

# **ATP induzierte Membranpotenzial-Ozillationen in humanen Makrophagen**

Dissertation

Zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Boris Musset**

aus Lich

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie

Der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am \_\_\_\_\_ angenommen

Erstgutachter HD. Dr. Monika Stengl

Zweitgutachter Prof. Dr. Dr. Jürgen Daut

Tag der mündlichen Prüfung am \_\_\_\_\_

### **Erklärung**

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

#### **ATP induzierte Membranpotenzial Ozillationen in humanen Makrophagen**

Selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

\_\_\_\_\_  
(Ort/Datum)

\_\_\_\_\_  
(Unterschrift mit Vor- und Zunamen)

Für Noel

23.10.2004

## Vorwort

Die vorliegende Arbeit zeigt meine elektrophysiologischen Untersuchungen mit den Makrophagen in der Zeit meiner Doktorarbeit.

Aus dieser Arbeit ist eine Veröffentlichung entstanden (Hanley *et al.*, 2004).

Die elektrophysiologischen Messungen wurden alle von mir durchgeführt und ab den Abschnitten mit ATP von mir und Sven Limberg.

Eine solche Arbeit ist ohne die Hilfe von anderen Wissenschaftler kaum möglich. Aus diesem Grund möchte ich besonders die Fluoreszenzmessungen von Peter Hanley hervorheben.

Die RT-PCR Daten von Vijay Renigunta leisten zusätzlich unerläßliche Informationen für die Doktorarbeit und die Veröffentlichung.

Rainer Sus hat mit seinen Video-Analysen der Makrophagen einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

Alexander Dalpke hat mit den Untersuchungen zur Zytokinproduktion die Doktorarbeit stärken können.

Nicht unerwähnt sollte bleiben, dass eine weitere Veröffentlichung in Vorbereitung ist. In dieser Arbeit werden die Makrophagenvorläuferzellen (Monozyten) und ihre Purinrezeptoren untersucht.

KAUFMANN, A., MUSSET, B., LIMBERG S.H., RENINGUNTA, V., SUS, R., DALPKE, A.H., HANLEY, P.J., (2004) Host tissue damage signal ATP promotes chemokinesis and negatively regulates Toll-receptor signalling in human monocytes *JBC* eingereicht

Zusätzlich ist während meiner Doktorarbeit folgende Veröffentlichung entstanden (Rajan *et al.*, 2002). Eine weitere Veröffentlichung ist in Vorbereitung.

MUSSET, B., WEGNER, S., PETERS, J., DERST, C., LIU, G., DAUT, J., Modulation of the conductance of the K<sup>+</sup> channel TASK-3 by extracellular divalent or polyvalent cations --- in Vorbereitung

Boris Musset 28.10.2004

HANLEY, P. J., MUSSET, B., RENINGUNTA, V., LIMBERG, S. H., DALPKE, A. H., SUS, R., HEEG, K. M., PREISIG-MULLER, R. & DAUT, J. (2004). Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca<sup>2+</sup> and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 9479-9484.

RAJAN, S., PREISIG-MULLER, R., WISCHMEYER, E., NEHRING, R., HANLEY, P. J., RENINGUNTA, V., MUSSET, B., SCHLICHTHORL, G., DERST, C., KARSCHIN, A. & DAUT, J. (2002). Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J Physiol* 13-26.

# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
1.1	Kurze Übersicht	4
1.2	Entwicklung und Funktion des Immunsystems	4
1.2.1	Self-Nonsel Model (SNS)	7
1.2.2	Infectious-Nonsel-Model (INS)	8
1.2.3	Danger Model (DM)	9
1.3	Makrophagen	10
1.3.1	Makrophagen und Phagozytose	12
1.3.2	Makrophagen Zytokine	13
1.4	Ionenkanäle und Immunsystem	14
1.4.1	Struktur und Funktion von Kalium-Kanälen	15
1.4.2	$\beta$ -Untereinheiten	19
1.4.3	Spannungsabhängige Kaliumkanäle	21
1.4.4	Kalziumabhängige Kaliumkanäle	22
1.4.5	Einwärtsgleichrichter	23
1.4.6	K2P	24
1.5	Purinrezeptoren	25
1.5.1	P2X-Rezeptoren	26
1.5.2	P2Y-Rezeptoren	32
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>38</b>
2.1	Generierung von Makrophagen	38
2.1.1	Wachstumsmedien für Säugerzellen	38
2.1.2	Oberflächenfärbung	40
2.1.3	Durchflusszytometrie	40
2.2	Patch-Clamp-Messstand	43
2.2.1	Optische Komponenten	43
2.2.2	Mechanische Komponenten	43
2.2.3	Elektrische Komponenten	46
2.2.4	Kapillaren	47
2.2.5	Offsetpotenzial und Liquid Junction Potenzial	47
2.2.6	Sealbildung	48
2.2.7	Referenzelektrode	48
2.2.8	Membrankapazitäts-Bestimmung	49

<b>1 Inhaltsverzeichnis</b>	<b>2</b>
2.2.9 Zusammensetzung der Salzlösungen	50
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
<b>3.1 Passive elektrische Eigenschaften</b>	<b>51</b>
3.1.1 Kapazitätsmessungen	52
3.1.2 Membranpotenzialmessungen	54
3.1.3 Eingangswiderstand	56
3.1.4 Kaliumkanäle	57
<b>3.2 Durch ATP hervorgerufene Effekte</b>	<b>66</b>
3.2.1 RT-PCR Analysen von Purinrezeptoren (P2Y)	69
3.2.2 Stromklemmen Experimente mit ATP zeigen schnelle Depolarisation	70
3.2.3 Fluoreszenzmessungen zeigen P2X und P2Y Rezeptoren	72
3.2.4 RT-PCR Analysen von Purinrezeptoren (P2X)	74
3.2.5 Schnelle Spannungssprünge in der Spannungsklemme zeigt den Ursprung des Stroms	74
3.2.6 Messung der kalziumabhängigen Ströme in Makrophagen	76
3.2.7 Cell-attached Messungen der kalziumaktivierten Kaliumkanäle	78
3.2.8 Pharmakologische Charakterisierung des oszillierenden Kaliumstroms	80
3.2.9 Zytokinbestimmung der mit ATP superfundierten Makrophagen	80
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>83</b>
<b>4.1 Passive Eigenschaften und Kaliumkanäle</b>	<b>83</b>
4.1.1 Anandamid	84
<b>4.2 Effekte von ATP</b>	<b>84</b>
4.2.1 Andere Veröffentlichungen über Purinrezeptoren und Kaliumströmen in Ratten	85
4.2.2 Probleme der Meßtechniken Ganz-Zell und Fluoreszenz	87
4.2.3 Mechanismus der Kalziumoszillationen	87
4.2.4 Elektrophysiologische Untersuchungen kalziumaktivierter Strömen in Makrophagen	87
4.2.5 Vergleich mit anderen Veröffentlichungen an den Purinrezeptoren (P2X)	90
4.2.6 Vergleich mit anderen Veröffentlichungen an den Purinrezeptoren (P2Y)	89
4.2.7 BK-Kanal als möglicher Träger der Membranspannungszillationen.	91
4.2.8 Einfluß der $\beta$ -Untereinheiten des BK-Kanals	91
4.2.9 Bedeutung des BK-Kanals in der Makrophagen Physiology	92
4.2.10 Bedeutung des IK in den Oszillationen	93
4.2.11 Kalziumoszillationen steuern Transskriptionsfaktoren	93
4.2.12 Block der induzierten Zytokinproduktion durch Suramin	94
4.2.13 Möglicher Transduktionsweg zum Nukleus	95
4.2.14 IL6 ist ein wichtiges proinflammatorisches Protein	95
4.2.15 Danger Modell	96

<b>1 Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>99</b>
<b>6 ABKÜRZUNGEN</b>	<b>100</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>104</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Kurze Übersicht

Die Ergebnisse in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass ein wichtiges Erkennungssignal von Gefahren für den Organismus ATP sein kann. Geschädigtes Gewebe sekretiert ATP in den extrazellulären Raum oder, bei nicht physiologischen Zelltod (Nekrose), durch Ruptur der Zellmembran ins Gewebe.

Makrophagen als antigenpräsentierende Zellen und damit Mittler zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem sie zeigen eine starke Beeinflussung ihrer Zytokinproduktion, der interzellulären Kalziumkonzentration und der Ionenströme durch geringe Konzentrationen von extrazellulärem ATP.

Eine Übereinstimmung mit den von Polly Matzinger postulierten „Danger-Signals“, die aktivierend auf das Immunsystem wirken, könnte hier vorliegen.

## 1.2 Entwicklung und Funktion des Immunsystem

Alle Organismen, insbesondere festsitzende Pflanzen, Schwämme, Coelenteraten, Tunikaten, etc., haben Millionen von Jahren nur überdauern können, weil sie erfolgreich pathogene Infektionskeime (Viren, Bakterien, Pilze) und Parasiten (einzellige und vielzellige) abzuwehren verstanden. Eine erste unspezifische Abwehr basiert auf physikalischen Barrieren (Zellwände, Cuticula, hoch-viskoser Schleim). Darüber hinaus haben alle Organismen ein immunologisches Wissen erworben, um gegen Pathogene und Parasiten, mit denen sie seit Jahrtausenden zu tun haben, vorgehen zu können. Einerseits gelang es, diese abzutöten andererseits ihre Wirksamkeit in Schranken zu halten. Solche gezielten Abwehrmechanismen funktionieren mittels



Erkennungsmustern, um selektiv die Gefahren für den Organismus zu bekämpfen, ohne damit den eigenen Organismus zu schädigen.

Die bei Wirbellosen bisher gefundenen Abwehrsysteme basieren auf genetisch überkommenem, also angeborenem Wissen, dessen großer Vorteil ist, dass der Organismus schon vor einem Erstkontakt zur Abwehr gerüstet ist. Diese Schutzsysteme werden „unspezifisch“ genannt, obwohl sie durch die Evolution einige hoch wirksame und spezifische Stoffe, wie z.B. das Lysozym und hoch affine Rezeptoren durch fortwährende Selektion entwickelt haben. Pflanzen und wirbellose Tiere haben vielerlei antimikrobielle und antivirale Substanzen entwickelt.

Bei Vertebraten gibt es zwei Arten von Immunabwehrsystemen. Da hier die individuelle Lebensdauer meist höher ist als bei Invertebraten, gibt es zusätzlich zum angeborenen Immunsystem ein lernfähiges Immunsystem, das noch während der Individualentwicklung auf neue, veränderte Bedrohungen des Organismus reagieren kann. Das evolutionäre Risiko des Auslöschens der Population bei Pathogenbefall (Kalamität) ist bei höheren Organismen durch diese lernfähige und variable Art des Immunsystems herabgesetzt.

Die Lernfähigkeit des Immunsystems beruht auf den Lymphozyten. Diese unterteilen sich in zwei Hauptgruppen die B-Zellen und T-Zellen.

Lymphozyten entstehen im Knochenmark aus den selben Stammzellen (hämatopoetische Stammzellen), die auch die anderen Zellen des Blutes (Erythrozyten, Granulozyten, Makrophagen) produzieren. Aus den Stammzellen gehen die noch teilungsfähigen Lymphoblasten hervor, aus diesen die noch unreifen Lymphozyten. Diese verlassen das Knochenmark und besiedeln lymphatische Organe. Die Lymphozyten, die im Thymus heranreifen, bilden später die T-Zellen. Zellen, die sich in den Lymphknoten ansiedeln, bilden die B-Zellen (von Bursa fabricii). Diesen Zellen ist es möglich, durch ständige neue zufallsbeherrschte somatische Rekombination, spontane Punktmutationen (Hypermutation) und verschieden prozessierte mRNA eine milliardenfache Vielfalt von Antikörpern herzustellen. Mit Hilfe der Antikörper können so neue Krankheitserreger erfaßt werden. Zudem bildet das lernfähige Immunsystem Gedächtniszellen aus, die sich in den lymphatischen Organen ansiedeln und im Fall eines wiederholten Eindringens eines Krankheitserregers sofort mit den

immunologischen Gegenmaßnahmen beginnen können (Produktion von Antikörpern, Bilden von Klonen, ...).

Aus den myeloischen Zellen entstehen die polymorphkernigen Granulozyten und Mastzellen, sowie Monozyten, die dann zu Makrophagen maturieren.

Makrophagen und Neutrophile sind Phagozyten und gehören zum angeborenen Immunsystem. Das angeborene oder unspezifische Immunsystem basiert, wie bei den Invertebraten, auf genetisch überkommenem Wissen. Pathogene und Parasiten werden hier sofort bekämpft. Aus Monozyten reifen aber auch andere Zellen heran und tragen Namen, die mit ihrem Ansiedlungsort zusammenfallen: Histozyten im Bindegewebe, Mikroglia im Gehirn, Kupffer-Zellen in der Leber. Weitere Zellen mit phagozytischer Funktion sind die dendritischen Zellen, die ebenfalls sowohl in den lymphatischen Organen, wie auch anderorts gefunden werden, beispielsweise als Langerhans'sche Zellen in der Haut.

**Tabelle 1-1 Entwicklung des Immunsystems**

	Angeborenes Immunsystem		Adaptives Immunsystem	
	Phagozyten	Antikörper	T & B Lymphozyten	Lymphknoten
<b>Invertebraten</b>				
Protozoa	+	-	-	-
Schwämme	+	-	-	-
Anneliden	+	-	-	-
Athropoden	+	-	-	-
<b>Vertebraten</b>				
Elasmobranchier	+	+ (IgM)	+	-
Teleostier	+	+ (IgM)	+	-
Amphibien	+	+ (2 o. 3 Klassen)	+	-
Reptilien	+	+ (3 Klassen)	+	-
Aves	+	+ (3 Klassen)	+	+ (einige Arten)
Mammalia	+	+ (7 o. 8 Klassen)	+	+

Um die Funktionsweise des Immunsystem besser verstehen zu können, sind im Laufe der Zeit drei Modelle veröffentlicht worden. Alle Modelle sind aus den

wissenschaftlichen Erkenntnissen des jeweiligen Zeitraums entstanden, in dem sie postuliert wurden.

### 1.2.1 Self-Nonself Model (SNS)

Eines dieser Erkennungsmuster sind die Histokompatibilitäts-Antigene (MHC) der Menschen, die in der Zellmembran inserieren und dort körpereigene Zellen markieren, um sie von Fremdem unterscheidbar zu machen. Diese MHC werden vom Immunsystem erkannt. Sie sind individualspezifisch, d.h. sie sind bei jedem Individuum einzigartig, außer bei eineiigen Zwillingen. Zellen, die die eigenen MHC haben, werden toleriert. Zellen, die einen anderen oder keinen MHC ausbilden, werden vom Immunsystem erkannt und bekämpft. Burnet veröffentlichte dieses Modell und konnte damit erklären, warum der Körper Organspenden von Mensch oder Tier abstößt und Krankheitserreger bekämpft (Self-Nonself Model / SNS) (Burnet, 1962). Dieses Erklärungsmodell zeigt, dass die MHC in der Immunantwort eine Rolle spielen, dass jede Immunzelle einen MHC-Komplex trägt, und dass Lymphozyten, die das eigene Gewebe angreifen, in frühen Lebensphasen ausgelöscht werden. Diese Erkenntnis konnte aus den Versuchen mit zweieiigen Zwillingen und deren Toleranz des jeweils anderen Blutes herausgefunden werden. Zudem erhielten Burnet und Medawar den Nobelpreis für den Nachweis, dass Hauttransplantate von Mäusen nicht abgestoßen wurden, wenn die Mäuse als Baby Zellen des Spenders injiziert bekommen hatten.

Aber auch Wirbellose können mit besonderen individualspezifischen Oberflächenmolekülen ausgestattet sein, die eine Unterscheidung zwischen „eigen“ und „fremd“ erlauben.

Das SNS kann aber einige Eigenschaften des Immunsystems nicht erklären.

B-Zellen haben die Fähigkeit zu hypermutieren (siehe oben) bei ihnen besteht die Möglichkeit bei einer solchen Mutation autoaggressiv werden, was bedeutet, dass es später in der Entwicklung des Individuums Zellen gibt, die autoaggressiv sind und nicht in frühen Lebensphasen vernichtet werden.

Das Immunsystem besteht auch aus Zellen die zusätzlich regulierend in die Immunantwort eingreifen. Bei der Protein-Antigen-Erkennung ergibt sich nur eine Immunantwort, wenn T-Zellen über antigenpräsentierende Zellen (APC) aktiviert werden und dann in den Lymphknoten wiederum B-Zellen aktivieren können, die auch dieses Antigen präsentieren.

Diese Aktivierung der T-Zellen als Zellen des adaptiven Immunsystems durch APC des angeborenem Immunsystems zeigen deutlich die Koppelung zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem.

Aus dieser Aktivierungskaskade ergibt sich die Frage, wer oder was das angeborene Immunsystem aktiviert.

### 1.2.2 Infectious-Nonself-Model (INS)

APCs präsentieren alle möglichen Stoffe, die sie in ihrer Umgebung aufnehmen. Sie präsentieren also auch Stoffe die vom eigenen Organismus kommen, d.h. sie sind nicht antigenspezifisch und sie unterscheiden nicht zwischen fremd und eigen.

Um außer mit den Histokompatibilitäts-Molekülen zusätzliche Unterscheidung zwischen körpereigenen Zellen und fremden Zellen zu machen, gibt es weitere Rezeptoren, die auch von APCs exprimiert werden. Viren, Bakterien und Pilze, die in den Körper eindringen, können durch die Besonderheiten ihrer Oberflächenausstattung erkannt werden. Viren haben in ihrer „gestohlenen“ Eukaryontenmembran virale Spikeproteine inseriert, mit denen sie an Wirtszellen andocken. Bakterien bauen in ihrer Zellwand das Polysaccharid Murein ein. Pilze integrieren in ihrer Zellwand außer Chitin auch pilzspezifische  $\beta$ -1,3-Glucane. Diese Moleküle werden auch als PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) bezeichnet. Sie können von PRR (Pattern recognition receptors) wie den TLR (Toll like receptors) (Lemaitre *et al.*, 1996) erkannt werden, um spezifische Zellantworten auszulösen, wie z.B. die Aktivierung ruhender, unspezifischer Immunzellen.

Tabelle 1-2 Adaptives und angeborenes Immunsystem im Vergleich

<b>Eigenschaften</b>	<b>Angeborenes Immunsystem</b>	<b>Adaptives Immunsystem</b>
<b>Rezeptoren</b>	Im Genom festgelegt keine somatische Rekombination	Kodiert in Genabschnitten somatische Rekombination
<b>Verteilung</b>	Nicht klonal Alle Zellen sind identisch	Klonal Alle Zellen einer Klasse sind unterschiedlich
<b>Erkennung</b>	Konservierte molekuläre Muster (LPT, LTA, Mannan, Zucker)	Details der molekulären Struktur (Proteine, Peptide, Karbohydrate)
<b>Aktivierungszeit</b>	sofort	verzögert

TLR's kommen in evolutionär weit voneinander entfernten Spezies wie Fliegen und Mammalia vor. Ihre Aufgabe besteht darin, z.B. LPS (Lipopolysaccharid) von Gram negativen Bakterien durch TLR-4 oder bakterielle Lipoproteine durch TLR-2 erkennen zu können. Das Immunsystem erkennt einerseits die Zellen die eigen sind, an den Histokompatibilitätsmolekülen, andererseits erkennt es fremde Zellen an den ganz bestimmten Oberflächen Molekülen die nur von fremden Zellen ausgebildet werden. Das Infectious-Nonself-Model (INS) schließt diese Art der Erkennung von unvorteilhaften Fremdeinflüssen auf den Organismus mit ein und kann damit erklären, warum das Immunsystem die Kooperation vieler Zellen zur Immunantwort verwendet (Janeway, 1989; Janeway & Medzhitov, 2002).

Allerdings weist auch dieses Modell Erklärungslücken auf. Es kann nicht erklären, warum Tumore teilweise spontan abgestoßen werden, warum Viren, die nicht über eine gestohlene Eukaryontenmembran verfügen eine Immunantwort auslösen und warum nicht bakterielle Adjuvantien (werden beim Impfen zum Impfstoff gegeben um eine Immunantwort auszulösen) wie Alaun (Schwefelsäure Doppelsalz  $M^I M^{III}(SO_4)_2$ ) eine Immunantwort auslösen.

### 1.2.3 Danger Model (DM)

Ein weiteres Model der Funktionsweise des Immunsystems ist das Danger Model von Polly Matzinger (Matzinger, 2002). Sie geht von der Idee aus, dass das Immunsystem,

insbesondere das angeborene Immunsystem, über Gefahrensignale aktiviert wird und nicht eigene und fremd als Basis der Erkennung hat.

Die Gefahren für den Organismus haben einen ebenso langen evolutiven Prozess durchlaufen wie der Organismus, der angegriffen wird. Es ist also ein Vorteil, alte, „bekannte“ Schädiger zu erkennen, wie auch die Schädigung selbst. Gefahren können, wie im INS, durch fremde Substanzen ausgelöst werden. Es ist auch möglich, dass Produkte der eigenen Zellen, die im physiologischen Zustand die Zelle nicht verlassen, Gefahren anzeigen. Erst wenn diese Substanzen in das extrazelluläre Medium gelangen, können sie vom Immunsystem erkannt werden. Das Hitzeschockprotein ist eines dieser Signale (Gallucci & Matzinger, 2001). Gallucci und Matzinger gehen davon aus, dass auch andere Moleküle, die vom eigenen Körper produziert werden, wie z.B. Nukleotide, Zytokine, Abbauprodukte der Extrazellulärmatrix und Zwischenprodukte der Produktion von Sauerstoffradikalen eine „Danger Signal“-Wirkung haben.

Dieses Modell würde erklären, warum der Fötus im Mutterleib, der von seiner MHC-Expression sicherlich fremd ist, nicht vom Immunsystem bekämpft wird. Warum Transplantate, wenn sie aus lebenden Spendern entnommen, weniger oft abgestoßen werden, als wenn sie von toten Spendern entnommen werden. Warum eine Impfung besser und länger im immunologischen Gedächtnis bleibt, wenn Adjuvantien zugesetzt werden.

Die APCs zeigen also eine höchst wichtige Bedeutung für das Immunsystem, indem sie ständig Signale des Körpers aufnehmen und diese an das adaptive Immunsystem übermitteln.

Makrophagen sind solche APCs

### 1.3 Makrophagen

Aus Monozyten generierte Zellen sind außerordentlich vielseitige Immunzellen. Sie nehmen an einer Vielzahl von Prozessen teil, wie z.B. Wundheilung und Knochenneubildung. Bei der Knochenbildung spielen sie eine besondere Rolle als Osteoclasten. Diese Zellen verfügen über die Fähigkeit, die von den Osteoblasten

hergestellten Knochen wieder abzubauen und damit das Knochenwachstum und die Knochendichte zu beeinflussen.

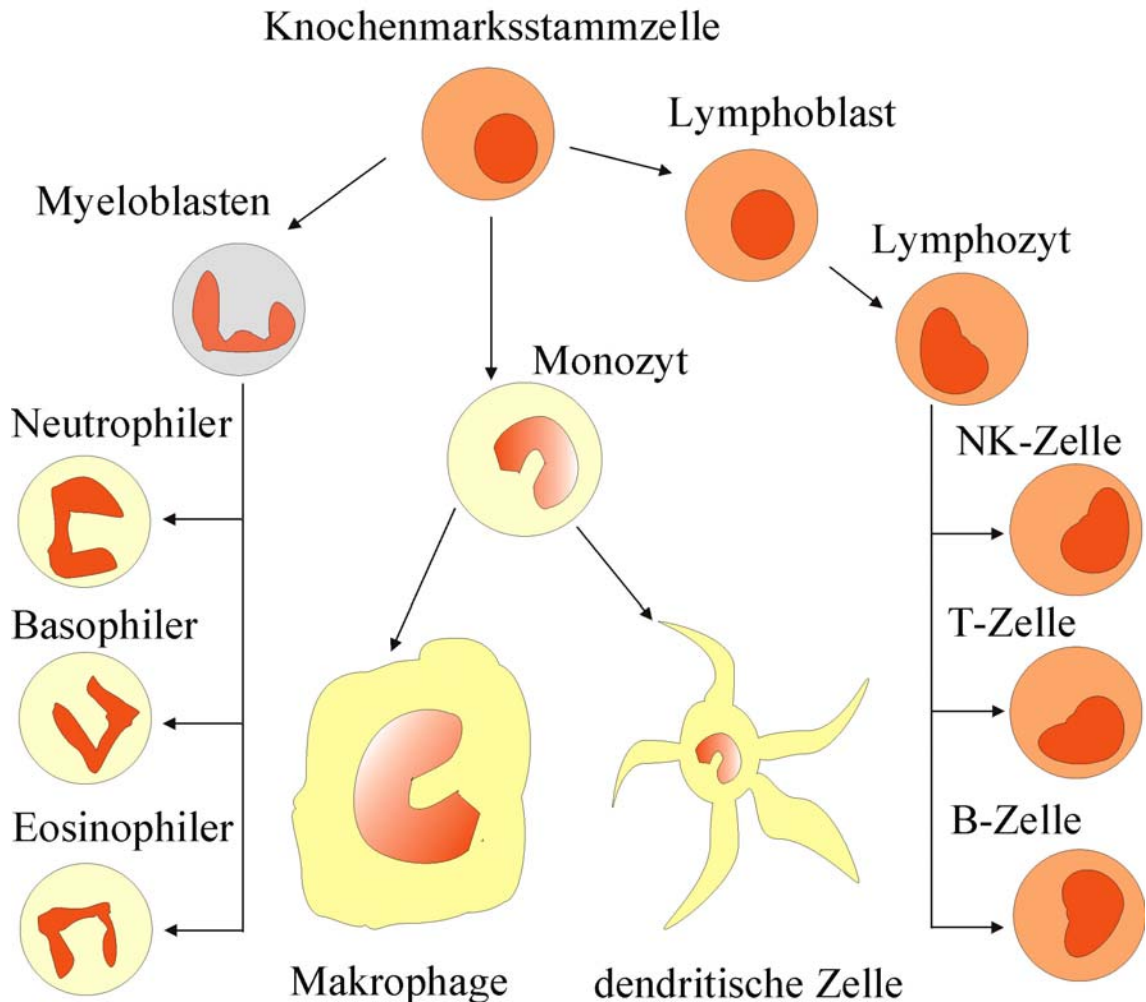


Abbildung 1-1

Stammbaum der aus Knochenmarkszellen reifenden myelozytischer und lymphatischer Immunzellen.

Damit das Immunsystem effizient arbeiten kann, ist besonders wichtig, dass die Makrophagen ihr ganzes funktionelles Repertoire ausbilden. Sie sind Sensoren und Zerstörer infektiöser Agenzien, sie interagieren mit dem adaptiven Immunsystem über Antigenpräsentation zu den T-Zellen und sie interagieren sowohl mit humoralen als auch zellgesteuerten Immunantworten. Die Alveolar-Makrophagen reduzieren die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und steigern den Ausstoß von IL-1 $\beta$  als Reaktion auf Catecholamin vermittelten Stress (Persoons *et al.*, 1996). Genauso spielen

Makrophagen eine Rolle bei der Fertilisation und dem Erhalt der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse mit ihren CSF-1 Rezeptoren (Pollard *et al.*, 1991). Aufgrund ihrer effektiven und verschiedenen Funktionen sind Makrophagen genau reguliert. Sollte diese Regulation in eine Schiefelage geraten, spielen Makrophagen eine destruktive Rolle bei einer Vielzahl von entzündlichen Krankheiten (Morbus Crohn, Basedow-Krankheit, Multiples Sklerose, Diabetes Typ 1, Myasthenia gravis, Schuppenflechte, Sklerodermie, spontane Sterilität, Morbus Addison etc. (Oldstone, 1987)).

### 1.3.1 Makrophagen und Phagozytose

Eine der Hauptaufgaben der Makrophagen ist die Phagozytose. Während der Phagozytose werden Bakterien, körpereigene oder fremde Partikel, wie Zellen, durch die Bildung von Sauerstoffradikalen zersetzt. Die NADPH-Oxidase überträgt dabei die Elektronen von NADPH von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite der Membran, um dort aus dem Sauerstoffmolekül ( $O_2$ ) Sauerstoffradikale ( $O_2^-$ ) zu bilden. Phagozytose ist ein sehr heterogenes Phänomen. Sie zeigt sich abhängig davon, welche Zellmembran-Rezeptoren aktiviert werden und welche Partikel oder Zellen phagozytiert werden. Dabei zeigt der Makrophage eine proinflammatorische Reaktion (proinflammatorische Zytokine werden sezerniert) bei Fc-Rezeptor initiiertes Phagozytose. Fc-Rezeptor initiiertes Phagozytose bedeutet, dass der Fc-Rezeptor an den C-Teil der Antikörper bindet, die vom adaptiven Immunsystem markiert worden sind und damit dem Auffinden von Keimen erleichtert. Komplement aktivierte Phagozytose hingegen zeigt eine antiinflammatorische Reaktion. Makrophagen zerstören apoptotische Zellen, helfen während der Entwicklung den Interzellularraum zu formen, vernichten gealterte Erythrozyten und helfen bei der positiven und negativen Selektion von T-Zellen im Thymus. Die Beseitigung von apoptotischen Zellen erzeugt, genau wie die Phagozytose, durch Komplement eine antiinflammatorische Reaktion. (Webster *et al.*, 1982).

Makrophagen, die eine apoptotische Zelle verdauen, unterdrücken aktiv die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen.



Zusätzlich verfügen Makrophagen über die oben schon erwähnten PRR. Wodurch sie auch ohne vorherige Markierung durch das adaptive Immunsystem Gefahren erkennen. Der TLR-2 erkennt Mannose, die sich auf der Zellwand von Bakterien befindet, TLR-4 erkennt das LPS. Die Leber schüttet ein mannosebindendes Protein als Reaktion auf Interleukine aus, das sowohl vom Komplement als auch von Makrophagen erkannt werden kann. Makrophagen dienen sowohl in der ersten Defensivlinie der Immunabwehr als auch als Vermittler zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem. Um diese Vermittleraufgabe vollkommen auszufüllen, sezernieren Makrophagen Zytokine.

### 1.3.2 Makrophagen Zytokine

Zytokine sind kleine etwa 25 kDa große Moleküle, die in den Körper freigesetzt werden. Sie können autokrin wirken und damit das Verhalten der Zelle beeinflussen von der sie freigesetzt wurden oder sie können parakrin wirken, indem sie benachbarte Zellen beeinflussen oder sie können endokrin Effekte in weit entlegenen Zellen auslösen. Zu den wichtigen Zytokinen, die Makrophagen als Reaktion auf bakterielle Bestandteile freisetzen, gehören IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, und IL-12.

IL-1 beeinflusst das Gefäßendothel, aktiviert Lymphozyten und verbessert damit den Zugang für die Effektorzellen. Im Körper löst IL-1 Fieber und die Produktion von IL-6 aus.

TNF- $\alpha$  aktiviert das Gefäßendothel und erhöht zusätzlich die Permeabilität der Gefäßwände, was zu einem verstärkten Einstrom von IgG, Komplement und Zellen ins Gewebe führt. Zudem wird die Flüssigkeitsableitung zu den Lymphknoten verstärkt. Der Körper reagiert mit Fieber, Metabolitenmobilisierung durch erhöhten Stoffwechsel und möglichen septischem Schock.

IL-6 erhöht die Antikörperproduktion durch Lymphozytenaktivierung. Der Körper reagiert mit Fieber und induziert die Produktion von Akute-Phase-Proteinen. Akute-Phasen Proteine sind Proteine die von den Hepatozyten hergestellt werden. Es handelt sich dabei um metallbindende Proteine wie Haptoglobin, Hämopexin, Ceruloplasmin,

die metallische Ionen als wichtige Co-Faktoren im Rahmen der Zellaktivierung und –funktion zur Verfügung stellen. C-reaktives Protein ist ein Akute-Phase-Protein, dass mit dem Komplement und Makrophagen interagiert. Dieses Protein ist einer der wichtigsten Entzündungsmarker in der Diagnostik und wird in großen Mengen von der Leber ausgeschüttet. Das Mannose-Bindungsprotein gehört wie Serum Amyloid, Prätransferrin und Präalbumin zu den Akut-Phase Proteinen (Renz, 2003).

IL-8 ist ein chemotaktischer Faktor, der Neutrophile, Basophile und T-Zellen zum Infektionsherd lotst.

IL-12 ist der Aktivator für die lymphatischen natürlichen Killerzellen, die bei der frühen Virenabwehr eine bedeutende Rolle spielen. Zudem induziert IL-12 die Differenzierung von CD4-T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen (Janeway, 2002). T<sub>H</sub>1-Zellen sind die funktionelle Unterklasse von T-Helfer-Zellen die besonders bei der Bekämpfung von intrazellulären Mikroben durch Phagozyten helfen.

## 1.4 Ionenkanäle und Immunsystem

Ionenkanäle sind im Immunsystem genauso vorhanden wie in Neuronen, den Herzmuskelzellen, dem Endothel oder anderen Zellarten.

Der erste große Unterschied zwischen den Immunzellen und z.B. Neuronen oder Herzmuskelzellen ist, dass die Immunzellen elektrisch nicht erregbare Zellen sind. Das bedeutet: Neuronen haben einen schnellen spannungsabhängigen Natriumkanal, der sie Aktionspotenziale ausführen lässt, Immunzellen haben weder den Natriumkanal noch lösen sie Aktionspotenziale aus (Hille, 2001).

Die Ionenkanäle in Immunzellen und hier insbesondere in Makrophagen müssen andere Aufgaben haben. Wie oben schon beschrieben tragen Makrophagen aktiv zur Immunsystemsregulation, besonders bei einer Sepsis (Entzündung), bei. Sie sind aber auch essentiell beim Wachstum des Organismus und bei der Phagozytose apoptotischer Zellen.

Feine Regulation von der Zytokinproduktion, der Aktivierung, bis zur Chemotaxis der bewegungsfähigen Makrophagen unterliegen auch dem Membranpotenzial der Zelle

(Gallin & Gallin, 1977; McKinney & Gallin, 1990; Fischer *et al.*, 1995; Eder & Fischer, 1997; Eder *et al.*, 1998; Khanna *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2002).

