (die schematische Darstellung des Gating-Modells ist in Abbildung. 3 zu sehen).



**Abb. 3: Darstellung des chemo-mechanischen „Gating“-Modells von SK-Kanälen (nach Schumacher u. a., 2001) .**

Die drei Untereinheiten der SK-Kanäle SK1 (Kca2.1), SK2 (Kca2.2) und SK3 (Kca2.3) werden durch die Gene KCNN1, KCNN2, und KCNN3 kodiert. In menschlichen Zellen sind diese drei Gene auf den Chromosomen 19p13.1, 5q22.3 und 1q21.3 lokalisiert (Wei u. a., 2005). Diese wurden später zusammen mit einer vierten Sequenz (IK1) in der Genfamilie KCNN1-4 zusammengefasst (Abbildung 4) (Adelman u. a., 2012).



**Abb. 4: Phylogenetischer Stammbaum und Nomenklatur der kalziumaktivierten Kaliumkanäle nach (Wei u. a., 2005).**

Die Verteilung und Expression der drei SK-Kanäle unterscheiden sich voneinander. SK1-, SK2- und SK3-Kanäle werden überwiegend im Zentralnervensystem exprimiert. Sie kommen – das Expressionsmuster von SK1 und SK2 überlagert sich stark – in Neokortex, Hippokampus, Thalamus und einigen kranialen Motoneuronen, aber auch in den monoaminergen Neuronen des Mittelhirns vor (Stocker, 2004).

Die Expression von SK3-Kanälen in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra wurde von Wolfart und Mitarbeitern (2001) nachgewiesen. Mittels elektrophysiologischer Untersuchungen von SK-Wildtyp- und Knockout-Mäusen wurde nicht nur die Expression, sondern auch die Rolle der SK2-Kanäle für die Frequenz des Aktionspotentials (AP) in den dopaminergen Neuronen aufgezeigt (Deignan u. a., 2012).

Die Expression von SK-Kanälen in Neuronen steht im Zusammenhang mit dem Nachhyperpolarisations-Phänomenen bei einem Aktionspotential, in dem die mittlere Komponente der Nachhyperpolarisation (AHP) von der Aktivierung der SK-Kanäle vermittelt wird.

Es bleiben noch wichtige Fragen über die Bedeutung der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{K}^{+}$ -Kanäle bei der AHP offen. Bereits gezeigt wurde, dass auch BK-Kanäle eine Rolle bei diesem Vorgang spielen.

SK-Kanäle, insbesondere die SK3-Subtyp, spielen in der Physiologie der dopaminergen Neurone eine wichtige Rolle. Die Beteiligung von SK-Kanälen an der Frequenz und Kinetik der Schrittmacheraktivität der dopaminergen Neurone des Mittelhirns steuert die Wiederaufnahme von Dopamin nach der Freisetzung, was letztlich zu einer potenziellen Beeinflussung der Neuronenaktivität führen könnte. (Deignan u. a., 2012; Herrik u. a., 2012; Wolfart u. a., 2001). Die Modulationen in der Funktion oder Expression der Kaliumkanäle können im Zusammenhang mit der Pathogenese der IPS stehen (Pedarzani & Stocker, 2008). Die wichtigen Funktionen der SK-Kanäle in Neuronen wurden auch bei Vorgängen wie der Regulation der dendritischen Erregung, der synaptischen Plastizität, dem Mechanismus des Lernens und der Gedächtnisfunktion untersucht (Faber & Sah, 2007).

### **1.4.2 Pharmakologie der SK-Kanäle**

Das Bienengift Apamin wurde als erster pharmakologischer Modulator der SK-Kanäle beschrieben und wird seither verbreitet experimentell genutzt, obwohl es nicht nur für die SK-Kanäle spezifisch ist.

Die Antwort auf Apamin variiert sehr stark in Abhängigkeit von der Kanaluntereinheit und ist abhängig von den Spezies. Zum Beispiel zeigen die menschlichen SK1-Kanäle eine schwächere Antwort auf eine Apaminbehandlung als SK2- oder SK3-Kanäle.

Nach Apamin sind auch verschiedene Skorpiongifte als spezifische Toxine der SK-Kanäle beschrieben worden. Später wurden neben den organischen auch synthetische Stoffe als Blocker für die 3 Isoformen der SK-Kanäle entwickelt (Pedarzani & Stocker, 2008). Bis heute sind verschiedene Positiv- und Negativmodulatoren und Blocker der SK-Kanäle entweder beschrieben oder synthetisch entwickelt worden.

Ein Problem bei den meisten SK-Modulatoren (Positiv- und Negativmodulatoren und Blockern) ist, dass sie nicht nur einen spezifischen Effekt auf die SK-Kanäle haben, sondern auch die IK-Kanäle beeinflussen. Ein Beispiel dafür ist der 1-EBIO (1-ethyl-2-benzimidazolinone), der zuerst als ein

pharmakologischer Modulator der SK-Kanäle beschrieben wurde und bei dem nachträglich festgestellt wurde, dass er auch die IK-Kanäle beeinflusst. CyPPA (N-Cyclohexyl-N-[2-(3,5-dimethyl-pyrazol-1-yl)-6-methyl-4-pyrimidinamine), ein Aktivator der SK-Kanäle, wurde kürzlich beschrieben und charakterisiert (Hougaard u. a., 2007). Als neuer pharmakologischer Modulator hat CyPPA den Vorteil, dass er selektiver sein könnte. Bis jetzt wurde nicht nachgewiesen, dass er die IK-Kanäle und die SK1-Kanäle beeinflusst, sondern er zeigt seine spezifische Wirkung auf die SK2- und SK3-Kanäle. Ein Nachteil von CyPPA ist, dass er sich nur gering auf die Aktivierung der SK-Kanäle bei menschlichen Neuronen auswirkt. Möglicherweise zeigt er nicht bei allen Zellmodellen die gewünschte Wirkung. In eigenen Studien wurde ein sehr geringer Effekt beobachtet, deswegen wurde dieser Aktivator für die Versuche nicht mehr weiter verwendet (die Ergebnisse sind in dieser Arbeit nicht aufgeführt).

2004 haben Strohbeck und Mitarbeiter einen neuen positiven Modulator mit einer 1000-Fach stärkeren Wirkung als 1-EBIO entwickelt. Dieser neue Stoff mit dem Namen 6,7-Dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime (NS309) gilt als spezifisch für die SK2 und SK3 Kanäle, obwohl in höherer Konzentration auch andere Kanäle aktiviert werden (Morimura u. a., 2006). Die Wirkung von NS309 bei den SK-Kanälen variiert je nach Protokoll. Bei den SK3-Kanälen ist jedoch schon bei einer Konzentration von 0,12  $\mu\text{M}$  eine  $\text{EC}_{50}$  zu beobachten.

Dieser Effekt ist auf die Wirkungsweise von NS309 als positiver „Gating“-Modulator der SK-Kanäle zu erklären, wodurch die Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$  -Empfindlichkeit resultiert, welche in Experimenten mit dem spezifischen SK-Inhibitor NS8593 bestätigt werden konnte (Strøbaek u. a., 2004). Die Modulation der SK-Kanäle mittels NS309 wurde in verschiedenen Modellen studiert. (Dolga u. a., 2011) zeigen in primärer Zellkultur von kortikalen Neuronen, dass die Aktivierung der SK-Kanäle die Veränderung der MNDAs-induzierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verhindert.

Beispiele für die oft verwendeten Negativ-, Positivmodulatoren und Toxine, die bei der Forschung der SK-Kanäle benutzt werden, sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1: Pharmakologie von SK-Kanälen (Pedarzani & Stocker, 2008).**

<b>Toxine (Inhibitoren)</b>			
<b>Stoffe</b>	<b>IC<sub>50</sub> (nM)</b>		
	<b>SK1</b>	<b>SK2</b>	<b>SK3</b>
Apamin	0,7 – 12,2	0,027 – 0,14	0,63 – 19,1
PO5	–	–	25
Scyllatoxin	80 – 325	0,29 – 0,3	1,1 – 8,3
Lei-Dab7	6000	5,5	2500
Tamapin	42	0,024	1,7
Tsk	–	–	198
d-Tubocurarine	23,5 – 354	2,4 – 17	210
UCL <sub>1684</sub>	0,76	0,28 – 0,36	5,8 – 9,5
Dequalinium	0,44 – 0,48	0,16 – 0,35	30
UCL <sub>1884</sub>	1,1	0,11 – 0,12	2,1
Calyculin	–	–	240
NS8593	415	598	726
TEA	5,2 – 14,6	2,8	8,7
<b>Aktivatoren</b>			
NS309	–	0,62	0,12 – 1,2

## 2 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Neurotoxin (Rotenon)-basiertes *in vitro*-Modell gewählt, das eine Differenzierung zu menschlichen post-mitotischen Neuronen erlaubt und möglichst viele Eigenschaften dopaminergener Neuronen zeigt. Verwendet wurde eine immortalisierte neuronale Zelllinie aus Neuroblasten des humanen fetalen Mesencephalons (LUHMES-Zellen).

Zunächst sollte überprüft werden, ob LUHMES-Zellen als Modell für das IPS überhaupt geeignet sind. Hierzu wurden anhand von 6 Tage lang differenzierten Zellen Proliferations-, Differenzierungs-, Phänotyp-Marker untersucht.

Die funktionellen und biochemischen Eigenschaften von Kalzium-gesteuerten Kaliumkanälen mit geringer Leitfähigkeit (SK-Kanäle) sind bei neurodegenerativen Krankheiten weitgehend unbekannt. SK-Kanäle sind aber von besonderem Interesse, da sie, insbesondere SK2-Kanäle, das Aktionspotential in dopaminergen Neuronen beeinflussen.

So sollte Expression und Lokalisation der SK-Kanäle in differenzierten LUHMES-Zellen untersucht werden. Anschließend wurde die Regulation der SK-Kanäle mittels des Kanal-Aktivators NS309 analysiert. Zuletzt sollte das mitochondriale Membranpotential abhängig von der Aktivierung der SK-Kanäle untersucht werden.

Ziel der Arbeit war es somit, anhand eines modernen Zellmodells, das das IPS bestmöglich simulieren kann, die Rolle der SK-Kanäle zu charakterisieren. Wir fokussieren uns dabei auf die pharmakologische Beeinflussbarkeit der SK-Kanäle, die uns neue therapeutische Optionen für eine Neuroprotektion menschlicher dopaminergener Neuronen eröffnen kann.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Allgemeine Chemikalien, Reagenzien und Materialien

Sofern nichts anders angegeben, wurden alle Laborchemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Fluka (Buch, Schweiz) bezogen. Die Herstellernamen für die speziellen Substanzen und Reagenzien sind in Klammern der jeweiligen Methodenbeschreibung beigefügt. In der nachstehenden Tabelle sind jeweils nur die allgemeinen Laborchemikalien und Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

**Tabelle 2: Laborchemikalien, Standards und Verbrauchsmaterialien**

Artikel	Art.-Nr.	Hersteller
CELLSTAR® Filter Top Zellkultur Flasche 75 cm <sup>2</sup>	658175	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® Filter Top Zellkultur Flasche 175 cm <sup>2</sup>	660175	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® 6 Well Zellkultur Multiwell Platte	657160	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® 12 Well Zellkultur Multiwell Platte	665180	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® 24 Well Zellkultur Multiwell Platten	662160	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® 48 Well Zellkultur Multiwell Platten	677180	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® 96 Well Zellkultur Multiwell Platten	655160	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
96 Well Polystyrol Zellkultur Microplatte, transparent	655180	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Advanced TC™ 96 Well Zellkultur Microplatte, weiß	675983	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
96 Well Polystyrol Zellkultur Microplatte, transparent	651160	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Polypropylen Röhrchen, konischer Boden, natur 15 ml	188271	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Polypropylen Röhrchen, konischer Boden, natur 50 ml	227261	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	83.1830	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
IbidiTreat 8-Well	80826	Ibidi, München, Deutschland
Sterile Filter 0,22 µm	291-3320	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Reaktionsgefäß 1,5 ml	72.706	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipette filter tips sterilized DF1200ST	F171803	Gilson, Luton, UK
Pipette filter tips sterilized DF300ST	F171603	Gilson, Luton, UK
Pipette filter tips sterilized DF200ST	F171503	Gilson, Luton, UK
Pipette filter tips sterilized DFL10ST	F171203	Gilson, Luton, UK
UltraPure DEPC Treated Water	750023	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Biozym LE Agarose	840004	Biozym, Wien, Austria
UltraPure 10X TBE Buffer	15581-044	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate	4346906	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
MicroAmp 96-Well Support Base	4379590	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Artikel	Art.-Nr.	Hersteller
MicroAmp Optical Adhesive Film	4360954	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Methanol absolute absolute, ≥99.8% (GC)	65543-2.5L	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
2-Propanol Eur., ≥99.8% (GC)	33539-2.5L-R	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol ≥99.5% (200 proof), absolute	459844	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml	86.1253.001	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 10 ml	86.1254..001	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 3.1.1 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die immunzytochemischen Untersuchungen und Western Blot Analysen eingesetzt.

#### 3.1.1.1 Primäre Antikörper

**Tabelle 3: Primäre Antikörper für Westernblot (WB) und Immunfluoreszenz (IF)**

	Katalog-Nr.	Herkunft/Art	Arbeitsverdünnung IF	Arbeitsverdünnung WB	Molekülmasse	Hersteller
Anti-GAPDH	MAB3374	Maus/ Polyklonal	–	1:2000	38 kDa	Millipore/ Billerica, MA, USA
Anti-Cyclophilin β	ab16045	Kaninchen/ Polyklonal	–	1:2000	23 kDa	Abcam/ Cambridge, UK
Anti-Aktin	08691001	Maus/ Monoklonal	–	1:10000	43 kDa	Mpbio/ Solon, OH, USA
Anti-TH	MAB318	Maus/ Monoklonal	–	1:1000	59-63 kDa	Millipore/ Billerica, MA, USA
Anti-TH	OPA1-04050	Kaninchen/ Poliklonal	1:200	–	–	Thermo Scientific/ Rockford, IL, USA
Anti-DAT	DAT13-A	Kaninchen/ Poliklonal	1:200	1:1000	50-60 kDa	Alpha Diacnostic/ San Antonio, TX, USA
Anti-VMAT2	ab37194	Kaninchen/ Polyklonal	1:200	1:1000	57 kDa	Abcam/ Cambridge, UK
Anti-DDC	AB1569	Kaninchen/ Polyklonal	1:200	1:2000	55 kDa	Millipore/ Billerica, MA, USA
Anti-Nurr1	AB5778	Kaninchen/ Polyklonal	1:200	1:500	66 kDa	Millipore/ Billerica, MA, USA
Anti-EN1	AB5732	Kaninchen/ Polyklonal	–	1:1000	40 kDa	Millipore/ Billerica, MA, USA

## Materialien und Methoden

Anti-GIRK2	APC-006	Kaninchen/ Polyklonal	–	1:1000	31 kDa	Alomone labs/ Jerusalem, Israel
Anti-PTX3	AB5722	Kaninchen/ Polyklonal	1:200	1:500	42 kDa	Millipore/ Billerica, MA, USA
Anti- TAU(HT7)	90222	Maus/ Monoklonal	–	1:1000	79 kDa	Thermo Scientific/ Rockford, IL, USA
Anti- $\alpha$ - synuclein	sc-7011- R	Kaninchen/ Polyklonal	1:500	1:1000	19 kDa	Santa Cruz/ Heidelberg, Deutschland
Anti-PCNA	M0879	Maus/ Monoklonal	–	1:1000	36 kDa	Dako Cytomation/ Glostrup, Dänemark
Anti-BrdU	OBT0030	Ratte/ Monoklonal	1:1000	–	–	AbD serotec/ Düsseldorf, Deutschland
Anti-KCNN1	Ab66624	Kaninchen/ Polyklonal	1:500	1:1000	30 – 60 kDa	Abcam/ Cambridge, UK
Anti-KCNN2	ab83733	Kaninchen/ Polyklonal	1:500	1:1000	62 kDa	Abcam/ Cambridge, UK
Anti-KCNN3	ab28631	Kaninchen/ Polyklonal	1:500	1:1000	82 kDa	Abcam/ Cambridge, UK
Anti-COX IV	ab16056	Kaninchen/ Polyklonal	–	1:1000	15 kDa	Abcam/ Cambridge, UK
Anti- $\alpha$ - Tubulin	T 6074	Maus/ Monoklonal	–	1:20000	50 kDa	Sigma- Aldrich/ Taufkirchen, Deutschland
Anti- $\beta$ - Tubulin III	T3952	Kaninchen/ Polyklonal	1:500	1:1000	50 kDa	Sigma- Aldrich/ Taufkirchen, Deutschland
Anti- Synaptophysin	MAB5258	Maus/ Monoklonal	1:200	1:1000	38 kDa	Millipore/ Billerica, MA, USA
Anti-NeuN	ABN78	Kaninchen/ Polyklonal	–	1:1000	46-48 kDa	Millipore/ Billerica, MA, USA
Anti-LMX1b	ab70174	Kaninchen/ Polyklonal	–	1:1000	41 kDa	Abcam/ Cambridge, UK
Anti- Neurofilament	AB9568	Kaninchen/ Polyklonal	1:200	–	–	Millipore/ Billerica, MA, USA
Anti-MAP2	AB5622	Kaninchen/ Polyklonal	1:200	–	–	Millipore/ Billerica, MA, USA

### 3.1.1.2 Sekundäre Antikörper

Die eingesetzten sekundären Antikörper sind in untenstehender Tabelle zusammengefasst. Für den Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen wurden mit Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelte sekundäre Antikörper eingesetzt.

**Tabelle 4: Sekundäre Antikörper**

	Katalog-Nr.	Herkunft/ Art	gekoppelt mit	Arbeitsverdünnung	Hersteller
<b>Western Blot</b>					
Anti-Kaninchen IgG	PI-1000	Ziege/ IgG (H+L)	HRP	1:2500 - 1:5000	Vector/ Burlingame, CA, USA
Anti-Ziege IgG	PI-9500	Pferd/ IgG (H+L)	HRP	1:2500 - 1:5000	Vector/ Burlingame, CA, USA
Anti-Maus IgG	PI-2000	Pferd/ IgG (H+L)	HRP	1:2500 - 1:5000	Vector/ Burlingame, CA, USA
<b>Immunfluoreszenz</b>					
Anti-Ziege IgG (H+L)	A11055	Esel/ IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	1:1000	Life Technologies/ Darmstadt, Deutschland
Anti-Maus IgG (H+L)	A11001	Ziege/ IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	1:1000	Life Technologies/ Darmstadt, Deutschland
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	A11008	Ziege/ IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	1:1000	Life Technologies/ Darmstadt, Deutschland
Anti-Maus IgG (H+L)	115-165-146	Ziege/ IgG (H+L)	Cy <sup>TM</sup> 3	1:200	Jackson Immuno Research/ Baltimore, MD, USA
Anti-Kaninchen IgG (H+L)	111-165-144	Ziege/ IgG (H+L)	Cy <sup>TM</sup> 3	1:200	Jackson Immuno Research/ Baltimore, MD, USA
Anti-Maus IgG (H+L)	711-175-152	Esel/ IgG (H+L)	Cy <sup>TM</sup> 5	1:200	Jackson Immuno Research/ Baltimore, MD, USA

### 3.1.2 Primer für die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die verwendeten Primer wurden entweder als synthetische Oligonukleotide, wie in der Literatur beschrieben, bezogen oder mit Hilfe des Programms CLC Main Workbench 6 (CLC bio, Cambridge, MA, USA) entworfen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) in HPLC-Qualität synthetisiert. Die Nukleotidsequenzen wurden der Gendatenbank der publizierten genomischen RNA-Sequenzen des Servers des National Center for Biotechnology (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) entnommen.

**Tabelle 5: Primer für den Nachweis der mRNA-Expression mittels RT-PCR**

Gen	GenBank Accession	Richtung	Primersequenz (5´-3´)	Programme; n(Zyklen);°C/Dauer; Primerhybridisierung	Produkt Länge [bp]
GAPDH	NM_002046 3	Vorwärts	CGAGATCCCTCCAAAATCAA	60°/30 min; 95°/2 min; 30(95°/15 sec; 57°/60 sec; 70°/2min); 70°/5 min; 4°/∞	885
		Rückwärts	CTGTGAGGAGGGGAGATTCA		
PPIB	NM_000942	Vorwärts	TGCTTTCGCCTCCGCCTGTG	60°/30 min; 94°/2 min; 30(94°/15 sec; 65°/30 sec; 68°/1 min); 68°/5 min; 4°/∞	443
		Rückwärts	GCCATGCTCACCCAGCCAGG		
ACTB	NM_001101	Vorwärts	ACAGAGCCTCGCCTTTGCCG	60°/30 min; 94°/3 min; 30(94°/60 sec; 63°/60 sec; 68°/2 min); 68°/2 min; 4°/∞	828
		Rückwärts	GGCAGCGGAACCGCTCATT		
KCNN1	NM_002248 (TAMARINA u. a., 2003)	Vorwärts	TCTTTGGCATGTTCCGGATTG TCGTCA	42°/30 min; 95°/4 min; 30(94°/30 sec; 63°/30 sec; 72°/30 sec); 72°/5 min; 4°/∞	197
		Rückwärts	CCAGTCATCGGCACCATTGTC CACCAG		
KCNN2	NM_021614 (TAMARINA u. a., 2003)	Vorwärts	GTGCTCTTGTTTTAGTATC TCG	42°/30 min; 95°/4 min; 30(94°/30 sec; 57,3°/30 sec; 72°/30 sec); 72°/5 min; 4°/∞	218
		Rückwärts	CAACCTGCACCCATTATTCC		
KCNN3	NM_002249 (TAMARINA u. a., 2003)	Vorwärts	CTGCTTGGTTTGATCATCGC	42°/30 min; 95°/4 min; 30(94°/30 sec; 61°/30 sec; 72°/30 sec); 72°/5 min; 4°/∞	166
		Rückwärts	AGAACTTGTA CTCTCCAGGAA T		
TH	NM_000360 (ZENG u. a., 2004)	Vorwärts	TCATCACCTGGTCACCAAGTT	60°/30 min; 94°/3 min; 30(94°/60 sec; 60,8°/60 sec; 70°/ 2 min); 70°/15 min; 4°/∞	125
		Rückwärts	GGTCGCCGTGCCTGTA CT		
VMAT2	L23205 (GRAFF u. a., 2001)	Vorwärts	CTTTGGAGTTGGTTTTGC	60°/30 min; 94°/3min; 30(94°/60sec; 53°/60sec; 68°/2min); 68°/10min; 4°/∞	301
		Rückwärts	GCAGTTGTGATCCATGAG		

## Materialien und Methoden

<b>DDC</b>	NM_000790	Vorwärts	CAAGTCACTCCCGGCTGCCT	60°/30 min; 95°/2 min; 30(95°/30 sec; 66°/60 sec; 70°/2 min); 70°/10 min; 4°/∞	786
		Rückwärts	TGTGGTCCCCAGGGTGGCAA		
<b>EN1</b>	NM_001426	Vorwärts	AGGGCACCAAATACCC	60°/30 min; 94°/2 min; 30(94°/15 sec; 52°/30 sec; 68°/1 min); 68°/5 min; 4°/∞	352
		Rückwärts	CGCTTGTTCTGGAACC		
<b>PTXT3</b>	NM_005029	Vorwärts	GTCTATCGGGACCCGTGTAA	60°/30 min; 94°/2 min; 30(94°/15 sec; 58°/30 sec; 68°/1 min); 68°/5 min; 4°/∞	225
		Rückwärts	CCAGTCAAAATGACCCAGT		
<b>NURR1</b>	NM_006186 (TRZASKA u. a., 2007)	Vorwärts	CAATGCGTTCGTGGCT	60°/30 min; 94°/2 min; 30(94°/15 sec; 58°/30 sec; 68°/1min); 68°/5 min; 4°/∞	274
		Rückwärts	GGGTACGAAGTTCTGGG		
<b>SOX1</b>	NM_005986	Vorwärts	CTCACTTTCTCCGCGTTGCT TCC	60°/30 min; 94°/3 min; 30(94°/60 sec; 66°/60 sec; 68°/2 min); 68°/10 min; 4°/∞	849
		Rückwärts	TGCCCTGGTCTTTGTCCTTCA TCC		
<b>CX3CR1</b>	NM_001337	Vorwärts	TGGCATAGCCCAGACACAGA AGAGG	60°/30 min; 94°/3 min; 30(94°/30 sec; 66°/30 sec; 70°/1 min); 70°/10 min; 4°/∞	358
		Rückwärts	TGTGAACAAGGTCTGGACGG GTGAA		
<b>PAC1</b>	NM_004624	Vorwärts	ATGGGAGCTCCTCTCCTGGA GGATT	60°/30 min; 94°/3 min; 30(94°/60 sec; 68°/60 sec; 70°/2 min); 70°/10 min; 4°/∞	896
		Rückwärts	GGTGGCAAGGGGATTGATT GATAA		
<b>PARK2</b>	NM_004562	Vorwärts	AATCCAAACCGGATGAGTG	60°/30 min; 95°/2 min; 30(95°/30 sec; 63,5°/60 sec; 70°/2min); 70°/10 min; 4°/∞	675
		Rückwärts	TTGATGGTTTCTTTGGAGGC		
<b>SNCA</b>	NM_000345	Vorwärts	CTTCAAGCCTTCTGCCTTTC	60°/30 min; 94°/3 min; 30(94°/30 sec; 58°/30 sec; 68°/1 min); 68°/10 min; 4°/∞	198
		Rückwärts	ACACCCTCTTTTGTCTTTCCT G		
<b>WNT1</b>	NM_005430	Vorwärts	GTGGAGCCATTGAACAG	60°/30 min; 95°/2 min; 30(95°/30 sec; 58°/60 sec; 70°/2min); 70°/10 min; 4°/∞	355
		Rückwärts	GCAGAGGAAGATGCTAC		
<b>LMX1B</b>	NM_001174 146	Vorwärts	GGATGCTGTTGTATAAT	60°/30 min; 94°/2 min; 30(94°/15 sec; 52°/30 sec; 68°/1 min); 68°/5 min; 4°/∞	305
		Rückwärts	ATACGAAAGTTACAC		
<b>NES</b>	NM_006617	Vorwärts	TAGAGAGCGAGCAGGAGGAG	60°/30 min; 94°/3 min; 30(94°/60 sec; 62°/60 sec; 68°/2 min); 68°/10 min; 4°/∞	937
		Rückwärts	GAGACTAGCGGCATTCTTG		
<b>DAT</b>	NM_001044	Vorwärts	CAATGGGAGAGACACGAAC	60°/30 min; 95°/2 min; 30(95°/30 sec; 56°/60 sec; 70°/2 min); 70°/10 min; 4°/∞	576
		Rückwärts	TCCTCCAATGCCTCTGAAC		
<b>GIRK2</b>	U52153 (PLUMMER u. a., 2004)	Vorwärts	ATGGATCAGGACGTCGAAAG	60°/30 min; 95°/2 min; 40(94°/30 sec; 55°/30 sec; 72°/45min); 70°/5 min; 4°/∞	438
		Rückwärts	ATCTGTGATGACCCGGTAGC		

### 3.1.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Die hier aufgeführten Puffer und Lösungen wurden in durch Ionenaustausch aufgereinigtem Wasser (Milli Q-Wasser, Millipore, Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Im Folgenden wird es als ddH<sub>2</sub>O bezeichnet. Die Puffer zu spezifischen Methoden werden im entsprechenden Abschnitt beschrieben.

