

Aus dem

Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie
der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling



Elektrophysiologische Charakterisierung und Nachweis einer funktionellen Expression Barium-sensitiver Kaliumkanäle in Gliomzellen

Inauguraldissertation zur Erlangung
des akademischen Grades Doktor der Medizin
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Annett Madadi
aus Berlin

März 2020



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine
Bearbeitungen 4.0 International Lizenz.

| | |
|-----------------------|---|
| Dekan | Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger |
| 1. Gutacher | Prof. Dr. med. Timo Kirschstein Oscar Langendorff Institut für Physiologie, Universitätsmedizin Rostock |
| 2. Gutachterin | Prof. Dr. med. Astrid Bertsche Kinder- und Jugendklinik, Universitätsmedizin Rostock |
| 3. Gutacher | Prof. Dr. med. Toni Schneider Institut für Neurophysiologie Universitätsklinikum Köln |

Datum der Einreichung: 11.03.2020

Datum der Verteidigung: 02.12.2020

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|------------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | III |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | V |
| TABELLENVERZEICHNIS | VI |
| ZUSAMMENFASSUNG | VII |
| I. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 GLIOME | 1 |
| 1.1.1 <i>Epidemiologie</i> | 1 |
| 1.1.2 <i>Einteilung und Ätiologie</i> | 2 |
| 1.1.3 <i>Symptome</i> | 3 |
| 1.1.4 <i>Das Glioblastoma multiforme</i> | 6 |
| 1.1.5 <i>Fokus der Forschung und Ausblick</i> | 8 |
| 1.2 KALIUMKANÄLE | 10 |
| 1.2.1 <i>Struktur und Funktion</i> | 10 |
| 1.2.2 <i>Einwärtsgerichtete Kaliumkanäle</i> | 11 |
| 1.3 ZELLINIEN..... | 17 |
| 1.4 ZIELE DER ARBEIT | 18 |
| II. MATERIAL UND METHODEN | 19 |
| 2.1 GERÄTE UND MATERIALIEN..... | 19 |
| 2.2 LÖSUNGEN UND PHARMAKA..... | 23 |
| 2.3 ZELLKULTUR..... | 25 |
| 2.3.1 <i>Subkultivierung</i> | 25 |
| 2.3.2 <i>Einfrieren und Auftauen der Zellen</i> | 25 |
| 2.4 PROTEINEXTRAKTION UND WESTERN BLOT | 26 |
| 2.5 ISOLIERUNG VON RNA AUS ZELLKULTUREN UND CDNA-SYNTHESE | 27 |
| 2.6 QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR (QRT-PCR) | 28 |
| 2.7 PATCH-CLAMP | 29 |
| 2.7.1 <i>Elektrophysiologische Grundlagen und Funktionsprinzip</i> | 29 |
| 2.7.2 <i>Messplatz und Durchführung</i> | 31 |
| 2.7.3 <i>Datenaufnahme und statistische Analyse</i> | 33 |
| 2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG | 36 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| III. | ERGEBNISSE | 37 |
| 3.1 | DIFFERENZIELLE EXPRESSION DES KIR4.1 | 37 |
| 3.2 | ETABLIERUNG DER ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN AN ZELLKULTUREN..... | 40 |
| 3.3 | ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ZELLEN..... | 41 |
| 3.3.1 | <i>Gliomzelllinie C6 GFP</i> | 43 |
| 3.3.2 | <i>Glioblastomzelllinie HROG05</i> | 44 |
| 3.3.3 | <i>Glioblastomzelllinie HROG38</i> | 45 |
| 3.4 | UNTERSCHIEDE IM RUHEMEMBRANPOTENZIAL DER ZELLINIEN..... | 46 |
| 3.5 | FUNKTIONELLE EXPRESSION EINES BARIUMSENSITIVEN STROMS..... | 46 |
| 3.5.1 | <i>C6</i> | 47 |
| 3.5.2 | <i>HROG38</i> | 49 |
| 3.5.3 | <i>HROG05</i> | 51 |
| 3.6 | BARIUMABHÄNGIGE DEPOLARISATION DER ZELLEN | 52 |
| 3.7 | BARIUMABHÄNGIGER ANSTIEG DES MEMBRANWIDERSTANDES..... | 53 |
| IV. | DISKUSSION | 55 |
| 4.1 | DIFFERENZIELLE EXPRESSION: RNA- UND PROTEINEBENE..... | 56 |
| 4.2 | ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ZELLINIEN..... | 57 |
| 4.3 | DIFFERENZIELLE EXPRESSION EINES BA ²⁺ -SENSITIVEN STROMS..... | 58 |
| 4.4 | BARIUMEFFEKT AUF DAS MEMBRANPOTENZIAL..... | 59 |
| 4.5 | AUSBlick..... | 60 |
| V. | THESEN | 62 |
| VI. | ANHANG | 64 |
| VII. | DANKSAGUNG | 66 |
| VIII. | LITERATURVERZEICHNIS | 67 |
| IX. | CURRICULUM VITAE | 85 |
| X. | VERÖFFENTLICHUNGSVEREICHNIS | 87 |
| XI. | EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG | 88 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Physikalische Formelzeichen, deren SI-Einheiten, sowie allgemein gebräuchliche Abkürzungen werden nicht gesondert aufgeführt

| | |
|------------|---|
| A | Adenin |
| AK | Antikörper |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| Aqua dest. | einfach destilliertes Wasser |
| ATP | Adenosin-5'-Triphosphat |
| BRAF | Protoonkogen |
| C | Cytosin |
| cDNA | Komplementäre DNS, <i>engl. complementary DNA</i> , |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DNA | Desoxyribunukleinsäure, <i>engl. desoxyribonucleic acid</i> |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| EORTC | Europäische Krebsforschungsgesellschaft (<i>engl. European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>) |
| EGFR | Wachstumsfaktorrezeptor, <i>engl. epidermal growth factor receptor</i> |
| E_K | Kaliumgleichgewichtspotenzial |
| FBS | Fetales Kälberserum, <i>engl. fetal bovine serum</i> |
| FGFR-TACC | Fusionsprotein infolge Translokation zwischen dem Fibroblastenwachstumsfaktor, <i>engl. fibroblast growth factor receptor</i> und dem <i>transforming acidic coiled-coil-containing protein 3</i> |
| G | Guanin |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GEKID | Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| GTP | Guanosin-5'-Triphosphat |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazino)-Ethansulfonsäure |
| HGFR | Hepatozytenwachstumsfaktorrezeptor, <i>engl. hepatocyte growth factor receptor</i> |
| ICD | Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, <i>engl. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i> |
| IDH | Isocitrat-Dehydrogenase |
| I_H | Haltestrom |

| | |
|----------------|---|
| Kir | einwärtsgerichteter Kaliumkanal, <i>engl. inward rectifier</i> |
| LOH 1p/19q | 1p19q-Ko-Deletion, <i>engl. LOH für loss of heterozygosity</i> |
| MDR-Proteine | <i>engl. multidrug resistance-related</i> Proteine |
| MGMT | O6-Methylguanymethyltransferase |
| mRNA | Boten-RNA, <i>engl. messenger RNA</i> |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MS | Multiple Sklerose |
| n | Anzahl |
| NCIC | Kanadisches Krebsforschungsinstitut <i>engl. National Cancer Institute of Canada</i> |
| PBS | phosphatgepufferte Kochsalzlösung, <i>engl. phosphate buffered saline</i> |
| PDGFR | <i>engl. platelet-derived growth factor receptor</i> |
| PGK1 | Gen, das die Phosphoglyceratkinase kodiert |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| qPCR | quantitative Polymerasekettenreaktion, <i>engl. polymerase chain reaction</i> |
| RKI | Robert-Koch-Institut |
| RMP | Ruhemembranpotenzial |
| RNA | Ribonukleinsäure, <i>engl. ribonucleic acid</i> |
| RNAse | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen per Minute, <i>engl. rounds per minute</i> |
| RT und RTase | Reverse Transkription & Reverse Transkriptase |
| S18 | ribosomales Protein S18, Haushaltsgen |
| SDS | Natriumdodecylsulfat, <i>engl. sodium dodecyl sulfate</i> |
| SEM | Standardabweichung vom Mittelwert, <i>engl. standard error of the mean</i> |
| T | Thymin |
| Taq-Polymerase | Polymerase, die aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i> isoliert wurde |
| TMZ | Temozolomid |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Enzymaktivitätseinheit, <i>engl. unit</i> |
| VEGF | vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, <i>engl. vascular endothelial growth factor</i> |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation, <i>engl. World Health Organisation</i> |
| ZNS | Zentralnervensystem |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| ABBILDUNG 1 – VERGLEICH DER UNTEREINHEITEN EINES (A) K2P-KANALS UND EINES (B) KIR-KANALS..... | 11 |
| ABBILDUNG 2 – KIR-KANAL-FAMILIE | 13 |
| ABBILDUNG 3 – STANDARDPIPETTIERPROTOKOLL cDNA-SYNTHESE | 27 |
| ABBILDUNG 4 – PATCH CLAMP KONFIGURATIONEN - SCHEMA | 30 |
| ABBILDUNG 5 – SCHALTREIS WHOLE-CELL-KONFIGURATION..... | 31 |
| ABBILDUNG 6 – STROMANTWORT AM OSZILLOSKOP AUF SPANNUNGSIMPULS VOR MESSVORGANG | 33 |
| ABBILDUNG 7 – VOLTAGE-CLAMP-MESSPROTOKOLL UND STROMANTWORT C6 GLIOMZELLE | 34 |
| ABBILDUNG 8 – CURRENT-CLAMP-MESSPROTOKOLL UND STROMANTWORT C6 GLIOMZELLE | 35 |
| ABBILDUNG 9 – SCHEMA ZUR BESTIMMUNG DER MEMBRANZEITKONSTANTE, DETAIL AUS ABBILDUNG 8 | 35 |
| ABBILDUNG 10 – QUANTITATIVE RT-PCR: KIR4.1 EXPRESSION DER HUMANEN ZELLINIEN..... | 37 |
| ABBILDUNG 11 – QUANTITATIVE REAL TIME PCR: KIR4.1 EXPRESSION DER HUMANEN ZELLINIEN | 38 |
| ABBILDUNG 12 – QUANTITATIVE REAL TIME PCR: KIR4.1 EXPRESSION DER MURINEN ZELLINIEN | 38 |
| ABBILDUNG 13 – WESTERN BLOT: AUSWERTUNG DER KIR4.1-EXPRESSION IN RELATION ZUR GAPDH-EXPRESSION..... | 39 |
| ABBILDUNG 14 – WESTERN BLOT: KIR4.1-EXPRESSION | 40 |
| ABBILDUNG 15 – C6 GFP-GLIOMZELLE WÄHREND WHOLE-CELL PATCH-CLAMP-MESSUNG | 43 |
| ABBILDUNG 16 – HROG05-GLIOBLASTOMZELLE WÄHREND WHOLE-CELL PATCH-CLAMP-MESSUNG | 44 |
| ABBILDUNG 17 – HROG038-GLIOBLASTOMZELLE WÄHREND WHOLE-CELL PATCH-CLAMP-MESSUNG | 45 |
| ABBILDUNG 18 – RUHEMEMBRANPOTENZIAL DER ZELLINIEN..... | 46 |
| ABBILDUNG 19 – BEISPIELSPUR C6 GFP | 47 |
| ABBILDUNG 20 – RELATIVER BARIUMSENSITIVER STROM C6 | 47 |
| ABBILDUNG 21 – STROM-SPANNUNGS-KENNLINIE C6-GFP..... | 48 |
| ABBILDUNG 22 C6-GFP BARIUMSENSITIVER STROM | 48 |
| ABBILDUNG 23 – BEISPIELSPUR HROG38..... | 49 |
| ABBILDUNG 24 – STROM-SPANNUNGS-KENNLINIE HROG38..... | 49 |
| ABBILDUNG 25 – HROG38 BARIUMSENSITIVER STROM | 50 |
| ABBILDUNG 26 – RELATIVER BARIUMSENSITIVER STROM HROG38..... | 50 |
| ABBILDUNG 27 – BEISPIELSPUR HROG05..... | 51 |
| ABBILDUNG 28 – STROM-SPANNUNGS-KENNLINIE HROG05..... | 51 |
| ABBILDUNG 29 – BARIUMSENSITIVER STROM HROG05 | 52 |
| ABBILDUNG 30 – BEEINFLUSSUNG DES RUHEMEMBRANPOTENZIALS DURCH BARIUMAPPLIKATION | 53 |
| ABBILDUNG 31 – BEEINFLUSSUNG DES MEMBRANWIDERSTANDES DURCH BARIUMAPPLIKATION | 54 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| TABELLE 1 – PATIENTINNENDATEN ZU DEN GLIOBLASTOMZELLINIEN | 18 |
| TABELLE 2 – GERÄTE | 20 |
| TABELLE 3 – VERBRAUCHSMATERIALIEN | 20 |
| TABELLE 4 – CHEMIKALIEN, ENZYME, ANTIKÖRPER, KITS | 22 |
| TABELLE 5 – SOFTWARE | 22 |
| TABELLE 6 – ZUSAMMENSETZUNG EXTRAZELLULÄRLÖSUNG | 23 |
| TABELLE 7 – ZUSAMMENSETZUNG INTRAZELLULÄRLÖSUNG | 23 |
| TABELLE 8 – ELEKTROPHORESEGEL | 24 |
| TABELLE 9 – ZUSAMMENSETZUNG PROBENPUFFER NACH LÄMMLI | 24 |
| TABELLE 10 – ZUSAMMENSETZUNG RIPA-PUFFER..... | 24 |
| TABELLE 11 – STRIPPINGPUFFER..... | 24 |
| TABELLE 12 – ANSATZ qRT-PCR | 29 |
| TABELLE 13 – QUANTITATIVE RT-PCR PROGRAMM | 29 |
| TABELLE 14 – ELEKTROPHYSIOLOGISCHE ZELLPARAMETER C6-GFP | 43 |
| TABELLE 15 – ELEKTROPHYSIOLOGISCHE ZELLPARAMETER HROG05 | 44 |
| TABELLE 16 – ELEKTROPHYSIOLOGISCHE ZELLPARAMETER HROG38 | 45 |
| TABELLE 17 – VERZEICHNIS DER VERWENDETEN PRIMER | 64 |
| TABELLE 18 – VERWENDETE ANTIKÖRPER | 65 |
| TABELLE 19 – PROTOKOLL FÜR P-97 SUTTER PIPETTE PULLER | 65 |
| TABELLE 20 – MITTELWERTVERGLEICH QUANTITATIVE RTPCR | 65 |

ZUSAMMENFASSUNG

Glioblastome sind die häufigsten malignen Hirntumore und gehen mit äußerst schlechten Prognosen einher. Während ihre molekularbiologische Charakterisierung in der neuroonkologischen Forschung einen großen Stellenwert hat, gibt es bisher wenig Daten zur Elektrophysiologie dieser Tumorzellen. Der einwärtsgerichtende Kaliumkanal Kir4.1 spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation von Proliferation und Differenzierung von Glia und der Modulation der neuronalen Erregbarkeit. Da in der Literatur ein Verlust der Kir4.1-Funktion in Gliomzellen beschrieben ist, zielte diese Arbeit darauf ab, die an der Universität Rostock etablierten Glioblastomzelllinien bezüglich der Expression des Kanals zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zelllinien auf molekularbiologischer Ebene eine differenzielle Expression des Kir4.1 aufweisen. So zeigten sowohl quantitative PCR-Untersuchungen als auch Western-Blot-Experimente, dass die auf Haushaltsgene normierten Expressionslevel teils stark reduziert sind, teilweise aber auch in der Größenordnung von gesundem Gewebe liegen. In den darauffolgenden elektrophysiologischen Untersuchungen konnte für die Glioblastomzelllinie HROG38 und die murine Gliomzelllinie C6 ein Barium-sensitiver Strom nachgewiesen, dessen einwärtsgerichtete Komponente am ehesten das funktionelle Korrelat des Kir4.1 darstellt. Die Patch-Clamp-Experimente zeigten auch, dass der Nachweis eines Barium-sensitiven Stroms mit Membranpotenzialen einhergeht, die nahe der für Gliazellen physiologische Werte liegen. So weist die Zelllinie HROG05, die keinen signifikanten Barium-sensitiven Strom und vor allem keinen einwärtsgerichteten Strom zeigte, ein deutlich depolarisiertes Membranpotenzial auf. Für die Zelllinien HROG38 und C6 lag das Membranpotenzial deutlich näher an physiologischen Werten und zeigte dazu auch eine signifikante und reversible Barium-abhängige Depolarisation.

Somit konnte in dieser Arbeit eine residuale Expression eines Barium-sensitiven Stroms mit zumindest geringer einwärtsgerichteter Komponente als möglicherweise funktionelles Kir4.1-Korrelat nachgewiesen werden. In weiterführenden Experimenten könnte untersucht werden, inwiefern diese differenzielle Expression das Proliferationsverhalten *in vivo* und *in vitro*, sowie klinische Symptome wie das Auftreten einer Tumor-assoziierten Epilepsie beeinflusst und ob der Kir4.1 sich gegebenenfalls als Biomarker oder therapeutische Zielstruktur eignet.

I. EINLEITUNG

1.1 GLIOME

Maligne Hirntumoren gehören zu den Krebsarten mit den schlechtesten Prognosen. Aufgrund ihrer Lokalisation und der daraus resultierenden Symptomatik schränken sie früh die Lebensqualität der Betroffenen ein. Weiterhin gelten sie trotz Fortschritten in der onkologischen Therapie in den letzten Jahrzehnten – mit Ausnahme der nicht-infiltrativ wachsenden Gliome WHO Grad I – weiterhin als nicht heilbar (Claus *et al.*, 2016). Dies liegt einerseits an den Grenzen der chirurgischen Therapie mit einer nur begrenzt möglichen radikalen Tumorsektion dieser sehr invasiv wachsenden Tumore (Louis, 2006), aber auch an Herausforderungen in der pharmakologischen Therapie. Dabei besteht einerseits die Schwierigkeit, im Hinblick auf Hirntumore wirksame Chemotherapeutika zu entwickeln und die zusätzliche Hürde, diese an ihren Wirkungsort hinter die Blut-Hirn-Schranke zu bringen (Van Tellingen *et al.*, 2015).

1.1.1 Epidemiologie

Die systematische Erfassung von sowohl benignen als auch malignen Hirntumoren erfolgt weltweit bisher weder einheitlich noch flächendeckend. Dies führt zu großen Schwankungen der epidemiologischen Daten (De Robles *et al.*, 2015). Im deutschsprachigen Raum erfassen die Krebsregister bösartige Tumoren des Gehirns (ICD-10: C71) zusammengefasst mit Neoplasien der Hirnhäute (ICD-10: C70) und des Zentralnervensystems (ICD-10: C72). Derzeit werden in Deutschland pro Jahr bei Männern ca. 3.900 und bei Frauen ca. 3.000 solcher Neuerkrankungen erfasst, davon sind etwa 95% primäre bösartige Tumoren des Gehirns (Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2017). Mit weltweiten Inzidenzraten von etwa 4-5 auf 100.000 Einwohner und einem Anteil von etwa 80% sind Gliome darunter die mit Abstand häufigste Tumorentität (Larjavaara *et al.*, 2007; Gousias *et al.*, 2009; Ostrom *et al.*, 2017). Das mittlere Erkrankungsalter ist stark abhängig vom Tumor-Subtyp und liegt für Oligodendrogliome bei etwa 43 Jahren, wohingegen das Glioblastom mit einem medianen Erkrankungsalter von 64 Jahren deutlich später auftritt (Ostrom *et al.*, 2017).

Während die altersstandardisierten Erkrankungsinzidenzen in den letzten 10 bis 15 Jahren weitestgehend stabil sind, nimmt die absolute Zahl der Erkrankungen aufgrund demographischer Entwicklungen durch die Veränderung der Altersstruktur zu (Hofer *et al.*, 2017). Somit ist in Zukunft mit einer zunehmenden Anzahl von betroffenen PatientInnen zu rechnen.

1.1.2 Einteilung und Ätiologie

Grundsätzlich werden je nach Zelltyp astrozytische, oligodendrogliale und ependymale Gliome unterschieden (Louis *et al.*, 2007). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterteilt jedoch seit 2016 erstmals Tumoren des Zentralnervensystems nicht mehr nur primär aufgrund ihrer histomorphologischen Merkmale, sondern berücksichtigt ebenfalls ihre Molekulargenetik (Louis *et al.*, 2016). Dieser Ansatz der Integration von genomischen Charakteristika neben dem bisher vorherrschenden Fokus auf phänotypische Merkmale hat zu einer großen Umstrukturierung der Kategorien geführt. Dies spiegelt die derzeitige Tendenz zur detaillierten molekularen Charakterisierung dieser Tumore wider, immer mit dem Ausblick auf sowohl ein besseres Verständnis der Tumoren als auch auf eine gezieltere und individualisierte Therapie. Aus der molekularen Charakterisierung ergibt sich eine Einteilung der diffusen astrozytären und oligodendroglialen Gliome in drei große Gruppen, die sich daneben auch in der Morphologie und Prognose unterscheiden: diffuse Gliome ohne IDH-Mutation und diffuse Gliome mit IDH-Mutation, die wiederum potenziell in Kombination mit einer 1p/19q-Kodeletion auftreten können (Louis *et al.*, 2016). Neben der Feststellung der Tumorentität und molekularen Marker gehört auch die Bestimmung des Differenzierungsgrades des Gewebes zur Diagnose. Die aktuelle Unterteilung der WHO unterscheidet weiterhin Gliome von Grad I bis Grad IV (Louis *et al.*, 2016). Diese Gradierung wird vorgenommen anhand von histologischen Kriterien wie Zell- und Kernmorphologie, Zelldichte, Mitoseraten und dem Auftreten pathologischer Mitosen und Gewebnekrosen. Sie ist ein indirektes Maß für die Malignität des Tumors und geht mit entsprechenden Überlebensraten einher.

Die Ätiologie sporadischer Gliome ist größtenteils ungeklärt. Das spontane Auftreten von Gliomen korreliert mit weißer Hautfarbe (Ohgaki und Kleihues, 2005), männlichem Geschlecht (Rice *et al.*, 2015a) und für niedergradige Gliome auch mit höherem

sozioökonomischem Status (Inskip *et al.*, 2003). Als bisher einziger gesicherter exogener Risikofaktor gilt ionisierende Strahlung, wie beispielsweise eine therapeutische Schädelbestrahlung in der Kindheit im Rahmen einer Leukämie (Shapiro, Mealey und Sartorius, 1989; Ostrom *et al.*, 2018). Bereits im Jahr 2000 wurde außerdem ein möglicher Zusammenhang zwischen der Entstehung von Hirntumoren und der Nutzung von Mobiltelefonen diskutiert (Muscat *et al.*, 2000). Trotz diverser Studien zu dieser Fragestellung seither konnte bisher kein eindeutiger Zusammenhang nachgewiesen werden (Ostrom *et al.*, 2014). Angesichts der möglicherweise langen Latenzzeit zwischen Strahlenexposition und Tumorentstehung und der zunehmenden Verbreitung von Mobiltelefonen ist dies jedoch weiterhin Gegenstand von Untersuchungen. Ebenfalls erwägt werden Infektionskrankheiten als Risikofaktor für die Entstehung von Hirntumoren, bisher jedoch ohne eindeutige Ergebnisse (Wrensch *et al.*, 2002).

Etwa fünf bis zehn Prozent aller Gliome treten familiär gehäuft auf, so zum Beispiel im Rahmen von Syndromen wie dem Li-Fraumeni-Syndrom, dem Cowden-Syndrom, der Tuberösen Sklerose, dem Lynch-Syndrom und der Neurofibromatose Typ 1 und Typ 2 (Li *et al.*, 1995; Wrensch *et al.*, 2002; Hottinger und Khakoo, 2009). Darüber hinaus wurden unabhängig von diesen Syndromen einige Genvarianten identifiziert, die mit einem erhöhten Risiko assoziiert sind, an einem Gliom zu erkranken. Bisher eignen sich diese allerdings nicht für großflächige Screeninguntersuchungen (Rice *et al.*, 2015b).

1.1.3 Symptome

Die klinische Präsentation von Gliomen ist äußerst variabel und in erster Linie von der Lokalisation des Tumors abhängig. Im Durchschnitt liegen etwa drei Monate zwischen der Manifestation erster Symptome und der Diagnosestellung (Rasmussen *et al.*, 2017). Etwa 35-50% der PatientInnen klagen bei Diagnosestellung über Kopfschmerzen, diese sind oft unspezifisch was Lokalisation und Schmerzmuster angeht (Valentinis *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2017). Hinweisend auf sekundäre Kopfschmerzen sind eine zunehmende Verschlechterung, Übelkeit und Erbrechen, sowie Einseitigkeit und Neuauftreten bei PatientInnen über 50 Jahren (Omuro und DeAngelis, 2013). Unspezifische Symptome wie kognitive Einschränkungen oder Persönlichkeitsveränderungen können unter Umständen fälschlicherweise auf eine

psychiatrische Erkrankung, oder insbesondere bei älteren PatientInnen auf eine Demenz zurückgeführt werden. Große Tumoren führen aufgrund ihrer raumfordernden Wirkung teilweise zu Gangstörungen und Inkontinenz. Aggressive und hochproliferative Gliome gehen oft mit einem perifokalen Ödem einher, das sich in einer akuten Hirndrucksymptomatik mit Kopfschmerzen, sowie Übelkeit und Erbrechen manifestieren kann (Omuro und DeAngelis, 2013). Je nach Lokalisation des Tumors kommt es außerdem zu entsprechenden fokal-neurologischen Symptomen, wie motorische Ausfälle, Parästhesien, Aphasien oder Sehstörungen (Posti *et al.*, 2015).

Im Rahmen einer Gliomerkrankung kommt es sehr häufig zu epileptischen Anfällen. Die Prävalenz bei PatientInnen mit niedriggradigen Gliomen liegt bei 70-90%, häufig sind Krampfanfälle sogar eines der ersten klinischen Symptome der Tumorerkrankung (Wick *et al.*, 2005; Van Breemen *et al.*, 2009; Kerkhof und Vecht, 2013). Für die Gruppe der PatientInnen mit Glioblastomen schwanken die Häufigkeitsangaben in der Literatur, doch auch sie sind bis zu 60% von sekundären Krampfanfällen betroffen (Wick *et al.*, 2005; Kerkhof *et al.*, 2013). Die Anfälle können sich sowohl als einfach-fokale oder komplex-fokale mit oder ohne sekundäre Generalisation manifestieren und sind in etwa der Hälfte der Fälle pharmakoresistent (Chang *et al.*, 2008; Rudà *et al.*, 2012). Die antiepileptische Therapie im Rahmen von Glioblastomen stellt eine eher palliative Maßnahme da, um die Lebensqualität während der limitierten Lebenserwartung nicht noch weiter einzuschränken. Dagegen stellen therapierefraktäre epileptische Anfälle bei PatientInnen mit niedriggradigen Gliomen angesichts der deutlich längeren Lebenserwartung eine große Herausforderung dar. Die PatientInnen sind hier über Jahre nicht nur von möglichen kognitiven Einbußen infolge der Tumorerkrankung und epileptischen Anfällen betroffen, sondern zusätzlich auch von typischen unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Antikonvulsiva wie Gedächtnis- und Konzentrationsstörungen (Klein *et al.*, 2003). Im Allgemeinen führt eine Tumorkontrolle begleitend auch zu einer Verbesserung des sekundären Anfallsleidens. Einen großen Stellenwert hat hier die chirurgische Therapie. Das Ausmaß der Resektion korreliert direkt mit der postoperativen Anfallsfreiheit. Nach einer makroskopisch vollständigen Resektion sind 89% der PatientInnen anfallsfrei, nach einer anteiligen Resektion liegt dieser Anteil nur bei 56,7% (Chang *et al.*, 2008). Die operative Therapie ist also nicht nur im Hinblick auf den onkologischen Krankheitsverlauf relevant,

sondern auch für die Symptomkontrolle. Ebenso führen Radio- und eine Chemotherapie mit Temozolomid zu einer Reduktion der Anfälle oder sogar zu Anfallsfreiheit (Brojna, Robles und Duffau, 2008). Insgesamt leiden jedoch bis zu ein Drittel der Betroffenen auch nach (sub)totaler Resektion an therapierefraktären sekundären Krampfanfällen (Brojna, Robles und Duffau, 2008; Smits und Duffau, 2011). So ist perioperativ oder bei refraktärer Epilepsie oft eine antikonvulsive medikamentöse Therapie nötig. Diese gestaltet sich zuweilen komplex. Neben der Expression von MDR-Proteinen der Tumorzellen, die das Erreichen therapeutischer Plasmaspiegel erschweren (Brojna, Robles und Duffau, 2008), gibt es zusätzlich potenzielle Wechselwirkungen im Rahmen der multimodalen Antitumorthherapie. Dabei gilt es, therapeutische Plasmaspiegel der Antiepileptika zu erreichen, ohne mit der Wirksamkeit einer parallel erfolgenden Chemotherapie zu interferieren (Wick *et al.*, 2005). Daher werden unter anderem Antikonvulsiva wie Carbamazepin oder Phenytoin, die zu einer Enzyminduktion führen, nur ungern eingesetzt (Vecht, Wagner und Wilms, 2003). Daneben geht eine simultane antiepileptische und Chemotherapie mit einem erhöhten Risiko an Nebenwirkungen und einer kumulativen Toxizität einher. Dazu gehören beispielsweise unerwünschte hämatologische Arzneimittelwirkungen wie Myelosuppression mit Thrombozytopenien und Neutropenien unter Valproattherapie, oder einer Leukopenie infolge Carbamazepineinnahme (Evans *et al.*, 1989; Bourg *et al.*, 2001; Nasreddine und Beydoun, 2008). Die Überschneidung von Gliomen und Tumor-assoziiertes Epilepsie hat jedoch auch zur Identifizierung potenzieller neuer therapeutischer Strategien geführt. Epileptische Anfälle im Rahmen einer höhergradigen Gliom- und Glioblastomkrankung sind im Allgemeinen mit einer besseren Prognose assoziiert, was dazu führte, dass Antiepileptika auf ihr onkologisches Potenzial untersucht wurden (Lote *et al.*, 1998; Berendsen *et al.*, 2016). Infolgedessen wurde beobachtet, dass Valproat eine prognoseverbessernde Wirkung hat (Weller *et al.*, 2011). In einer retrospektiven Analyse zeigten Kerkhof *et al.*, dass bei PatientInnen mit Glioblastom eine Valproattherapie in Kombination mit einer Radiochemotherapie mit Temozolomid mit einem um zwei Monate verlängerten medianen Überleben einhergeht (Kerkhof *et al.*, 2013). Als Ursache wird eine Hemmung von Histon-Deacetylasen vermutet (Göttlicher *et al.*, 2001). Daneben werden durch Valproat auch diverse Signalkaskaden beeinflusst, darunter auch der MAP-Kinase- Signalweg (Gurvich *et al.*,

2004). In vitro wurde ein antiproliferativer und Apoptose-induzierender Effekt auf Tumorzellen (Göttlicher *et al.*, 2001) und in vivo eine wahrscheinliche Wirkverstärkung einer Temozolomid- und Strahlentherapie des Glioblastoms beschrieben (Weller *et al.*, 2011; Van Niffterik *et al.*, 2012; Barker *et al.*, 2013). Bislang wurden klinische Daten jedoch vor allem retrospektiv ausgewertet. Eine prospektive Phase II Studie zeigte eine gute Verträglichkeit der Kombination aus Radiochemotherapie mit Temozolomid und Valproat und möglicherweise eine verbesserte Prognose (Krauze *et al.*, 2015). Ergebnisse aus prospektiven randomisierten Studien stehen noch aus. Auch weitere Antiepileptika wie Levetiracetam werden im Hinblick auf ihr onkologisches Potenzial untersucht (Bobustuc *et al.*, 2010).