Die Kaliumkanäle der Makrophagen sind durch mehreren Wissenschaftlern beschrieben worden, sie zeigen eine hohe Übereinstimmung der Kanäle in alle Veröffentlichungen (Gallin, 1984, 1986; Gallin & McKinney, 1988; Gallin, 1989; Kanno & Takishima, 1990; Judge *et al.*, 1994; DeCoursey *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1996; Eder, 1998).

Eine kurze Beschreibung der Kaliumkanalfamilien folgt im nächsten Abschnitt, mit einem Schwerpunkt auf den kalziumaktivierten Kaliumkanälen und den Einwärtsgleichrichtern.

#### 1.4.1 Struktur und Funktion von Kalium-Kanälen

Julius Bernstein postulierte 1902 als erster die selektive Kaliumleitfähigkeit von erregbaren Zellmembranen. Auf der Suche nach den Proteinen, die für die Permeabilität der Zellmembranen zuständig sein könnten, fand man Proteine für Kalzium, Natrium und Chlorid-Kanäle. Doch keiner dieser Ionenkanalfamilien läßt sich mit der Diversität der Kalium-Kanäle vergleichen. Die hohe Diversität der Kalium-Kanäle dient dem genauen Einstellen des Potenzials von erregbaren und nichterregbaren Zellen. Jeder Zelltyp hat seinen eigenen Besatz an Ionenkanälen, mit dem er für seine Aufgaben eine Feinregulierung vornehmen kann. So können verschiedene Arten von Zellen durch ihren Ionenkanalbesatz, obwohl morphologisch sehr ähnlich, funktionell unterschieden werden (Neuhoff *et al.*, 2002).

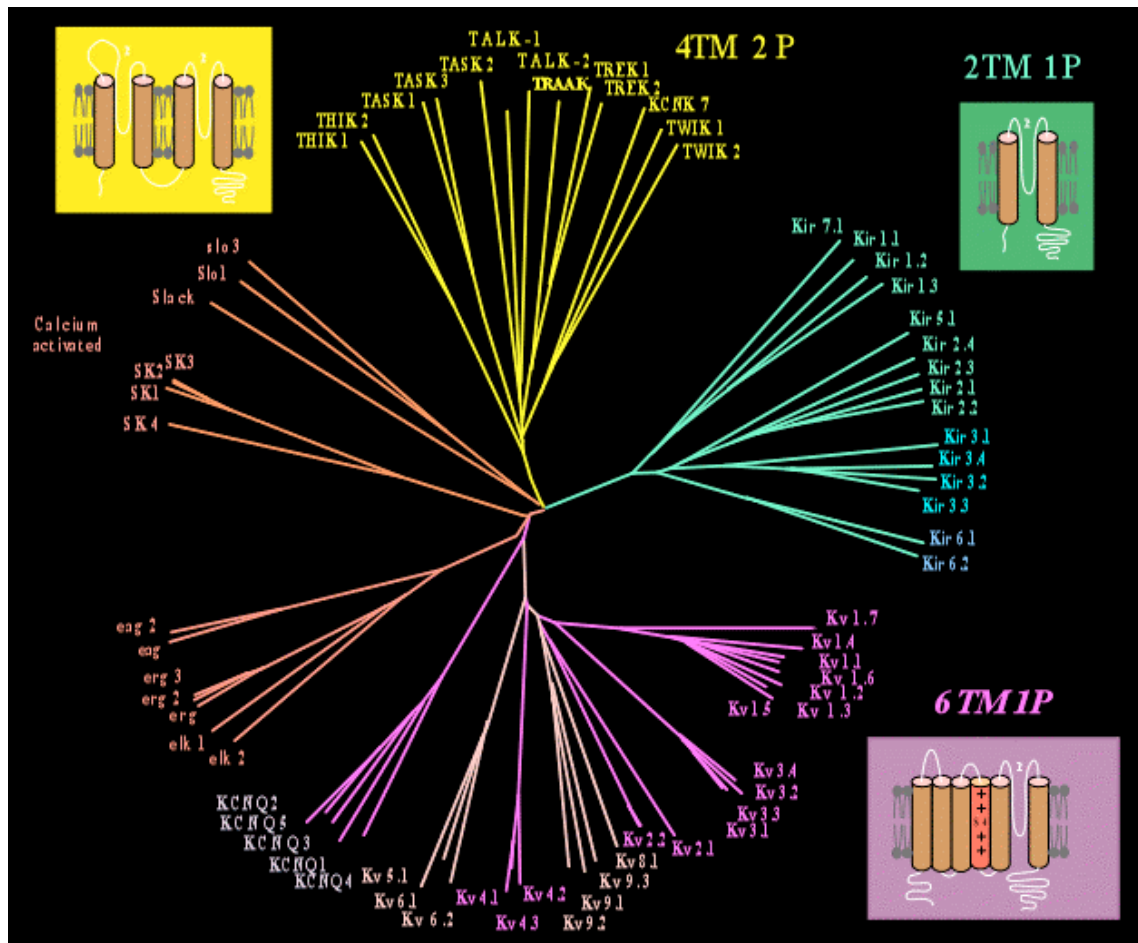


Abbildung 1-2

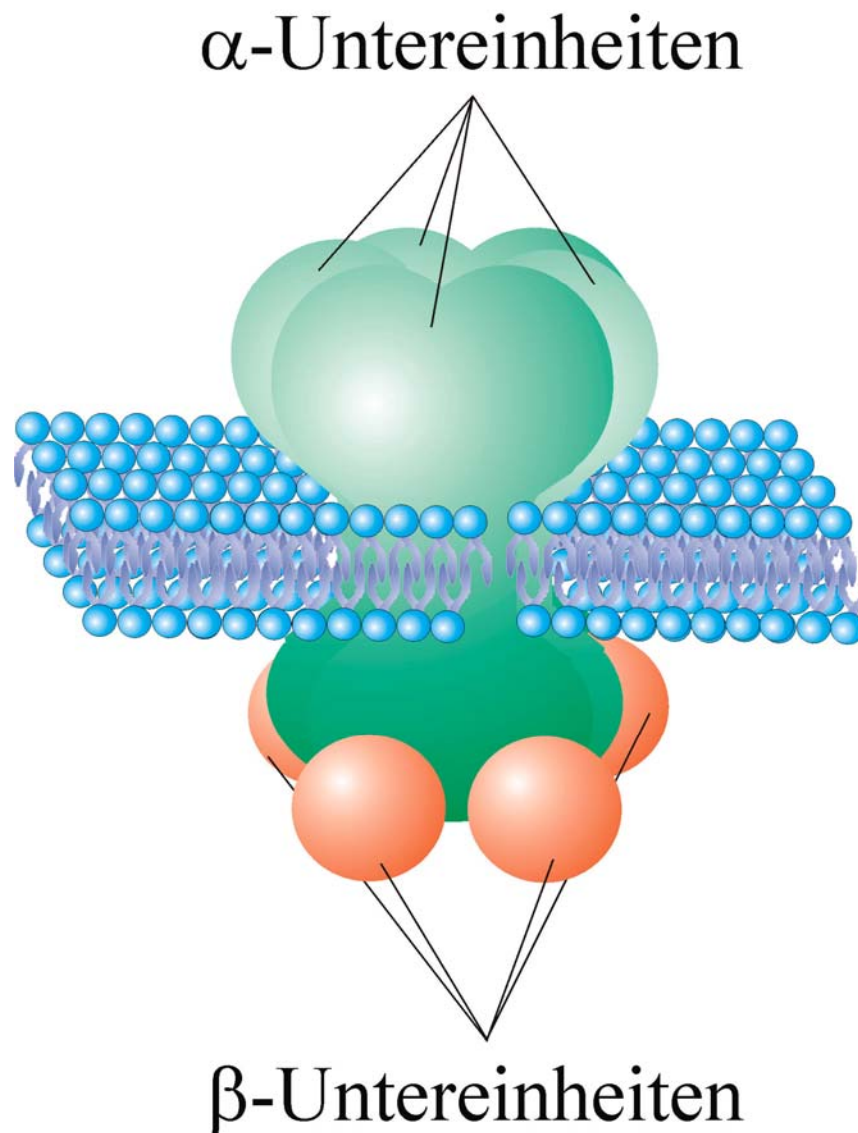
Dendrogram aller 71 verschiedener Säugetier Kalium-Kanal-Proteine. In den kleineren Abbildungen befinden sich die Strukturen von jeweils einer einzelnen Untereinheit. Aus der webseite von Duprat (<http://www.ipmc.cnrs.fr/~duprat/2p/index>)

Kalium-Kanäle sind die Hauptakteure bei der Einstellung des Membranruhepotenzials. Sie haben aber auch andere Aufgaben, wie die Repolarisation des Aktionspotenzials und das Einstellen des Zellvolumens. Sie bestimmen die Länge des Herzaktionspotenzials, verkleinern die Effektivität von excitatorischen Einflüssen und helfen die Zeitspanne zwischen den Bursts von Aktionspotenzialen zu verlängern.

Das Öffnen der Kalium-Kanäle durch klinische Anästhetika führt zur Bewußtlosigkeit. Das Schließen von Kalium-Kanälen durch „Second-Messenger-Systeme“ ist eine Strategie die Erregbarkeit von Zellen zu erhöhen oder eine andere Strategie ist einen Depolarisationsblocks zu setzen. Beim Depolarisationsblock wird durch das Schließen

von Kaliumkanälen eine ständige Depolarisation der Zelle ausgelöst. Die Spannungsabhängigen Natriumkanäle können nicht vom inaktivierten Zustand in den aktivierbaren Zustand wechseln somit entsteht kein neues Aktionspotenzial. Die Reizweiterleitung einer Nervenzelle ist durch den Depolarisationsblock gehemmt. In höheren Pflanzen steuern bestimmte Kalium-Kanäle die Volumenregulation der Stützzellen.

Jede Zelle hat Kalium-Kanäle. Je mehr verschiedene Kalium-Kanal-Populationen sich in einer Zelle befinden, desto schwieriger ist es herauszufinden, welchen einzelnen Bestandteil der Kaliumleitfähigkeit sie ausmachen. Elektrophysiologisch ist es möglich, an bestimmten Merkmalen, wie zum Beispiel der Strom-Spannungskurve in der *Voltage-Clamp*, eine Kanalpopulation zu erkennen. Bei einigen Kanälen ist es ebenso möglich, anhand von Einzelkanalableitungen deren Leitfähigkeiten sowie Offen- und Geschlossen-Zeiten zu bestimmen und dann eine genaue Zuordnung zu treffen. Zudem wird die Methode der mRNA-Amplifizierung der Zielzellen genutzt, um die Genexpression bestimmter Kalium-Kanal-Gene nachzuweisen. Hier wird die mRNA aus den Zellen gewonnen, mit der reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und durch Polymerase Chain reaction (PCR) mit spezifischen Primern amplifiziert. Gemessenen Kanälen können bestimmte Gene zugeordnet werden.



**Abbildung 1-3**

Darstellung eines Kalium-Kanals aufgebaut aus 4  $\alpha$ -Untereinheiten und 4  $\beta$ -Untereinheiten.

Bei der Klonierung der Kalium-Kanäle war die Entdeckung des Selektivitätsfilters ein wichtiges Hilfsmittel. Diese Region der Kalium-Kanäle ist hoch konserviert und zeigt im P-Loop folgende Aminosäuresequenz –TXXTXGYGD– (thr-X-X-thr-X-gly-tyr-gly-glu). Diese Sequenz wird auch „Signature sequence“ genannt (Heginbotham *et al.*, 1992). Aufgrund der Entdeckung dieses Motivs konnten in einigen Lebewesen die Anzahl der Kalium-Kanalgene genau bestimmt werden. So verfügt *Caenorhabditis elegans* über 76 Kalium-Kanalgene (Bargmann, 1998), *Drosophila melanogaster* über

27 Kalium-Kanalgene (Littleton & Ganetzky, 2000) und Säugetiere über 80 Kalium-Kanalgene (Patel & Lazdunski, 2004). Die Architektur der Kalium-Kanäle ist sehr unterschiedlich. Sie zeigt sich in ihren Untereinheiten. Es gibt Untereinheiten mit 2 Transmembrandomänen über 6 und 7 Transmembrandomänen und einer Porenschleife, bis zu 4 und 8 Transmembrandomänen mit 2 Porenschleifen (Abbildung: 1-3). Die 8 Transmembrandomänen konnten bis jetzt nur in Hefe gefunden werden. Um einen funktionellen Kanal zu erhalten, braucht es 4 Poren-Schleifen. Daraus ergibt sich, dass aus 2, 6 und 7 Transmembrandomänen ein Tetramer zur Bildung eines Kanals notwendig ist, während bei 4 und 8 Transmembrandomänen jeweils zwei Untereinheiten reichen. Über die einfachste Struktur verfügt der 1998 kristallisierte bakterielle KcsA Kanal (Doyle *et al.*, 1998).

#### 1.4.2 $\beta$ -Untereinheiten

Zusätzlich zu der einfachen Grundstruktur bis zur Bildung einer Pore aus 4 Poren-Loops gibt es für einige Kalium-Kanäle  $\beta$ -Untereinheiten, die einen starken Einfluß auf die Ionenkanäle haben. Bei den Einwärtsgleichrichtern der Kir-Familie dem Kir 6.2 wird der Kanal sensitiv für die intrazelluläre ATP-Konzentration (offen bei 15-100  $\mu$ M ATP), wenn er ein Oktamer aus 4 Kanaluntereinheiten und 4 Sulfonyelurearezeptoren SUR2A (Herz) oder SUR1 (Pankreas) bildet. Bei den großen kalziumabhängigen Kalium-Kanälen werden die Sensitivität für das Kalzium, Aktivierungs- und Inaktivierungs Kinetiken, pharmakologische Charakterisierungen und Spannungsabhängigkeit von den verschiedenen  $\beta$ -Untereinheit bestimmt, 4  $\beta$ -Untereinheiten sind bekannt.

Tabelle 1-3 Eigenschaften und Modelierung der  $\beta$ -Untereinheiten des BK

	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\beta_4$
<b>Vorkommen</b>	Glatter Muskulatur, Makrophagen	Herzmuskel, Niere, Hippocampus, Ovarien	Testis, Plazenta, Pankreas, Leber	Gehirn, zentrales Nervensystem
<b>Einfluß auf den BK- Kanal</b>	Erhöhung der Kalzium- und Spannungssensitivität. Kanal wird bei negativeren Potenzialen geöffnet.	Erhöhung der Kalziumsensitivität. Kanal inaktiviert schneller. Kanal wird von niedrigeren Potenzialen geöffnet.	Schnellere Aktivierung des Kanals in Abhängigkeit vom Subtyp (a-d).	Verlangsamung der Aktivierung, Verschiebung der Aktivierungskurve in Abhängigkeit vom $Ca^{2+}$ .
<b>Pharmakologie</b>	Erhöhung der ChTX-Sensitivität, Verringerung der IbTX-Sensitivität	Verringerung der ChTX-Sensitivität		Kein Block durch ChTX und IbTX im nM Bereich
<b>Literatur</b>	(McManus <i>et al.</i> , 1995; Dworetzky <i>et al.</i> , 1996; Tseng-Crank <i>et al.</i> , 1996; Wallner <i>et al.</i> , 1996; Nimigean & Magleby, 1999; Valverde <i>et al.</i> , 1999)	(Wallner <i>et al.</i> , 1999; Xia <i>et al.</i> , 1999; Brenner <i>et al.</i> , 2000; Uebele <i>et al.</i> , 2000; Orio <i>et al.</i> , 2002)	(Behrens <i>et al.</i> , 2000; Brenner <i>et al.</i> , 2000; Uebele <i>et al.</i> , 2000)	(Tseng-Crank <i>et al.</i> , 1996; Wanner <i>et al.</i> , 1999; Behrens <i>et al.</i> , 2000; Brenner <i>et al.</i> , 2000; Meera <i>et al.</i> , 2000)

Des weiteren hat der Kalium-Kanal KvLQT die  $\beta$ -Untereinheit MinK, der HERG-Kanal die  $\beta$ -Untereinheit MiRP, Kv 4.3 die  $\beta$ -Untereinheit KChIP und der Kv 1.2 die  $\beta$ -Untereinheit KChAP. Alle diese  $\beta$ -Untereinheiten verändern die Funktionalität der  $\alpha$ -Untereinheiten, bis auf KChAP, bei der noch keine biophysikalische Modulation erkennbar ist. Für die KChAP  $\beta$ -Untereinheit konnte die Wirkung als Chaperon (intrazelluläre Transport und Faltungsprotein) nachgewiesen werden (Pourrier *et al.*, 2003).



### 1.4.3 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Die Diversität in der Struktur zeigt sich auch in der Funktionalität der Kalium-Kanäle.

Die Kanäle mit 6 Transmembrandomänen sind alle, bis auf die kalziumabhängigen Kalium-Kanäle mit kleiner und mittlerer Leitfähigkeit, spannungsabhängig. Sie unterteilen sich in die Gruppe der *fast delayed rectifiers* und die *slow delayed rectifiers*.

*Fast delayed rectifiers* gehören zu den Kanälen, die für eine schnelle Repolarisierung der Aktionspotenziale z.B. im auditorischen System verantwortlich sind. In diesen Zellen kommt der größte Teil der Kaliumleitfähigkeit von den schnell aktivierenden, verzögernd auswärtsrichtenden Kalium-Kanälen der **Kv** Klasse, deren Strom als  $I_K$  bezeichnet wird. Die offizielle Nomenklatur für die Vertebraten Kv ist Kv x.x was die zeitliche Rangfolge der Entdeckung in den Unterklassen wiedergibt (Chandy, 1991). Zum Beispiel ist Kv1.1 der erste klonierte Säuger Kalium-Kanal.

Der Kalium-Kanal im auditorischen System ist der Kv3.1., er ermöglicht hier die schnellste Folge von Aktionspotenzialen im menschlichen Körper (Gan & Kaczmarek, 1998). Auch unmyelinisierte Axone, Motoneurone und die weiße Muskulatur in Vertebraten erzeugen mit Hilfe der Kv schnelle Aktionspotenziale.

Die *Slow delayed rectifiers* erfüllen ihre Aufgabe bei der Repolarisation des Aktionspotenzials im Herzen. Im Gegensatz zu den *fast delayed rectifieres* aktiviert der Strom der *slow delayed rectifiers* langsam. Im Menschen sind die HERG und die KCNQ für diesen Strom verantwortlich. Der  $I_{Ks}$  Strom wird durch den KCNQ1 Kanal mit seinen akzessorischen MinK Untereinheiten getragen, der  $I_{Kr}$  wird durch die HERG (human related ether a-go-go) und dessen akzessorischen Untereinheit MiRP1 getragen (Sanguinetti & Jurkiewicz, 1990). Die  $\alpha$ -Untereinheiten verfügen jeweils über 6 Transmembrandomänen und die  $\beta$ -Untereinheiten bestehen aus nur einer Transmembrandomäne. Werden diese Ströme blockiert, so kommt es zu dem medizinisch relevanten Long QT-Syndrom, das sich aus der Verlängerung des Aktionspotenzials ergibt (Sanguinetti & Spector, 1997; Abbott *et al.*, 1999)

In Neuronen sind die *slow delayed rectifiers* verantwortlich für eine ständige Kontrolle des Kaliumausstroms aus der Zelle. Sie sind partiell schon beim Ruhemembranpotenzial aktiv und inaktivieren nicht, so dass eine Schließung zur Depolarisation der Nervenzelle

führt. Eine weitere Öffnung dieser Kanäle senkt das Membranruhepotenzial und führt zur Verminderung der Erregbarkeit (Charlier *et al.*, 1998).

#### 1.4.4 Kalziumabhängige Kaliumkanäle

Eine weitere Klasse der Kalium-Kanäle sind die kalziumabhängigen Kalium-Kanäle. Sie wurden das erste Mal von G. Gardos (Gardos, 1958) in Erythrozyten, als Kalzium induzierte Kaliumleitfähigkeit entdeckt. Der momentane Stand des Wissens über K(Ca)-Kanäle begründet sich aus der Patch-Clamp-Technik (Sah, 1996; Vergara *et al.*, 1998). Sie zeigen drei Grundtypen von Kanälen einen spannungsabhängigen Kanal mit hoher Leitfähigkeit (BK), einen spannungsunabhängigen Kanal mit mittlerer (IK) und drei spannungsunabhängige Kanälen mit kleiner (SK) Leitfähigkeit. Aus der Pharmakologie haben besonders Peptidgifte wie Apamin von der Biene (*Apis mellifica*), Iberiotoxin (*Buthus tamulus*) und Charybdotoxin (*Leiurus quinquestriatus*) vom Skorpion sich als hilfreich erwiesen, um die Komponenten des  $IK_{(Ca)}$  zu unterscheiden (Garcia *et al.*, 1997)

**Tabelle 1-4 Drei Typen von K(Ca) Kanälen bei Vertebraten**

Eigenschaften	Kanaltyp		
	BK	IK	SK
<b>Kalzium Konzentration zur Aktivierung</b>	1-10 $\mu$ M	50-900 nM	50-900 nM
<b>Spannungsabhängigkeit</b>	ja	nein	nein
<b>Einzelkanal-Leitfähigkeit</b>	100-250 pS	20-80 pS	4-20 pS
<b>Blocker</b>	Charybdotoxin (nM) Iberiotoxin (nM) TEA (< 1 mM)	$\alpha$ -KTx (nM) Clotrimazol (nM)	Apamin (nM) Scyllatoxin (nM) Curare ( $\mu$ M)
<b>Mammalia Gene</b>	Slo1	IK1 / SK4	SK 1,2,3

Der BK Kanal hat als einziger Kalium-Kanal Untereinheiten mit sieben Transmembrandomänen. Sein Aufbau entspricht dem eines klassischen spannungsabhängigen Kalium-Kanals, bis auf das  $S_0$ -Segment, das dem  $S_1$ -Segment vorgelagert ist. Damit hat der BK seinen Amino-Terminus außerhalb der Zelle. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass das  $S_0$ -Segment nicht die Membran

durchspannt, sondern im Zytosol bleibt. Dann bliebe der Aminoterminus natürlich auch im Zytosol.

Die kalziumabhängigen Kalium-Kanäle dienen vielen verschiedenen Zwecken. In den Neuronen sind die BK für die schnelle Nachhyperpolarisation *Afterhyperpolarisation* (AHP) und die SK für die langsame AHP verantwortlich. Wenn das intrazelluläre Kalzium steigt, öffnen diese Kanäle und unterstützen somit die Neuronen mit ihrem Kaliumausstrom bei der Repolarisation (Barrett & Barret, 1976; Yarom *et al.*, 1985). In Immunzellen stehen sie im Wechselspiel mit den spannungsunabhängigen Kalzium-Kanälen. Die BK und SK sorgen dafür, dass das Membranpotenzial in der Nähe des Kaliumgleichgewichtspotenzials bleibt, so dass die treibende Kraft für Kalzium hoch bleibt (-120 mV).

#### 1.4.5 Einwärtsgleichrichter

Eine wichtige und große Gruppe der Kalium-Kanalfamilie sind die einwärtsgleichrichtenden Kanäle. Sie beinhaltet 16 Mitglieder, wobei jeder funktionelle Kanal aus 4  $\alpha$ -Untereinheiten mit jeweils 2 Transmembrandomänen aufgebaut ist. Trotz ihres gleichen Aufbaus sind die Einwärtsgleichrichter in starke Einwärtsgleichrichter (Kir2.x, Kir3.x, und Kir4.x) und schwache Einwärtsgleichrichter (Kir1.x, Kir6.x und Kir7.x) unterteilbar. Zwei herausragende Mitglieder der Kir-Gruppe sind der  $K_{ATP}$  Kanal. Er besteht aus den oben genannten Kir6.1 oder Kir6.2 mit jeweils einer assoziierten SUR  $\beta$ -Untereinheit. Die anderen herausragenden Kanäle der Kir-Gruppe sind der Kir3.1 und Kir3.4, die direkt mit dem muscarinischen Acetylcholinrezeptor über ein  $G_T$ -Protein als Vermittler interagieren. Dieser Strom wird in der Literatur als  $K_{ACh}$  bezeichnet. Die Einwärtsgleichrichter wurden das erste Mal aus Makrophagen und dem schnellen Skelettmuskel kloniert (Kubo *et al.*, 1993). Ihre Aufgabe besteht in der Einstellung des Ruhemembranpotenzials sowie der Generierung von Auswärtsströmen bei Potenzialen, die in positiver Richtung vom Kalium Gleichgewichtspotenzial gelegen sind. Diese Auswärtsströme werden durch den spannungsabhängigen Polyaminblock (Spermin und Spermidin) (Lopatin *et al.*, 1994) bei starken Einwärtsgleichrichtern und Magnesium (Vandenberg, 1987) bei schwachen Einwärtsgleichrichtern geblockt. In der

Ganz-Zell-Messung kann man beim Einwärtsgleichrichter einen charakteristische Auswärtsstrom erkennen der aus diesem intrinsischen Block entsteht. Dieser Auswärtsstrom verschwindet bei höheren positiven Potentialen. Physiologisch ist der Auswärtsstrom der einzige relevante Kaliumstrom dieses Kanals. Er findet seine Bedeutung z.B. in der Repolarisierung des Herzaktionspotenzials. Seine Abwesenheit in der Plateauphase des Herzaktionspotenzials bei hohen positiven Potentialen (Archer & Rusch, 2001), bei der Spannungsgeneration im elektrische Organ des Zitteraals (*Electrophorus electricus*) und der lang anhaltenden Depolarisation nach der Befruchtung von Eiern (Anneliden, Anura, Bufonidae, Drosophila, Maus ....) (Hagiwara & Jaffe, 1979).

#### 1.4.6 K2P

Die letzte zu nennende Kalium-Kanal-Familie sind die K2P Kanäle. Sie besteht aus 14 Mitgliedern bei Säugetieren, 50 bei *Caenorhabditis elegans* und 11 bei Drosophila, die für die  $\alpha$ -Untereinheiten der Kanäle kodieren (Wang *et al.*, 1999). Bei den Tandemporenionenkanälen besteht ein funktioneller Kanal aus zwei Untereinheiten, die jeweils über zwei Porendomänen verfügen. Sie werden weder durch 4-AP (4-Aminopyridin) noch durch TEA (Tetraethylammonium) blockiert. Der einzige Blocker für die K2P-kanäle des Typs TASK-1 ist Methanandamid ( $IC_{50} = 700$  nM) Momentan sind keine anderen spezifische Blocker für Tandemporenionenkanäle bekannt (Maingret *et al.*, 2001). Alle K2P-Kanäle, bis auf den humanen TWIK-2, TREK-1 und TALK-2 reagieren mit Schließung auf extrazelluläre Ansäuerung. Kontakt mit Halothan führt zur Öffnung von TREK-1, TREK-2, TASK-1 und TASK-2.

Die K2P-Kanäle zeigen sich durch cAMP, PMA,  $PIP_2$ , DAG, PKA und PKC reguliert. Diese Eigenschaften sowie die Fähigkeit, auf die Zusammensetzung des extrazellulären Milieus zu reagieren, lassen einen hohen regulatorischen Einfluß auf die ganze Zelle vermuten (Chemin *et al.*, 2003).

Kaliumkanäle alleine ist es möglich als Sensoren der Zelle für das extrazelluläre Milieu zu dienen. Sie zeigen Veränderungen in ihren Eigenschaften

(Öffnungswahrscheinlichkeit, Offenzeit und Leitfähigkeit) auf bestimmte Moleküle. Sie sind zum großen Teil abhängig von zellinterner Regulation und können so das Membranpotenzial mitbestimmen. Es sind zur Zeit keine Kaliumkanäle bekannt, die auf extrazelluläres ATP reagieren.

ATP wird von bestimmten anderen Rezeptoren erkannt. Sie haben den Namen Purinrezeptoren.

## 1.5 Purinrezeptoren

ATP liegt in jeder Zelle in einer Konzentration von ca. 5 mM vor. ATP ist ein wichtiger Botenstoff innerhalb des Körpers. Rezeptoren für Purine wurden früh in der Evolution entwickelt und rücken in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses.

Lange Zeit kannte man nur Rezeptoren für Adenosin (Ralevic & Burnstock, 1998); Adenosin erfüllt aber nicht alle Kriterien, um als Transmitter bezeichnet zu werden (keine Speicherung in Vesikeln, keine von  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Ausschüttung). Es wird daher nur als Neuromodulator bezeichnet. Das auf Adenosin-Rezeptoren wirkende Adenosin dürfte in Wirklichkeit nur das Abbauprodukt von Adenosin-Nukleotiden und letztere die eigentlichen Transmitter sein. Als man die Bedeutung der Adenosin-Nukleotide erkannte, führte man den Begriff Purinrezeptoren ein und zählte dazu Rezeptoren für Adenosin ( $\text{P}_1$ ) und Rezeptoren für die Adenosin-Nukleotide ATP und ADP ( $\text{P}_2$ ). Es stellte sich heraus, dass an manchen dieser Rezeptoren Uridin-Nukleotide besser wirken als Adenosin-Nukleotide. Uracil gehört nicht zu den Purinen ist aber, wie oben beschrieben, in die Nomenklatur mit aufgenommen worden. Adenosin-Rezeptoren werden eingeteilt in  $\text{A}_1$  und  $\text{A}_2$  (Die Bezeichnung  $\text{P}_1$  hat sich nicht durchgesetzt).  $\text{A}_1$ -Rezeptoren vermitteln hemmende Wirkungen (mit G-Protein gekoppelt,  $\text{G}_i$ ),  $\text{A}_2$ -Rezeptoren stimulierende Wirkungen ( $\text{G}_s$ ).

Nukleotid ( $\text{P}_2$ )-Rezeptoren werden eingeteilt in ionotrope ( $\text{P}_2\text{X}$ ) und metabotrope Rezeptoren ( $\text{P}_2\text{Y}$ ) (Abbraccio & Burnstock, 1994). In den letzten Jahren wurden

sieben P2X- und 12 P2Y-Rezeptoren kloniert. Nur sechs dieser P2Y-Rezeptoren scheinen jedoch wirklich Nukleotid-Rezeptoren zu sein.

Nukleotid-Rezeptoren wurden in allen Tierarten bis zur Amöbe gefunden. Möglicherweise handelt es sich um die phylogenetisch ältesten aller Botenstoffe. Bisher wurden zur Erforschung dieser Rezeptoren nur Nukleotide und einfache Nukleotid-Analoga eingesetzt. Mit der Hilfe von Substanzen, die Ectonukleasen blockieren, sowie nicht hydrolysierbaren Analoga kann nun eine genauere Charakterisierung vorgenommen werden.

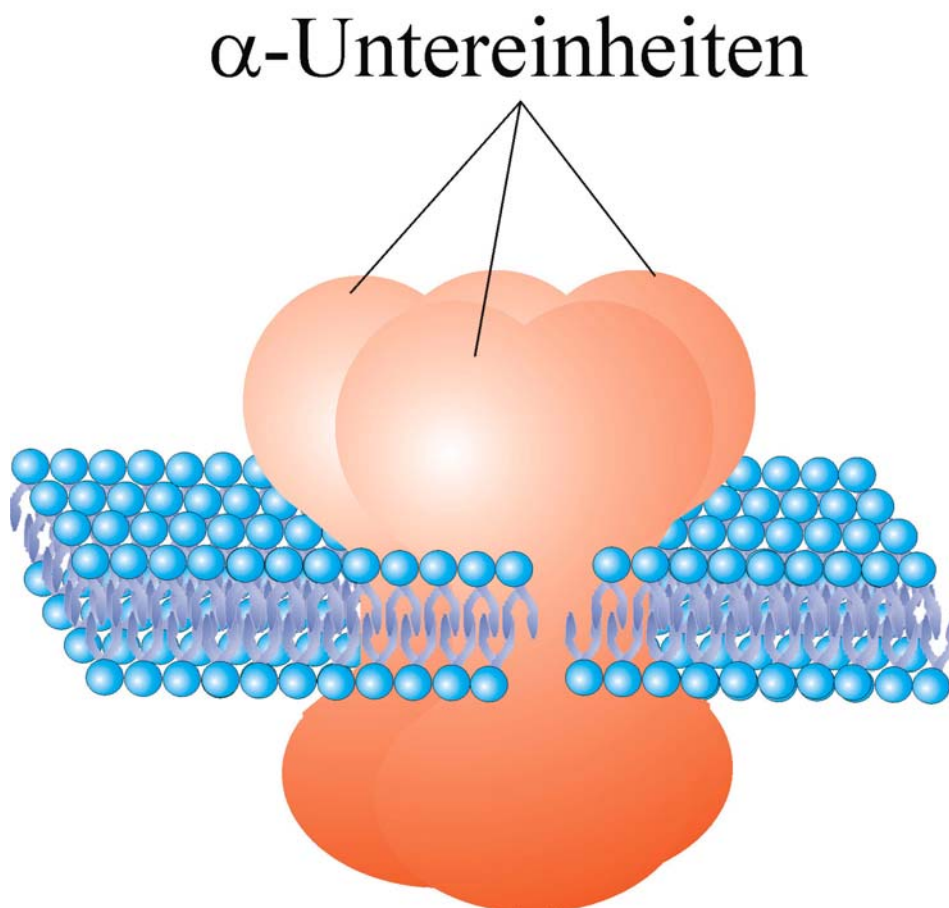
Die nächsten Abschnitte sind so eingeteilt, dass auf eine kurze Übersicht über den Rezeptortyp eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Mitglieder folgt.

### 1.5.1 P2X-Rezeptoren

P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte unspezifische Kationen-Kanäle, die dadurch schnell (in 10 ms) selektiv Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ) (North & Barnard, 1997) leiten. Sie sind aufgrund ihrer schnellen Schaltzeiten sehr verbreitet in den erregbaren Zellen, (glatter Muskel, Neuronen und Gliazellen) und haben einen großen Einfluß bei der schnellen exzitatorischen Neurotransmission mit ATP im peripheren und zentralen Nervensystem. Alle sieben P2X-Rezeptoren bilden aus homomeren Untereinheiten funktionelle Proteine, die in Oozyten und in Mammaliazellen exprimiert und charakterisiert werden konnten. Eine Übersicht über ihre pharmakologische Eigenschaften zeigt Tabelle 1-5.