**Tabelle 6: 1 X PBS, pH 7.4**

NaCl	9g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,527 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,144 g
HCl (0,1M)	auf pH 7,4 einstellen
ddH <sub>2</sub> O	auf 1000 ml auffüllen

### 3.1.4 Kits und Standards

**Tabelle 7: Kits und Standards**

Kit	Katalog-Nr.	Hersteller
Micro BCA Protein Assay Kit	23235	Thermo Scientific (Pierce)/ Rockford, IL, USA
ViaLight™ HS Kit	LT07-111	Lonza/ Köln, Deutschland
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	# 26619	Thermo Scientific (Pierce)/ Rockford, IL, USA
Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder	# 26628	Thermo Scientific (Pierce)/ Rockford, IL, USA
Spectra Multicolor High Range Protein Ladder	# 26625	Thermo Scientific (Pierce)/ Rockford, IL, USA
BSA	# 9998	Cell Signaling/ Danvers, USA
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	04693124001	Roche Applied Science/ Mannheim, Deutschland
PhosSTOP - Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	04906837001	Roche Applied Science/ Mannheim, Deutschland
HRP-Juice PLUS	103 15	PJK GmbH/ Kleinblittersdorf, Deutschland
DAPI	62247	Thermo Scientific (Pierce)/ Rockford, IL, USA
Normal Horse Serum	S-2000	Vector/ Burlingame, CA, USA
Normal Goat Serum	S-1000	Vector/ Burlingame, CA, USA
Normal Donkey Serum	S30-100ML	Millipore/ Billerica, MA, USA

### 3.1.5 Geräte

Tabelle 8: Geräte

Gerät	Hersteller
ChemiDOC XRS+	Bio-Rad, Münch, Deutschland
Trans-Blot Turbo	Bio-Rad, Münch, Deutschland
PowerPac™ HC Power Supply	Bio-Rad, Münch, Deutschland
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, Münch, Deutschland
UltraRocker Rocking Platform	Bio-Rad, Munich, Deutschland
Heracell 150i CO <sub>2</sub> Incubators	Thermo Scientific, Deutschland
HERAfreeze® BASIC SI -86°C	Thermo Scientific, Deutschland
HERAEUS Megafuge 16 Centrifuge	Thermo Scientific, Deutschland
HERAEUS Fresco 17 Centrifuge	Thermo Scientific, Deutschland
StepOnePlus Real-Time PCR System	Life Technologies, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Deutschland
Labcycler Gradient	SENSOQuest, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Mini Plate Spinner MPS 1000	Labnet International, USA
Fluorescence inverted microscopy CRX41	Olympus, Japan
Confocal Leica TCS SP5 II	Leica, Deutschland
Fully Automated Inverted Research Microscope DMI6000 B	Leica, Deutschland
SAFE 2020 Sicherheitswerkbänke	Thermo Scientific, Deutschland

## 3.2 Zellbiologische Methoden

Alle Kultivierungsarbeiten wie Auftauen, die Aussaat und Umsetzen der Zellen erfolgten unter aseptischen Bedingungen in einer Sicherheitsarbeitsbank (SAFE 2020, ThermoScientific, Rockford, IL, USA)

### 3.2.1 Zelllinie

Die immortalisierte neuronale Zelllinie (MesC 2.10, Subklon LUHMES; (LOTHARIUS u. a., 2005) wurde von Prof. Marcel Leist, Univ. Konstanz, zur Verfügung gestellt.

### 3.2.2 Auftauen der Zellen

Nach 30 Passagen wurden neue Zellen niedrigerer Passagen aufgetaut. Tiefgefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Danach sofort in 4 ml erwärmtes Wachstumsmedium (WM) (Zusammensetzung siehe 3.2.3) pipettiert und bei 225,6 x g für 7 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach dem Absaugen des Überstandes in 2 ml Medium resuspendiert und in mit 10 ml WM befüllte Zellkulturflaschen pipettiert.

### 3.2.3 Kultivierung der LUHMES-Zelllinie

Die Anzucht der Zellen erfolgte nach der Methode von Lotharius u. a. (2005), nach der die LUHMES-Zellen mit einer Zelldichte von  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro Flasche in 10 ml von einem modifizierten DMEM/F-12 Medium (Wachstumsmedium) ausplattiert wurden. Vor dem Aussäen wurden die Kulturgefäße mit 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin (PLL) (Sigma-Aldrich, P1399-25MG) beschichtet. Nach 24 Stunden wurden die Kulturflaschen zweimal mit PBS gewaschen und kühl gelagert. Der Medienwechsel erfolgte alle 48 Stunden. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub>-haltiger Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97% im Brutschrank inkubiert.

**Tabelle 9: Wachstumsmedium (WM)**

DMEM/ F-12 Medium		Sigma-Aldrich, D6421-500ML
bFGF	25 µg/ml	Sigma-Aldrich, 233-FB-025
N2 Supplement	1 %	R&D Systems, 17502-048
Penicillin/Streptomycin	1 %	Invitrogen, 15070-063

### 3.2.4 Differenzierung der LUHMES-Zelllinie

Für die Differenzierung wurden die Zellen nach Trypsin-Behandlung (ca. 7 Minuten) resuspendiert und bei 225,6 x g für 7 Minuten abzentrifugiert, anschließend in Wachstumsmedium aufgenommen. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Das neue Medium (Differenzierungsmedium, DM) enthält anstelle von bFGF jetzt Tetracyclin, dibutyryl cAMP und GDNF (die genaue Zusammensetzung siehe in Tabelle 9). In der Differenzierungsphase

wurde die LUHMES-Zelllinie auf doppelt beschichteten Oberflächen (10 µg/ml PLL und 50 µg/ml Fibronectin) ausgesät. Die Aussaat erfolgte in den jeweiligen Zellkulturgefäßen in der idealen Zelldichte (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 10: Differenzierungsmedium**

DMEM/ F-12 Medium		Sigma-Aldrich, D6421-500ML
Tetracyclin	1mg/ml	Sigma-Aldrich, T7660
dibutyryl cAMP	49 mg/ml	Sigma-Aldrich, A9501
GDNF	5 ng/µl	R&D, 212-GD-050
Penicillin/Streptomycin	1 %	Invitrogen, 15070-063

**Tabelle 11: Zelldichte**

Kulturgefäße	Oberfläche (cm <sup>2</sup> )	Volumen des Mediums (µl)	Zellanzahl (x 1000)
96-Well Platte	0,34	200	20
48-Well Platte	1,1	300	60
24-Well Platte	1,9	500	100
12-Well Platte	3,5	1000	21
6-Well Platte	9,6	2500	500
IBIDI	1,1	200	30-60

### 3.2.5 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl 0,4% Trypanblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, P1399-1G) in einem 1,5 ml Eppendorf Tube gemischt. Dies entspricht einer 1:1 Verdünnung. Trypanblau färbt nur beschädigte Zellen an und durchdringt die Zellwand intakter Zellen nicht. Dies lässt eine Unterscheidung von lebenden und toten/geschädigten Zellen zu. Die Auszählung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (peqlab, Erlangen, Deutschland, DHC-N01) unter dem Mikroskop. Es wurde dabei die durchschnittliche Zellzahl der vier großen Quadrate (1 Quadrat = 0,1 µl) der Neubauer-Kammer erfasst.

Die genaue Zellzahl wird wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} \Sigma \text{Zellzahl aller Quadrate} / 4 &= \text{Mittelwert der Zellzahl/Quadrat} \\ \text{Mittelwert der Zellzahl} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10 &= \text{Zellzahl/} \mu\text{l} \\ \text{Zellzahl/} \mu\text{l} \times \text{Volumen der Zellsuspension} &= \text{Gesamtzellzahl} \end{aligned}$$

### 3.2.6 Kryokonservierung der Zelllinie

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden Zellen kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) überführt. Nach siebenminütiger Zentrifugation bei 225,6 x g wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in Einfriermedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 10) aufgenommen (2 Mio. Zellen/ ml). Je 1 ml dieser Suspension wurde in ein 1,5 ml-Kryo-Röhrchen (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland, 72.379.992) überführt und zunächst bei –80°C eingefroren, und schließlich zur längeren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

**Tabelle 12: Einfriermedium**

Wachstumsmedium	45%	
FCS	45%	Sigma-Aldrich, F9665
DMSO	10%	Sigma-Aldrich, D8418-250ML

### 3.2.7 BrdU-Inkorporations-Assay

Um die Wirkung der Differenzierung auf das Proliferationsverhalten der LUHMES-Zelllinie zu verfolgen, wurde ein 5-Brom-2'-Deoxyuridin (BrdU)-Inkorporationsassay durchgeführt. BrdU ist ein chemisches Analogon des Nukleotids Thymidin. Es wird zur labordiagnostischen Markierung proliferierender Zellen in vitalen Geweben verwendet (Taupin, 2007). Die Methode basiert auf dem immunzytochemischen Nachweis von BrdU, welches bei der DNA-Synthese anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden kann.

Für den Test wurden die LUHMES-Zellen auf IBIDI-Platten ausgesät und nach 24 Stunden im Inkubationsschrank für 2 Stunden mit 10  $\mu\text{M}$  BrdU (Sigma-Aldrich, B5002-5g) im Medium bei 37°C inkubiert. Für die Durchführung der anti-BrdU-Färbung ist eine Vorbehandlung nötig, welche die DNS denaturiert, um die Freilegung des darin kovalent eingebauten Antigens (BrdU) zu ermöglichen. Hierzu wurden die mit 4% PFA-fixierten LUHMES-Zellen zunächst in kalter 1N HCl-Lösung für 10 min inkubiert, danach für 20 Min. in 37°C warmer 2N HCl-Lösung. Nach der Behandlung mit HCl wurden die Zellen zunächst für 10 Min. in 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) bei Raumtemperatur inkubiert und dann drei Waschschritten ( $3 \times 5$  Min. in PBS), wie unter dem Punkt „Immunzytochemie“ beschrieben, unterzogen. Der anti-BrdU Primärantikörper (AbD serotec, OBT0030) wurde mit einer Endkonzentration von 1:1000 verwendet.

**Tabelle 13: BrdU Lösung**

5-Brom-2-Desoxyuridin (BrdU)	
Molare Masse	307,10 g·mol <sup>-1</sup>
Löslichkeit	970 mg/ml
Stammlösung	10 mM in PBS
BrdU	18,426 mg
PBS	auf 2 ml auffüllen
Arbeitslösung	1 mM in DMEM/F12
1: 10 in DMEM/F12	für jedes Experiment frisch einsetzen

**Tabelle 14: 0,1 M Boratpuffer**

Borsäure	1,236 g
ddH <sub>2</sub> O	auf 200 ml auffüllen
NaOH	auf pH 8,5 einstellen

### 3.3 Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität

#### 3.3.1 MTT-Test

Zur Ermittlung der Zytotoxizität von den Testsubstanzen für Zellexperimente wurde die Zellviabilität mittels MTT-Test untersucht. Dieser Test basiert auf der Umwandlung des gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazoliumbromids (MTT) durch zelluläre Dehydrogenasen zum dunkelblauen und wasserunlöslichen Formazan (Abbildung 5). Die Formazan-Bildung ist zur Aktivität der Dehydrogenasen und zur Zytotoxizitätsrate proportional. Für diesen Test wurden 20'000 Zellen/ Vertiefung in einer 96-Well-Platte ausgesät (Medium 100 µl/ Vertiefung). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Medium durch Differenzierungsmedium ersetzt und die Zellen für 6 Tage differenziert. Nach weiteren 48 Stunden wurde das entsprechende Volumen von MTT-Lösung für eine Endkonzentration von 0,25-0,5 mg/ ml zugegeben. Anschließend wurden die Platten zwei Stunden bei 37°C inkubiert, das Medium abgesaugt und die Platten bei -80°C mindestens eine Stunde eingefroren. Daraufhin wurde die Platte mit 50 µl DMSO noch eine weitere Stunde bei 37°C in der Schüttelmaschine inkubiert. Die Detektion erfolgte photometrisch im Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 550 nm. Die quantitative Darstellung erfolgte in Prozentanteilen der Kontrollen.

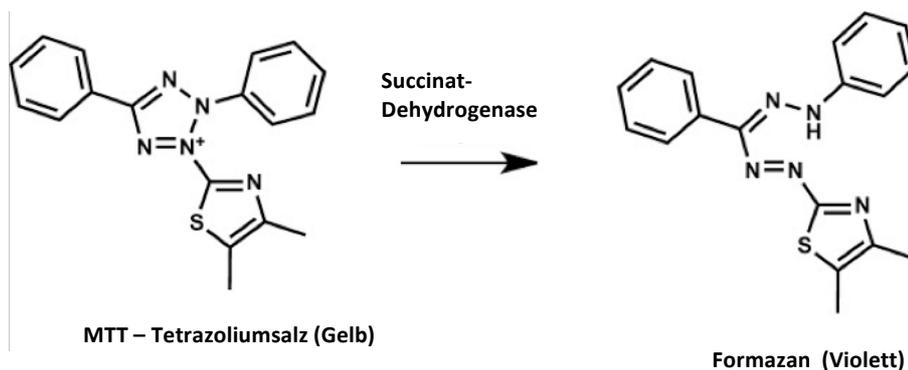


Abb. 5: Reduktion von MTT zu Formazan

**Tabelle 15: MTT 2,5 mg/ml Arbeitslösung**

MTT	125 mg	Sigma-Aldrich, M5655
PBS	auf 50 ml auffüllen	

### 3.3.2 ATP-Messung

Mittels der Messung des ATP (Adenosintriphosphat)-Gehalts durch Lumineszenz wurde die Integrität von lebenden Zellen gemessen. Die ATP-Spiegel wurden mit Hilfe des ViaLight™ plus Kit (LONZA, Basel, Schweiz, LT07) bestimmt. Dafür wurden die LUHMES-Zellen in einer Zelldichte von  $2,0 \times 10^4$  Zellen/Well auf einer weißen 96 Well-Mikrotiterplatte ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen differenziert. Am Ende der Experimentalzeit wurden zu jeder Vertiefung 100  $\mu$ l Nucleotide Releasing Reagent (NRR) gegeben, um intrazelluläres ATP freizusetzen. Nach mindestens 5 min Inkubationszeit bei RT wurde die Messung der Proben am Luminometer durch automatische Zugabe von je 20  $\mu$ l ATP Monitoring Reagent (AMR) zu jedem Well initiiert. Zur Bestimmung des 100 %-Wert der Viabilität dienten unbehandelte Zellen. Die Lumineszenz der Zellen ohne Zugabe von NRR und die Lumineszenz des Mediums ohne Zugabe von Zellen wurden als negative Kontrollen bestimmt. Jede Bedingung wurde als Dreifachansatz durchgeführt, aus denen jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung (s) berechnet wurden. Gemessen wurde mit einem Lumineszenz-Reader (Fluostar Optima /BMG LABTECH).

### 3.3.3 DAPI-Kernfärbung

Um Zytotoxizität bestimmen zu können, wurden eine Zellkernfärbung mittels DAPI durchgeführt. Für die DAPI-Färbung wurden die Zellen zunächst auf IBIDIs Kulturkammerobjektträger ausgesät und nach 24 Stunden differenziert, 10 min mit 4 % PFA fixiert und mit PBS 1 X gewaschen. Diese Zellen wurden mit DAPI-Lösung (1  $\mu$ l DAPI-Stammlösung mit 1 ml PBS versetzt) für 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Färbung wurde daraufhin unter dem Fluoreszenzmikroskop mit UV-Anregung untersucht. Nach DNA-Markierung erfolgte die Auswertung der Signale mit dem Fluoreszenzfiltersatz für blaue Fluoreszenz. Eine intensivere Färbung weist auf

Apoptose hin. DAPI bindet an Adeninreste der DNA. Alle Zellkerne wurden nach den morphologisch-apoptotischen Kriterien wie Kernpyknose, Kernfragmentierung und Apoptosekörperchen, von vier Vertiefungen pro Bedienung analysiert. Pro Vertiefung sind 5 Aufnahmen ausgezählt worden. Die Ergebnisse sind in Prozent der Gesamtzellzahl ausgedrückt.

### **3.4 Molekularbiologische Methoden**

Die hier benutzt molekularbiologische Techniken, wie RT-PCR und qPCR, wurden unter sterilen Bedingungen auf einer sterilen Arbeitsfläche (DNA/RNA UV Cleaner, MS Laborgeräte, Schröder OHG, Wiesloch, Deutschland) durchgeführt. Die benutzten Reaktionsgefäße wurden vor der Verwendung für 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt.

#### **3.4.1 Isolierung und Reinigung von Gesamt-RNA**

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgt mit Hilfe des Total RNA Isolation Kit - Nucleo Spin RNA II (MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland, 740955). Hierbei wurden mindestens 500,000 Zellen vorgelegt. Daraufhin wurden die Wells einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend wie nach der Beschreibung des Herstellers entsprechend verfahren. Dazu wurden die Zellen mit 350 µl Lysepuffer (RA1) benetzt, der mit 3,5 µl  $\beta$ -Mercaptoethanol zuvor aktiviert worden war. Anschließend wurden die Zellen vom Kulturgefäß mit einem Schaber abgelöst. Das Lysat kann stabil bis zu einem Jahr bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert oder sofort weiterverarbeitet werden. Der Kit bedient sich der Bindung von mRNA an Polymere, die gewaschen werden und mit polarem Lösungsmittel die mRNA wieder freisetzen. Nach Isolation und Trocknung der RNA wurden diese in 30-60 µl DEPC-Wasser gelöst. Die Qualitätssicherung der RNA erfolgte anschließend durch lab-on-chip-Technologie über Kapillarelektrophorese (Experion, Bio-Rad, Münch, Deutschland). Die RNA-Stammlösungen und Verdünnungen wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die RNA-Reinheits- und Konzentrationsbestimmung wurde bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm mit einem NanoDrop 2000c Spektral-Photometer (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) bestimmt. RNA: OD<sub>260/280</sub> = 2,0 entspricht einer 100 %igen Reinheit.

### 3.4.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Für die Durchführung der RT-PCR Reaktion wurde das SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, 12574-018) eingesetzt. Als RNA Vorlage wurde 0,1 µg RNA verwendet. Die Annealing-Temperatur, die Dauer der Extension, sowie die Anzahl der Zyklen richteten sich nach den verwendeten genspezifischen Primer (siehe Tabelle 05). Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,2 µM verwendet und die PCR-Bedingungen den Primern und der Länge des zu amplifizierenden Bereiches angepasst. Die genaue Angabe des Reaktionsmix entspricht dem in Tabelle 14 beschriebenen. Der Ansatz wurde zu der Reaktion hinzugegeben, gemischt und im Thermocycler unter primerspezifischen Bedingungen inkubiert. Nach der Reaktion wurden die Proben auf ein 1,5 %-Agarosegel, je nach der Gelgröße mit 1 bis 2,5 µl SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, S33102) aufgetragen. Die Dokumentation erfolgte durch Aufnahme der Fluoreszenz mit dem Gel Doc XR BIO-RAD.

**Tabelle 16: Zusammensetzung der RT-PCR Arbeitslösung**

2X Reaction Mix	12,5 µl
Template RNA (0,1 µg)	1 µl
Vorwärts primer (5 µM)	1 µl
Rückwärts primer (5 µM)	1 µl
SuperScript III RT/ Platinum Taq Mix	1 µl
MgSO <sub>4</sub> 5 mM*	2 µl
DEPC-Wasser	auf 25 µl aufgefüllt

\*Falls notwendig

### 3.4.4 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in horizontalen Agarosegelenkammern (OWL EASYCAST, Thermo Scientific, Rockford, USA, B1A) in 1 X TBE-Puffer (10 X TBE-Puffer : 1 M Tris, 0,9 M Boric Acid, 0,01 M EDTA), pH 8,4 (Gibico, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, 15581-044) bei einer Spannungen von 130 V und einer Agarosekonzentrationen zwischen 1,5 und 3% (w/v) in TBE-Puffer. Das PCR-Produkt (1- 5 µl) wurde mit 2 µl von einem 1: 4 BlueJuice Gel Loading Buffer-Lösung (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, 10816-015) auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker wurde bei der Elektrophorese 0,1 µg einer 1 kb DNA-Leiter (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, 15628-050) aufgetragen.

**Tabelle 17: 100 pb Leiter Verdünnung**

100 bp DNA Ladder 1µg/µl	10 µl
Blue Juice	50 µl
DEPC-Wasser	440 µl
Auftragen	2,5 – 5 µl *
Bei 4°C aufbewahren	

\*je nach Größe der Taschen

### 3.4.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

#### 3.4.5.1 cDNA-Synthese

Die Umschreibung der mRNAs zu cDNA erfolgte mittels eines reversen Transkriptase Kit (iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad, München, Deutschland, 170-8890), welches eine Mischung von Random-Hexamer-Nukleotiden und Oligo-dT-Nukleotiden als Startpunkte für die Reverse Transkription beinhaltet. So wurden rRNA, tRNA und mRNA aus der zuvor extrahierten Gesamt-RNA der Proben revers transkribiert. 1000 ng gesamt-RNA wurde als Vorlage für die cDNA-Synthese verwendet. Das entspricht nach der Umschreibung 50 ng cDNA /  $\mu\text{l}$ . In einem Thermocycler erfolgte die Inkubation nach folgendem Protokoll: 5 min bei 25 °C, 30 min bei 42 °C und anschließend 5 min bei 85 °C. Als Kontrolle wurde für jede Probenreihe auch eine genomische DNA Kontroll-Probe eingesetzt, bei der das Enzym Reverse Transkriptase durch Wasser ersetzt wurde. Diese Kontrolle ist wichtig um eine Verunreinigung der cDNA-Probe mit chromosomaler DNA detektieren zu können. Nach der Synthese wurde die cDNA mit DEPC-Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt und bei - 20°C gelagert.

**Tabelle 18: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes**

5X iScript reaction mix	4 $\mu\text{l}$
iScript reverse transcriptase	1 $\mu\text{l}$
DEPC-Wasser	X $\mu\text{l}$ *
RNA-Vorlage	0,5 – 1 $\mu\text{g}$
Gesamtvolumen	20 $\mu\text{l}$

\* je nach Konzentration der RNA-Vorlage angepasst.