1.1.4 Das Glioblastoma multiforme

Das Glioblastom ist entsprechend seiner Gradierung als WHO Grad IV Tumor das bösartigste unter den Gliomen. Es ist nicht nur der häufigste Gliom-Subtyp, sondern ist mit ca. 47% (Ostrom *et al.*, 2017) auch der häufigste aller primären, malignen Tumoren des Gehirns und des Zentralnervensystems insgesamt. Die altersbereinigten Inzidenzraten liegen in Europa und Nordamerika bei etwa 2-4 pro 100.000 Einwohner (Ohgaki *et al.*, 2004; Gousias *et al.*, 2009; Arora *et al.*, 2010; Ostrom *et al.*, 2017). Trotz der Fortschritte in der Therapie, die zu Beginn des 21. Jahrhunderts durch die Einführung des alkylierenden Chemotherapeutikums Temozolomid erreicht wurden, sind die Prognosen weiterhin desolat. Auch nach Ausschöpfung aller Therapieoptionen liegt das mediane Überleben nur bei etwa 14,7 Monaten ab Diagnosestellung (Stupp *et al.*, 2009). Der Anteil an Langzeitüberlebenden, d.h. PatientInnen, die drei Jahren nach Erstdiagnose noch am Leben sind, liegt bei nur 10,1% (Ostrom *et al.*, 2017). Bedeutende prognostische Faktoren im Hinblick auf das Überleben sind das Alter bei Diagnosestellung, die Vollständigkeit der Tumorresektion, das Ausmaß von Tumornekrosen und der Karnovsky-Index als Maß für den Allgemeinzustand der PatientIn (Lacroix *et al.*, 2001; Bauchet *et al.*, 2010).

Infolge ihres Entstehungsmechanismus aus astrozytären, oligodendroglialen und neuralen Stammzellen werden sie in primäre und sekundäre Glioblastome eingeteilt (Crespo *et al.*, 2015). Obgleich beide histomorphologisch kaum zu differenzieren sind, unterscheiden sie sich aufgrund ihrer Entwicklung deutlich in ihrer Tumorbio-

gie. Etwa 90-95% sind de novo entstehende primäre Glioblastome mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von etwa 62 Jahren; das sekundäre Glioblastom dagegen entwickelt sich aus niedergradigen Gliomen und betrifft in der Regel jüngere PatientInnen in der vierten Lebensdekade (Ohgaki *et al.*, 2004). Dabei findet sich der Tumor oft im Frontalhirn, der Anteil der Tumornekrosen ist geringer und die Prognose ist im Allgemeinen deutlich besser (Homma *et al.*, 2006; Stockhammer *et al.*, 2012). Ebenso unterscheiden sie sich auf molekularer Ebene. Als objektiver Marker für die Identifizierung unabhängig von klinischen Kriterien dient am ehesten die IDH1-Mutation, die in erster Linie mit sekundären Glioblastomen assoziiert ist (Ohgaki und Kleihues, 2013). Daneben wurden viele andere genetische Alterationen beschrieben, die an der Entstehung von Glioblastomen beteiligt sind: darunter eine MGMT-Hypermethylierung, eine Überexpression des EGF-Rezeptors, aber auch Mutationen anderer Wachstumsfaktorrezeptoren wie des VEGF-Rezeptors, aber auch PTEN-Mutationen oder die Deletion des Chromosoms 10 (Fujimoto *et al.*, 1989; Plate *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1997; Hegi *et al.*, 2005; Ohgaki und Kleihues, 2013).

In Abhängigkeit von Tumorstadium, PatientInnenalter, Allgemeinzustand und klinischer Symptomatik stehen multimodale Therapiekonzepte zur Wahl. Der Goldstandard in der Therapie eines neu diagnostizierten Glioblastoms ist derzeit die chirurgische Resektion mit adjuvanter Radio- und Chemotherapie (Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 2015). Die Ziele sind sowohl eine Zytoreduktion im Hinblick auf die folgende Chemotherapie, eine Verringerung der raumfordernden Wirkung, aber auch die Gewinnung von Material für histologische und molekulare Analysen. Da das Ausmaß der Resektion prognosebestimmend ist, wird eine vollständige Entfernung des Tumors angestrebt (Lacroix *et al.*, 2001; Hottinger, Stupp und Homicsko, 2014). Dabei gilt es, möglichst wenig residuelles Tumorgewebe zurückzulassen, und gleichzeitig die postoperativen funktionellen Einbußen gering zu halten. Hierzu werden verschiedenste technische Hilfsmittel genutzt wie Fluoreszenzmarkierung, Neuronavigation und intraoperatives Mapping (Almeida *et al.*, 2015). Trotz dieser technischen Fortschritte verbleiben auch nach makroskopisch und radiologisch vollständig erscheinender Resektion infiltrierende Tumorzellen, so dass eine adjuvante Therapie obligat ist. Im Rahmen einer groß angelegten Studie der Europäischen Gesellschaft für Krebsforschung (EORTC) und des Kanadischen Krebsforschungsinstituts (NCIC) führte die simultane Radiochemotherapie mit

Temozolomid zu einer bis dato unerreichten medianen Überlebensdauer von 14,6 Monaten und 2-Jahres-Überlebensraten von 27,2% gegenüber nur 10,9% unter alleiniger adjuvanter Strahlentherapie (Stupp *et al.*, 2009). Infolgedessen hat sich in Anschluss an die chirurgische Resektion die adjuvante Bestrahlung mit simultaner Chemotherapie mit dem Alkylanz Temozolomid über 40-49 Tage, gefolgt von sechs weiteren Zyklen Temozolomid alle 28 Tage als Standardtherapie etabliert (Stupp *et al.*, 2010). Doch auch nach Ausschöpfung dieser Maßnahmen kommt es nahezu immer zu Rezidiven (Ening *et al.*, 2015). Die Datenlage zur Therapie eines Rezidivtumors ist nicht eindeutig, sodass hier nach aktueller Leitlinie individuell die Indikation zu Reoperation, erneuter Strahlen- oder Chemotherapie oder experimentellen Therapien im Rahmen von Studien geprüft werden sollte (Stupp *et al.*, 2010).

Angesichts der Tatsache, dass die mediane Lebenserwartung trotz Resektion und Chemotherapie in den 1970er Jahren noch bei nur etwa neun Monaten lag (Jellinger, 1978), ist die Steigerung der Überlebensdauer mithilfe der neuen Therapieschemata durchaus ein Fortschritt in der Therapie des Glioblastoms. Die Prognosen sind aber, nicht zuletzt aufgrund der Rezidiventwicklung, insgesamt weiterhin schlecht. Dies erklärt die vielfältigen experimentellen Therapiekonzepte, die derzeit Gegenstand der neuroonkologischen Forschung sind.

1.1.5 Fokus der Forschung und Ausblick

Gliome und vor allem Glioblastome zeichnen sich durch eine Vielzahl von Mutationen aus und sind dabei sehr heterogen. Darunter sind auch Mutationen, die bereits als prädiktive Biomarker zur Entscheidungsfindung in der Therapieplanung genutzt werden. So wurde im Rahmen der Studien NOA-08 und Nordic Trial der Methylierungsstatus des O6-MethylguaninDNA-Methyltransferase-(MGMT)-Promotors etabliert (Malmström *et al.*, 2012). Die Methylierung des MGMT-Promotors ist mit verbessertem Ansprechen auf alkylierende Chemotherapeutika, insbesondere Temozolomid, assoziiert. Dies ist vor allem bei älteren PatientInnen hilfreich, um eine bessere Nutzen-Risiko-Abwägung bezüglich der Entscheidung zwischen primärer Chemo- bzw. Strahlentherapie und kombinierter Radiochemotherapie zu ermöglichen (ebenda). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PatientInnen mit anaplastischen oligodendroglialen Tumoren mit 1p/19q-Kodektion von einer kombinierten Radiochemotherapie im Vergleich zu einer alleinigen Strahlentherapie deutlich profitieren (Wick *et al.*,

2016). Andere Mutationen, die als prädiktive Marker unter anderem im Hinblick auf eine medikamentöse Tumortherapie diskutiert werden, sind BRAF-Mutationen, die häufige IDH-Mutation, PTEN-Mutationen, EGFR-Alterationen – die bis zu 50% aller Glioblastome betreffen – und das eher seltene FGFR-TACC-Fusionsprotein, dessen onkogene Aktivität möglicherweise durch Tyrosinkinase-Inhibitoren beeinflusst werden kann (Dunn *et al.*, 2012; Olar and Aldape, 2014). Ziel ist es, durch ein verbessertes molekularbiologisches Verständnis und die Translation dieser Erkenntnisse in die klinische Versorgung, die Tumorzellen gezielter angreifen zu können. Damit sollen sowohl Überlebenszeiten verbessert, als auch in Zukunft kurative Therapieziele verfolgt werden. Die molekulare Charakterisierung der Tumoren kann ebenso zur weiteren Identifikation von prädiktiven Biomarkern führen, die die Therapieplanung beeinflussen können, um so die bereits vorhanden Therapieoptionen möglichst effizient einsetzen zu können. Experimentelle Therapieansätze, die derzeit näher untersucht werden, sind unter anderem die Anwendung antiangiogener Wirkstoffe, Immuntherapie, sowie die Anwendung von Wechselstromfeldern (Batchelor *et al.*, 2014; Reardon *et al.*, 2017; Stupp *et al.*, 2017). In Bezug auf Tumor-assoziierte Epilepsie bleibt weiterhin zu klären, welche Faktoren zur Epileptogenese im Rahmen von Gliomerkrankungen führen (De Groot *et al.*, 2012; Weller, Stupp und Wick, 2012). Die Entstehung einer Tumor-assoziierten Epilepsie ist ein multifaktorielles Geschehen. Es spielt sich sowohl auf molekularer Ebene durch beispielsweise genetische Faktoren über veränderte Signalkaskaden und Kanalexpression, als auch auf makroskopischer Ebene ab, beeinflusst unter anderem von Tumorgöße und -lokalisierung oder Ödembildung (Liubinas *et al.*, 2014). Identifizierte Risikofaktoren sind unter anderem niedriggradige, langsamer wachsende Tumoren, eine temporale oder frontale Lokalisation und eine IDH-Mutation (Skardelly *et al.*, 2015; Zhong *et al.*, 2015). Insbesondere angesichts des möglicherweise antiproliferativen Effekts von Antiepileptika sowie einer potentiellen Korrelation von sekundären epileptischen Anfällen und verbessertem Überleben in bestimmten PatientInnenkollektiven (Lote *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2017), gewinnt die Klärung der Ätiopathogenese dieser sekundären Anfälle an Bedeutung. Ein besseres Verständnis dieser Zusammenhänge kann somit nicht nur zu einer besseren symptomatischen Therapie epileptischer Anfälle führen, sondern auch einen Beitrag leisten zu einer kurativen oder zumindest prognoseverbessernden Therapie von Gliomen und Glioblastomen.

1.2 KALIUMKANÄLE

1.2.1 Struktur und Funktion

Kaliumkanäle sind Transmembranproteine, die den Ein- und Ausstrom von Kalium an Zellen ermöglichen und regulieren. Die Familie der Kaliumkanäle ist die mit Abstand vielfältigste (Miller, 2000). Die Kanäle haben den hochselektiven Transport von Kaliumionen bei mangelnder Durchlässigkeit für Natriumionen gemeinsam und unterscheiden sich in erster Linie durch ihre Regulationsmechanismen. Kaliumkanäle sind in nahezu allen Zellen von sowohl Eukaryoten, Prokaryoten als auch Archaeen beschrieben und sind auch im menschlichen Organismus in erregbaren, als auch nicht erregbaren Zellen an verschiedensten Funktionen beteiligt (MacKinnon, 2003).

Die Kaliumhomöostase ist gekennzeichnet durch eine stark ungleiche Verteilung in den einzelnen Kompartimenten zugunsten des Intrazellulärums und zugleich einer strengen Regulation des Serumkaliumspiegels in einem engen Bereich zwischen 3,5 und 5 mmol/l. Dies ist bedingt durch eine hohe Ruheleitfähigkeit der Zellmembran für Kaliumionen und dem starken elektrochemischen Gefälle, das durch den massiven Konzentrationsunterschied zwischen Zytosol und Extrazellulärums besteht. Infolgedessen haben auch schon geringe Konzentrationsveränderungen des extrazellulären Kaliums einen großen Einfluss auf das Membranpotenzial, was die bedeutende Rolle von Kaliumkanälen bei der Regulation des Ruhemembranpotenzials bedingt. Darüber hinaus sind sie an weiteren Vorgängen wie der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts, Zellzyklusregulation, Sekretionsprozessen und anderen endokrinen Vorgängen beteiligt (Kuo *et al.*, 2005). Bisher sind Kanäle mit zwei, vier und sechs Transmembrandomänen bekannt. Grundsätzlich bestehen dabei alle Kaliumkanäle aus einer porenbildenden und einer regulatorischen Domäne (Kuang, Purhonen und Hebert, 2015). Während die porenbildende Domäne unter allen Kaliumkanälen ähnlich ist, unterscheiden sich die großen Klassen vor allem in ihrer regulatorischen Domäne. Dabei unterscheidet man spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v), die aus sechs Transmembrandomänen bestehen, einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (K_{ir}) mit zwei Transmembrandomänen und Zwei-Poren-Kaliumkanäle (K_{2P}), die sich aus vier Transmembrandomänen zusammensetzen. Weiterhin gibt es Liganden-gesteuerte Kaliumkanäle, die aus zwei oder sechs Transmembrandomänen bestehen können (Buckingham *et al.*, 2005). Jeweils vier Monomere mit einer

porenbildenden Domäne bilden zusammen ein Tetramer und damit eine Pore, durch die sich die Ionen bewegen (MacKinnon, 1991). Eine Ausnahme bildet hier ausschließlich die Gruppe der 2-Poren-Kaliumkanäle, deren Monomer zwei Porenbildende Domänen aufweist, sodass ein Dimer hier schon eine funktionelle Kanalpore bildet (Sepulveda *et al.*, 2015).

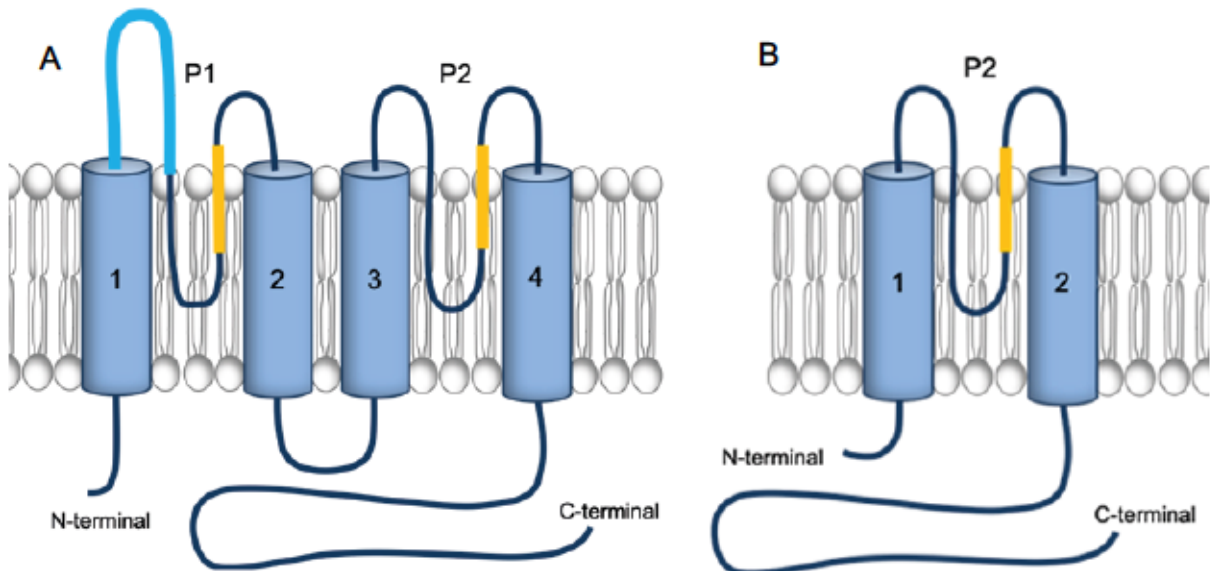


Abbildung 1 – Vergleich der Untereinheiten eines (A) K2P-Kanals und eines (B) Kir-Kanals

(A) Untereinheiten der Zwei-Poren-Kaliumkanäle bestehen aus vier Transmembrandomänen mit jeweils zwei Porenbildenden Domänen (P1 und P2), jeweils mit Selektivitätsfilter (hier ein wenig dicker markiert), sodass zwei Untereinheiten schon einen funktionellen Kanal bilden. (B) Kir-Kanäle bestehen aus zwei Transmembrandomänen mit nur einer porenbildenden Domäne (P2), sodass erst ein Tetramer einen funktionellen Kanal bildet. (nach: Sepulveda *et al.*, 2015)

Der Kaliumtransport durch die Kanäle ist sowohl hoch-selektiv – die Permeabilität für Kaliumionen beträgt in etwa das 10.000-fache der Durchlässigkeit für Natriumionen – als auch sehr schnell, mit Geschwindigkeiten von über eine Million Ionen pro Sekunde (Kuang, Purhonen und Hebert, 2015); dabei fungiert die stark konservierte TxGYG-Sequenz als Selektionsfilter (Sansom *et al.*, 2002). Die Carbonylgruppen der Tyrosin- und Glyzinreste bilden eine Ringstruktur, die die Hydrathülle von Kaliumionen ersetzt, nicht jedoch die der kleineren Natrium- oder Lithiumionen (McCoy und Nimigean, 2012).

1.2.2 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle

Obwohl einwärtsgleichrichtende Kaliumströme am Skelettmuskel 1948 schon früh von Bernard Katz beschrieben wurden (Katz, 1948), wurden 1993 mit dem

ROMK1/Kir1.1 aus dem Nierenmark der Ratte und der IRK1/Kir2.1 aus einer murinen Makrophagenzelllinie erst relativ spät die ersten Kir-Kanäle kloniert (Ho *et al.*, 1993; Kubo *et al.*, 1993). Hierbei steht Kir für *K⁺ inward(ly) rectifying*, zu deutsch einwärts gleichrichtend. Die Namensgebung beruht auf ihrer Eigenschaft, Einwärtsströme bei Membranpotenzialen negativ des Kaliumgleichgewichtspotenzials (E_K) besser zu leiten als Auswärtsströme bei entsprechenden Potenzialen positiv von E_K (Sakmann und Trube, 1984). Interessant hierbei ist, dass sie somit zwar spannungsabhängig funktionieren, diese Spannungsabhängigkeit jedoch nicht klassisch über ein spannungssensitives S4-Segment, wie bei anderen spannungsabhängigen Kationenkanälen vermittelt wird. Die biophysikalische Grundlage für diese einwärtsgleichrichtende Funktion ist stattdessen eine spannungsabhängige Blockade der Pore durch intrazelluläre di- und polyvalente Kationen wie Mg^{2+} -Ionen und Polyaminen (Nichols und Lopatin, 1997; Oliver, Baukowitz und Fakler, 2000). Die Stärke dieser Blockade nimmt zu mit dem Ausmaß der Depolarisation (ebenda) und somit mit steigender treibender elektromotorischer Kraft, die sich aus der Differenz des Kaliumgleichgewichtspotenzials und des jeweiligen Membranpotenzials ergibt. Durch Hyperpolarisation wird die Blockade aufgehoben, sodass dann entlang des elektrochemischen Gefälles ein Kaliumstrom in die Zelle ermöglicht wird. Die Größe dieses Kaliumstroms ist direkt abhängig von der extrazellulären Kaliumkonzentration (Lopatin und Nichols, 1996). Insgesamt haben Kir-Kanäle so einen stabilisierenden Effekt auf das Membranpotenzial verschiedener Zellen auf Werte nahe des Kaliumgleichgewichtspotenzials (Verkhratsky und Steinhäuser, 2000).

Kir-Kanäle werden derzeit in sieben Subgruppen kategorisiert, die wiederum funktionell in vier Gruppen eingeteilt werden können: klassische Kir-Kanäle (Kir3.x), G-Protein-gesteuerte Kir-Kanäle (Kir3.x), ATP-sensitive Kaliumkanäle (Kir6.x) und Kaliumtransportkanäle (Kir4.x, Kir5.x und Kir7.x) (siehe Abbildung 2).

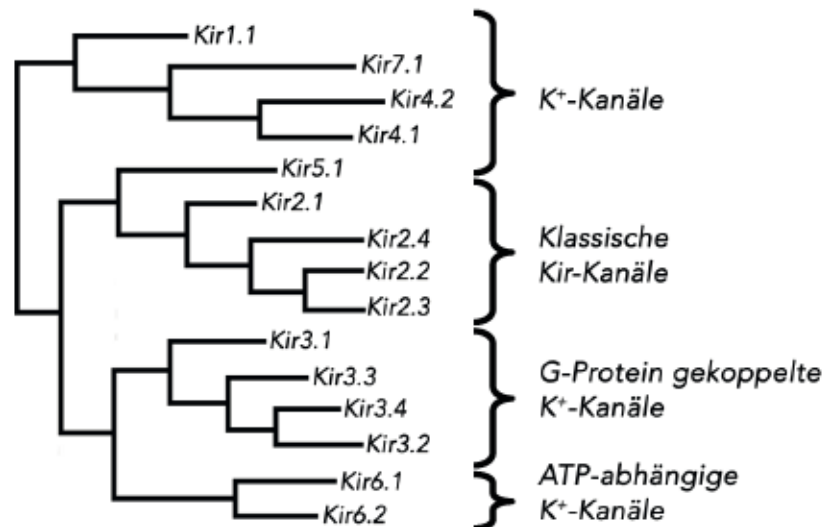


Abbildung 2 – Kir-Kanal-Familie

Die 15 bekannten Untereinheiten sind hier nach phylogenetischer Analyse der Aminosäuresequenzen gruppiert und lassen sich in vier funktionelle Gruppen einteilen. (nach: Hibino *et al.*, 2010)

Kir-Kanal-Monomere bestehen jeweils aus zwei Transmembrandomänen, die zusammen die Kanalpore formen (Biggin, Roosild und Choe, 2000). Aufgrund der einfachen Struktur der einzelnen Untereinheiten und großen Homologie der verschiedenen Subtypen können sich die porenbildenden Einheiten sowohl zu Homo- als auch zu Heterotetrameren zusammenlagern, worüber unter anderem eine Modulation der Stärke der gleichrichtenden Funktion möglich ist, die innerhalb der Subtypen variiert (Pessia *et al.*, 1996). Die Leitfähigkeit der Kir-Kanäle, mit Ausnahme des Kir7.1, steigt in Abhängigkeit der extrazellulären K⁺-Konzentration und wird außerdem durch pH-Änderungen beeinflusst (Sepulveda *et al.*, 2015). So öffnet sich der Kanal bei Alkalisierung und schließt infolge eines Absinken des pH-Wertes, was vermutlich der engen Verknüpfung des Kalium- und des Protonenhaushaltes geschuldet ist und einem übermäßigen Kaliumverlust der Zellen bei metabolischer Azidose entgegenwirken soll (Schulte und Fakler, 2000).

Über den zytoplasmatischen Anteil des Kanals wird die Funktion des Kanals durch diverse intrazelluläre Mediatoren moduliert (Borschel *et al.*, 2017). Phosphatidylinositolen wirken aktivierend auf den K_{ATP} und viele andere einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (Fürst, Mondou und D'Avanzo, 2014). Ebenso wird die Kanalfunktion durch G-Proteine, Phosphorylierung und auch Interaktionen mit dem Aktin-Cytoskelett moduliert (Furukawa *et al.*, 1996). Ein Beispiel einer solchen Interaktion ist die ATP-

abhängige Schließung der Kir-Kanäle der Bauchspeicheldrüse und die infolgedessen durch Depolarisierung bewirkte Insulinausschüttung, die integral ist für die Regulation des Blutzuckerspiegels (Nichols *et al.*, 1996). Neben ihrem Vorkommen im ZNS an Neuronen und Gliazellen, sowie im bereits erwähnten Pankreas, wurden Kir-Kanäle in einer Vielzahl weiterer Zellen wie Kardiomyozyten, Osteoklasten, Endo- und Epithelzellen, sowie Oozyten beschrieben (Hagiwara, Miyazaki und Rosenthal, 1976; Hagiwara *et al.*, 1978; Newman, 1984; Kurachi, 1985; Sims und Dixon, 1989; Takahashi, 1990; Hebert *et al.*, 2005).

Kanalblocker wie Tetraethylammonium (TEA) und 4-Aminopyridin (4-AP), die klassischerweise genutzt werden, um spannungsabhängige Kaliumkanäle zu inhibieren, zeigen sich auf Kir-Kanäle wenig wirksam (Oonuma *et al.*, 2002). Dagegen werden die meisten Kir-Kanäle effektiv durch Barium- (Ba^{2+}) und Cäsiumionen (Cs^{+}) inhibiert (Hagiwara, Miyazaki und Rosenthal, 1976; Hagiwara *et al.*, 1978). In sehr hohen Konzentrationen blockieren Bariumionen zusätzlich auch spannungsabhängige Kaliumkanäle, jedoch sind sie in niedrigen Konzentrationen relativ Kir-spezifisch (Quayle *et al.*, 1993). Die Blockade der Kir-Kanäle durch Ba^{2+} als und Cs^{+} ist insofern spannungsabhängig, als dass sie Kir-Ströme bei hyperpolarisiertem Membranpotenzial stärker inhibieren. Ebenfalls modulierend wirkt die extrazelluläre Kaliumkonzentration, deren Anstieg zu einer reduzierten Hemmung der Kir-Ströme führt (Oliver *et al.*, 1998). In nativen Zellen und Geweben werden größtenteils Barium- und Caesiumionen genutzt, um Kir-Kanäle elektrophysiologisch zu untersuchen (Hibino *et al.*, 2010). Daneben sind mittlerweile weitere Substanzen bekannt, die Subtypen von Kir-Kanälen beeinflussen. So hemmt das aus dem Gift der Honigbiene isolierte Tertiapin G-Protein-gekoppelte Kaliumkanäle und Kir1.1-Kanäle (Mercado *et al.*, 2018). Die in der Bauchspeicheldrüse vorkommenden ATP-abhängigen Kaliumkanäle sind außerdem Zielstruktur von oralen Antidiabetika wie Sulfonylharnstoffen und den Gliniden (Ashcroft, 1996; Seino, 2012).

Der Kanal wird durch das KCNJ10-Gen kodiert und wurde initial im ZNS beschrieben. Mittlerweile wurde der Kir4.1 aber auch in den Müllerzellen der Retina, im Innenohr, sowie in der Niere identifiziert. Im ZNS wird er vor allem von Astrozyten und unreifen Oligodendrozyten (Kofuji und Newman, 2004; Brasko *et al.*, 2017) exprimiert und findet sich vorrangig in der Nähe von Synapsen und Blutgefäßen, oft in räumlicher Nähe

des AQP4 Wassertransportproteins (Nagelhus, Mathiesen und Ottersen, 2004). Obwohl Gliazellen eine Vielzahl von Kaliumkanälen exprimieren, geht man davon aus, dass vorrangig einwärtsgerichtete Kanäle die für Gliazellen charakteristische hohe Kaliumleitfähigkeit und das stark negative Ruhemembranpotenzial verursachen (Verkhratsky und Steinhäuser, 2000). Weiterhin bewirken Gliazellen nach abgelaufenen Aktionspotenzialen die Wiederaufnahme von Transmittern, darunter auch das exzitatorische Glutamat, und die Kaliumhomöostase (Djukic *et al.*, 2007). Insbesondere der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kir4.1 Kanal scheint hierbei eine Schlüsselrolle zu spielen (Djukic *et al.*, 2007).

Das Phänomen, dass es infolge von Aktionspotenzialen zu einer Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration und einer damit einhergehenden Depolarisation der Gliazellmembran kommt, wurde 1966 von Orkand *et al.* schon relativ früh beschrieben (Orkand, Nichols und Kuffler, 1966). Noch bevor diese Funktion einzelnen Kanälen zugeschrieben werden konnte, stellte er die Hypothese auf, dass elektrisch gekoppelte Gliazellen durch Aufnahme der freigesetzten Kaliumionen und ihre Umverteilung als „*spatial buffers*“ fungieren (ebenda). Ein analoger Prozess ist an den Müllerzellen der Retina beschrieben und wird dort als „*K⁺ siphoning*“ bezeichnet, da diese keine Synzytien bilden und die Umverteilung der Kaliumionen auf der Ebene einzelner Zellen erfolgt (Newman, Frambach und Odette, 1984). Mittlerweile wird dieser Vorgang am ehesten auf Kir4.1-Kanälen zurückgeführt (Kofuji *et al.*, 2000; Higashi *et al.*, 2001). So kommt es infolge eines Aktionspotenzials oder einer Abfolge von Potenzialen zu einer starken Steigerung der extrazellulären Kaliumkonzentration, von normalerweise etwa 3mmol/l auf Werte von 20 mmol/l und höher (Orkand, Nichols und Kuffler, 1966). Dies führt nun zu einer Reduktion des Kaliumgleichgewichtspotenzials auf weniger negative Werte, wodurch es aufgrund der starken Kaliumleitfähigkeit an der Membran der angrenzenden Gliazellen zu einer Depolarisation kommt (Orkand, Nichols und Kuffler, 1966). Die beschriebene Veränderung des Kaliumgleichgewichtspotenzials führt im Bereich der Perisynapse zu einer Steigerung des Kaliumeinstroms in die Gliazellen. Dies wird zusätzlich durch den differenziellen Besatz mit verschiedenen Kir-Tetrameren gefördert. So sind an den Müllerzellen der Retina synapsennah im Bereich der äußeren plexiformen Schicht, wo es durch Lichteinfall zu einem Anstieg der Kaliumkonzentration kommt, eher Heteromere wie

Kir4.1/Kir5.1 beschrieben (Ishii *et al.*, 2003). Diese bewirken eine stärkere Einwärtsrichtung als Kir4.1-Homotetramere (Pessia *et al.*, 1996). Auf der anderen Seite können die Müllerzellen über Kir4.1-Homotetramere, die weniger gleichrichtend sind, die Kaliumionen in Richtung des Glaskörpers und angrenzender Blutgefäße abgeben (Kofuji *et al.*, 2002). Im Gehirn wird ein analoger Mechanismus der Umverteilung vermutet, wobei Astrozyten hier über *gap junctions* ein weites Netzwerk aus Zellen binden (Dermietzel *et al.*, 1991; McKhann, D'Ambrosio und Janigro, 1997). Über dieses Synzytium können sich die aufgenommenen Kaliumionen nun gleichmäßig verteilen, ohne die intrazelluläre Kaliumkonzentration signifikant zu erhöhen, um dann in der Nähe von Kapillaren und synapsenfern in Bereichen mit geringerer extrazellulärer Kaliumkonzentration abgegeben zu werden (Butt und Kalsi, 2006). Ebenso diskutiert wird die Bedeutung des Kir4.1 für den Wasserhaushalt von Gliazellen und Neuronen. Aufgrund der gehäuften Ko-Lokalisation des Kir4.1. mit dem Aquaporin-4-Wassertransportmolekül, wird eine gewisse Wechselwirkung vermutet (Nagelhus, Mathiesen und Ottersen, 2004). Außerdem konnte sowohl durch pharmakologische Blockade, als auch an Kir4.1 Knockout-Mäusen gezeigt werden, dass der Kir4.1-Kanal unter hypotonen Bedingungen eine protektive Funktion hat und einer Ödembildung entgegenwirkt (Dibaj *et al.*, 2007).