Die Struktur der P2X-Rezeptoren ist aus den Vorhersagen der Aminosäuresequenzen der klonierten P2X-Untereinheit erstellt worden. Eine Untereinheit kann aus 379 bis 472 Aminosäuren bestehen und besitzt zwei Transmembrandomänen und eine Porendomäne. Die Gesamtstruktur kommt der Amilorid-sensitiven Natrium-Kanäle am nächsten. Der putative extrazelluläre Loop der klonierten P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren hat 10 konservierte Cysteinreste, 14 konservierte Glycinereste und 2 bis 6 potentielle stickstoffgebundene Glykosilierungsstellen. Vieles deutet daraufhin, dass die

Disulfidbrückenbindungen für die ATP-Bindungsstelle und deren Struktur extrem wichtig sind. Die höchste Homologie findet man in der extrazellulären Schleife, während die Transmembrandomänen sich variabler zeigen. Die Quartärstruktur der klassischen ligandenbindenden Ionenkanäle wie z.B. die des nikotinischen Acetylcholinrezeptorkanals besteht im Allgemeinen aus einem heteromeren Komplex aus strukturell verwandten Untereinheiten. Für P2X-Rezeptoren wird angenommen, dass sie in der Membran einen ähnlichen Komplex bilden. Ihre Stöchiometrie ist bis jetzt unbekannt. Sie könnte aber drei oder mehr Untereinheiten umfassen. Die Ergebnisse der SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese dieser Molekularmassen unter nicht denaturierenden Bedingungen zeigen beide möglichen Stöchiometrien (Nicke *et al.*, 1998).



**Abbildung 1-4**

Die Abbildung zeigt einen P2X nicht selektiven Ionenkanal. P2X-Rezeptoren sind aus 3 oder 4  $\alpha$ -Untereinheiten aufgebaut. In dieser Abbildung ist der Ionenkanal aus 3  $\alpha$ -Untereinheiten zusammengesetzt.  $\beta$ -Untereinheiten sind noch nicht bekannt.

### P2X<sub>1</sub>

Der P2X<sub>1</sub>-Rezeptor wurde als erstes aus der Vas deferens der Ratten kloniert. Der rekombinante Rezeptor wird durch 2MeSATP  $\rightarrow$   $\alpha,\beta$ -meATP  $\rightarrow$  ADP aktiviert. Die daraus resultierenden Einwärtsströme konnten durch Suramin (Valera *et al.*, 1994) geblockt werden. Der Rezeptor desensitiviert sehr schnell in einem Bereich von hunderten von Millisekunden. P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren konnten auf mRNA Ebene in der Blase, glatter Muskulatur der kleinen Arterien und Arteriolen sowie dem Ductus deferens und in kleineren Mengen in der Lunge und der Milz gefunden werden. Der P2X<sub>1</sub>-Rezeptor ist die am stärksten verbreitete P2X Untereinheit in der glatten Muskulatur. Die hohe Ähnlichkeit zwischen den pharmakologischen Profilen und der Desensitivierung von rekombinanten P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren lassen den Schluß zu, dass sich in der glatten Muskulatur hauptsächlich P2X-Rezeptoren aus P2X<sub>1</sub> Homomeren befinden. Es gibt hohe Übereinstimmungen in der Pharmakologie zwischen den P2X-Rezeptoren in Megakaryozyten und Thrombozyten zu den P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich in Blut- und Immunzellen auch P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren befinden könnten.

### P2X<sub>2</sub>

P2X<sub>2</sub>-Rezeptoren wurden das erste Mal aus den Pheochromocytom PC12 Zellen der Ratte kloniert (Brake *et al.*, 1994). Der rekombinante P2X<sub>2</sub>-Rezeptor wird von ATP, ATP $\gamma$ S und 2MeSATP gleich stark aktiviert und zeigt dabei einen nicht selektiven Kationen-Strom.  $\alpha,\beta$ -meATP und  $\beta,\gamma$ -meATP zeigen keine Wirkung, weder als Agonist noch als Antagonist. Es ist nur eine leichte Desensitivierung erkennbar. Zusätzlich unterscheidet sich der P2X<sub>2</sub>-Rezeptor von dem P2X<sub>1</sub>-Rezeptor dadurch, dass er eine nicht so starke Kalzium Leitfähigkeit besitzt. P2X<sub>2</sub>-Rezeptoren mRNA konnte in Blase, Gehirn, Rückenmark, Cervicalganglien, Nebennierenmark, im Hoden und dem Ductus



deferens detektiert werden. Im Skelettmuskel, Herz, Lunge, Leber, Niere und Milz konnte der P2X<sub>2</sub>-Rezeptor nicht gefunden werden.

### P2X<sub>3</sub>

P2X<sub>3</sub>-Rezeptoren wurden aus der hinteren Spinalnervenzwurzel der Ratte kloniert (Chen *et al.*, 1994). Sie zeigen nur 43% Identität auf Ebene der Aminosäuresequenz mit P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren und 47% Identität mit P2X<sub>2</sub>-Rezeptoren. P2X<sub>3</sub>-Rezeptoren werden aktiviert durch 2MeATP >> ATP > α,β-meATP und desensitivieren in weniger als 100 ms. P2X<sub>3</sub>-Rezeptoren im Menschen konnten nur im Rückenmark und im Herzen gefunden werden.

### P2X<sub>4</sub>

P2X<sub>4</sub>-Rezeptoren wurden zuerst aus dem Hippocampus von Ratten kloniert (Bo *et al.*, 1995). Analysen der mRNA ergaben ein Vorkommen von P2X<sub>4</sub>-Rezeptoren im Gehirn, Rückenmark, sensorischen Ganglien, Lunge, dem Bronchialepithel, Thymus, Blase, Hoden und Ductus deferens. Im Gehirn und im Rückenmark ist die Verteilung von P2X<sub>4</sub>-Rezeptoren gleich der Verteilung von P2X<sub>6</sub>-Rezeptoren. Der rekombinante P2X<sub>4</sub>-Rezeptor wird aktiviert durch 2MeSATP, aber α,β-meATP bewirkt keine Aktivierung. Suramin hat keine Wirkung auf den P2X<sub>4</sub>-Rezeptor. Es konnte gezeigt werden, dass P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren und P2X<sub>2</sub>-Rezeptoren über einen Lysin-Rest verfügen, den P2X<sub>4</sub>-Rezeptoren nicht besitzen. Dieser Lysin-Rest ist für die Antagonistenbindung wichtig, Agonist beeinflusst er jedoch nicht. Der P2X<sub>4</sub>-Rezeptor desensitiviert langsam, dabei ist der humane P2X<sub>4</sub>-Rezeptor jedoch in seiner Desensitivierung viel schneller als der Ratten P2X<sub>4</sub>-Rezeptor.

### P2X<sub>5</sub>

Der erste P2X<sub>5</sub>-Rezeptor wurde aus dem Ganglium coeliacum der Ratte kloniert (Collo *et al.*, 1996). Sie kommen in Motoneuronen des ventralen Horns und im cervicalen Rückenmark vor, sowie in Neuronen im Trigeminal- und Rückenwurzelganglion. Das Gehirn scheint keine P2X<sub>5</sub>-Rezeptoren zu exprimieren. Schnelle Einwärtsströme werden durch ATP > 2MeSATP > ADP aktiviert, während  $\alpha,\beta$ -meATP als Agonist ineffektiv ist. Der P2X<sub>5</sub>-Rezeptor desensitiviert nicht vollkommen und wird durch Suramin gehemmt.

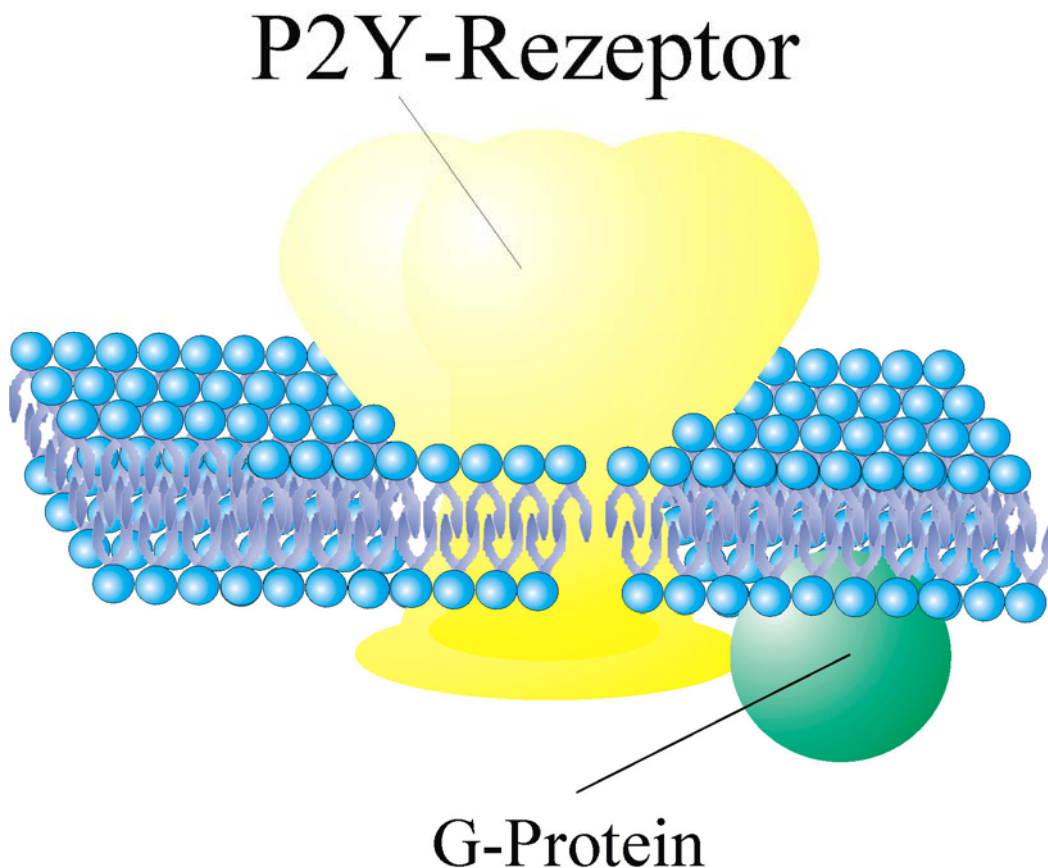
### P2X<sub>6</sub>

P2X<sub>6</sub>-Rezeptoren wurde aus einer Ratten Ganglion cervicale superius cDNA-Bibliothek isoliert (Collo *et al.*, 1996). P2X<sub>6</sub>-Rezeptoren kommen überall im Gehirn und dort besonders in den Purkinjenzellen vor. Schnelle Einwärtsströme werden von ATP > 2MeSATP > ADP, aber nicht von  $\alpha,\beta$ -meATP aktiviert. Suramin hat nur teilweise blockierende Effekte auf die P2X<sub>6</sub>-Rezeptoren.

### P2X<sub>7</sub>

P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren sind zuerst aus Makrophagen und dem Gehirn kloniert worden (Surprenant *et al.*, 1996). P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren sind funktionell in allen Zellen vorhanden, die einen hämatopoetischen Ursprung haben. Zusätzlich konnten sie noch in Mastzellen nachgewiesen werden. P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren haben den gleichen Aufbau wie andere P2X-Rezeptoren bis auf einen längeren C-Terminus als bei anderen P2X-Rezeptoren. Der rekombinante Rezeptor wird durch 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl ATP (BzATP) >>ATP >> 2MeSATP > ATP $\gamma$ S > ADP aktiviert. P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren desensitivieren langsam, obwohl beim human P2X<sub>7</sub>-Rezeptor beobachtet werden kann, dass nach 10–20 sec

diskontinuierlicher Agonisten Applikation der Strom auf Grundlinienniveau zurück geht. In Lösungen, in denen die Konzentration der divalenten Kationen stark gesenkt sind, kann der homologe P2X<sub>7</sub>-Klon Poren bilden, die Moleküle bis zur Größe von 900 Dalton durchlassen. Dieser Effekt konnte auch in Lymphozyten nachgewiesen werden. Der dortige Ausschluß für Moleküle lag bei 200-300 Dalton. Werden beim rekombinaten P2X<sub>7</sub>-Rezeptor carboxyterminal 177 Aminosäuren trunkiert, so ist die Porenbildung für große Moleküle nicht mehr möglich. Wie bei anderen P2X-Rezeptoren wird der P2X<sub>7</sub>-Rezeptor auch durch divalente Kationen gehemmt. Aktivierung der P2X<sub>7</sub>-Rezeptoren in humanen Makrophagen zeigte, dass die Freisetzung von IL-1 $\beta$ , einem proinflammatorischen Zytokin gesteigert werden konnte (Griffiths *et al.*, 1995).



**Abbildung 1-5**

Die Abbildung zeigt einen P2Y-Rezeptor. An den Rezeptor bindet das „Purin“ und erzeugt eine Aktivierung des G-Proteins. Mit diesem Mechanismus werden extrazelluläre Informationen in die Zelle übersetzt.

### 1.5.2 P2Y-Rezeptoren

P2Y-Rezeptoren sind Purin und Pyrimidin Rezeptoren, die mit einem G-Protein koppeln. Diese Rezeptorgruppe beinhaltet die klonierten Mammaliarezeptoren P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> und P2Y<sub>11</sub> und den P2Y<sub>ADP</sub> (der bis jetzt noch nicht kloniert wurde) sowie den endogenen P2Y<sub>Endogen</sub>, der einige Ähnlichkeit mit den klonierten P2Y<sub>4</sub> und P2Y<sub>6</sub> zeigt. Die putativen Rezeptoren P2Y<sub>5</sub>, P2Y<sub>7</sub>, P2Y<sub>9</sub> und P2Y<sub>10</sub>-Rezeptoren sind nicht in die Definition mit einbezogen worden, da funktionelle Tests zeigten, dass es sich bei diesen Proteinen nicht um P2Y-Rezeptoren handelt. Rezeptoren für Pyrimidin, die speziell von Uridin aber nicht von Adenin aktiviert werden, wurden das erste Mal von Seifert postuliert (Seifert & Schultz, 1989). Diese Hypothese konnte bestätigt werden bei der Klonierung von P2Y<sub>4</sub> und P2Y<sub>6</sub>, die UDP und UTP bevorzugen. Die Klonierung des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor konnte zeigen, dass es auch Rezeptoren gibt, die sich sowohl von ATP als auch von UTP aktivieren lassen.

Die Struktur der P2Y-Rezeptoren besteht aus 308 bis 377 Aminosäuren und bilden Proteine der Größe von 41 bis 53 kDa nach der Glykosylierung. Die sieben Transmembrandomänen Tertiärstruktur der P2Y-Rezeptoren ist typisch für die G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Ein Model des P2Y-Rezeptors, basierend auf der Primärsequenz von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren und dem als G-Protein gekoppelten Rezeptor und dem strukturhomologen Protein Rhodopsin, zeigt positiv geladene Aminosäurereste in den Transmembranregionen 3, 6 und 7, die bei der Ligandenbindung und der elektrostatischen Interaktion mit dem Phosphat des ATP's interagieren könnten (Van Rhee *et al.*, 1995). Viele dieser Aminosäuren kommen auch in anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren vor. Mutationen der positiven Ladungen in neutrale Ladungen in der 6 und 7 Transmembranregion führten beim P2Y<sub>2</sub> zum Rückgang der ATP und UTP Affinität um das 100- bis 850 fache. Dies könnte auf die Bedeutung dieser Aminosäuren hindeuten (Erb *et al.*, 1995). Andererseits liegen beim P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor die Transmembrandomänen 3 und 7 auf der exofacialen (Innenseite der Membran) Seite der Rezeptoren. Die meisten P2Y-Rezeptoren koppeln über ein G-Protein, um eine PLC zu aktivieren, die wiederum über IP<sub>3</sub> intrazelluläres Kalzium freisetzt. Die Koppelung von

einigen P2Y-Rezeptoren zur Aktivierung der Adenylatzyklase ist beschrieben worden. Die Zeit bis zur Antwort der Zelle ist bei P2Y-Rezeptoren länger als bei P2X-Rezeptoren, da P2X ligandengesteuerte Ionenkanäle sind und P2Y-Rezeptoren ein „Second Messenger System“ bis zu einer ionalen-Antwort benötigen.

### P2Y<sub>1</sub>

P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren, werden durch ATP, ADP und andere Diadenosinpolyphosphate aktiviert, nicht aber durch UDP und UTP. Charakteristisch unterscheidet sich der P2Y<sub>1</sub> gegenüber allen anderen P2Y-Rezeptoren in seiner Aktivierung durch 2MeSATP, ADP, ADPβS, ADPβF. Die Aktivierungswertigkeit geht von 2MeSATP ≥ ATP >> ADP, wobei α,β-meATP, β,γ-meATP und UTP keine Wirkung zeigen. Suramin hemmt die Aktivierung durch ATP und 2MeSATP.

Der erste klonierte P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor wurde aus dem Gehirn von Hühnern gewonnen (Webb *et al.*, 1993). Die Aktivierung des rekombinaten P2Y<sub>1</sub> erhöht die intrazelluläre Kalziumkonzentration, der cAMP-Spiegel bleibt aber gleich (Simon *et al.*, 1995). Das G-Protein, dass mit dem P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor koppelt, konnte als G<sub>q</sub> (G<sub>11</sub>) identifiziert werden und ist insensitiv für Pertussis-Toxin und Cholera-Toxin. Der erste Signaltransduktionsweg geht über G<sub>q/11</sub> zur PLC, die DAG und IP<sub>3</sub> freisetzt. Diese wiederum können ein weites Wirkspektrum in der Zelle auslösen (PLC,PKC,MAPK...), das zuletzt auch auf Ionenkanäle wirken kann, wie z.B. Arachidonsäure (Wickman & Clapham, 1995). Beim zweiten Signaltransduktionsweg wird eine Hemmung der Adenylatzyklase (AC) vermutet. Dies wurde für P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in der Ratte beschrieben (Webb *et al.*, 1996a). Diese beiden Signalwege sind voneinander unabhängig. Die Aktivierung der PLC muß nicht mit einer Blockade der AC einher gehen. Es ist noch nicht aufgeklärt, ob diese Wirkung durch verschiedene G-Proteine oder durch Heterogenität der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren hervorgerufen wird.

P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren sind stark verbreitet und befinden sich im, Herz-Kreislaufsystem, in Neuronen und dem Immunsystem. Es konnte nachgewiesen werden, dass P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren eine Rolle beim Einstellen des vaskulären Tonus spielen. P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren

befinden sich im Endothel und vermitteln Vasodilatation durch Kalzium abhängige Produktion von NOS und Generierung von EDRF und EDHF. Dass ATP und ADP von Zellen des Endothels unter Scherstreß und Hypoxie ausgeschüttet werden sowie von Thrombozyten während der Aggregation, ist bekannt.

### P2Y<sub>2</sub>

P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren werden durch ATP und UTP gleich stark aktiviert. Sie reagieren nur schwach auf ADP, 2MeSATP und  $\alpha,\beta$ -meATP. Der erste Klon eines P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors wurde aus NG108-15 Neuroblastomzellen gewonnen (Lustig *et al.*, 1993). P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren koppeln über die beiden G-Proteine G<sub>i/o</sub> und G<sub>q/11</sub> und erzeugen den Zusammenbruch von Phospholipiden und Phosphoinositiden genauso wie die Freisetzung von Kalzium durch PLC $\beta$ . P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren, die mit G<sub>i</sub> koppeln, steuern die  $\beta\gamma$  Untereinheit des Proteins, die wiederum Phospholipase C- $\beta$ 2, IP<sub>3</sub> Freisetzung, Kalzium Mobilisation, PKC, PLA<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup> abhängige Kalium-Kanäle, EDRF und EDHF aktivieren. Der genaue Signaltransduktionsweg ist aber abhängig von der Zellart, in der der Rezeptor produziert wird. Über die Freisetzung von Kalzium durch ATP und UTP werden im Lungenepithel Kalzium abhängige Chlorid-Kanäle geöffnet (Clarke & Boucher, 1992), in Leberepithelzelllinien (Wolkoff *et al.*, 1995) und in der Salzdrüse von Vögeln (Martin & Shuttleworth, 1995). Die Aktivierung von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren stimuliert aber auch Ca<sup>2+</sup> abhängige Kalium-Kanäle in HTC-Zellen von einer Rattenleber Tumorzelllinie (Fitz & Sostman, 1994). UTP und ATP lösten in neurosekretorischen Zellen der Ratte die Öffnung eines nicht selektiven Kationen-Kanals aus (Hiruma & Bourque, 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren die Adenylatzyklase inhibieren. In NCB-20 Zellen wurde die cAMP Produktion durch ATP und UTP gehemmt. Dieser Effekt fiel mit einem Anstieg des intrazellulären Kalzium zusammen. Ein Pertussis-Toxin sensitives G-Protein stoppt die cAMP Akkumulation in der Zelle (Schulze-Lohoff *et al.*, 1995). P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren desensitivieren vollständig ( $t_{1/2} = 10$  min). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren mRNA sich bei der humanen Zelllinie HL-60 bei der Differenzierung zu Neutrophilen in hohe Mengen nachweisen lässt, bei der Differenzierung zu

Monozyten oder Makrophagen diese mRNA jedoch geringer wurde (Martin *et al.*, 1997).

UTP und ATP sind natürliche Liganden der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren und gleich stark in der Aktivierung. 2MeSATP und  $\alpha,\beta$ -meATP haben keine Wirkung auf die Rezeptoren, was die Charakterisierung der Rezeptoren einfach gestaltet. ATP $\gamma$ S und UTP $\gamma$ S sind beide Agonisten für die P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren, haben aber den Vorteil, dass sie sich nicht hydrolisieren lassen und damit gegen Ektonukleasen resistent sind (Lustig *et al.*, 1993). Suramin ist ein potenter Antagonist für P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren. P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren kommen fast überall im Körper vor.

**Tabelle 1-5 Pharmakologische Charakteristika von P2X-Rezeptoren**

P2X-Rezeptor	Desensitivierung	$\alpha,\beta$ -meATP sensitiv	Suramin sensitiv
P2X <sub>1</sub>	Schnell	Ja	Ja
P2X <sub>2</sub>	Langsam	-	Ja
P2X <sub>3</sub>	Schnell	Ja	Ja
P2X <sub>4</sub>	Langsam	-	-
P2X <sub>5</sub>	Langsam	-	Ja
P2X <sub>6</sub>	Langsam	-	-
P2X <sub>7</sub> (P <sub>2Z</sub> )	Langsam	-	Ja

**Tabelle 1-6 Pharmakologische Charakteristika von P2Y-Rezeptoren**

P2Y-Rezeptoren	Agonistensensitivität				
	2MeSATP	ATP	UTP	ADP	UDP
P2Y <sub>1</sub>	Ja	Ja	-	Ja	-
P2Y <sub>2</sub>	-	Ja	Ja	-	-
p2y3	-	-	Ja	Ja	Ja
P2Y <sub>4</sub>	-	Ja	Ja	-	-
P2Y <sub>6</sub>	-	-	-	-	Ja
P2Y <sub>11</sub>	Ja	Ja	-	-	-
P2Y <sub>ADP</sub>	-	-	-	Ja	-

Nothern Blot Analysen zeigen P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren in der Milz, dem Hoden, Niere, Leber, Lunge, Herz und Gehirn (Parr *et al.*, 1994). Zudem konnte mRNA nachgewiesen werden in Alveolar Typ II Zellen, Osteoblasten und Knochen (Bowler *et al.*, 1995). Pharmakologisch und funktionell wurden P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren in Astrozyten, verschiedenen Blutzellen, Chromaffinzellen, Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten, Gliazellen, Leberzellen, Keratinozyten, Herzmuskelzellen,  $\beta$ -Zellen (Pankreas) und Tumorzellen nachgewiesen. Im Kreislauf befinden sich P2Y<sub>2</sub>-

Rezeptoren meistens im Endothel und sorgen dort für die Produktion von Prostazyklin und NO, zwei starken Vasodilatoren. Bei den Zellen, die für das Immunsystem wichtig sind hat man P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren in Neutrophilen gefunden, wobei ATP die induzierte fMLP Superoxid Stimulation weiter steigert und Aggregation anregt (Kuroki *et al.*, 1989). P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren in HL-60 Zellen regen eine höhere Aktivität der NADPH-Oxidase an, während die HL-60 Zellen, die sich zu Neutrophilen differenzieren, Chemotaxis und Aktin-Polymerisation auf ATP Gabe aktivieren (Seifert *et al.*, 1989).

### p2y3

Über die p2y3-Rezeptoren ist bis jetzt wenig bekannt. Sie wurden zuerst aus Hühnerhirn kloniert und weisen eine Nukleotidselektivität mit abfallender Intensität von UDP > UTP > ADP > 2MeSATP > ATP auf (Webb *et al.*, 1996b). Für dieses Protein konnte im Menschen noch kein funktionelles Gegenstück gefunden werden.

### P2Y<sub>4</sub>

Der Uridin Nukleotid spezifische P2Y<sub>4</sub>-Rezeptor wurde zuerst aus der humanen Plazenta kloniert (Communi *et al.*, 1995). Der humane P2Y<sub>4</sub>-Rezeptor ist selektiver für UTP als für ATP und kann nicht durch Nukleotiddiphosphate aktiviert werden. ATP kann sowohl Antagonist wie auch Agonist sein. Er koppelt über zwei G-Proteine, dem G<sub>i</sub> am Anfang und dem G<sub>q/11</sub> später, in der Signaltransduktionskette. G<sub>q/11</sub> führt über die PLC zu einer Freisetzung von DAG und IP<sub>3</sub>. Das IP<sub>3</sub> wird innerhalb von Minuten wieder auf den Basiswert in der Zelle zurückgeführt, was eine Desensitivierung des Rezeptors anzeigen könnte. Der humane P2Y<sub>4</sub>-Rezeptor wird nicht durch Suramin geblockt. P2Y<sub>4</sub>-Rezeptoren sind im Menschen nur in der Plazenta und in der Lunge gefunden worden.

### P2Y<sub>6</sub>

Der P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor ist das erste Mal aus humaner Plazenta und aus der Milz kloniert worden (Communi *et al.*, 1996). Der Rezeptor wird am stärksten durch UDP weniger



durch UTP, ATP, ADP oder 2MeSATP aktiviert. Der P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor ist Pertussi-Toxin insensitiv, was den Signaltransduktionsweg über das G<sub>q/11</sub> einbezieht und dessen Aktivierung von der PLC und der Freisetzung von IP<sub>3</sub>. Interessanterweise ist die IP<sub>3</sub> Antwort auf den humanen Klon sehr stabil und sinkt erst nach Stunden auf den Basalwert (Robaye *et al.*, 1997).

P2Y<sub>6</sub>-Rezeptoren werden verschiedenen Körpergeweben gefunden werden, wie z.B. Rattenplazenta, -Lunge, -Thymus, -Milz, -Herz-, -Aorta, -Darm und -Mesenterium (Chang *et al.*, 1995).

### P2Y<sub>11</sub>

Das P2Y<sub>11</sub>-Rezeptorgen wurden aus der humanen Plazenta kloniert (Communi *et al.*, 1997). Der Rezeptor hat 33% Aminosäurenidentität mit P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren und 28% mit den P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren. Als einziger Rezeptor der P2Y-Gruppe wirkt die Aktivierung des Rezeptors stimulierend auf die Adenylatzyklase- und den Phosphoinositid-Signalweg. Zudem ist der P2Y<sub>11</sub>-Rezeptor der Einzige, der nur durch ATP aktiviert werden kann. Die Aktivierungsrangfolge ist ATP>2MeSATP>>>ADP, mit UTP und UDP bleibt der Rezeptor inaktiv.

### Kurze Überleitung

Purin Rezeptoren sind wichtige Sensoren des extrazellulären Milieus. Ihre Verteilung in Zellen des Immunsystems zeigt deutlich, dass bei der starken Ausprägung dieser Rezeptorenklasse das Erkennen von Purinen ein wichtiger „Umwelt“ Marker ist. ATP bewirkt Chemotaxis bei Neutrophilen (Kuroki *et al.*, 1989) und ist auch bei Eosinophilen ein wichtiger Auslöser zellulärer Antworten (Idzko *et al.*, 2001; Idzko *et al.*, 2003). Der anschließende Ergebnisteil zeigt die elektrischen Eigenschaften von Makrophagen und die Wirkung von 10 µM ATP auf die einzelne Immunzelle.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Generierung von Makrophagen**

Die in dieser Arbeit verwendeten Makrophagen wurden aus dem Blut humaner Spender gewonnen. Damit die Reinheit bei den gemessenen Zellen überprüft werden konnte, sind die Aufreinigung unter der Kontrolle des FACS gemacht worden. Um die höchst mögliche Reinheit der Zellen zu garantieren, sind einige Monozyten mittels magnetischer Isolierung gewonnen worden.

#### **2.1.1 Wachstumsmedien für Säugerzellen**

##### Clicks/RPMI

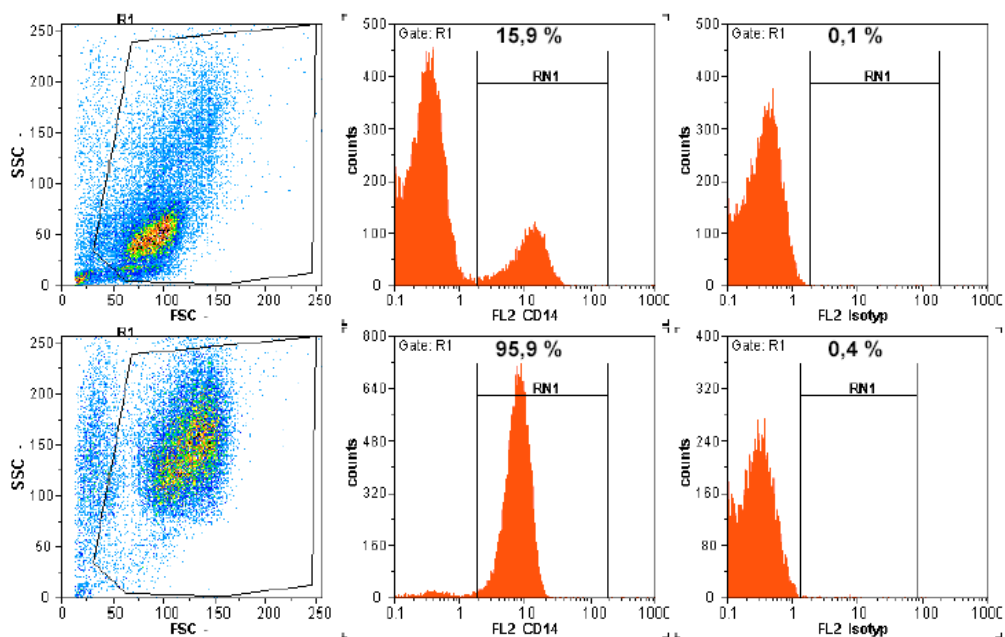
Das Trockenpulver wurde gemäß den Angaben des Herstellers in 10 l Aqua dest. gelöst, anschließend mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 23,93 g HEPES und 11,76 g NaHCO<sub>3</sub> versetzt und der pH auf 7,2 eingestellt. Nach Sterilfiltration (0,2 µm) erfolgte die Lagerung bei 4°C. Unmittelbar vor Gebrauch wurde noch β-Mercaptoethanol (50 µM), L-Glutamin (1 mM) und inaktiviertes (56°C, 30 min) FCS hinzugefügt.

##### PBS

Das PBS-Trockenpulver wurde in 10 l Aqua dest. (Braun, Melsungen, Deutschland) gelöst und der pH auf 7,2 eingestellt. Anschließend wurde die gesamte Lösung sterilfiltriert (0,2 µm) und zu je 500 ml bei 4°C gelagert.

Periphere mononukleäre Zellen aus Blut (PBMC, bestehend aus B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thrombozyten) können aufgrund ihrer Dichte mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten durch isopyknische Zentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten

und toten Zellen getrennt werden. Aus den PBMC lassen sich mit Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren *in vitro* humane Makrophagen generieren. Die untersuchten humanen Makrophagen dieser Arbeit wurden aus 20 ml Spenderblut gewonnen. Diese Blutprobe wurde mit dem Gerinungshemmer Heparin versetzt. 10 ml des Blutes wurden jeweils in ein 50 ml Falcon-Röhrchen abgefüllt und mit 20 ml PBS verdünnt und mit 15 ml Ficoll (1,077 Biocoll, Biochrom, Berlin) unterschichtet. Ficoll ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, dessen Dichte (1,077 g/ml) so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen höherer Dichte die Ficollschicht passieren. Granulozyten dringen in die Ficollphase ein, während sich mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten) in der Interphase ansammeln.



**Abbildung 2-1**

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus dem FACS-Gerät zur Makrophagen Aufreinigung. Der SSC zeigt die Granularität der Zellen, der FSC deren Größe. Der Rahmen gibt an, welche Zellen im Histogramm dargestellt werden. 5,9 % der Zellen sind CD14 positiv und zeigen keine Fluoreszenz bei der Abdeckung mit dem CD14 Isotyp-Fluoreszenz-Marker. Aus den 15,9% CD14 positiven Zellen wird eine zweite FACS-Analyse unternommen. Die zeigt das hier eine 95,9% Reinheit erzielt wird, die wiederum von der Isotypfärbung zusätzlich unterstützt wird.

Daraufhin erfolgte eine ungebremste Zentrifugation für 20 min, 660 xg (1800 U/min), 4°C. Die Interphase wurde abgenommen und in neue 50 ml Röhrchen überführt. Zwei weitere Waschstufen erfolgten für 10 min bei 400 xg, -(1300 U/min) 4°C in PBS

wobei alle Röhren in eines vereinigt wurden. Der zweite Waschschrift wurde bei gleichen Bedingungen mit PBS / 0,1 mM EDTA durchgeführt. Aus dem Röhren wurden dann 10 µl Zellen entnommen und mit 90 µl des 0,4%igen Farbstoffs Trypanblau (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) versetzt. Der Farbstoff diffundiert nur durch die Zellmembran der toten Zellen und färbt diese im Zytoplasma blau an. Dadurch können die toten Zellen bei der Zellzahlbestimmung ausgegrenzt werden. Ausgezählt wurden vier mal 16 Felder einer Neubauer-Zählkammer. Um die Zellzahl pro ml Zellsuspension zu ermitteln, wurde der Mittelwert aus 16 Feldern berechnet und anschließend mit dem Verdünnungsfaktor (10) und  $10^4$  multipliziert. Eine 100 µl Fraktion der Zellen wurde für durchflusszytometrische Analysen abgenommen.