#### 3.4.5.2 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Zur Bestimmung der spezifischen DNA-Sequenz in einer Probe und um zugleich auch eine Quantifizierung des DNA-Abschnittes zu definieren, wurde die Methode der Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) angewendet. In dieser Arbeit wurde die qPCR am StepOnePlus Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Quantifizierung wurde mithilfe des Programms qbasePlus (Biogazelle,

Zwijnaarde, Belgien) als relative mRNA-Werte erfolgte. Für den TaqMan® PCR-Ansatz wurde der vorgefertigte 2 x TaqMan® Universal PCR-Mastermix mit UNG (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, 4440039) verwendet. Der Reaktionsansatz mit cDNA, Primer-Sonde-Mischung und DEPC-Wasser für die qPCR hatte ein Gesamtvolumen von 20µl und wurde wie bei der Tabelle 17 aus folgenden Komponenten zusammengesetzt. Als passive Referenz wurde der Farbstoff Rox hinzugegeben, der keinen Einfluss auf die PCR hat und die Fluoreszenzfluktuationen in der Normalisierung der Fluoreszenzsignale ausgleicht. Das PCR-Protokoll wurde nach Herstellerangabe durchgeführt. Die genspezifische Primer-Sonde wurde von Life Technologies synthetisiert und sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

**Tabelle 19: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes**

2X TagMan Universal Master Mix	10 µl
TagMan Primer/ Sonde Mix	1 µl
cDNA-Vorlag	1 µl
DEPC-Wasser	8 µl
Gesamtvolumen	20 µl

**Tabelle 20: Bedingungen für die qPCR**

50 °C	UNG	2 min.	
95 °C	Enzym Aktivierung	10 min.	
95 °C	Denaturierung	15 sec.	40 Zyklen
60 °C	Hybridisierung/ Verlängerung	60 sec.	
16 °C		∞	

**Tabelle 21: Verwendete Primer-Sonden Mischungen**

Gen	Assay ID	Spezies	Firma	Produkt Länge	Ta (°C)
18S	Hs99999901_s1	Human	Life technologies	187	60
ACTB	Hs01060665_g1	Human	Life technologies	63	60
GAPDH	Hs99999905_m1	Human	Life technologies	122	60
PLOR2A	Hs00172187_m1	Human	Life technologies	61	60
PPIA	Hs04194521_s1	Human	Life technologies	97	60
PPIB	Hs00168719_m1	Human	Life technologies	67	60
PSMC1	Hs02386942_g1	Human	Life technologies	100	60
KCNN1	Hs00158457_m1	Human	Life technologies	83	60
KCNN2	Hs01030641_m1	Human	Life technologies	108	60
KCNN3	Hs01546821_m1	Human	Life technologies	73	60

Zur Normalisierung der Daten aus den q-PCR-Experimenten wurde die Expressionsrate der Test- und Kontrollproben auf die Expressionsrate von Haushaltsgenen (HHG) bezogen. Dies erfolgte, um biologische Variationen bei der Ergebnisinterpretation berücksichtigen zu können. Die Auswahl und die Anzahl der HHG in den Experimentbedingungen wurden mithilfe des qbasePlus (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgien) bestimmt, mit dem die stabilste Expression in den Proben und die optimalen Anzahl von HHG als „Stability value“ (M) und „pairwise variation“  $V(n/n+1)$  berechnet wurden. Die in dieser Arbeit verwendete HHG sind auf der Tabelle 19 zu finden.

### **3.4.6 Genexpressionsanalyse**

Die Genexpressionsanalyse erfolgt mit Hilfe eines Illumina BreadChip Systems (Illumina, San Diego, CA, USA). Für die Analysen wurden die LUHMES-Zellen auf 10 cm<sup>2</sup> ausplattiert und differenziert. Nach zwei, vier und sechs Tage wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 500 µl RLT Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland, 79216) gelöst und das Lysat bei -80°C gelagert. Anschließend wurde die gesamte RNA nach Herstellerangabe isoliert. Als erster Schritt der Microarray-Analyse wurde die RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend erfolgte die Synthese des zweiten komplementären cDNA Strängen und die Genexpressionsanalyse, wie im Protokoll von Qiagen beschrieben.

## **3.5 Detektion und Identifizierung von Proteinen**

### **3.5.1 Protein-Extraktion und Probenvorbereitung**

Nach der Durchführung der Experimente wurden das Medium abgesaugt und die Wells zweimal mit PBS (4°C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers mit 150-250 µl (je nach Größe der Wells) Lysepuffer vorsichtig von der Platte abgelöst. Danach wurde das Lysat in ein 1,5 ml Eppendorftube überführt und für mindestens 2 h bei -80°C eingefroren. Das Zelllysate wurde dann aufgetaut, gut resuspendiert und bei 13'000 g

abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues steriles Eppendorftube überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Gehaltsbestimmung gelagert.

**Tabelle 22: Zusammensetzung des Lysepuffer Grundmix**

D-Mannitol 0,25 M	4,56 g
Tris-base 0.05 M	0,788 g
EDTA 1 mM	0,038 g
EGTA 1 mM	0,038 g
HCL	Auf pH 7,8 einstellen
ddH <sub>2</sub> O	auf 100 ml aufgefüllt

**Tabelle 23: Zusammensetzung der Lysepuffer-Arbeitslösung**

Grundmix	10 ml
DTT-Stammlösung 100 mM	100 $\mu\text{l}$
Triton X-100	100 $\mu\text{l}$
Proteaseinhibitor	1 Tablette
Phosphataseinhibitor	1 Tablette
Frisch ansetzen	1 Woche nutzbar

**Tabelle 24: Zusammensetzung der DTT-Stammlösung 100 mM**

DTT	1154 mg
ddH <sub>2</sub> O	auf 100 ml aufgefüllt
Bei $-20^{\circ}\text{C}$ aufbewahren	

### 3.5.2 Proteinbestimmung

Die Gehaltsbestimmung von Proteinen erfolgte photometrisch mit dem BCA-Proteinbestimmungs-Kit (BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific (Pierce), Rockford, USA, 232225) und ermöglichte, dass für die semiquantitative Western Blot Analyse gleiche Mengen von Proteinen aufgetragen werden konnten. Die Methode basiert auf dem Prinzip der Reduktion der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{+}$  durch Proteine in alkalischer Lösung mit anschließender Bildung eines violett gefärbten Komplexes mit Bicinchoninsäure (BCA). Bei der Bestimmung wurde eine Standardkurve berechnet, welche den Konzentrationsbereich von 20-2000  $\mu\text{g/ml}$  abdeckt. Dazu wurden 5  $\mu\text{l}$  des Proteinlysats mit 200  $\mu\text{l}$  BCA-Arbeitslösung versetzt, gemischt und bei  $60^{\circ}\text{C}$  für 30 Min. inkubiert. Danach

wurde 100 µl der Lysat-BCA-Mischung zu einer 96-Well-Platte transferiert, in das Mikrotiterplattenlesegerät (Fluostar Optima, BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland) gestellt und die Proteinkonzentration mittels der Software Omega Version 1.10 (BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland) berechnet. Die Konzentrationen der Bestandteile des Lysepuffers lagen innerhalb des linearen Bereichs der Ausgleichsgeraden.

### **3.5.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die immunologische Detektion von Proteinen wird das Protein-Lysat im Nachgang der elektrophoretischen Trennung auf spezielle Membranen transferiert, um es mit Hilfe von Antikörpern zu detektieren. Zur elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden 25-30 µg des Gesamtprotein-Lysats auf ein 10-15% SDS-Gel aufgetragen. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine PVDF-Membran mit einer Semidry-Blot-Apparatur (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad, München, Deutschland). Die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines Massenstandards (Page Rule Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific (Fermentas), Rockford, USA, 26616) abgeschätzt. Nach dem Transfer wurden die Membranen einige Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, dann wieder mit Transferpuffer rehydriert. Um die unspezifischen Antikörperbindungsstellen zu sättigen, wurden die Membranen in einer Lösung aus 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST für 1h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranen über Nacht mit dem entsprechenden primären Antikörper in Verdünnungspuffer (Antikörper und Verdünnung siehe Tabelle 3). Nach dreimaligem Waschen mit 0,1% Tween TBS wurden die Membranen mit einem an Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper für eine weitere Stunde inkubiert. Wiederum nach dreimaligem Waschen erfolgt die Detektion gebundener Antikörper unter Verwendung der ECL- oder ECL plus-Systeme von Amersham (GE Healthcare, Little Chalfont, RPN2209/ RPN2132). Die Quantifizierung der Bandenintensität wurde mittels ImageLab (Bio-Rad, München, Deutschland), einem semiquantitativen Software-System von Bio-Rad, durchgeführt. Als Ladungskontrolle diente das Stripping und die Inkubation der PVDF-Membranen mit GAPDH- Aktin- oder Cyclophilin β-Antikörper.

**Tabelle 25: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele**

	Trenngel (1 Mini Gel)				Sammelgel (1 Mini Gel)	
	7,5%	10%	12,5%	15%	3,5%	4%
ddH <sub>2</sub> O	4,85	4	3,35	2,32	6,2	6,1
1,5 M Tris pH 8,8	2,5	2,5	2,5	2,5		
0,5 M Tris pH 6,8					2,5	2,5
SDS 10%	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Acryl/bis 30%	2,5	3,34	4	5	1,2	1,3
10% APS	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02
Total (ml)	10	10	10	10	10	10

### 3.5.4 Lösungen und Puffer für Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot

**Tabelle 26: 0,5 M Tris pH 6,8**

Tris-HCl	7.88 g
Bidest dH <sub>2</sub> O ad	100 ml
HCl	pH 6.8

**Tabelle 27: 1,5 M Tris pH 8,8**

Tris-HCl	23.6 g
ddH <sub>2</sub> O ad	100 ml
HCl	pH 8.8

**Tabelle 28: 10 % Ammoniumpersulfat (APS)**

Ammoniumpersulfat	1 g
ddH <sub>2</sub> O ad	10 ml

**Tabelle 29: 1x Elektrophorese Puffer**

Trisbase	3 g
Glycin	100 ml
SDS	1 g
ddH <sub>2</sub> O ad	1000 ml

**Tabelle 30: 5 x SDS-Lade Puffer**

1 M Tris-HCl pH 6.8	7 ml
Glycerol	3 ml
SDS	1 g
D,L-dithiotreitol (DTT)	0.93 g
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,1 ml
Bromophenol blue sodium salt	1.2 mg

**Tabelle 31: 1 x Transfer Puffer**

Trisbase	3 g
Glycine	14.4 g
Methanol	100 ml
ddH <sub>2</sub> O ad	1000 ml

**Tabelle 32: 1 x TBS/Tween 20**

Trisbase	2,42 g
NaCl	29,2 g
Tween 20	0,5 ml
ddH <sub>2</sub> O ad	1000 ml

**Tabelle 33: 5 % Block-Puffer**

non-fatty milk powder	5 g
TBST ad	100 ml

**Tabelle 34: Antikörper-Verdünnungspuffer**

TBST	100 ml
BSA	5 g

### 3.5.5 Stripping der PVDF Membranen

Zur erneuten Antikörper-Hybridisierung der PVDF-Membranen kann diese mit Hilfe eines Stripping-Protokolls von bereits gebundenen Antikörpern gereinigt werden. Dazu wurde die Membran kurz in ddH<sub>2</sub>O gespült und zwei Mal für 20 min bei 37 °C mit Stripping-Puffer gewaschen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für 5 Minuten folgten zwei Waschschritte mit TBST für jeweils 10 min und

das Blocken mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS Tween. Danach folgte das Protokoll wie unten beschrieben.

**Tabelle 35: Zusammensetzung des Stripping-Puffers**

Glycin	15 g
SDS	1 g
Tween20	10 ml
ddH <sub>2</sub> O	auf 1 l auffüllen
HCl	auf pH 2,2 einstellen

### 3.5.6 Färbung von Acrylamidgelen

Zur Kontrolle der Effizienz des Transfers und der Proteinbestimmung wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Dafür wurden die Gels, nach dem Transfer, ca. 1 h bei RT mit Coomassie-Brilliantblue-Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärbelösung geschwenkt. Bei der Entfärbung werden die Banden im Gel sichtbar. Man erreicht mit dieser Methode eine Nachweisempfindlichkeit von 1 µg bis 0,1 µg Protein.

**Tabelle 36: Coomassie-Färbelösung**

Coomassie-Brilliantblue R250	0,25 % (w/v)	2,5 g
Methanol	50 % (w/v)	500 ml
Essigsäure	10 % (w/v)	100 ml
ddH <sub>2</sub> O		auf 100 ml auffüllen

**Tabelle 37: Coomassie-Entfärbelösung**

<i>Methanol</i>	5 % (w/v)	50 ml
Essigsäure	10 % (w/v)	100 ml
ddH <sub>2</sub> O		auf 1 l auffüllen

### 3.5.7 Auswertung

Die Quantifizierung der Protein-Banden erfolgte mittels densitometrischer Auswertung des spezifischen Signals mit Hilfe des Programms Image Lab (ImageLab Software Version 5.0.1, Bio-Rad, München, Deutschland). Um die gleichmäßige Verteilung der Proteine auf den Membranen zu kontrollieren wurde als interne Ladungskontrolle GAPDH, Aktin, Cyclophilin  $\beta$  oder  $\beta$ -Tubulin verwendet. Zur Bestimmung und Kontrolle der Proteingröße wurde ein Molekulargewichtsmarker (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific (Fermentas), Rockford, USA, 26616) mitlaufen gelassen. Die Ergebnisse wurden an der jeweils zugehörigen Kontrolle normalisiert. Aus mindestens drei Experimenten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

## 3.6 Zellfärbungen

### 3.6.1 Immunzytochemie

Auf IBIDI-Glasplättchen kultivierte Zellen (Zelldichte: 40K Zellen/cm<sup>2</sup>) wurden einmal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die IBIDIs 15 Minuten mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in Phosphat Puffer fixiert. In der Folge wurden sie erneut zweimal mit PBS gewaschen und mit 0,3% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Geblockt wurden die IBIDIs mit einer Lösung aus 5% Ziegen Serum und 0,3% Triton-X-100 in PBS 30 Minuten lang bei RT. Die Inkubation mit Erstantikörperlösung wurde mit entsprechender Antikörperkonzentration (siehe Tabelle 3) über Nacht vorgenommen. Die Kulturen wurden dann wieder mit PBS gewaschen. Anschließend wurde zwei Stunden lang mit dem Sekundärantikörper, entweder mit anti-Maus- oder anti-Kaninchen-IgG, jeweils gekoppelt an das Fluorochrom Alexa Fluor 488, inkubiert. Für die Negativkontrollen wurde die Immunzytochemie ohne den Erstantikörper durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde an einem Leica-Fluoreszenzmikroskop (LEICA DMI600B) visualisiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgt mittels einer LEICA DFC 360 FX Kamera und Leica Application Suite F (LAS F) Software.

### 3.6.2 MitoTracker-Färbung

Die spezifische Färbung der Mitochondrien zwecks Kolokalisationsstudien wurde erreicht, indem die Zellen vor der Fixierung 30 min mit MitoTracker® DeepRed angefärbt wurden. Bei MitoTracker® Deep Red FM (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, M22426) handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der selektiv aktive Mitochondrien anfärbt. Der Farbstoff enthält eine thiolreaktive Chloromethylgruppe. Diese ermöglicht es, dass die Färbung auch nach einer Aldehyd-Fixierung und Permeabilisierung noch bestehen bleibt. Der Farbstoff absorbiert bei 644 nm und emittiert Licht einer Wellenlänge von 665 nm. Um die Mitochondrien anzufärben, wurden die LUHMES-Zellen auf IBIDs in einer Dichte von 3.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und für sechs Tage differenziert. Danach wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch Differenzierungsmedium mit Mitotracker in einer Endkonzentration von 300 nM ersetzt. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 20 Minuten in den Brutschrank zurück gestellt. Anschließend wurden die Wells kurz mit PBS gewaschen und mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in Phosphat Puffer fixiert.

**Tabelle 38: MitoTracker® DeepRed 50 µM Stammlösung**

<i>MitoTracker® DeepRed</i>	50 µg
DMSO	1,834 ml
Aliquotieren	
Bei - 20°C aufbewahren	

### 3.6.3 Kolokalisierung

Der Nachweis der Kolokalisation von SK-Kanälen und Mitochondrien erfolgte nach der spezifischen Färbung von sechs Tagen differenzierten LUHMES-Zellen. Zu diesem Zweck wurden 21 konfokale Z-Stack-Aufnahmen mit 63 X Objektiv (Wasserimmersion) pro Zellen aufgenommen. Die Analyse erfolgte anhand eines softwaregestützten Algorithmus. Dieser sieht zwei verschiedene Methoden vor (Fluoreszenzintensität oder Kolokalisierungsrate) und kann mit der Leica Application Suite F (LAS F Leica, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet werden. Die Überlagerung wurde mittels mindestens zweier Fluoreszenz-

Kanäle festgestellt. Für die Kolokalisierungsrate wurde zunächst die Hintergrundfluoreszenz und das Rauschen in den Einzelbildern zu 50 % und 25 % normalisiert und eine ROI (Region of Interest) von  $47,81 \mu\text{m}^2$  ausgewählt. Die Kolokalisierungsrate zeigt das Ausmaß der Überlagerung in % und wird aus dem Radius zwischen der Fläche der überlagerten Fluoreszenz-Signale und der Größe des Bildes berechnet. Die Bildpunkte mit Kolokalisation von MitoTracker und anti-SK-Antikörpern wurden als eigener Kanal dargestellt. Die Fluoreszenzintensität wurde mittels des Dye Separation Werkzeug der Software gemessen.

### **3.6.4 Neuronales Netzwerk**

Die Vermessung des neuronalen Netzwerkes wurde mit Hilfe der frei zugänglichen Bildanalysesoftware ImageJ (U.S. National Institutes of Health, MD, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>) durchgeführt. Das Plugin Neurite Tracer diente der Auswertung nach einem Protokoll von Pool u. a. (2008). Um die Neuriten zu visualisieren wurde die LUHMES-Zellen mit einer Zelldichte von 60 000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf IBIDIs ausplattiert, differenziert und nach sechs Tagen mit einem Antikörper gegen DAT gefärbt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops (DMI 6000 B, Leica, Wetzlar, Deutschland) visualisiert und die Bilder mit einer CCD-Kamera (DFC 360 FX, Leica, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen. Die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI wurde zum Nachweis der Integrität der Zellen benutzt.

## **3.7 Analyse von mitochondrialen Proteinen**

### **3.7.1 Isolierung der mitochondrialen Fraktion von Neuronen**

Zur genauen Determination der Lokalisation endogener Proteine wurden die Mitochondrien über differentielle Zentrifugation nach einer abgewandelten Methode von Mootha et al. (2003) isoliert und angereichert. Die Methode erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation in Abhängigkeit der verschiedenen Masseschichten der einzelnen Zellkompartimente. Zu diesem

Zweck wurden 10 Mio. Zellen in 175 cm<sup>2</sup> Flaschen ausgesät und differenziert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml MI-Puffer lysiert. Das entstandene Homogenat wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend erfolgte die erste Zentrifugation bei 830 × g für 10 Min. bei 4°C. Der Überstand (S1) wurde gesammelt und in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt. Das Pellet wurde in 0,5 ml MI-Puffer (siehe Tabelle 37) erneut homogenisiert und zentrifugiert. Der entstandene Überstand (S2) wurde gesammelt und mit (S1) zusammengefügt und bei 16.800 x g für 10 min (sedimentiert). Anschließend wurde das Pellet zweimal mit 50 µl MI-Puffer II (siehe Tabelle 38) gewaschen (800 x g für 10 Min.) und in 50 µl MI-Puffer I gelöst. Der Proteingehalt wurde mit dem BCA-Test gemessen und die Proben bei -20°C gelagert.

**Tabelle 39: Mitochondrienisolationspuffer I (MI-Puffer I)**

Sucrose 250 mM	4,279 g
HEPES 20 mM	0,2383 g
EDTA 3 mM	0,0558 g
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 ml aufgefüllt
HCL	auf pH 7,5 einstellen
Frisch ansetzen	
Proteaseinhibitor	1 Tablette je 10 ml
Phosphataseinhibitor	1 Tablette je 10 ml

**Tabelle 40: Mitochondrienisolationspuffer II (MI-Puffer II)**

Tris-HCL	10 mM
NaCl	100 mM
auf pH 7,6 einstellen	

### 3.7.2 Mitochondrienisolation aus Mausgehirn

Mitochondrien wurden über differentielle Zentrifugation nach dem Protokoll von Zischka et al. (2008) isoliert. Frisch isoliertes Mäusegewebe wurde zerkleinert und in einen gekühlten Potter-Elvehjem Glas-Teflon-Homogenisator überführt. Ein ml Mitochondrienisolationspuffer (siehe Tabelle 39) wurde zugegeben. Das Gewebe wurde anschließend mit ca. 20 Stößen homogenisiert. Das resultierende Homogenat wurde zweimal für 10 Minuten bei 750 x g

zentrifugiert, um Zellreste zu pelletieren. Das Mitochondrienpellet wurde dann bei 9'000 x g für 10 Min. zentrifugiert und von anderen Organell-Fractionen durch dreimaliges Waschen (einmal bei 9'000 x g und zweimal bei 15'000 x g) befreit. Das Mitochondrienpellet wurde in FFE-Puffer (siehe Tabelle 40) resuspendiert. Bei den Mitochondrienisolationen wurden alle Schritte bei 4°C durchgeführt. Die verwendeten Tubes und Zentrifugen wurden ebenfalls auf 4°C vorgekühlt.

**Tabelle 41: Mitochondrienisolationpuffer**

Triethanolamin (TEA)	10 mM
Essigsäure	10 mM
Sucrose	280 mM
EGTA	0,2 mM
KOH	auf pH 7,4 einstellen

**Tabelle 42: FFE-Puffer**

TEA	10 mM
Essigsäure	10 mM
Sucrose	280 mM
KOH	auf pH 7,4 einstellen

### 3.7.3 Messung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ )

Das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\psi_m$ ) in den LUHMES-Zellen wurde bestimmt durch Messung des DiOC6(3) Fluoreszenzfarbstoffs (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, D273). Membranpotential aus Mitochondrienmembran (Liposomen) und aus isolierten Mitochondrien des Mausgehirns wurde mit Hilfe von Rhodamine-123 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, R-302) analysiert. Bei beiden Methoden korreliert das Ausmaß des Fluoreszenzsignals linear mit dem Membranpotential. In den Mitochondrien wird kationische lipophile Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-123 aufgenommen und sammelt sich in der mitochondrialen Matrix (Baracca u. a., 2003). Je höher die Zerstreung des  $\Delta\psi_m$ , desto mehr Rhodamine 123 kann in die Matrix aufgenommen werden. Die Depolarisation des  $\Delta\psi_m$  führt zu einer erhöhten Fluoreszenz, wenn Rhodamine 123 von den Mitochondrien ins

Cytoplasma abgespalten wird (Perry u. a., 2011). 50-100  $\mu\text{g}$  Mitochondrien wurden mit 20 nM DIO6(3) inkubiert und mit 25  $\mu\text{M}$  des SK-Aktivator NS309 behandelt. Nachdem eine maximale Fluoreszenz-Abnahme erreicht worden war, wurde zur positiven Kontrolle bis zum vollständigen Abbau des Membranpotentials ( $\Delta\psi\text{m}$ ) 10 $\mu\text{M}$  CCCP oder FCCP zu den Mitochondrien zugegeben. ( $\Delta\psi\text{m}$ ) wurde mit einem Mikrotiterplattenlesegerät (Fluostar Optima, BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland) und mit der Software Omega Version 1.10 (BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland) ausgewertet. Die Experimente wurden als Triplicate-Bestimmung durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse der letzten drei unabhängigen Versuche. Bei diesen Experimenten hat Amalia Dolga ebenfalls Messungen durchgeführt.