Neben ihrem Einfluss auf den Wasser- und Elektrolythaushalt der Astrozyten, scheint der Kir4.1 essentiell für den Vorgang der Myelinisierung. So führt eine gezielte Blockade der Kir4.1-Kanäle in Oligodendrozyten während der frühen postnatalen Entwicklung zu motorischen Störungen in Mäusen mit einer Hypomyelinisierung des Rückenmarks, spongiformer Vakuolation, sowie Schwellung und Degeneration von Axonen (Neusch *et al.*, 2001). In der Zusammenschau mit der Beschreibung von Anti-Kir4.1-Autoantikörpern bei PatientInnen mit Multipler Sklerose (Srivastava *et al.*, 2012) führte dies zwischenzeitlich dazu, dass eine Rolle des Kir4.1 in der Pathophysiologie der MS diskutiert wurde, was jedoch bislang nicht bestätigt werden konnte (Srivastava *et al.*, 2012; Nerrant *et al.*, 2014).

Die Bedeutung des Kir4.1 für diverse physiologische Abläufe veranschaulicht das klinische Bild des SeSAME/EAST-Syndroms, das auf einer *loss-of-function*-Mutation des Kanals beruht: Im Rahmen dieses Syndroms kommt es zu einer sensorineuralen

Taubheit, da der Kir4.1 über die Anreicherung der Endolymphe mit Kaliumionen essentiell ist für die Ausbildung des endokochleären Potenzials; in der Niere führt das Fehlen des Kir4.1 zu einer renalen Tubulopathie (Reichold *et al.*, 2010). Daneben kommt es aufgrund seines Funktionsausfalls im ZNS zu Ataxie und epileptischen Anfällen (Bockenbauer *et al.*, 2009). Weitere Hinweise auf eine Rolle des Kir4.1 in der Pathophysiologie der Epilepsie lieferten Untersuchungen von Gliazellen mit therapieresistenter Epilepsie: Diese zeigten einen Verlust von Kir-Strömen, eine Reduktion der Gleichrichtungsfunktion und im Resultat vermutlich eine gestörte Kaliumwiederaufnahme. (Steinhäuser, Grunnet und Carmignoto, 2016) Des Weiteren ist die Expression von Kir4.1 mit der Differenzierung von Astrozyten und Zellzyklusregulation assoziiert; im Laufe der Zellreifung steigt die Kir4.1-Expression und das Membranpotenzial nimmt charakteristisch negative Werte an (Olsen *et al.*, 2006). Daneben korrelieren Kir4.1-Expressionsraten invers mit Proliferationsraten und der Negativität des Membranpotenzials: so konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die pharmakologische Blockade des Kir4.1 zu einer Verzögerung der Zelldifferenzierung und einem Ausschneiden aus dem Zellzyklus führt (MacFarlane und Sontheimer, 2000). Dies ist besonders im Hinblick auf einen beschriebenen funktionellen Kir4.1-Verlust in Glioblastomzellen bemerkenswert (Olsen und Sontheimer, 2004). Der Kir4.1 könnte vor diesem Hintergrund als prädiktiver Marker für sekundäre epileptische Anfälle im Rahmen der Tumorerkrankung, als prognostischer Marker oder sogar als therapeutisches Target geeignet sein.

1.3 ZELLINIEN

Die Untersuchungen wurden sowohl an bereits etablierten und kommerziell verfügbaren Zelllinien, wie der Gliomlinie C6, der F98 und der U87 durchgeführt (von Köhling, Senner, Paulus, & Speckmann, 2006; Schültke *et al.*, 2018), aber auch an Zellkulturen, die aus Resektionsmaterial von Glioblastomen von der Arbeitsgruppe Mullins, Classen und Linnebacher an der Universität Rostock etabliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich Kulturen sowohl aus frischem Material, als auch nach Kryokonservierung etablieren lassen. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, dass in der Zellkultur die Mutationsmuster des Primärtumors erhalten bleiben (Mullins *et al.*, 2013). Klinische Daten zu den entsprechenden Ursprungtumoren sind in Tabelle 1 verzeichnet (ebenda).

Einleitung

| <i>Tumor ID</i> | <i>Alter</i> | <i>Gender</i> | <i>Lokalisation</i> | <i>Überleben* (Monate)</i> |
|------------------|--------------|---------------|--------------------------|--------------------------------|
| HROG02 | 68 | M | parietookzipital, rechts | 7 tot |
| HROG05 (Rezidiv) | 60 | F | temporal, links | 3 tot |
| HROG15 | 56 | M | parietal, rechts | 23 |
| HROG24 | 73 | F | okzipital, links | 10 tot |
| HROG38 | 49 | F | parietookzipital, rechts | 19 |

Tabelle 1 – PatientInnendaten zu den Glioblastomzelllinien

Stand: 25. Januar 2013 nach Mullins et al., 2013.

1.4 ZIELE DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit sollen mithilfe von molekularbiologischen und elektrophysiologischen Methoden erstmals die an der Universität Rostock nach chirurgischer Resektion etablierten Glioblastomzelllinien bezüglich ihrer Expression des einwärtsgerichteten Kir4.1 Kalium-Kanals charakterisiert werden. Die Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe um Mullins, Classen und Linnebacher als Zellkultur etabliert und bislang nicht elektrophysiologisch untersucht. Der Kir4.1 spielt eine Schlüsselrolle bei der Funktion von Glia, die neuronale Erregbarkeit modulieren. Daneben ist eine Assoziation zur Differenzierung von Glia, der Regulierung des Zellzyklus und ein Kir4.1-Funktionsverlust in Gliomen beschrieben. All dies macht den Kir4.1 zu einer vielversprechenden Zielstruktur für ein besseres Verständnis von Tumor-assoziierten Epilepsie und der Einflussnahme auf die Proliferationsraten von Glioblastomen und wirft verschiedene Fragen auf:

1. Exprimieren die Glioblastomzelllinien den Kir4.1 Kanal?
2. Folgt aus der Expression auf molekularer Ebene ein funktioneller Kir4.1-Strom?
3. Welchen Einfluss hat die Expression dieses Stromes auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Tumorzellen?

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1 GERÄTE UND MATERIALIEN

| <i>Gerät mit Typenbezeichnung</i> | <i>Hersteller und Sitz</i> |
|--|---|
| Absaugvorrichtung ALA VWK | ALA Scientific Instruments (Westbury, NY, USA) |
| Analog-Digital-Wandler Power1401 | Cambridge Electronic Design (Cambridge, England) |
| Bio Photometer | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Faradaykäfig | Eigenbau Oscar-Langendorff-Institut für Physiologie, Rostock |
| Glasflaschen (500ml, 1l und 2l) | Schott (Mainz, Deutschland) |
| InfraFrot-Fluoreszenzdetektor und -scanner | Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences; Lincoln, NE, USA) |
| Inkubator CB 60 | Binder (Tuttlingen, Deutschland) |
| Inversmikroskop | Nikon Instruments (Melville, NY, USA) |
| Manometer PCE-P15 | PCE Instruments (Meschede-Freienohl, Deutschland) |
| Magnetrührer RH basic 2 | IKA (Staufen, Deutschland) |
| Messkolben | Hirschmann (Eberstadt, Deutschland) |
| Messzylinder | Brand (Wertheim, Deutschland) |
| Mikromanipulator PatchStar & PatchPad | Scientifica (Uckfield, England) |
| Mikrowaage CP 225 D | Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Mini-ProteanTetra Elektrophoresesystem | Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) |
| Osmometer Osmomat 030 | Gonotec (Berlin, Deutschland) |
| Oszilloskop TDS 1002 | Tektronix (Beaverton, OR, USA) |
| Personalcomputer und Monitor | Dell (Round Rock, TX, USA) |
| pH-Meter CG840 | Schott (Mainz, Deutschland) |
| Pipette (0,1- 2,5µl; 20-20 µl, 2-200 µl, 1 ml) | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Pipettenziehgerät | P-97 Sutter Instrument (Novato, USA) |
| PowerPac Universal Spannungsquelle | Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) |
| Real-Time PCR Thermal Cycler qTOWER3 | Analytik Jena (Jena, Deutschland) |
| realplex mastercycler | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |

Material und Methoden

| | |
|---|---|
| Reinstwasseranlage Purelab Ultra | Elga Labwater (Celle, Deutschland) |
| Silikonschläuche | VWR International (West Chester, PA, USA) |
| Standard Power Pack P25 Spannungsquelle Elektrophorese | Biometra, Teil von Analytik Jena (Jena, Deutschland) |
| Taschenrechner minirex 75 | VEB Röhrenwerk Mühlhausen (Erfurt, Deutschland) |
| Tisch, schwingungsgedämpft Linos 63-530 | TMC (Peabody, MA, USA) |
| Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell Blotter | Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) |
| Verstärker | ELC-03XS (npi electronic; Tamm, Germany) |
| Waage A 120 S | Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Wasserbad Thermo Haake C10 | Thermo Electron Corp (Waltham, MA, USA) |
| Zentrifuge 5417R | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |

Tabelle 2 – Geräte

| <i>Verbrauchsmaterialien</i> | <i>Hersteller und Sitz</i> |
|---|--|
| Begasungsfritte | Robu (Hattert, Deutschland) |
| Borosilikatröhrchen GB150-10 | Science Products (Hofheim, Deutschland) |
| Einmal-Pasteurpipetten 3,5ml | Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) |
| Filterpapier WB #3030-704 | GE Healthcare Life Sciences (Chicago, IL, USA) |
| Immobilon-FL PVDF-Membran pore size 0,45µm | Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) |
| Linsenreinigungspapier | Kodak (New York, USA) |
| Mikrofilter 0.22 µm, Millex GV | Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) |
| Mikropipette MF28G-5 | World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA) |
| Pipettenspitzen | Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich) |
| Silberdraht 0,005 Zoll | Science Products (Hofheim, Deutschland) |
| Spritze Omnifix®-H | B. Braun (Melsungen, Deutschland) |
| Zellkulturschalen, 35 mm | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |

Tabelle 3 – Verbrauchsmaterialien

Material und Methoden

| <i>Chemikalien</i> | <i>Hersteller und Sitz</i> |
|--|--|
| Acrylamid | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Ammoniumperoxodisulfat | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| ATPNa ₂ | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| BaCl ₂ | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Bromphenolblau | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| CaCl ₂ | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| DMEM/Ham's F12 (1:1) | Biochrom (Berlin, Deutschland) |
| DMSO | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| DNTPs #U151B | Promega (Madison, WI, USA) |
| Ethanol | Zentralapotheke Uni Rostock |
| Fetales Kälberserum (FCS 10%) | Bio&SELL (Nürnberg, Deutschland) |
| GAPDH AK, anti-rabbit, #2118 | Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) |
| GeneMatrix Universal RNA Purification Kit #E3598 | EURx Ltd (Danzig, Polen) |
| Glucose | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Glycerol | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| GTPNa ₂ | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| H ₂ O bioscience grade | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| HEPES | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| K ⁺ Gluconat | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| KCl | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Kir4.1 AK APC-035 | Alomone Labs (Jerusalem, Israel) |
| KOH | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| M-MLV #M3683 | Promega (Madison, WI, USA) |
| M-MLV RT #M368C + Reaktionspuffer 5x | Promega (Madison, WI, USA) |
| Mastermix qPCR 2x SBR Green | Bimake (Houston, TX, USA) |
| MgCl | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| MgSO ₄ | Tocris Bioscience (Bristol, UK) |
| Milchpulver | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| NaCl | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| NaH ₂ PO ₄ | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |

Material und Methoden

| | |
|---|--|
| NaOH | Calbiochem (Darmstadt, Deutschland) |
| Natriumazid | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Oligoprimer #C110 | Promega (Madison, WI, USA) |
| PBS | Biochrom (Berlin, Deutschland) |
| Phosphocreatin-Na ₂ | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Protease inhibitor cocktail cOmplete | Roche (Basel, Schweiz) |
| Protein-Molekulargewichtsmarker Precision Plus Protein Standards x161-0374 dual color | Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) |
| Puffer M-MLV #M531A | Promega (Madison, WI, USA) |
| Random Primer #C118 | Promega (Madison, WI, USA) |
| RNAse H #E1330-01 | Roboklon GmbH EURx (Danzig, Polen) |
| RNASIN #N261B | Promega (Madison, WI, USA) |
| SDS | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| β-Mercaptoethanol | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| Sucrose | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| TEMED | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| TRIS | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Triton x-100 | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Trypsin/EDTA in PBS (0,05%/0,02%) | Biochrom (Berlin, Deutschland) |
| TWEEN20 | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |

Tabelle 4 – Chemikalien, Enzyme, Antikörper, Kits

| <i>Software</i> | <i>Hersteller und Sitz</i> |
|-------------------------------|---|
| LI-COR Image Studio Lite | LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA) |
| Signal 4.1 | Cambridge Electronic Design (Cambridge, UK) |
| qPCR soft 3.4 | Analytik Jena (Jena, Deutschland) |
| SigmaStat 3.5 | Systat Software (Erkrath, Deutschland) |
| SigmaPlot 13.0 | Systat Software (Erkrath, Deutschland) |
| Microsoft Excel for Mac 16.14 | Microsoft (Redmond, WA, USA) |
| Microsoft Word for Mac 16.14 | Microsoft (Redmond, WA, USA) |

Tabelle 5 – Software

2.2 LÖSUNGEN UND PHARMAKA

Die Extrazellulärlösung wurde zwei Mal wöchentlich aus Reinstwasser frisch angesetzt und bis zur Verwendung bei 6°C gekühlt aufbewahrt. Entsprechend den physiologischen Gegebenheiten wurde der pH-Wert der Extrazellulärlösung mit NaOH und die der Intrazellulärlösung mit KOH eingestellt. Die Intrazellulärlösung wurde einmalig hergestellt, in Aliquots von 1 ml bei -22°C aufbewahrt, täglich vor Durchführung der Experimente aufgetaut und bis zur Verwendung aufgrund temperaturempfindlicher Inhaltsstoffe auf Eis gelagert. Auch die Bariumchloridlösung wurde einmalig mit einer Konzentration von 1 mol/l angesetzt und in Aliquots von 100µl bei -22°C gelagert. Vor der Versuchsdurchführung wurden die Aliquots täglich aufgetaut und zur Extrazellulärlösung gegeben, sodass eine Zielkonzentration von 1 mMol/l erreicht wurde.

| <i>Stoff</i> | <i>Konzentration in mmol/l</i> |
|--|--------------------------------|
| NaCl | 125 |
| HEPES | 15 |
| KCl | 3 |
| CaCl ₂ | 2,5 |
| NaH ₂ PO ₄ | 1,3 |
| MgSO ₄ | 1,25 |
| Glucose | 10 |
| Sucrose | 15 |
| <i>pH 7,3 mit NaOH titriert, Osmolarität 300 mosmol/kg</i> | |

Tabelle 6 – Zusammensetzung Extrazellulärlösung

| <i>Stoff</i> | <i>Konzentration in mmol/l</i> |
|---|--------------------------------|
| K ⁺ Gluconat | 140 |
| MgCl | 3 |
| HEPES | 2,5 |
| Phosphocreatin-Na ₂ | 1,3 |
| ATPNa ₂ | 1,25 |
| GTPNa ₂ | 10 |
| <i>pH 7,3 mit KOH titriert, Osmolarität 300 mosmol/kg</i> | |

Tabelle 7 – Zusammensetzung Intrazellulärlösung

Material und Methoden

| <i>Stoff</i> | <i>Menge</i> |
|---|--------------------|
| Tris | 1,5 M |
| SDS | 0,1% |
| APS | 0,09% |
| TEMED | 0,1% |
| GTPNa ₂ | GTPNa ₂ |
| <i>10%-iges Trenngel mit 10% Acrylamid angesetzt, 5%-iges Sammelgel entsprechend mit 5% Acrylamid</i> | |

Tabelle 8 – Elektrophoresegel

| <i>Stoff</i> | <i>Menge</i> |
|-------------------|--------------|
| Tris | 62 mM |
| Glycerol | 10% |
| β-Mercaptoethanol | 5% |
| SDS | 2% |
| Bromphenolblau | 0,0001% |

Tabelle 9 – Zusammensetzung Probenpuffer nach Lämmli

| <i>Stoff</i> | <i>Menge</i> |
|--|--------------|
| Tris/HCl (pH 7,4) | 50 mM |
| NaCl | 150 mM |
| Triton x-100 | 1% |
| Na-Desoxycholat | 1% |
| SDS | 0,1% |
| EDTA | 1mM |
| <i>Vor Gebrauch frisch dazugeben: Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette/10 ml)</i> | |

Tabelle 10 – Zusammensetzung RIPA-Puffer

| <i>Stoff</i> | <i>Menge</i> |
|-----------------------------|--------------|
| SDS | 2% |
| Glycin | 0,18% |
| <i>In Aqua dest, pH 2,0</i> | |

Tabelle 11 – Strippingpuffer

2.3 ZELLKULTUR

Die etablierten Zellkulturen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen bei 95% O₂, 5% CO₂ und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Als Kulturmedium wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit einem Zusatz von 10% fetalem Kälberserum verwendet. In Vorbereitung auf die Patch-Clamp-Messungen wurden die Zellen abtrypsinisiert und in 35 mm Eppendorf Zellkulturschalen neu ausgesät, sodass die Zellen zum Zeitpunkt der Patch-Clamp-Messungen an Tag 1 bzw. 2 nach Aussaat größtenteils vereinzelt lagen.

2.3.1 Subkultivierung

Da adhärent wachsende Zellen nach Erreichen einer gewissen Zelldichte im Wachstum stagnieren, bis hin zu einem Absterben der Zellkultur, müssen sie regelmäßig geerntet, verdünnt und neu ausgesät werden. So wurden die Zellen etwa einmal wöchentlich, wenn sie mikroskopisch eine annähernde Konfluenz erreichten, subkultiviert. Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann so viel Trypsin/EDTA in PBS (0,05%/0,02%) hinzugegeben, bis der Boden der Kulturflasche bedeckt war. Dann folgte eine Inkubation bei 37°C für etwa 5 Minuten, woraufhin das Trypsin durch Zugabe von Zellkulturmedium antagonisiert wurde. Die Zellen wurden dann abgenommen, zentrifugiert und in frisches Medium aufgenommen, bevor sie in einem Verhältnis von eins zu zehn neu ausgesät wurden. Eine Ausnahme bildete die Zelllinie HROG38, deren Wachstum zwischenzeitlich stagnierte und dann nicht gesplittet, sondern eins zu eins ausgesät wurde.

2.3.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Für eine Lagerung über Wochen bis Monate wurden die Zellen bei -80° C eingefroren. Dafür wurden die Zellen in spezielle Kryoröhrchen in Einfriermedium aufgenommen. Um eine thermische Beschädigung der Zellen zu vermeiden, wurde Zellkulturmedium verwendet, das als Frostschutzmittel DMSO enthielt. Die Zellen wurden mithilfe eines speziellen Gefrierbehälters langsam um 1°C pro Stunde heruntergekühlt. Um die Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurden die Behälter langsam im Wasserbad erwärmt. Sobald die Zellsuspension vollständig aufgetaut war, wurde sie rasch in eine Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt und innerhalb von etwa 24 Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.4 PROTEINEXTRAKTION UND WESTERN BLOT

Die *Western-Blot*-Methode dient dem Nachweis bestimmter Proteine in Gewebeextrakten. Um ein Proteinextrakt der Zellen herzustellen, wurden diese zunächst abtrypsinisiert und dann über fünf Minuten bei 2500 g zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach drei solchen Waschgängen wurde nun laut Herstellerangaben 1ml RIPA-Puffer je 40 mg Nassgewicht Zellmaterial zum Zellpellet gegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Dieser Ansatz wurde dann unter sanften Schüttelbewegungen über 15 Minuten auf Eis inkubiert. Um den Zelldebris vom Proteinextrakt zu trennen, wurde das Gemisch dann 15 Minuten lang bei 14.000 g zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Analyse abpipettiert. Nach photometrischer Bestimmung der Proteinkonzentrationen der verschiedenen Zelllinien bei einer Wellenlänge von 280 nm wurden diese auf eine einheitliche Arbeitskonzentration von 2 µg/µl verdünnt. Zur Vorbereitung auf die SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben mit Probenpuffer nach Lämmli versetzt, bei 90° C über 10 Minuten denaturiert und anschließend 5 Minuten lang bei 5.000 g zentrifugiert. Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte per SDS-Polyacrylamidelektrophorese. Dazu wurde 10%-iges Trenngel und 5%-iges Sammelgel verwendet. Neben den Proteinproben à 10µg, wurde ein Molekulargewichtsmarker in die Gele aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 150 V in Elektrophoresepuffer über eine Dauer von 45 Minuten.

Vor dem immunologischen Nachweis der Proteine wurden die Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung auf einer PVDF-Membran fixiert. Nach Aktivierung der PVDF-Membran in Methanol wurde sie nach Spülen mit Aqua dest. über 15 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer erfolgte mittels *Semi-Dry*-Blotverfahren bei 10 V über 45 Minuten. Anschließend wurden die Membranen in drei Waschgängen mit PBST gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation in 2% Milchpulverlösung blockiert. Über Nacht erfolgte bei 4°C unter konstanter Schüttelbewegung die Inkubation mit den in Magermilchpulver gelösten Zielantikörpern (Siehe Tab. 18 im Anhang). Nach erneutem Waschen der Membranen folgte analog zum Erstantikörper die Inkubation der Membranen mit einem sekundären Fluoreszenz-Antikörper über 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einem

letzten Waschvorgang der Membranen wurden mithilfe eines Infrarot-Fluoreszenzdetektors die Detektion der fluoreszierenden Banden und mit der dazugehörigen Software nach Herstellerangaben eine semiquantitative Auswertung durchgeführt. Durch das sogenannte „Stripping“ konnten die mit Antikörper-behandelten PVDF-Membranen gereinigt werden, um für einen weiteren Proteinnachweis verwendet zu werden. Hierfür wurden die Membranen bei 55°C für 15 Minuten unter Schüttelbewegung inkubiert. Nach drei Waschgängen mit PBST konnten die Membranen erneut blockiert und dann wie oben beschrieben erneut mit Primär- und Sekundärantikörper behandelt werden.

2.5 ISOLIERUNG VON RNA AUS ZELLKULTUREN UND CDNA-SYNTHESE

Die RNA-Isolierung aus den geernteten Zellen wurde mithilfe des GeneMatrix Universal RNA Purification Kit (EURx, Gdansk, Polen) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Bestimmung der RNA-Konzentrationen erfolgte im Spektrometer durch Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}). Außerdem wurde die Absorption von Licht mit einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Der Quotient der beiden Werte (OD_{260}/OD_{280}) ist ein Maß für die Reinheit des RNA-Extraktes und sollte mindestens bei etwa 2,0 liegen. Ein weiteres Maß für die Reinheit ist der Quotient OD_{260}/OD_{320} , der Werte zwischen 2,0 und 2,2 annehmen sollte. Die Konzentration der Nukleinsäuren berechnete sich dann wie folgt: Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] = $OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$. Vor Durchführung der PCR musste die isolierte RNA in komplementäre DNS-Stränge (cDNA) umgeschrieben werden. Die Synthese erfolgte mithilfe einer reversen Transkriptase und Random Hexamer Primern nach dem Schema in Abbildung 3 mit einem Gesamtvolumen von 20 μl im Thermo-Cycler.

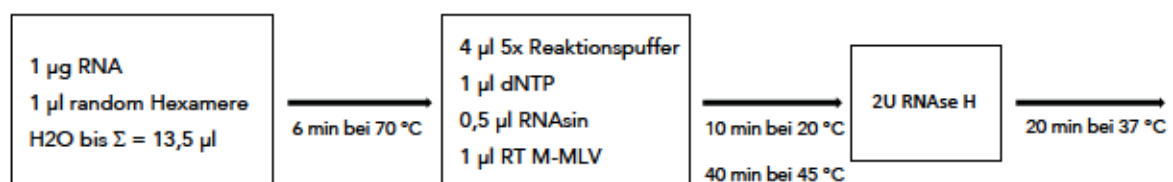


Abbildung 3 – Standardpipettierprotokoll cDNA-Synthese

2.6 QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR (QRT-PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, engl. polymerase chain reaction) ist ein von Mullis et al. 1986 erstmals beschriebenes Verfahren zur exponentiellen Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte (Mullis *et al.*, 1986). Hierfür werden für die Zielsequenzen spezifische synthetische Primer genutzt. Nach Auftrennung der DNA-Doppelstränge durch Auflösen der Wasserstoffbrückenbindungen lagern sie sich an die 3'-Enden der jeweiligen Einzelstränge. Aus den im Reaktionsansatz enthaltenen Desoxynukleosidtriphosphaten kann die thermophile Taq-DNA-Polymerase nun anknüpfend an die Primer einen zur Zielsequenz komplementären DNA-Strang synthetisieren. Die resultierenden Tochterstränge fungieren wiederum als Matrize, sodass es zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA-Zielsequenzen kommt, bis nach Erschöpfung eines der Reaktanden ein Plateau an DNA-Kopien erreicht wird.

Bei der quantitativen *real-time*-PCR wird die Vervielfältigung des PCR-Produktes in Echtzeit gemessen. Sie basiert auf der Detektion eines Fluoreszenzsignals, welches während der Amplifikation im gleichen Maß wie das PCR-Produkt zunimmt. Dafür wurde hier SYBR Green genutzt, das sich unspezifisch an doppelsträngige DNA anlagert. Für die Quantifizierung der cDNA-Startmenge wird der sogenannte ct- (engl. *cycle threshold*) bzw. auch cp-Wert (engl. *crossing point*) verwendet. Er entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen, nach denen ein definiertes Fluoreszenzsignal erreicht ist. Zur absoluten Quantifizierung kann eine Verdünnungsreihe bekannter Menge synthetischer RNA amplifiziert und so eine Standardkurve generiert werden, die ct-Werte mit den entsprechenden Ausgangskonzentrationen korreliert. Zur relativen Quantifizierung können neben den Zielgenen auch Haushaltsgene als Referenz amplifiziert werden. Diese werden im Allgemeinen konstant exprimiert und können somit zur Normierung der Expressionsanalyse genutzt werden. Die ct-Werte der Zielgene können dann zur Auswertung in Relation zu den ct-Werten der Haushaltsgene gesetzt werden (Δct). In der vorliegenden Arbeit wurden die Haushaltsgene GAPDH und S18 verwendet, sowie in der Regel eine Doppel- bzw. Dreifachbestimmung pro Reaktion durchgeführt. Aus der wie in Abschnitt 8.4.4 synthetisierten cDNA wurden nach Schema in Tab 12 die Reaktionsansätze für die qRT-PCR angesetzt. Die PCR erfolgte standardmäßig in einem Volumen von 20 μ l pro Reaktion. Die verwendeten Primer finden sich im Anhang in Tabelle 17.

Material und Methoden

| Menge | Reagenz |
|-------|-----------------------------|
| 10 µl | 2-fach Sybr Green Mastermix |
| 1 µl | cDNA |
| 1 µl | Forward Primer (10 mM) |
| 1 µl | Reverse Primer (10 mM) |
| 7 µl | Aqua dest |

Tabelle 12 – Ansatz qRT-PCR

Die Amplifikation und Messung der Expressionslevel erfolgte im Real-Time PCR Thermal Cycler qTOWER3 nach dem folgenden Protokoll:

| Schritt | T [°C] | Dauer | Zyklen |
|-----------------------------------|---------|--------|--------|
| 1. Aktivierung der DNA-Polymerase | 95 | 5 min | 1 |
| 2. Denaturierung | 95 | 15 s | 40 |
| Annealing | 60 | 15 s | |
| Elongation | 68 | 20 s | |
| 3. Schmelzkurvenanalyse | 60 → 95 | 20 min | 1 |

Tabelle 13 – quantitative RT-PCR Programm

Zum Abschluss erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse. Dabei wurden die Reaktionsprodukte über 20 Minuten von 60°C auf 95°C erhitzt. Währenddessen wurde weiterhin das Fluoreszenzsignal gemessen. Überschreitet die Temperatur den Schmelzpunkt des jeweiligen Produktes, nimmt das Signal ab. Da unspezifische Reaktionsprodukte wie Primerdimere niedrigere Schmelzpunkte haben als spezifische PCR-Produkte kann so die Spezifität der PCR-Produkte überprüft werden. Die Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse erfolgte mithilfe der bereits beschriebenen Δct -Methode.

2.7 PATCH-CLAMP

2.7.1 Elektrophysiologische Grundlagen und Funktionsprinzip

Die Technik der Patch-Clamp-Messung wurde 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt (Neher und Sakmann, 1976). Sie ermöglicht, Ströme durch einzelne Ionenkanäle oder Membranabschnitte – sogenannte „patches“, daher der Name – zu messen. Dabei wird eine mit Elektrolytlösung gefüllte Messpipette, an der über ein

Schlauchsystem ein leichter Überdruck anliegt, an eine Zelle angenähert. In unmittelbarer Nähe der Zelle wird der Überdruck über das Schlauchsystem abgelassen und gegebenenfalls kurzzeitig manuell Überdruck appliziert. Durch die Verbindung der Pipette mit dem darunter liegenden Membranabschnitt, dem Patch, entsteht nun zwischen der in der Messpipette befindlichen Lösung und der Extrazellulärlösung ein hoher elektrischer Widerstand, der Gigaseal. Dadurch ist dieser Membranabschnitt nun elektrisch von der restlichen Zellmembran isoliert, sodass Ionenströme in diesem Bereich über die Pipette abfließen und über die Messelektrode registriert werden können. Diese Konfiguration wird *cell-attached* genannt und erlaubt die Untersuchung einzelner Ionenkanäle in diesem Membranabschnitt. Durch manuelles Anlegen eines Unterdrucks oder durch die Applikation einer kurzzeitigen Wechsellspannung kann der Patch eröffnet werden. Das Innere der Pipette steht nun mit dem Zytoplasma in Verbindung. Darüber wird durch einen Ausgleich der Ionenkonzentrationen zwischen Zellinnerem und Intrazellulärlösung die intrazellulären Ionenverhältnisse und der pH-Wert durch die Pipettenlösung vorgegeben. In dieser *whole-cell*-Konfiguration kann die Zelle als Ganzes elektrophysiologisch untersucht werden. Diese *whole-cell*-Konfiguration wurde auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen angewandt.