### 2.1.2 Oberflächenfärbung

Mittels Oberflächenfärbung und durchflusszytometrischer Messung wurde die Generierung von Makrophagen aus PBMC kontrolliert. Dazu wurden 100 µl Zellprobe in ein FACS-Röhren pipettiert und danach 15 min auf Eis mit dem Farbe-Antikörper anti CD14 (BD Pharma, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Nach einem Waschschrift in PBS/2% FCS wurden die Zellen in 2 ml PBS/2% FCS aufgenommen und im Durchflusszytometer vermessen. Der zur Markierung verwendete Antikörper war PE-(Phycoerythrin) markiert.

### 2.1.3 Durchflusszytometrie

Im Gegensatz zur Immunfluoreszenz-Mikroskopie werden bei der Durchflusszytometrie einzelne Zellen einer Suspension objektiver durch Photomultiplier und nicht durch das menschliche Auge beurteilt.

Das Durchflusszytometer erfasst und zählt Zellen, die in einem Flüssigkeitsstrom einzeln einen Laserstrahl passieren. Dies ermöglicht eine multiparametrische Messung und Analyse bezüglich der Fluoreszenzmarkierung, Größe und Granularität jeder Zelle. Die Zellsuspension wird zunächst mittels Druck in die Messkanüle gedrückt und durch eine trichterartige Verengung beschleunigt, wodurch sich die Zellen in einem feinen Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander anordnen (hydrodynamische Fokussierung).

Dadurch kann der Argon Laser (488 nm) jede Zelle als Einzelne erfassen. Durch Linsen wird das Licht gebündelt und trifft somit exakt auf die durchfließenden Zellpartikel. Handelt es sich um fluoreszenzmarkierte Zellen, so regt der Laserstrahl die jeweiligen Fluorochrome an, die daraufhin Licht charakteristischer Wellenlänge emittieren. Durch das optische System, bestehend aus Filtern, Spiegeln und optischen Linsen, wird das emittierte Licht so aufgetrennt, dass im hier verwendeten Durchflusszytometer letztlich sechs verschiedene Parameter jeder Zelle erfaßt werden können: die Messung der Amplitude des Vorwärtsstreulichts (FCS, forward scatter) erlaubt eine Aussage über die Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (SSC, sideward scatter) ist ein Maß für die Granularität einer Zelle. Das von den Fluorochromen emittierte Licht wird mit dichromatischen Spiegeln in seine spektralen Komponenten zerlegt und gemessen. Im DAKO Galaxy-System stehen hierfür vier Kanäle (FL1-FL4) zur Verfügung, so dass bis zu vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden können. Zusätzlich ist die Anregung über eine Laser-Diode bei 630 nm möglich. In nachgeschalteten elektronischen Komponenten erfolgt die Verstärkung sowie eine Umwandlung in ein digitales Messsignal. Die Messung wurde entweder als Histogramm, in dem Zellzahl gegen Intensität der Fluoreszenz und Größe bzw. Granularität, durch einen Punkt dargestellt.

Die Zellen wurden dann in Polystyrol-Platten (Nunc-153066 40x12 mm) in Clicks / RPMi Medium / 10 % FCS supplementiert (Zelldichte:  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) für 16 h in den Brutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C gestellt. In dieser Zeit adhären die Monozyten im Gegensatz zu den Lymphozyten fest am Boden der Petrischale. Die Lymphozyten wurden durch das Wechseln des Mediums nach 16 h abgewaschen. Das neue Medium beinhaltet zusätzlich zum ursprünglichen Medium 2 ng/ml MCSF (Macrophage-Colony-Stimulating-Factor) als Differenzierungsfaktor für Makrophagen (TEBU, Frankfurt, Deutschland). Die Petrischalen wurden nach dem Mediumwechsel für 14 Tage bei den oben beschriebenen Bedingungen im Brutschrank inkubiert.

Für die Molekularbiologie und einige elektrophysiologische Messungen wurden Makrophagen höchster Reinheit durch Sortieren der Vorläufer-Monozyten aus PBMC und anschließende Differenzierung mittels MCSF hergestellt. Bei dieser

Sortierungsmethode wurden 20 ml Blut verwendet. PBMC wurden wie oben beschrieben aufgereinigt und gezählt. Das Zellpellet mit einem Restvolumen von ca. 100  $\mu$ l wurde dann zur weiteren Aufreinigung wie folgt benutzt. Monozyten wurden mit 10  $\mu$ l pro  $10^7$  Zellen monoklonale Antikörper  $\alpha$ -CD14 beads (Miltenyi, Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland), die direkt mit superparamagnetischen Mikropartikeln (Durchmesser ca. 100 nm) markiert sind und an das Monozyten spezifische Rezeptormolekül CD 14 (Cluster of Differentiation) binden, aus PBMC mittels magnetischer Sortierung (MACS) aufgereinigt. CD 14 wird auf Makrophagen und Monozyten exprimiert und ist über einen Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker in der Zytoplasmamembran verankert, es ist hochaffin ( $K_d = 3 \times 10^{-8}$ M) für das Lipid-A Segment von LPS. Monozyten in PBMCs wurden zusätzlich mit 10  $\mu$ l pro  $10^7$  Zellen Blocking-Reagenz (Miltenyi) versetzt, um  $F_c$ -Rezeptoren, die auf Monozyten exprimiert werden, zu blockieren. Die so vorbereiteten Zellen wurden in einem Volumen von 100  $\mu$ l für 15 min bei 4°C zur Markierung inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen für 10 min, 400 xg bei 4°C in PBS / 0,1 mM EDTA gewaschen. Die Zellsuspension mit spezifisch markierten Zellen (Monozyten) und unmarkierten Zellen wurde über eine Trennsäule gegeben (LS Säule, Miltenyi) die sich in einem Permanentmagnetfeld befindet. Die Trennsäulen besitzen eine Matrix aus Stahlwolle oder eisenmagnetischen Kugeln. Die unmarkierten Zellen durchlaufen die Säule im Hochgradientenfeld, die markierten Zellen bleiben an den Trennsäulen hängen und werden anschließend außerhalb des Magnetfeldes eluiert. Das MACS-System kann zur Anreicherung oder zum Ausschluß (Depletion) einer Zellpopulation aus einer Gesamtpopulation eingesetzt werden. Die Isolationen wurden gemäß den Herstellerprotokollen für den konjugierten Antikörper, Isolations-Kit und MACS-Säule (Miltenyi) durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen erneut gezählt und 100  $\mu$ l für eine erneute Durchflusszytometer-Analyse zur Bestimmung der Reinheit entnommen. Die Zellen wurden dann wie oben direkt in MCSF-haltigem Medium ausplattiert und differenziert.

## 2.2 Patch-Clamp-Messstand

Die Makrophagen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik (Hamill *et al.*, 1981) auf ihr elektrisches Verhalten untersucht. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur 22°C durchgeführt. Alle Messungen wurden an dem gleichen Meßstand gewonnen. Der Meßstand besteht aus optischen, mechanischen und elektrischen Komponenten.

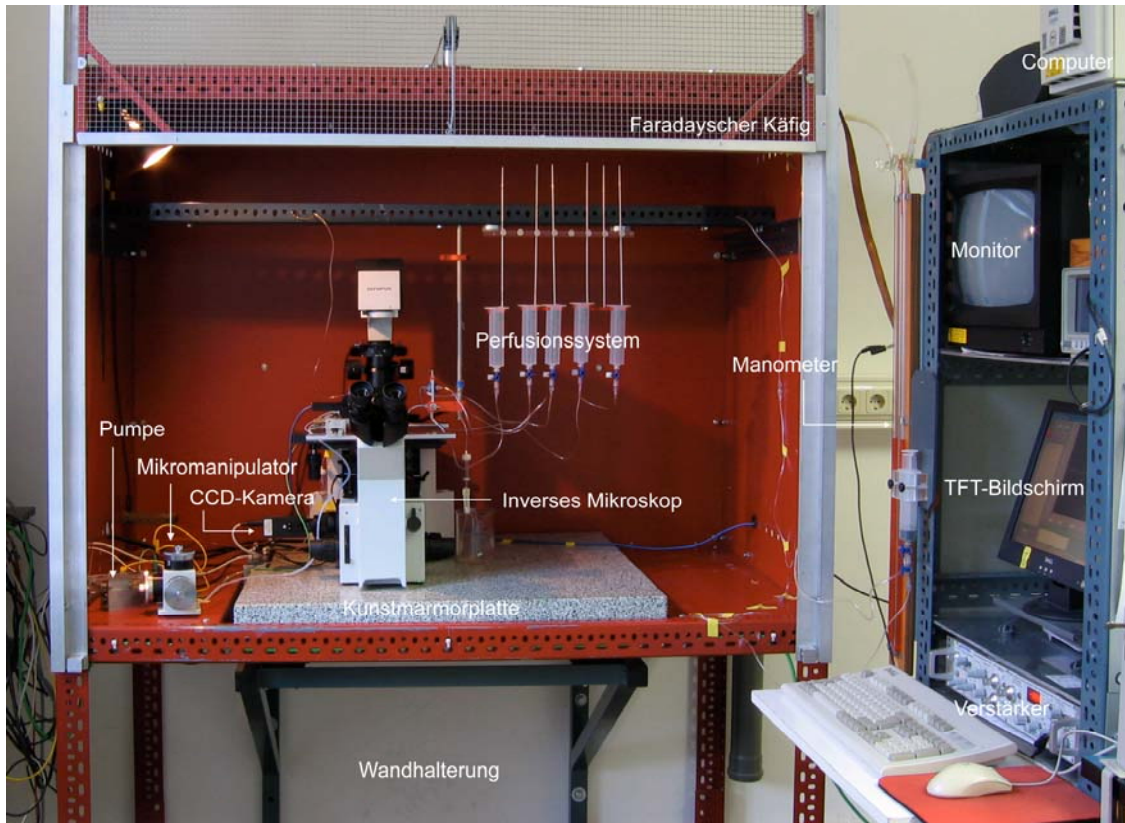
### 2.2.1 Optische Komponenten

Die optischen Bestandteile sind ein inverses Mikroskop (Olympus IX 50), das über eine Kamera (EHD) mit dem Monitor (Mon 12HR, EHD, Damme, Deutschland) verbunden ist. Der Monitor dient der Darstellung der Zelle und der Patch-Pipette bei geschlossenen Faraday-Käfig. Für die Messungen wurden Vergrößerungen von 40x und 400x benutzt mit Phasenkontrast 2 zur besseren räumlichen Orientierung. Die an das Mikroskop angeschlossene UV-Lampe wurde für die Messungen an Makrophagen nicht verwendet, da keine Transfektionen mit GFP oder andere Fluoreszenz-Farbstoffe benutzt wurden.

### 2.2.2 Mechanische Komponenten

Selbst die geringste Erschütterung kann zu einer Veränderung der Lage der Pipette zur Zelle und damit zu einem Abbruch der Messung durch einen Verlust des Seal führen. Aus diesem Grund ist der Meßstand über ein Gestell an der Wand schwingungsgedämpft befestigt. Dieses Gestell ist an einer tragenden Wand des Gebäudes befestigt, diese Wände sind auf Grund ihrer Statik schon von der Schwingung des Bodens entkoppelt. Auf dem Gestell ist an den vier Eckpunkten jeweils ein pneumatischer Vibrationsisolator (max 4 bar, 4,2 Hz Eigenfrequenz, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) angebracht. Auf den Vibrationsisolatoren liegt eine Marmorplatte auf.

Direkt auf dem Tisch des Mikroskops ist der Mikromanipulator (Narishige MHW 103 kleinster Schritt= 1µm / Aktionsbereich X-Y-Z=1cm) angeschlossen. Mit ihm ist es möglich, die Patch-Pipette ins Bad bis vor die Zelle zu bewegen. Der Pipettenhalter ist



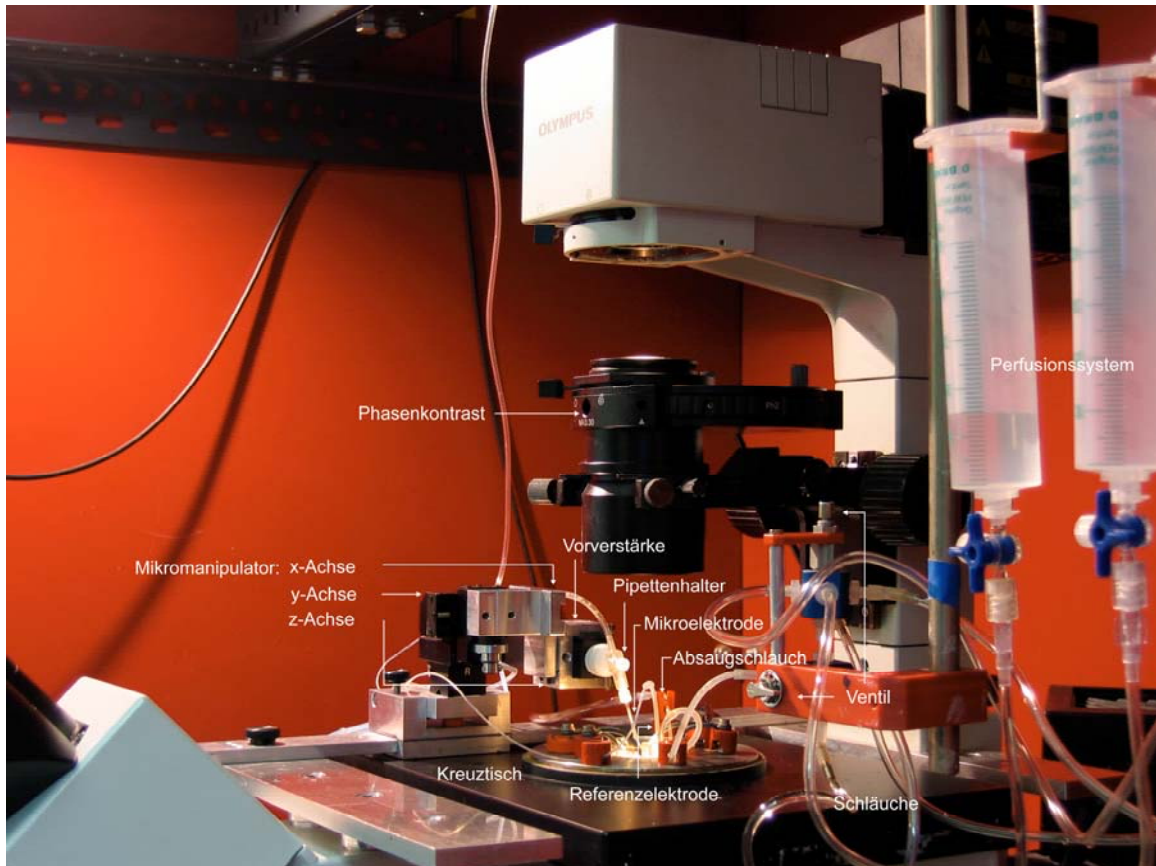
**Abbildung 2-2**

Aufbau des Patch-Clamp-Setups. Die Beschriftung zeigt die essentiellen Komponenten für die elektrophysiologischen Untersuchungen an den Makrophagen.

ein Eigenbau der Institutswerkstatt. Seine Hauptaufgabe besteht darin, die Patchpipette sicher und stabil zu fixieren, die elektrische Verbindung zum Vorverstärker herzustellen und das Anlegen eines Unter- bzw. Überdrucks zu ermöglichen. Der Halter besteht aus Polycarbonat und Teflon. Sein Rauschen ist durch das Verwenden von Kunststoff minimiert. Kunststoff minimiert die verwendete Masse und sorgt zusätzlich für genügende mechanische Stabilität. Genauso trägt das lötfreie Andrücken des Silberchloriddrahtes an den Goldstecker erheblich zum kleineren Rauschen bei. Die Glas-Kapillare ist durch eine Quetschdichtung fest mit dem Halter verbunden und zeigt keine „freien“ Bewegungen. Das Perfusionssystem des Patch-Clamp-Setups ist bewußt einfach gehalten. Der Zulauf der Lösungen von der Perfusor-Spritze in das Bad ist gravitationsgetrieben. Die Badlösungen wurden in Spritzen (Braun Perfusor 50 ml) aufbewahrt. Die Badlösungen liefen durch ein Dreiwegeventil über



Schlauchverbindungsleitungen (Clinico 58362 VL Bad Hersfeld, Deutschland) zu den Verteilerventilen. Über die zwei Verteilerventile, ein 4-Wege und 2-Wege Ventil (Hamilton HVDP4-5 und HVP4-2) wurde die Lösung bis kurz vor das Bad geführt, so dass der Totraum bis in das Bad möglichst klein gehalten wurde. Die Meßkammer selbst ist eine Petrischale (Nunc-153066 40x12 mm) mit einem Plexiglaseinsatz (Schuh). Dieser Schuh wird in die Petrischale gelegt und mit vier Plastikklemmen mit magnetischen Haltern befestigt. Die Halter waren vormals aus Metall gefertigt und wurden durch Plastikhalter ersetzt, da Feuchtigkeit an den Metallenden der Halter leicht Kriechströme verursachten und dafür sorgten, dass sich das Rauschen verstärkte und der Offset negativ beeinflusst wurde. Sitzt der Schuh fest in der Petrischale ist das überspülte Volumen auf wenige  $\text{mm}^3$  bestimmt, wodurch die Geschwindigkeit des Lösungswechsels erheblich vergrößert ist. Zudem hat dieser Einsatz zwei Bohrungen, in die sowohl die Referenzelektrode (MED-PE-Mikro-Schlauch 28471  $\varnothing_1=0,58$  mm,  $\varnothing_a=0,96$ mm, Reichelt, Heidelberg, Deutschland) als auch der Zulauf gesteckt wurden. Am hinteren Ende der Petrischale wurde ein gebogenes Glaskapillarrohr als Ablauf, das mit einer Gleichstrompumpe (Werkstatt, Eigenbau) verbunden war, eingesetzt. Vor dem Zulauf und nach dem Ablauf war das Bad durch Tropfenfänger elektrisch von den Zulauf- und Ablaufgefäßen entkoppelt.



**Abbildung 2-3**

Die Abbildung zeigt einen Einblick in die Messanordnung der Patch-Clamp Ableitungen. Dargestellt ist das Nunc®-Dish mit dem ihn umgebenden Mikroapparaturen. Die Beschriftungen weisen auf die einzelnen Komponenten hin.

### 2.2.3 Elektrische Komponenten

Die elektrischen Komponenten sind ein Patch-Clamp-Verstärker (Axopatch 200B Axon Instruments, Foster City, USA), das Herzstück der Elektronik, der mit seinem Vorverstärker direkt kleinste Spannungs- und Stromänderungen ausliest. Ein großer Vorteil gegenüber anderen Verstärkern ist seine kapazitive Kopplung des Vorverstärkers. sie erlaubt eine weitere Reduktion des Rauschens und ermöglicht damit hochauflösende Einzelkanalmessungen. An den Verstärker wurde ein Oszilloskop und ein AD/DA-Wandler (National Instruments) angeschlossen. Das Oszilloskop (Gould 20MHz Digital Storage Type 1425) diente der Überprüfungen der Software und der Bestimmung von Rausch- und Brummquellen ohne Computer. Der Computer wurde

über eine Analog-/Digitalkarte (PCI-MIO-16XE-10, National Instruments, München) an den AD/DA-Wandler angeschlossen und diente der Aufzeichnung und Steuerung der elektrophysiologischen Messungen. Die Sampling Rate bei Einzelkanalmessungen war 16000 /s und die Filterfrequenz lag bei 5000 Hz. Bei Ganzzell-Ableitungen waren es 5000 /s und ein Filter von 1 kHz. Die Software wurde von Allen Bassaly geschrieben und ist in drei Programme eingeteilt. Das erste Programm (Oszi) dient nur der Aufzeichnung von Daten und dem Applizieren von Messprotokollen. Das zweite Programm ermöglichte die Analyse von Whole-Cell-Daten und das dritte die Analyse von Einzelkanal-Daten.

#### 2.2.4 Kapillaren

Sowohl für die Whole-Cell-Ableitungen als auch für die Cell-Attached Messungen wurde dünnwandiges Borosilikatglas mit Filament (Gb 150TF-8P, Science Products, Hofheim, Deutschland) benutzt, das einen Außendurchmesser von 1.5 mm hatte. Die Glaskapillaren wurden mit dem horizontalen Elektrodenziehgerät (DMZ-Universal-Puller, Zeitz Instrumente, Augsburg, Deutschland) gezogen und poliert. Das erste Pull-Programm mit zwei Vorpulls und einem zweiphasigen Hauptzug, der schließlich die Glaskapillare auseinander reißt, ergab für die Patchpipetten einen konstanten Widerstand von 8 M $\Omega$ . Der anschließende Hitzepoliervorgang des Elektrodenzieh-Programms ändert diesen Pipettenwiderstand nicht.

Das Glas wurde für beide Ableitungskonfigurationen mit dem Polymer R6101 (Dow Chemicals) beschichtet. Das Beschichten erfolgte unter dem Stereoskop und wurde dann in einer Glühwendel ausgehärtet. Das Polymer dient der Verringerung der Kapazität der Pipette und dadurch verringert sich auch das Rauschen. Da es den Abstand der beiden „Kondensatorplatten“ Pipettenlösung und Badlösung vergrößert und damit die Kapazität herabsetzt (Pipette 2-3 pF).

#### 2.2.5 Offsetpotenzial und Liquid Junction Potenzial

Das Offsetpotenzial ist ein Potenzial, das an den Übergängen innerhalb der Messkette Silberchloriddraht-Pipettenlösung-Salzlösung im Bad-Referenzelektrode gebildet wird.

Der Abgleich erfolgt über den Offsetpotentiometer des Verstärkers. Es wird über die Software mit dem Testpulsprogramm der Software und dem Offsetpotentiometer des Verstärkers so eingestellt, dass bei 0 mV Spannung 0 pA Strom fließt. Das korrigiert aber auch das Liquid-Junction-Potenzial, das ein Übergangspotenzial ist, welches bei Whole-Cell Messungen sowohl an den Grenzflächen Pipettenlösung-Zellinhalt als auch am Übergang intrazelluläres Milieu – extrazelluläre Lösung entsteht (Barry & Lynch, 1991). Die Membranpotenziale und Klemmpotenziale sind in dieser Arbeit nicht um das Liquid-Junction-Potenzial korrigiert worden.

Um das Liquid-Junction-Potenzial zu messen, benutzt man eine Referenzelektrode mit 3 M KCl und einer Agarbrücke. Die Patch-Pipette wird in eine 3 M KCl Lösung getaucht, dabei gleicht man das Offsetpotenzial wie gewohnt ab. Danach wird die Badlösung durch eine physiologische Salzlösungen (5mM K<sup>+</sup>) ausgetauscht. Dabei kann man nun im Current-Clamp Modus die Potenzialverschiebung messen. Die bisher genaueste Anleitung für die Bestimmung des Liquid-Junction-Potenzial ist von Erwin Neher verfaßt (Neher, 1992).

### 2.2.6 Sealbildung

Vor dem Eintauchen der Pipette in die Badlösung wurde ein Überdruck von 30 cm Wassersäule auf die Pipette gegeben. Damit wurde verhindert, dass sich Verschmutzungen an die vordere Öffnung der Pipette anlagern konnte, was eine Verschlechterung der Sealwahrscheinlichkeit zur Folge gehabt hätte. Die Pipette wurde daraufhin kurz vor die Zelle positioniert, damit beim Verringern des Überdrucks und beim Anlegen des Unterdrucks es zu einer Sealbildung kam. Bei Abschlusswiderständen, deren Widerstand unter 10 GΩ lag, wurde die Messung sofort abgebrochen. Diese Vorgehensweise war zwingend notwendig, da der Eingangswiderstand der elektrisch sehr dichten Makrophagen bei ungefähr 5 GΩ lag.

### 2.2.7 Referenzelektrode

Als Referenzelektrode wurden selbst hergestellte Silber-Silberchlorid-Elektroden verwendet. Ein 4 cm langer Silberdraht ( $\varnothing = 300 \mu\text{m}$ ) wurde in 150 mM

Kaliumchlorid-Lösung getaucht, die an die Kathode einer Gleichstromquelle angeschlossen war – der Silberdraht an die Anode. Die etwa eine Stunde dauernde Chlorierung erfolgte bei einer Stromstärke zwischen 100 mA und 150 mA und einer Spannung von 1,5 V. Der Silberchloriddraht wurde dann mit einem 5 cm langen Polyethylen-Schlauch ( $\varnothing_i$  1,45 mm,  $\varnothing_a$  1,8 mm) umgeben. Das hintere, nicht chlorierte Ende des Silberdrahtes wurde mit einem Goldstecker lötfrei verbunden. Das vordere Ende des Polyethylen-Schlauchs wurde mit einer 3%igen Agarbrücke abgedichtet, um Verunreinigungen des Präparats durch Silberionen zu verhindern. Eine 150 mM KCl Lösung diente als Referenzelektrodenbefüllung. In der gleichen Lösung wurden auch die Elektroden aufbewahrt um Austrocknung zu verhindern.

### 2.2.8 Membrankapazitäts-Bestimmung

Kapazitätsmessungen sollten im Verlauf dieser Arbeit noch eine große Bedeutung haben. Zur Kapazitätsbestimmung der Membran wurde folgende Methode verwandt.

Allgemein gilt: Die Kapazität  $C$  läßt sich als Quotient aus Ladung  $Q$  und Spannung  $U$  ausdrücken. Das an der Membran abfallende Potenzial ist in der Regel nicht exakt bekannt, da die Membran auch ohne ein extern angelegtes Potenzial aufgeladen sein kann und zusätzlich ein Diffusionspotenzial an der Spitze der Pipette auftreten kann. Aus diesem Grund betrachtet man die Kapazität  $C = dQ/dU$ , und dies bedeutet für eine Spannungsrampe:  $dU/dt = (dQ/dt)/C$ . Da  $dQ/dt$  der Strom  $I$  ist, gilt  $C = I/(dU/dt)$ . Beim Wechsel einer Aufwärtsrampe von +1000 mV/s zu einer Abwärtsrampe von -1000mV/s kommt es zu einem Spannungswechsel  $dU/dt$  von 2V/s. Folglich bedeutet ein resultierender Stromsprung von 100pA eine Kapazität von 50 pF. Das betrachtete  $dU/dt$  ist hierbei die Änderung des Spannungsabfalls über die Zellmembran. Wenn der Zugriffswiderstand  $R_z$  nicht wesentlich kleiner ist als der Membranwiderstand  $R_m$  der abgeleiteten Zelle, muss der Spannungsabfall an der Membran  $U_m$  gemäß der Formel:  $dU_m/dt = (dU/dt) * R_m/(R_m+R_z)$  korrigiert werden. Da bei den Makrophagen der Membranwiderstand mindestens 100 fach größer ist als der Zugriffswiderstand, wurde  $R_z$  vernachlässigt.

### 2.2.9 Zusammensetzung der Salzlösungen

Für die verschiedenen Messungen der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Bad- und Pipettenlösungen verwandt. Diese Lösungen werden in den nächsten Tabellen aufgeführt.

**Table 2.2.1 Badlösung der Makrophagen-Messungen (alle Angaben in mM)**

Name	KCl	NaCl	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na- Pyruvat	Ca Cl <sub>2</sub>	Mg Cl <sub>2</sub>	HEPES	B- Albumin	EGTA	NMDG	Glc	pH
Makro- 5K+	4,5	150	1,2	2	1,6	1,13	10	0,5%	0	0	10	7,3
Makro- 150K+	150	4,5	1,2	2	1,6	1,13	10	0,5%	0	0	10	7,3
Makro- 5K+ 0NaCa	4,5	0	0	2	0	1,13	10	0	1	150	10	7,3
Intra	130	0	0	0	0	0	10	0	10	0	10	7,2

**Table 2.2.2 Pipettenlösungen der Makrophagen-Messungen (alle Angaben in mM) (fMg = freies Magnesium f Ca = freies Calcium)**

Name	KCl	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	K- Glutamat	K <sub>2</sub> - ATP	Na <sub>2</sub> - GTP	Ca CL <sub>2</sub>	Mg Cl <sub>2</sub>	HEPES	EDTA	EGTA	pH	fMg-fCa
Makro-1	50	10	65	1,9	0,2	1,6	7,9	5	0	1,1	7,3	Mg=7,9
Makro-2	50	10	65	1,9	0,2	1,5	4,5	5	5	0	7,3	Mg=1 Ca=0,005
Makro-3	50	10	65	1,9	0,2	4,5	1,8	5	5	0	7,3	Mg=1,2 Ca=0,1
Makro-4	50	10	65	1,9	0,2	6	0	5	5	0	7,3	Mg=1
B1	50	10	65	1,9	0,2	0	2	10	0,1	0	7,3	
S1	120	0	0	0	0	9	2	10	0	9,6	7,3	Ca=0,0011

### Pharmaka und Salze

Alle verwendeten Salze und Pharmaka sind von Sigma (Steinheim, Deutschland)

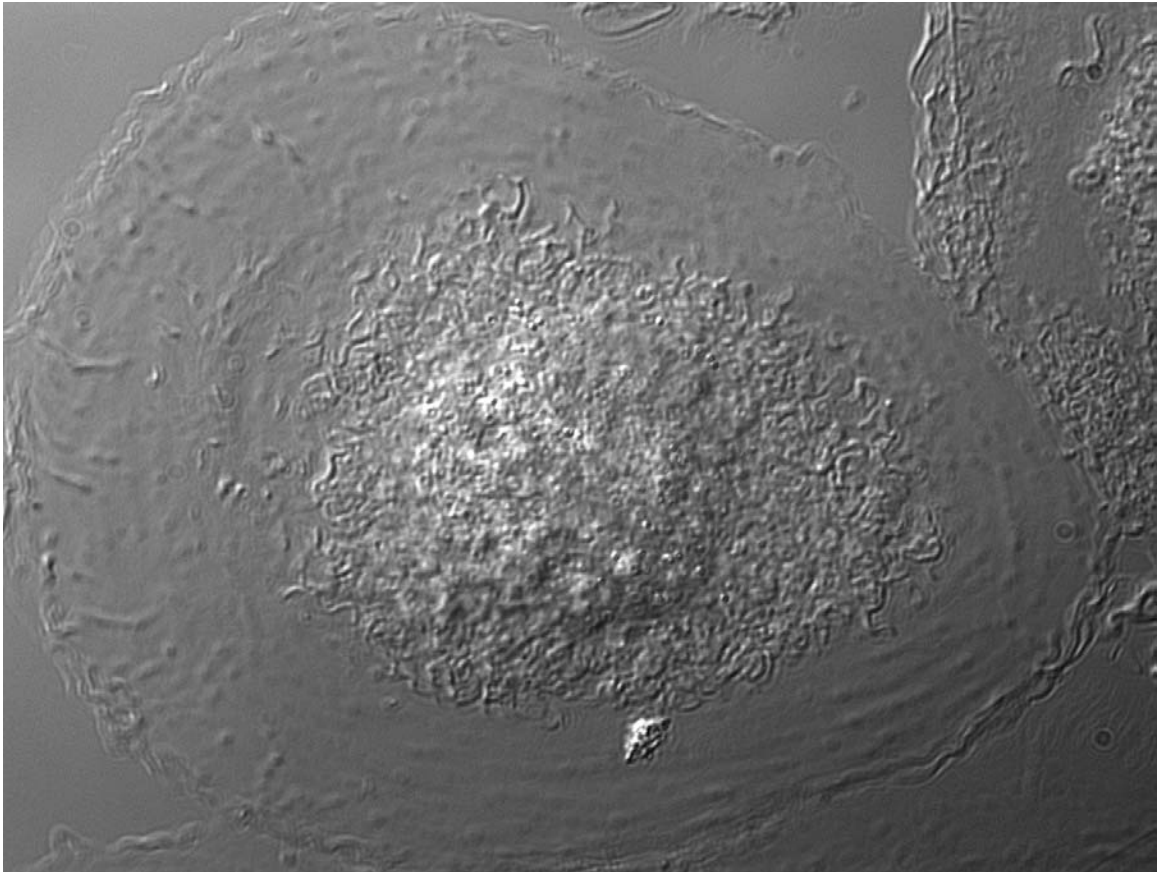
## **3 Ergebnisse**

Dieser Teil der Doktorarbeit befasst sich mit den elektrischen Eigenschaften der humanen Blut-Makrophagen. Humane Blut-Makrophagen sind seit Gallin und McKinney nicht mehr mit der Patch-Clamp-Technik untersucht worden. Die Ergebnisse in den 80er Jahre sind eher als Richtschnur zu sehen, da die Isolierungsmethoden von Makrophagen und die heutigen verbesserten Apparaturen für die Patch-Clamp-Technik genauere Charakterisierungen zulassen. Makrophagen gehören zu den elektrisch nicht erregbaren Zellen, sie verfügen nicht über die Möglichkeit Aktionspotenziale zu generieren. Da die Referenzdaten über die elektrischen Eigenschaften der Makrophagen älteren Datums sind, dienen die ersten Resultate und Versuche dem Ziel, eine Reproduzierbarkeit von Standardmessbedingungen zu etablieren.

Makrophagen sind relativ große Zellen, ihr Durchmesser unter dem Mikroskop liegt zwischen 12 und 15  $\mu\text{m}$ . Im Vergleich zu HEK 293 Zellen ist der Durchmesser etwa 2-4  $\mu\text{m}$  größer. Die Membran der Makrophagen zeigen eine hohe Anzahl von Invaginationen, d.h. Einfurchungen, die die Oberfläche am gesamten Zellkörper um ein Vielfaches vergrößern.

### **3.1 Passive elektrische Eigenschaften**

Zur Bestimmung der passiven Eigenschaften der Makrophagen sind über 680 Zellen untersucht und ausgewertet worden. Es konnte eine repräsentative Anzahl an Messungen analysiert werden. Daraus ergibt sich, dass im Mittel fast jede Zelle mit zwei der drei untersuchten Eigenschaften in die Statistik eingegangen ist. Die passiven elektrischen Eigenschaften dieses Kapitels zeigen somit Durchschnittswerte der untersuchten Makrophagen.