### **3.8 Statistische Methoden**

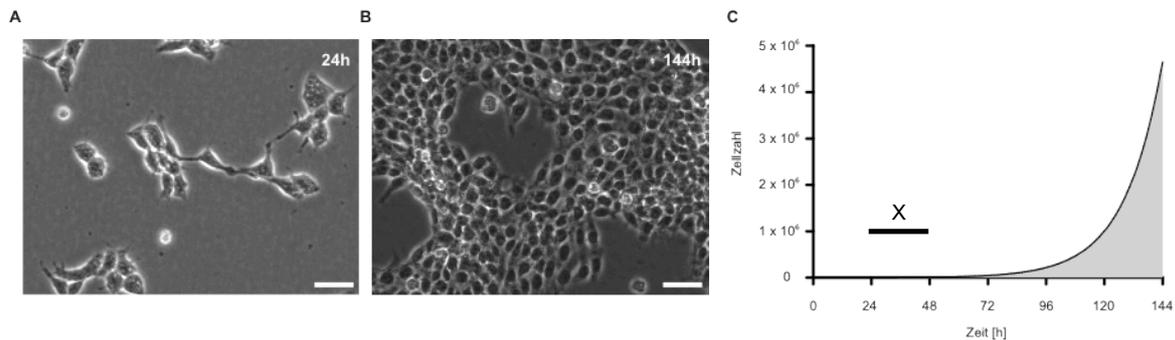
Sämtliche Experimente wurden mindestens dreimal in unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Für die statistische Auswertung benutzten wir GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $\sigma$ ) dargestellt. Die Signifikanz zwischen den Gruppen wurde durch eine Varianzanalyse (ANOVA) und anschließend mit einem Post-hoc Scheffé-Test bestimmt. Ein P-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung des Zellmodells

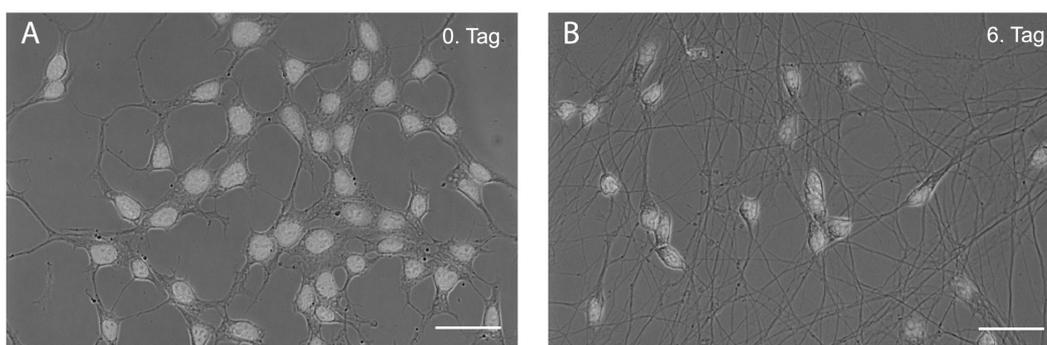
### 4.2 Wachstumsverhalten

Die Wachstumseigenschaften der LUHMES-Zellen wurden unter Proliferationsbedingungen durch eine Wachstumskurve charakterisiert. Dazu wurden die Zellen über einen Zeitraum von fünf Tagen zu verschiedenen Zeitpunkten gezählt. Die Graphik in Abbildung 6 zeigt die Eigenschaften der Zellvermehrung der LUHMES-Zellen in diesem Zeitraum. Die Auswertung ergab für die LUHMES-Zellen eine durchschnittliche Verdopplungszeit von 20,2 h. Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen früheren und späteren ( $\leq 30$ ) Passagen und auch ein Effekt der Stickstoffeinlagerung über die Zellverdoppelungszeit wurden nicht beobachtet. Im undifferenzierten Zustand wuchsen die LUHMES-Zellen als „Monolayer“ und zeigten eine kontaktvermittelte Inhibition der Proliferation nach Erreichen von ca. 100 % Konfluenz. Diese führte zu einer vollständigen Ablösung des Zellteppichs nach fünf Tagen Kultivierung.



**Abb. 6: Wachstumsverhaltender LUHMES-Zellen.**

Abgebildet ist die Wachstumskurve der LUHMES Zellen auf PLL-beschichteten  $\varnothing$  60 mm Petrischalen. Verwendet wurde DMEM/F12 Medium mit 1% N2 Supplement und 0,04  $\mu\text{g/ml}$  bFGF. Die Veränderung der Zellzahl wurde unter dem Lichtmikroskop mittels einer Neubauer-Zählkammer über einen Zeitraum von 6 Tagen (144 h) bestimmt; (n=3). In (A) sind Phasenkontrast-Aufnahmen der Zellen 24 h nach dem Einsäen dargestellt. Nach 144 h waren die LUHMES Zellen auf den Schalen konfluent gewachsen (B) und signifikant kleiner als nicht konfluente LUHMES Zellen. Die Grafik in (C) zeigt das Wachstumsverhalten der LUHMES Zellen mit einer Regressionskurve; X markiert die Populationsverdopplungszeit in 24 h von 17 949 (SD $\pm$  2029) Zellen auf 42602 (SD $\pm$ 3869) Zellen. Es wurde keine Plateauphase beobachtet, nach 6 Tagen haben sich die Zellen vollständig abgelöst. Der Maßstabsbalken in A,B beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

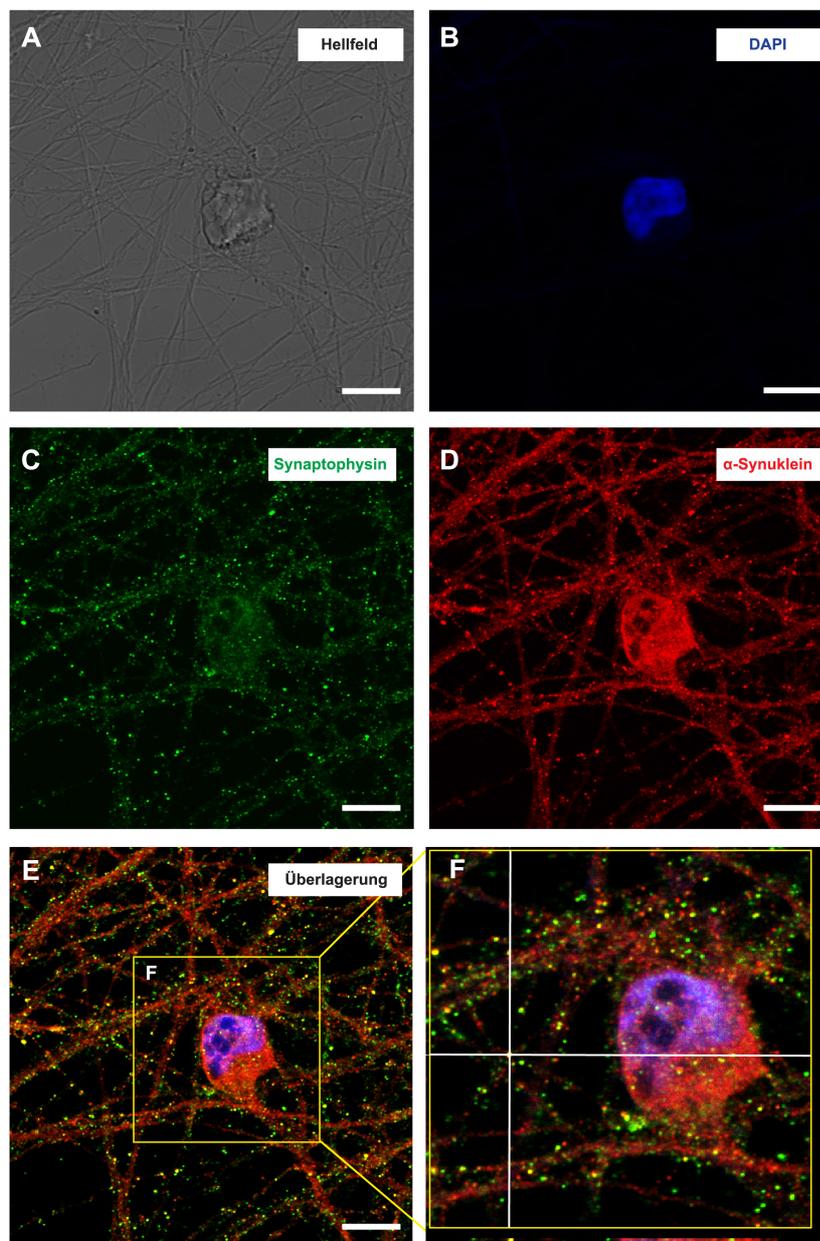


**Abb. 7: LUHMES-Zellen lassen sich zu Neuronen differenzieren.**

Lichtmikroskopische Aufnahmen undifferenzierter (A) und 6 Tage mit Tetracyclin / dibutyryl-cAMP/ GDNF differenzierter (B) LUHMES-Zellen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (weiss) sichtbar gemacht. Der Maßstabsbalken beträgt 25  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2.1 Veränderung der Zellmorphologie nach Tetracyclin-kontrollierter Differenzierung**

Im undifferenzierten Zustand zeigen die Zellen vorwiegend ein rundes bis polygonales Erscheinungsbild mit kurzen Neuritenfortsätzen (Abbildung 7). Unter Differenzierungsbedingungen haben sich die LUHMES-Zellen morphologisch zu neuronähnlichen Zellen mit starkem radialförmigen Neuritenwachstum (Abbildung 7) entwickelt, in denen positive Färbung für alpha-Synuclein in Synapsen zu detektieren ist (Abbildung 8). Das Neuritenwachstum wurde mit drei immunocytochemischen Färbungen nachgewiesen und durch das Bildanalyseprogramm ImageJ ausgewertet.

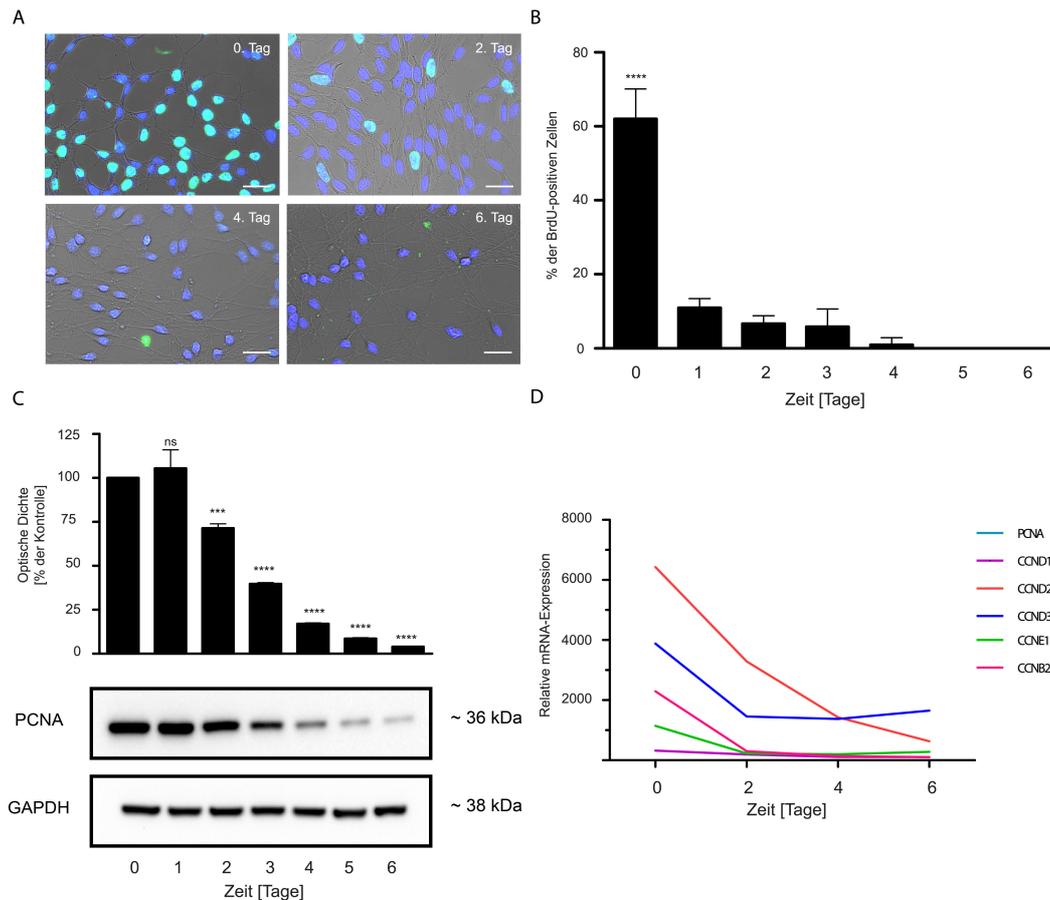


**Abb. 8: Lokalisation von  $\alpha$ -Synuklein und Synaptophysin in ausdifferenzierten LUHMES Zellen.**

Dargestellt sind Hellfeld- und Konfokalmikroskop-Ansichten der repräsentativen Zellen erzeugt mittels konfokaler z-Stack Schnittaufnahmen. Hellfeldmikroskopische Aufnahmen (A), DAPI-Zellkernfärbung (B), Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -Synuklein (C) sowie gegen Synaptophysin (D) zeigen, die (E) Kolokalisierung beider Fluoreszenzen. Auf (F) ist die Vergrößerung des gelben Rahmens aus (E) dargestellt. Die Maßstabsbalken betragen 10  $\mu$ m.

#### **4.2.2 Nach der Differenzierung werden LUHMES-Zellen postmitotisch**

Adulte funktionelle Neuronen sind postmitotische Zellen. Diese Charakteristik ist wichtig für ein neuronales Zellmodell. Die Proliferationsraten der LUHMES-Zellen wurden durch drei unabhängige Methoden (BrdU-Einbau-Test, Expression von PCNA (Mitose-assoziiertes Protein) und Genexpressionsanalyse) ermittelt. Die Teilungsaktivität der LUHMES-Zellen ist nach wenigen Tagen der Differenzierung stark reduziert. Die Inkorporation des Thymidinanalogon BrdU in nukleäre DNA verringerte sich schon nach fünf Tagen der Differenzierung (Abbildung 9) von ~60% auf 0%. Ab diesem Zeitpunkt waren die Zellen also mitotisch inaktiv geworden. Die Western Blot-Analyse der Expression des proliferationsassoziierten nukleären Zell-Antigens (Abbildung 9) und die Expressionsmuster verschiedener Protoonkogene der Cyclinfamilie (Abbildung 9) zeigen ebenso übereinstimmend, dass die LUHMES-Zellen nach der Differenzierung postmitotisch geworden waren.



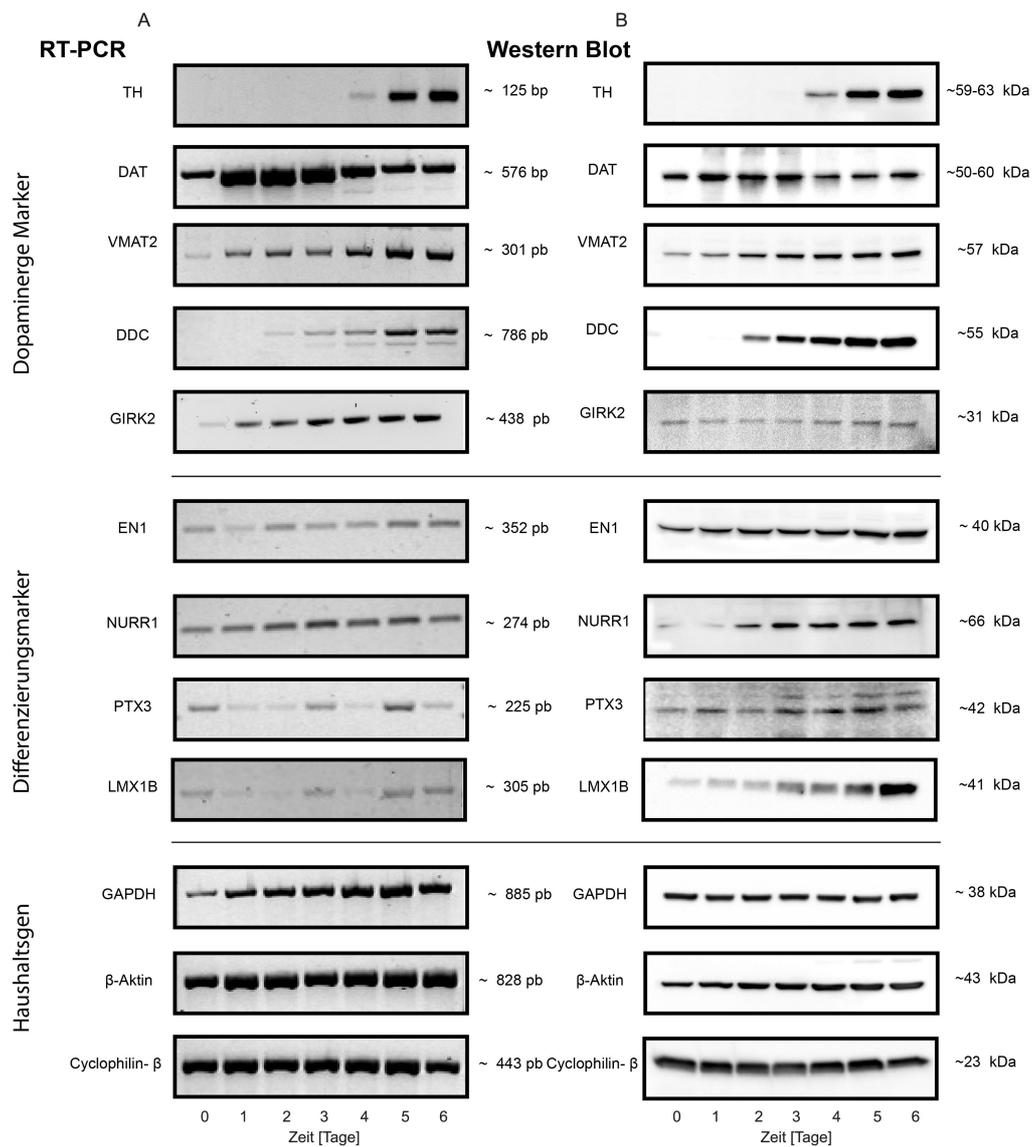
**Abb. 9: Die Differenzierung der LUHMES-Zellen in menschliche post-mitotische dopaminerge Neurone.**

(A) Nach dem Wechsel von Proliferations- zu Differenzierungsmedium wurde der Prozentsatz der proliferierten LUHMES-Zelle, durch den Einbau von Thymidin-BrdU (grün) in ihre Kern-DNA (DAPI, blau) während der Mitose identifiziert. (B) zeigte eine progressive Verringerung von ~ 60% an Tag Null (0) auf 0% am Tag Fünf (5) und Sechs (6); Zu beachten ist das gleichzeitige Wachstum eines umfangreichen neuritischen Netzwerks von Tag Null (0) zu Tag Sechs (6) in der Hellfeld-mikroskopischen Aufnahme. (C) Die Western-Blot-Analyse der LUHMES-Zellen zeigt die progressive Reduktion des Zellproliferationsmarkers PCNA von Tag Null (0) zu Sechs (6) der Differenzierung. (D) Die mRNA-Chip-Analyse der LUHMES-Zellen von Tag Null (0) zu Sechs (6) der Differenzierung demonstriert die progressive Reduktion der mitotischen Proliferationsmarker. Abkürzungen sind Entrez Gen-Namen. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Tag Null (0), ANOVA mit anschließendem post-hoc Scheffé-Test.

### **4.2.3 Analyse der Expression spezifischer neuronaler und nicht-neuronaler Marker in differenzierten LUHMES-Zellen**

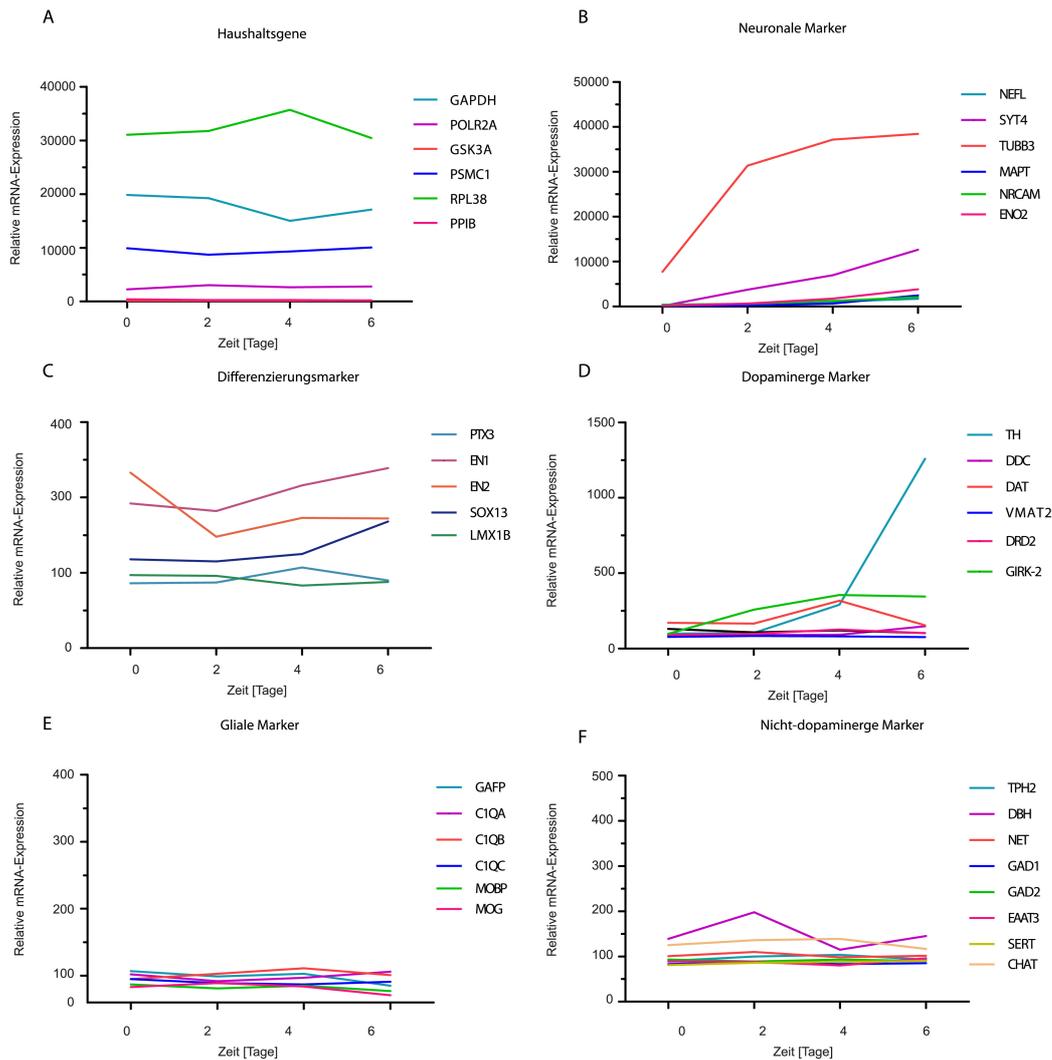
Die Differenzierung wirkt sich nicht nur auf die Morphologie und die Teilungsaktivität der LUHMES-Zellen, sondern auch auf das Expressionsmuster unterschiedlicher neuronaler Marker aus. Es wurden undifferenzierte Zellen (Tag 0) und anschließend differenzierte Zellen vom ersten bis zum sechsten Tag mit neuronalen und dopaminergen Expressionsmarkern untersucht. Marker für reife dopaminerge Neuronen sind Proteine, die eine direkte Beziehung zur Biosynthese des Neurotransmitters Dopamin oder der Ontogenese der dopaminergen Differenzierung haben (Zeng u. a., 2004). Zu diesem Zweck wurde mittels RT-PCR, Affymetrix Expressions-Chipanalyse, Western Blotting und Immunocytochemie die Expression von Proteinen wie TH, DAT und DDC in LUHMES Zellen überprüft. Andere Marker, die ebenfalls eine Bedeutung für die Entwicklung und Differenzierung der dopaminergen Zellen haben, wurden außerdem untersucht. Die Ergebnisse von RT-PCR (Abbildung 10) und Affymetrix-Analysen (Abbildung 11) zeigen eine Zunahme der neuronalen, insbesondere der dopaminergen Marker während des Differenzierungsprozesses. Nicht-dopaminerge Marker verblieben auf niedrigem Niveau. Ebenfalls konnte auf Proteinebene mittels Western Blot ein ähnliches Expressionsmuster nachgewiesen werden (Abbildung 10). Die Marker-Expression wurde auch mit Hilfe der Immunocytochemie untersucht, bei der die Bildaufnahmen eine gleichmäßige Verteilung der Marker innerhalb der Zellpopulation zeigten (Abbildung 12).

Bei kombinierter Immunfluoreszenzfärbung für  $\alpha$ -Synuclein und Synaptophysin zeigt sich eine Kolo-kalisierung von beider Proteine.