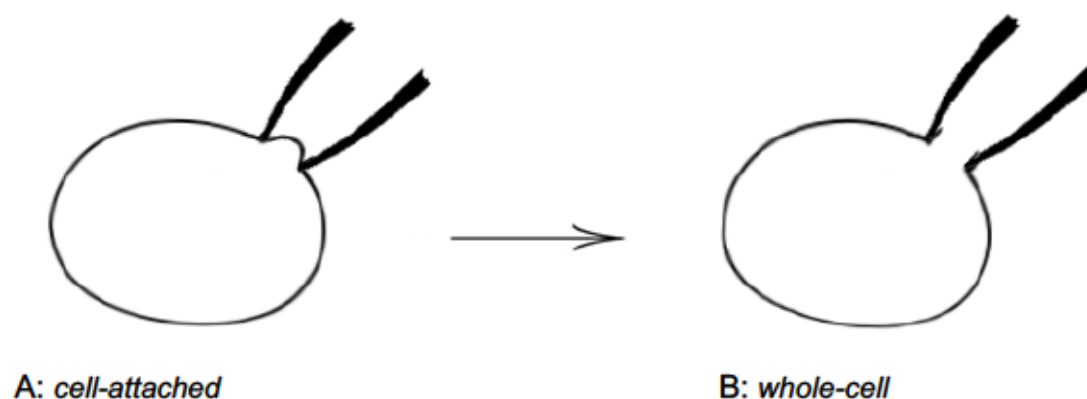


Abbildung 4 – Patch Clamp Konfigurationen - Schema

A: durch Aufsetzen der Pipette auf die Zelloberfläche und Ablassen des zuvor angelegten Überdrucks entsteht die *cell-attached*-Konfiguration. B: durch Applikation eines leichten intermittierenden Überdrucks wird die Zelle eröffnet, wodurch in der *whole-cell*-Konfiguration das Zytoplasma mit der Pipette in Verbindung steht. Über die Intrazellulärlösung kann nun mithilfe der Ableitelektrode der Strom der gesamten Zelle registriert werden.

Durch die Ungleichverteilung von Ionen zwischen Innen- und Außen-seite der Zellmembran entsteht über die semipermeable Membran hinweg eine elektrische Spannung, das Transmembranpotenzial. In Ruhe ist dieses Potenzial bei Gliomzellen stark negativ im Bereich von ca. -80 mV (Brismar, 1995). Die Veränderung des Ionenflusses führt zur Veränderung des Membranpotenzials in positivere oder negativere Bereiche, entsprechend einer De- oder Hyperpolarisation. Über die sogenannte Spannungsklemme (engl. *voltage clamp*)

kann ausgehend vom Kompensationsstrom, der benötigt wird, um das Membranpotenzial auf dem Sollwert zu halten, auf den über die Membran fließenden Strom und somit die Membranleitfähigkeit rückgeschlossen werden. Umgekehrt kann der Strom vorgegeben werden und die erzeugte Spannung abgeleitet werden (engl. *current clamp*).

2.7.2 Messplatz und Durchführung

Die Messungen erfolgten unter kontrollierten Bedingungen bei Raumtemperatur. Der Messstand bestand aus einem Inversmikroskop in dessen Fokusebene sich eine Vertiefung für 35 mm Zellkulturschalen befand. In Vorbereitung auf die elektrophysiologischen Messungen wurden die Gliomzellen ein bis zwei Tage zuvor geerntet und in diesen Zellkulturschalen neu ausgesät, sodass sie zum Zeitpunkt der Versuche größtenteils vereinzelt lagen. Während der gesamten Messdauer wurden die Zellen mit durch Sauerstoff begaster Extrazellulärlösung perfundiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde konstant durch eine Pumpe abgesaugt. Vor Messbeginn wurde so zunächst das Zellkulturmedium über 10 Minuten kontinuierlich über ein Infusionsschlauchsystem durch die Extrazellulärlösung ausgetauscht und dann noch mindestens weitere

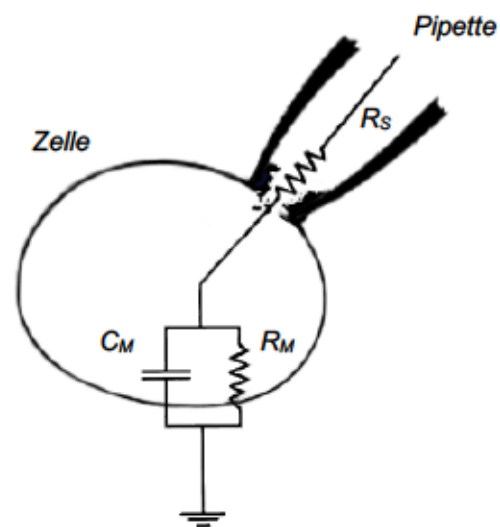
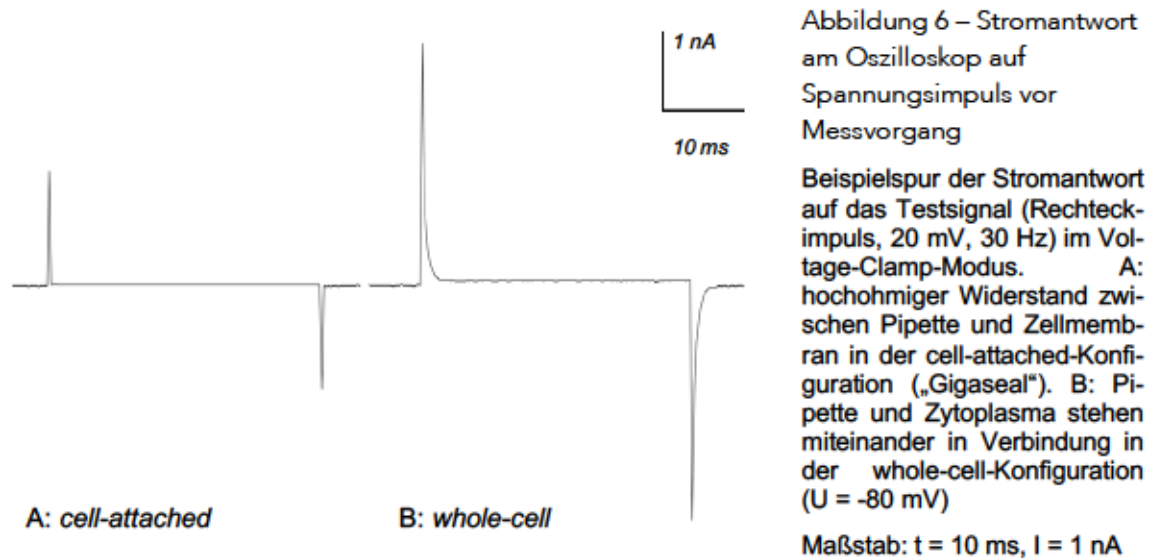


Abbildung 5 – Schaltkreis whole-cell-Konfiguration

Die Zellmembran wird elektrophysiologisch durch ihren Widerstand (R_M) und die Kapazität (C_M) charakterisiert. Zwischen dem Inneren der Pipette und dem Verstärker fällt der Strom über den zur Zelle in Serie geschalteten Serienwiderstand (R_s) ab. Modifiziert nach Numberger und Draguhn, 1996

20 Minuten Äquilibrationszeit abgewartet. Aufgrund der großen Störanfälligkeit wurden die Versuche elektrisch durch einen geerdeten Faraday-Käfig abgeschirmt und auf einem vibrationsgedämpften Tisch durchgeführt, um den Versuchsablauf nicht durch Erschütterungen zu stören. Ebenso wurde die Messpipette nicht manuell, sondern über einen Mikromanipulator gesteuert.

Die Messung erfolgte über eine niederohmige Glasmikropipetten, die unmittelbar vor der Versuchsdurchführung mithilfe eines horizontalen Pipettenziehgerätes aus Borosilikatröhrchen gefertigt wurden. Da die Herstellung dieser Pipetten temperatur-, luftdruck- und luftfeuchtigkeitsabhängig ist, musste das Programm kontinuierlich angepasst werden, um zuverlässig Pipetten mit Widerständen von 3-5 M Ω zu erhalten. Vor der Messung wurde die Glaspipette retrograd mit Messlösung gefüllt. Da diese wärmeempfindlichen Inhaltsstoffe wie ATP und GTP enthält, wurde sie bis zum Versuchsbeginn auf Eis gelagert. Die Messlösung stand über einen täglich mit 6%-iger Natriumhypochloritlösung chlorierten Silberdraht mit dem Vorverstärker in Verbindung. Vor der Messung erfolgte nach Füllung der Pipette und Einbringen in die Extrazellulärlösung die Kontrolle des Pipettenwiderstandes. Nach Anlegen eines leichten Überdruckes wurde die Elektrode unter mikroskopischer Sicht über den Mikromanipulator an die Gliomzellen angenähert. Die Ausbildung des Gigaseals wurde über die veränderte Stromantwort auf einen applizierten Rechteckimpuls am Oszilloskop festgestellt (Abbildung 6A). Nach Ausbildung eines Gigaseals erfolgte die Kompensation der schnellen kapazitiven Komponente (C_F). Zur Schonung der Gliomzellen wurde das Potenzial auf -80 mV geklemmt, noch bevor die Zellmembran durch leichten, kurzzeitigen Unterdruck eröffnet wurde. Auch dieser Schritt spiegelte sich in einer veränderten Stromantwort am Oszilloskop wieder, wie in Abbildung 6B zu sehen ist.



Nun wurde die langsame kapazitive Komponente (C_S) kompensiert und im *current-clamp*-Modus die Zellkapazität bestimmt. Ausgehend von dieser *whole-cell*-Konfiguration wurde unter Überprüfung eines zeitlich stabilen Serienwiderstandes nun das Messprotokoll durchgeführt. Nach Aufnahme der Daten unter Kontrollbedingungen, erfolgte der Einwasch von bariumhaltiger (1 mM) Extrazellulärlösung und nach einer Latenzzeit von 15 Minuten eine erneute Durchführung des Messprotokolls.

2.7.3 Datenaufnahme und statistische Analyse

Die Signale wurden über den ELC-03XS Patch-Clamp-Verstärker (npi electronic; Tamm, Deutschland) verstärkt, bei 1 kHz gefiltert und mit 20 Frames pro Minute registriert. Über den Power1401mkII Analog-Digital-Wandler (CED; Cambridge, England) wurden die Signale digitalisiert. Mithilfe der Software Signal 4.10 (CED; Cambridge, England) konnten die Daten aufgenommen und analysiert werden bzw. umgekehrt auch Spannungs- und Stromprotokolle generiert und appliziert werden. Zum einen erfolgte intermittierend im *current-clamp*-Modus (dt.: Stromklemme) eine Dokumentation des Ruhemembranpotenzials. Im *voltage-clamp*-Modus (dt.: Spannungsklemme) wurde kontinuierlich dokumentiert, welcher Haltestrom I_H benötigt wurde, um das Membranpotenzial auf das Sollpotenzial zu klemmen. Daneben wurde die Echtzeitanalyse von Signal 4 genutzt, die Serien-, Membranwiderstand und Membrankapazität anzeigte, um die Stabilität von Zelle und Stromantwort zu kontrollieren.

Für die Erstellung einer Strom-Spannungs-Kurve wurden ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV in Stufen von jeweils 10 mV Spannungen von -140 bis $+50\text{ mV}$ angelegt und die Stromantwort der Zelle gemessen. Das Messprotokoll und eine typische Ableitung sind in Abbildung 7 zu sehen.

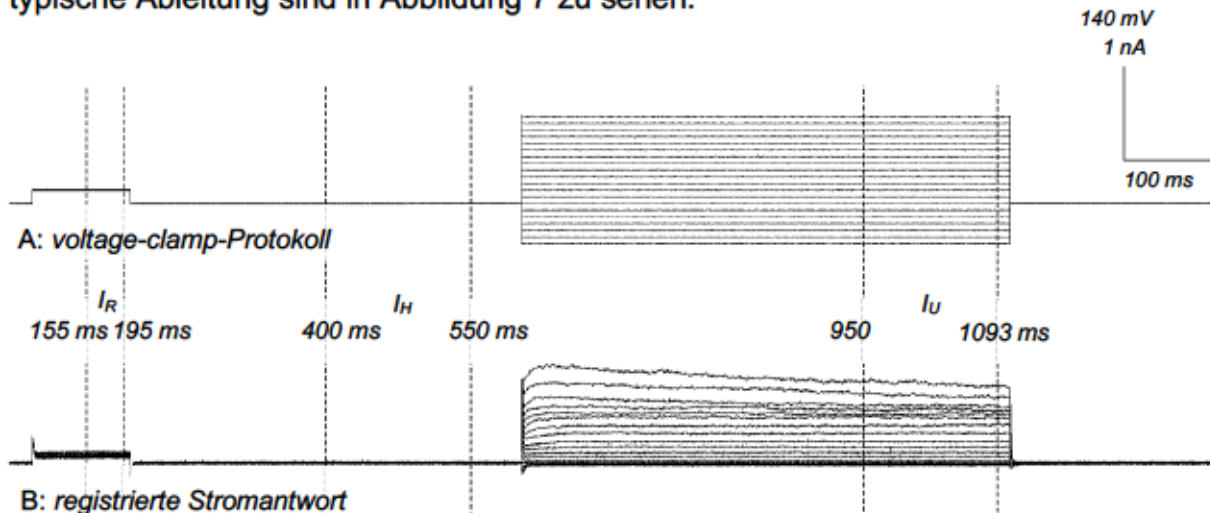


Abbildung 7 – voltage-clamp-Messprotokoll und Stromantwort C6 Gliomzelle

A: voltage-clamp-Protokoll und B: registrierte Stromantwort einer C6 Gliomzelle. Darstellung eines gesamten Messdurchgangs mit 10 mV Spannungsstufen von $U = -140\text{ mV}$ bis $U = +50\text{ mV}$ mit Überlagerung der angelegten Spannung bzw. gemessenen Ströme. Gestrichelte Linien markieren die Zeiträume, die für die Auswertung genutzt wurden, siehe Text. Maßstab: vertikal $U = 140\text{ mV}$ für A bzw. $I = 1\text{ nA}$ für B und horizontal $t = 100\text{ ms}$.

Zur Erstellung der Strom-Spannungs-Kurven wurde die Stromantwort (I_U) auf die angelegte Spannung (U) im Zeitraum von $t = 950\text{ ms} - 1093\text{ ms}$ des Protokolls nach Erreichen eines Plateaus gemittelt. Als Referenz diente der Haltestrom (I_H); dieser wurde über die Zeitspanne von $t = 400\text{ ms} - 550\text{ ms}$ des Messprotokolls abgelesen. Die Differenz wurde über die angelegte Spannung aufgetragen. Um den Membranwiderstand zu bestimmen, wurde ausgehend vom Haltepotenzial ein kleiner Rechteckimpuls $U_R = 20\text{ mV}$ am Anfang des Protokolls appliziert. Der Widerstand wurde aus der Stromantwort der Zelle (I_R), gemittelt über die Zeitspanne von $t = 155\text{ ms} - 195\text{ ms}$, mithilfe des Ohm'schen Gesetzes bestimmt.

Um die Zellkapazität zu bestimmen, wurde ein current-clamp-Protokoll genutzt. Hier wurden $I = 0,15\text{ nA}$ Rechteckimpulse appliziert. Das Messprotokoll und eine typische Ableitung sind in Abbildung 8 zu sehen.

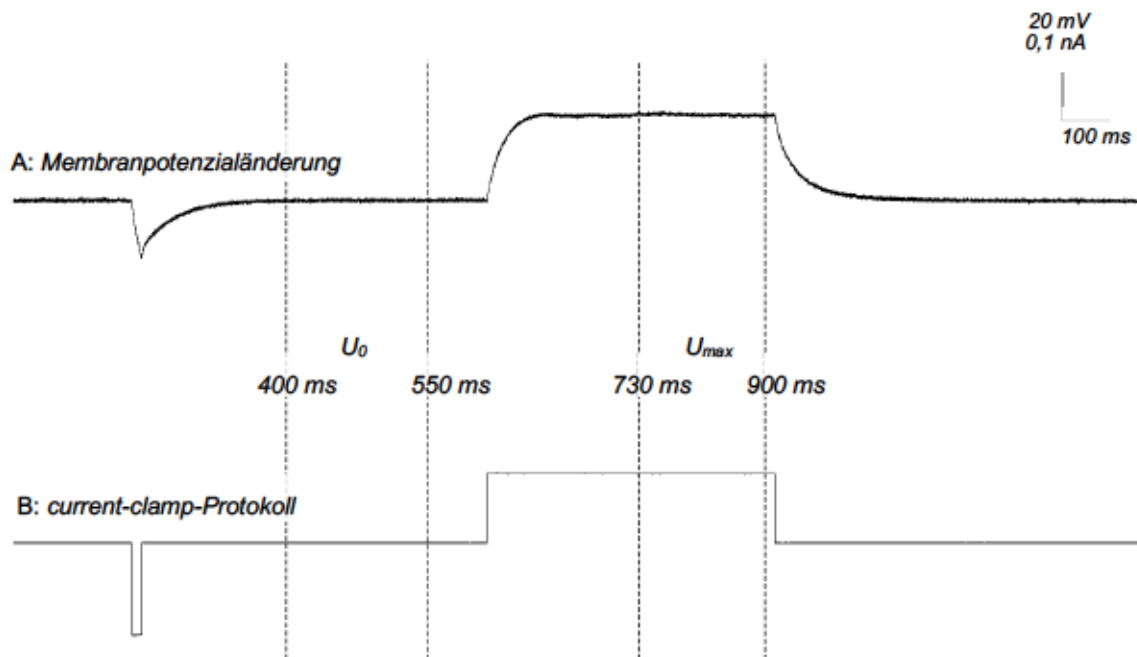


Abbildung 8 – current-clamp-Messprotokoll und Stromantwort C6 Gliomzelle

A: registrierte Membranpotenzialänderung (mV) infolge des B: current-clamp-Protokoll mit einem injizierten Strom von $I = 0,2 \text{ nA}$. Gestrichelte Linien markieren die Zeiträume, die für die Auswertung genutzt wurden (Details siehe Text). Maßstab: vertikal: $U = 20 \text{ mV}$ (A) bzw. $I = 0,1 \text{ nA}$ (B) und horizontal: $t = 100 \text{ ms}$ (beide).

Die maximale Spannungsantwort der Zelle (U_{max}) auf diesen Strom wurde über der Zeitspanne $t = 730 \text{ ms} - 900 \text{ ms}$ nach Erreichen eines Plateaus bestimmt. Durch Subtraktion des initialen Potentials (U_0), bestimmt im Zeitraum von $t = 400 \text{ ms} - 550 \text{ ms}$, konnte wie in Abbildung 9 dargestellt die maximale Potenzialänderung bestimmt werden.

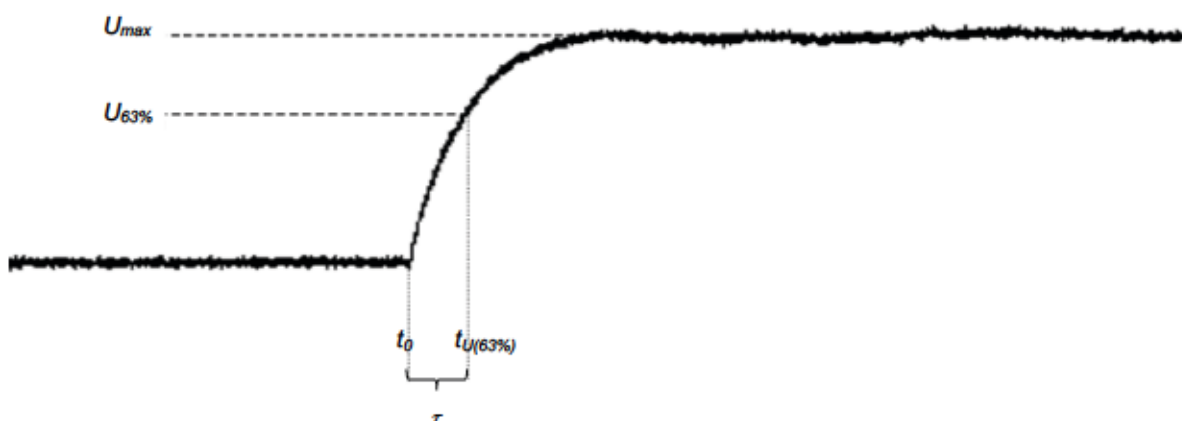


Abbildung 9 – Schema zur Bestimmung der Membranzeitkonstante, Detail aus Abbildung 8

Markiert sind die maximale Membranpotenzialänderung U_{max} einer C6 Gliomzelle infolge eines injizierten Stroms. Wird nun 63% von U_{max} mit einem Cursor markiert, kann über den Schnittpunkt mit der Kurve der Zeitpunkt $t_{U(63\%)}$ und damit die Membranzeitkonstante τ ermittelt werden.

Darauf aufbauend konnte die Membranzeitkonstante τ bestimmt werden, die als die Zeitdauer definiert ist, nach der ausgehend vom Reizbeginn t_0 ca. 63% der maximalen Potenzialänderung erreicht ist. Mithilfe der Membranzeitkonstante kann wiederum die Zellkapazität wie folgt berechnet werden: $C = \frac{\tau \cdot I}{U}$.

2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung erfolgte durch SigmaStat 3.5 (Systat Software, San Jose, CA, USA) und die graphische Darstellung durch MS Office Excel 2016 (Microsoft Corporation; Redmond, WA, USA) und SigmaPlot 13.0. Normalverteilte Daten werden – falls nicht anders angemerkt – als Mittelwerte mit der Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) angegeben. Statistische Vergleiche wurden mithilfe des Student-t-Test durchgeführt. Waren Messwerte innerhalb einer Versuchsgruppe nicht normalverteilt, erfolgte die Prüfung auf signifikante Unterschiede mithilfe des Rangsummentests nach Wilcoxon-Mann-Whitney. Für den Vergleich der ermittelten Kennlinien vor und nach Bariumapplikation wurde eine 2-WAY-ANOVA (Tukey Posthoc-Test) durchgeführt. Die Signifikanzniveaus sind mit Sternchen gekennzeichnet: $p < 0,05$ wurde mit einem Sternchen (*), $p < 0,01$ mit (**) und $p < 0,001$ mit (***) markiert.

III. ERGEBNISSE

3.1 DIFFERENZIELLE EXPRESSION DES KIR4.1

In der Literatur ist ein funktioneller Verlust des Kir4.1 bei Gliomen und Glioblastomen bereits beschrieben (Bordey und Sontheimer, 1998). Jedoch wurden die an der Universitätsmedizin Rostock aus PatientInnenmaterial isolierten und etablierten Glioblastomzelllinien bisher nicht dahingehend untersucht. Sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene zeigten sich hier Unterschiede im Ausmaß der residualen Kir4.1-Expression. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Zelllinien zur weiteren elektrophysiologischen Charakterisierung ausgewählt. Die Auswertung der quantitativen real-time-PCR wurde wie in Kapitel 8.3.5 beschrieben durchgeführt. Da für die weiteren elektrophysiologischen Untersuchungen die absoluten Mengen an mRNA nicht relevant waren, wurde ausschließlich eine relative Quantifizierung durch Normierung auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH durchgeführt. (Abbildung 10)

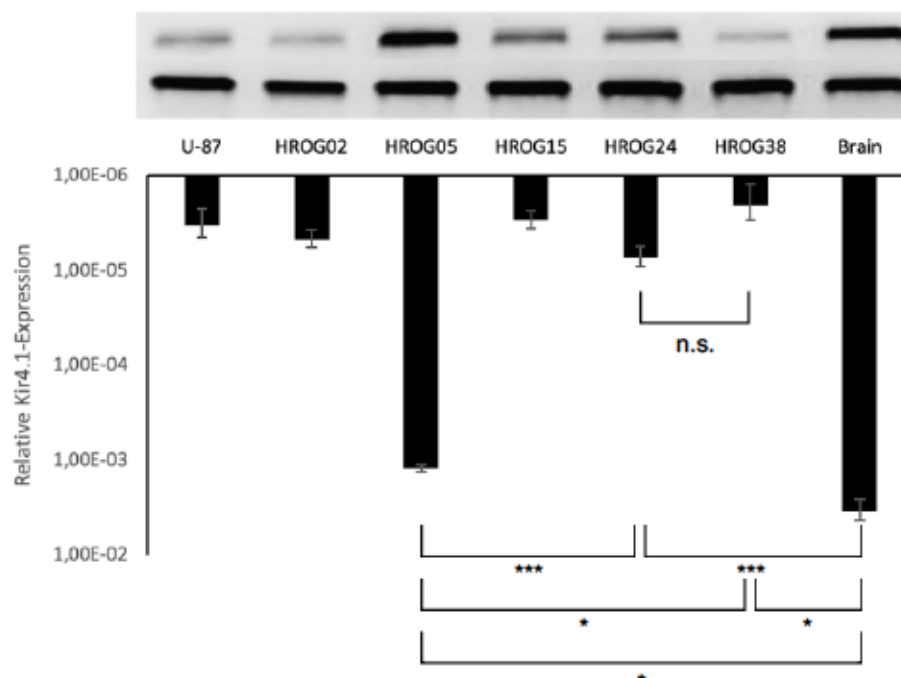


Abbildung 10 – quantitative rtPCR: Kir4.1 Expression der humanen Zelllinien

Relative Kir4.1-Expression (obere Bande) der humanen Glioblastomzelllinien HROG 02, 05, 15, 24, 38, sowie der kommerziell verfügbaren U-87 und humanem Gehirn als Positivkontrolle, jeweils normiert auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH (untere Bande) mit anschließender Gelelektrophorese der Amplifikate (n=4), logarithmische Darstellung, Fehlerbalken = SEM. Signifikanter Unterschied im Mittelwertvergleich nach Student-Newman-Keuls: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ mit (**) und $p < 0,001$ (***). Darstellung ausgewählter Paarvergleiche, Signifikanzniveaus für alle paarweisen Vergleiche siehe Tab 20 im Anhang.

Ergebnisse

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden nach Abschluss der elektrophysiologischen Experimente an den untersuchten Zellen erneut eine real-time-PCR-Analyse durchgeführt. Diesmal erfolgte die relative Quantifizierung auf Basis der Housekeeping-Gene GAPDH und S18. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt und bestätigten die bisherigen Resultate mit einer signifikanten höheren Kir4.1-Expression der Zelllinie HROG05 im Vergleich zu der Expression der HROG38-Glioblastomzellen.

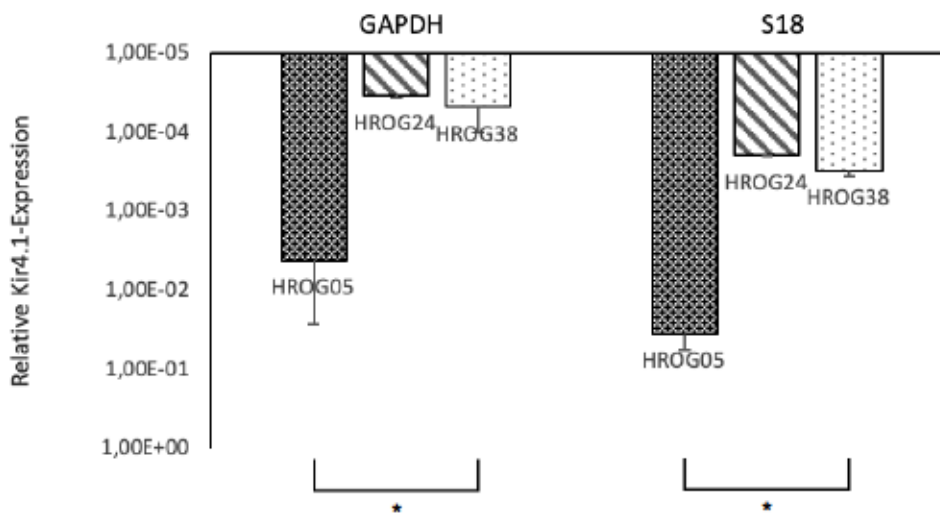


Abbildung 11 – quantitative real time PCR: Kir4.1 Expression der humanen Zelllinien

Relative Kir4.1- Expression der Glioblastomzelllinien HROG05, HROG24 und HROG38, jeweils normiert auf die Haushaltsgene GAPDH (links) und S18 (rechts), logarithmische Darstellung. $n = 4$. Signifikanter Unterschied im Rangsummentest nach Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0,029 < 0,05$ (*). Fehlerbalken: SEM.

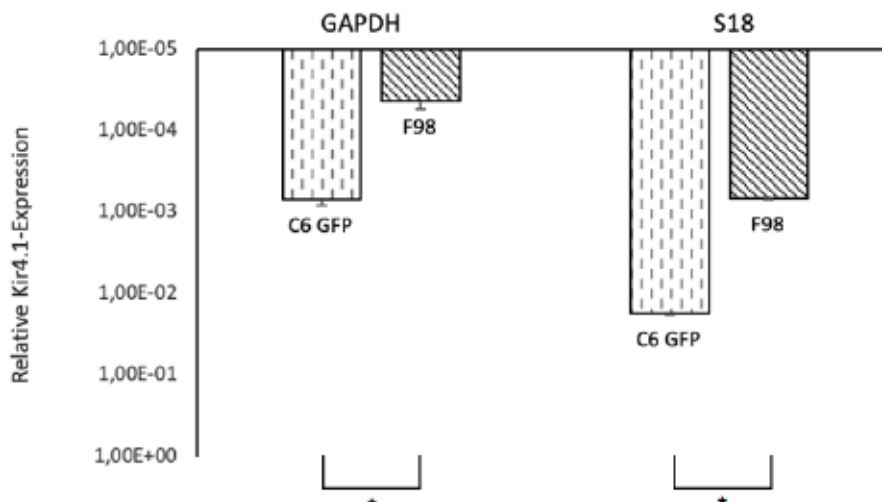


Abbildung 12 – quantitative real time PCR: Kir4.1 Expression der murinen Zelllinien

Relative Kir4.1- Expression der kommerziell verfügbaren Gliomzelllinien C6 GFP und F98, jeweils normiert auf die Haushaltsgene GAPDH (links) und S18 (rechts), logarithmische Darstellung. $n = 4$. Signifikanter Unterschied im Rangsummentest nach Wilcoxon-Mann-Whitney: $p = 0,029 < 0,05$ (*). Fehlerbalken = SEM.

Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob diese differenzielle Expression auch auf Proteinebene nachweisbar ist, wurden aus den jeweiligen Zelllinien Proteine für Western Blot-Versuche isoliert. Die Western Blot-Analysen zeigten eine Expression von Kir4.1. in allen untersuchten Zelllinien. Dabei konnten mit den Kir4.1-Antikörpern diverse Banden mit verschiedenen Molekulargewichten dargestellt werden. Zur exemplarischen quantitativen Auswertung wählten wir Banden bei ca. 42,5 kDa, entsprechend dem Molekulargewicht des Kir4.1 Kanalproteins, wie in Abbildung 13 gezeigt.