**Bild 3-1**

Ruhender Makrophage mit weitem Rand Spiegelei-Form (fried egg)

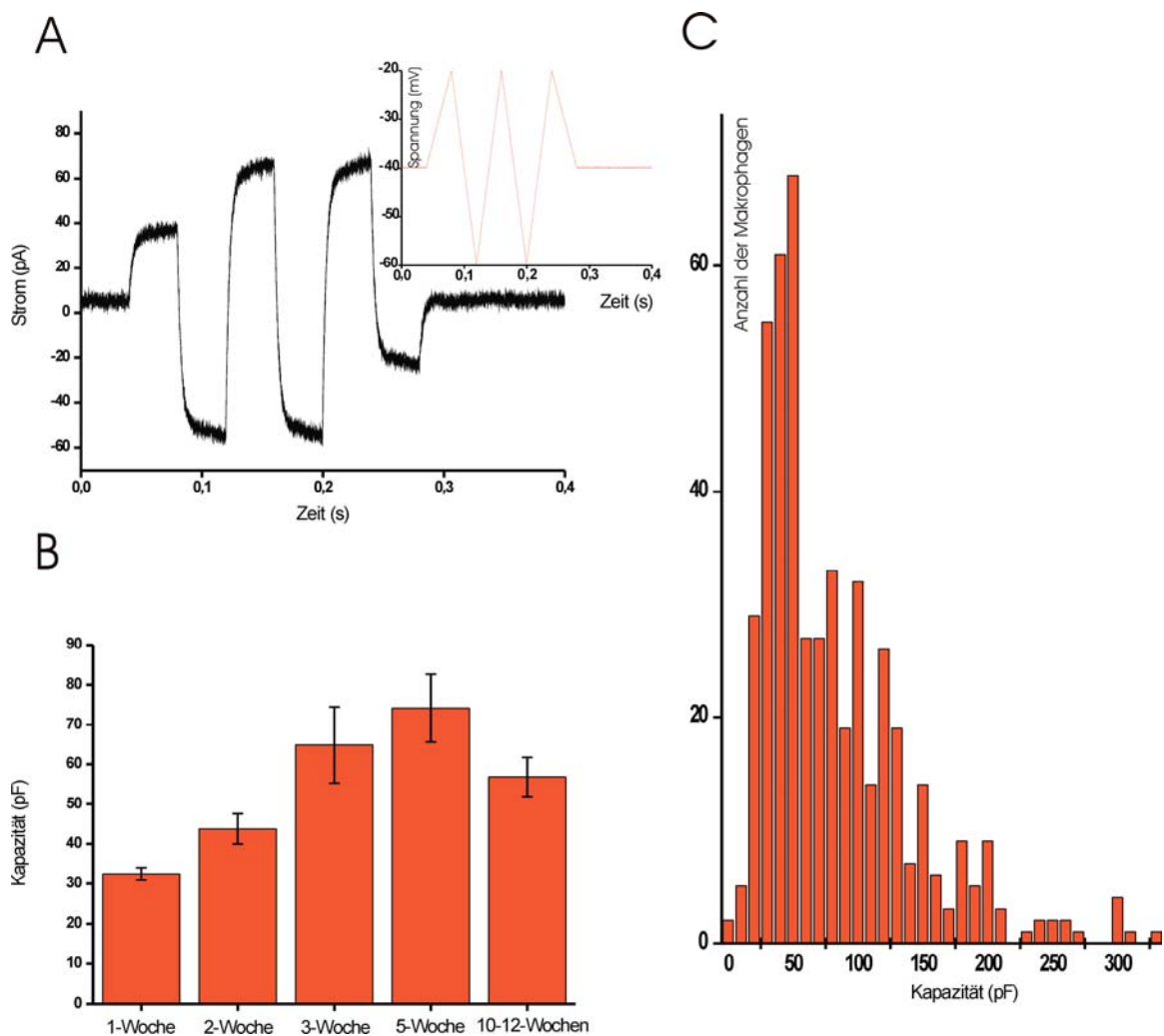
### 3.1.1 Kapazitätsmessungen

Kapazitätsmessungen geben Auskunft über die Größe der Fläche der Membran der Makrophagen. Mit Hilfe der Kapazität lassen sich Aussagen über die Anzahl von bestimmten Ionenkanälen oder der Stromdichte pro Fläche treffen. Aus den Ergebnissen läßt sich berechnen, ob die Zelle im Verhältnis zur Fläche über viel oder eher wenige Kanäle verfügt.

In diesem Abschnitt wurden die Kapazitäten aller Makrophagen bestimmt und dargestellt. Die Kapazität wurde nach dem Reifungsalter der Makrophagen zusätzlich sortiert.



Kapazitätsmessungen, wie in Material und Methoden detailliert beschrieben, sind an den Makrophagen vorgenommen worden. Bei 487 Messungen wurde die Kapazität im Mittel mit  $80,5 \pm 2,56$  pF bestimmt. Die Verteilung zeigt ihr Maximum um 50-70 pF. Die durchschnittliche Kapazität von HEK 293 Zellen liegt bei 10 pF. Damit liegt die Kapazität von Makrophagen im Mittel 5-7 fach höher. Kapazitäten von 40-100 pF sind von (Gallin & McKinney, 1988)) beschrieben worden. Diese Messungen stimmen mit denen dieser Arbeit sehr gut überein.



**Abbildung 3-1**

Kapazitätsmessungen an 487 Makrophagen. (A) zeigt eine typische schnelle Rampe, mit ihrer Stromantwort, aus der sich direkt die Kapazität ablesen lässt. (B) zeigt die durchschnittliche Kapazität nach verschiedenen Zeiten der Makrophagenreifung mit Standardfehler. (C) zeigt alle Kapazitäten von Makrophagen jeden Alters  $n = 487$ .

Bei den Makrophagen nimmt die Kapazität mit dem Alter der Reifung zu. Makrophagen der ersten Woche haben im Mittel eine Kapazität von  $32,5 \pm 1,6$  pF (n=34). Die der zweiten Woche haben im Mittel  $43,75 \pm 3,8$  pF (n=24). Die Makrophagen der dritten Woche haben  $64,8 \pm 9,6$  pF (n=7). Die Makrophagen der fünften Woche haben eine Kapazität von  $74,13 \pm 8,6$  pF (n=16). Von der Kapazität läßt sich direkt auf die Membranoberfläche der Makrophagen schließen. Es ist deutlich, dass die Membranoberfläche mit der Dauer der Zeit steigt, in der die Monozyten zu Makrophagen reifen. Die Meßergebnisse von 10-12 Wochen alten Makrophagen mit  $56,8 \pm 4,9$  pF (n=6) zeigen diese Entwicklung nicht mehr. Hierbei ist anzumerken, dass in den Petrischalen nach dieser langen Zeitspanne nur 10% der Zellen noch lebten. Die Messungen zeigen also nur Überlebende, die durch die Anzahl der toten Zellen und den sehr lange zurück liegenden Mediumwechsel in ihrer Entwicklung beeinträchtigt waren. Die Summe der Messungen in den verschiedenen Altern ergeben zusammen nicht die Summe der gesamten Messungen, hierzu ist anzumerken, dass die Makrophagen bei späteren Messungen nach morphologischen Kriterien ausgesucht worden sind. Durch diese Selektion ist hier eine allgemeine Aussage über die Makrophagenpopulation möglich.

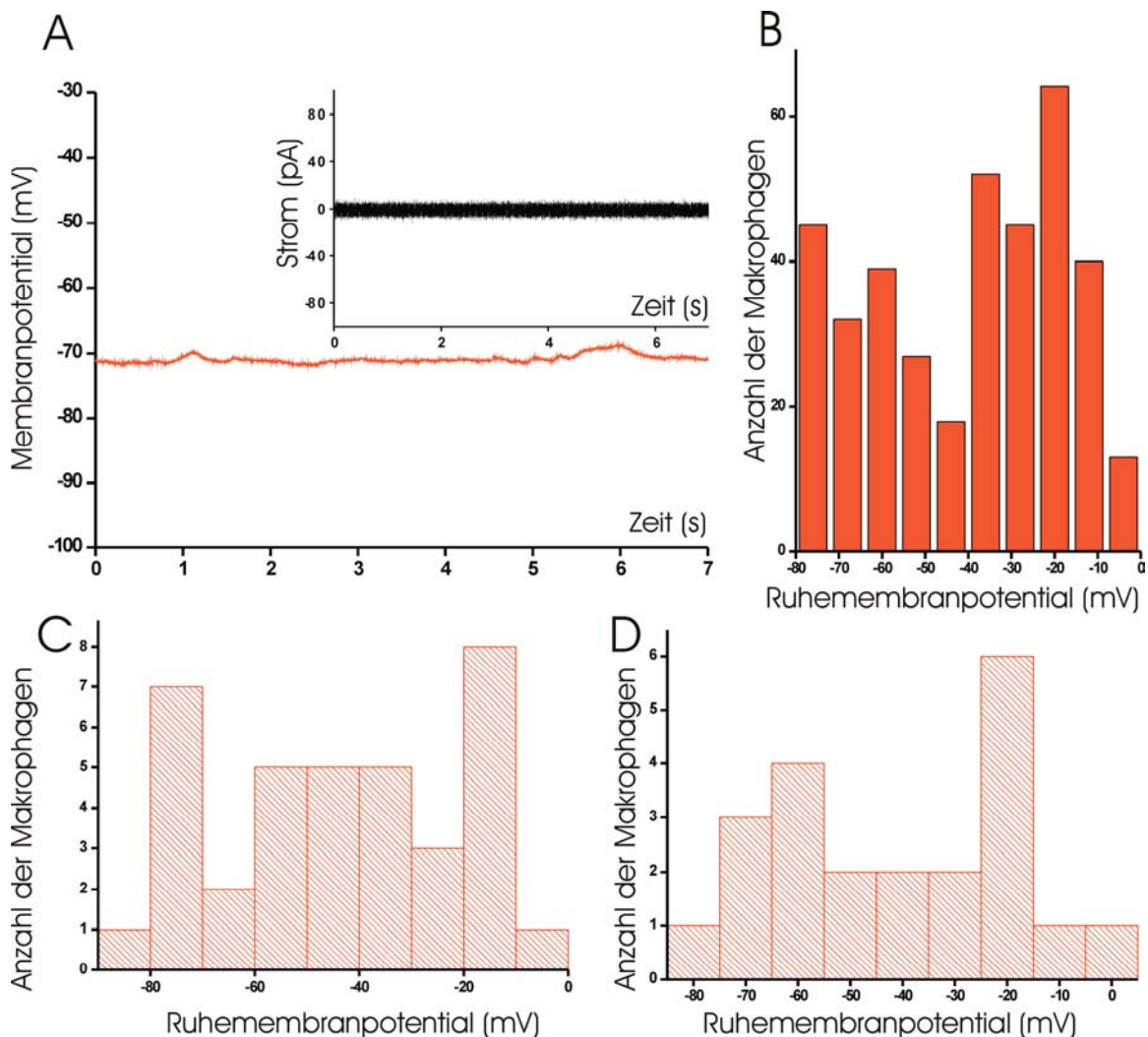
### 3.1.2 Membranpotenzialmessungen

Das Membranpotenzial gibt Auskunft über den derzeitigen elektrischen Zustand der Makrophagen. Zellen, die über geöffnete Kaliumkanäle verfügen, haben ein Membranpotenzial nahe dem Kaliumgleichgewichtspotenzial. Makrophagen verfügen über Kaliumkanäle. Sie verfügen aber auch über Chloridkanäle und unspezifische Kationkanäle. Hier sind alle gemessenen Membranpotenziale direkt nach dem Einbrechen in den Ganz-Zell-Modus ausgewertet worden. Die Ergebnisse zeigen zwei Maxima in der Nähe des Chloridgleichgewichtspotenzials und des Kaliumgleichgewichtspotenzials. Obwohl die Verteilung bimodal ist, sind hier auch Angaben über den Mittelwert gegeben.

Des Weiteren wurden bei 407 Makrophagen Membranpotenzialmessungen in der Strom-Klemme durchgeführt. Sie zeigen im Mittel ein Ruhemembranpotenzial von -42

$\pm 1,25$  mV. Die Verteilung der Membranpotenziale zeigt sich als bimodal, dies bedeutet es gibt zwei Maxima; eines bei  $-25$  mV und eines bei  $-70$  mV. Diese beiden Werte entsprechen den Nernst-Potenzialen für Kalium ( $-70$  mV) und Chlorid ( $-25$  mV), die sich aus der Ionenverteilung der Badlösung und der Pipettenlösung ergeben.

Makrophagen der ersten Woche haben im Mittel ein Ruhemembranpotenzial  $-46,5 \pm 4,1$  mV ( $n=39$ ). Makrophagen der zweiten Woche haben im Mittel ein Ruhemembranpotenzial von  $-41,7 \pm 4,79$  mV ( $n=22$ ). Das Ruhemembranpotenzial der Makrophagen der dritten Woche liegt bei  $-62,3 \pm 14,7$  mV ( $n=4$ ). Die Makrophagen der fünften Wochen haben im Mittel ein Ruhemembranpotenzial von  $-65,8 \pm 8,1$  mV.



**Abbildung 3-2**

Ruhemembranpotenzial der Makrophagen. (A) zeigt eine Beispielmessung bei einer Current-Clamp mit  $I=0$ . (B) zeigt die bimodale Verteilung des Ruhemembranpotenzials von Makrophagen jeden Alters. (C) zeigt ein Woche alte Makrophagen. (D) zeigt zwei Wochen alte Makrophagen.

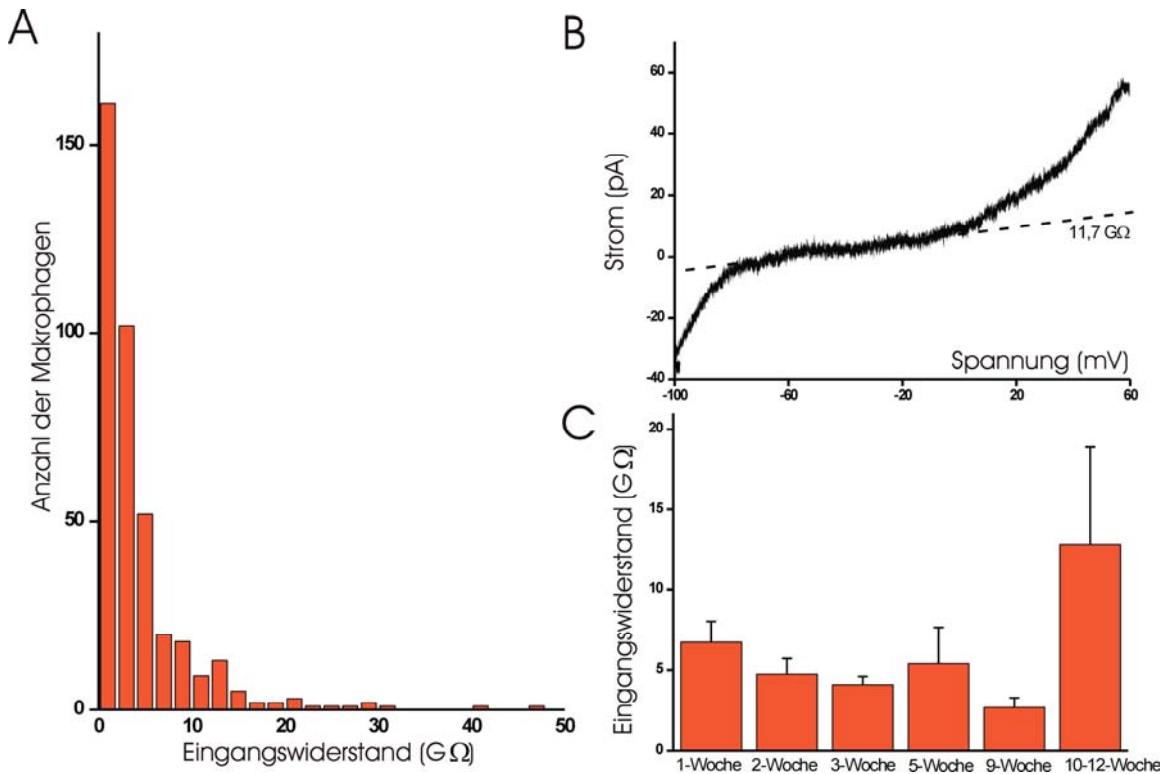
Das Ruhemembranpotenzial von Makrophagen, die 10-12 Wochen alt sind, ist im Mittel  $-44,5 \pm 8,6$  mV (n=6). Die bimodale Verteilung zeigt sich in den ersten beiden Wochen genauso wie in der Gesamtverteilung. Bei den drei, fünf und zehn bis zwölf Wochen alten Makrophagen ist die Anzahl der Messungen zu gering, um aus dem Histogramm fundierte Schlüsse ziehen zu können. Bei den Membranruhepotenzial zeigt sich ein Verlauf zu negativeren Spannungen in Richtung des Kaliumgleichgewichtspotenzials.

### 3.1.3 Eingangswiderstand

Der Eingangswiderstand liefert Informationen über das Leck, die Qualität der Ableitung sowie die Anzahl der offenen Ionenkanäle nach dem Einbrechen in den Ganz-Zell-Modus. Der Eingangswiderstand ist im hohen Maße vom Abschlußwiderstand abhängig, da bei hohen Abschlußwiderständen das Leck minimiert wird. Die Messungen des Eingangswiderstandes wurden direkt nach dem Eintreten in die Whole-Cell Konfiguration bestimmt, um Veränderungen des Zytosol durch die Pipettenlösung zu verhindern. Der Eingangswiderstand ist das Maß, um die elektrische Dichte der Zellen zu bestimmen. Die Zellen deren Eingangswiderstand unter  $5 \text{ G}\Omega$  lag wurden nicht für weitere Messungen verwendet.

Bei 398 Zellen wurde der Eingangswiderstand bestimmt. Der Eingangswiderstand lag im Mittel bei  $5 \pm 0,6 \text{ G}\Omega$ . Die Höhe des Eingangswiderstands zeigt, dass Makrophagen im normalen ruhenden Zustand über wenige offene Ionenkanäle verfügen. Makrophagen der ersten Woche haben im Mittel einen Eingangswiderstand von  $6,7 \pm 1,3 \text{ G}\Omega$  (n=32). Zwei Wochen alte Makrophagen zeigen im Mittel einen Eingangswiderstand von  $4,7 \pm 0,9 \text{ G}\Omega$  (n=22). Makrophagen, die drei Wochen gereift sind, haben durchschnittlich einen Eingangswiderstand von  $4,1 \pm 0,5 \text{ G}\Omega$  (n=4). Makrophagen der fünften Woche haben im Mittel einen Eingangswiderstand von  $5,4 \pm 2,3 \text{ G}\Omega$  (n=10). Neun Wochen alte Makrophagen haben einen Eingangswiderstand von  $2,7 \pm 0,6 \text{ G}\Omega$ . (n=10). Bei Makrophagen, deren Alter 10-12 Wochen ist, liegt der Eingangswiderstand bei  $12,8 \pm 6,1 \text{ G}\Omega$  (n=6). Der Wert für den Eingangswiderstand zeigt mit dem Alter der Abwehrzellen kaum Veränderungen. Dies läßt keine Aussage über den Einbau von spannungsabhängig Kanälen in die Membran zu, da im

Ruhezustand über ein Spannungsintervall von  $-60$  bis  $-20$  mV in der Spannungsrampe nur Kanäle in Erscheinung treten, die nicht spannungsabhängig sind oder durch Liganden oder Kalzium geöffnet werden. In der Spannungsrampe zeigen sich alle spannungsunabhängigen Kanäle.



**Abbildung 3-3**

Messung des Eingangswiderstandes bei Makrophagen verschiedenen Alters.

(A) zeigt die Bestimmung aller gemessenen Eingangswiderstände. Makrophagen mit Eingangswiderständen geringer als  $5 \text{ G}\Omega$  wurden für diese Arbeit nicht weiter ausgewertet. (B) zeigt eine Beispielmessung zur Bestimmung des Eingangswiderstandes. (C) zeigt Veränderungen des Eingangswiderstandes abhängig vom Alter der Makrophagen.

### 3.1.4 Kaliumkanäle

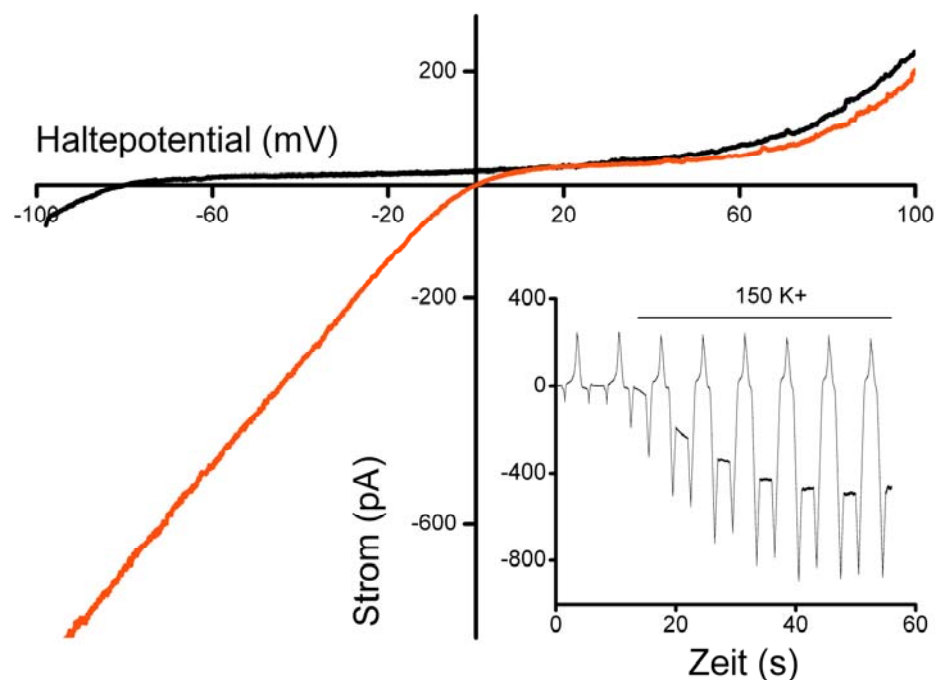
Wie in der Einleitung beschrieben, sind die Kaliumströme, die in dieser Arbeit untersucht werden, mit denen anderer Arbeiten vergleichbar. Diese Kaliumströme wurden in Einzelkanal- und Ganz-Zell-Messungen mit hoher Reproduzierbarkeit gemessen.

Zur weiteren Bestimmung der elektrischen Eigenschaften der Makrophagen sind Ganz-Zell-Ströme mit langsamen Spannungsrampen gemessen worden. Bei dieser Art der Messung können gezielt die spannungsunabhängigen Ströme in der Ganz-Zell-Ableitung bestimmt werden.

### Kir-Kanal

Da der einwärtsrichtende Kanal Kir 2.1 aus Makrophagen kloniert wurde, wurde der Messansatz so gewählt, dass der von diesem Kanal getragene Strom gut sichtbar gemacht werden konnte.

Dieser Kanal erzeugt einen markanten Einwärtsstrom, der bei Whole-Cell-Ableitung als starker Kaliumeinwärtsstrom mit Spannungen in Bereichen negativer als das Kaliumgleichgewichtspotenzial deutlich erkennbar wird.

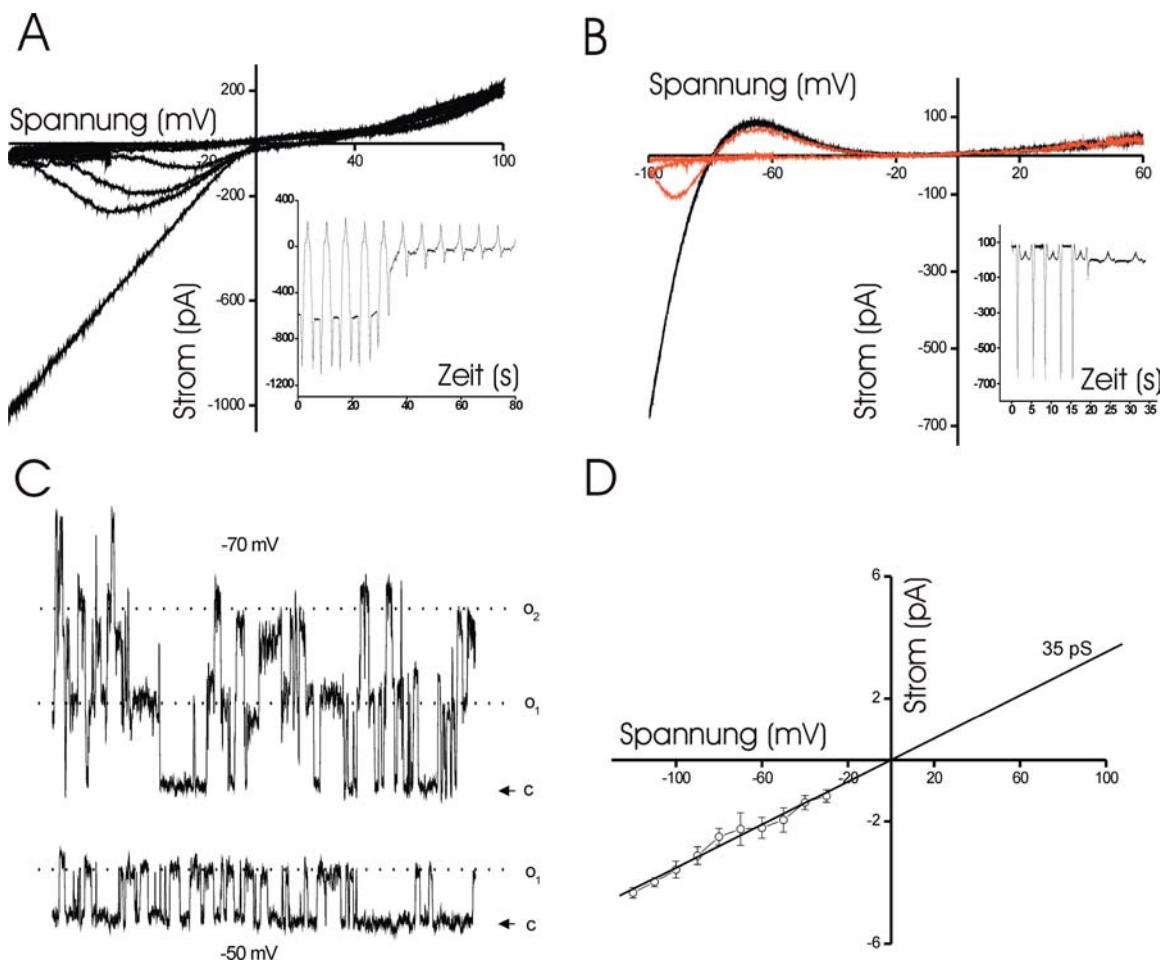


**Abbildung 3-4**

Stromspannungsklemme einer Makrophage. Die rote Stromspur zeigt die I/V in 150 mM Kalium. Die schwarze Stromspur zeigt die I/V in 5 mM Kalium. In der kleineren Abbildung ist der Wechsel von 5 mM Kalium auf 150 mM Kalium abgebildet.

Die physiologische Badlösung, in der die Zellen gemessen werden, enthält eine Kaliumkonzentration von 5 mM. Beim Austausch von der 5 mM Kalium Lösung gegen eine 150 mM Lösung, entspricht die Kaliumkonzentration außerhalb der Zelle der Kaliumkonzentration in der Zelle. Da die Kaliumleitfähigkeit in 150 mM Kalium dominiert, folgt das Membranpotenzial dem Kaliumgradienten. Das bedeutet, dass das Membranpotenzial in symmetrischer Lösung auf 0 mV gesetzt ist.

### Bariumblock und Kir-Einzelkanäle



**Abbildung 3-5**

(A) Spannungabhängiger Bariumblock in symmetrischer Kaliumlösung bei Makrophagen. (B) Spannungabhängiger Bariumblock in HEK 293 Zellen transfiziert mit Kir2.1. (C) Cell-attached Messung von Kir-Kanälen in Makrophagen. (D) Auswertung der Messungen von Kir-Kanälen im Strom-Spannungsdiagramm.

Der Beginn des von Kir 2.1 getragenen Einwärtsstroms verändert sich damit beim Lösungswechsel von  $-80$  mV auf  $0$  mV. Abbildung: 3-4 zeigt die Spannungsrampen und die dazu aufgezeichneten Stromkurven während des gesamten Zeitverlaufs und die Stromspannungskurven von Start und Endpunkt der Messung ( $n=22$ ). Bei jeder Messung zeigten sich die dargestellten Veränderungen.

Kaliumkanäle werden von Barium in verschiedenen Konzentrationen geblockt. Besonders sensitiv für Barium sind die Kir-Kanäle. Applikation von  $1$  mM Barium blockiert diese Kanäle vollständig.

In symetrischem Kalium ist der einwärtsgerichtete Strom als starker Einwärtsstrom ab  $0$  mV deutlich erkennbar.  $1$  mM Barium wurde auf die Makrophagen appliziert. Die kleinere Grafik in Abbildung 3-5 A zeigt den Zeitverlauf des Einwaschens.

In der Stromspannungskurve in Abbildung 3-5 A zeigt sich der Bariumblock über die Zeit.

Der Bariumblock zeigt eine typische Charakteristik, seine Strom-Spannungskurve hat bei  $-60$  mV einen höheren Stromfluss als bei  $-100$  mV. Dies ist eine Besonderheit des Bariumblocks. Diese Spannungsabhängigkeit des Bariumblocks zeigt sehr genau seine Wirkung auf den Kanal. Das zweiwertige Bariumion passiert die Lipidmembran nicht. Es wird durch die höheren negativen Spannungen in der Zelle von außen in die Kanalpore gezogen, so dass das einströmende Kalium nicht an diesem großen Molekül vorbei in die Zelle eindringen kann. Die Kraft, mit der das Barium in die Kanalpore gezogen wird, ist bei höheren negativen Spannungen stärker, so dass kaum noch Kalium durch den Kanal fließt.

Zum Vergleich wurde in Abbildung: 3-5 B ein Bariumblock in einer mit Kir 2.1 transfizierten HEK 293 Zelle gezeigt. Dabei hat die Badlösung eine physiologische Kaliumkonzentration, d.h. der Block setzt bei  $-80$  mV ein, da dort das Kaliumgleichgewichtspotenzial liegt. Auch hier ist die typische Charakteristik des Bariumblocks zu erkennen.

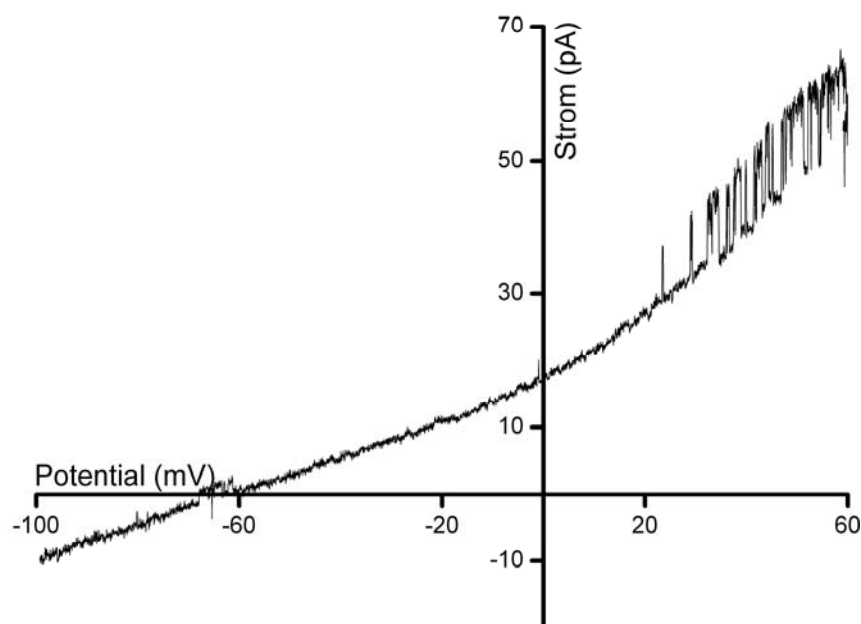
Abbildung 3-5 C bildet zwei Strom-Spuren bei  $-50$  und  $-70$  mV ab. Diese Stromspuren konnten in Cell—attached Messungen gewonnen werden. Die Abbildung zeigt Einwärtströme, die jedoch nicht invertiert dargestellt sind. Aus diesem Grund sind die



Offenzustände nach oben dargestellt. Aus  $n=9$  solcher Einzelkanal-Messungen konnte die Leitfähigkeit der Einwärtsgleichrichter mit  $G= 35 \pm 2$  pS bestimmt werden (Abbildung 3-5 D).

### Kir 2.1 Dichte in Makrophagen

Aus dem Vergleich von 150 mM Kalium-Badlösung mit 150 mM Kalium-Badlösung + 1 mM Barium läßt sich mit Hilfe der Leitfähigkeit eines Kir 2.1 Kanals von 35 pS die Anzahl der Kanäle pro Zelle errechnen. Dieser Wert ergibt noch kein vergleichbares Ergebnis, da die Anzahl der Kanäle auf die Größen der Zellen normalisiert werden muß. Die Größe einer Zelle kann direkt durch ihre Kapazität ausgedrückt werden. Die Anzahl der Kanäle kann über die Kapazität über die Membranfläche von  $1\text{mm}^2/\mu\text{F}$  normalisiert werden. Aus acht Analysen ergibt sich  $1 \pm 0,6$  Kir 2.1 Kanal pro pF.



**Abbildung 3-6**

Stromspannungskurve in der Spannungsrampe einer Makrophage. Ab 20 mV erscheinen die Öffnungen eines BK-Kanals. Gut zu erkennen ist die Erhöhung der Öffnungen bei höheren Potentialen des BK-Kanals.

### B<sub>Ca</sub>-Kanal

Ein weiterer Kanal wurde Cell-Attached relativ häufig gefunden. Seine durchschnittliche Leitfähigkeit ist  $200 \pm 6$  pS (n=7). Zudem ist er ein Auswärtsgleichrichter, bei dem sich bei negativen Potenzialen keine Öffnungsereignisse aufzeichnen lassen. Es gibt nur einen Kalium-Kanal mit dieser Leitfähigkeit, den B<sub>Ca</sub>. Der B<sub>Ca</sub> hat mehrere Synonyme wie BK, MaxiK, Slo oder als Gen KCNMA. Seine Leitfähigkeit wird mit 100-200 pS beschrieben. Dieser Kanal ist sowohl kalzium- als auch spannungsabhängig. Die Kalziumsensitivität ist nicht so affin wie bei anderen kalziumabhängigen Kaliumkanälen (Schilling *et al.*, 2002). Die Spannungsabhängigkeit läßt sich sowohl Cell-attached als auch Whole-Cell gut demonstrieren.