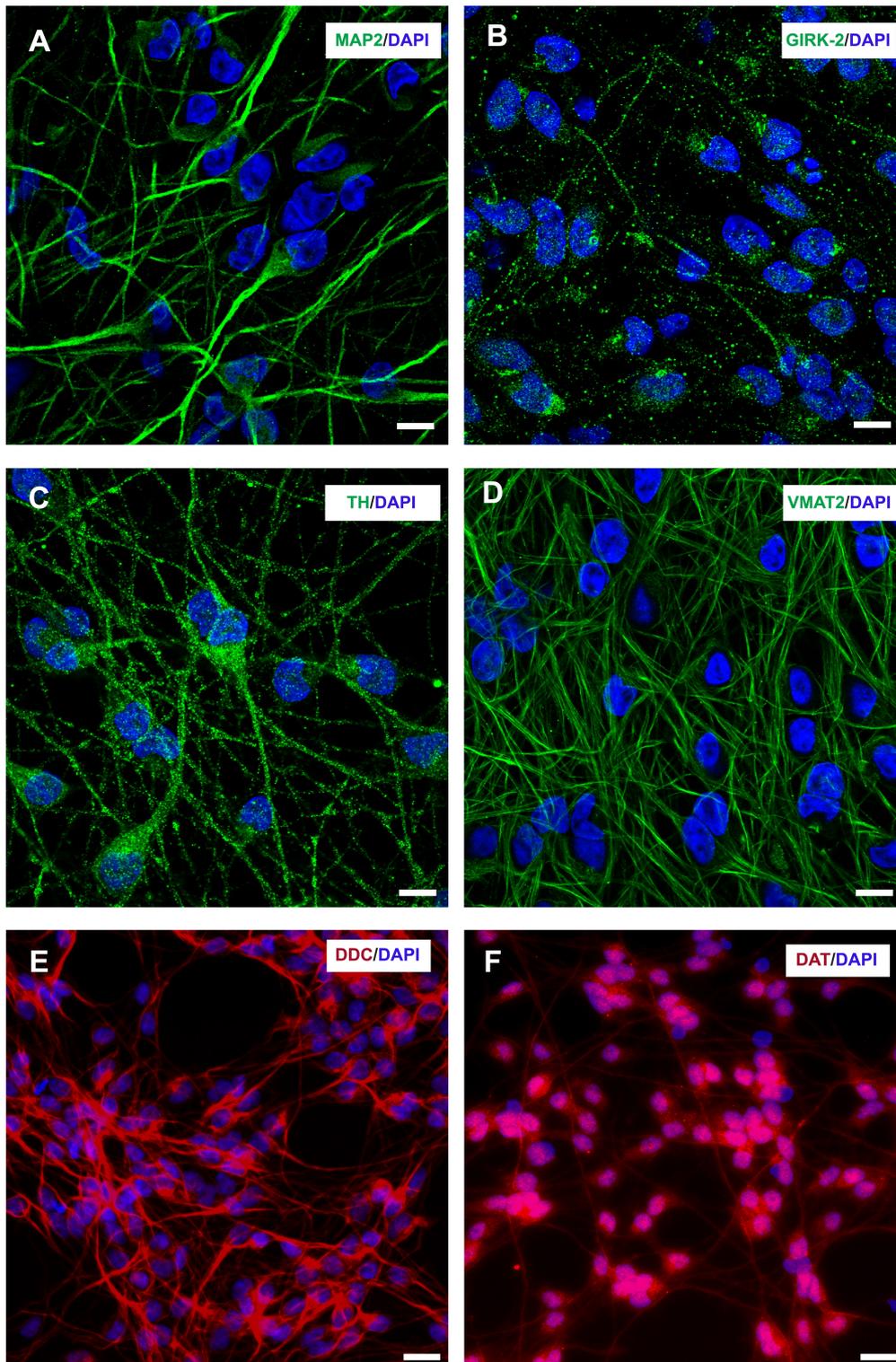
**Abb. 10: Differenzierte LUHMES-Zellen exprimieren spezifische neuronale dopaminerge Marker.**

Dargestellt ist das Expressionsmuster von verschiedenen Charakterisierungs-Markern auf der (A) mRNA- und (B) Protein-Ebene, dargestellt mittels Semi-quantitativer RT-PCR Analyse und Western Blot in LUHMES Zellen vom undifferenzierten Zustand am Ende der Wachstumsphase Tag Null (0) und vom 1. bis zum 6. Tag der Differenzierungsphase. Die Befunde werden anhand ausgewählter Beispiele illustriert.



**Abb. 11: LUHMES-Zellen exprimieren für dopaminerge Neuronen spezifische Markergene.**

Gezeigt wird der Expressionsverlauf der Gene mithilfe von Affymetrix-Chipanalysen aus LUHMES-Zellen für die funktionellen Gruppen: Haushaltsgene, neuronale Marker, Differenzierungsmarker, dopaminerge Marker, gliale Marker und nicht-dopaminerge Marker. Das Expressionsprofil wurde in einer Zeitkinetik innerhalb der ersten 6 Tage nach Beginn der Differenzierung dargestellt.



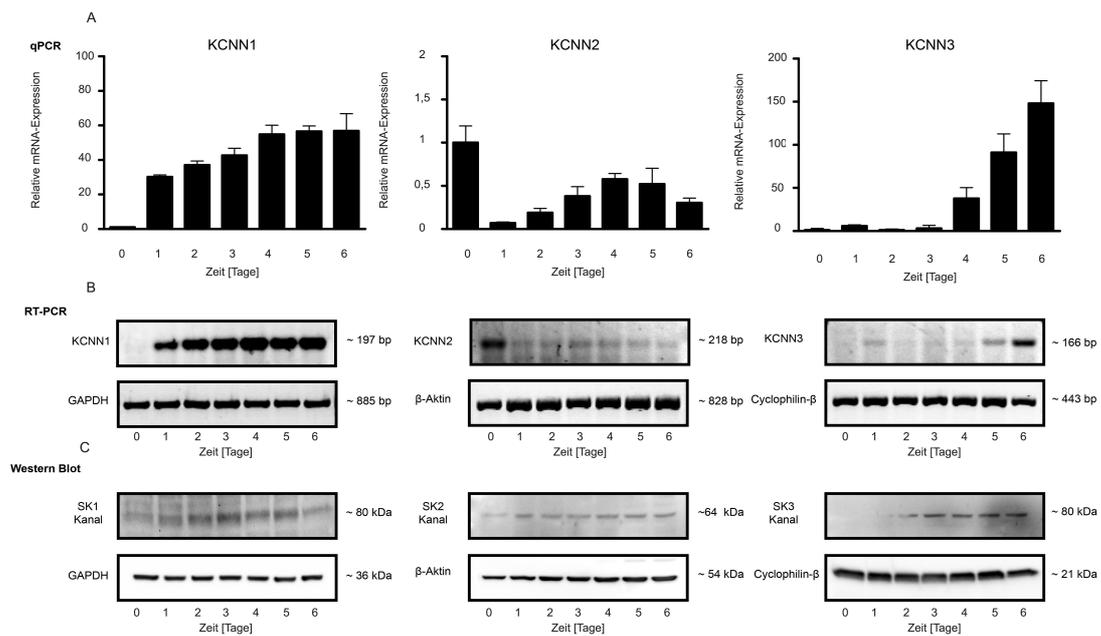
**Abb. 12: Differenzierte LUHMES-Zellen zeigen neuronal-dopaminergen Charakter**

Die Immunocytochemie von LUHMES-Zellen zeigt nach sechs Tagen Differenzierung eine homogene Expression von neuronalen [MAP2 (grün)] und dopaminergen Markern [DAT, DDC (rot); TH, VMAT2, GIRK2 (grün)]; DAPI-Kernfärbung (blau). Die Maßstabsbalken stellen 10 μm dar.

### 4.3 Expression der SK-Kanäle in LUHMES-Zellen

Die Expression der Untereinheit der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen aktivierten  $\text{K}^+$  Kanäle, also SK1, SK2 und SK3, wurden zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten in LUHMES-Zellen detailliert untersucht. Mittels RT-PCR und quantitativer PCR konnten wir zeigen, dass alle drei Kanäle-Untereinheiten, jedoch in unterschiedlichen Mengen und zeitlichen Mustern, exprimiert werden (Abbildung 13).

Die SK1-Kanal-Expression war über sechs Tage Differenzierung im Vergleich zu GAPDH, Aktin und Cyclophilin- $\beta$  hochreguliert, während diejenige der SK2 herunterreguliert war. Die SK3-Kanal-Expression dagegen war erst ab dem vierten Tag hochreguliert. Diese Ergebnisse wurden durch Western-Blot-Analyse bestätigt (Abbildung 13) und sind in Übereinstimmung mit den beschriebenen Expressionsmustern der SK-Kanäle auf der Proteinebene in dopaminergen Neuronen (Deignan u. a., 2012).



### Abb. 13: LUHMES-Zellen exprimieren $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kaliumkanäle (SK-Kanäle)

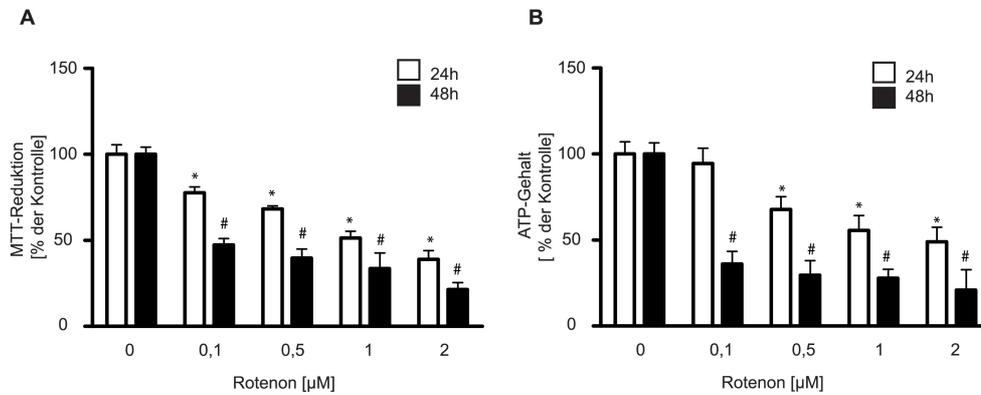
Das Expressionsprofil der SK-Kanäle wurde in einer Zeitkinetik innerhalb der ersten 6 Tage nach Anfang der Differenzierung untersucht. Die Expression der Untereinheiten der SK-Kanäle (SK1/ KCNN1; SK2/ KCNN2; SK3/ KCNN3) ist auf Bild (A) als quantitative PCR, auf Bild (B) semi-quantitative RT-PCR und auf Bild (C) mit Western Blot dargestellt. Die qPCR Analyse wurde durch ein TaqMan Primer/Proben Verfahren durchgeführt. 50 ng cDNA wurde als Vorlage für diese Reaktion benutzt.

### **4.3.1 Rotenon-Sensitivität in differenzierten humanen dopaminergen Neuronen.**

Als nächstes wurde die Sensitivität von differenzierten LUMES-Zellen gegenüber dem Komplex I-Inhibitor Rotenon charakterisiert. Eine Exposition mit Rotenon (0,1-0,5  $\mu\text{M}$ ) rief Konzentrations- als auch Zeit-abhängige toxische Effekte in den dopaminergen Zellen hervor, die mittels eines MTT-Tests und ATP-Messungen (Abbildung 14) quantifiziert wurden. Die Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  ergab eine signifikante Reduktion des MTT-Metabolismus um ca. 50%, ebenso eine Einschränkung des ATP-Spiegels nach 48 h Behandlung und wurde somit für die weiteren Experimente benutzt.

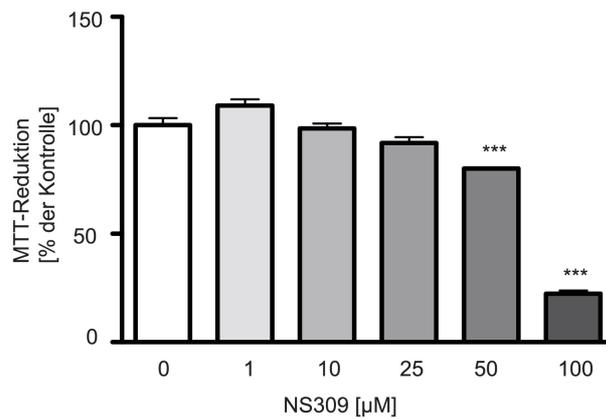
### **4.3.2 Toxizität des NS309 Kanal-Aktivators in differenzierten humanen Zellen.**

Um die Wirkung der SK-Kanal-Aktivierung auf die Rotenon-Toxizität zu analysieren, wurden differenzierte LUMES-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von NS309 (10-75  $\mu\text{M}$ ) behandelt, einem pharmakologischen Aktivator für SK-Kanäle (Strøbaek u. a., 2004). Konzentrationen höher als 50  $\mu\text{M}$  induzierten den Zelltod in LUHMES-Zellen (Abbildung 15). Basierend auf diesen Experimenten haben wir NS309-Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  für weitere Experimente gewählt, obwohl NS309 bei dieser Konzentration vollständig die SK-Kanäle aktiviert (Strøbaek u. a., 2004). Auf Grund der Instabilität von NS309 entschieden wir uns für eine Konzentration höher als die mittlere effektive Konzentration ( $\text{EC}_{50}$ ) (Jørgensen u. a., 2013). Die Behandlung der dopaminergen Neuronen dauerte bei diesen Experimenten 24 bis 48 Stunden.



**Abb. 14: Rotenon induziert Zeit- und Konzentrations-abhängigen Zelltod in LUHMES-Zellen**

(A) Sechs Tage ausdifferenzierte LUHMES Zellen wurden für 24 und 48h h mit Rotenon inkubiert und einem MTT-Test unterzogen. (B) Relativer ATP-Gehalt wurde nach 24 und 48h Behandlung mit Rotenon analysiert. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Rotenon inkubiert, anschließend wurde der ATP-Gehalt mittels ATP-Lumineszenz-Assays bestimmt. Der Wert der Kontrollgruppe (unbehandelte Kulturen) wurde gleich 100 % gesetzt. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrollen bei 24h, #  $p < 0,05$  vs. Kontrollen bei 48h, ANOVA mit anschließendem post-hoc Scheffé-Test.



**Abb. 15: Konzentrations-Toxizitäts-Verhältnis in LUHMES-Zellen nach Inkubation mit Kanal-Modulator NS309**

Die während sechs Tagen differenzierten LUHMES-Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe von 0 - 100 µM des SK-Kanal-Aktivators NS309 für 48 Stunden inkubiert. Das Zellüberleben wurde mit dem MTT-Assay bestimmt und in Prozent der unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Die Balken der Grafik repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Versuchen. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Kontrollen, ANOVA mit anschließendem post-hoc Scheffé-Test.

### **4.3.3 Aktivierung der SK-Kanäle verhindert Rotenon-induzierten Zelltod und Auflösung des neuronalen Netzwerks.**

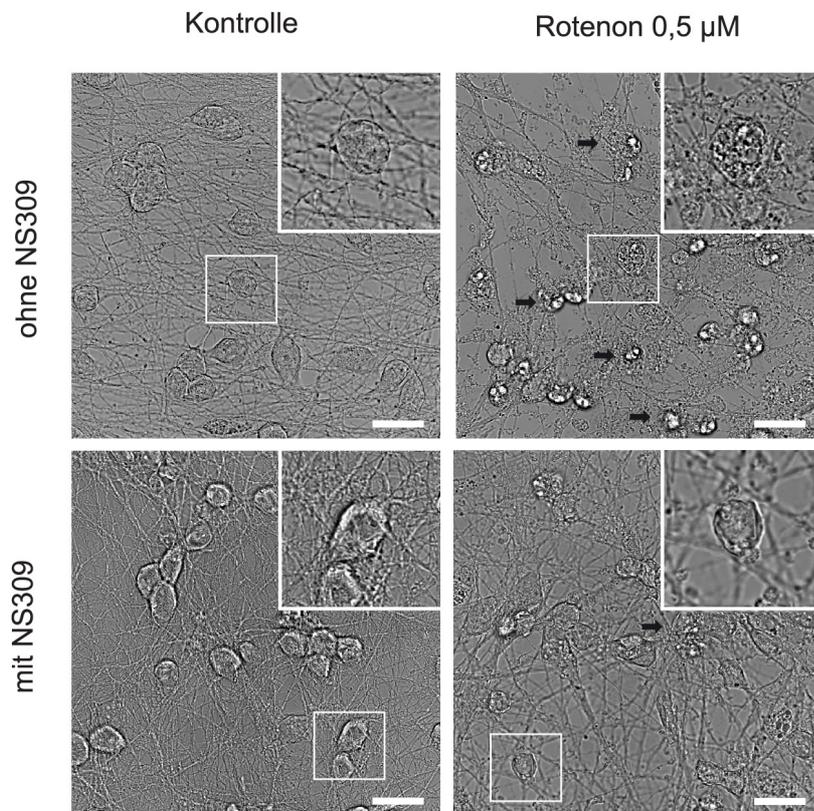
Um festzustellen, ob die SK Kanal-Aktivierung mit dem Überleben der dopaminergen Zellen in Verbindung steht, wurde der SK Kanal-Aktivator NS309 unter den Bedingungen der Rotenon-Toxizität getestet. Die dopaminergen Neurone wurden mit Rotenon (0,5  $\mu\text{M}$ ) über 24 Stunden hinweg in Gegenwart oder in Abwesenheit des SK-Aktivators NS309 inkubiert. Die Anwendung des SK-Kanal-Aktivators begünstigte das Überleben von dopaminergen Zellen, die mit Rotenon behandelt wurden, wie durch Analyse hellfeldmikroskopischer Aufnahmen (Abbildung 16) und der DAPI-Kernfärbung (Abbildung 17) bestätigt werden konnte. Die neuronale Lebensfähigkeit wurde quantifiziert, indem die Anzahl der gesunden, nicht fragmentierten DAPI-gefärbten neuronale Kerne nach der Exposition an Rotenon in Gegenwart oder Abwesenheit von NS309 (Abbildung 17) ausgezählt wurden.

Anschließend wurde die Auswirkung der SK-Kanal-Aktivierung auf das neuronale dopaminerge Netzwerk untersucht. Die Beschädigung des neuronalen Netzwerks wurde als ein zentraler Indikator für die Entwicklung einer Reihe von verschiedenen menschlichen ZNS-Erkrankungen (Medana & Esiri, 2003) erkannt. Um den Abbau des neuronalen Netzwerks zu quantifizieren, erfolgte die Verwendung des Bildbearbeitungsprogramms Image J mit NeuriteTracer-Plugin (Pool u. a., 2008). Mit diesem Plugin analysierten wir den Neuritaufbau von fluoreszenzmarkierten LUHMES-Zellen, die mit Antikörper gegen Dopamin-Transporter (DAT) gefärbt wurden. Nach 24 Stunden der Rotenon-Exposition (0,5  $\mu\text{M}$ ) verloren die Zellen die typische Organisation der Neuriten und das Netzwerk seine organisierte Erscheinung, die unter Kontroll-Kulturen-Bedingungen zu beobachten ist. Stattdessen erschien das neuritische Netzwerk fragmentiert und die neuronalen Prozesse abgebaut. Diese neue morphologische Struktur mit kleinen stummelförmigen Fortsätzen ist schon in früheren Stadien des Rotenon-induzierten Netzerfalles zu beobachten (Abbildung 18).

Die Quantifizierung des dopaminergen neuronalen Netzwerks bestätigte, dass Rotenon starke Schäden an der neuronalen Netzwerkdicke (Abbildung 18) auslöst. Die Behandlung mit NS309 bewahrt hingegen die dopaminerge Netzdicke.

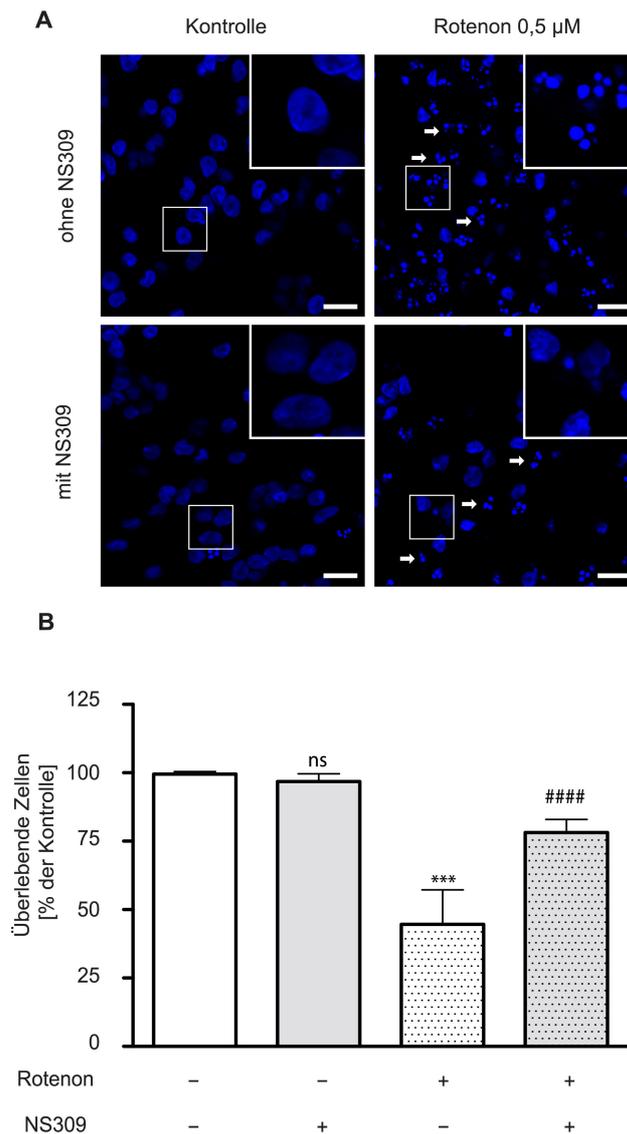
#### **4.3.4 Die Blockade von SK-Kanälen antagonisiert die Neuroprotektion gegenüber der Rotenon-Toxizität in menschlichen dopaminergen Zellen.**

Das MTT und die cytoplasmatische ATP-Analyse, die nach einer 48 Stunden langen Behandlung mit Rotenon durchgeführt wurde, zeigte, dass sich mit NS309 die Rotenon-Toxizität bei dopaminergen Neuronen (Abbildung 19) abgeschwächt hatte. Die Selektivität des NS309-Effekts wurde durch den sehr spezifischen SK-Kanal-Blocker Apamin (Stocker, 2004) bestätigt: Unter diesen Bedingungen blockierte Apamin die neuroprotektive Wirkung von NS309 in kultivierten dopaminergen Zellen (Abbildung 19) vollständig. Die Aktivierung des SK-Kanals für das Überleben der dopaminergen Zellen ist somit unter den Bedingungen der Rotenon-Toxizität essenziell.



**Abb. 16: Aktivierung der SK-Kanäle verhindert Zelltod und neuronalen Netzerfall.**

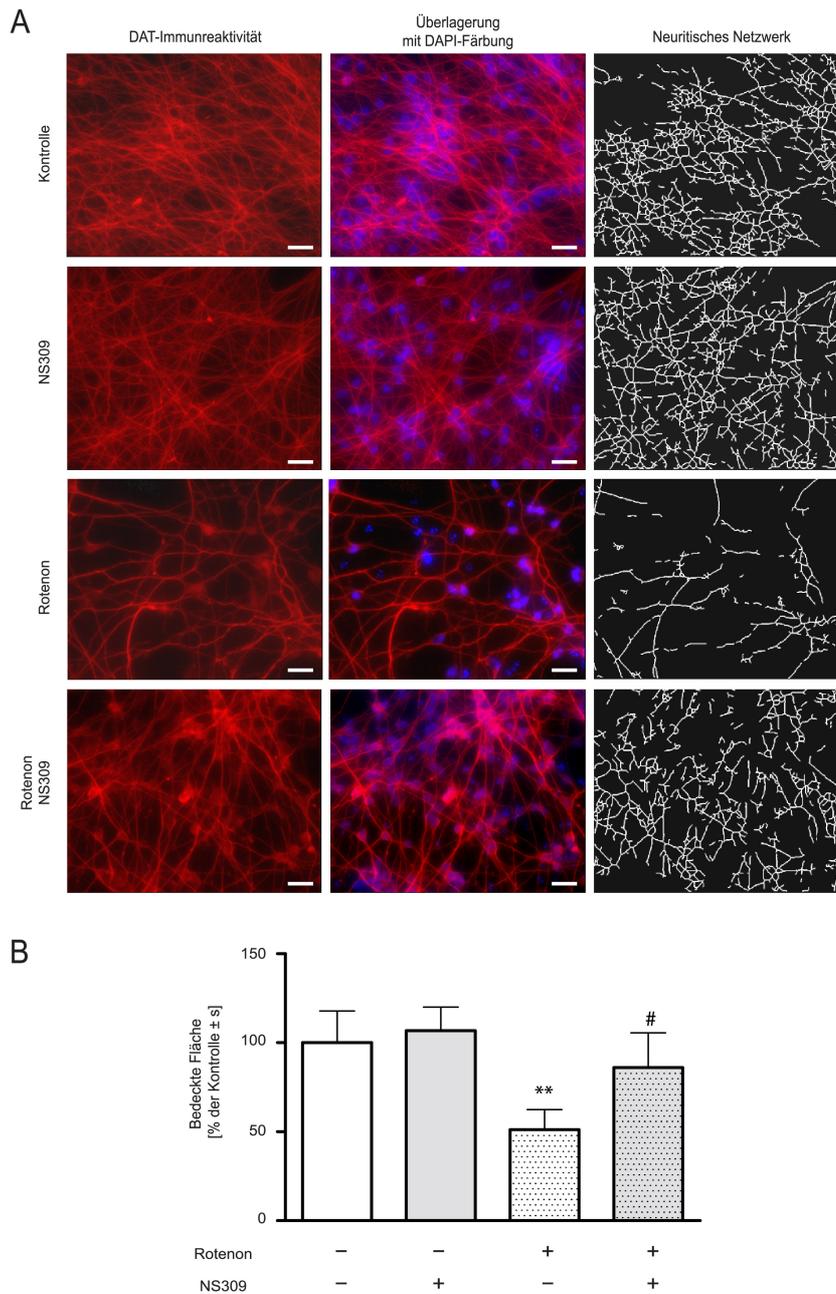
Dargestellt sind Hellfeld-mikroskopische Aufnahmen der repräsentativen Zellen. LUHMES-Zellen wurden nach sechs Tagen Differenzierung für 48 h mit 0,5  $\mu\text{M}$  Rotenon, 50  $\mu\text{M}$  NS309 oder beiden inkubiert. Rotenon-behandelte Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe ein zerstörtes neuritisches Netzwerk und starken Zelltod (schwarze Pfeile). Beide Phänomene wurden durch Behandlung mit NS309 verhindert. Der Ausschnitt oben rechts in jedem Bild stellt die Vergrößerung des weißen Rahmens dar. Die Maßstabsbalken betragen 20  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 17: Zytoprotektive Wirkung von NS309 nach einer 48 h Behandlung mit Rotenon .**

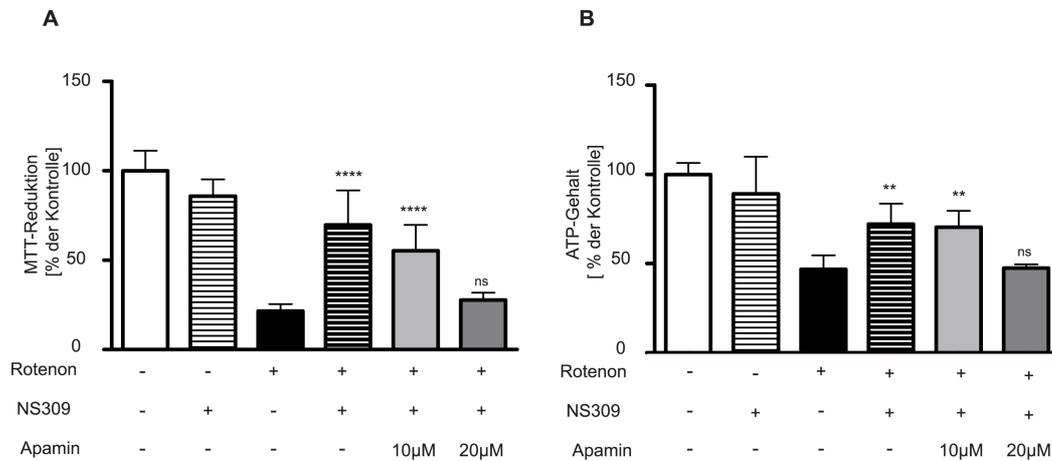
(A) Die Bilder sind konfokalmikroskopische Aufnahmen von LUHMES-Zellkernen nach Anfärbung der DNA mit DAPI. Kondensiertes Chromatin in apoptotischen Zellen ist leuchtend blau gefärbt. Die Pfeile deuten auf apoptotische Zellen hin. Differenzierte LUHMES-Zellen wurden mit 0,5  $\mu$ M Rotenon in Anwesenheit oder Abwesenheit von 25  $\mu$ M NS309 für 48h h behandelt. Die Ausschnitte oben rechts in den Bildern sind jeweils die Vergrößerung des weißen Rahmens.