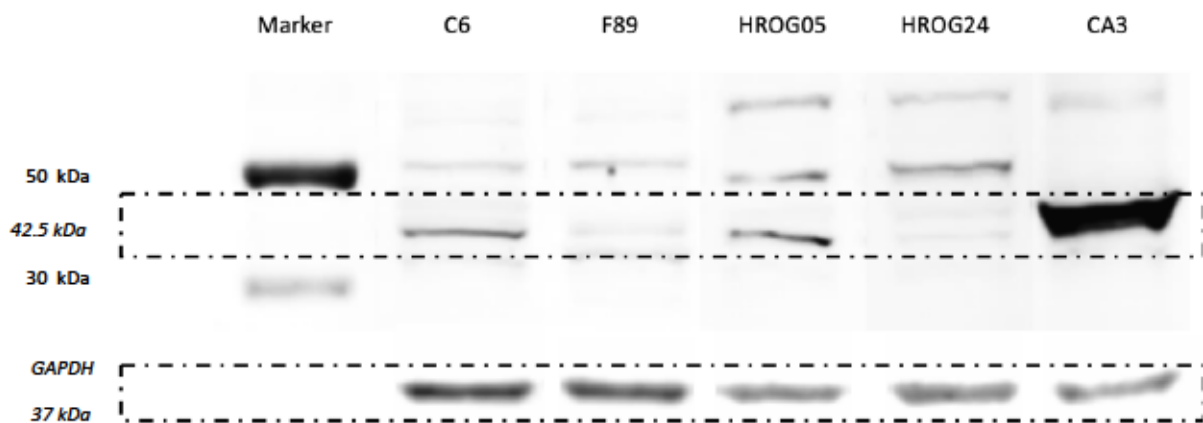


Abbildung 13 – Western Blot: Auswertung der Kir4.1-Expression in Relation zur GAPDH-Expression

Darstellung der Auswertung der Kir4.1- Expression auf Proteinebene einiger muriner und humaner Zelllinien. Darunter die kommerziell verfügbaren Gliomzelllinien C6 GFP und F98 sowie die aus Resektaten etablierten Glioblastomzelllinien HROG05 und HROG24, sowie zur Etablierung der Methode eine Positivkontrolle aus der CA3 Region der Maus.

Auch hier wurde beispielhaft eine relative Quantifizierung auf Grundlage der Expression des Housekeeping-Gens GAPDH durchgeführt. Dabei konnten die PCR-Ergebnisse mit Unterschieden in der Expression zwischen den Zelllinien bestätigt werden. Die höchsten Expressionsraten zeigte die HROG05 unter den humanen und die C6-GFP-Zellen im Vergleich zur anderen Rattenzelllinie F98. Die Expressionswerte, normiert auf Grundlage der Intensität der GAPDH-Bande, sind in Abbildung 14 dargestellt. Aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft durch die Mehrzahl an Kir4.1-positiven Banden und einer geringen Versuchszahl werteten wir diese Versuche nicht weiter statistisch aus.

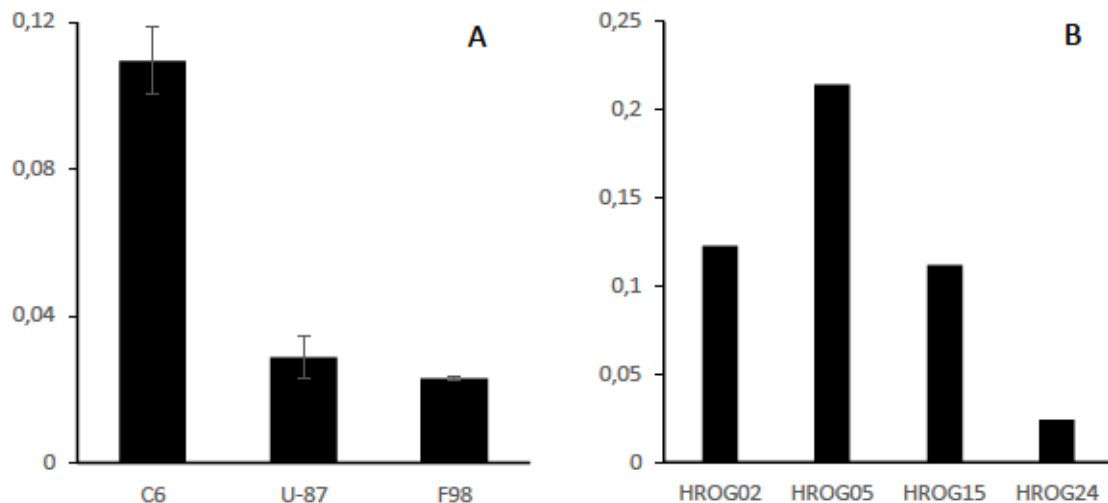


Abbildung 14 – Western Blot: Kir4.1-Expression

Relative Kir4.1- Expression auf Proteinebene der murinen und humanen Zelllinien. Darunter die kommerziell verfügbaren Gliomzelllinien C6 GFP und F98 sowie die aus Resektaten etablierten Glioblastomzelllinien HROG02, HROG05, HROG15 und HROG24. Expression jeweils normiert auf das Haushaltsgen GAPDH: A) murine Zelllinien n=2, B) humane Zelllinien n =1.

3.2 ETABLIERUNG DER ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN AN ZELLKULTUREN

Die Messung von Glioblastomzellen in Zellkultur musste im Rahmen dieser Arbeit an unserem Institut erst noch etabliert werden. Dazu gehörten Versuche mit verschiedenen Zellkultur-Gefäßen, die sowohl mit dem Inversmikroskop als auch mit dem Pipettenhalter des Mikromanipulators kompatibel sein musste. Zuletzt verwendeten wir 35 mm Eppendorf-Zellkulturschalen, die vor jeder Messung an den Messplatz angepasst wurden. Ebenso mussten Protokolle für das Pipettenziehgerät P-97 Sutter Instrument etabliert werden. Hierfür müssen Durchmesser der Spitze und Länge der generierten Spitze auf die zu untersuchenden Zellen abgestimmt werden. Eine kleine Öffnung ermöglicht eine einfachere Bildung des Giga-Seals, der für *patch-clamp*-Messungen unerlässlich ist, andererseits kann eine sehr kleine Öffnung die Eröffnung der Zelle für die Generierung der *whole-cell*-Konfiguration erschweren. Ebenso wird eine lange, schmale Pipettenspitze mit geringer Öffnungsfläche schneller durch Zell- oder Membranbestandteile verlegt, sodass es im Laufe der Experimente zu Störungen der Strommessung bis hin zum Abbruch bei Zunahme des Serienwiderstandes kommen kann. Umgekehrt ist eine große Pipettenspitze bei den durchgeführten Messungen

von über dreißig Minuten pro Zelle für die Stabilität des Serienwiderstandes zu bevorzugen, die Giga-Seal-Bildung ist mit solchen Pipetten jedoch deutlich erschwert. Ausgehend von vielen Versuchsreihen entstand ein Protokoll für das Pipettenziehgerät P-97 Sutter Instrument das im Allgemeinen Pipetten mit Widerständen von 3-5 M Ω lieferte (siehe Anhang Tab.19). Zwar ist ein stabiles Raumklima für elektrophysiologische Untersuchungen essenziell, trotzdem führen geringe Veränderungen schon zu Abweichungen der dadurch generierten Pipetten, sodass das Programm im Allgemeinen täglich modifiziert werden musste.

3.3 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ZELLEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die an der Universität Rostock nach chirurgischer Resektion in Zellkultur etablierten Glioblastom-Zelllinien (Mullins *et al.*, 2013) erstmals elektrophysiologisch mithilfe der *patch-clamp*-Technik untersucht. Dabei stellen nicht nur die im vorherigen Abschnitt bereits erwähnten technischen Aspekte eine Herausforderung dar. Die Versuche an entdifferenzierten Tumorzellen waren weiterhin aufgrund von veränderten Membraneigenschaften, die die Ausbildung eines Giga-seals verhindern, erschwert. Eine weitere Hürde war, Zellen auszuwählen, die über das gesamte Messprotokoll hinweg elektrophysiologisch stabil blieben. Neben den hierausgewerteten Zelllinien wurde zunächst auch die Zelllinien HROG24 in die Versuchsreihen miteinbezogen. Hier konnte jedoch nur in einigen wenigen Versuchen überhaupt die *Gigaseal*-Konfiguration erreicht werden, vermutlich aufgrund der stark veränderten und fragilen Zellmembran. Dies deckt sich auch mit dem lichtmikroskopischen Aspekt der Zellen dieser Linie. Diese technische Hürde generiert entsprechend natürlich eine gewisse Selektion, da nur diejenigen Zelllinien elektrophysiologisch charakterisiert werden können, deren Membran- und sonstige Eigenschaften eine Messung überhaupt möglich machen.

Da es bisher keine Daten gab, auf deren Basis Ein- und Ausschlusskriterien für die entsprechenden Zelllinien hätten definiert werden können, wurden diese im Laufe der Messungen festgelegt. Physiologisch bei Glia erwartete Parameter konnten dabei nur zur Orientierung herangezogen werden, da sich Glioblastomzellen durch ihre onkogene Transformation auch elektrophysiologisch von ihren Ursprungszellen unterscheiden. Basierend auf der Stabilität der Zellen im Laufe der Messungen wurden Einschlusskriterien für das Ruhemembranpotenzial für jede Zelllinie definiert. Zellen,

die im Verlauf der Messungen nicht stabil waren, zeigten dabei ein depolarisiertes Membranpotenzial und entsprechend einen überdurchschnittlich hohen Haltstrom (I_H). So wurden nur Zellen in die Auswertung eingeschlossen, die ein stabiles Membranpotenzial aufzeigten. Dies korrelierte mit einem Haltestrom, der vor Beginn der Messungen nicht unter -150 nA lag. Im Verlauf der Versuchsreihen wurden so für jede Zelllinie Normalwerte festgelegt. Dabei musste das Membranpotenzial nach einer Äquilibrationszeit, während derer der Ausgleich der Ionenkonzentrationen zwischen Zytoplasma und Intrazellulärlösung abgewartet wurde, unter den Grenzwerten von -65 mV für die C6-Gliomzellen und HROG38-Glioblastomzellen, sowie -25 mV für die HROG05-Glioblastomzellen liegen.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen sind in den Tabelle 14 bis 16 dargestellt. Das mittlere Membranpotenzial für die kommerziell verfügbare Ratten-Gliomzelllinie C6 GFP, die genutzt wurde, um die Patch-Clamp-Technik an Tumorzellen in Zellkultur an unserem Institut zu etablieren, betrug $-71,1 \pm 1,4$ mV. Für die aus PatientInnen isolierten Glioblastomzelllinie HROG05 lag das RMP bei $-29,1 \pm 1,7$ mV und bei der HROG38-Zelllinie bei $-60,4 \pm 1,6$ mV. Die durchschnittliche Zellkapazität betrug $66,5 \pm 6,7$ pF für die C6-GFP-Zellen, $100,4 \pm 10,8$ pF für die HROG05 und $74,4 \pm 6,3$ pF für die HROG38.

3.3.1 Gliomzelllinie C6 GFP

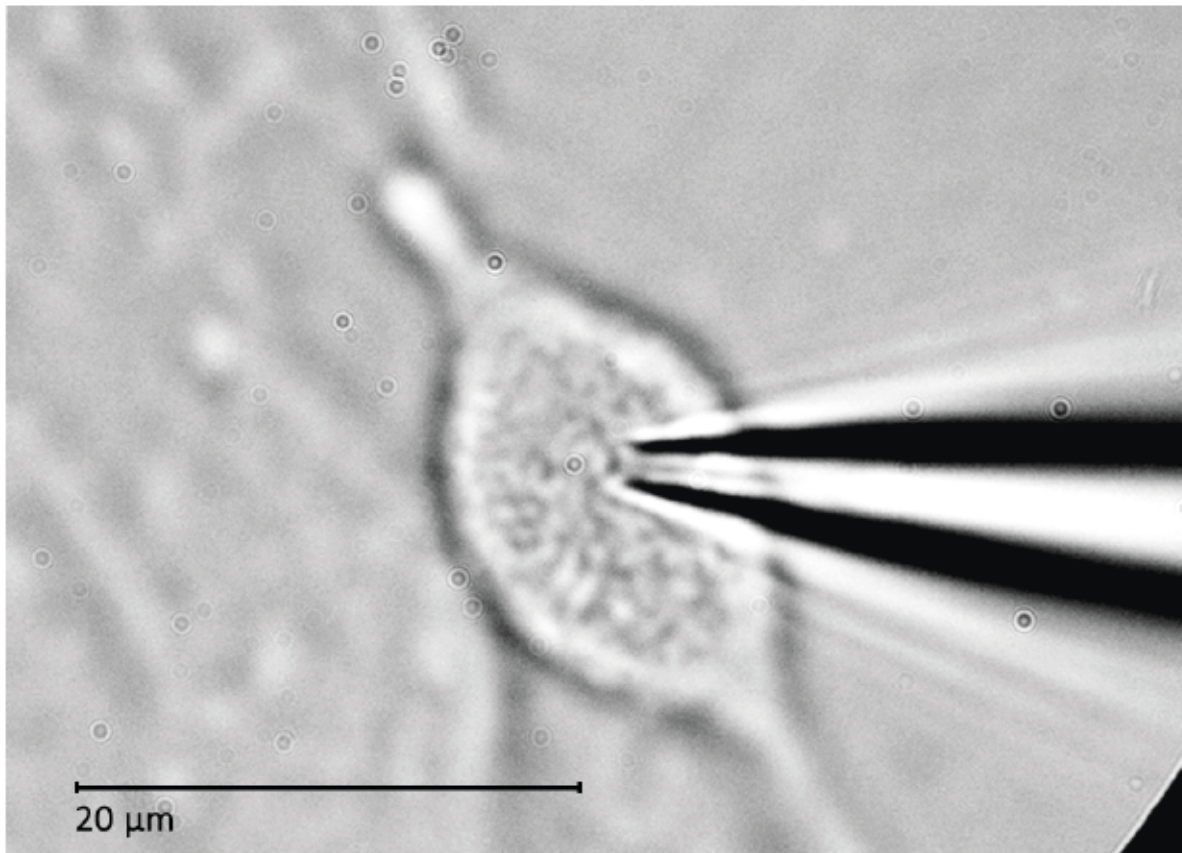


Abbildung 15 – C6 GFP-Gliomzelle während whole-cell Patch-Clamp-Messung

| <i>Parameter C6-GFP</i> | <i>Mittelwert ± SEM</i> |
|---------------------------------------|-------------------------|
| Ruhemembranpotenzial (<i>n</i> = 12) | -71,1 ± 1,4 mV |
| Serienwiderstand (<i>n</i> = 11) | 12,0 ± 0,9 MΩ |
| Zellkapazität (<i>n</i> = 11) | 66,5 ± 6,7 pF |
| Membranwiderstand (<i>n</i> = 11) | 237,7 ± 29,0 MΩ |
| Haltestrom (<i>n</i> = 11) | -0,072 ± 0,007 nA |

Tabelle 14 – elektrophysiologische Zellparameter C6-GFP

3.3.2 Glioblastomzelllinie HROG05

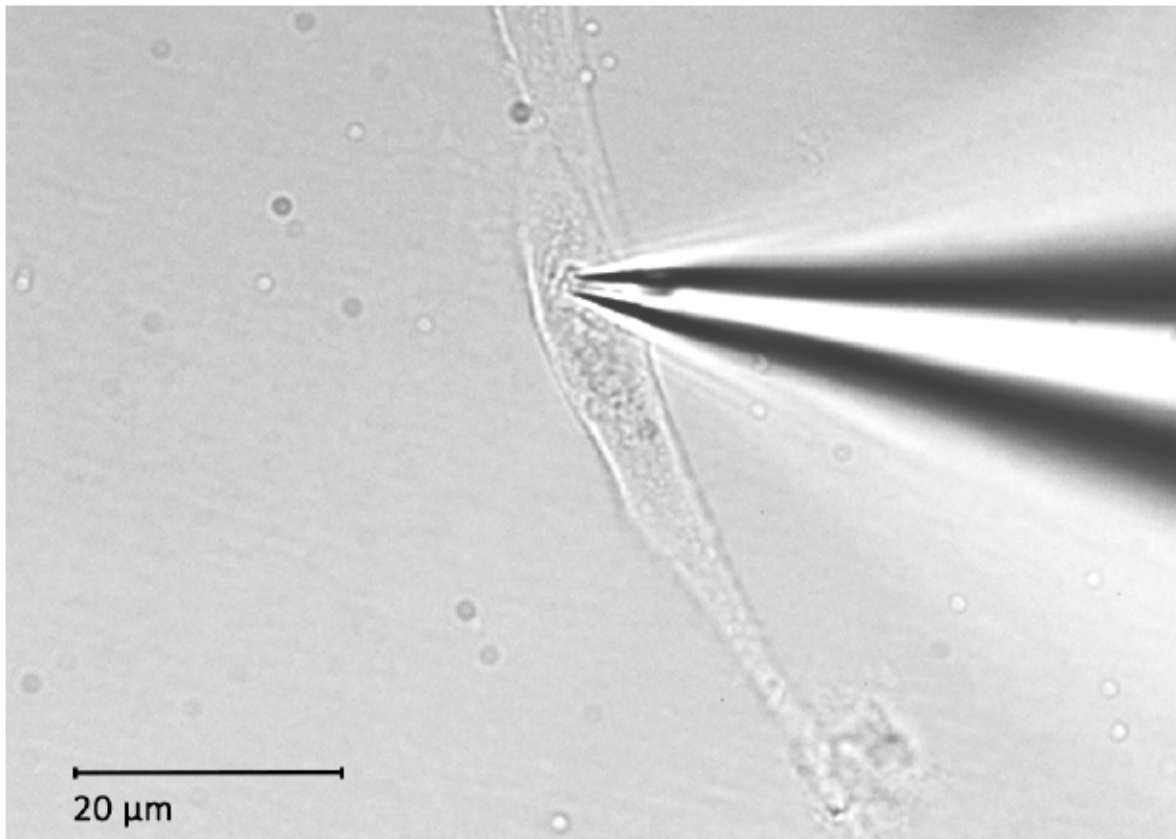


Abbildung 16 – HROG05-Glioblastomzelle während whole-cell Patch-Clamp-Messung

| <i>Parameter HROG05</i> | <i>Mittelwert ± SEM n = 10</i> |
|--|------------------------------------|
| Ruhemembranpotenzial (<i>n = 11</i>) | -29,1 ± 1,7 mV |
| Serienwiderstand (<i>n = 10</i>) | 15,1 ± 1,4 MΩ |
| Zellkapazität (<i>n = 10</i>) | 100,4 ± 10,8 pF |
| Membranwiderstand (<i>n = 11</i>) | 368,7 ± 40,1 MΩ |
| Haltestrom (<i>n = 10</i>) | -0,147 ± 0,016 nA |

Tabelle 15 – elektrophysiologische Zellparameter HROG05

3.3.3 Glioblastomzelllinie HROG38

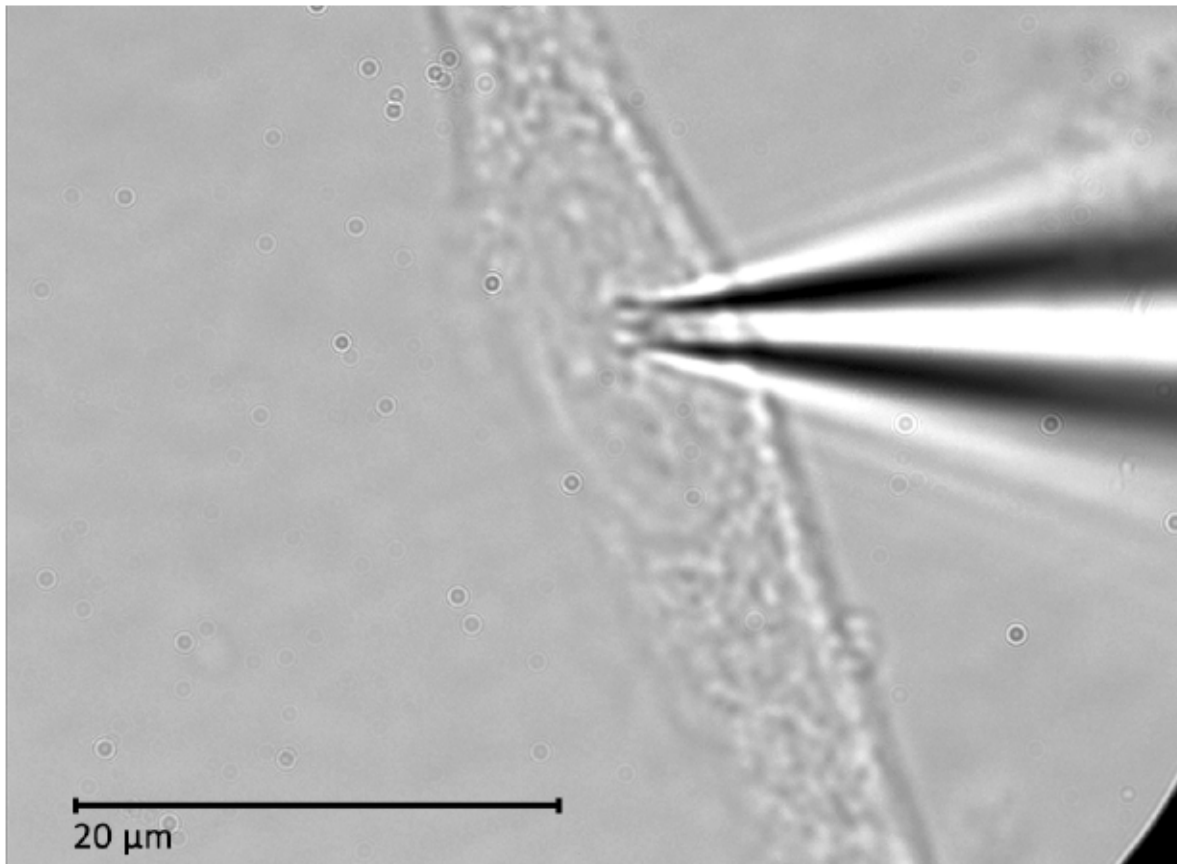
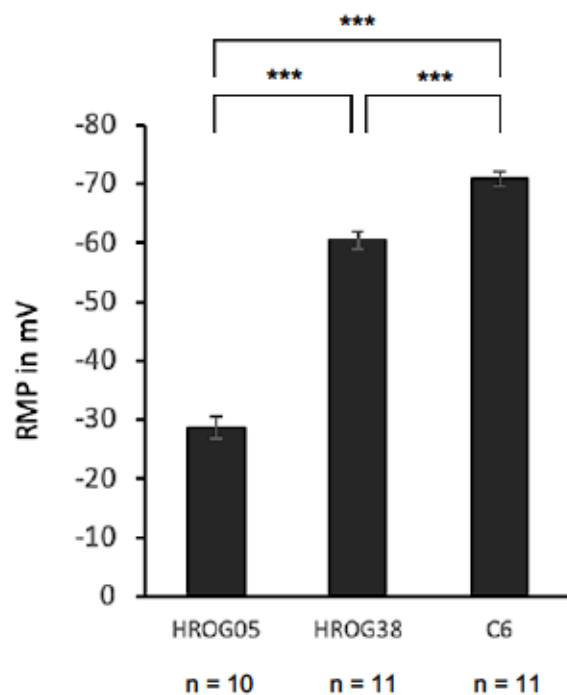


Abbildung 17 – HROG038-Glioblastomzelle während whole-cell Patch-Clamp-Messung

| <i>Parameter HROG38</i> | <i>Mittelwert ± SEM n = 10</i> |
|--|------------------------------------|
| Ruhemembranpotenzial (<i>n = 12</i>) | $-60,4 \pm 1,6$ mV |
| Serienwiderstand (<i>n = 11</i>) | $16,9 \pm 1,1$ MΩ |
| Zellkapazität (<i>n = 10</i>) | $74,4 \pm 6,3$ pF |
| Membranwiderstand (<i>n = 11</i>) | $254,1 \pm 51,1$ MΩ |
| Haltestrom (<i>n = 11</i>) | $-0,132 \pm 0,01$ nA |

Tabelle 16 – elektrophysiologische Zellparameter HROG38

3.4 UNTERSCHIEDE IM RUHEMEMBRANPOTENZIAL DER ZELLLINIEN



Die Bestimmung des Ruhemembranpotenzials vor Beginn der Messungen zeigt, dass die Zelllinien unterschiedlich stark depolarisiert sind. Während die C6-GFP-Gliomzellen mit $-71,2 \pm 1,1$ mV noch ein relativ negatives Ruhemembranpotenzial aufweisen, sind Zellen der Linie HROG38 mit durchschnittlich $-60,4 \pm 1,6$ mV ein wenig und die HROG05-Glioblastomzellen mit $-29,1 \pm 1,7$ mV sehr deutlich depolarisiert.

Abbildung 18 – Ruhemembranpotenzial der Zelllinien

Mittleres RMP der Zelllinien vor Barium-Applikation. Signifikanter Unterschied im Mittelwertvergleich nach Student-Newman-Keuls: $p < 0,001$ (***) Fehlerbalken: SEM.

3.5 FUNKTIONELLE EXPRESSION EINES BARIUMSENSITIVEN STROMS

Durch Applikation von Spannungsstufen und Registrierung der entsprechenden Ströme jeweils vor und nach Bariumapplikation und die Subtraktion der entsprechenden Ströme konnte eine Strom-Spannungs-Kennlinie für den Barium-sensitiven Anteil der Ströme erstellt werden. Die Ergebnisse sind im Folgenden für die einzelnen Zelllinien separat dargelegt.

3.5.1 C6

In Abbildung 19 finden sich Beispielspuren der registrierten Ströme für die C6 GFP-Ratten-Gliomzelllinie vor und nach Barium-Applikation über die Extrazellulärlösung.

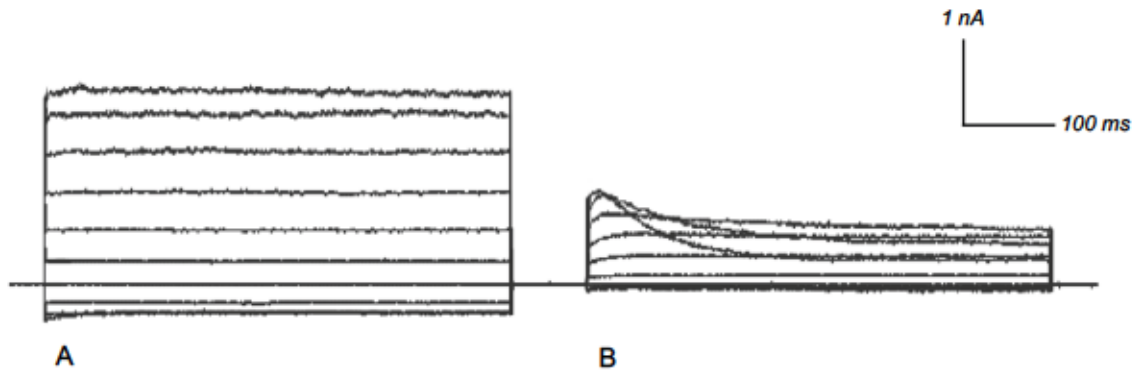


Abbildung 19 – Beispielspur C6 GFP

Ausschnitt der Stromantwort einer C6-GFP-Gliomzelle infolge applizierter Spannungsstufen von -140 mV bis + 50 mV, überlagerte Darstellung. A: Kontrolle B: nach Zugabe von 1mM Ba²⁺. Maßstab: vertikal I = 1 nA horizontal t = 100 ms.

Bei den Experimenten zeigen sich signifikante Unterschiede in der Stromantwort infolge der Bariumapplikation. Beispielhaft ist der gemittelte Strom über die Spannungsstufen -60 mV bis -70 mV in Abhängigkeit von Barium in Abbildung 20 dargestellt. Dabei zeigt sich eine signifikante Reduktion des gemessenen Stroms um etwa 28%.

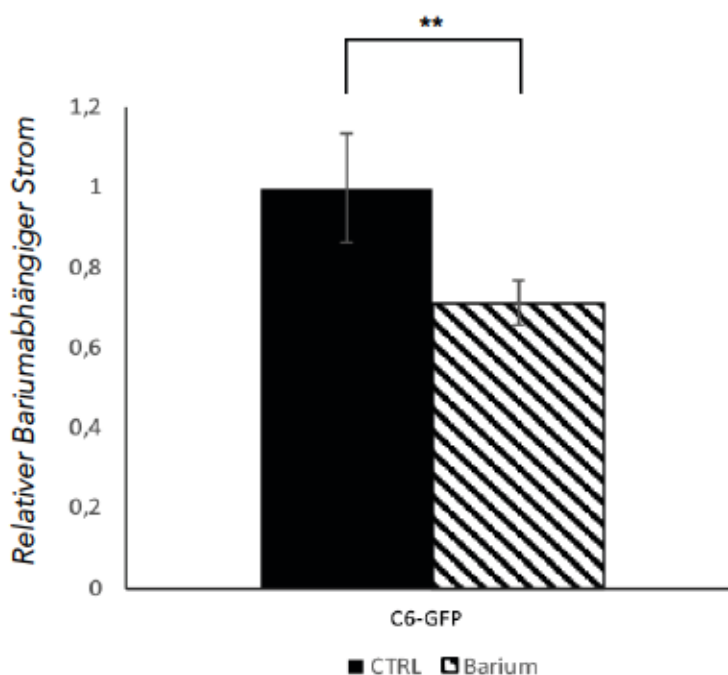


Abbildung 20 – Relativer Bariumsensitiver Strom C6

Mittelwerte der gemessenen Ströme über die Spannungsstufen -60 mV, -130 mV und -70 mV vor nach Bariumapplikation. Darstellung normiert auf den gemessenen Strom vor Einwaschen der Bariumhaltigen (1mM) Extrazellulärlösung. Hier zeigt sich Reduktion der einwärtsgerichteten Stromkomponente um ca. 28%. Signifikanter Unterschied im Rangsummentest nach Wilcoxon-Mann-Whitney. $p < 0,01$ (**). $n = 10$. Fehlerbalken: SEM.