Vijay Reningunta konnte mittels RT-PCR Gentranskripte für den BK und dessen  $\beta$ -Untereinheit (Abbildung: 3-8) nachweisen. Die Expression von Maxi-K-Kanälen ist ein Maß für die Reife der Makrophagen (Gallin & McKinney, 1988). Die ersten Maxi-K-Kanäle wurden in zwei Wochen alten Makrophagen entdeckt. Je reifer die Makrophagen waren, desto wahrscheinlicher war ein Cell-attached Patch, indem sich ein BK-Kanal befindet. In Abbildung 3-7 ist zu erkennen, dass ein Auswärtsstrom ab 20 mV Spannung entsteht, der die Strom-Spannungskurve dann in Auswärtsrichtung verschiebt.

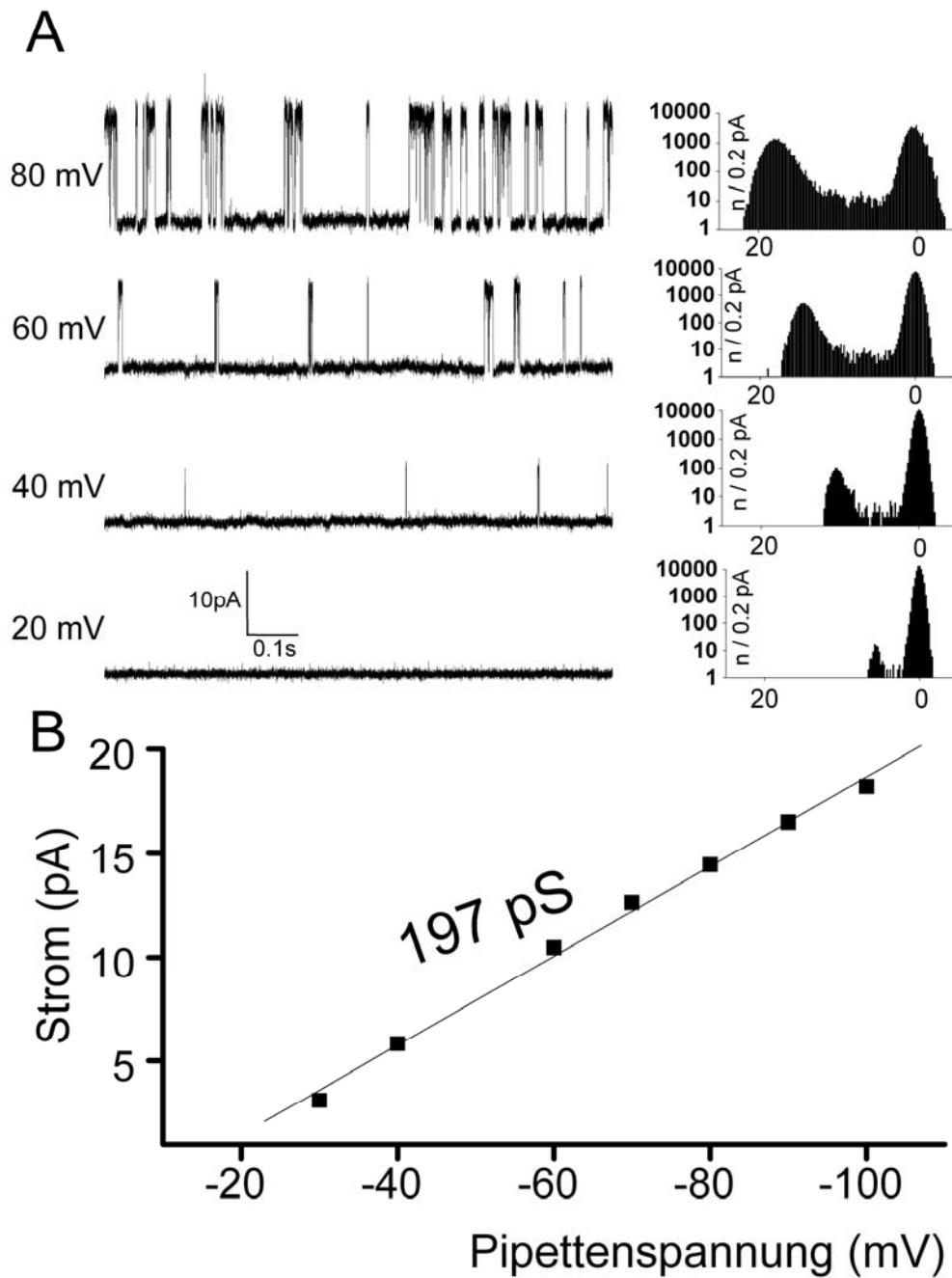
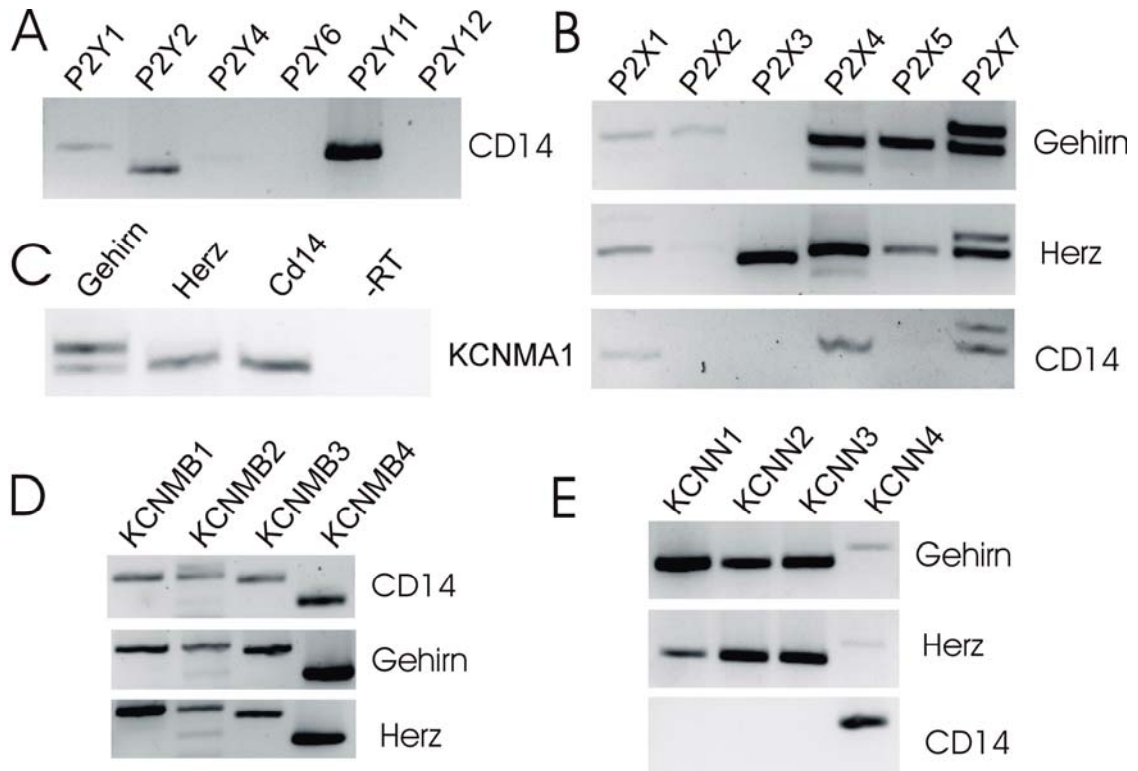


Abbildung 3-7

Typische Cell-Attached Messung eines BK's. (A) zeigt die Spannungspuren mit den Histogrammen, deutlich wird die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit bei höheren Spannungen erkennbar. (B) zeigt das Stromspannungsdiagramm bei angelegter Pipettenspannung.

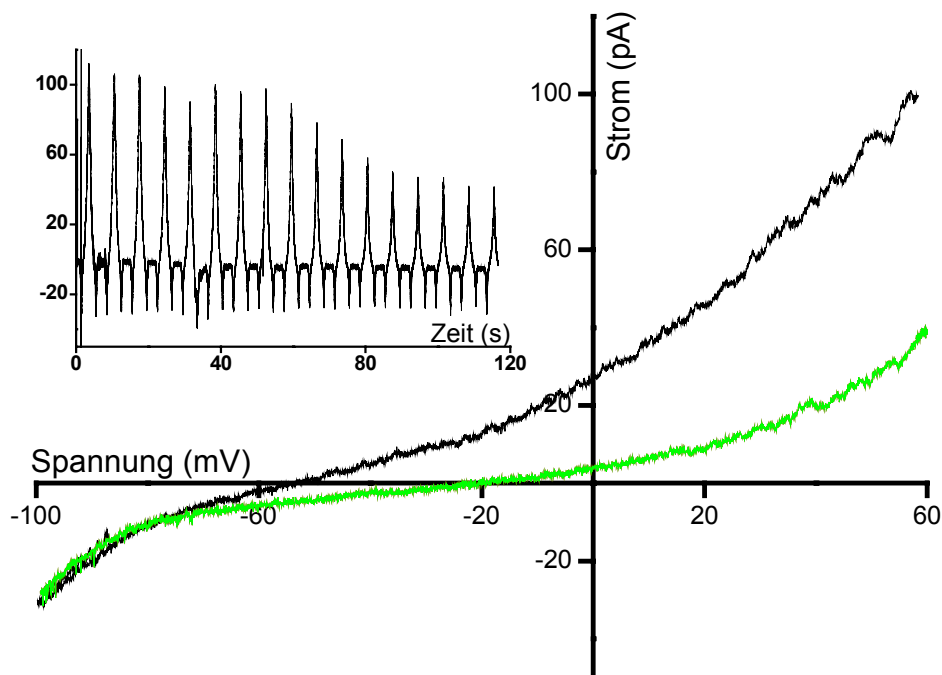
**Abbildung 3-8**

RT-PCR Expressionsanalysen an CD14 sortierten Makrophagen. (A) zeigt die drei in 2 Wochen alten Makrophagen vorkommenden P2Y-Rezeptoren. (B) Die drei in Makrophagen vorkommenden P2X-Rezeptorkanäle mit Kontrollen. (C) Nachweis des Gentranskripts des BK (KCNMA1) in Makrophagen. (D) Alle  $\beta$ -Untereinheiten vom BK werden in Makrophagen exprimiert. (E) Expressionsanalyse der SK Kanäle. Einzig der KCNN4 kann in Makrophagen gefunden werden.

### K2P in Makrophagen

Eine weitere Suche galt den K2P-Kanälen Task-1 und Task-3, die spezifisch von dem Endocannabinoid Anandamid gehemmt werden (Maingret *et al.*, 2001). Auf die Makrophagen wurde jeweils 10  $\mu$ M Anandamid appliziert. In vier Versuchen wurde bei einer Spannung von 60 mV 59.5 %  $\pm$  5,7 %. (n=4) des Auswärtsstroms gehemmt. Der Schnittpunkt beider Stromgeraden liegt bei -70 mV, was auf eine Kaliumleitfähigkeit hindeutet, die mit dem Anandamid geblockt wird. Insgesamt dauert der Block des Kaliumstroms relativ lang mit 112,5  $\pm$  26 s (n=4) bei einer durchschnittlichen Lösungswechselzeit von 15 s. Anandamid ist membrangängig, d.h. es kann durch die Membran hindurch diffundieren und dann innerhalb der Zelle wirken. Sehr lange Einwaschzeiten schließen eine Beeinflussung intrazellulärer Mechanismen nicht aus.

Die Untersuchung der RNA der Makrophagen ergibt, dass keine Task-1 oder Task-3 Ionenkanäle exprimiert werden, sondern THIK-1, THIK-2 und TWIK-2 (n=3). Der THIK-2 Klon konnte noch nicht funktionell exprimiert werden, so dass keine elektrophysiologische Daten über diesen Kanal vorliegen. Über TWIK-2 gibt es zwei widersprüchliche Veröffentlichungen (Patel *et al.*, 2000) und (Chavez *et al.*, 1999). Beide berichten nicht über eine Inhibition durch Anandamide. In Versuchen in der Arbeitsgruppe Daut, den TWIK-2 funktionell in Oocyten zu exprimieren, konnten wir nur sehr kleine Kaliumströme nachweisen, die sich durch die Blocker und Aktivator der beiden Publikation unbeeindruckt zeigen. THIK-1 hingegen kann exprimiert werden und zeigt in physiologischen Lösungen eine Auswärtsrektifizierung, die dem geblockten Strom zugeordnet werden kann. Von THIK-1 ist nicht bekannt, ob und wie er auf Anandamid reagiert.

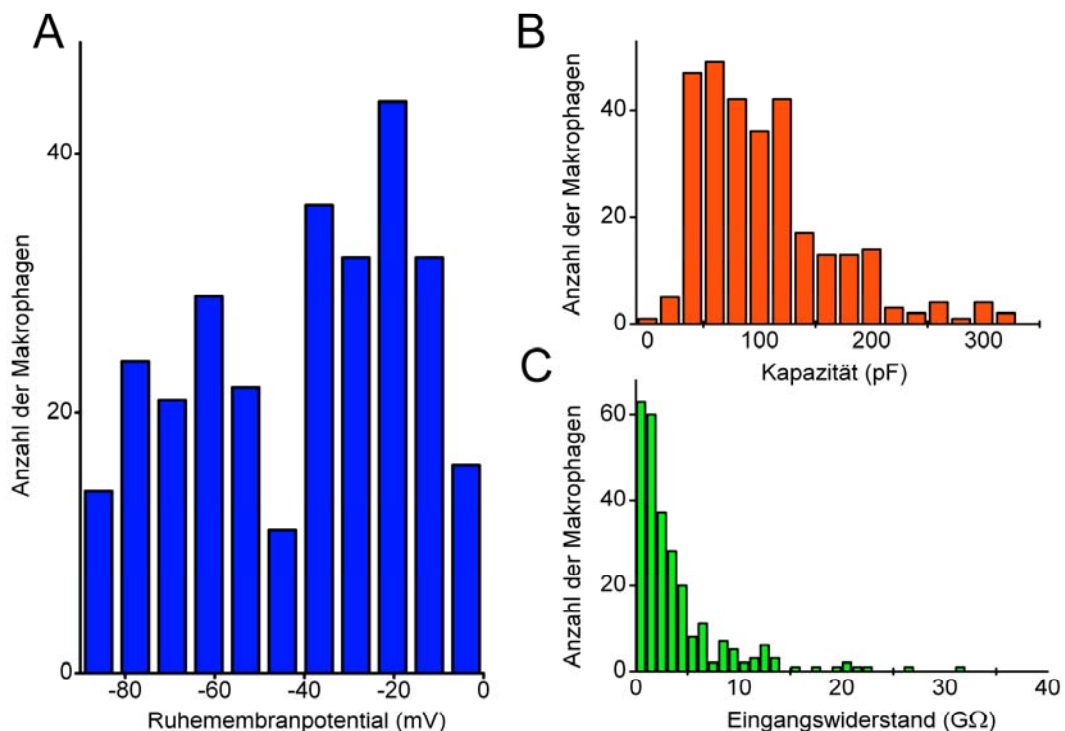


**Abbildung 3-9**

Die Wirkung von 10  $\mu$ M Anandamid zeigt eine Blockierung des Kaliumstroms. Die grüne Kurve zeigt den Strom während des Blocks. Das kleinere Fenster die Zeit des Einwaschens.

### 3.2 Durch 10 $\mu\text{M}$ ATP hervorgerufene Effekte

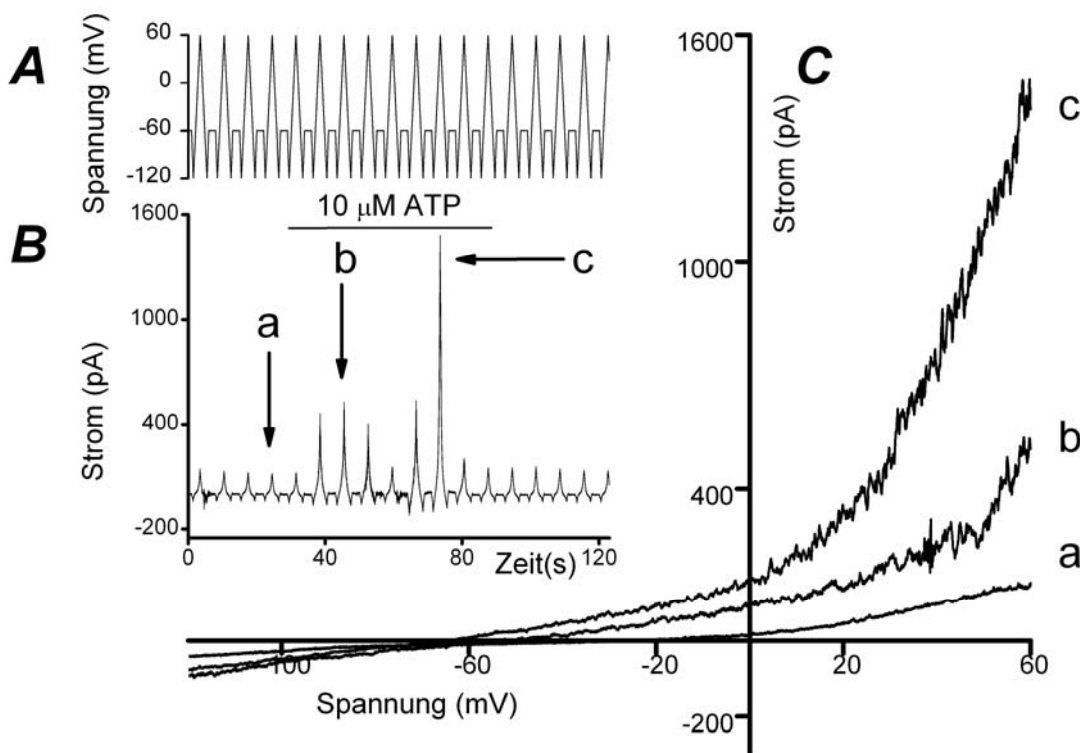
Wie in der Einleitung beschrieben, ist ATP ein wichtiger Messenger der Kommunikation der Zellen. ATP liegt in jeder Zelle in einer Konzentration von ca. 5 mM vor. Die Konzentration im Plasma oder im Interstitium ist bis jetzt eher Schätzungen unterlegen und zeigt einen Wert von 5-25  $\mu\text{M}$  auf der Zelloberfläche (Lazarowski *et al.*, 2003). Nach langer Überprüfung der Patchbarkeit und der Qualität der Makrophagen erwiesen sich Makrophagen in der Spiegelei-Form (Fried-egg) im Alter von zwei Wochen als am besten geeignet. Wie in Abbildung 3-10 zu sehen ist, ergab sich aus diesen Messungen eine durchschnittliche Kapazität von  $101 \pm 3,5$  pF ( $n = 295$ ), ein Ruhemembranpotenzial von  $40 \pm 1,5$  mV ( $n = 281$ ) und ein Eingangswiderstand von  $4,9 \pm 0,8$  G $\Omega$  ( $n = 268$ ) als passive Eigenschaften. Bei weiteren Experimenten mit 2 Wochen alten humanen Makrophagen, sind 10  $\mu\text{M}$  ATP auf die Zellen appliziert worden.



**Abbildung 3-10**

Die passiven elektrischen Eigenschaften aller 2 Wochen alten, „Fried egg“ Makrophagen sind in dieser Abbildung ausgewertet. In (A) ist das Ruhemembranpotenzial ausgewertet und zeigt einen bimodalen Verlauf mit Maxima bei  $-20$  mV und  $-70$  mV. In (B) ist die Kapazität aufgetragen, die um einiges höher ist als bei den Makrophagen ohne „Fried egg“ Form. (C) zeigt alle Eingangswiderstände. Dabei sind bei den niedrigen Eingangswiderständen nie Oszillationen gemessen worden.

Bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ATP in Ganz-Zell-Messungen (Spannungsklemme) zeigt sich eine Erhöhung der Auswärtsströme. Die Pipettenlösung für die Ganz-Zell-Messungen ist mit dem divalenten Kationen-Chelator EDTA (0.1 mM) gepuffert. Die geringe Konzentration von EDTA läßt Kalziumänderungen in der Zelle zu, so dass kalziumabhängige Membran- und zytosolische Prozesse frei ablaufen können. Während einer ständigen Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ATP zeigen die Auswärtsströme in der Spannungsklemme bei Depolarisationen verschieden hohe Maxima bis zu +60 mV (n=4). Die Auswärtsströme sind Kaliumströme, da ihr Umkehrpotenzial in der Nähe des Kaliumgleichgewichtspotenzials bei -70 mV ( $E_K = -96$  mV) liegt. Abbildung 3-11 zeigt eine solche Aufnahme, in der die Stromänderungen über die Zeit deutlich zu erkennen ist. Um mehr Informationen über die Wirkung von 10  $\mu\text{M}$  ATP auf die Kaliumkanäle zu erhalten, sind Fluoreszenzmessungen an den Makrophagen vorgenommen worden.

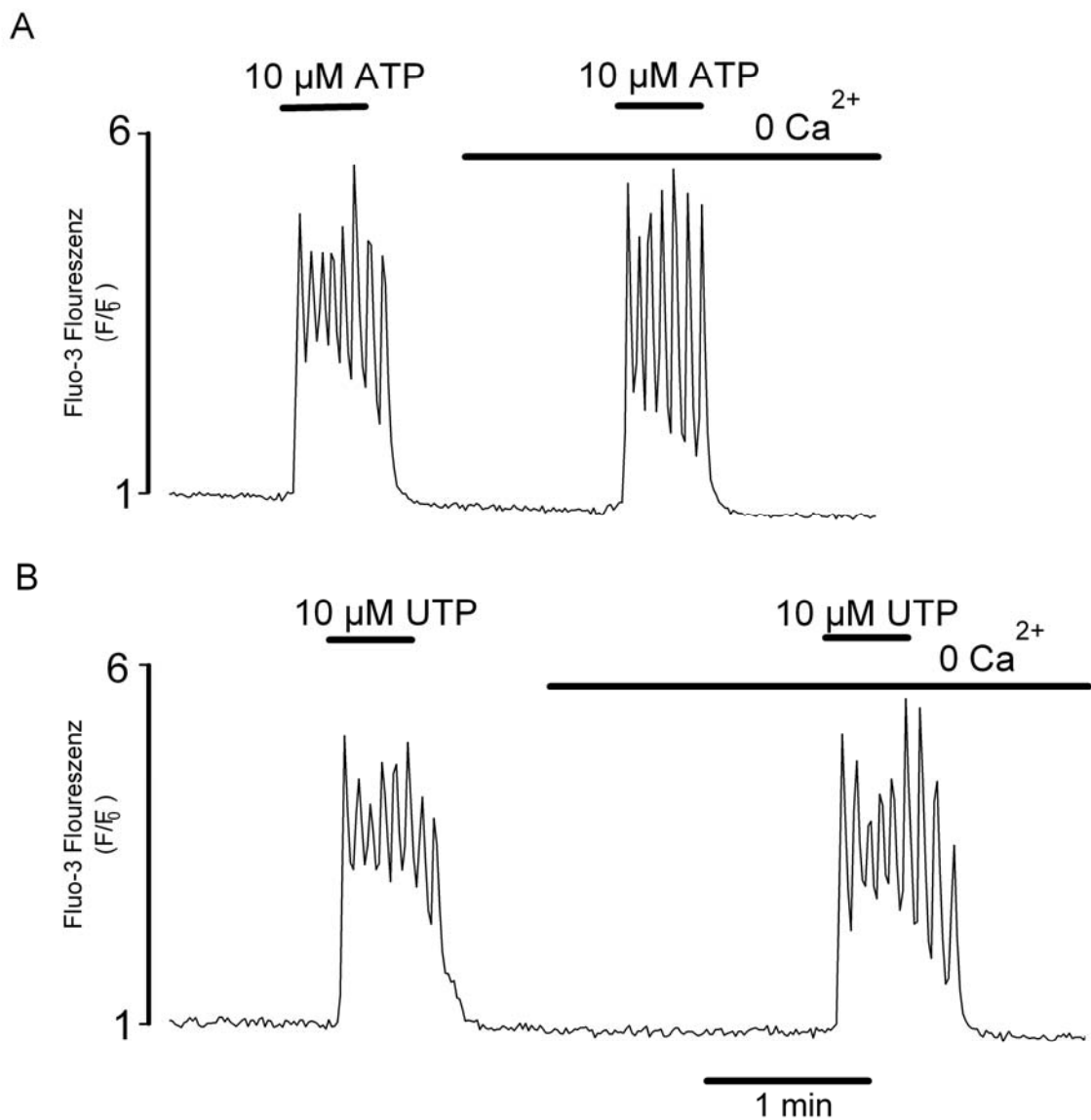


**Abbildung 3-11**

Die Abbildung zeigt Oszillationen in den Auswärtsströmen die bei sich ständig wiederholenden Spannungsrampen aufgenommen wurden. (A) zeigt die Spannungsrampen über die Zeit. (B) Zeigt die Stromantwort auf die Spannungsrampen mit verschieden hohen Maxima. (C) zeigt die Strom-Spannungskurven der einzelnen Maxima aus B.

### Fluoreszenzmessungen an Makrophagen mit 10 $\mu\text{M}$ ATP

Diese Messungen zeigen, dass es bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ATP zu Oszillationen des Kalziums (Fluo-3) in den Makrophagen kommt. Die Oszillationen haben eine Frequenz von 3 bis 19 in der Minute. Im Durchschnitt sind das  $12,1 \pm 0,7$  Oszillationen pro Minute ( $n=31$ ). Applikation von 10  $\mu\text{M}$  UTP zeigt Oszillationen des intrazellulären Kalziums von durchschnittlich  $11,5 \pm 0,7 \text{ min}^{-1}$  ( $n=6$ ). Dieser Unterschied in der Frequenz war nicht signifikant ( $P > 0,05$ ).



**Abbildung 3-12**

Die Abbildung zeigt in (A) die Fluoreszenzantwort von „Fried egg“ Makrophagen während der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ATP. Es entstehen Kalziumoszillationen, die mit dem Entzug des ATP's aufhören. In (B) entstehen Kalziumoszillationen als Antwort auf UTP. Auch sie sind beendet mit dem Entzug des UTP's. Beide Kalzium Oszillationen in A und B werden nicht durch extrazelluläres Kalzium beeinflusst.



Für diese Reaktion auf extrazelluläres ATP können die in der Einleitung schon erwähnten Purinrezeptoren P2X und P2Y verantwortlich sein (Abbraccio & Burnstock, 1994). P2X-Rezeptoren werden nicht durch UTP aktiviert. Einige P2Y-Rezeptoren (z.B. P2Y<sub>2</sub>) werden jedoch von beiden Agenzien ATP und UTP gleich stark aktiviert (Ralevic & Burnstock, 1998; North, 2002). Weiterhin sollte ein Entfernen des extrazellulären Kalziums die Kalziumoszillationen, die durch P2X-Rezeptoren vermittelt werden, aufheben.

Werden auf die Makrophagen kalziumfreie Lösung und 10 µM ATP oder 10 µM UTP appliziert, zeigen sich die Oszillationen unverändert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch ATP ausgelösten Kalziumoszillationen durch die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern in das Zytoplasma erfolgen muß.

### 3.2.1 RT-PCR Analysen von Purinrezeptoren (P2Y)

Das Expressionsmuster der RT-PCR-Analyse (Abbildung 3-8) der zwei Wochen alten, CD14<sup>+</sup> aufgereinigten Makrophagen zeigt Signale für P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>11</sub>, wobei die Bande für die P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren sehr schwach ausfällt. P2Y<sub>11</sub> wird nicht durch UTP aktiviert (Ralevic & Burnstock, 1998; von Kugelgen & Wetter, 2000), was bedeutet, dass dieser Rezeptor auch keinen Anteil an den Kalziumoszillationen hat, da diese durch UTP und ATP gleich stark ausgefallen sind. Um genau zu unterscheiden, welcher der P2Y-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>2</sub> den Hauptanteil an den Kalziumoszillationen hat, wurde zusätzlich mit UDP, ADP und 2-Methylthio-ATP experimentiert.

P2Y<sub>1</sub> wird durch ADP, UDP und 2-Methylthio-ATP aktiviert.

Bei der Zugabe dieser Stoffe während der Fluoreszenzmessung reagierten 6 von 12 Zellen auf 10 µM ADP (Maximum  $F/F_0$ ,  $5.8 \pm 0.2$ ; n = 6), auf 10 µM UDP reagierten 5 von 10 Zellen (Maximum  $F/F_0$   $5.6 \pm 0.5$ ; n = 5). Auf 10 µM 2-Methylthio-ATP zeigt keine Makrophage eine detektierbare Fluoreszenz bei 9 Messungen.

### 3.2.2 Stromklemmen Experimente mit 10 $\mu\text{M}$ ATP zeigen schnelle Depolarisation

Die intrazellulären Kalziumoszillationen könnten für die starken Veränderungen im Auswärtsstrom während der Spannungsklemme verantwortlich sein. Um die Veränderungen im Potenzial der Makrophagen herauszuarbeiten, sind bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ATP Stromklemmenmessungen durchgeführt worden. Sie zeigten mit Beginn des Einwaschens von ATP eine frühe Depolarisation mit später folgenden, sich wiederholenden Hyperpolarisationen mit einer Frequenz von 7-16  $\text{min}^{-1}$  ( $n = 11$ ). Bei einer zweiten, folgenden Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ATP blieben die hyperpolarisierenden Membranpotenzialsoszillationen bestehen, die frühe Depolarisation wurde kleiner.

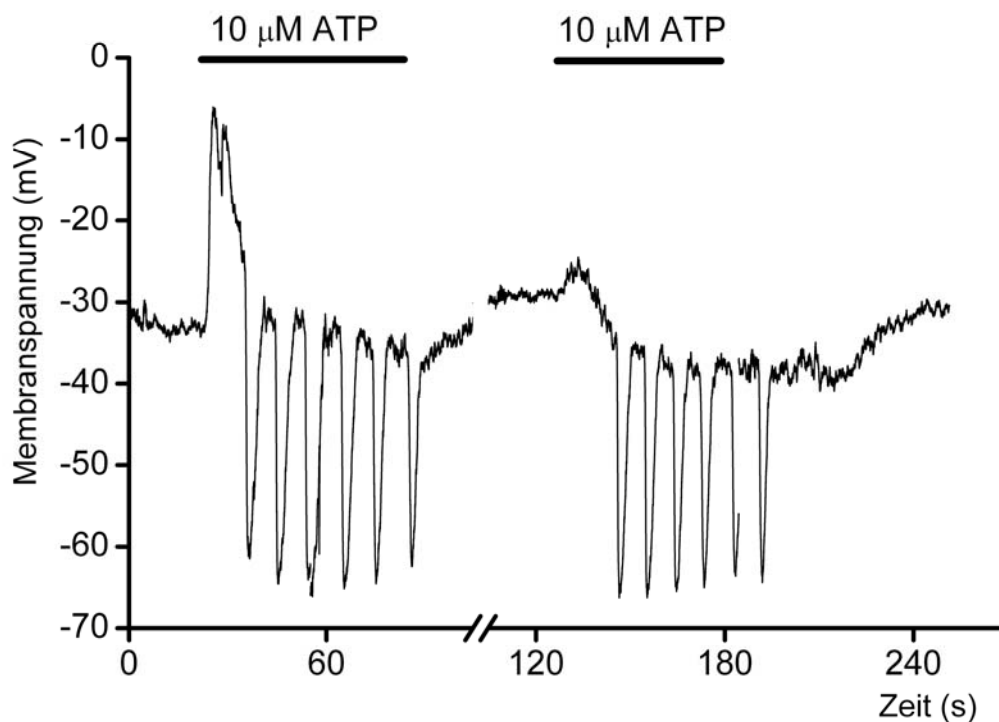


Abbildung 3-13

Die Abbildung zeigt eine Ganz-Zell Stromklemme einer Makrophage während der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ATP. Es zeigt sich eine frühe Depolarisation als Antwort auf das ATP, die dann in Hyperpolarisationsoszillationen übergeht. Bei einer zweiten Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ATP ist die Depolarisation kleiner, die Hyperpolarisationen bleiben.

Da die Kaliumstromänderungen nur eine Verschiebung des Membranpotenzials in Richtung Kaliumgleichgewichtspotenzial zur Folge haben können, muß die frühe Depolarisation einen anderen Ursprung haben.

Ersetzen des extrazellulären Natriums und Kalziums aus dem Badmedium durch NMDG (N-methyl D-glucamine) kann helfen, zu verstehen ob die Depolarisation ihren Ursprung in der Badlösung hat. NMDG ist ein positiv geladenes Molekül, das nicht durch Ionenkanäle oder Transporter in die Zelle gelangt. Wie in Abbildung 3-14 gezeigt, verschwindet die frühe Depolarisation, wenn sich im äußeren Medium kein Natrium oder Kalzium befindet ( $n = 3$ ). Die Hyperpolarisationen bleiben in natrium- und kalziumfreien Lösungen bestehen.

Zusammenfassend zeigen sich bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ATP auf Makrophagen zwei Effekte. Erstens die Hyperpolarisationen werden durch interne Kalziumfreisetzung erzeugt und bleiben auch bei der oben genannten Veränderungen im Badmedium bestehen. Zweitens die Depolarisation wird durch ATP-sensitive Rezeptoren vermittelt, die einen Einstrom positiver Ionen von außen zulassen, der aber eine Tachyphylaxie zeigt.

P2X-Rezeptoren haben Eigenschaften, die mit den Ergebnissen der Experimente eine hohe Übereinstimmung zeigen. P2X sind ligandengesteuerte und nicht spezifische Kationenkanäle. Sie bilden keine Ströme aus, wenn das externe Medium der Zellen keine Ionen enthält die geleitet werden. Dies verhindert eine Depolarisation.