(B) Zur Quantifizierung wurden Zellen mit kondensierten Kernen gezählt. Zu sehen ist der prozentuale Anteil der Zellen mit kondensierten und fragmentierten Kernen aus der Gesamtheit der Zellen. Die Signifikanz zwischen den Gruppen wurde durch eine ANOVA (analysis of variance) mit anschließendem post-hoc Scheffé-Test bestimmt. Ausgezählt wurden 500 Zellen pro Bedingung, n = 4. \*\*\* p<0,001 vs. unbehandelter Kontrollen, #### p<0,0001 vs. Rotenon ohne NS309.



**Abb. 18: NS309 verhindert den Zerfall des neuritischen Netzwerks in Rotenon-behandelten dopaminergen Zellen.**

(A) Neuronal differenzierte LUHMES-Zellen wurden mit Antikörper gegen Dopamintransporter (DAT) markiert. (B) Die von neuronalem Netzwerk bedeckte Fläche wurde in Bezug zu DAPI gefärbte Zellkerne analysiert. Die Rotenon-Behandlung führt zu einem massiven Verlust des neuronalen Netzwerks nach 48 h. Andererseits zeigt die Ko-Inkubationen mit Rotenon und 25  $\mu$ M NS309 einen signifikant protektiven Effekt in Vergleich zur Rotenonbehandlung allein. Die Signifikanz zwischen den Gruppen wurde durch eine ANOVA (analysis of variance) mit anschließendem post-hoc Scheffé-Test bestimmt. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. unbehandelter Kontrollen, #  $p < 0,05$  vs. Rotenone ohne NS309. Die Maßstabsbalken betragen 20  $\mu$ m.

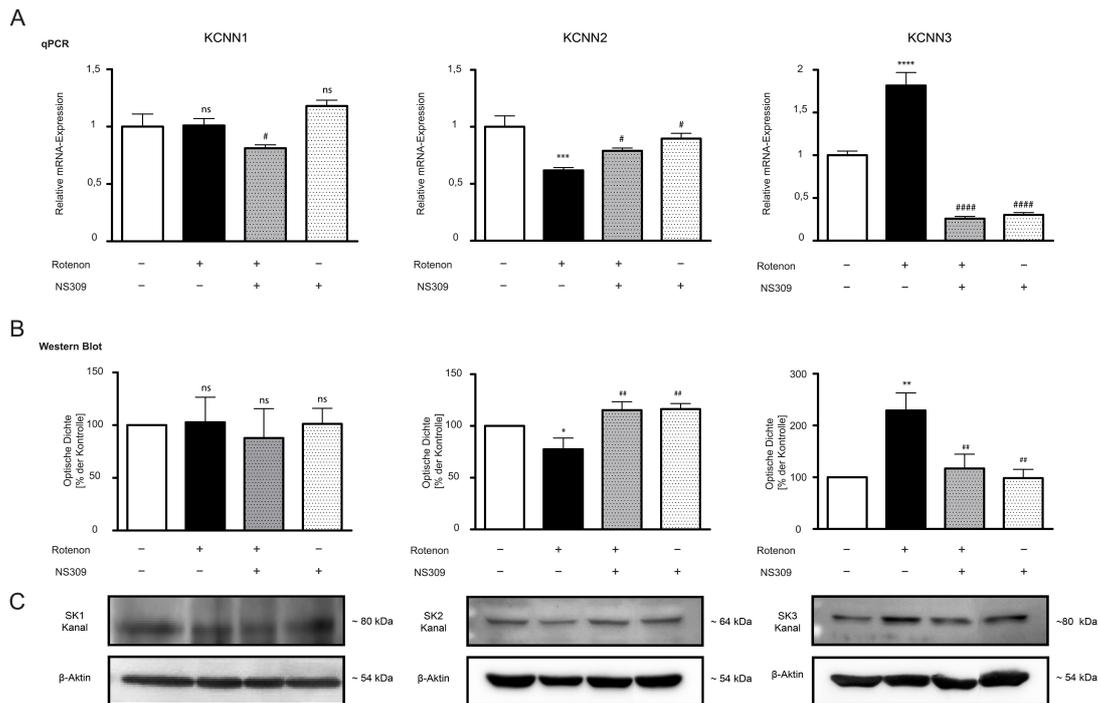


**Abb. 19: Rotenon-induzierte Neurotoxizität lässt sich durch Ko-Inkubation mit einem SK-Kanal-Aktivator blockieren.**

Dopaminerge Zellen wurden 48 h mit 0,5 µM Rotenon mit oder ohne Verwendung von NS309 (25 µM) oder Apamin (10-20 µM) auf den 96-Well-Platten kultiviert. Anschließend wurde die Zellvitalität photometrisch mittels MTT-Test (A) oder ATP-Gehalts (B) bestimmt. Standardabweichungen ergaben sich aus drei unabhängigen Experimenten. ANOVA mit anschließendem post-hoc Scheffé-Test, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Rotenon ohne NS309. ns = nicht signifikant.

#### **4.3.5 Rotenon-Neurotoxizität ist für die Reduktion des Proteinspiegels des SK2-Kanals verantwortlich.**

Wir untersuchten den Effekt von Rotenon auf die Expression von SK-Kanälen in LUHMES-Zellen. Nach 48 Stunden Inkubation mit 0,5  $\mu$ M Rotenon war die Expression von SK2-Kanälen signifikant vermindert, während die Expression des SK3-Kanals zunahm. Der SK-Kanal-Aktivator NS309 verhinderte die Rotenon-induzierte Abnahme der SK2-Kanal-Expression (Abbildung 20) und die Rotenon-abhängige Zunahme der SK3-Kanal-Expression (Abbildung 20).



**Abb. 20: Rotenon beeinflusst die Expression von SK-Kanälen.**

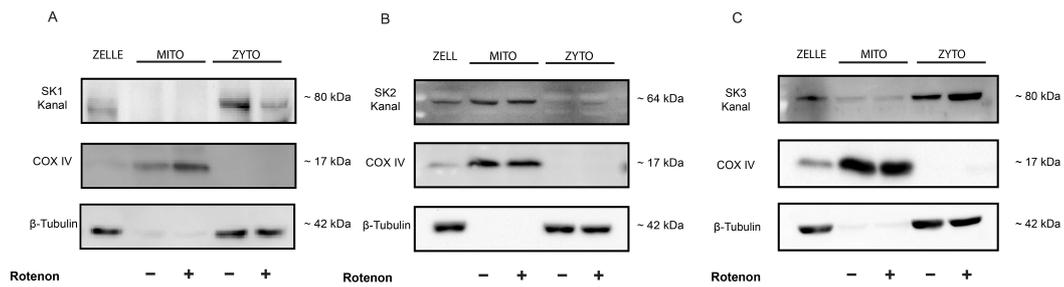
Die SK-Kanal Expression wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR und Western Blot semiquantitativ ermittelt. (A) Verdeutlicht wird die relative mRNA-Expression von SK1/KCNN1, SK2/KCNN2 und SK3/KCNN3 bezogen auf die jeweilige Haushaltsgen-Expression. (B) Auf Protein-Ebene wurde die Expression mittels spezifischer SK1-, SK2- und SK3-Antikörper detektiert. (C) Die quantitative Auswertung der Proteinexpression erfolgt nach der optischen Dichte-Messung in Bezug zur  $\beta$ -Aktin-Expression. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde als 100%-Bezugspunkt gesetzt. Die Signifikanz zwischen den Gruppen wurde durch eine ANOVA mit anschließendem post-hoc Scheffé-Test bestimmt, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs. unbehandelte Kontrollen. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$ , ####  $p < 0,0001$  vs. Rotenon ohne NS309. ns = nicht signifikant.

#### **4.3.6 Intrazelluläre Lokalisation von SK-Kanal-Untereinheiten in LUHMES-Zellen.**

Da Rotenon die Aktivität des mitochondrialen Komplex 1 hemmt und die Aktivierung von SK-Kanälen die schädlichen Auswirkungen, die von Rotenon ausgeht, abmildert, wurde untersucht, ob die SK-Kanal-abhängige Neuroprotektion mit einer erhaltenen Funktion der Mitochondrien korreliert. Zunächst wurden intakte Mitochondrien nach einem festgelegten Protokoll (Perocchi u. a., 2010) isoliert und mittels Western Blot die Protein-Expression von SK1-, SK2- und SK3-Kanälen in den isolierten Organellen analysiert. SK1- und SK3-Kanäle wurden vor allem in der zytosolischen Fraktion (Abbildung 21) lokalisiert. SK2-Kanäle wurden vor allem in reinen Mitochondrien (MITO) exprimiert.

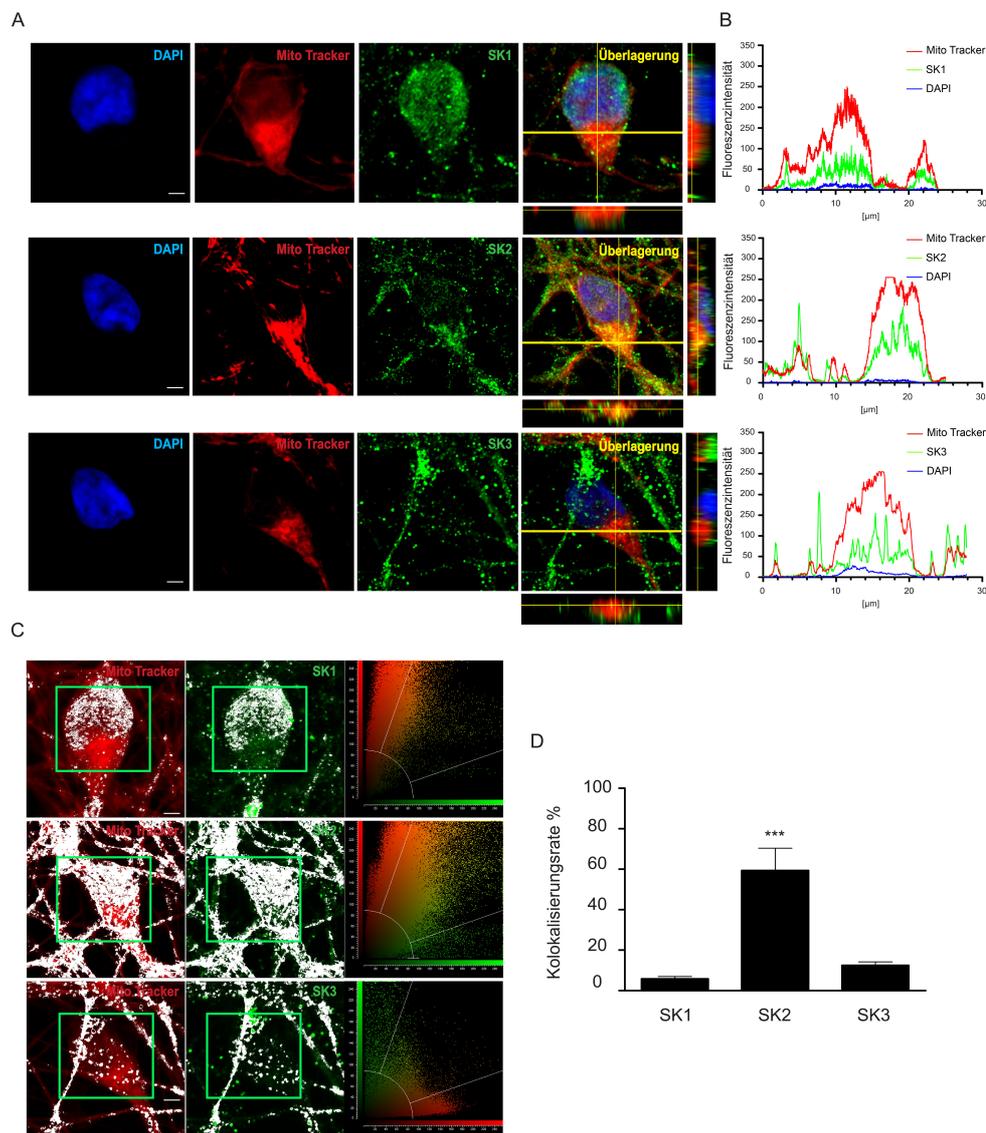
SK1-Kanäle sind nicht mit mitochondrialen Markern in dopaminergen Zellen (Abbildung 21) kolokalisiert. Konfokale Immunfluoreszenzfärbungen, die für SK2-Kanäle spezifisch sind, zeigten umfangreiche Überschneidungen zwischen SK2-Kanal- und Mitochondrienfärbung in neuronalen dopaminergen Zellen. In Übereinstimmung mit den Western-Blot-Messungen zeigte die konfokale Mikroskopie-Analyse, dass zwar die SK2-Kanäle in Mitochondrien exprimiert sind, die SK3-Kanäle dort mit dem MitoTracker Deep Red, einem mitochondrialen Marker (Abbildung 22), nur in einem geringeren Ausmaß kolokalisiert sind.

Zwei unabhängige Bioinformatik-Rechenmethoden (TargetP 1.1 und Mitoprot II) legten eine mitochondriale Targeting-Sequenz in menschlichen SK2-Kanälen (Zugangsnummer: AAP45946) nahe. Zusammen mit der rechnerischen Vorhersage einer mitochondrialen Targeting-Sequenz, weisen diese Daten stark auf die Lokalisierung von SK2-Kanälen an der Membran der Mitochondrien hin.



**Abb. 21: Expression von SK-Isoformen in Mitochondrien und Zytoplasma.**

Subzelluläre Fraktionen aus unbehandelten oder Rotenon-behandelten LUHMES-Zellen ( $0,5 \mu\text{M}$ , 48h) wurden über einen Saccharose-Stufengradienten aufgereinigt, elektrophoretisch aufgetrennt und mit spezifischem Antikörper gegen der Einzelnen-Untereinheiten der SK-Kanäle SK1 (A), SK2 (B) und SK3 (3) detektiert. Als fraktionsspezifische Referenzantikörper wurden  $\beta$ -Tubulin (Zytoplasma) und COXIV (Mitochondrien) verwendet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. Die Total-Zelllysate, Mitochondrienfraktion, Überstand der Mitochondrienfraktion mit Zytosol und Mikrosomen sind auf den Bildern als ZELLE, MITO oder ZYTO bezeichnet.



**Abb. 22: Subzelluläre Lage von SK-Isoformen im dopaminergen Zellmodell.**

(A) Dargestellt sind repräsentative Konfokal-Aufnahmen von 6 Tage differenzierten LUHMES-Zellen. SK-Kanäle wurden immunzytochemisch nachgewiesen. Des Weiteren ist die Anfärbung mittels Mitochondrien-selektiven Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Deep Red zu sehen. Kokolisierung von SK-Kanälen und Mitochondrien erfolgte an einem Leica TCS SP5 konfokalem Laserscanning-Mikroskop und wurde mit der Software LAS AF durch (B) Intensitätsmessung und (C und D) Kokolisierungswerkzeug ausgewertet. In Darstellung (A) zeigen die gelben Linien in den Bildern an, an welchen Stellen und in welchem entsprechenden Z-Schnitt die Fluoreszenzintensität (B) aufgenommen und ausgewertet wurde. In (C) definieren die grünen Rahmen die region-of-interest (ROI) für die Analyse der Kokolisierungsrate. Die Kokolisierungsrate zwischen Immunfärbung und MitoTracker ist in der Grafik (D) dargestellt. Die Signifikanz zwischen den Gruppen wurde durch eine ANOVA mit anschließendem post-hoc Scheffé-Test bestimmt (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

#### **4.3.7 Der SK-Kanal-Aktivator NS309 schwächt den Rotenon-induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ .**

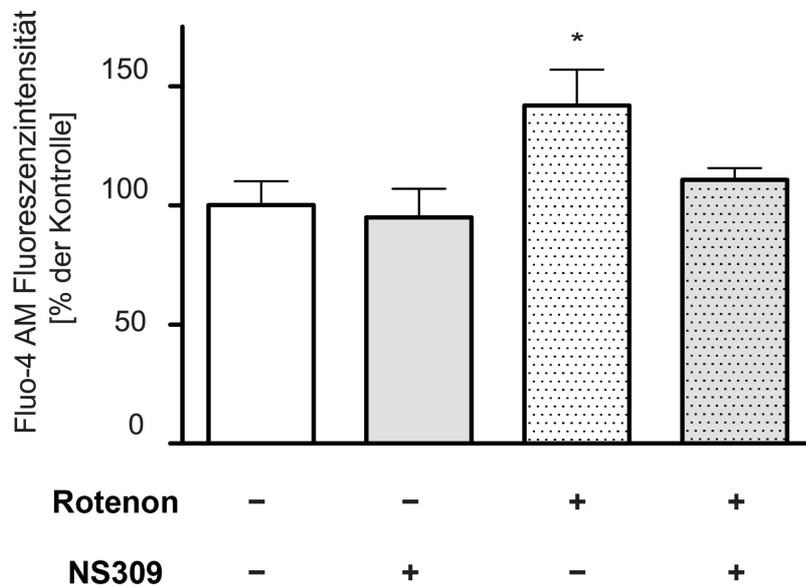
Die chronische Erhöhung der basalen  $[Ca^{2+}]_i$  ist oft assoziiert mit einer neuronalen Zellschädigung (Freestone u. a., 2009; Lee u. a., 2003). Zur weiteren Untersuchung der Rolle des erhöhten intrazellulären Calciumspiegels beim Rotenon-induziertem neuronalem Zelltod, wurde den LUHMES-Zellen mit calciumsensitivem Farbstoff (Fluo-4 AM) inkubiert. Die Veränderung der Fluoreszenz wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop detektiert. Die NS309 Behandlung allein hatte keinen Einfluss auf  $[Ca^{2+}]_i$  im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 23). Jedoch wiesen die LUHMES-Zellen einen erhöhten  $[Ca^{2+}]_i$ -Wert nach 24 Stunden Behandlung mit Rotenon ( $0,5 \mu\text{M}$ ) auf. NS309 milderte die Rotenon-induzierte Erhöhung des  $[Ca^{2+}]_i$  deutlich ab (Abbildung 23).

#### **4.3.8 Die SK-Kanal-Aktivierung reduziert das mitochondriale Membranpotenzial leicht.**

Zum besseren Verständnis der neuroprotektiven Effekte, die durch die Aktivierung der SK-Kanäle auf mitochondrialer Ebene vermittelt werden, untersuchten wir das mitochondriale Membranpotenzial ( $\Delta\Psi_m$ ) in Reaktion auf die Aktivierung der SK-Kanäle. Isolierte intakte Mitochondrien aus differenzierten LUHMES-Zellen wurden dem Fluoreszenzfarbstoff DIOC6(3) ausgesetzt. NS309 induzierte eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials in Vergleich zu Kontrollbedingungen (Abbildung 24).

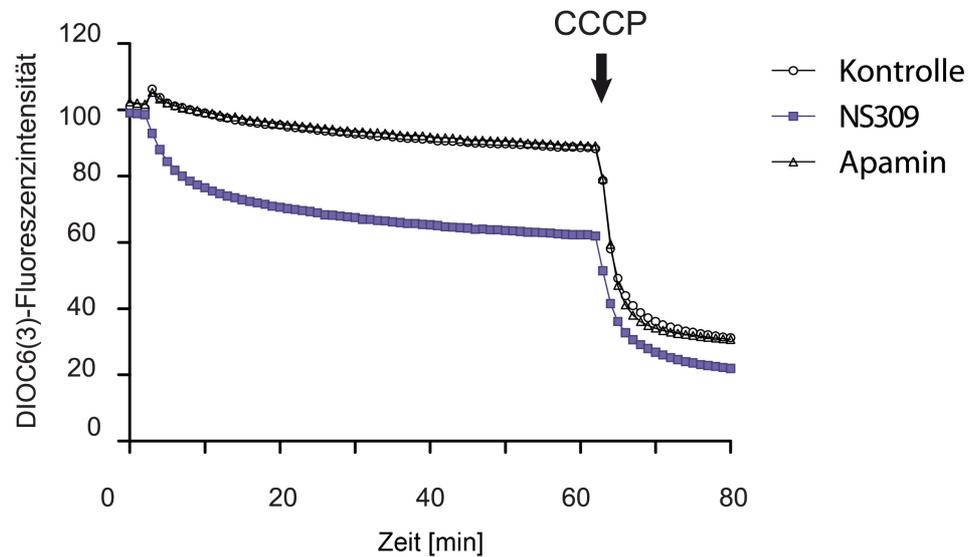
Um meinen Befund zu untermauern, dass die Aktivierung von SK-Kanälen eine leichte mitochondriale Membrandepolarisation in differenzierten dopaminergen Neuronen induziert, isolierten wir Mitochondrien aus Mäusegehirn-Synaptosomen und von gesamtem Gehirnzellen und analysierten das  $\Delta\Psi_m$  mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff (Rhodamin 123). Bei der Behandlung der Gehirn-Mitochondrien mit verschiedenen Konzentrationen von NS309 wurde eine Depolarisation des  $\Delta\Psi_m$  entdeckt. Dieser Effekt wurde in Abwesenheit des

extramitochondrialen Kalziums (Abbildung 25) nicht beobachtet. In Synaptosomen des Mäusegehirns reduzierte NS309 auch das  $\Delta\Psi_m$  und diese Depolarisation wurde in Gegenwart von Calcium (Abbildung 25) weiter erhöht. Diese Experimente bestätigen die Wirkung des SK-Kanal-Aktivators NS309 auf mitochondriale Funktionen in purifizierten Gehirn-Mitochondrien.