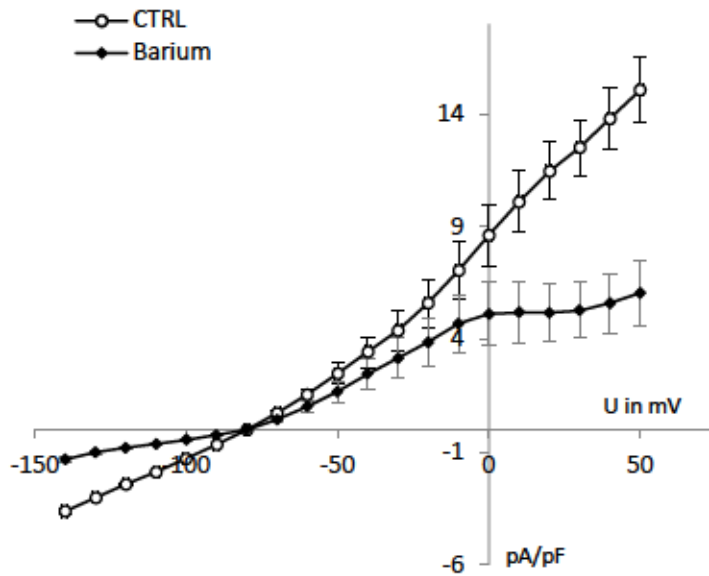


Abbildung 21 – Strom-Spannungs-Kennlinie C6-GFP

Strom-Spannungs-Kennlinien für die Zelllinie C6-GFP. Mittelwerte der gemessenen Ströme aufgetragen über die entsprechenden angelegten Spannungsstufen von -140 bis +50 mV vor und nach Bariumapplikation. Darstellung in pA/pF, bezogen auf die durchschnittliche Zellkapazität der Zelllinie. Signifikanter Unterschied über die gesamte Strom-Spannungsbeziehung hinweg (2-WAY-ANOVA, Tukey Posthoc-Test). ($p < 0,001$) $n = 10$. Fehlerbalken: SEM

In der weiteren Analyse der Strom-Spannungs-Beziehung zeigte sich ein kleiner bariumsensitiver Strom, mit sowohl auswärts als auch einwärts gerichteter Komponente. Dabei zeigt sich, dass bei physiologischen Membranpotenzialen von -80 bis 0 mV ein einwärtsgerichteter Strom durch die Bariumapplikation blockiert wird, jedoch der bei depolarisierten Membranpotenzialen auftretende, auswärts gerichtete Ionenstrom nur partiell inhibiert wird. (Abb. 21 und 22)

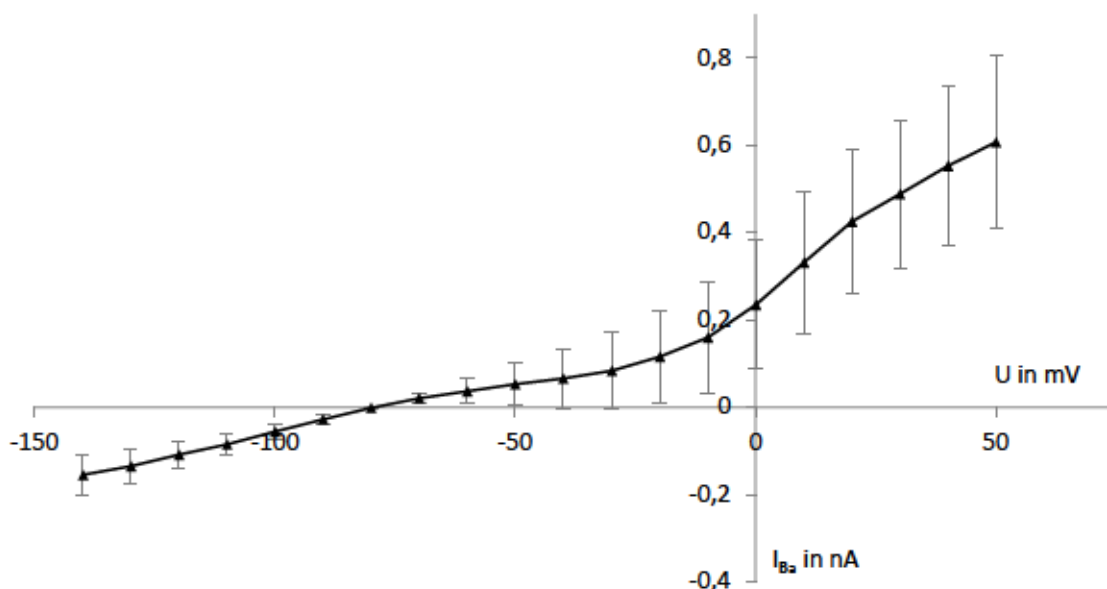


Abbildung 22 C6-GFP Bariumsensitiver Strom

Strom-Spannungs-Kennlinie für die Zelllinie C6-GFP. Differenz der Mittelwerte der gemessenen Ströme vor und nach Bariumapplikation, aufgetragen über die entsprechenden angelegten Spannungsstufen von -140 bis +50 mV. $n = 10$. Fehlerbalken: SEM

3.5.2 HROG38

Ebenso konnte für die Zelllinie HROG38 ein bariumsensitiver Strom nachgewiesen werden. Beispielspuren zur Baseline und nach Einwaschen der bariumhaltigen Extrazellulärlösung finden sich in Abbildung 23.

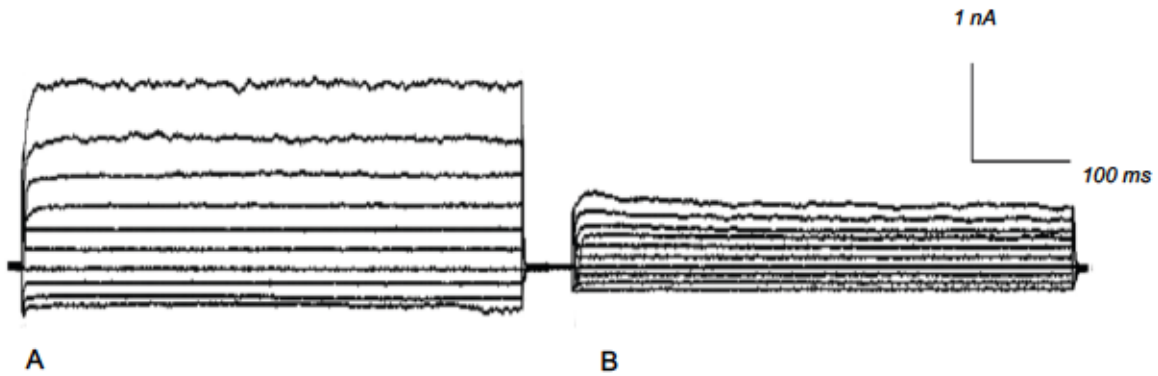


Abbildung 23 – Beispielspur HROG38

Ausschnitt der Stromantwort einer HROG38-Glioblastomzelle infolge applizierter Spannungsstufen von -140 mV bis +50 mV, überlagerte Darstellung. A: Kontrolle B: nach Zugabe von 1mM Ba²⁺; Maßstab: vertikal I = 1 nA horizontal t = 100 ms.

Auch die Strom-Spannungskennlinie für diese Zelllinie ist signifikant verändert infolge der Bariumapplikation (Abbildungen 24 und 25).

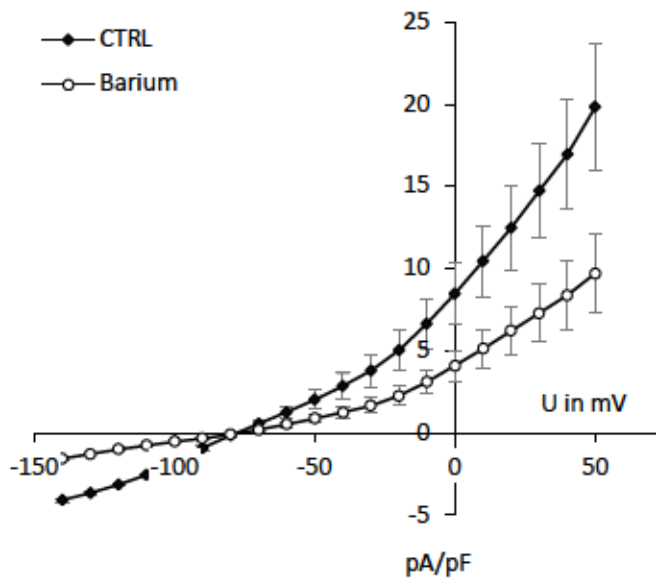


Abbildung 24 – Strom-Spannungskennlinie HROG38

Strom-Spannungskennlinie für die Zelllinie HROG38. Mittelwerte der gemessenen Ströme aufgetragen über die entsprechenden angelegten Spannungsstufen von -140 bis +50 mV vor und nach Bariumapplikation. Darstellung des Stromes in pA/pF, bezogen auf die durchschnittliche Zellkapazität der Zelllinie. Signifikanter Unterschied über die gesamte Strom-Spannungsbeziehung hinweg (2-WAY-ANOVA, Tukey Posthoc-Test). ($p < 0,001$) $n = 10$. Fehlerbalken: SEM

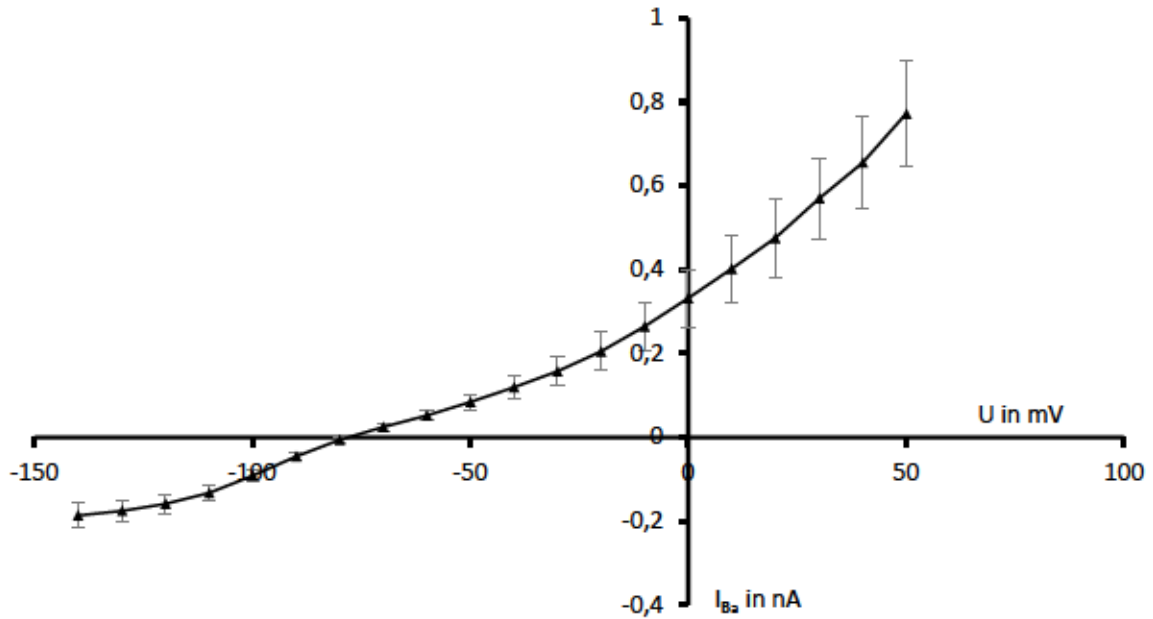


Abbildung 25 – HROG38 Bariumsensitiver Strom

Strom-Spannungs-Kennlinien für die Zelllinie HROG38. Differenz der Mittelwerte der gemessenen Ströme vor und nach Bariumapplikation, aufgetragen über die entsprechenden angelegten Spannungsstufen von -140 bis +50 mV. n = 10. Fehlerbalken: SEM

Der relative Barium-sensitive Strom, gemittelt über die Spannungsstufen -60 bis -70 mV ist in Abbildung 26 dargestellt. Auch hier zeigt sich Reduktion der einwärtsgerichteten Stromkomponente um ca. 60%.

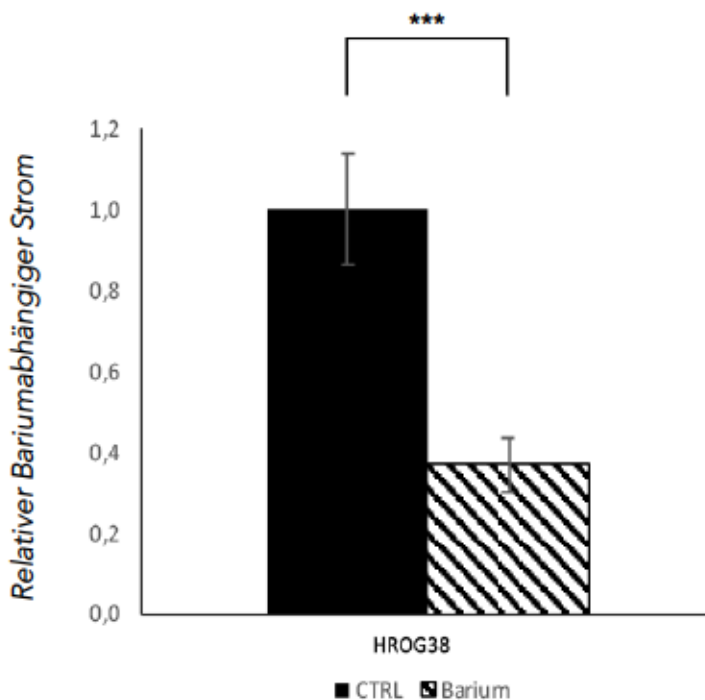


Abbildung 26 – Relativer Bariumsensitiver Strom HROG38

Mittelwerte der gemessenen Ströme über die Spannungsstufen -60 mV, - und -70 mV vor nach Bariumapplikation. Darstellung normiert auf den gemessenen Strom vor Einwaschen der Barium-haltigen (1mM) Extrazellulärlösung. Hier zeigt sich Reduktion der einwärtsgerichteten Stromkomponente um ca. 60%. Signifikanter Unterschied im Rangsummen-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney. p < 0,001 (***) n = 10. Fehlerbalken: SEM.

3.5.3 HROG05

Für die Zelllinie HROG05 konnte über den gesamten Strom-Spannung-Verlauf kein signifikanter Unterschied der gemessenen Ströme vor und nach Bariumapplikation beobachtet werden, die Strom-Spannungs-Kennlinien (Abbildungen 29) vor und nach Bariumapplikation sind nicht signifikant verschieden. Die ist auch anhand der Beispielspuren (Abbildung 28) zu erahnen.

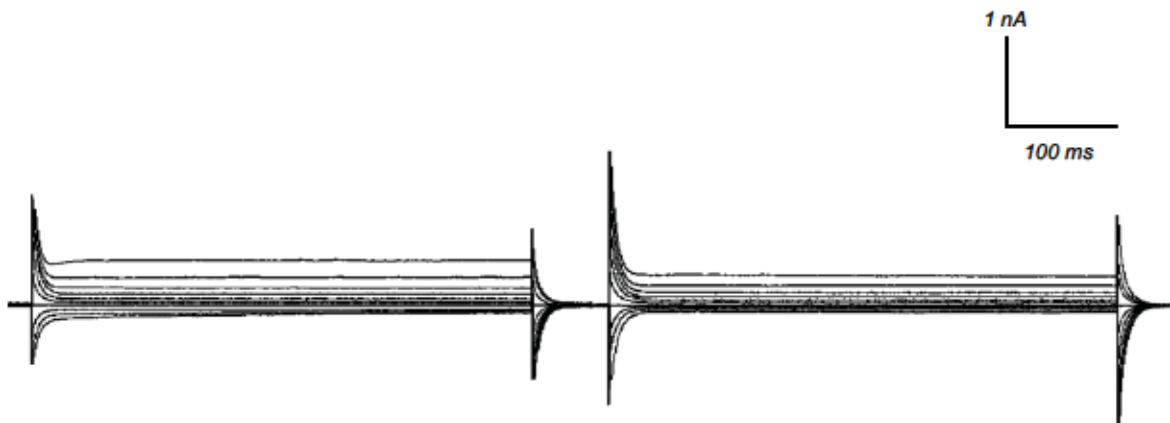


Abbildung 27 – Beispielspur HROG05

Ausschnitt der Stromantwort einer HROG05-Glioblastomzelle infolge applizierter Spannungsstufen von -140 mV bis +50 mV, überlagerte Darstellung. A: Kontrolle B: nach Zugabe von 1mM Ba2+.

Maßstab: vertikal I = 1 nA horizontal t = 100 ms.

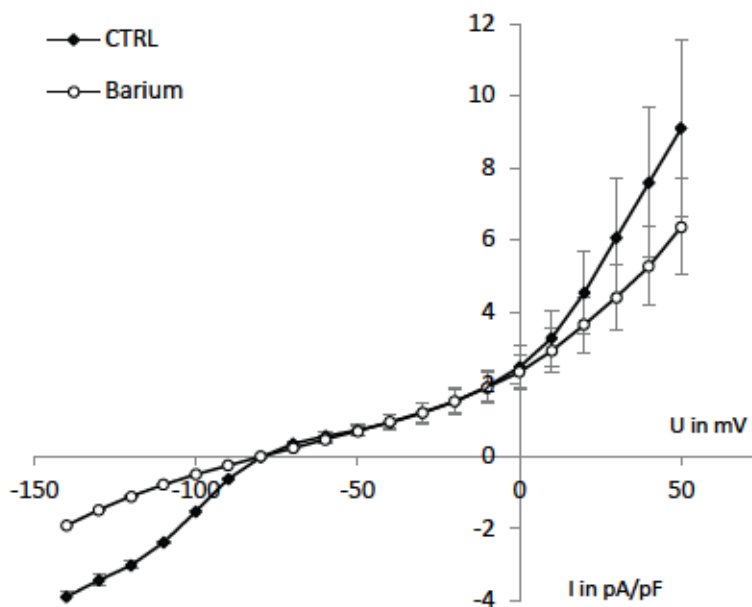


Abbildung 28 – Strom-Spannungs-Kennlinie HROG05

Strom-Spannungs-Kennlinien für die Zelllinie HROG05. Mittelwerte der gemessenen Ströme aufgetragen über die entsprechenden angelegten Spannungsstufen von -140 bis +50 mV vor und nach Bariumapplikation. Darstellung des Stromes in pA/pF, bezogen auf die durchschnittliche Zellkapazität der Zelllinie. Kein signifikanter Unterschied über die gesamte Strom-Spannungsbeziehung hinweg, ausschließlich über die Spannungsstufen -110 bis -150 mV und +30 bis +50 mV. (2-WAY-ANOVA, Tukey Posthoc-Test). ($p < 0,05$) $n = 10$. Fehlerbalken: SEM

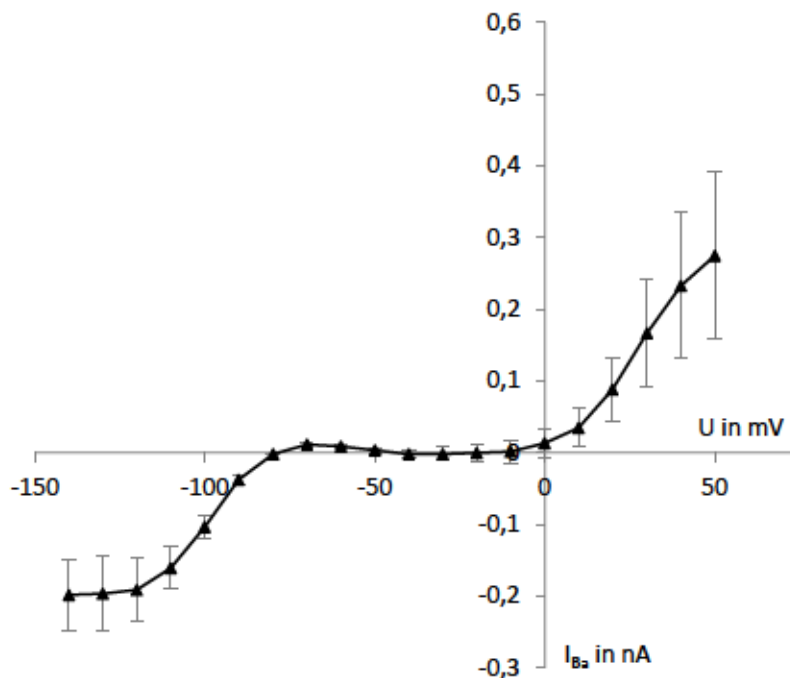


Abbildung 29 –
Bariumsensitiver
Strom HROG05

Strom-Spannungs-
Kennlinien für die Zellli-
nie HROG05. Differenz
der Mittelwerte der ge-
messenen Ströme vor
und nach Bariumappli-
kation, aufgetragen
über die entsprechen-
den angelegten Span-
nungsstufen von -140
bis +50 mV. n = 10.
Fehlerbalken: SEM

Jedoch zeigte sich in der statistischen Auswertung bei hyperpolarisierten Potenzialen über die Spannungsstufen von $U = -110$ bis $U = -140$ mV, sowie bei depolarisierten Potenzialen von $U = 30$ mV bis $U = 50$ mV ein signifikanter Unterschied der Stromantwort abhängig von der Bariumapplikation. (2-WAY-ANOVA, Tukey-Post-Hoc-Test, $p < 0,05$), nicht jedoch im physiologischen relevanten Bereich von etwa -80 bis 0 mV.

3.6 BARIUMABHÄNGIGE DEPOLARISATION DER ZELLEN

Entsprechend des Nachweises Barium-sensitiver Ströme konnte auch ein Barium-abhängiger Effekt auf das Membranpotenzial der Gliomzellen nachgewiesen werden. So zeigten sowohl die Gliomzelllinie C6-GFP als auch die humane Glioblastomzelllinie HROG38 eine signifikante Depolarisation infolge der Bariumapplikation. Bei der HROG05-Glioblastomzelllinie führte das Einwaschen von Barium nicht zu einer signifikanten Veränderung des Membranpotenzials. (Abb. 31)

Für die Zelllinie C6 GFP lag das Membranpotenzial initial bei $-71,23 \pm 1,14$ mV und lag nach Bariumapplikation bei $-63,10 \pm 1,39$ mV. Für die Glioblastomzelllinien lag das RMP initial bei $-29,12 \pm 1,70$ mV für die HROG05 und $-60,42 \pm 1,56$ mV für die HROG38 und nach Applikation von 1mM Ba^{2+} über die Extrazellulärlösung bei $-26,88 \pm 1,30$ mV bzw. $-47,97 \pm 1,24$ mV für die HROG38.

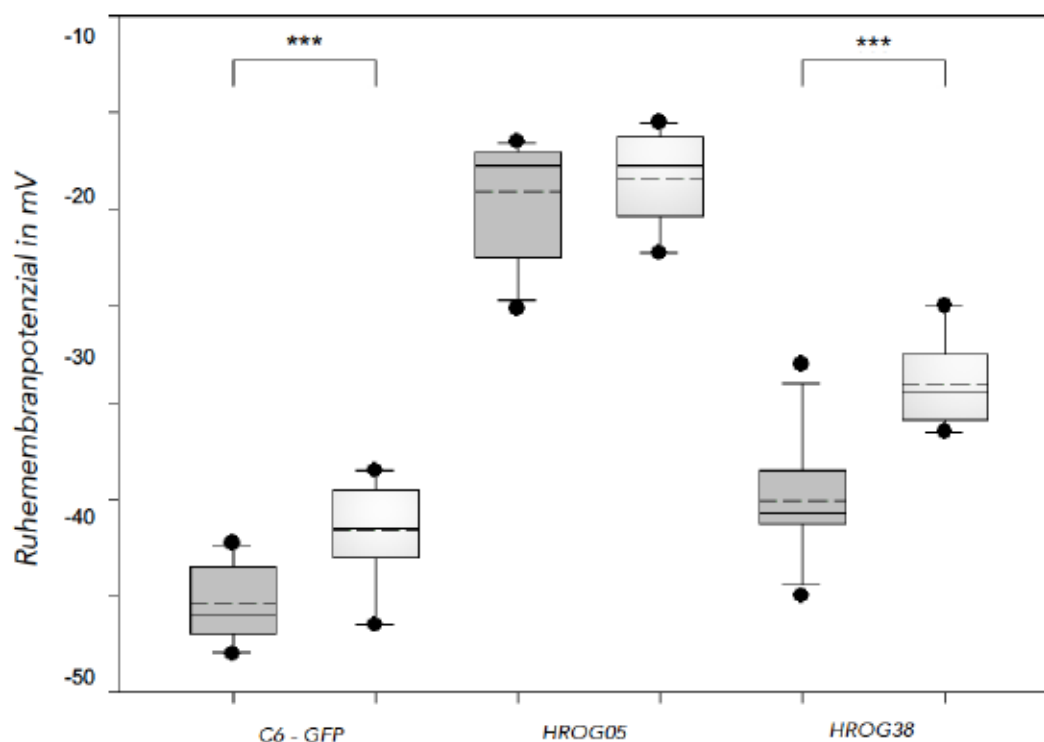


Abbildung 30 – Beeinflussung des Ruhemembranpotenzials durch Bariumapplikation

Darstellung des durchschnittlichen Ruhemembranpotenzials (RMP) der jeweiligen Zelllinien im Box-Whisker-Plot. Grau: Ruhemembranpotenzial vor Bariumapplikation. Weiß: Membranpotenzial nach Einwasch von Extrazellulärlösung mit einer Bariumkonzentration von 1mM. Signifikante Unterschiede im t-Test sind durch Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,01$ mit (**)) und $p < 0,001$ mit (***)). $n = 10$. (— Median, — arithmetischer Mittelwert, □ 25. bzw. 75. Perzentil, T ⊥ 10. bzw. 90. Perzentil, • Extrema)

Auswaschversuche gestalteten sich aufgrund der Länge der Messungen schwierig. Die vereinzelt durchgeführten Auswaschversuche konnten aufgrund der geringen Anzahl nicht statistisch ausgewertet werden, zeigten jedoch eine Repolarisation des Membranpotenzials und eine Reversibilität des Bariumeffektes.

3.7 BARIUMABHÄNGIGER ANSTIEG DES MEMBRANWIDERSTANDES

Neben einem Effekt von Bariumionen auf das Membranpotenzial der Gliomzellen konnte ebenfalls eine Beeinflussung des Membranwiderstandes durch Ba^{2+} demonstriert werden. Dabei waren die Membranwiderstände der Zelllinien vor Bariumapplikation nicht signifikant unterschiedlich. Jedoch zeigten sowohl die Gliomzelllinie C6-GFP als auch die humane Glioblastomzelllinie HROG38 eine signifikante Zunahme des Membranwiderstandes infolge der Bariumapplikation. Bei der HROG05-Glioblastomzelllinie dagegen war ebenso wie bezüglich des Membranpotenzials kein Bariumeffekt auf den Membranwiderstand zu beobachten. Für die Zelllinie C6 GFP

lag der Membranwiderstand (R_M) initial bei $237,7 \pm 29,1 \text{ M}\Omega$ und lag nach Bariumapplikation bei $364,6 \pm 43,9 \text{ M}\Omega$. Für die Glioblastomzelllinien lag R_M initial bei $368,7 \pm 40,1 \text{ M}\Omega$ für die HROG05 und $254,1 \pm 51,1 \text{ M}\Omega$ für die HROG38 und nach Applikation von 1mM Ba^{2+} über die Extrazellulärlösung bei $425,6 \pm 44,5 \text{ M}\Omega$ bzw. $621,9 \pm 124,6 \text{ M}\Omega$ für die HROG38.

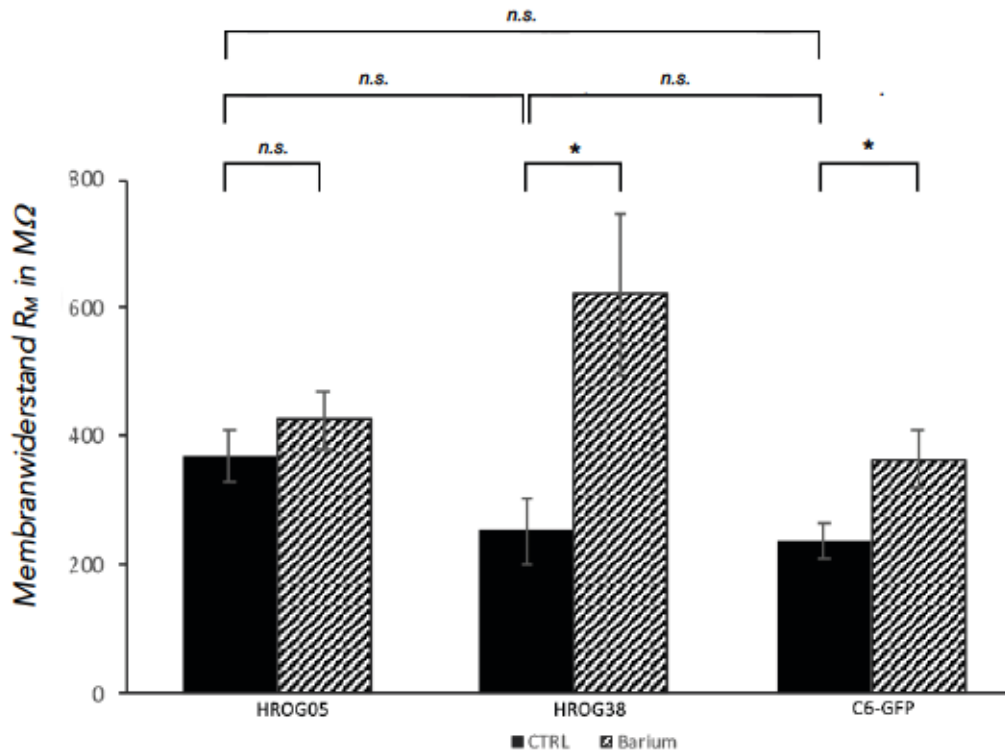


Abbildung 31 – Beeinflussung des Membranwiderstandes durch Bariumapplikation

Darstellung des durchschnittlichen Membranwiderstandes (R_M) der jeweiligen Zelllinien. Streifen: Membranwiderstand vor Bariumapplikation. Schwarz: Membranwiderstand nach Einwaschen von Extrazellulärlösung mit einer Bariumkonzentration von 1mM . Signifikante Unterschiede im t-Test (C6-GFP) bzw. im Rangsummen-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney (HROG38) sind durch Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,05$). $n = 10$, Fehlerbalken: SEM.

IV. DISKUSSION

Molekularbiologische Untersuchungen sind derzeit einer der Schwerpunkte in der Glioblastomforschung. Entsprechend sind für Gliome und Glioblastome in der Literatur eine Vielzahl an Mutationen beschrieben (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Suzuki *et al.*, 2015). Auch die an der Universität Rostock im Rahmen einer Zusammenarbeit der Kliniken für Pädiatrie, Neurochirurgie und der experimentellen Chirurgie etablierten Zelllinien wurden bereits molekularbiologisch untersucht. Dabei zeigten sich unter anderem MGMT-Promoter-Methylierungen, EGFR-Amplifikation und TP53- und K-ras-Mutationen (Mullins *et al.*, 2013). Elektrophysiologische Experimente an Tumorzellen sind dagegen weniger üblich, da sie sich einerseits aufwändiger gestalten und sich nicht unmittelbar Zielstrukturen für gezielte onkologische Therapien identifizieren lassen. Trotzdem gewinnen speziell Kaliumkanäle, aber auch andere Ionenkanäle und Transporter als potenzielle onkologische Angriffspunkte an Bedeutung (Arcangeli und Becchetti, 2010; Huang und Jan, 2014). So gibt es bereits den Ansatz in einem Maus-Xenograft-Modell durch Inhibition der α 1-Untereinheit der in Glioblastomen überexprimierten Na-K-ATPase die Migration und Proliferation der Tumorzellen zu reduzieren (Lefranc *et al.*, 2008). Da der Kir4.1-Kanal, wie bereits dargelegt, durch seine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Membranpotenzials in Gliazellen sowohl die Erregbarkeit der umgebenden Neuronen moduliert, als auch Einfluss auf Zelldifferenzierung und -proliferation nimmt, ist auch er eine vielversprechende Zielstruktur für alternative Therapieansätze von Glioblastomkrankungen.