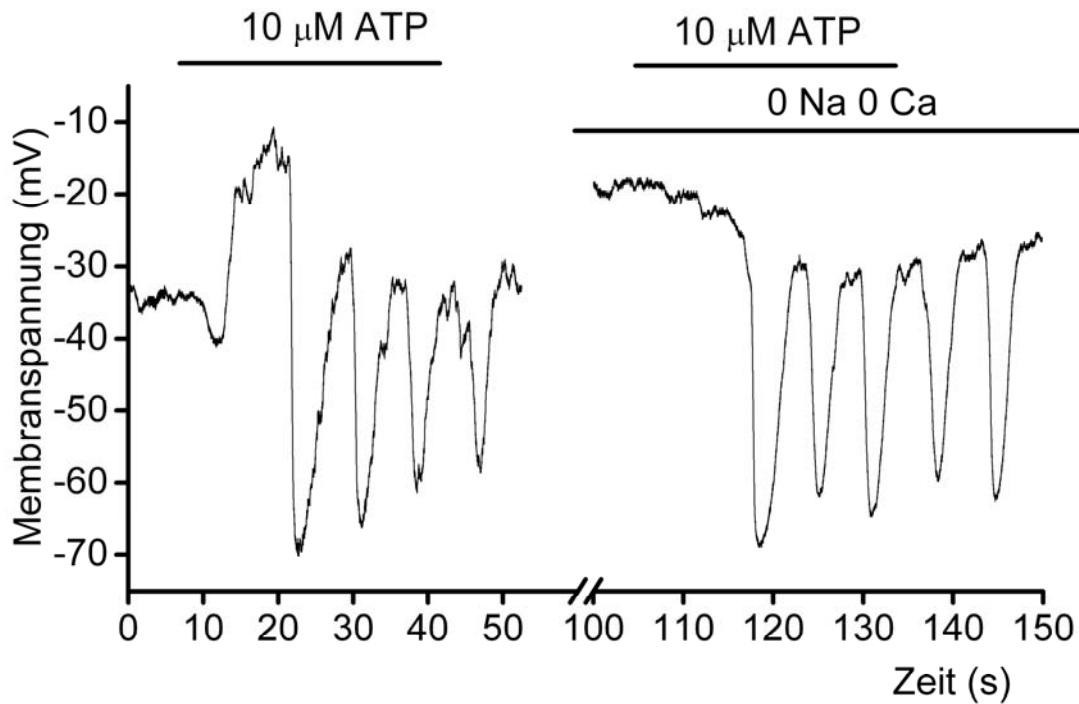


Abbildung 3-14

Die Abbildung zeigt eine Ganz-Zell Stromklemme. Die frühe Depolarisation tritt nicht auf, wenn sie im Kalzium-freien Medium ausgelöst wird.

### 3.2.3 Fluoreszenzmessungen zeigen P2X und P2Y Rezeptoren

Die Aufzeichnung der Fluoreszenzantwort der Makrophagen mit dem Fokus auf die P2X-Rezeptoren zeigten detaillierter das feine Zusammenspiel der Purinrezeptoren. P2X-Rezeptoren werden durch UTP nicht aktiviert. Zudem ist von P2X-Rezeptoren bekannt, dass sie inaktivieren bzw. desensibilisieren.

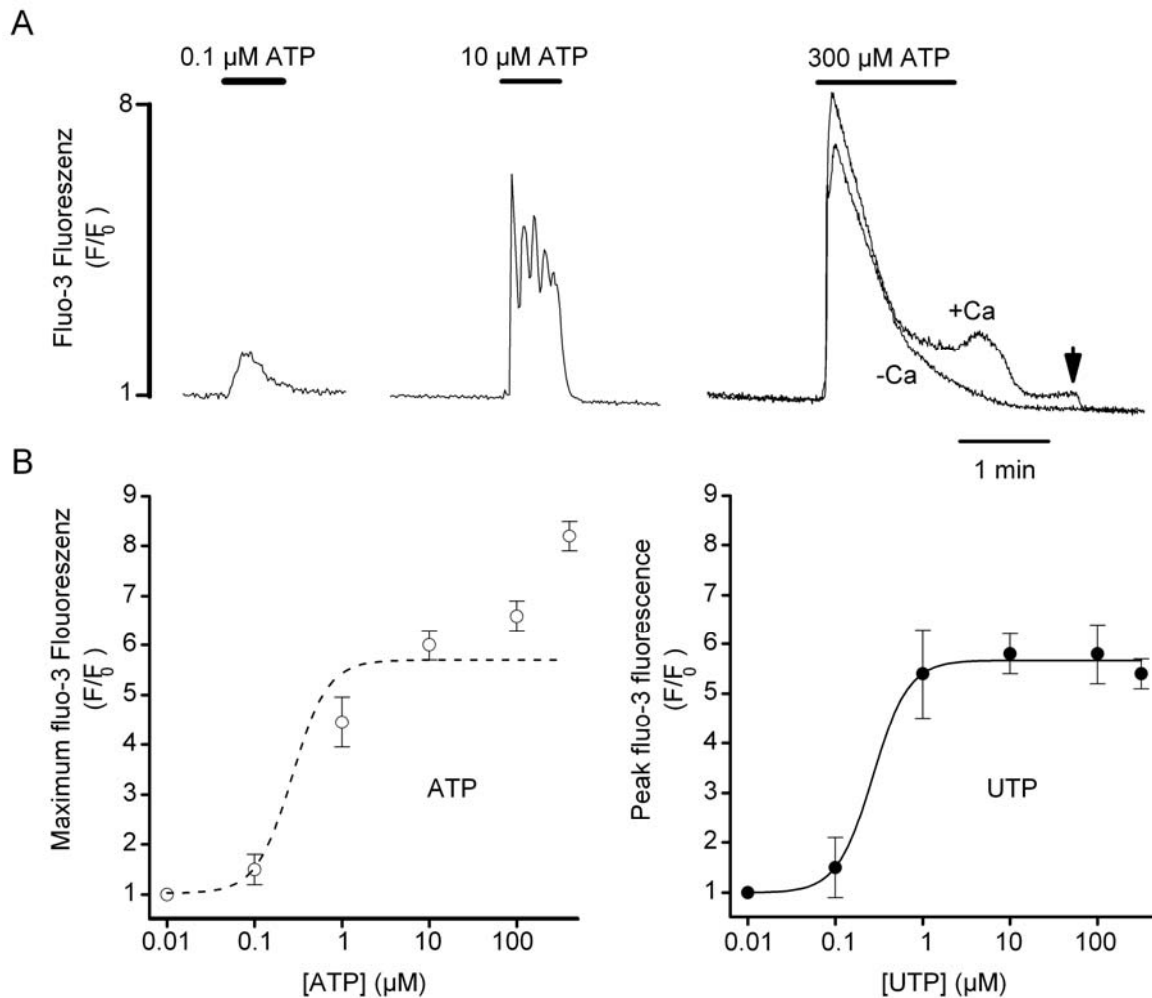


Abbildung 3-15

Konzentrationsabhängigkeit von ATP und UTP. (A) zeigt verschiedene Konzentrationen von ATP und ihre Wirkung auf das intrazelluläre ATP. Der Pfeil zeigt den Effekt, wenn kalziumfreie Badlösung benutzt wird. (B) ATP Maxima gegen Konzentration aufgetragen. Die gepunktete Linie ist die UTP Konzentrationskurve. Die zweite Abbildung von (B) zeigt die Dosis Wirkungskurve von UTP.

Aus diesem Grund wurden von den Kalziummessungen nur die anfänglichen Maxima für die Dosiswirkungskurve ausgewertet. Der halbmaximale Effekt von UTP ( $EC_{50}$ ) erreicht einen Wert von  $0,3 \mu\text{M}$  und die Dosiswirkungskurve flacht bei Werten größer als  $1 \mu\text{M}$  ab Abbildung 3-15. Die Effekte, die mit UTP erzielt werden, zeigen die Dosiswirkungskurve der P2Y-Rezeptoren. Die Erhöhung der Kalziumfluoreszenz durch ATP zeigt die Überblendung beider Kurven mit dem zweiten Rezeptortyp, den P2X-Rezeptoren.

Bei höher konzentriertem ATP von  $300 \mu\text{M}$  in ABB 3-15 A zeigt sich, dass nach dem Anstieg der Kalziumfluoreszenz eine Plateauphase bleibt, die möglicherweise durch

nicht desensitivierte P2X oder durch store-operated Channels ( $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle die direkt über den Füllungsstatus der intrazellulären Speicher kontrolliert werden) getragen wird. Dieses Plateau verschwand bei der Entfernung des extrazellulären freien Kalziums aus dem Badmedium.

### 3.2.4 RT-PCR Analysen von Purinrezeptoren (P2X)

RT-PCR Analysen zeigten, dass  $\text{CD14}^+$  positive Makrophagen mRNA von  $\text{P2X}_1$ ,  $\text{P2X}_4$  und zwei Splice-Varianten von  $\text{P2X}_7$  (Abbildung 3-8) exprimieren. Die Kontrollen in denen alle P2X-Rezeptoren gefunden wurden, mit der cDNA vom Gehirn und vom Herzen zeigen die Qualität der Primer.

### 3.2.5 Schnelle Spannungssprünge in der Spannungsklemme zeigt den Ursprung des Stroms

Als logische Konsequenz ergibt sich aus der Betrachtung der beiden Klassen von Purinrezeptoren, diese in der Ganz-Zell Konfiguration zu isolieren. Die P2X-Rezeptoren sind unspezifische Kationen-Kanäle, d.h. sie zeigen bei einer Haltespannung von 0 mV keinen Strom. Ergibt sich bei 0 mV während der Applikation von  $10 \mu\text{M}$  ATP ein Strom, so kann dieser nicht durch unspezifische Kationenkanäle fließen, da sich diese im Gleichgewicht befinden und keine treibende Kraft auf sie wirkt.

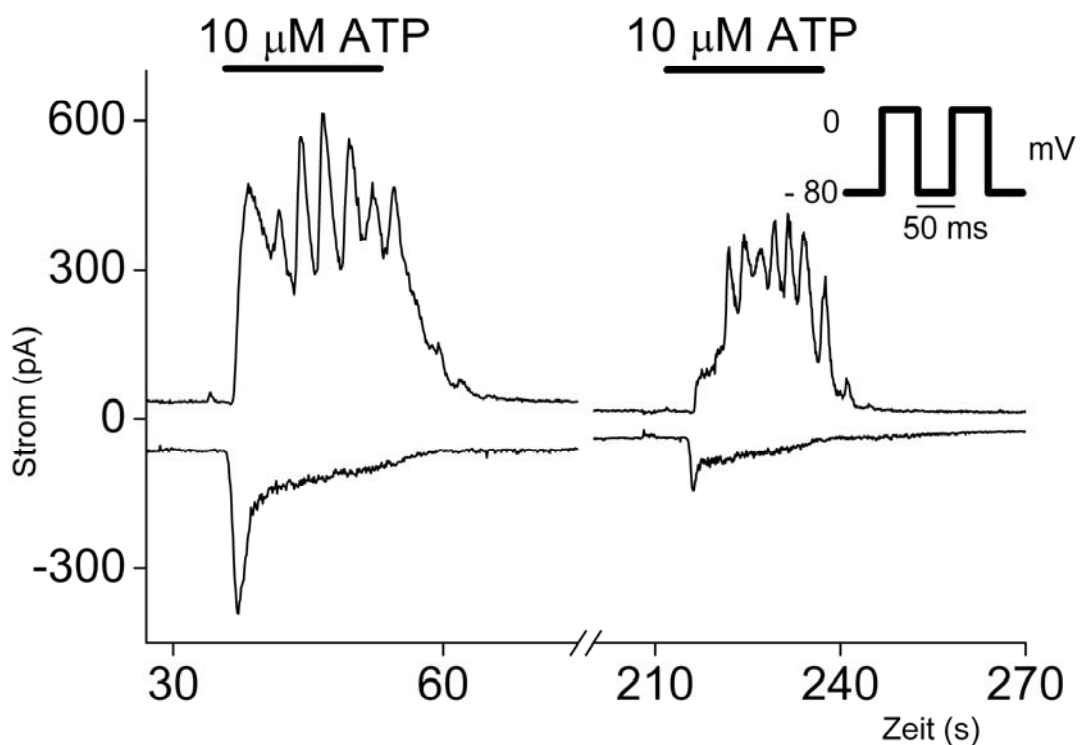
Die P2Y-Rezeptoren sind über ein Gq-Protein mit der PLC verbunden. Die Freisetzung von  $\text{IP}_3$  (Inositoltriphosphat) ergibt sich aus der Spaltung von  $\text{PIP}_2$  (Phosphoinositolbisphosphat).  $\text{IP}_3$  öffnet daraufhin die Kalziumkanäle in den internen Speichern der Makrophagen und sorgt damit für einen Anstieg des zytosolischen Kalziums. Das Kalzium wiederum wirkt auf die beiden kalziumabhängigen Kaliumkanäle BK und IK. Klemmen wir das Potenzial auf  $-80 \text{ mV}$ , so befinden sich die Kaliumkanäle nahe dem Gleichgewichtspotenzial für Kalium.  $E_K$  ( $-96 \text{ mV}$ ) errechnet sich über die Nernst-Gleichung.

Ströme, die bei diesem Potenzial durch Applikation von  $10 \mu\text{M}$  ATP erkennbar werden, können keine Kaliumströme sein. Mit diesem Ausschlußverfahren sind bei 0 mV

Steigerungen der Kaliumleitfähigkeiten (vermittelt durch erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeiten der Kaliumkanäle) zu erkennen.

Bei  $-80$  mV sollte man einen Strom erkennen, der durch das einströmende Natrium und Kalzium getragen wird. Dieser Strom wird durch unspezifische Kationenkanäle getragen. Hier sollte eine erhöhte Öffnung der P2X-Rezeptorkanäle zu erkennen sein.

Aufgrund dieser Überlegung alterniert im Spannungsprotokoll für die Spannungsklemme die Haltespannung alle 50 ms von 0 mV auf  $-80$  mV. Abbildung 3-16 zeigt ein solches Experiment. Die obere Stromlinie zeigt den Strom bei 0 mV Haltepotenzial. Die untere Stromlinie zeigt den Strom bei  $-80$  mV. Deutlich ist der frühe Einstrom in der unteren Stromlinie zu erkennen. Dieser Einwärtsstrom desensitiviert schnell und strebt während der Applikation von  $10 \mu\text{M}$  ATP schon zu einem Minimum hin. In der oberen Stromlinie ( $0$  mV) erkennt man die sich in der Stromklemme abzeichnenden Auswärtsstromoszillation. Sie zeigen eine nur leichte Desensitivierung.



**Abbildung 3-16**

Voltage-Clamp mit schnellen Wechseln zwischen 0 und  $-80$  mV während der Applikation von  $10 \mu\text{M}$  ATP. Die obere Linie zeigt die Stromantwort bei 0 mV, die untere Linie die Stromantwort bei  $-80$  mV. Eine Verringerung des Einwärtsstroms bei  $-80$  mV ist bei der zweiten Applikation von  $10 \mu\text{M}$  ATP zu erkennen. Die Ströme bei 0 mV oszillieren auch bei der zweiten Zugabe.

Bei einer zweiten folgenden Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ATP zeigen die Ströme Veränderungen, die zu den Spannungen in der Stromklemme passen. Wie in der Stromklemme deutlich zu sehen ist, fällt bei der zweiten Applikation die Depolarisation deutlich schwächer aus. In der Spannungsklemme ist in der unteren Stromspur eine deutliche Reduzierung des frühen Einstroms zu erkennen. Die P2X-Rezeptoren befinden sich in einem desensitisierten Zustand, der durch die erste Applikation entstanden ist und noch teilweise andauert, so dass nur eine kleine Population von P2X-Rezeptoren auf einen erneuten Stimulus antwortet. Auch bei den Auswärtsstromoszillationen ist eine Reduktion in der Amplitude zu erkennen. In der Stromklemme bleiben die Hyperpolarisations-Oszillationen bestehen. Dies deutet auf eine leichte Desensitivierung der P2Y Rezeptoren hin. Die Experimente in der Spannungsklemme haben eine Frequenz zwischen 8 und 23 pro Minute sowie einen Durchschnittswert von  $15 \pm 1 \text{ min}^{-1}$  und konnten mit dem Spannungsprotokoll (0 mV und  $-80 \text{ mV}$ ) ( $n = 8$ ) oder in kontinuierlichen Haltespannungen von 0 mV oder  $-80 \text{ mV}$  wiederholt werden ( $n = 32$ ).

Bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  UTP konnten die gleichen Ströme sowohl bei 0 mV, als auch bei der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ATP gemessen werden. Bei  $-80 \text{ mV}$  konnte kein Einstrom aufgezeichnet werden, was zusätzlich einen Beweis für die Bedeutung dieser Ströme durch P2X-Rezeptoren ist.

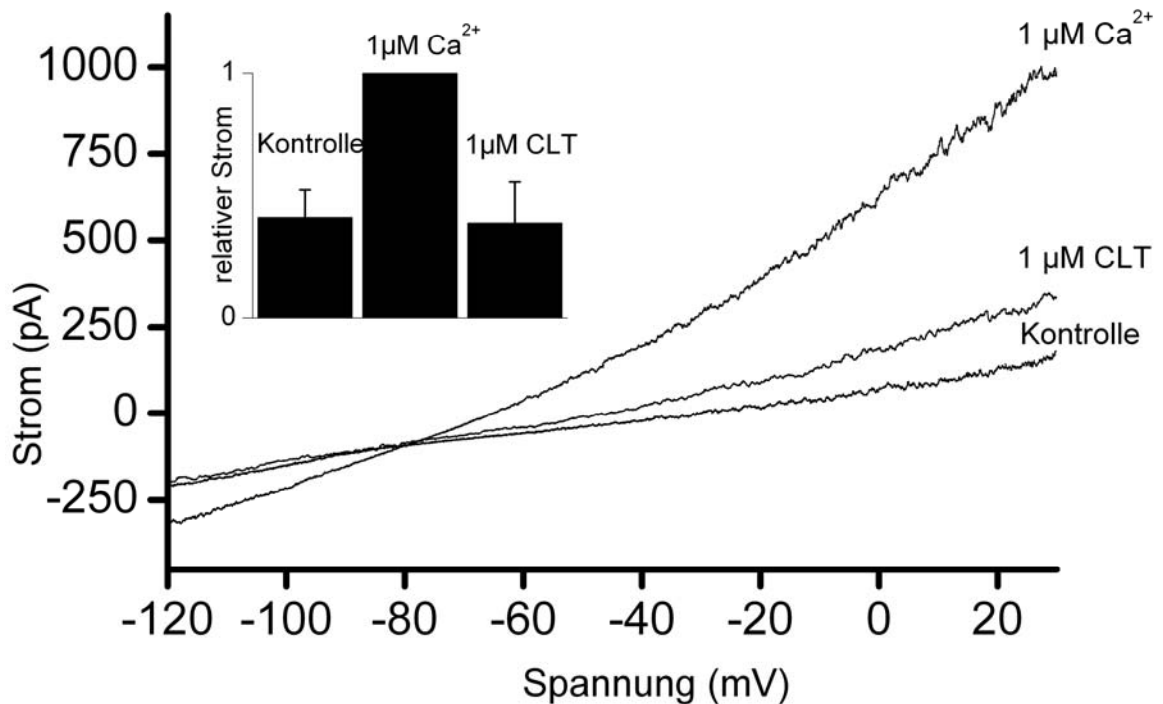
Die Oszillationen in der Spannungsklemme zeigen auf die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  ATP einen oszillierenden Kaliumstrom (Abbildung 3-11). Sind diese Erhöhungen des Stroms abhängig vom Kalzium?

### 3.2.6 Messung der kalziumabhängigen Ströme in Makrophagen

In der Ganz-Zell-Konfiguration dialysiert mit der Dauer des Patches die Pipettenlösung die Zelle. Mit erhöhten Kalzium in der Pipettenlösung wird so das Kalzium im Zytosol der Zelle erhöht. Kalziumabhängige Kaliumkanäle würden dann ihren Kaliumstrom verstärken. Direkt nach dem Einbrechen in die Ganz-Zell-Konfiguration wird eine erste



Spannungsrampe aufgezeichnet, um den „Normal“ Zustand des Kalziums der Zelle zu dokumentieren.



**Abbildung 3-17**

Strom-Spannungskurve eines Makrophagen mit 1 µM intrazellulären Kalzium. Die Kontrolle wurde direkt nach dem Einbrechen in die Zelle genommen. Nach 2 min zeigte sich eine Erhöhung eines linearen Kaliumstroms mit Umkehrpotenzial bei -80 mV. Clotrimazol blockiert diesen Strom fast vollständig.

Mit einer Pipettenlösung, in der das Kalzium auf 1 µM geklemmt wird, zeigt Abbildung 3-17, dass der Kaliumstrom mit der Dialyse des Kalziums ins Zytoplasma langsam ansteigt. Nach 2 Minuten erreicht dieser kalziumabhängige Kaliumstrom sein Maximum. Der Auswärtstrom steigt an, aber auch der Einwärtsstrom zeigt einen Anstieg. Mit Clotrimazol, einem Blocker für alle SK-Kanäle, kann man diesen durch das Kalzium angestiegenen Strom fast komplett blockieren. Zudem fällt auf, dass es keine spannungsabhängige Komponente des Stroms gibt. Dies deutet daraufhin, dass in einem Spannungsbereich bis 30 mV die spannungsabhängigen und kalziumabhängigen BK-Kanäle kaum in den offenen Zustand wechseln.

BK-Kanäle sind ein deutliches Zeichen für den Reifungsgrad der Makrophagen. Je länger die Monozyten zu Makrophagen ausreifen, desto mehr BK-Kanäle sind mit Cell-

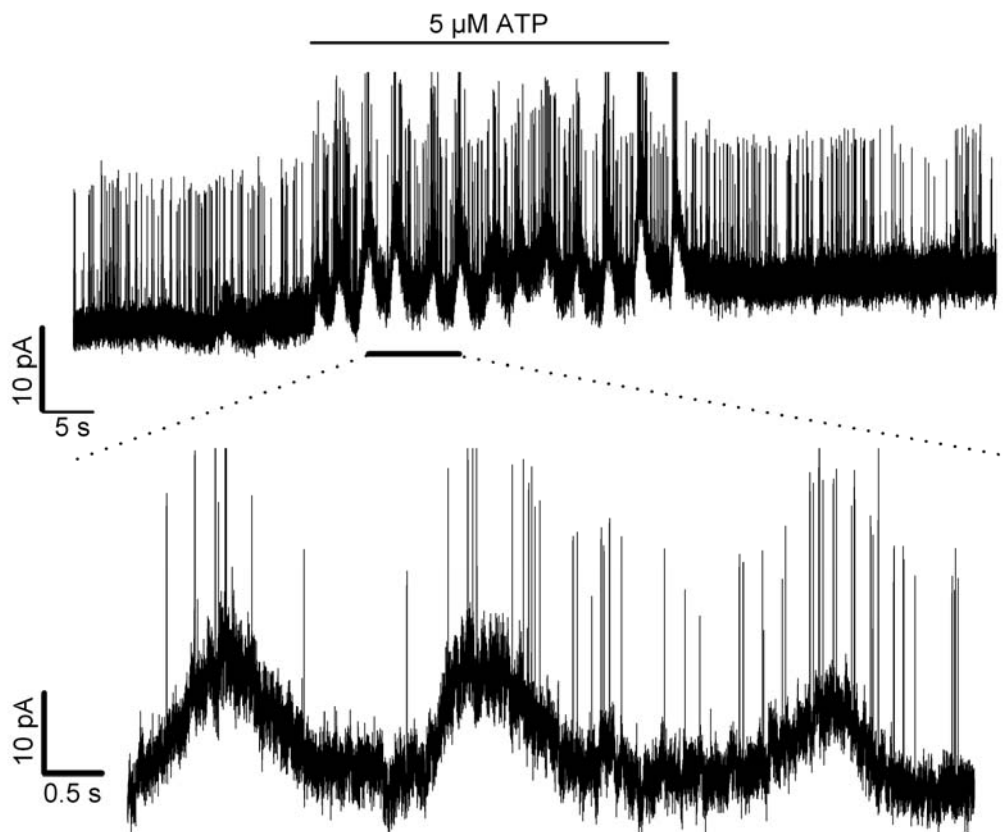
Attached-Messungen auffindbar (Kim *et al.*, 1996). In dieser Arbeit konnten BK-Kanäle Cell-Attached gemessen werden. Ihre Leitfähigkeit lag bei  $197 \pm 5.7$  pS ( $n = 7$ ) (Abbildung 3-8). Aus diesen Daten ergibt sich, dass sowohl der BK als auch mindestens einer der SK-Kanäle in den humanen zwei Wochen alten Makrophagen exprimiert ist.

Die Auswärtsstromoszillationen sind die Träger der Hyperpolarisationsoszillationen der Makrophagen. Sie sind durch  $10 \mu\text{M}$  ATP ausgelöst und werden durch die Purin-Rezeptoren der P2Y-Klasse und deren Erhöhung des intrazellulären Kalziums vermittelt. Diesen Kaliumauswärtsströmen liegen zwei Kaliumkanäle zu Grunde, der kalziumabhängige BK und der kalziumabhängige IK (SK-4). RT-PCR Untersuchungen an  $\text{CD14}^+$  selektierten Makrophagen zeigen eine Spleißform des BKs (*KCNMA1*), wobei mit den gleichen Primern zwei Spleißvarianten im Gehirn nachgewiesen werden konnten. Die Sequenzierung der amplifizierten DNA zeigte, dass es sich um eine Splicevariante handelt. Zudem zeigte die Amplifikation der aus den Makrophagen gewonnen cDNA, dass alle  $\beta$ -Untereinheiten (*KCNMB1-4*) (Abbildung 3-8) des BKs in Makrophagen exprimiert werden. Die Expressionsanalyse bezüglich der kalziumabhängigen IK Kanäle ergab, dass von den vier Genen SK1, SK2, SK3 und SK4 einzig SK4 (*KCNN4*) in Makrophagen exprimiert wird. Welche der beiden kalziumabhängigen Kaliumkanalpopulationen ist für die Auswärtsströme wirklich verantwortlich?

### 3.2.7 Cell-attached Messungen der kalziumaktivierten Kaliumkanäle

Die grundlegenden Eigenschaften dieser Kanäle ist oben schon ausgeführt worden. Der IK ist kalziumsensitiver als der BK, der BK ist spannungsabhängig, der IK ist spannungsunabhängig. In einem Cell-attached Versuch sind diese Eigenschaften für die Klassifizierung ausnutzbar.

Eine  $150 \text{ mM}$  Kalium Badlösung erzeugt eine Depolarisierung der Zelle. Sie klemmt das Potenzial der Zelle auf  $0 \text{ mV}$ . Bei Applikation von  $10 \mu\text{M}$  ATP wird das zytosolische freie Kalzium steigen und die kalziumabhängigen Kaliumkanäle mit vermehrtem Öffnen reagieren.



**Abbildung 3-18**

Cell-Attached Messung bei  $-80$  mV Pipettenpotenzial. Bei der Applikation von  $5\mu\text{M}$  ATP ist eine Oszillation der Baseline zu erkennen. Diese Oszillationen sind noch einmal vergrößert dargestellt.

Durch das Öffnen der Kaliumkanäle wird das Membranpotenzial der Makrophagen nicht beeinflusst, da es sich durch die gleiche Konzentration des Kaliums innen wie außen keine Ladungsverschiebungen ergeben.

Der Patch an der Zellmembran kann aber unter unterschiedliche Spannungen gesetzt werden. In diesem Experiment lag eine Pipettenspannung von  $-80$  mV vor. Aufgrund der Vorzeichenumkehr im Cell-attached-Patch öffnet sich der BK bei negativen Spannungen, und er ist bei  $-80$  mV gut zu erkennen. Dabei herrscht ein Transmembranpotenzial von  $80$  mV über dem Patch. Mit der Applikation von  $5\mu\text{M}$  ATP zeigt sich nun eine Oszillation in der Baseline, die Leitfähigkeit der SK4 Kanäle ist mit  $5\text{-}12$  pS (Ishii *et al.*, 1997) in Auswärtsrichtung beschrieben. Einzelne Kanalöffnungen mit kleiner Größe und in hoher Anzahl sind mit dem Stand der heutigen Technik nicht aufzulösen. Aus diesem Grund gehen die Öffnungen des SK's bei den Versuchen ( $n = 3$ ) ins Rauschen der Baseline mit ein.

Aus diesen Daten ergibt sich, dass beide Kanäle, der BK und SK-4, in 2 Wochen alten Makrophagen exprimiert werden. In der Ganz-Zell-Messung mit dem fixierten Kalzium ist der Einfluß des SK-4 ( $IK_{Ca}$ ) auf die Veränderung des Kalzium zu erkennen. Ist das auch der Fall, wenn die Zelle oszilliert?

### 3.2.8 Pharmakologische Charakterisierung des oszillierenden Kaliumstroms

Die oszillierenden Kaliumströme werden in der Ganz-Zell Spannungsklemme bei 0 mV geklemmt. Daraufhin werden die Makrophagen mit dem jeweilige Blocker superfundiert.

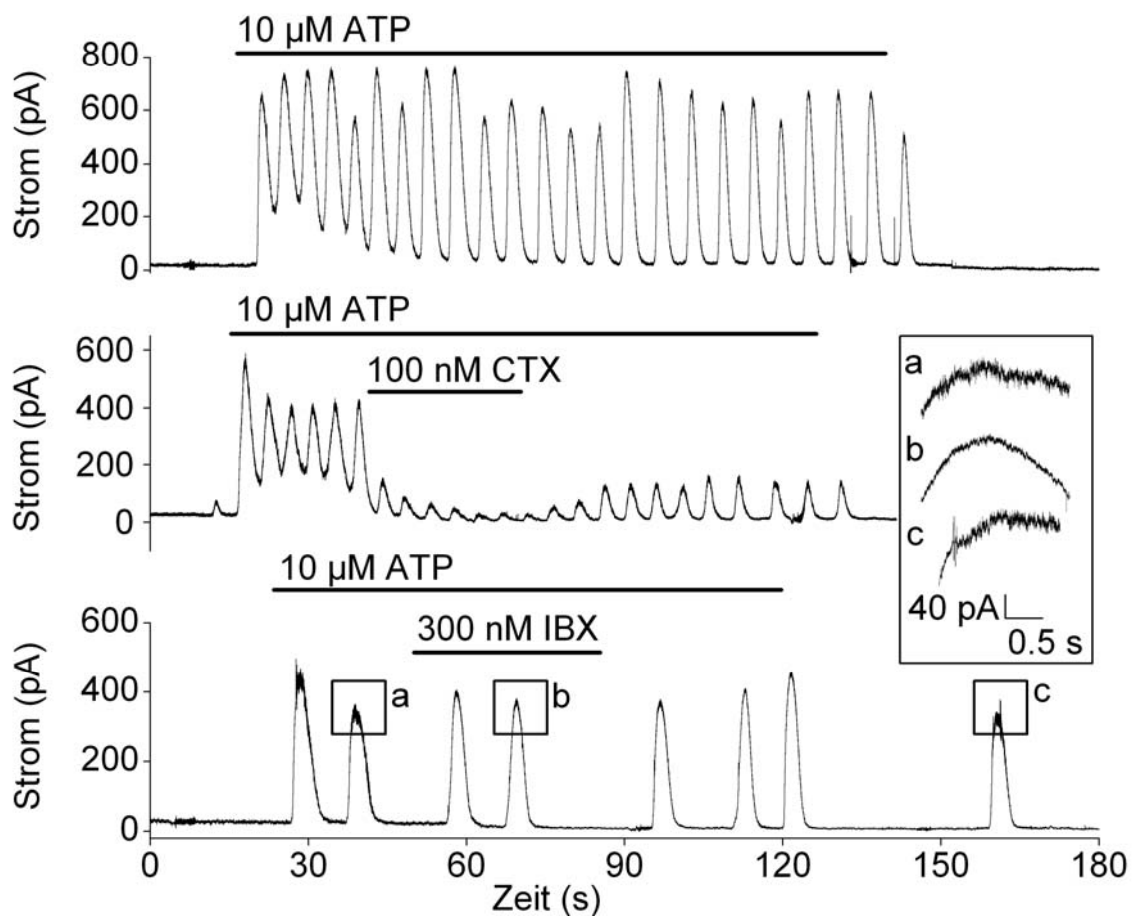
Mit den pharmakologischen Agenzien Iberitoxin, einem spezifischen BK-Kanal Blocker und Charybdotoxin, einem Blocker für BK- und SK-Kanäle, werden die durch 10  $\mu$ M ATP erzeugten Oszillationen, wie in Abbildung 3-19 gezeigt, geblockt. In einer Spannungsklemme mit einer Haltespannung von 0 mV wird mit 10  $\mu$ M ATP der Strom der Makrophage zum Oszillieren gebracht, dabei entstehen Oszillationen mit bis zu 2 Minuten Dauer ( $n = 4$ ). Applikation von 100 nM Charybdotoxin reduziert die Amplitude der Oszillationen um  $15 \pm 3\%$ .

Die Zugabe von 300 nM Iberitoxin verursacht nur eine kleine, aber signifikante ( $P < 0.05$ ) Reduktion auf  $94\% \pm 3\%$  ( $n = 3$ ). Zusätzlich wird das Rauschen in den Maxima der Stromkurven erheblich weniger, was sehr wahrscheinlich mit dem Schließen der BK-Kanäle zusammenhängt. Diese Resultate zeigen, dass die Oszillationen ihren Hauptursprung in den SK-Kanälen haben.

### 3.2.9 Zytokinbestimmung der mit ATP superfundierten Makrophagen

Makrophagen haben, wie in der Einleitung beschrieben, die Möglichkeit Zytokine zu produzieren und freizusetzen. Alexander Dalpke konnte diese nachweisen. Mit 10  $\mu$ M ATP $\gamma$ S, dem nicht hydrolysierbaren ATP Analog, wurde auf transkriptioneller Ebene IL-6 von CD14<sup>+</sup> selektierten Makrophagen untersucht. Mit quantitativer RT-PCR wurde

die Veränderung der mRNA von IL-6 im Vergleich zum konstitutiv exprimierten Gen GAPDH gemessen.