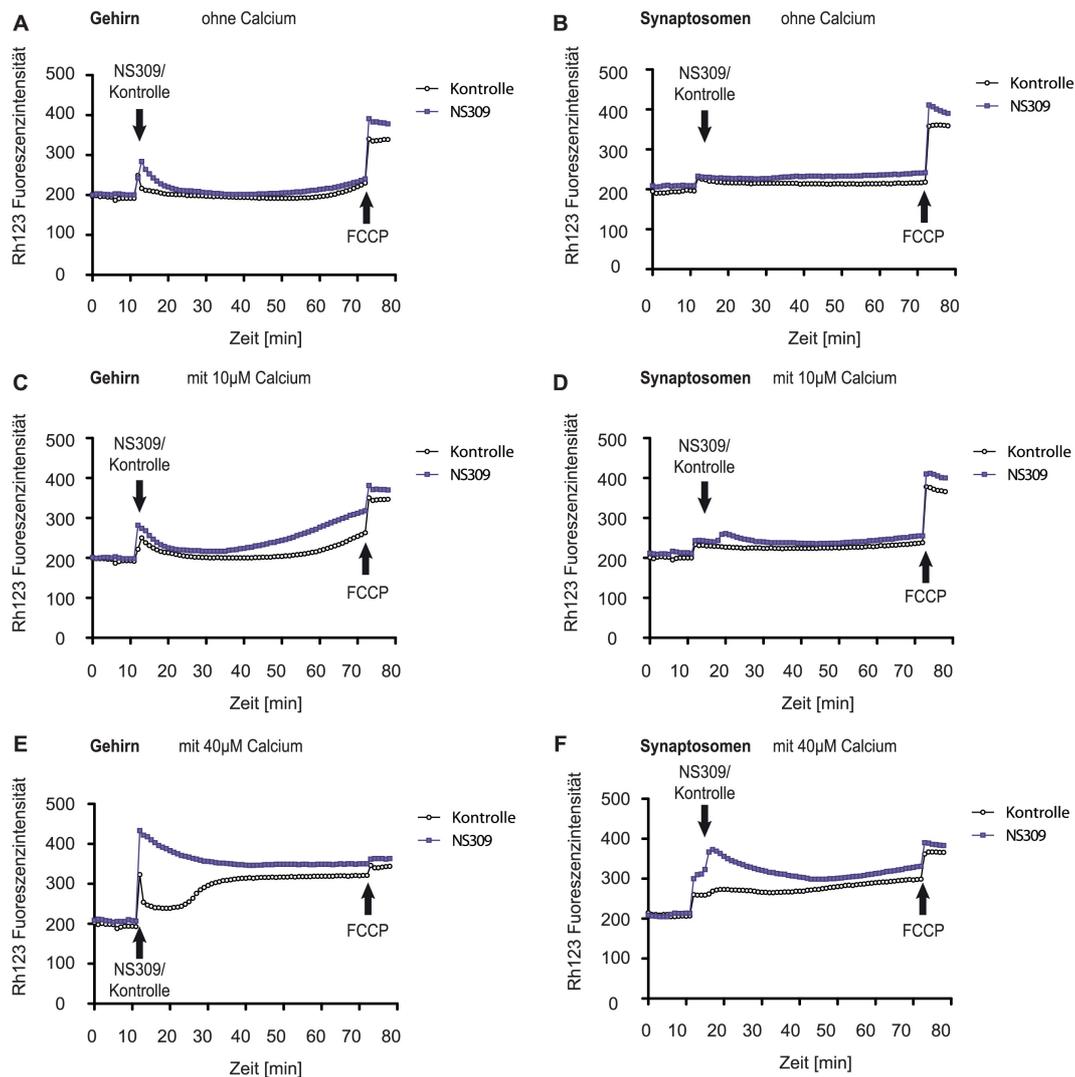
**Abb. 23: Aktivierung von SK-Kanälen verhindert Kalzium-Dysregulation.**

Die Abbildung ist eine graphische Darstellung des intrazellulären Kalziumnachweises. Differenzierte LUHMES-Zellen wurden mit 0,5  $\mu\text{M}$  Rotenon in An- oder Abwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  NS309 inkubiert; danach wurde der intrazytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel mittels fluoreszenzspektroskopischer Bestimmung analysiert. Die Signifikanz zwischen den Gruppen wurde durch eine ANOVA mit anschließendem post-hoc Scheffé-Test bestimmt. \* $p < 0,05$  vs. unbehandelte Kontrollen,  $n=6$ .



**Abb. 24: Veränderung im mitochondrialen Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) durch Aktivierung von SK-Kanälen in LUHMES-Zellen.**

Die Veränderung im mitochondrialen Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) wurde mit Hilfe von 20 nM des Fluoreszenzfarbstoffes DiOC6(3) nachgewiesen. Als positive Kontrolle wurden die Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  CCCP, ein Protonophor, das das MMP reversibel aufhebt, verwendet. Für die Auswertung der Messergebnisse wurden die gemessenen Fluoreszenzen auf den Proteingehalt normiert und so die relative Enzymaktivität pro  $\mu\text{g}$  Protein ermittelt. Die Daten zeigen die repräsentativen Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten.



**Abb. 25: Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) durch Aktivierung von SK-Kanälen.**

Das mitochondriale Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) wurde anhand der membranpotentialabhängigen Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin123 (Rh123) ermittelt. Für die Messung wurden frisch isolierte Mitochondrien aus Mäusegehirn verwendet. Der Effekt von 25  $\mu\text{M}$  NS309 auf die Rh123-Fluoreszenzintensität auf isolierten Mitochondrien wurde (A) zum einen in Abwesenheit von extrazellulärem Calcium, (B) und zum anderen in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  und (C) von 40  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  gemessen. Der Nachweis für einen vollständigen Abbau des  $\Delta\Psi_m$  wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  FCCP geführt (pos. Kontrolle).

## 5 Diskussion

### 5.1 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass über 6 Tage differenzierte LUHMES-Zellen als Modell für das IPS geeignet sind. Die Behandlung mit dem Komplex I-Inhibitor Rotenon kann einen Parkinson-ähnlichen Zellzustand herbeiführen. SK-Kanäle werden in differenzierten dopaminergen Neuronen unterschiedlich exprimiert. Der SK2-Kanal-Subtyp ist in den Mitochondrien lokalisiert. Die Aktivierung von SK-Kanälen wirkt protektiv; so wird das mitochondriale Membranpotential reduziert, das neuritische Netzwerk, die Lebensfähigkeit und die ATP-Spiegel der Zellen bleiben auch nach Gabe von Rotenon erhalten.

### 5.2 Das Zellmodell

Zellkultur-Modelle sind nützlich, um selektive Untersuchungen von pathologischen und biochemischen Aspekten der IPS auf zellulärer Ebene zu analysieren. *In vitro* Modelle bieten die Vorteile eines einfachen Zugangs, um Experimente auf der zellulären Ebene durchzuführen (Orth & Tabrizi, 2003). Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Zell-Modelle entwickelt, die alle ihre spezifischen Vor- und Nachteile aufweisen (Schüle u. a., 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst der Subklon der immortalisierten neuronalen Zelllinie MesC 2.10 als Modell charakterisiert. Die ursprüngliche Zelllinie wurde von Lotharius und Kollegen erstmals 2002 als Alternativmodell für die Parkinson-Forschung dargestellt. Die LUHMES-Zellen sind humane embryonale Zellen, die verschiedene Charakteristika der dopaminergen Neuronen zeigen (Schildknecht u. a., 2009). Schon bei Lotharius et al., 2002 (Lotharius u. a., 2002) ist beschrieben, dass LUHMES-Zellen Marker von reifen dopaminergen Neuronen exprimieren. In unserem Labor wurde eine genauere Charakterisierung durchgeführt und gezeigt, dass durch eine sechstägige Differenzierung der dopaminerge Phänotyp der Zellen auf RNA- und Proteinebene verstärkt ausgeprägt wird.

Anders als bei anderen Zellmodellen zeigten LUHMES-Zellen schon nach wenigen Tagen im Differenzierungszustand eine starke Zunahme der neuronalen

und dopaminergen Marker. Entweder war in herkömmlichen Zellmodellen der dopaminerge Phänotyp nach der Differenzierung nur schwach ausgeprägt (Primäre-Kultur zwischen 1-2% TH-positive Zellen; neurale Stammzellen (NSCs) 18% TH-positive Zellen) oder der Prozentsatz dopaminergere Zellen war stark vom Differenzierungsprotokoll abhängig (SH-SY5Y) (Xie u. a., 2010). Nachteilig ist bei diesen Zellmodellen, dass die erzielte Differenzierung auch unter Verwendung des gleichen Protokolls deutlich variiert (MSCs zwischen 12,7 und 67 % TH-positive Zellen) (Schüle u. a., 2009). Unsere Daten stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Marcel Leist (Scholz u. a., 2011).

Die korrekte Spezialisierung und Entwicklung dopaminergere Neuronen im Mittelhirn hängt davon ab, ob bestimmte Transkriptionsfaktoren während der Entwicklung exprimiert werden (Maxwell & Li, 2005). Um den Differenzierungsprozess nach Tetracyclin-abhängiger Hemmung der v-myc Überexpression bei LUHMES-Zellen nachzuweisen, haben wir in dieser Arbeit nicht nur nach Markern gesucht, die bei vollständig differenzierten dopaminergere Neuronen vorkommen (TH, VMAT2, DAT, DDC, GIRK2), sondern auch nach solchen, die den Differenzierungsprozess nur begleiten.

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse und des Western Blots bestätigen die Expression und Schwankungen der Marker PTX3, EN1, LMX1B, NURR1. Die Expression von PITX3 während der Entwicklung der dopaminergere Neuronen ist entscheidend für die Regulierung der TH-Expression in der Substantia nigra (Maxwell & Li, 2005). Zwei weitere Transkriptionsfaktoren, Nurr1 und Lmx1b, sind an der Spezialisierung der dopaminergere Mittelhirnneuronen beteiligt (Simeone, 2005). Die selbst ermittelten Resultate zeigen, dass diese Marker im Verlauf der Differenzierung kontinuierlich in LUHMES-Zellen exprimiert werden.

Im Laufe der Differenzierung zeigen Luhmes-Zellen eine reduzierte Teilungsaktivität und ein verstärktes Neuritenwachstum. Diese Beobachtung wurde mehrfach unter verschiedenen Methoden bestätigt, was ein Vorteil der LUHMES-Zellen gegenüber anderen Zellmodellen ist. So wird beispielsweise bei der humanen SH-SY5Y-Neuroblastoma-Zelllinie, einem Subklon der Human Neuroblaston SK-N-SH-Zellen, ein nicht vollständiger postmitotischer Zustand

erreicht. In diesem Zellmodell ist das Niveau der Differenzierung sehr protokollabhängig. Dieser nicht vollständige postmethodische Zustand beeinflusst die Empfindlichkeit der Zellen gegen Neurotoxin, womit dieses Modell nicht optimal für die Erforschung der PK ist (Xie u. a., 2010).

Wir zeigten weiterhin, dass LUHMES-Zellen eine homogene Entwicklung erreichen, so dass Marker wie TH, DDC, DAT und VMAT2 soweit ersichtlich in allen Zellen exprimiert werden. Diese Charakteristik und die Tatsache, dass diese aus menschlichen Zellen stammen, war entscheidend, dass diese Zelllinie als Modell ausgewählt und die Rolle kalziumabhängiger Kalium-Kanäle in einem toxinbasierten Parkinson-Modell untersucht werden konnte.

Aufgrund dieser Daten wurden nicht nur Grundkenntnisse gewonnen, um die LUHMES-Zelllinie als Modell zu verwenden. Es konnte auch das Expressionsmuster für die weitere Planung der Experimente genau beschrieben werden.

### **5.3 Das Rotenon-Parkinson-Modell**

Frühere Studien zeigten, dass Rotenon die pathophysiologischen Vorgänge in dopaminergen Neuronen bei Morbus Parkinson stimuliert und viele klinische Merkmale des IPS in Tier- und Zellmodellen simuliert (Betarbet u. a., 2000; Tanner u. a., 2011; Xiong u. a., 2012).

Beispielsweise zeigen Rotenon-Rattenmodelle einen fortschreitenden Verlust von dopaminergen Neuronen und es kommt zur Bildung von Lewy-Körpern im nigral-striatalen System (Xiong u. a., 2012). Darüber hinaus zeigte eine kürzlich durchgeführte klinische Studie eine Assoziation von IPS und Rotenon-Exposition. Die Hemmung des respiratorischen mitochondrialen Komplex I durch Rotenon erhöht die basalen  $[Ca^{2+}]$ -Konzentrationen in dopaminergen Neuronen (Xiong u. a., 2012). Der Anstieg an intrazellulärem  $[Ca^{2+}]$  ist besonders relevant für den Zelltod, da eine  $[Ca^{2+}]$  Überlastung molekulare Mechanismen aktiviert, was zu nekrotischem und apoptotischem Zelltod führt (Dolga u. a., 2011; Freestone u. a., 2009; Lee u. a., 2003). Die Funktionsbeeinträchtigung der Mitochondrien dürfte also zur IPS-Pathologie beitragen (Tanner u. a., 2011).

Ein direkter Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion und dem IPS konnte bei Patienten, bei denen ein mitochondrialer Komplex I-Dysfunktion

in der Substantia nigra messbar war, nachgewiesen werden (Schapira u.a., 1989). Diese Erkenntnisse wurden bei Parkinson-Patienten mit mitochondrialen Defekten in der Skelettmuskulatur, den Blutplättchen und den Lymphoblasten (Schapira, 1994) bestätigt.

In dieser Studie wurde im Besonderen untersucht, wie die SK-Kanal-Expression und Funktion das Überleben der dopaminergen Zelle beeinflusst. In einem Modell der Rotenon-Toxizität war nachzuweisen, dass die pharmakologische Aufrechterhaltung der SK-Kanal-Aktivität die Neuroprotektion der menschlichen dopaminergen Neuronen bewirkt. Ferner zeigen die Daten, dass die Rotenon-Toxizität eine nachhaltige Reduzierung der SK-Kanal-Expression verursacht.

#### **5.4 SK-Kanäle**

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von SK-Kanälen die Rotenon-abhängige  $[Ca^{2+}]$ -Überlastung reduziert und die ATP-Spiegel aufrechterhält. Ein möglicher Mechanismus der SK-Kanal-Aktivierungsabhängigen Neuroprotektion geht aus der Ähnlichkeit mit Vorkonditionierungsmechanismen hervor. Diese geben eine schützende Antwort gegen ansonsten letalen Stress nach einer transienten Exposition der Zellen mit Stress-Stimuli-System.

Mehrere Nachweise zeigten, dass der Konvergenzpunkt der vorkonditionierenden Paradigmen durch Mitochondrien vertreten wird (Correia u. a., 2011).

In früheren Arbeiten wurde der mitochondriale ATP-sensitive Kalium ( $_{mito}K_{ATP}$ )-Kanal untersucht, der das mitochondriale Membranpotenzial reduziert. Dieses Phänomen wurde als der zugrunde liegende Mechanismus der mitochondrialen Vorbehandlung angenommen. Es wurde auch gezeigt, dass die Aktivierung von Kalium- $K_{ATP}$ -Kanälen in kortikalen und dopaminergen Neuronen gegen Neurotoxin Schutz bieten (Kis u. a., 2003; Xie u. a., 2010).

Hier konnte nachgewiesen werden, dass sich SK-Kanäle und insbesondere der SK2-Kanal-Subtyp in neuronalen Mitochondrien befinden. Die Aktivierung der SK-Kanäle durch NS309 in isolierten Mitochondrien bewirkte einen leichten Rückgang des mitochondrialen Membranpotenzials, was zu einem

neuroprotektiven Vorkonditionierungseffekt beitragen könnte. Tatsächlich verhinderte die Vorbehandlung mit NS309 auch den Rotenon-vermittelten Zelltod in dopaminergen Neuronen. Durch die Öffnung der SK-Kanäle wird aus einer Vulnerabilität der Neuronen gegenüber schädigenden Substanzen zu einer Toleranz gegenüber Toxin, was wir als Neuroprotektion verstehen können.

Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass NS309 die Expression der SK-Kanäle in dopaminergen Neuronen, die Rotenon ausgesetzt wurden, erhält. Dies deutet darauf hin, dass die Rotenon-induzierte Toxizität bei gleichzeitiger Unterbrechung der Gegenmechanismen, wie es durch SK-Kanälen vermittelt wird, nach dem toxischen Stimulus verschwindet. In unserer Studie reduzierte Rotenon besonders die Expression der SK2-Kanal-Untereinheit und erhöht die Expression der SK3-Kanal Untereinheit in dopaminergen Neuronen. Interessanterweise verhinderte die Aktivierung von SK-Kanälen mit NS309 die Rotenon-induzierte Herunterregulierung des SK2-Kanals, die Hochregulierung des SK3-Kanals und den Zelltod. Diese Beobachtungen ähneln Befunden, die durch Modelle der Glutamat-Toxizität *in vitro* oder bei zerebraler Ischämie *in vivo* gewonnen wurden. Dort induzierte der Insult einen Rückgang der SK2-Kanal-Expression, die wiederum von SK2-Kanal-Aktivatoren verhindert wurden (Allen u. a., 2011; Dolga u. a., 2011).

Unter pathophysiologischen Bedingungen wie einer zerebralen Ischämie wirkt sich ein erheblicher Anstieg der Glutamat-Freisetzung *in vitro* auf die Expression der SK-Kanäle aus (Allen u. a., 2011; Dolga u. a., 2011). Ferner zeigte die Immunelektronenmikroskopie, dass reduzierte SK-Kanal-Ströme mit der synaptischen Internalisierung der Kanäle (Allen u. a., 2011) im Zusammenhang stehen. Diese Befunde wurden an primären kortikalen Neuronen gewonnen, die toxischen Dosen von Glutamat ausgesetzt waren, wobei Glutamat eine Internalisierung von SK2-Kanal-Subtypen (Dolga u. a., 2011) hervorrief. Die Modulation der SK2-Kanal-Funktion entweder durch 1-Ethyl-benzimidazolinon (1-EBIO) oder durch NS309 erhielt die SK2-Kanal-Expression, reduzierte den neuronalen Zelltod und verbesserte das kognitive Ergebnis (Allen u. a., 2011; Dolga u. a., 2011). Wie durch elektrophysiologische Arbeiten gezeigt, verursachte *in vivo* eine durch Herzstillstand und Reanimation

induzierte zerebrale Ischämie eine verzögerte und anhaltende Reduktion der synaptischen SK-Kanal-Aktivität.

Der SK-Aktivator NS309 zielt sowohl auf die SK-Kanäle der Plasmamembran als auch die SK2 Kanäle der Mitochondrien. Wie und wo das Zellüberleben gesteuert wird, ist noch weitgehend ungeklärt, so dass es von Bedeutung ist, den relativen Beitrag der Zellmembran zum Schutz gegen Rotenon-Toxizität gegenüber dem der mitochondrialen SK-Kanäle zu bestimmen. NS309 bewirkt durch das Zielen auf die mitochondrialen SK-Kanäle eine leichte Depolarisation des mitochondrialen Membranpotenzials und leistet so wahrscheinlich einen Beitrag zur neuroprotektiven Wirkung. Denkbar ist aber auch, dass NS309 durch das Zielen auf SK-Kanälen der Zellmembran das Aktivierungsmuster der dopaminergen Neuronen beeinflusst. Die Verringerung der sichtbaren  $Ca^{2+}$ -Sensibilität von SK-Kanälen oder die Blockade von SK-Kanälen reduziert in der Tat die mittlere Dauer nach der Hyperpolarisation nach einmaliger Spitze und begünstigt die unregelmäßige Aktivierungs- und Neuroplastizität *in vitro* (Herrik u. a., 2012; Ji u. a., 2009; Shepard & Bunney, 1988). Dieser Effekt wurde durch den positiven Modulator NS309 (Ji u. a., 2009) überwunden.

Zusammenfassend können die mitochondriale Dysfunktion und der verzögerte Zelltod von menschlichen dopaminergen Zellen durch Erhöhung und / oder Stabilisierung der SK-Kanal-Aktivität verhindert werden.

Somit bietet die Erhöhung der SK-Kanal-Aktivität offenbar eine viel versprechende therapeutische Strategie der Neuroprotektion.

## 6 Zusammenfassung

Die Aktivierung der kalziumabhängigen Kaliumkanäle mit kleiner Leitfähigkeit (KCNN/SK/KCa<sub>2</sub>) ist ein vielversprechender therapeutischer Ansatz für die Behandlung von neurologischen Erkrankungen wie Schlaganfall, amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Ataxie und Schizophrenie. In dieser Studie wurde das therapeutische Potential der SK-Kanalaktivierung in einem Rotenon-basierten Parkinson-*in-vitro*-Modell untersucht. Als Zellmodell wurden über 6 Tage differenzierte dopaminerge Neuronen aus einer immortalisierten humanen Zelllinie (LUHMES-Zellen) verwendet. Die konzentrationsabhängige Behandlung mit dem Komplex I-Inhibitor Rotenon (0,1-2,0 µM) zerstörte das dendritische Netzwerk der differenzierten dopaminergen Neuronen und führte zum Zelltod. Quantitative RT-PCR und Western Blot Analyse zeigen, dass die differenzierten dopaminergen Neurone wenig SK2-Kanäle und in hohem Maß SK1 und SK3 Kanäle exprimieren. Proteinuntersuchungen subzellulärer Fraktionen wiesen die Lokalisierung des SK2-Kanal-Subtyps in den Mitochondrien nach. Der positive SK-Kanalmodulator NS309 reduzierte das mitochondriale Membranpotential, während gleichzeitig das dendritische Netzwerk, die Lebensfähigkeit und die ATP-Spiegel der Zellen nach der Gabe von Rotenon erhalten blieben. Insgesamt zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass die Aktivierung von SK-Kanälen protektive Effekte in menschlichen dopaminergen Neuronen bewirken, wahrscheinlich über die Aktivierung des mitochondrialen Membranpotentials durch SK-Kanäle. Somit kann die Aktivierung der SK-Kanäle ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen wie der Parkinsonschen Krankheit sein, bei der dopaminergem Zellverlust mit dem Fortschreiten der Krankheit assoziiert wird.

## 7 Summary

Activation of Calcium-dependent potassium channels with small conductance (KCNN/SK/KCa<sub>2</sub>) plays an important role in neurological diseases such as stroke, amyotrophic lateral sclerosis, ataxia or schizophrenia. This study addresses the therapeutic potential of SK channel activation in a rotenone-based Parkinson *in vitro* model. Dopaminergic neurons from an immortalized human cell line differentiated over 6 days (LUHMES cells) was used as cell model. The concentration-dependent treatment with the complex I-inhibitor rotenone (0.1-2.0  $\mu$ M) destroyed the dendritic network of differentiated dopaminergic neurons and caused cell death. Quantitative RT-PCR and Western blot analysis demonstrated the differentiated dopaminergic neurons express sparsely SK2 channels and largely SK1 and SK3 channels. Protein analysis of subcellular fractions showed localization of SK2 channel subtypes in mitochondria. The positive SK channel modulator NS309 reduced the mitochondrial membrane potential whereas dendritic network, viability and ATP levels of cells sustained after rotenone treatment. Taken together, the findings showed activation of SK channels promoted protective effects in human dopaminergic neurons, likely via activation of mitochondrial membrane potential by SK channels. Activation of SK channels, hence, is a very promising therapeutic approach for treatment of neurodegenerative diseases such as Parkinson disease in that dopaminergic cell loss is associated with disease progress.

## 8 Danksagungen

Für den Erfolg meiner Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen und Einrichtungen einen herzlichen Dank. Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Günter Höglinger für die Möglichkeit, in seinem Labor als PhD Student arbeiten und forschen zu können. Sie brachten mir sehr viel Geduld entgegen und sorgten mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen der Arbeit. Ebenso möchte ich bei Ihrer Arbeitsgruppe erst in Marburg und dann in München für die interessante Zusammenarbeit und das mir entgegengebrachte Wohlwollen danken. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Carsten Culmsee und seiner Arbeitsgruppe am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie der Philipps Universität Marburg für das an seinem Institut gewährte Gastrecht und die Übernahme des Zweitgutachters danken.

Ohne das große Stipendium des DAAD und ohne dass ich an der Philipps Universität in Marburg als Doktorand angenommen worden wäre, wäre meine Doktorarbeit in Deutschland niemals möglich geworden.

Ein großer Dank geht aber auch an all meine Kolleginnen und Kollegen, denn die Zusammenarbeit mit Ihnen war ein Meilenstein bei der Erstellung meiner Doktorarbeit. Sie gaben mir mit Ihrem fundierten Fachwissen viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit. Ohne Ihr Wissen, ohne Ihre Ideen und Ihre Kritik wäre mein Forschungsprojekt niemals soweit gekommen. Für sie alle vertretend möchte ich mich hier besonders bei Amalia, Sebastian und Svenja bedanken. Sie und alle andern haben mir gute Impulse in fachlicher und sprachlicher Hinsicht gegeben.