4.1 DIFFERENZIELLE EXPRESSION: RNA- UND PROTEINEBENE

Ausgehend von der bereits beschriebenen Funktion des Kir4.1 in Gliazellen und dem Verlust des Kanals in Gliomen, wurde im Rahmen dieser Arbeit angestrebt, diesen Expressionsverlust an den aus PatientInnenmaterial etablierten Glioblastomzelllinien zu reproduzieren und weiter zu differenzieren. Aus den kultivierten Glioblastomzelllinien wurden sowohl mRNA als auch Proteine isoliert und quantitative real time PCR- bzw. Western-Blot-Untersuchungen durchgeführt. Die molekularbiologischen Untersuchungen bestätigten den differenziellen Kir4.1-Verlust und dienten gewissermaßen als Screeninguntersuchung, um geeignete Zelllinien für weiterführende elektrophysiologische Experimente zu identifizieren. Die molekularbiologischen Nachweise konnten zeigen, dass die Glioblastomzellen und auch die kommerziell verfügbaren Rattenzelllinien heterogen sind, was das Ausmaß der Kir4.1-Expression angeht. Neben Zelllinien wie HROG02, HROG24 und HROG38 mit sehr geringer Expression, gibt es auch Zelllinien wie HROG05, die zumindest auf Protein- und RNA-Ebene eine Kir4.1-Expression in der Größenordnung von gesundem Gewebe aufweisen. Das ist besonders interessant, da bisher bei aufrechterhaltener Expression auf RNA- und Proteinebene, vor allem ein funktioneller Verlust Kir4.1 in Gliomzellen beschrieben ist. Olsen und Sontheimer haben beispielsweise eine Fehllokalisierung von Kir-Kanälen an die Zellkernmembran, das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat beschrieben (Olsen & Sontheimer, 2004), sodass es trotz Expression auf mRNA- und Proteinebene zu einem Ausfall der Kir-Stroms und entsprechend zu einer Depolarisation der Zellmembran kommt. Auch unsere Untersuchungen zeigten, insbesondere auf die Zelllinien HROG05, dass eine Expression auf molekularbiologischer Ebene nicht unweigerlich mit einer erhaltenen Kir4.1-Funktion auf elektrophysiologischer Ebene einhergeht. Hierbei müssen die Kir-Nachweise auf Proteinebene jedoch aufgrund der multiplen positiven Banden und geringen Versuchsanzahl kritisch gesehen werden. Um zu eruieren, ob die multiplen positiven Banden in den Western-Blot-Untersuchungen Folge dysfunktionaler und potenziell fragmentierter oder anderweitig veränderter Kir-Kanäle sind, sind weitere Untersuchungen nötig. Um die Bedeutung und Folgen der differenziellen Expression des Kir4.1-Kanals der verschiedenen Glioblastomzelllinien besser beurteilen zu können, ist letztlich eine Korrelation zu Tumoreigenschaften und funktionellen Konsequenzen auf Zellebene nötig. Neben den

elektrophysiologischen Untersuchungen, deren Ergebnisse in den folgenden Abschnitten diskutiert werden, sind auch Proliferationsuntersuchungen denkbar.

4.2 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ZELLLINIEN

Neben dem mikroskopischen Aspekt der Zelllinien, die einen Hinweis auf die Membranstabilität und die Umsetzbarkeit der Patch-Clamp-Experimente geben können, wurde basierend auf den Ergebnissen der Western Blot- und PCR-Experimente die murine Zelllinie C6 zur Etablierung der Methode am Institut gewählt. Anschließend wurden Patch-Clamp-Untersuchungen an den Zelllinien HROG24 und HROG05 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Zellmembran der HROG24-Zelllinie Patch-Clamp-Untersuchungen aufgrund ihrer Labilität nicht zugänglich ist, sodass weitere Untersuchungen an der HROG38-Zelllinie geplant wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden somit die aus PatientInnen gewonnen Zelllinien HROG05 und HROG38 erstmals elektrophysiologisch charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden sowohl *current-clamp*- als auch *voltage-clamp*-Patch-Clamp-Experimente durchgeführt. Die Zelleigenschaften wurden dabei vor Bariumapplikation bestimmt. Wie zu erwarten war, wurden weder spontane, noch durch Depolarisation generierte Aktionspotenziale registriert, da Gliazellen keine spannungsabhängigen Natriumkanäle exprimieren. Trotzdem verfügen Gliom- und Glioblastomzellen über Ionenkanäle, die messbare Ströme generieren.

Wie auch schon für andere Gliomzellen beschrieben, weisen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gliomzellen ein im Vergleich zu physiologischer Glia ein depolarisiertes Membranpotenzial auf (Bordey und Sontheimer, 1998; Olsen und Sontheimer, 2004). Dabei zeigten die Experimente, dass das Ausmaß der Depolarisation innerhalb der untersuchten Zelllinien variiert. Für die kommerziell verfügbare murine C6 Gliomzelllinie lag das Membranpotenzial mit $-71,1 \pm 1,4$ mV in der Größenordnung von bereits publizierten Daten (Brismar, 1995). Die Zelllinie HROG38 zeigte trotz relativ reduzierter Expression von Kir4.1 auf Protein- und mRNA-Ebene ein negatives Membranpotenzial nahe des Kaliumgleichgewichtspotenzials, wohingegen Zellen der Zelllinie HROG05 ein äußerst depolarisiertes Membranpotenzial aufweisen, wie auch für andere Glioblastomzelllinien bereits beschrieben wurde (Brismar, 1995). Weiterführend wäre interessant, das Membranpotenzial der Zelllinien anhand von PatientInnendaten oder in einem Xenograft-Modell mit klinischen

Symptomen wie Tumorprogression oder dem Vorhandensein einer Tumor-assoziierten Epilepsie zu korrelieren.

Weiterhin zeigte sich, dass die Membrankapazitäten aller HROG-Zellen deutlich größer ist als bisher für Glioblastomzellen höherer Passagen beschrieben wurde. (Brismar und Collins, 1989) Insbesondere die Zellkapazität der HROG05 übersteigt die Kapazität der HROG38-Zellen. Dies korreliert ebenfalls mit der reduzierten funktionellen Expression des Kir4.1 korreliert, welcher mit Astrozytenschwellung assoziiert ist. Hierbei zeigen neuere Untersuchungen, dass der Kir4.1 zwar nicht direkt über einen Kir4.1/AQP4-Komplex beteiligt ist, jedoch der Na⁺/HCO₃⁻-Cotransporter, der jedoch über eine durch Kaliumionen vermittelte Depolarisation aktiviert wird (Larsen und MacAulay, 2017).

4.3 DIFFERENZIELLE EXPRESSION EINES BA²⁺-SENSITIVEN STROMS

Ebenso wie in den molekularbiologischen Versuchen eine differenzielle Expression des Kir4.1 auf RNA- und Proteinebene festgestellt wurde, konnte im Rahmen der *voltage-clamp*-Messungen Unterschiede in der Expression bariumsensitiver Ströme nachgewiesen werden. So exprimieren sowohl die murine C6-Gliomzelle als auch die HROG38-Glioblastomzelllinie einen Barium-sensitiven Strom mit einem einwärtsgerichteten Anteil. Dass dabei die HROG05-Zelllinie, trotz der in qPCR- und Western-Blot-Untersuchungen festgestellten Kir4.1-Expression, keinen Barium-sensitiven Strom exprimiert, wirft einige Fragen auf. Mögliche Erklärungen für diese Diskrepanz sind einerseits, dass die gemessenen Ströme nicht Kir4.1-spezifisch sind, sondern auf weitere von Barium blockierte Kanäle zurückzuführen sind. Eine weitere Erklärung ist die Expression eines dysfunktionalen Kir4.1-Kanals oder eine Fehllokalisation des Kanalproteins an Membranen des Zellkerns, des endoplasmatischen Retikulums oder des Golgi-Apparates, wie in Abschnitt 12.1 bereits angeführt. Weiterführend könnten hier Einzelzell-PCR-Untersuchungen genutzt werden, um Molekularbiologie und Elektrophysiologie unmittelbar zu korrelieren. Da aufgrund der reduzierten Expression der Kanäle sehr kleine Ströme erwartet wurden und die Messung der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle am Institut erst etabliert werden musste, wurde eine relativ hohe Bariumkonzentration zur Kanalblockade gewählt. Diese inhibiert, wie aus den Strom-Spannungs-Kennlinien ersichtlich, auch auswärtsgerich-

tende Ströme bei positiveren Membranpotenzialen. Vor allem im Hinblick auf die Beeinflussung der Zellzyklusregulation und zur weiteren Differenzierung der Stromkomponenten, könnte diese Versuchsreihe um eine Blockade mit geringeren Bariumkonzentrationen erweitert werden. Der Nachweis der relativ hochregulierten auswärtsgerichteten Barium-sensitiven Ströme ist gleichzeitig aber auch ein Hinweis auf die Entdifferenzierung der Zellen. MacFarlane und Sontheimer haben bereits 2000 eine Hochregulation der auswärtsgerichteten bariumsensitiven Ströme und einen Zusammenhang mit einem Eintritt in die G1- und S-Phase beschrieben (MacFarlane und Sontheimer, 2000). So ähneln die hier resultierenden Strom-Spannungs-Kennlinien beispielsweise der Zelllinie HROG38 durch die große auswärtsgerichtete Komponente eher den Kennlinien unreifer Astrozyten statt differenzierter Glia, bei denen die einwärtsgerichtete Kir4.1-Komponente sonst deutlich überwiegt (Higashimori und Sontheimer, 2007).

4.4 BARIUMEFFEKT AUF DAS MEMBRANPOTENZIAL

In der Literatur ist vielfach beschrieben, dass das negative Membranpotenzial von Glia wesentlich durch einwärtsgerichtete Kaliumströme, darunter auch Kir4.1-Ströme, bedingt ist (Dennis und Gerschenfeld, 1969; Ransom und Sontheimer, 1995). Ebenso wurde bei kardialen Fibroblasten und Myofibroblasten ein Beeinflussung der Proliferation und des Membranpotenzials durch einwärtsgerichtete Kaliumströme festgestellt (Chilton *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Teil der untersuchten Gliomzelllinien einen Barium-sensitiven Strom exprimiert. Die Tatsache, dass die Expression dieses Stroms mit einem negativeren Ruhemembranpotenzial und einer Depolarisation und Anstieg des Membranwiderstandes infolge Bariumapplikation einhergeht, deutet darauf hin, dass die Generierung des negativen Membranpotenzial wesentlich von diesem Barium-sensitiven Strom abhängt. Entsprechend konnte in einzelnen Auswaschversuchen gezeigt werden, dass sich nach Auswaschen der Barium-haltigen Extrazellulärlösung das Membranpotenzial wieder auf negative Werte repolarisiert, sodass dieser Effekt kein Artefakt oder Folge einer Dekompensation der Zellen im Laufe der Versuche zu sein scheint. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist anzunehmen, dass die Expression der nachgewiesenen Barium-sensitiven Ströme – möglicherweise überwiegend der

Kir4.1 Einwärtsgleichrichter – einen wesentlichen Einfluss auf das Membranpotenzial der untersuchten Zellen hat.

Wie schon erwähnt, ist in der Literatur ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Membranpotenzial und Proliferationsrate beschrieben (Gallo *et al.*, 1996; Knutson *et al.*, 1997). Bemerkenswerterweise zeigten sich entsprechend diesen Daten die HROG38-Zellen in der Zellkultur mit ihrem vergleichsweise weniger depolarisierten Membranpotenzial deutlich langsamer wachsend als HROG05-Zellen. Dies korreliert zusätzlich auch mit dem postoperativen Überleben: Während die Patientin, aus deren Glioblastom die HROG05-Zellkultur etabliert wurde, drei Monate nach der Operation verstarb, lag das postoperative Überleben der Patientin, die die HROG38-Zellen zur Verfügung gestellt hat, bei über 19 Monaten.

Es ist jedoch nicht nur bekannt, dass der Verlust der Kir4.1-Expression über eine Depolarisation mit einer Zunahme der Proliferation korreliert ist, sondern umgekehrt auch, dass durch Transfektion eine stabile Expression von Kir4.1-Kanälen erzeugt werden kann (Higashimori und Sontheimer, 2007). Diese führte zu einer Repolarisation der Zellen, damit einhergehend zum Übergang von der G2/M-Phase in die G0/G1-Phase, und bewirkte schließlich eine Reduktion der Proliferationsrate. Durch Depolarisation infolge hoher extrazellulärer Kaliumkonzentrationen oder der Applikation von Barium konnte dieser Prozess umgekehrt werden (Kalsi *et al.*, 2004; Higashimori und Sontheimer, 2007). Angesichts der differenziellen Expression von Kir4.1-Kanälen in Glioblastomen stellt eine solche Beeinflussung der Proliferationsregulation möglicherweise einen neuartigen Ansatz in der neuroonkologischen Therapie dar.

4.5 AUSBLICK

Eine Einschränkung der bisher durchgeführten Versuche ist, dass aufgrund der neuen Etablierung der Messungen der bariumsensitive Strom in seinen einwärts- und auswärtsgerichtenden Komponenten nicht durch eine differenzielle Blockade aufgeschlüsselt wurde. Zudem bringt die Arbeit mit kultivierten Zellen weitere Unwägbarkeiten mit sich. Faktoren wie das verwendete Medium, die Zugabe von Wachstumsfaktoren und anderen Substanzen bis hin zu der Vorbereitung auf die Messungen können Zelleigenschaften beeinflussen. Schon 1980 haben Black und Kornblith beispielsweise gezeigt, dass die Zeitspanne von der Subkultivierung bis zur Messung

einen Einfluss auf das gemessene Membranpotenzial der Zellen hat (Black und Kornblith, 1980). So kann dies nur ein Anfang sein in der elektrophysiologischen Charakterisierung der am Institut etablierten Glioblastomzellen und der Verbindung dieser Erkenntnisse mit klinischen Eigenschaften der Tumore.

Auch war die Untersuchung der Proliferationsraten der Zelllinien und die Korrelation mit der funktionellen Expression einwärtsgerichteter Kaliumkanäle nicht Bestandteil dieser Arbeit, bietet jedoch Potenzial für weitere Untersuchungen. In diesem Rahmen könnte der Effekt einer Repolarisation der Zellen auf die Wachstumsraten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht werden. Mögliche Ansätze für weitergehende Untersuchungen könnten die Entwicklung und Applikation spezifischer Kaliumkanalaktivatoren oder die Transfektion der Zellen mit Kir4.1 sein. Auf diese Weise kann das Potenzial der Expression des Kir4.1 als Indikator für Wachstumsraten und Zelldifferenzierung weiter eruiert werden. Ebenfalls erschließt sich damit unter Umständen die Beeinflussung des Membranpotenzials der Glioblastomzellen nicht nur als ein Ansatz zur Behandlung von Tumor-assoziiertes Epilepsie, sondern auch als ein mögliches onkologisches Target. In der Zusammenschau mit Untersuchungen des Proliferationsverhaltens der Zellen sowie klinischer Daten besteht somit die Möglichkeit, zu einem besseren Verständnis der Regulierung des Zellzyklus zu gelangen, was gegebenenfalls neuartige neuroonkologische Perspektiven eröffnet.

V. THESEN

- I. Gliome sind die häufigsten primären Hirntumoren
- II. Das Glioblastoma multiforme, ein Grad IV Gliom, ist der häufigste maligne Hirntumor und geht mit sehr schlechten Prognosen einher.
- III. Im Rahmen von Gliom- und Glioblastomerkrankungen kommt es häufig zu Tumor-assoziiertes Epilepsie, deren Ätiopathologie bisher nicht abschließend geklärt ist und die oftmals pharmakoresistent sind.
- IV. Glia spielen eine wichtige Rolle in der zerebralen Elektrolythomöostase und der Modulation der Erregbarkeit.
- V. Eine Schlüsselrolle in der Funktion von Glia spielt der einwärtsgerichtete Kaliumkanal Kir4.1.
- VI. Der Kir4.1-Kanal ist maßgeblich an der Aufrechterhaltung des sehr negativen Membranpotenzials von Gliazellen beteiligt.
- VII. Das Membranpotenzial von Gliazellen ist sowohl an der Beeinflussung der neuronalen Erregbarkeit als auch an der Regulation von Proliferation und Differenzierung von Glia beteiligt.
- VIII. In Gliomen ist ein Kir4.1-Funktionsverlust beschrieben.
- IX. Aufgrund der Schlüsselrolle bezüglich der Modulation von Epileptogenität als auch der Regulation von Differenzierung und Proliferation von Gliazellen ist der Kir4.1 eine potenziell bedeutsame neuroonkologische Zielstruktur.

- X. In molekularbiologischen Untersuchungen konnte ein differenzieller Kir4.1-Verlust in aus PatientInnenmaterial-etablierten Glioblastomzelllinien reproduziert werden.
- XI. In elektrophysiologischen Untersuchungen zeigte sich eine residuale funktionelle Expression eines Barium-sensitiven Stroms mit geringer einwärtsgerichteter Komponente.
- XII. Der Nachweis dieses Barium-sensitiven Stromes korreliert mit Ruhemembranpotenzialen nahe physiologischer Werte. Der Verlust dieses Stromes geht einher mit einem depolarisiertem Ruhemembranpotenzial.
- XIII. Ebenso korreliert der Nachweis eines Barium-sensitiven Stroms mit einer Barium-abhängigen Depolarisation der Tumorzellen.
- XIV. Damit konnte eine residuelle Expression eines Barium-sensitiven Stroms mit zumindest geringer einwärtsgerichteter Komponente als möglicherweise funktionelles Kir4.1-Korrelat nachgewiesen werden.
- XV. Weiterführend sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen mit klinischen Daten und Proliferationsuntersuchungen zu korrelieren.
- XVI. Zu klären bleibt, ob sich der Kir4.1 als molekularer Marker eignet, um beispielsweise das Risiko für eine Tumor-assoziierte Epilepsie besser evaluieren zu können, oder sogar als therapeutische Zielstruktur dienen könnte.

VI. ANHANG

Die Primer wurden mithilfe von NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) entworfen, basierend auf Sequenzdaten für die entsprechende Spezies, abgerufen vom National Center for Biotechnology Information kurz NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Die Sequenzen wurden so gewählt, dass sie das Zielgen und eine Exon-Exon-Grenze in jede Richtung abdecken, sodass das spätere Amplifikat der mRNA entspricht. Die so entworfenen Primer wurden von TIB MOLBIOL GmbH (Berlin, Deutschland) bezogen. Die Annealing-Temperatur betrug für alle Primer 60°C.

| <i>Gen</i> | <i>Primersequenz</i> Forward 5'-3' Reverse 3'-5' | <i>Produktlänge</i> (bp) |
|----------------|--|-----------------------------|
| Kir4.1 - Ratte | F: ACTGTCGCCAGTGGCAAATAC R: CGTTACTAATGCGCACACTAAGGG | 188 |
| Kir4.1 - human | F: CGCAGTGGTGAGGGTGACTTTG R: TCAGGGTCTCCGTAGCGTACAG | 248 |
| GAPDH - Ratte | F: CACGGCAAGTTCAACGGCACAG R: TTCAGGTGAGCCCCAGCCTT | 182 |
| GAPDH - human | F: TGTGGGCAAGGTCATCCCTGAG R: GGAGTGGGTGTCGCTGTTGAAG | 229 |
| PGK1 - Ratte | F: GCAAAGACTGGCCAAGCTACTG R: CGTGGCTTTCACCACCTCATCC | 204 |
| PGK1 - human | F: GGAGAACCTCCGCTTTCATGTGG R: CCAGCCTTCTGTGGCAGATTGAC | 201 |
| S18 - Ratte | F: GCGGAGATACGCTCATGTGG R: GTTGGCCAGAACCTGGCTATAC | 193 |
| S18 - human | F: ATCCACGCCAGTACAAGATCCC R: AGAAGTGACGCAGCCCTCTATG | 162 |
| GFAP - Ratte | F: GCGCATTTGCCTCTCCAAGGAC R: GCGTCTGGACCAGCTTACTACC | 206 |
| GFAP - human | F: ACCGCAGCCCTGAAAGAGATCC R: AGACTCCAGGTCGCAGGTCAAG | 201 |

Tabelle 17 – Verzeichnis der verwendeten Primer

Anhang

| <i>Antikörper</i> | <i>Spezies</i> | <i>Verdünnung</i> | <i>Hersteller und Sitz</i> |
|-----------------------------------|----------------|-------------------|-----------------------------------|
| Anti-GAPDH (2118S) | Kaninchen | 1:10000 | Cell Signaling (Cambridge, UK) |
| Anti-Kir4.1 (APC-035) | Kaninchen | 1:400 | Alomone (Jerusalem, Israel) |
| Sekundär: Anti-Rabbit (#926-3221) | Ziege | 1:5000 | LI-COR (Lincoln, NE, USA) |

Tabelle 18 – verwendete Antikörper

| <i>heat</i> | <i>pull</i> | <i>velocity</i> | <i>time (ms)</i> |
|-------------|-------------|-----------------|------------------|
| 518 | - | 16 | 250 |
| 515 | - | 16 | 250 |
| 504 | - | 12 | 250 |
| 504 | - | 12 | 250 |
| 504 | - | 12 | 250 |
| 515 | - | 16 | 250 |

Tabelle 19 – Protokoll für P-97 Sutter Pipette Puller

| <i>Vergleich</i> | <i>Rangsummen- unterschied</i> | <i>q</i> | <i>p</i> | <i>p < 0,05</i> |
|------------------|------------------------------------|----------|----------|--------------------|
| HROG05 vs HROG38 | 63,000 | 4,455 | 0,020 | Ja |
| HROG05 vs HROG15 | 54,000 | 4,564 | 0,011 | Ja |
| HROG05 vs U-87 | 54,000 | 5,671 | <0,001 | Ja |
| HROG05 vs HROG02 | 41,000 | 5,686 | <0,001 | Ja |
| HROG05 vs HROG24 | 28,000 | 5,715 | <0,001 | Ja |
| HROG24 vs HROG38 | 35,000 | 2,958 | 0,224 | Nein |
| HROG24 vs HROG15 | 26,000 | 2,731 | 0,215 | Nein |
| HROG24 vs U-87 | 26,000 | 3,606 | 0,029 | Nein |
| HROG24 vs HROG02 | 13,000 | 2,654 | 0,061 | Nein |
| HROG02 vs HROG38 | 22,000 | 2,310 | 0,360 | Nein |
| HROG02 vs HROG15 | 13,000 | 1,803 | 0,409 | Nein |
| HROG02 vs U-87 | 13,000 | 2,654 | 0,061 | Nein |
| U-87 vs HROG38 | 9,000 | 1,248 | 0,651 | Nein |
| U-87 vs HROG15 | 0,000 | 0,000 | 1,000 | Nein |
| HROG15 vs HROG38 | 9,000 | 1,837 | 0,194 | Nein |

Tabelle 20 – Mittelwertvergleich quantitative rtPCR

Kir4.1 Expression der humanen Zelllinien, Mittelwertvergleich nach Student-Newman-Keuls-Test, siehe Abb. 10, Kapitel III.3.1

VII. DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling und Prof. Dr. med. Timo Kirschstein für die Vergabe dieses Themas, die Betreuung in allen Phasen der Arbeit und die vielen anregenden Unterhaltungen der letzten Jahre. Für die Unterstützung beim Aufbau des Messplatzes und die Einführung in elektrophysiologischen Tätigkeiten gilt mein Dank Hannes Brehme und Jakob Wolfart, sowie Steffen Müller im Hinblick auf die molekularbiologischen Experimente. Im Laboralltag war Anne Einsle mir eine große Hilfe, sowohl bei den molekularbiologischen Methoden als auch bei der Vorbereitung der Zellkulturen für die elektrophysiologischen Messungen und hat mit ihrer freundlichen und motivierten Art immer für ein sehr angenehmes Zusammenarbeiten gesorgt. Daneben standen Tina Sellmann und Katrin Porath stets für große und kleine Fragen rund um das Laborabläufe, Geräte und Materialien zur Verfügung. Auch bei den anderen MitarbeiterInnen des Institutes für Physiologie möchte ich mich für ein angenehmes Arbeitsklima und ihre Hilfestellungen bedanken.

Vor allem aber möchte ich mich bei meiner Familie und meinen FreundInnen für ihre andauernde Unterstützung und Ermutigung während des Studiums und der Promotion bedanken. Dies gilt besonders für meine Eltern, die so viel getan haben, um mir diesen Lebensweg zu ermöglichen. Außerdem erwähnenswert sind hier Sophie, die mit mir gemeinsam viele Höhen und Tiefen der Promotion durchlebt hat und Martin, der nicht nur aufgrund seiner exzellenten Power-Point-Fertigkeiten eine große Unterstützung war. Daneben auch Julia, Caro, Svenja, Lena, Donya Arevik, Nat und viele andere, die immer da waren, unabhängig davon, ob gerade Motivation oder Ablenkung nötig waren.

Zuletzt möchte ich mich für die ideelle und finanzielle Förderung durch die Studienstiftung des Deutschen Volkes bedanken, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Almeida, J. P. *et al.* (2015) 'The Value of Extent of Resection of Glioblastomas: Clinical Evidence and Current Approach', *Current Neurology and Neuroscience Reports*. Springer US, p. 517. doi: 10.1007/s11910-014-0517-x.
- Arcangeli, A. and Becchetti, A. (2010) 'New trends in cancer therapy: Targeting ion channels and transporters', *Pharmaceuticals*, 3(4), pp. 1202–1224. doi: 10.3390/ph3041202.
- Arora, R. S. *et al.* (2010) 'Are reported increases in incidence of primary CNS tumours real? An analysis of longitudinal trends in England, 1979-2003', *European Journal of Cancer*. Pergamon, 46(9), pp. 1607–1616. doi: 10.1016/j.ejca.2010.02.007.
- Ashcroft, F. M. (1996) 'Mechanisms of the glycaemic effects of sulfonylureas.', *Hormone and metabolic research*, 28(9), pp. 456–63. doi: 10.1055/s-2007-979837.
- Barker, C. A. *et al.* (2013) 'Valproic acid use during radiation therapy for glioblastoma associated with improved survival.', *International journal of radiation oncology, biology, physics*. NIH Public Access, 86(3), pp. 504–9. doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.02.012.
- Batchelor, T. T. *et al.* (2014) 'Antiangiogenic therapy for glioblastoma: current status and future prospects.', *Clinical Cancer Research*. NIH Public Access, 20(22), pp. 5612–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0834.
- Bauchet, L. *et al.* (2010) 'Oncological patterns of care and outcome for 952 patients with newly diagnosed glioblastoma in 2004', *Neuro-Oncology*. Oxford University Press, 12(7), pp. 725–735. doi: 10.1093/neuonc/noq030.
- Berendsen, S. *et al.* (2016) 'Prognostic relevance of epilepsy at presentation in glioblastoma patients', *Neuro-Oncology*, 18(5), pp. 700–706. doi: 10.1093/neuonc/nov238.
- Biggin, P. C., Roosild, T. and Choe, S. (2000) 'Potassium channel structure: Domain by domain', *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Current Trends, 10(4), pp. 456–461. doi: 10.1016/S0959-440X(00)00114-7.
- Black, P. M. and Kornblith, P. L. (1980) 'Biophysical properties of human astrocytic brain tumor cells in cell culture', *J. Cell Physiol*, 105(3), pp. 565–570.
-

- Bobustuc, G. C. *et al.* (2010) 'Levetiracetam enhances p53-mediated MGMT inhibition and sensitizes glioblastoma cells to temozolomide.', *Neuro-oncology*. Oxford University Press, 12(9), pp. 917–27. doi: 10.1093/neuonc/noq044.
- Bockenbauer, D. *et al.* (2009) 'Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations.', *The New England journal of medicine*. NIH Public Access, 360(19), pp. 1960–70. doi: 10.1056/NEJMoa0810276.
- Bordey, A. and Sontheimer, H. (1998) 'Electrophysiological properties of human astrocytic tumor cells In situ: enigma of spiking glial cells.', *Journal of neurophysiology*, 79(5), pp. 2782–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9582244>.
- Borschel, W. F. *et al.* (2017) 'Control of Kir channel gating by cytoplasmic domain interface interactions', *The Journal of General Physiology*. The Rockefeller University Press, 149(5), pp. 561–576. doi: 10.1085/jgp.201611719.
- Bourg, V. *et al.* (2001) 'Nitroso-urea-cisplatin-based chemotherapy associated with valproate: Increase of haematologic toxicity', *Annals of Oncology*, 12(2), pp. 217–219. doi: 10.1023/A:1008331708395.
- Brasko, C. *et al.* (2017) 'Expression of Kir4.1 and Kir5.1 inwardly rectifying potassium channels in oligodendrocytes, the myelinating cells of the CNS', *Brain Structure and Function*, 222(1), pp. 41–59. doi: 10.1007/s00429-016-1199-8.
- Van Breemen, M. S. M. *et al.* (2009) 'Efficacy of anti-epileptic drugs in patients with gliomas and seizures', *Journal of Neurology*. D. Steinkopff-Verlag, 256(9), pp. 1519–1526. doi: 10.1007/s00415-009-5156-9.
- Brismar, T. (1995) 'Physiology of transformed glial cells', *Glia*. Wiley-Blackwell, 15(3), pp. 231–243. doi: 10.1002/glia.440150305.
- Brismar, T. and Collins, V. P. (1989) 'Inward rectifying potassium channels in human malignant glioma cells', *Brain Research*. Elsevier, 480(1–2), pp. 249–258. doi: 10.1016/0006-8993(89)90190-X.
- Brogna, C., Robles, S. G. and Duffau, H. (2008) 'Brain tumors and epilepsy', *Expert Review of Neurotherapeutics*. Taylor & Francis, 8(6), pp. 941–955. doi: 10.1586/14737175.8.6.941.

Buckingham, S. D. *et al.* (2005) 'Structure and function of two-pore-domain K⁺ channels: contributions from genetic model organisms', *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Current Trends, 26(7), pp. 361–367. doi: 10.1016/j.tips.2005.05.003.

Butt, A. M. and Kalsi, A. (2006) 'Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: A special role for Kir4.1 in glial functions', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(1), pp. 33–44. doi: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00289.x.

Cancer Genome Atlas Research Network, T. C. G. A. (TCGA) R. (2008) 'Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways.', *Nature*. NIH Public Access, 455(7216), pp. 1061–8. doi: 10.1038/nature07385.

Chang, E. F. *et al.* (2008) 'Seizure characteristics and control following resection in 332 patients with low-grade gliomas', *Journal of Neurosurgery*. American Association of Neurological Surgeons, 108(2), pp. 227–235. doi: 10.3171/JNS/2008/108/2/0227.

Chilton, L. *et al.* (2005) 'K⁺ currents regulate the resting membrane potential, proliferation, and contractile responses in ventricular fibroblasts and myofibroblasts', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. American Physiological Society, 288(6), pp. H2931–H2939. doi: 10.1152/ajpheart.01220.2004.

Claus, E. B. *et al.* (2016) 'Survival and low grade glioma: the emergence of genetic information', *Neurosurgery Focus*. NIH Public Access, 38(1), pp. 1–19. doi: 10.3171/2014.10.FOCUS12367.Survival.