Ohne jemanden persönlich zu kennen, ohne der Deutschen Sprache mächtig zu sein bin ich im Januar 2006 erstmals für mein Promotionsvorhaben in Marburg eingetroffen. Es war einer der einmaligen Zufälle im Leben der mich euch Gunter und Robert in einer Bar treffen ließ. Ihr habt mir mit Eurer Freundschaft und immer wieder aufmunternden Art geholfen, mein Vorhaben zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen und die Krisen und Tiefpunkte zu überwinden.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 11.01.1979  
 Geburtsort: Abaetetuba; Brasilien

### Bildungsweg

10/2007 – heute	Doktorand an der Klinik für Neurologie, Fachbereich Medizin, Philipps Universität Marburg Erstgutachter: Prof. Dr. Günter Höglinger
04/2004 – 08/2007	Lehrer an der Centro Universitário CESMAC, Maceió, Brasilien
06/2005 – 08/2007 Brasilien	Lehrer an der Faculdade Alagoana de Administração, Maceió,
01/2003 – 08/2005 Zellbiologie	Masterstudiengang, Neurowissenschaft und Universidade Federal do Pará, Belém, Brasilien Erstgutachterin: Prof. Dr. Elizabeth Sumi Yamada
01/1998 - 06/2002	Bachelorstudiengang Medizinische Biologie Universidade Federal do Pará, Belém, Brasilien
01/1997 - 12/1997	Gymnasium Ideal, Belém, Brasilien
01/1995 - 12/1996 Brasilien	Gymnasium São Francisco Xavier, Abaetetuba,
01/1987 – 12/1994	Grundschule in Abaetetuba; Brasilien

## **10 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren

In Belém: Almeida Machado, Campos Ribeiro dos Santos, Conti, da Silva Pinheiro, de Souza Messias Júnior, Farias Guerreiro, Gomes da Cunha, Gomes Leal, Harada, Ishak, Louzada Guedes, Martins do Nascimento, Mitio Ohashi, Mousinho Ribeiro, Nakauth Azevedo, Nascimento dos Santos Corrêa, Oliveira Bahia, Oliveira da Silva, Oliveira Guimarães Ishak, Picanço Diniz, Pieckzarca, Ricardo dos Santos Vieira, Rodriguez Burbano, Santana da Silva, Silva Ribeiro, Socorro Evangelista Costa, Vallinoto, Viera Cayres Vallinoto, Yamamoto Tsutsumi.

## 11 Veröffentlichungen

DOLGA, A M ; **DE ANDRADE, A** ; MEISSNER, L ; KNAUS, H-G ; HÖLLERHAGE, M ; CHRISTOPHERSEN, P ; ZISCHKA, H ; PLESNILA, N ; HÖGLINGER, G U ; U. A.: Subcellular expression and neuroprotective effects of SK channels in human dopaminergic neurons. In: *Cell death & disease* Bd. 5 (2014), S. e999

HÖLLERHAGE, MATTHIAS ; GOEBEL, JOACHIM N ; **DE ANDRADE, ANDERSON** ; HILDEBRANDT, TOBIAS ; DOLGA, AMALIA ; CULMSEE, CARSTEN ; OERTEL, WOLFGANG H ; HENGERER, BASTIAN ; HÖGLINGER, GÜNTER U: Trifluoperazine rescues human dopaminergic cells from wild-type  $\alpha$ -synuclein-induced toxicity. In: *Neurobiology of aging* (2014)

HANGEN, E ; DE ZIO, D ; BORDI, M ; ZHU, C ; DESSEN, P ; CAFFIN, F ; LACHKAR, S ; PERFETTINI, J-L ; LAZAR, V ; BENARD, J ; FIMIA, GM ; PIACENTINI, M ; HARPER, F ; PIERRON, G ; VICENCIO, JM ; BÉNIT, P ; **DE ANDRADE, A** ; HÖGLINGER, G ; CULMSEE, C ; RUSTIN, P ; BLOMGREN, K ; CECCONI, F ; KROEMER, G ; MODJTAHEDI, N: A brain-specific isoform of mitochondrial apoptosis-inducing factor: AIF2. In: *Cell death and differentiation* Bd. 17 (2010), Nr. 7, S. 1155–1166

YAMADA, ELIZABETH S ; RESPONDEK, GESINE ; MÜSSNER, STEFANIE ; **DE ANDRADE, ANDERSON** ; HÖLLERHAGE, MATHIAS ; DEPIENNE, CHRISTEL ; RASTETTER, AGNÈS ; TARZE, AGATHE ; FRIGUET, BERTRAND ; U. A.: Annonacin, a natural lipophilic mitochondrial complex I inhibitor, increases phosphorylation of tau in the brain of FTDP-17 transgenic mice. In: *Experimental neurology* (2014)

## 12 Literaturverzeichnis

- ADELMAN, JOHN P ; MAYLIE, JAMES ; SAH, PANKAJ: Small-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels: Form and Function. In: *Annual review of physiology* Bd. 74 (2012), Nr. 1, S. 245–269
- ALLEN, DUANE ; NAKAYAMA, SHIN ; KUROIWA, MASAYUKI ; NAKANO, TAKAAKI ; PALMATEER, JULIE ; KOSAKA, YASUHARU ; BALLESTEROS, CARMEN ; WATANABE, MASAHIKO ; BOND, CHRIS T ; U. A.: SK2 channels are neuroprotective for ischemia-induced neuronal cell death. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* Bd. 31 (2011), Nr. 12, S. 2302–2312
- BETARBET, R ; SHERER, T B ; MACKENZIE, G ; GARCIA-OSUNA, M ; PANOV, A V ; GREENAMYRE, J T: Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. In: *Nature neuroscience* Bd. 3 (2000), Nr. 12, S. 1301–1306
- BLESA, JAVIER ; PHANI, SUDARSHAN ; JACKSON-LEWIS, VERNICE ; PRZEDBORSKI, SERGE: Classic and new animal models of Parkinson's disease. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* Bd. 2012 (2012), S. 845618
- CHRISTOPHERSEN, NICOLAJ S ; GRØNBORG, METTE ; PETERSEN, THOMAS N ; FJORD-LARSEN, LONE ; JØRGENSEN, JESPER R ; JULIUSSON, BENGT ; BLOM, NIKOLAJ ; ROSENBLAD, CARL ; BRUNDIN, PATRIK: Midbrain expression of Delta-like 1 homologue is regulated by GDNF and is associated with dopaminergic differentiation. In: *Experimental neurology* Bd. 204 (2007), Nr. 2, S. 791–801
- CORREIA, SÓNIA C ; CARDOSO, SUSANA ; SANTOS, RENATO X ; CARVALHO, CRISTINA ; SANTOS, MARIA S ; PERRY, GEORGE ; SMITH, MARK A ; MOREIRA, PAULA I: New insights into the mechanisms of mitochondrial preconditioning-triggered neuroprotection. In: *Current pharmaceutical design* Bd. 17 (2011), Nr. 31, S. 3381–3389
- DAUER, WILLIAM ; PRZEDBORSKI, SERGE: Parkinson's disease: mechanisms and models. In: *Neuron* Bd. 39 (2003), Nr. 6, S. 889–909
- DEIGNAN, J ; LUJÁN, R ; BOND, C ; RIEGEL, A ; WATANABE, M ; WILLIAMS, J T ; MAYLIE, J ; ADELMAN, J P: SK2 and SK3 expression differentially affect firing frequency and precision in dopamine neurons. In: *Neuroscience* Bd. 217 (2012), S. 67–76
- DI MONTE, D ; LAWLER, C P: Mechanisms of parkinsonism: session X summary and research needs. In: Bd. 22, 2001, S. 853–854
- DOLGA, A M ; TERPOLILLI, N ; KEPURA, F ; NIJHOLT, I M ; KNAUS, H-G ; D'ORSI, B ; PREHN, J H M ; EISEL, U L M ; PLANT, T ; U. A.: KCa<sub>2</sub> channels activation prevents [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> deregulation and reduces neuronal death following glutamate toxicity and cerebral ischemia. In: *Cell death & disease* Bd. 2

(2011), S. e147

- FABER, E S LOUISE ; SAH, PANKAJ: Functions of SK channels in central neurons. In: *Clinical and experimental pharmacology & physiology* Bd. 34 (2007), Nr. 10, S. 1077–1083
- FALKENBURGER, B H ; SCHULZ, J B: Limitations of cellular models in Parkinson's disease research. In: *Journal of neural transmission. Supplementum* (2006), Nr. 70, S. 261–268
- FANG, NIANBAI ; CASIDA, JOHN E: Novel Bioactive Cubé Insecticide Constituents: Isolation and Preparation of 13-homo-13-Oxa-6a,12a-dehydrorotenoids. In: *The Journal of organic chemistry* Bd. 62 (1997), Nr. 2, S. 350–353
- FOUNTAIN, TIMOTHY M ; VENDA, LARA LOURENCO ; WARRICK, NICHOLAS ; CHRISTIAN, HELEN C ; BRUNDIN, PATRIK ; CHANNON, KEITH M ; WADE-MARTINS, RICHARD: The effect of alpha-synuclein knockdown on MPP+ toxicity in models of human neurons. In: *The European journal of neuroscience* Bd. 28 (2008), Nr. 12, S. 2459–2473
- FREESTONE, PETER S ; CHUNG, KENNY K H ; GUATTEO, EZIA ; MERCURI, NICOLA B ; NICHOLSON, LOUISE F B ; LIPSKI, JANUSZ: Acute action of rotenone on nigral dopaminergic neurons--involvement of reactive oxygen species and disruption of Ca<sup>2+</sup> homeostasis. In: *The European journal of neuroscience* Bd. 30 (2009), Nr. 10, S. 1849–1859
- FUNKE, CLAUDIA ; SCHNEIDER, SUSANNE A ; BERG, DANIELA ; KELL, DOUGLAS B: Genetics and iron in the systems biology of Parkinson's disease and some related disorders. In: *Neurochemistry international* Bd. 62 (2013), Nr. 5, S. 637–652
- GRAFF, L ; CASTROP, F ; BAUER, M ; HÖFLER, H ; GRATZL, M: Expression of vesicular monoamine transporters, synaptosomal-associated protein 25 and syntaxin1: a signature of human small cell lung carcinoma. In: *Cancer research* Bd. 61 (2001), Nr. 5, S. 2138–2144
- HERRIK, KJARTAN F ; REDROBE, JOHN P ; HOLST, DORTE ; HOUGAARD, CHARLOTTE ; SANDAGER-NIELSEN, KARIN ; NIELSEN, ALEXANDER N ; Ji, HUIFANG ; HOLST, NINA M ; RASMUSSEN, HANNE B ; U. A.: CyPPA, a Positive SK3/SK2 Modulator, Reduces Activity of Dopaminergic Neurons, Inhibits Dopamine Release, and Counteracts Hyperdopaminergic Behaviors Induced by Methylphenidate. In: *Frontiers in pharmacology* Bd. 3 (2012), S. 11
- HOUGAARD, C ; ERIKSEN, B L ; JØRGENSEN, S ; JOHANSEN, T H ; DYHRING, T ; MADSEN, L S ; STRØBAEK, D ; CHRISTOPHERSEN, P: Selective positive modulation of the SK3 and SK2 subtypes of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. In: *British journal of pharmacology* Bd. 151 (2007), Nr. 5, S. 655–665
- HOULDEN, HENRY ; SINGLETON, ANDREW B: The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. In: *Acta neuropathologica* Bd. 124 (2012), Nr. 3, S. 325–338

- HÖGLINGER, GÜNTER U ; FÉGER, JEAN ; PRIGENT, ANNICK ; MICHEL, PATRICK P ; PARAIN, KARINE ; CHAMPY, PIERRE ; RUBERG, MERLE ; OERTEL, WOLFGANG H ; HIRSCH, ETIENNE C: Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. In: *Journal of neurochemistry* Bd. 84 (2003), Nr. 3, S. 491–502
- JELLINGER, K A: Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. In: *Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and research groups on neurochemistry and cerebrospinal fluid* Bd. 14 (1991), Nr. 3, S. 153–197
- Ji, HUIFANG ; HOUGAARD, CHARLOTTE ; HERRIK, KJARTAN FRISCH ; STRØBAEK, DORTE ; CHRISTOPHERSEN, PALLE ; SHEPARD, PAUL D: Tuning the excitability of midbrain dopamine neurons by modulating the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of SK channels. In: *The European journal of neuroscience* Bd. 29 (2009), Nr. 9, S. 1883–1895
- JØRGENSEN, SUSANNE ; DYHRING, TINO ; BROWN, DAVID T ; STRØBAEK, DORTE ; CHRISTOPHERSEN, PALLE ; DEMNITZ, JOACHIM: A high-throughput screening campaign for detection of ca(2+)-activated k(+) channel activators and inhibitors using a fluorometric imaging plate reader-based tl(+)-influx assay. In: *Assay and drug development technologies* Bd. 11 (2013), Nr. 3, S. 163–172
- KIS, BELA ; RAJAPAKSE, NISHADI C ; SNIPES, JAMES A ; NAGY, KRISZTINA ; HORIGUCHI, TAKASHI ; BUSIJA, DAVID W: Diazoxide induces delayed pre-conditioning in cultured rat cortical neurons. In: *Journal of neurochemistry* Bd. 87 (2003), Nr. 4, S. 969–980
- KÖHLER, M ; HIRSCHBERG, B ; BOND, C T ; KINZIE, J M ; MARRION, N V ; MAYLIE, J ; ADELMAN, J P: Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. In: *Science (New York, N.Y.)* Bd. 273 (1996), Nr. 5282, S. 1709–1714
- LAPOINTE, NICOLAS ; ST-HILAIRE, MICHEL ; MARTINOLI, MARIA-GRAZIA ; BLANCHET, JULIE ; GOULD, PETER ; ROUILLARD, CLAUDE ; CICHETTI, FRANCESCA: Rotenone induces non-specific central nervous system and systemic toxicity. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* Bd. 18 (2004), Nr. 6, S. 717–719
- LEE, JONG-MIN ; ANDERSON, PETER C ; PADGITT, JANETTE K ; HANSON, JANEAN M ; WATERS, CHRISTOPHER M ; JOHNSON, JEFFREY A: Nrf2, not the estrogen receptor, mediates catechol estrogen-induced activation of the antioxidant responsive element. In: *Biochimica et biophysica acta* Bd. 1629 (2003), Nr. 1-3, S. 92–101
- LOHMANN, K ; BROCKMANN, K: [Genetics of movement disorders]. In: *Der Nervenarzt* Bd. 84 (2013), Nr. 2, S. 143–150
- LOTHARIUS, JULIE ; BARG, SEBASTIAN ; WIEKOP, PIA ; LUNDBERG, CECILIA ; RAYMON, HEATHER K ; BRUNDIN, PATRIK: Effect of mutant alpha-synuclein on

- dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. In: *The Journal of biological chemistry* Bd. 277 (2002), Nr. 41, S. 38884–38894
- LOTHARIUS, JULIE ; BRUNDIN, PATRIK: Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. In: *Nature reviews. Neuroscience* Bd. 3 (2002), Nr. 12, S. 932–942
- LOTHARIUS, JULIE ; FALSIG, JEPPE ; VAN BEEK, JOHAN ; PAYNE, SARAH ; DRINGEN, RALF ; BRUNDIN, PATRIK ; LEIST, MARCEL: Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-lineage kinase pathway. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* Bd. 25 (2005), Nr. 27, S. 6329–6342
- MAREY-SEMPER, I ; GELMAN, M ; LÉVI-STRAUSS, M: A selective toxicity toward cultured mesencephalic dopaminergic neurons is induced by the synergistic effects of energetic metabolism impairment and NMDA receptor activation. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* Bd. 15 (1995), Nr. 9, S. 5912–5918
- MAXWELL, SARAH L ; LI, MENG: Midbrain dopaminergic development in vivo and in vitro from embryonic stem cells. In: *Journal of anatomy* Bd. 207 (2005), Nr. 3, S. 209–218
- MEDANA, I M ; ESIRI, M M: Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. In: *Brain : a journal of neurology* Bd. 126 (2003), Nr. Pt 3, S. 515–530
- MOOHTHA, VAMSI K ; BUNKENBORG, JAKOB ; OLSEN, JESPER V ; HJERRILD, MAJBRIIT ; WISNIEWSKI, JACEK R ; STAHL, ERICH ; BOLOURI, MARJAN S ; RAY, HETA N ; SIHAG, SMITA ; U. A.: Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. In: *Cell* Bd. 115 (2003), Nr. 5, S. 629–640
- MORIMURA, KOZO ; YAMAMURA, HISAO ; OHYA, SUSUMU ; IMAIZUMI, YUJI: Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-channel block by openers of intermediate and small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in urinary bladder smooth muscle cells. In: *Journal of pharmacological sciences* Bd. 100 (2006), Nr. 3, S. 237–241
- OLANOW, C W ; TATTON, W G: Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. In: *Annual review of neuroscience* Bd. 22 (1999), S. 123–144
- ORTH, MICHAEL ; TABRIZI, SARAH J: Models of Parkinson's disease. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* Bd. 18 (2003), Nr. 7, S. 729–737
- PAN-MONTOJO, FRANCISCO J ; FUNK, RICHARD H W: Oral administration of rotenone using a gavage and image analysis of alpha-synuclein inclusions in the enteric nervous system. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (2010), Nr. 44
- PAUL, GESINE ; CHRISTOPHERSEN, NICOLAJ S ; RAYMON, HEATHER ; KIAER,

- CAROLINE ; SMITH, RUBEN ; BRUNDIN, PATRIK: Tyrosine hydroxylase expression is unstable in a human immortalized mesencephalic cell line--studies in vitro and after intracerebral grafting in vivo. In: *Molecular and cellular neurosciences* Bd. 34 (2007), Nr. 3, S. 390–399
- PEDARZANI, P ; STOCKER, M: Molecular and cellular basis of small--and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* Bd. 65 (2008), Nr. 20, S. 3196–3217
- PEROCCHI, FABIANA ; GOHIL, VISHAL M ; GIRGIS, HANY S ; BAO, X ROBERT ; MCCOMBS, JANET E ; PALMER, AMY E ; MOOTHA, VAMSI K: MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. In: *Nature* Bd. 467 (2010), Nr. 7313, S. 291–296
- PERRY, SETH W ; NORMAN, JOHN P ; BARBIERI, JUSTIN ; BROWN, EDWARD B ; GELBARD, HARRIS A: Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. In: *BioTechniques* Bd. 50 (2011), Nr. 2, S. 98–115
- PLUMMER, HOWARD K ; YU, QIANG ; CAKIR, YAVUZ ; SCHULLER, HILDEGARD M: Expression of inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) and beta-adrenergic regulation of breast cancer cell lines. In: *BMC cancer* Bd. 4 (2004), S. 93
- POOL, MADELINE ; THIEMANN, JOACHIM ; BAR-OR, AMIT ; FOURNIER, ALYSON E: NeuriteTracer: a novel ImageJ plugin for automated quantification of neurite outgrowth. In: *Journal of neuroscience methods* Bd. 168 (2008), Nr. 1, S. 134–139
- PUSCHMANN, ANDREAS: Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: clinical phenotypes and frequencies of known mutations. In: *Parkinsonism & related disorders* Bd. 19 (2013), Nr. 4, S. 407–415
- SCHAPIRA, A H: Evidence for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease--a critical appraisal. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* Bd. 9 (1994), Nr. 2, S. 125–138
- SCHILDKNECHT, STEFAN ; PÖRTL, DOMINIK ; NAGEL, DANIEL M ; MATT, FLORIAN ; SCHOLZ, DIANA ; LOTHARIUS, JULIE ; SCHMIEG, NATHALIE ; SALVO-VARGAS, ALBERTO ; LEIST, MARCEL: Requirement of a dopaminergic neuronal phenotype for toxicity of low concentrations of 1-methyl-4-phenylpyridinium to human cells. In: *Toxicology and applied pharmacology* Bd. 241 (2009), Nr. 1, S. 23–35
- SCHOLZ, DIANA ; PÖRTL, DOMINIK ; GENEWSKY, ANDREAS ; WENG, MATTHIAS ; WALDMANN, TANJA ; SCHILDKNECHT, STEFAN ; LEIST, MARCEL: Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line. In: *Journal of neurochemistry* Bd. 119 (2011), Nr. 5, S. 957–971
- SCHÜLE, BIRGITT ; PERA, RENEE A REIJO ; LANGSTON, J WILLIAM: Can cellular models revolutionize drug discovery in Parkinson's disease? In: *Biochimica*

- et biophysica acta* Bd. 1792 (2009), Nr. 11, S. 1043–1051
- SHASTRY, B S: Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. In: *Neuroscience research* Bd. 41 (2001), Nr. 1, S. 5–12
- SHEPARD, P D ; BUNNEY, B S: Effects of apamin on the discharge properties of putative dopamine-containing neurons in vitro. In: *Brain research* Bd. 463 (1988), Nr. 2, S. 380–384
- SHERER, TODD B ; KIM, JIN HO ; BETARBET, RANJITA ; GREENAMYRE, J TIMOTHY: Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. In: *Experimental neurology* Bd. 179 (2003), Nr. 1, S. 9–16
- SHIMOHAMA, SHUN ; SAWADA, HIDEYUKI ; KITAMURA, YOSHIHISA ; TANIGUCHI, TAKASHI: Disease model: Parkinson's disease. In: *Trends in molecular medicine* Bd. 9 (2003), Nr. 8, S. 360–365
- SIMEONE, ANTONIO: Genetic control of dopaminergic neuron differentiation. In: *Trends in neurosciences* Bd. 28 (2005), Nr. 2, S. 62–5– discussion 65–6
- STOCKER, MARTIN: Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels: molecular determinants and function of the SK family. In: *Nature reviews. Neuroscience* Bd. 5 (2004), Nr. 10, S. 758–770
- STRØBAEK, DORTE ; TEUBER, LENE ; JØRGENSEN, TINO D ; AHRING, PHILIP K ; KJAER, KATRINE ; HANSEN, RIE S ; OLESEN, SØREN PETER ; CHRISTOPHERSEN, PALLE ; SKAANING-JENSEN, BO: Activation of human IK and SK Ca<sup>2+</sup> - activated K<sup>+</sup> channels by NS309 (6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime). In: *Biochimica et biophysica acta* Bd. 1665 (2004), Nr. 1-2, S. 1–5
- TAMARINA, NATALIA A ; WANG, YONG ; MARIOTTO, LORIS ; KUZNETSOV, ANDREY ; BOND, CHRIS ; ADELMAN, JOHN ; PHILIPSON, LOUIS H: Small-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels are expressed in pancreatic islets and regulate glucose responses. In: *Diabetes* Bd. 52 (2003), Nr. 8, S. 2000–2006
- TANNER, CAROLINE M ; KAMEL, FREYA ; ROSS, G WEBSTER ; HOPPIN, JANE A ; GOLDMAN, SAMUEL M ; KORELL, MONICA ; MARRAS, CONNIE ; BHUDHIKANOK, GRACE S ; KASTEN, MEIKE ; U. A.: Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. In: *Environmental health perspectives* Bd. 119 (2011), Nr. 6, S. 866–872
- TAUPIN, PHILIPPE: BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. In: *Brain research reviews* Bd. 53 (2007), Nr. 1, S. 198–214
- TEIXEIRA, J R ; LAPA, A J ; SOUCCAR, C ; VALLE, J R: Timbós: ichthyotoxic plants used by Brazilian Indians. In: *Journal of ethnopharmacology* Bd. 10 (1984), Nr. 3, S. 311–318
- TRZASKA, KATARZYNA A ; KUZHIKANDATHIL, ELDO V ; RAMESHWAR, PRANELA: Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal

- stem cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* Bd. 25 (2007), Nr. 11, S. 2797–2808
- WEI, AGUAN D ; GUTMAN, GEORGE A ; ALDRICH, RICHARD ; CHANDY, K GEORGE ; GRISSMER, STEPHAN ; WULFF, HEIKE: International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. In: *Pharmacological reviews* Bd. 57 (2005), Nr. 4, S. 463–472
- WOLFART, J ; NEUHOFF, H ; FRANZ, O ; ROEPER, J: Differential expression of the small-conductance, calcium-activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neurons. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* Bd. 21 (2001), Nr. 10, S. 3443–3456
- WOOD, P G: The spontaneous activation of a potassium channel during the preparation of resealed human erythrocyte ghosts. In: *Biochimica et biophysica acta* Bd. 774 (1984), Nr. 1, S. 103–109
- XIE, HONG-RONG ; HU, LIN-SEN ; LI, GUO-YI: SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. In: *Chinese medical journal* Bd. 123 (2010), Nr. 8, S. 1086–1092
- XIONG, NIAN ; LONG, XI ; XIONG, JING ; JIA, MIN ; CHEN, CHUNNUAN ; HUANG, JINSHA ; GHOORAH, DEVINA ; KONG, XIANGQUAN ; LIN, ZHICHENG ; U. A.: Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. In: *Critical reviews in toxicology* Bd. 42 (2012), Nr. 7, S. 613–632
- ZENG, XIANMIN ; CAI, JINGLI ; CHEN, JIA ; LUO, YONGQUAN ; YOU, ZHI-BING ; FOTTER, ERIN ; WANG, YUN ; HARVEY, BRANDON ; MIURA, TAKUMI ; U. A.: Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* Bd. 22 (2004), Nr. 6, S. 925–940
- ZISCHKA, HANS ; LAROCLETTE, NATHANAEL ; HOFFMANN, FLORIAN ; HAMÖLLER, DANIELA ; JÄGEMANN, NORA ; LICHTMANNEGGER, JOSEF ; JENNEN, LUISE ; MÜLLER-HÖCKER, JOSEF ; ROGGEL, FRIGGA ; U. A.: Electrophoretic analysis of the mitochondrial outer membrane rupture induced by permeability transition. In: *Analytical chemistry* Bd. 80 (2008), Nr. 13, S. 5051–5058