Crespo, I. *et al.* (2015) 'Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme', *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 185(7), pp. 1820–1833. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.02.023.

Dennis, M. J. and Gerschenfeld, H. M. (1969) 'Some physiological properties of identified mammalian neuroglial cells', *The Journal of Physiology*, 203(1), pp. 211–222. doi: 10.1113/jphysiol.1969.sp008860.

Dermietzel, R. *et al.* (1991) 'Gap Junctions between Cultured Astrocytes: Immunocytochemical, Molecular, and Electrophysiological Analysis.', *The Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 11(5), pp. 1421–1432. doi: 10.1523/JNEUROSCI.11-05-01421.1991.

- Dibaj, P. *et al.* (2007) 'Kir4.1 channels regulate swelling of astroglial processes in experimental spinal cord edema', *Journal of Neurochemistry*. Wiley/Blackwell (10.1111), 103, pp. 2620–2628. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04979.x.
- Djukic, B. *et al.* (2007) 'Conditional Knock-Out of Kir4.1 Leads to Glial Membrane Depolarization, Inhibition of Potassium and Glutamate Uptake, and Enhanced Short-Term Synaptic Potentiation', *Journal of Neuroscience*, 27(42), pp. 11354–11365. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0723-07.2007.
- Dunn, G. P. *et al.* (2012) 'Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma', *Genes and Development*, 26(8), pp. 756–784. doi: 10.1101/gad.187922.112.
- Ening, G. *et al.* (2015) 'Repeat-surgery at Glioblastoma recurrence, when and why to operate?', *Clinical Neurology and Neurosurgery*. Elsevier, 136, pp. 89–94. doi: 10.1016/j.clineuro.2015.05.024.
- Evans, O. B. *et al.* (1989) 'Hematologic Monitoring in Children With Epilepsy Treated With Carbamazepine', *Journal of Child Neurology*. Sage Publications Sage CA: Thousand Oaks, CA, 4(4), pp. 286–290. doi: 10.1177/088307388900400407.
- Fujimoto, M. *et al.* (1989) 'Loss of heterozygosity on chromosome 10 in human glioblastoma multiforme', *Genomics*. Academic Press, 4(2), pp. 210–214. doi: 10.1016/0888-7543(89)90302-9.
- Fürst, O., Mondou, B. and D'Avanzo, N. (2014) 'Phosphoinositide regulation of inward rectifier potassium (Kir) channels', *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media SA, 4 JAN, p. 404. doi: 10.3389/fphys.2013.00404.
- Furukawa, T. *et al.* (1996) 'Functional linkage of the cardiac ATP-sensitive K⁺ channel to the actin cytoskeleton', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. Springer-Verlag, 431(4), pp. 504–512. doi: 10.1007/BF02191896.
- Gallo, V. *et al.* (1996) 'Oligodendrocyte Progenitor Cell Proliferation and Lineage Progression Are Regulated by Glutamate Receptor-Mediated K⁺ Channel Block', *The Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 16(8), pp. 2659–2670. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-08-02659.1996.
- Göttlicher, M. *et al.* (2001) 'Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors
-

inducing differentiation of transformed cells', *EMBO Journal*. European Molecular Biology Organization, 20(24), pp. 6969–6978. doi: 10.1093/emboj/20.24.6969.

Gousias, K. *et al.* (2009) 'Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in Northwest Greece and study of potential predisposing factors, 2005-2007', *Neuroepidemiology*. Karger Publishers, 33(2), pp. 89–95. doi: 10.1159/000222090.

De Groot, M. *et al.* (2012) 'Epilepsy in patients with a brain tumour: Focal epilepsy requires focused treatment', *Brain*. Oxford University Press, 135(4), pp. 1002–1016. doi: 10.1093/brain/awr310.

Gurvich, N. *et al.* (2004) 'Histone Deacetylase Is a Target of Valproic Acid-Mediated Cellular Differentiation', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 64(3), pp. 1079–1086. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-0799.

Hagiwara, S. *et al.* (1978) 'Blocking effects of barium and hydrogen ions on the potassium current during anomalous rectification in the starfish egg.', *The Journal of physiology*. Wiley-Blackwell, 279, pp. 167–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/566793> (Accessed: 8 July 2018).

Hagiwara, S., Miyazaki, S. and Rosenthal, N. P. (1976) 'Potassium Current and the Effect of Cesium on this Current during Anomalous Rectification of the Egg Cell Membrane of a Starfish', *The Journal of General Physiology*. The Rockefeller University Press, 67(6), pp. 621–638. doi: 10.1085/jgp.67.6.621.

Hebert, S. C. *et al.* (2005) 'Molecular diversity and regulation of renal potassium channels.', *Physiological reviews*. NIH Public Access, 85(1), pp. 319–71. doi: 10.1152/physrev.00051.2003.

Hegi, M. E. *et al.* (2005) 'MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 352(10), pp. 997–1003. doi: 10.1056/NEJMoa043331.

Hibino, H. *et al.* (2010) 'Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles', *Physiology Reviews*, 90, pp. 291–366. doi: 10.1152/physrev.00021.2009.

Higashi, K. *et al.* (2001) 'An inwardly rectifying K⁺ channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain', *American Journal of*

Physiology-Cell Physiology. American Physiological Society Bethesda, MD, 281(3), pp. C922–C931. doi: 10.1152/ajpcell.2001.281.3.C922.

Higashimori, H. and Sontheimer, H. (2007) 'Role of Kir4.1 channels in growth control of glia', *Glia*. NIH Public Access, 55(16), pp. 1668–1679. doi: 10.1002/glia.20574.

Ho, K. *et al.* (1993) 'Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel', *Nature*, 362(6415), pp. 31–38. doi: 10.1038/362031a0.

Hofer, S. *et al.* (2017) *Gliome im Erwachsenenalter*, *Onkopedia - Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie*. Available at: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/gliome-im-erwachsenenalter> (Accessed: 13 August 2018).

Homma, T. *et al.* (2006) 'Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. Oxford University Press, 65(9), pp. 846–854. doi: 10.1097/01.jnen.0000235118.75182.94.

Hottinger, A. F. and Khakoo, Y. (2009) 'Neurooncology of familial cancer syndromes', *Journal of Child Neurology*. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, 24(12), pp. 1526–1535. doi: 10.1177/0883073809337539.

Hottinger, A. F., Stupp, R. and Homicsko, K. (2014) 'Standards of care and novel approaches in the management of glioblastoma multiforme.', *Chinese journal of cancer*. BioMed Central, 33(1), pp. 32–9. doi: 10.5732/cjc.013.10207.

Huang, X. and Jan, L. Y. (2014) 'Targeting potassium channels in cancer', *Journal of Cell Biology*, 206(2), pp. 151–162. doi: 10.1083/jcb.201404136.

Inskip, P. D. *et al.* (2003) 'Sociodemographic indicators and risk of brain tumours', *International Journal of Epidemiology*. Oxford University Press, 32(2), pp. 225–233. doi: 10.1093/ije/dyg051.

Ishii, M. *et al.* (2003) 'Differential expression and distribution of Kir5.1 and Kir4.1 inwardly rectifying K⁺ channels in retina.', *American journal of physiology. Cell physiology*. American Physiological Society, 285(2), pp. C260–C267. doi: 10.1152/ajpcell.00560.2002.

Jellinger, K. (1978) 'Glioblastoma multiforme: Morphology and biology', *Acta*

Neurochirurgica, 42(1–2), pp. 5–32. doi: 10.1007/BF01406628.

Kalsi *et al.* (2004) 'Kir4.1 expression by astrocytes and oligodendrocytes in CNS white matter: A developmental study in the rat optic nerve', *Journal of Anatomy*. Wiley-Blackwell, 204(6), pp. 475–485. doi: 10.1111/j.0021-8782.2004.00288.x.

Katz, B. (1948) 'The Electrical Properties of the Muscle Fibre Membrane', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. The Royal Society, 135(881), pp. 506–534. Available at: <http://www.jstor.org/stable/82561>.

Kerckhof, M. *et al.* (2013) 'Effect of valproic acid on seizure control and on survival in patients with glioblastoma multiforme', *Neuro-Oncology*. Oxford University Press, 15(7), pp. 961–967. doi: 10.1093/neuonc/not057.

Kerckhof, M. and Vecht, C. J. (2013) 'Seizure characteristics and prognostic factors of gliomas', *Epilepsia*, 54(SUPPL. 9), pp. 12–17. doi: 10.1111/epi.12437.

Klein, M. *et al.* (2003) 'Epilepsy in low-grade gliomas: The impact on cognitive function and quality of life', *Annals of Neurology*. Wiley-Blackwell, 54(4), pp. 514–520. doi: 10.1002/ana.10712.

Knutson, P. *et al.* (1997) 'K⁺ channel expression and cell proliferation are regulated by intracellular sodium and membrane depolarization in oligodendrocyte progenitor cells.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 17(8), pp. 2669–82. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-08-02669.1997.

Kofuji, P. *et al.* (2000) 'Genetic Inactivation of an Inwardly Rectifying Potassium Channel (Kir4.1 Subunit) in Mice: Phenotypic Impact in Retina', *Journal of Neuroscience*. NIH Public Access, 20(15), pp. 5733–5740. doi: 10.1037/a0013262.Open.

Kofuji, P. *et al.* (2002) 'Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: Implications for spatial potassium buffering', *GLIA*. Wiley-Blackwell, 39(3), pp. 292–303. doi: 10.1002/glia.10112.

Kofuji, P. and Newman, E. A. (2004) 'Potassium buffering in the central nervous system', *Neuroscience*. NIH Public Access, 129(4), pp. 1045–1056. doi:

10.1016/j.neuroscience.2004.06.008.

Köhling, R. *et al.* (2006) 'Epileptiform activity preferentially arises outside tumor invasion zone in glioma xenotransplants', *Neurobiology of Disease*. Academic Press, 22(1), pp. 64–75. doi: 10.1016/J.NBD.2005.10.001.

Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (2015) *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Gliome, Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Gliome*.

Krauze, A. V *et al.* (2015) 'A Phase 2 Study of Concurrent Radiation Therapy, Temozolomide, and the Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid for Patients With Glioblastoma.', *International journal of radiation oncology, biology, physics*. NIH Public Access, 92(5), pp. 986–992. doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.04.038.

Kuang, Q., Purhonen, P. and Hebert, H. (2015) 'Structure of potassium channels', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer, 72(19), pp. 3677–93. doi: 10.1007/s00018-015-1948-5.

Kubo, Y. *et al.* (1993) 'Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel', *Nature*. Nature Publishing Group, 362(6416), pp. 127–133. doi: 10.1038/362127a0.

Kuo, M. M.-C. *et al.* (2005) 'Prokaryotic K⁺ channels: From crystal structures to diversity', *FEMS Microbiology Reviews*. Wiley/Blackwell (10.1111), pp. 961–985. doi: 10.1016/j.femsre.2005.03.003.

Kurachi, Y. (1985) 'Voltage-dependent activation of the inward-rectifier potassium channel in the ventricular cell membrane of guinea-pig heart.', *The Journal of physiology*. Wiley-Blackwell, 366, pp. 365–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2414434> (Accessed: 10 July 2018).

Lacroix, M. *et al.* (2001) 'A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival', *Journal of Neurosurgery*. Journal of Neurosurgery Publishing Group, 95(2), pp. 190–198. doi: 10.3171/jns.2001.95.2.0190.

Larjavaara, S. *et al.* (2007) 'Incidence of gliomas by anatomic location', *Neuro-Oncology*. Oxford University Press, 9(3), pp. 319–325. doi: 10.1215/15228517-2007-

016.

Larsen, B. R. and MacAulay, N. (2017) 'Activity-dependent astrocyte swelling is mediated by pH-regulating mechanisms', *GLIA*. doi: 10.1002/glia.23187.

Lefranc, F. *et al.* (2008) 'Targeting the alpha1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells', *Neurosurgery*, 62(1), pp. 211–222. doi: 10.1227/01.NEU.0000296985.39041.52.

Li, Y. -J *et al.* (1995) 'Incidence of germ-line p53 mutations in patients with gliomas', *International Journal of Cancer*. Wiley-Blackwell, 64(6), pp. 383–387. doi: 10.1002/ijc.2910640606.

Liubinas, S. V. *et al.* (2014) 'Tumour associated epilepsy and glutamate excitotoxicity in patients with gliomas', *Journal of Clinical Neuroscience*. Churchill Livingstone, pp. 899–908. doi: 10.1016/j.jocn.2014.02.012.

Lopatin, A. N. and Nichols, C. G. (1996) '[K⁺ dependence of open-channel conductance in cloned inward rectifier potassium channels (IRK1, Kir2.1).', *Biophysical journal*. The Biophysical Society, 71(2), pp. 682–94. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79268-8.

Lote, K. *et al.* (1998) 'Prevalence and Prognostic Significance of Epilepsy in Patients with Gliomas', *European Journal of Cancer*. Pergamon, 34(1), pp. 98–102. doi: 10.1016/S0959-8049(97)00374-2.

Louis, D. N. (2006) 'Molecular Pathology of Malignant Gliomas', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. Annual Reviews, 1(1), pp. 97–117. doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100043.

Louis, D. N. *et al.* (2007) 'The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.', *Acta neuropathologica*. Springer, 114(2), pp. 97–109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4.

Louis, D. N. *et al.* (2016) 'The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary', *Acta Neuropathologica*. Springer Berlin Heidelberg, 131(6), pp. 803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.

MacFarlane, S. N. and Sontheimer, H. (2000) 'Changes in Ion Channel Expression Accompany Cell Cycle Progression of Spinal Cord Astrocytes', *Glia*. Wiley-Blackwell,

30(1), pp. 39–48. doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(200003)30:1<39::AID-GLIA5>3.0.CO;2-S.

MacKinnon, R. (1991) 'Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel', *Nature*. Nature Publishing Group, 350, p. 232. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/350232a0>.

MacKinnon, R. (2003) 'Potassium channels', *FEBS Letters*. Wiley-Blackwell, 555(1), pp. 62–65. doi: 10.1016/S0014-5793(03)01104-9.

Malmström, A. *et al.* (2012) 'Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: The Nordic randomised, phase 3 trial', *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd, 13(9), pp. 916–926. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70265-6.

McCoy, J. G. and Nimigean, C. M. (2012) 'Structural correlates of selectivity and inactivation in potassium channels', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. NIH Public Access, 1818(2), pp. 272–285. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.09.007.

McKhann, G. M., D'Ambrosio, R. and Janigro, D. (1997) 'Heterogeneity of astrocyte resting membrane potentials and intercellular coupling revealed by whole-cell and gramicidin-perforated patch recordings from cultured neocortical and hippocampal slice astrocytes.', *The Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 17(18), pp. 6850–6863. doi: MO1.

Mercado, F. *et al.* (2018) 'Kir 4.1 inward rectifier potassium channel is upregulated in astrocytes in a murine multiple sclerosis model', *Neuroscience Letters*. Elsevier, 677, pp. 88–93. doi: 10.1016/j.neulet.2018.04.052.

Miller, C. (2000) 'An overview of the potassium channel family', *Genome Biology*. BioMed Central, 1(4), pp. 1–5. doi: 10.1186/gb-2000-1-4-reviews0004.

Mullins, C. S. *et al.* (2013) 'Establishment and Characterization of Primary Glioblastoma Cell Lines from Fresh and Frozen Material: A Detailed Comparison', *PLoS ONE*, 8(8). doi: 10.1371/journal.pone.0071070.

Mullis, K. *et al.* (1986) 'Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.', *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1, pp. 263–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3472723>

(Accessed: 26 July 2018).

Muscat, J. E. *et al.* (2000) 'Handheld Cellular Telephone Use and Risk of Brain Cancer', *JAMA*. American Medical Association, 284(23), p. 3001. doi: 10.1001/jama.284.23.3001.

Nagelhus, E. A., Mathiisen, T. M. and Ottersen, O. P. (2004) 'Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1', *Neuroscience*. Pergamon, 129(4), pp. 905–913. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.08.053.

Nasreddine, W. and Beydoun, A. (2008) 'Valproate-induced thrombocytopenia: a prospective monotherapy study', *Epilepsia*. Wiley/Blackwell (10.1111), 49(3), pp. 438–445. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01429.x.

Neher, E. and Sakmann, B. (1976) 'Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres', *Nature*. Nature Publishing Group, 260(5554), pp. 799–802. doi: 10.1038/260799a0.

Nerrant, E. *et al.* (2014) 'Lack of confirmation of anti-inward rectifying potassium channel 4.1 antibodies as reliable markers of multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis Journal*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 20(13), pp. 1699–1703. doi: 10.1177/1352458514531086.

Neusch, C. *et al.* (2001) 'Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 21(15), pp. 5429–5438. doi: 21/15/5429 [pii].

Newman, E. A. (1984) 'Regional specialization of retinal glial cell membrane', *Nature*. NIH Public Access, 309(5964), pp. 155–157. doi: 10.1038/309155a0.

Newman, E. A., Frambach, D. A. and Odette, L. L. (1984) 'Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning.', *Science (New York, N.Y.)*. NIH Public Access, 225(4667), pp. 1174–5. doi: 10.1126/science.6474173.

Nichols, C. G. *et al.* (1996) 'Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 272(5269), pp. 1785–1787. doi: 10.1126/science.272.5269.1785.

Nichols, C. G. and Lopatin, A. N. (1997) 'Inward rectifier potassium channels', *Annu Rev Physiol*, 59, pp. 171–191. doi: 10.1146/annurev.physiol.59.1.171.

Van Niffterik, K. A. *et al.* (2012) 'Valproic acid sensitizes human glioma cells for temozolomide and γ -radiation', *Journal of Neuro-Oncology*. Springer US, 107(1), pp. 61–67. doi: 10.1007/s11060-011-0725-z.

Numberger, M. and Draguhn, A. (1996) *Patch-Clamp-Technik*. Heidelberg [u.a. : Spektrum, Akad. Verl. (Labor im Fokus).

Ohgaki, H. *et al.* (2004) 'Genetic Pathways to Glioblastoma: A Population-Based Study', *CANCER RESEARCH*, 64, pp. 6892–6899. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/64/19/6892.full.pdf> (Accessed: 6 July 2018).

Ohgaki, H. and Kleihues, P. (2005) 'Epidemiology and etiology of gliomas', *Acta Neuropathologica*. Springer-Verlag, 109(1), pp. 93–108. doi: 10.1007/s00401-005-0991-y.

Ohgaki, H. and Kleihues, P. (2013) 'The definition of primary and secondary glioblastoma', *Clinical Cancer Research*, 19(4), pp. 764–772. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.

Olar, A. and Aldape, K. D. (2014) 'Using the Molecular Classification of Glioblastoma to Inform Personalized Treatment', *Journal of Pathology*. NIH Public Access, pp. 165–177. doi: 10.1002/path.4282.

Oliver, D. *et al.* (1998) 'Interaction of permeant and blocking ions in cloned inward-rectifier K⁺ channels', *Biophysical Journal*. The Biophysical Society, 74(5), pp. 2318–2326. doi: 10.1016/S0006-3495(98)77941-X.

Oliver, D., Baukowitz, T. and Fakler, B. (2000) 'Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K⁺ channels', *European Journal of Biochemistry*. Wiley/Blackwell (10.1111), 267(19), pp. 5824–5829. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01669.x.

Olsen, M. L. *et al.* (2006) 'Functional expression of Kir4.1 channels in spinal cord astrocytes', *Glia*. NIH Public Access, 53(5), pp. 516–528. doi: 10.1002/glia.20312.

Olsen, M. L. and Sontheimer, H. (2004) 'Mislocalization of Kir Channels in Malignant Gliia', *GLIA*. NIH Public Access, 46(1), pp. 63–73. doi: 10.1002/glia.10346.

- Omuro, A. and DeAngelis, L. M. (2013) 'Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review', *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 310(17), pp. 1842–1850. doi: 10.1001/jama.2013.280319.
- Oonuma, H. *et al.* (2002) 'Inward rectifier K(+) current in human bronchial smooth muscle cells: Inhibition with Antisense Oligonucleotides Targeted to Kir2.1 mRNA', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. American Thoracic Society New York, NY, 26(3), pp. 371–379. doi: 10.1165/ajrcmb.26.3.4542.
- Orkand, R. K., Nichols, J. G. and Kuffler, S. W. (1966) 'Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia.', *Journal of neurophysiology*, 29(4), pp. 788–806. doi: 10.1152/jn.1966.29.4.788.
- Ostrom, Q. T. *et al.* (2014) 'The epidemiology of glioma in adults: A "state of the science" review', *Neuro-Oncology*. Oxford University Press, 16(7), pp. 896–913. doi: 10.1093/neuonc/nou087.
- Ostrom, Q. T. *et al.* (2017) 'CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014', *Neuro-Oncology*. Oxford University Press, 19(suppl_5), pp. v1–v88. doi: 10.1093/neuonc/nox158.
- Ostrom, Q. T. *et al.* (2018) 'Epidemiology of Intracranial Gliomas.', *Progress in neurological surgery*. Karger Publishers, 30, pp. 1–11. doi: 10.1159/000464374.
- Pessia, M. *et al.* (1996) 'Subunit positional effects revealed by novel heteromeric inwardly rectifying K⁺ channels', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 15(12), pp. 2980–7. doi: 10.1073/pnas.1101400108.
- Plate, K. H. *et al.* (1992) 'Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo.', *Nature*. Nature Publishing Group, 359(6398), pp. 845–8. doi: 10.1038/359845a0.
- Posti, J. P. *et al.* (2015) 'Presenting symptoms of glioma in adults', *Acta Neurologica Scandinavica*, 131(2), pp. 88–93. doi: 10.1111/ane.12285.
- Quayle, J. M. *et al.* (1993) 'Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries.', *The American journal of physiology*. American Physiological Society Bethesda, MD, 265(5 Pt 1), pp. C1363-1370. doi:

10.1152/ajpcell.1993.265.5.C1363.

Ransom, C. B. and Sontheimer, H. (1995) 'Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K⁺ currents in rat spinal cord astrocytes.', *Journal of neurophysiology*, 73(1), pp. 333–346.

Rasmussen, B. K. *et al.* (2017) 'Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I–IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry', *Journal of Neuro-Oncology*. Springer US, 135(3), pp. 571–579. doi: 10.1007/s11060-017-2607-5.

Reardon, D. A. *et al.* (2017) 'Immunomodulation for glioblastoma', *Current Opinion in Neurology*, 30(3), pp. 361–369. doi: 10.1097/WCO.0000000000000451.

Reichold, M. *et al.* (2010) 'KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy) disrupt channel function.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 107(32), pp. 14490–5. doi: 10.1073/pnas.1003072107.

Rice, T. *et al.* (2015a) 'Understanding inherited genetic risk of adult glioma - A review', *Neuro-Oncology Practice*, 3(1), pp. 10–16. doi: 10.1093/nop/npv026.

Rice, T. *et al.* (2015b) 'Understanding inherited genetic risk of adult glioma - A review', *Neuro-Oncology Practice*. Oxford University Press, 3(1), pp. 10–16. doi: 10.1093/nop/npv026.

Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2017) 'Krebs in Deutschland für 2013/2014'. doi: 10.17886/rkipubl-2017-007.

De Robles, P. *et al.* (2015) 'The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: A systematic review and meta-analysis', *Neuro-Oncology*. Oxford University Press, pp. 776–783. doi: 10.1093/neuonc/nou283.

Rudà, R. *et al.* (2012) 'Seizures in low-grade gliomas: Natural history, pathogenesis, and outcome after treatments', *Neuro-Oncology*. Oxford University Press, 14(SUPPL.4), pp. iv55-64. doi: 10.1093/neuonc/nos199.

Sakmann, B. and Trube, G. (1984) 'Conductance properties of single inwardly

rectifying potassium channels in ventricular cells from guineapig heart.', *The Journal of Physiology*. Wiley-Blackwell, 347(1), pp. 641–657. doi: 10.1113/jphysiol.1984.sp015088.

Sansom, M. S. P. *et al.* (2002) 'Potassium channels: Structures, models, simulations', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier, pp. 294–307. doi: 10.1016/S0005-2736(02)00576-X.

Schulte, U. and Fakler, B. (2000) 'Gating of inward-rectifier K⁺ channels by intracellular pH', *European Journal of Biochemistry*. Wiley/Blackwell (10.1111), 267(19), pp. 5837–5841. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01671.x.

Schültke, E. *et al.* (2018) 'Survival of rats bearing advanced intracerebral F 98 tumors after glutathione depletion and microbeam radiation therapy: conclusions from a pilot project.', *Radiation oncology (London, England)*. BioMed Central, 13(1), p. 89. doi: 10.1186/s13014-018-1038-6.

Seino, S. (2012) 'Cell signalling in insulin secretion: the molecular targets of ATP, cAMP and sulfonylurea', *Diabetologia*. Springer-Verlag, 55(8), pp. 2096–2108. doi: 10.1007/s00125-012-2562-9.

Sepulveda, F. V. *et al.* (2015) 'Molecular Aspects of Structure, Gating, and Physiology of pH-Sensitive Background K₂P and Kir K⁺-Transport Channels', *Physiological Reviews*, 95(1), pp. 179–217. doi: 10.1152/physrev.00016.2014.

Shapiro, S., Mealey, J. and Sartorius, C. (1989) 'Radiation-induced intracranial malignant gliomas', *Journal of Neurosurgery*. Journal of Neurosurgery Publishing Group, 71(1), pp. 77–82. doi: 10.3171/jns.1989.71.1.0077.

Sims, S. M. and Dixon, S. J. (1989) 'Inwardly rectifying K⁺ current in osteoclasts', *Am J Physiol*. American Physiological Society Bethesda, MD, 256(0002–9513), pp. C1277–C1282. doi: 10.1152/ajpcell.1989.256.6.C1277.

Skardelly, M. *et al.* (2015) 'Predictors of preoperative and early postoperative seizures in patients with intra-axial primary and metastatic brain tumors: A retrospective observational single center study', *Annals of Neurology*. Wiley-Blackwell, 78(6), pp. 917–928. doi: 10.1002/ana.24522.

Smits, A. and Duffau, H. (2011) 'Seizures and the natural history of world health

organization grade II gliomas: A review', *Neurosurgery*. Oxford University Press, 68(5), pp. 1326–1333. doi: 10.1227/NEU.0b013e31820c3419.

Srivastava, R. *et al.* (2012) 'Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis.', *The New England journal of medicine*. NIH Public Access, 367(2), pp. 115–23. doi: 10.1056/NEJMoa1110740.

Steinhäuser, C., Grunnet, M. and Carmignoto, G. (2016) 'Crucial role of astrocytes in temporal lobe epilepsy', *Neuroscience*. Pergamon, 323, pp. 157–169. doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2014.12.047.

Stockhammer, F. *et al.* (2012) 'IDH1/2 mutations in WHO grade II astrocytomas associated with localization and seizure as the initial symptom', *Seizure*. W.B. Saunders, 21(3), pp. 194–197. doi: 10.1016/j.seizure.2011.12.007.

Stupp, R. *et al.* (2009) 'Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial', *Lancet Oncology*, 10, pp. 459–466. doi: 10.1016/S1470.

Stupp, R. *et al.* (2010) 'High-grade malignant glioma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up', *Annals of Oncology*. Oxford University Press, 21(SUPPL. 5), pp. v190–v193. doi: 10.1093/annonc/mdq187.

Stupp, R. *et al.* (2017) 'Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma a randomized clinical trial', *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association, 318(23), pp. 2306–2316. doi: 10.1001/jama.2017.18718.

Suzuki, H. *et al.* (2015) 'Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 47(5), pp. 458–468. doi: 10.1038/ng.3273.

Takahashi, T. (1990) 'Inward Rectification in Neonatal Rat Spinal Motoneurons', *The Journal of Physiology*. Wiley-Blackwell, 423(1), pp. 47–62. doi: 10.1113/jphysiol.1990.sp018010.

Van Tellingen, O. *et al.* (2015) 'Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective

glioblastoma treatment', *Drug Resistance Updates*. Elsevier Ltd, 19, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.drug.2015.02.002.

Toledo, M. *et al.* (2017) 'Epileptic features and survival in glioblastomas presenting with seizures', *Epilepsy Research*. Elsevier B.V., 130, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2016.12.013.

Valentinis, L. *et al.* (2010) 'Headache attributed to intracranial tumours: A prospective cohort study', *Cephalalgia*. SAGE PublicationsUK, 30(4), pp. 389–398. doi: 10.1111/j.1468-2982.2009.01970.x.

Vecht, C. J., Wagner, G. L. and Wilms, E. B. (2003) 'Interactions between antiepileptic and chemotherapeutic drugs', *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group, 2(7), pp. 404–409. doi: 10.1016/S1474-4422(03)00435-6.

Verkhratsky, A. and Steinhäuser, C. (2000) 'Ion channels in glial cells', *Brain Research Reviews*. Elsevier, 32(2–3), pp. 380–412. doi: 10.1016/S0165-0173(99)00093-4.

Wang, S. I. *et al.* (1997) 'Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme.', *Cancer research*. American Association for Cancer Research, 57(19), pp. 4183–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9331071> (Accessed: 22 July 2018).

Weller, M. *et al.* (2011) 'Prolonged survival with valproic acid use in the EORTC/NCIC temozolomide trial for glioblastoma', *Neurology*. American Academy of Neurology, 77(12), pp. 1156–1164. doi: 10.1212/WNL.0b013e31822f02e1.

Weller, M., Stupp, R. and Wick, W. (2012) 'Epilepsy meets cancer: When, why, and what to do about it?', *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd, 13(9), pp. e375–e382. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70266-8.

Wick, W. *et al.* (2005) 'Pharmacotherapy of epileptic seizures in glioma patients: who, when, why and how long?', *Onkologie*. Karger Publishers, 28(8–9), pp. 391–6. doi: 10.1159/000086375.

Wick, W. *et al.* (2016) 'Long-term analysis of the NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with PCV or temozolomide', *Neuro-Oncology*. Oxford University Press, 18(11), pp. 1529–1537. doi:

10.1093/neuonc/now133.

Wrensch, M. *et al.* (2002) 'Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature', *Neuro-Oncology*. Oxford University Press, 4(4), pp. 278–299. doi: 10.1093/neuonc/4.4.278.

Zhong, Z. *et al.* (2015) 'IDH1/2 mutation is associated with seizure as an initial symptom in low-grade glioma: A report of 311 chinese adult glioma patients', *Epilepsy Research*. Elsevier B.V., 109(1), pp. 100–105. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2014.09.012.

IX. CURRICULUM VITAE

X. VERÖFFENTLICHUNGSVEREICHNIS

Originalarbeiten

A. Madadi, J. Wolfart, F. Lange, H. Brehme, M. Linnebacher, A. U. Bräuer, A. Büttner, T. Freiman, C. Henker, A. Einsle, S. Rackow, R. Köhling, T. Kirschstein, S. Müller (2020): "Correlation between Kir4.1 expression and barium-sensitive currents in rat and human glioma cell lines"

Neuroscience Letters, doi:10.1016/j.neulet.2020.135481

Kongressbeiträge

„Functional expression of Inward rectifier K⁺ currents in glioma cells“ auf der 95. jährlichen Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (2016)

Abstract: A. Madadi, S. Müller, H. Brehme, M. Linnebacher, J. Wolfart, R. Köhling, P04-08, p. 105, doi:10.1111/apha.12672

XI. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock, den 11.03.2020

Annett Madadi