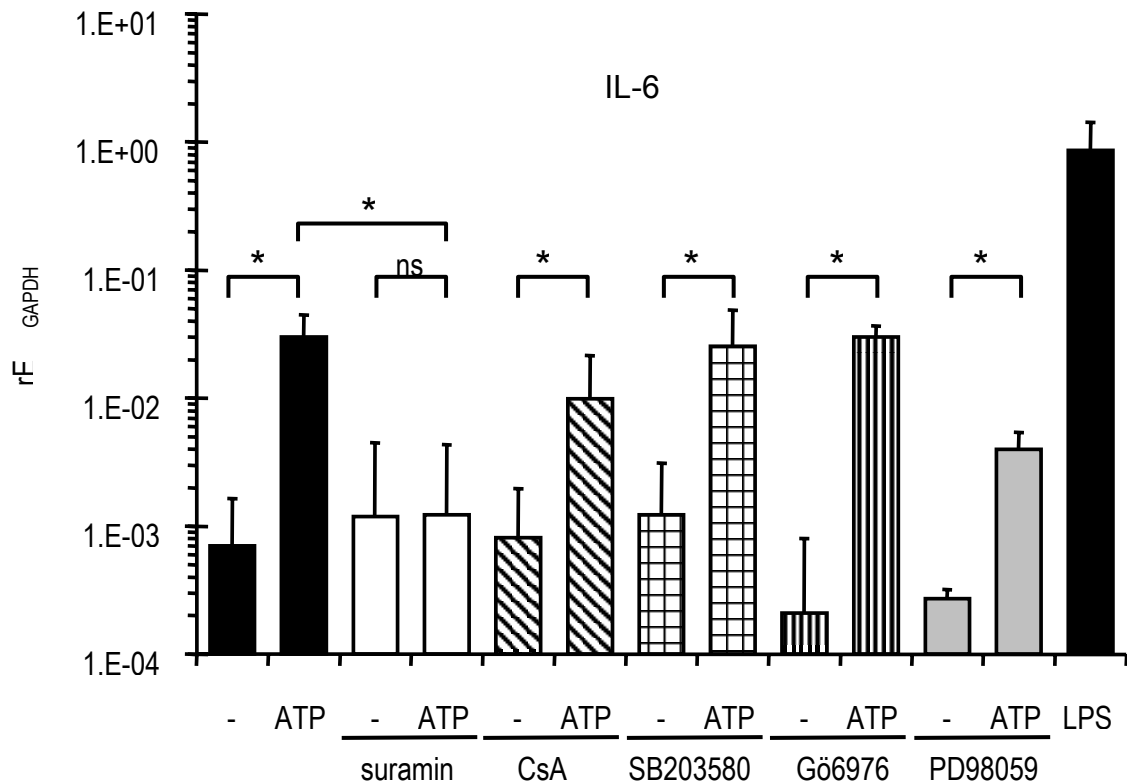


**Abbildung 3-19**

Die Abbildung zeigt eine über 2 min dauernde, durch ATP ausgelöste Oszillation der Auswärtsströme bei 0 mV. Die Oszillationen sind durch den BK und  $IK_{Ca}$  Blocker Charybdotoxin blockierbar. Beim Auswaschen kommen die Ströme nicht vollständig zurück. Im unteren Teil Blockierung durch Iberiotoxin, einem spezifischen BK Blocker, zeigt wenig Effekt. (a) zeigt ein hohes Rauschen bevor ATP appliziert wird. Bei (b) ist es verschwunden und tritt bei (c) wieder auf.

Unter Kontrollbedingungen war die Transkription des IL-6 Gens gering. Zugabe von 10 μM ATP $\gamma$ S für 2 Stunden vor der Isolation der IL-6 mRNA erzeugte eine 40 fache Erhöhung der mRNA. Als positive Kontrolle ist der Anstieg von IL-6 in Gegenwart von 100 ng/ml LPS gemessen worden. Dabei stieg die IL-6 Produktion um das 1000 fache. Suramin ist ein potenter Blocker für P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> und P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren (North & Barnard, 1997; Ralevic & Burnstock, 1998; von Kugelgen & Wetter, 2000). Wird Suramin zu den Makrophagen mit und ohne 10 μM ATP $\gamma$ S zugegeben, erhöhte sich die

IL-6 Transkription nicht. Zudem verringern Gö6976, ein Inhibitor der kalziumabhängigen Proteinkinase C, SB203580, ein Inhibitor der p38 mitogen aktivierten Proteinkinase, PD98059, ein Inhibitor der extrazellulären Proteine Kinase 1, Proteinkinase 2 und Cyclosporin A, ein Inhibitor des NFAT Signalwegs, den stimulierenden Effekt von 10  $\mu\text{M}$  ATP $\gamma\text{S}$  nicht (Abbildung 3-20).



**Abbildung 3-20**

Quantitative RT-PCR Analyse von humanen Makrophagen aus dem Blut von sechs verschiedenen Spendern. Mit 10  $\mu\text{M}$  ATP $\gamma\text{S}$  wurden die Zellen über 2 Stunden aktiviert. Zur Kontrolle wurden 100 ng  $\text{ml}^{-1}$  LPS genommen. 1 Stunde vor der Aktivierung durch 10  $\mu\text{M}$  ATP $\gamma\text{S}$  wurden zu den Makrophagen die Inhibitoren (100  $\mu\text{M}$ ) Suramin, (1  $\mu\text{M}$ ) Gö6976, (10  $\mu\text{M}$ ) SB203580 und (10  $\mu\text{M}$ ) PD98059 gegeben. Die Expression von IL-6 ist relativ zur konstitutiv exprimierten Gen GAPDH gezeigt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

## 4 Diskussion

### 4.1 Passive Eigenschaften und Kaliumkanäle

Die Untersuchungen an den Makrophagen zeigen bei den Messungen der passiven Eigenschaften, Kapazität und Ruhemembranpotenziale, hohe Übereinstimmungen mit den früheren Arbeiten (Gallin & McKinney, 1988). Gallin zeigte 1985, dass die an Makrophagen ähnliche Maus Zelllinie J774.1 über stark einwärts gleichrichtende Kalium-Kanäle verfügt. Auch DeCoursey zeigte 1996starke Einwärtsgleichrichter in der humanen Monozyten Zellline THP-1. Andere konnten starke einwärts gleichrichtende Kaliumleitfähigkeiten nachweisen (Gallin & Sheehy, 1985; Kim *et al.*, 1996; Vicente *et al.*, 2003). Die Einwärtsgleichrichter wurde in dieser Arbeit mit symmetrischen Kalium und Bariumblock, sowie Einzelkanalmessungen im Cell-Attached Modus, in humanen Makrophagen bestimmt. Auch die Existenz von kalziumabhängigen Kaliumkanälen wurde als Kaliumleitfähigkeit in humanen Makrophagen, Mikroglia und Zelllinie (HEK 293) gezeigt (Gallin & McKinney, 1988; Kim *et al.*, 1996; Eder *et al.*, 1997; Schilling *et al.*, 2002). In dieser Arbeit sind die beiden für die kalziumabhängigen Kaliumkanäle verantwortlichen Gene in Makrophagen identifiziert worden. Zu diesen Ergebnissen konnte die Elektrophysiologie die funktionelle Expression des BK-Kanals als Cell-Attached-Patch, in Ganz-Zell und durch Blockierung durch IBX zeigen. Der SK-4 (IK<sub>Ca</sub> oder IK) wurde in Ganz-Zell, Cell-Attached und mit der Pharmakologie auch während der Oszillationen nachgewiesen. Diese ersten Ergebnisse zeigten, dass die Messungen dieser Arbeit mit denen der Literatur übereinstimmen und diese ergänzen. Damit ist die Basis für weitergehende Untersuchungen der elektrischen Eigenschaften der Makrophagen erreicht worden.

### 4.1.1 Anandamid

Als ein weiterer Ansatz wurde die elektrische Reaktion auf die Applikation von 10  $\mu$ M Anandamid überprüft.

Anandamid ist ein im Körper vorkommendes Endocannabinoid. Es wird bei Schmerzen oder körperlicher Belastung ausgeschüttet und wirkt hauptsächlich schmerzlindernd und beruhigend. Die in dieser Arbeit untersuchte Wirkung auf Makrophagen ist eindeutig und zeigt eine starke Verringerung der Kaliumauswärtsströme. Diese Auswärtsströme könnten durch Tandemporenionenkanäle getragen werden. Die RT-PCR-Analyse an Makrophagen zeigten, dass THIK 1-2 und TWIK 2 in Makrophagen exprimiert werden. Für den K2P-Kanal TASK-1 ist beschrieben worden, dass das Endocannabinoid Anandamid und sein stabileres Derivat, das Methanandamid, blockierend wirken (Maingret *et al.*, 2001). TWIK 1-2 Kanäle werden durch Anandamide nicht blockiert. Für den THIK fehlen die Experimente. Durchaus plausibel ist aber, dass auch andere K2P-Kanäle durch Anandamid geblockt werden könnten. Sicherlich ist es interessant, diesen Block nachzuvollziehen und herauszufinden, welche Auswirkung diese Resultate auf die Zytokinproduktion haben könnte.

M.R. Qiu et al (2002) berichtet eine Verringerung der Zytokinproduktion von IL-8 und TNF- $\alpha$  bei einem Block von Kaliumauswärtsströmen durch 4-AP (Qiu *et al.*, 2002). 4-AP ist ein Blocker für die spannungsabhängigen Kaliumkanäle. Tandemporenionenkanäle gehören zu den Hintergrund-Kalium-Kanälen. Sie sind 4-AP insensitiv. Allerdings haben sie einen Einfluß auf die Membranspannung der Makrophagen und es besteht die Möglichkeit, dass sie bei den potenzialabhängigen Prozessen der Exozytose von Zytokinen von Bedeutung sind (Haslberger *et al.*, 1992).

## 4.2 Effekte von ATP

Den Hauptanteil an dieser Arbeit haben aber die Effekte von 10  $\mu$ M ATP auf die Ströme und Spannungen der Makrophagen.



Der Ausstoß von ATP aus Zellen kann eine Zellbeschädigung oder den plötzlichen nicht apoptotischen Zelltod zur Ursachen haben. Andererseits wird ATP auch direkt aus der Zelle sezerniert. Für diese aktive Freisetzung von ATP können mechanische Stimulierung, metabolischer Streß oder spontane Freilassung zu Grunde liegen (Communi *et al.*, 2000; Di Virgilio *et al.*, 2001; Lazarowski *et al.*, 2003).

Wie in der Einleitung beschrieben, aktiviert ATP die Purinrezeptoren P2Y und P2X.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zwei Wochen alten Makrophagen hauptsächlich über P2X<sub>4</sub> und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren auf die Applikation von 10 µM ATP reagieren.

Beide Rezeptoren wirken direkt oder indirekt auf das Membranpotenzial der Makrophagen.

#### **4.2.1 Vergleiche mit anderen Veröffentlichungen über Purinrezeptoren und Kaliumströme in Ratten**

In der Ratten Alveolar-Makrophagen Zelllinie NR8383 konnten unabhängig von der vorliegenden Arbeit P2X<sub>4</sub>, P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren nachgewiesen werden (Bowler *et al.*, 2003).

Diese Ergebnisse stimmten mit denen der vorliegenden Arbeit überein.

Die Veröffentlichung von Bowler (2003) zeigt den IK als Träger des Auswärtsstroms.

Beim Membranpotenzial gibt es weitere Übereinstimmungen, da auf eine schnelle transiente Depolarisation eine längere Hyperpolarisation auf das Superfundieren mit ATP erfolgt. Beide Rezeptoren wirken direkt oder indirekt auf das Membranpotenzial der Makrophagen, was in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Mit den Meßmethoden der Fluoreszenzmessung und der Ganz-Zell-Messung konnten die Kalziumoszillationen aufgezeichnet werden. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, wie die Kalziumoszillationen von P2Y-Rezeptoren über Transduktionsketten aus intrazellulären Kalziumspeichern getragen werden.

## 4.2.2 Ganzzellmessungen und Fluoreszenzmessungen

Beide Meßmethoden lassen die Zusammensetzung des Zytosols nicht unverändert. Bei der Ganz-Zell-Messung dialysiert mit der Dauer der Messung die Pipettenlösung das Zytosol. Durch diesen Austausch können intrazelluläre lösliche Komponenten des Zytosols ausgewaschen werden. Die Komponenten könnten an der Übermittlung der Informationen von den P2Y-Rezeptoren zu den Kalziumspeichern beteiligt sein, die über das  $G_{q/11}$  die Phospholipase C aktivieren, welche  $PIP_2$  in  $IP_3$  und DAG spaltet.

Auch das Einbringen der Chromophoren ins Zytosol und deren Pufferkapazität für Kalzium verändert den *in vivo* Zustand der Makrophage.

### Cell-attached Messungen lassen das Zytosol unbeeinflusst

Messungen der Oszillationen des Baselinestromes der Cell-Attached-Messungen sind nicht „invasiv“. Cell-Attached bedeutet, dass die Zellmembran nur durch die Pipette berührt wird, die Lösung in der Pipette sich aber nicht mit dem Zytosol vermischt. Bei der Applikation von 10  $\mu$ M ATP konnte auch mit dieser Meßmethode eine Veränderung der Ströme erkannt werden. In diesem Fall ist die Transduktion des ATP-Signals durchs Zytosol ungestört weitergeleitet worden, von den  $P2Y_2$ -Rezeptoren bis zu den Kalziumspeichern und von dort zu den Kanälen zurück. Mit diesem Experiment konnte bewiesen werden, dass sich die in der Ganz-Zell-Konfiguration und die in der Fluoreszenzmessungen ergebenden Daten auch so *in vivo* ereignen. Eine weitere Methode zur Überprüfung der Kalziumoszillationen in Makrophagen, ohne das Zytosol zu verändern ist der Perforated-Patch. Hier wird durch eine Chemikalie (Nystatin, Amphotericin oder Gramicidin) in das Membranstück unter der Pipette Poren (Ionenkanäle) eingebunden, die einen Zugang zum Inneren der Zelle erlauben, ohne für größere Moleküle und Wasser durchlässig zu sein (Horn & Marty, 1988).

### 4.2.3 Mechanismus der Kalziumoszillationen

Den detaillierten Mechanismus der Oszillationen des Kalziums selbst kann diese Arbeit nicht aufklären. Mit den Versuchen der Fluoreszenzmessung und der Elektrophysiologie konnte gezeigt werden, dass die Oszillationen aus internen Speichern erfolgen müssen, da sie beim Entfernen des extrazellulären Kalziums weiterhin existent waren. Warum aber das Kalzium nicht nur einen einfachen Anstieg vollzieht, sondern nach der Applikation von ATP wieder fällt und oszilliert, kann nur vermutet werden. Bertil Hille hat in seinen Arbeiten gezeigt, dass  $IP_3$  abhängige Kalziumkanäle in gonadotropen Zellen der Adenohypophyse für Kalziumoszillationen verantwortlich sind (Tse & Hille, 1992; Hille *et al.*, 1995). Diese Kalziumoszillationen konnte er mit Heparin oder Pentosanpolysulfat blocken. Beide Agenzien hemmen die  $IP_3$ -Kanäle kompetitiv. Auch eine Blockierung des aktiven Rücktransports durch Thapsigargin, einem Inhibitor der SerCa-Pumpe, läßt die Kalziumoszillationen verschwinden. Wie dieses Zusammenspiel zwischen Freisetzung und Rücktransport ins Zytosol aufeinander abgestimmt ist, hängt von der Agonistenkonzentration und dem Typ der Zelle ab (Hille, 2001). Gezeigt werden konnte, dass die Kalziumoszillation beginnt, bevor eine mehrere hundert Millisekunden lange Verzögerungsperiode vergeht und bevor ein schneller Kalziumanstieg sich entweder in einer verzögerten oder aufbauenden Oszillation entlädt (Berridge & Irvine, 1989; Fewtrell, 1993; Thomas *et al.*, 1996).

### 4.2.4 Elektrophysiologische Untersuchungen von kalziumaktivierten Strömen in Makrophagen

Überprüft man die Literatur der letzten Jahre, gibt es drei Arbeiten, die das Phänomen von Kalzium-aktivierten Strömen in Makrophagen zu erklären versuchen. Dabei benutzen zwei Arbeiten ATP als Aktivator der Ströme. Die erste Arbeit wurde 1975 von Gallin veröffentlicht (Gallin *et al.*, 1975). Diese Arbeit beschäftigt sich mit spontanen und induzierbaren Hyperpolarisationen von Makrophagen. Die Autoren konnten mit der damaligen Methode des Einstechens mit hochohmigen Pipetten zeigen, dass mit einer

Ionophore durchlässig gemachte Membran eine Hyperpolarisation in Makrophagen auslöst. Die Verschiebung des Membranpotenzials zum Kaliumgleichgewichtspotenzial zeigte, dass sich durch die Ionophore eine Aktivierung einer Kaliumleitfähigkeit ergeben muß. Zur Überprüfung sind während der Hyperpolarisation durch die Ionophore 1,5 mM EGTA ins Bad gegeben worden. EGTA inhibierte die Hyperpolarisation durch Chelieren des freien Kalziums. Daraus konnte man 1975 eine kalziumabhängige Kaliumleitfähigkeit postulieren. Gallin hatte jedoch mit der Einstichttechnik höhere Leckströme, die dazu führten, dass weder Ruhemembranpotenzial noch Eingangswiderstand den heutigen Messwerten entsprechen.

Albuquerque et al konnte 1993 mit der Ganz-Zell-Technik zeigen, dass ATP und UTP in von ihnen nicht genau bestimmbar Dosen bei Makrophagen Einwärts- und Auswärtsströme auslösen. Ein kurzer früher Einwärtsstrom wurde bei einer Spannungsklemme von  $-40$  mV durch einen Auswärtsstrom abgelöst (Albuquerque *et al.*, 1993). Die Autoren zeigten, dass der Einwärtsstrom von einem unspezifischen Kationen-Kanal getragen wird und der Auswärtsstrom durch kalzium- abhängige Kaliumkanäle. Zudem konnte der Ursprung des Kalziums, das freigesetzt wurde, aus inneren Speichern bestimmt werden. Trotzdem war es ihnen nicht möglich, die Oszillationen des Kalziums aufzunehmen oder die Typen der Rezeptoren zu bestimmen.

1997 konnte Schmid-Antomarchi zeigen, dass geringe Mengen an UTP (1- 100  $\mu$ M) und ATP einen Auswärtsstrom in Makrophagen auslösen. Einwärtsströme blieben von ihr unentdeckt. Mit Charybdotoxin konnte sie dann die Auswärtströme blockieren und mit Cell-attached-Messungen zeigen, dass es sich bei den durch UTP geöffneten Kanälen, um kleine (10 pS) Leitfähigkeiten handelte. Sie schloß daraufhin auf  $K_{Ca}$ -Kanäle. Interessant ist, dass eine Verbindung zwischen SK-Kanälen und der Bildung von Sauerstoffradikalen zeigen konnte.

Auffällig an dieser Arbeit ist, dass mit 2 mM EGTA als Kalziumpuffer in der Pipette noch Änderungen des Kalziums gemessen werden konnte. Auch in dieser Arbeit konnten keine Kalziumoszillationen gezeigt werden.

#### 4.2.5 Vergleiche mit anderen Veröffentlichungen an den Purinrezeptoren (P2X)

Wie aus den oben diskutierten Arbeiten ersichtlich ist, ist nicht geklärt worden, welcher der Purinrezeptoren an der Signalkaskade bis zu den Kaliumkanälen und den unspezifischen Einwärtsströmen beteiligt ist. Sowohl die Arbeit von Bowler als auch diese Arbeit zeigten bei zwei verschiedenen Spezies (Ratte und Mensch) jeweils einen Einwärtsstrom von P2X<sub>4</sub> Liganden gesteuerten Ionenkanälen (Bowler *et al.*, 2003). Mit der RT-PCR zeigte diese Arbeit, dass P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub> und P2X<sub>7</sub> in CD14<sup>+</sup> selektierten Makrophagen vorkommen. Bowler zeigte, dass in der Ratte P2X<sub>4</sub> und P2X<sub>7</sub> exprimiert werden. Beide Arbeiten schließen unabhängig von einander auf P2X<sub>4</sub> als den Träger der Einwärtsströme. Die Sensitivität für ATP ist bei den P2X<sub>7</sub> schlechter als bei P2X<sub>4</sub>, deshalb schließen 10 µM ATP eine Wirkung auf den P2X<sub>7</sub> aus. Bowler hat zur weiteren Charakterisierung BzATP benutzt. BzATP wirkt auf den P2X<sub>7</sub>-Rezeptor verstärkend, aber nicht aktivierend auf den P2X<sub>4</sub>. Bei der Applikation von BzATP zeigte sich eine Reduktion im Einwärtsstrom. Dies deutet eher auf den P2X<sub>4</sub> hin.

Auch zeigt Bowler in einer Immunanfärbung, dass P2X<sub>4</sub> stärker exprimiert wird als P2X<sub>7</sub>. Weidema konnte in Osteoklasten zeigen, dass der P2X<sub>4</sub> auch in diesen Zellen exprimiert wird (Weidema *et al.*, 2001).

#### 4.2.6 Vergleiche mit anderen Veröffentlichungen an den Purinrezeptoren (P2Y)

Bei den P2Y-Rezeptoren sind die Verteilungen in den Spezies zwischen Mensch und Ratte ähnlich. Bowler hat mRNA von P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>12</sub> nachgewiesen. In dieser Arbeit konnte ebenfalls P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>12</sub> nachgewiesen werden. Da in Ratten kein Gen für P2Y<sub>11</sub> existiert, sind in diesem Fall auch keine Übereinstimmungen zu erwarten. Der P2Y<sub>11</sub>-Rezeptor reagiert ausschließlich auf ATP. Seine Aktivierung erhöht die Rezeptordichte des N-Formyl Peptidrezeptors, der auf den Chemotaxis einleitenden Wirkstoff fMLP reagiert. Zudem fördert die Aktivierung von P2Y<sub>11</sub> die F-Aktin Polymerisation und verstärkt die durch NADPH getragene Sauerstoffradikal-

produktion. Eine Veränderung der Makrophagenform durch 10  $\mu$ M ATP konnte in der vorliegenden Arbeit (Daten nicht gezeigt) bewiesen werden (van der Weyden *et al.*, 2000). Der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor der Ratte reagiert auf ADP und ATP und ist hauptsächlich in seiner Wirkung als der Rezeptor bekannt, der bei Thrombozyten vermittelt, dass Agglutination eingeleitet wird. Viele Medikamente der Gerinnungshemmung konnten jetzt als Blocker des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors entdeckt werden (Dorsam & Kunapuli, 2004). Warum Alveolare-Makrophagen einen gerinnungsfördernden Rezeptor tragen, bleibt bei Bowler ungeklärt. Da P2Y<sub>12</sub> über das G<sub>i</sub> wirkt, ist eine Beteiligung an Kaliumströmen eher auszuschließen.

Die Rezeptoren, die beide Spezies funktionell exprimieren, sind die P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren. Der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor bevorzugt ADP als Agonisten, auf ATP reagiert er schwächer. In dieser und in der Arbeit von Bowler konnte aber eine Diskriminierung mit UTP vorgenommen werden. Wie in der Einleitung schon beschrieben, reagiert P2Y<sub>1</sub> nicht auf UTP. Die Effekte von UTP und ATP sind auf die Kalziumoszillationen wie auf die Auswärtströme gleich stark. Zusätzlich konnte bei der Applikation von 2-methylthio-ATP kein Kalziumanstieg gemessen werden, was wiederum ein weiteres Argument für die nicht Beteiligung von P2Y<sub>1</sub> ist, da 2-methylthio ATP diesen Rezeptor am stärksten aktiviert.

Bowler erkennt mit ADP einen Kalziumanstieg in der Zelllinie NR8383. Er findet zusätzlich mit den Blockern von P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>2</sub> sehr unerwartete Ergebnisse. Seine Erklärung ist, dass es sich um eine Coexpression von beiden Rezeptoren handelt. Die Unterschiede in der Bowler Arbeit zu denen in dieser Arbeit beruhen auf den verschiedenen Zellen. Bowler benutzt eine Zelllinie, während in der vorliegenden Arbeit mit isolierten humanen Makrophagen gearbeitet wurde. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass die Oszillationen hauptsächlich von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren getragen werden.

#### 4.2.7 BK-Kanal als möglicher Träger der Membranspannungszustörungen

Der Maxi-K-Kanal ist der bekannteste Vertreter der kalziumabhängigen Kaliumkanäle. In dieser Arbeit konnte er durch verschiedene Methoden (RT-PCR, Cell-attached, Ganz-Zell, Iberitoxin) nachgewiesen werden. Seine Beteiligung an den Kaliumstromoszillationen ist eher klein, wie die Versuche mit dem Iberitoxin einwandfrei beweisen. Der BK-Kanal besitzt eine Kalziumabhängigkeit und eine Spannungsabhängigkeit (Barrett *et al.*, 1982; Archer & Rusch, 2001; Hille, 2001). Sowohl Spannungsabhängigkeit als auch Kalziumabhängigkeit wirken gemeinsam auf die Öffnungswahrscheinlichkeit des BK. Hohe Spannung mit geringer Kalziumkonzentration nehmen einen gleich großen Wert bei der Öffnungswahrscheinlichkeit ein, wie hohe Kalziumkonzentrationen bei niedrigen Spannungen. Bei einem Kalziumanstieg in der Zelle auf 1  $\mu\text{M}$  und einem Potenzial nahe 0 mV sind die meisten BK-Kanäle noch im geschlossenen Zustand. Aus den Stromklemme-Messungen ergibt sich keine Steigerung des Membranpotenzials über 0 mV durch die von 10  $\mu\text{M}$  ATP ausgelöste frühe Depolarisation. Bei den darauf folgenden oszillierenden Hyperpolarisationen zeigen sich Spannungen zwischen -30 mV und -70 mV. Bei diesen Potenzialen öffnet der BK erst bei einer intrazellulären Kalziumkonzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Es ist also eher unwahrscheinlich, dass der BK bei den gemessenen Spannungen in der Stromklemme viel zu den Hyperpolarisationen beiträgt. In der Spannungsklemme bei einer Kommandospannung von 0 mV zeigen sich die Auswärtsströme kaum durch den spezifischen BK-Kanal-Blocker Iberitoxin blockiert. Trotz der eher geringen Öffnungswahrscheinlichkeit der BK-Kanäle ist ein signifikanter Block ( $P < 0.05$ ) zu sehen.

#### 4.2.8 Einfluß der $\beta$ -Untereinheiten des BK-Kanals

Da in dieser Arbeit alle bekannten  $\beta$ -Untereinheiten des BK-Kanals durch RT-PCR nachgewiesen werden konnten, ist es durchaus möglich, dass sich die Kalziumaffinität der BK-Kanäle zu niedrigeren Konzentrationen verschoben hat oder die

Spannungsabhängigkeit durch die  $\beta$ -Untereinheiten herabgesetzt wird. In der Ganz-Zell Spannungsklemme mit dem auf 1  $\mu$ M festgeklemmten Kalzium erkennt man im Bereich zwischen 0 mV und + 20 mV keine Addition einer Leitfähigkeit. Anhand der Addition in der Leitfähigkeit und der daraus resultierende Strom könnte auf das Öffnen eines weiteren Kalium-Kanals mit höherer Leitfähigkeit geschlossen werden.

Dieses Resultat schließt aber eine Modulation der BK-Kanäle durch  $\beta$ -Untereinheiten mit klaren Effekten auf die hier gemessenen Makrophagen aus.

#### 4.2.9 Bedeutung des BK-Kanals in der Makrophagen Physiologie

Die Expression der BK-Kanäle hat sicherlich eine andere Bedeutung als die Membranoszillationen in Makrophagen aufrecht zu erhalten. Der größte Anteil des in den Oszillationen gemessenen Stroms ist IK-abhängig. Dieses Ergebnis wird durch andere Wissenschaftler und deren Ergebnisse unterstützt (Schmid-Antomarchi *et al.*, 1997; Weidema *et al.*, 1997; Bowler *et al.*, 2003). Sie zeigen auch, dass der BK bei einer internen Kalziumerhöhung kaum einen Anteil an den physiologischen Strömen hat.

BK-Kanäle schützen die Zelle vor zu starken Depolarisationen, indem sie durch ihr Öffnen sofort eine Repolarisation einleiten. Starke Depolarisationen treten in Makrophagen dann auf, wenn sie durch Aktivierung der NADPH-Oxidase Protonen ins Zytosol abgeben. Dabei erreichen andere Immunzellen wie die Eosinophilen eine Depolarisationsgeschwindigkeit von 18 V/s (DeCoursey, 2004). Um diese Umladung auszugleichen, gibt es derzeit zwei Hypothesen, die entweder den BK-Kanal (Reeves *et al.*, 2002; Ahluwalia *et al.*, 2004) oder Protonenkanäle als Ladungskompensation sehen (DeCoursey *et al.*, 2003). Der BK-Kanal kann auch ein Sensor für LPS sein. Blunck *et al.* zeigt, dass im Outside-Out-Patch eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit (Blunck *et al.*, 2001) durch freies LPS eingeleitet werden kann.

Diese Ergebnisse konnten wir in unserem Labor in Ganz-Zell Messungen nicht reproduzieren!



#### 4.2.10 Bedeutung des IK in den Oszillationen

Der IK kann in dieser Arbeit klar als der Kanal gezeigt werden, der den größten Anteil an den Kaliumstromoszillationen trägt. Der IK kommt im Immunsystem in Makrophagen sowie T- und B-Zellen vor (Cahalan *et al.*, 2001). Wie oben schon diskutiert ist er der Kanal, der als erstes auf Kalziumerhöhungen im Zytosol reagiert. Seine Rolle für das Immunsystem ist enorm, da sein Öffnen die starke treibende Kraft für Kalzium, das aus dem Plasma in die Zelle drängt aufrecht erhält. Dieses Kalzium kann dann als second Messenger verschiedene Aktivitäten der Zelle und damit des Immunsystems steuern, z.B. die Proliferation der T-Zellen (Wulff *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurde von Heike Wulff ein spezifischer Blocker, das Tram-34, für den IK entwickelt, der als Immunsuppressor fungiert und die Vermehrung von T-Zellen verhindert. Eine Blockierung des IK könnte auch seine Wirkung auf die Taxis der Makrophagen entwickeln, wie es für Mikroglia schon gezeigt worden ist (Schilling *et al.*, 2004). Auch eine Reduzierung der Zytokinproduktion ist denkbar, auch wenn Qiu *et al.* bei zwei Zytokinen IL-8 und TNF- $\alpha$  keinen Einfluß von Charybdotoxin entdecken konnten (Qiu *et al.*, 2002).

#### 4.2.11 Kalziumoszillationen steuern Transkriptionsfaktoren

Dolmetsch entdeckte Veränderungen in der Genexpression durch Kalziumoszillationen (Dolmetsch *et al.*, 1998) in T-Lymphozyten. Er konnte über das Klemmen des Kalziums innerhalb der Zelle, mittels der SOC (store operated channels) zeigen, dass die Frequenz der Kalziumoszillationen über einen Zeitraum bis zu 2 Stunden bestimmt, welcher Transduktionsweg in den T-Zellen aktiviert wird. Die Ergebnisse der Dolmetsch Veröffentlichung sind eindeutig. Oszillationen und die Amplitude des intrazellulären Kalziums bestimmen die Aktivität der Transkriptionsfaktoren. Dabei konnte Dolmetsch zwischen den Transkriptionsfaktoren, NF- $\kappa$ B, NF-AT und Oct / OAP noch Unterschiede in der Aktivierbarkeit durch die Frequenz der Oszillationen bestimmen. Hohe Oszillationen rekrutierten alle Transkriptionsfaktoren, während niedrige einzig

NF- $\kappa$ B aktivierten. Anhand dieser Ergebnisse zeigten die Zytokine IL-2 (NF-AT, Oct / OAP) und IL-8 (NF- $\kappa$ B) durch die Frequenz der Kalziumoszillationen und ihrer Abhängigkeit von den Transskriptionsfaktoren erhöhte oder erniedrigere Produktion.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kalziumoszillationen einen Einfluß auf die Transskription von IL-6 haben und diese um ein 40 faches erhöhen. Bei den Makrophagen zeigte die Frequenz der Membranpotenzialoszillationen mit  $9.5 \pm 0.9 \text{ min}^{-1}$  (n = 11) etwas langsamere Werte als die der Fluoreszenzmessungen mit  $11.5 \pm 0.7 \text{ min}^{-1}$  (n = 32). Diese nicht genaue Übereinstimmung in der Frequenz könnte seine Ursache in den verschiedenen Messbedingungen der verschiedenen Techniken haben.

Die Frequenzen in der Dolmetsch Veröffentlichung sind im Maximum niedriger (maximal  $2 \text{ min}^{-1}$ ) als die in der vorliegenden Arbeit. Erste Unterschiede bei den Transskriptionsfaktoren zeigten sich dort ab einer Frequenz von  $0,14 \text{ min}^{-1}$ .

Je niedriger die Frequenz in der Dolmetsch Veröffentlichung, desto kleiner die Aktivierung der Transskriptionsfaktoren. Daraus folgt bei niedriger Frequenzen eine kleinere Zytokinproduktion. Die Frequenz in der vorliegenden Arbeit ist 5 fach höher als die Frequenz in der Dolmetsch Veröffentlichung.

Damit ist die Steigerung in der Zytokinproduktion in dieser Arbeit zu erklären.

#### **4.2.12 Block der induzierten Zytokinproduktion durch Suramin**

In dieser Arbeit wurde die mRNA des IL-6 Zytokins mit und ohne ATP gemessen. Dabei wurden Blocker der Signaltransduktionswege zum IL-6 verwendet. Keiner dieser Blocker konnte jedoch die durch Oszillationen hervorgerufene mRNA Produktion von IL-6 inhibieren, bis auf Suramin, das den Purinrezeptor P2Y<sub>2</sub> selbst inhibiert. Dieses Ergebnis stärkt die Hypothese, dass die Kalziumoszillationen durch den Rezeptor, nach der Aktivierung mit  $10 \mu\text{M ATP}\gamma\text{S}$ , die Ursache für die erhöhte IL-6 Produktion sind.

### 4.2.13 Möglicher Transduktionsweg zum Nukleus

Alle diese Ergebnisse zusammen legen nahe, dass ATP ein starker Aktivator des angeborenen Immunsystems sein kann. Die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels in Makrophagen von Mäusen mit Hilfe der SerCa Blocker Thapsigargin und zyklopiazonischer Säure, führte zu erhöhten Produktion von IL-6 in den Makrophagen (Bost & Mason, 1995). Dies läßt vermuten, dass auch der Anstieg des Kalziums in den humanen Makrophagen dieser Arbeit zu einer erhöhten Freisetzung von IL-6 führte. Wie in der Veröffentlichung von Dolmetsch schon gezeigt worden ist (Dolmetsch *et al.*, 1998), können die Oszillationen von Kalzium verschiedene Genloki durch Transskriptionsfaktoren aktivieren. Das IL-6 zeigte auf transkriptioneller Ebene, einen 40 fach höheren mRNA Anteil als bei der Kontrollgruppe ohne ATP. Mit Suramin, einem Blocker der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren, zeigte sich diese Erhöhung nicht. Dies spricht zusätzlich für eine Aktivierung der Zytokinproduktion durch ATP. Trotzdem konnte meine Arbeit einen kalziumabhängigen Transduktionsweg von dem P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor zur Zytokinproduktion nicht nachweisen. Auch Hemmer für andere bekannte Transduktionswege, wie der kalziumabhängigen Proteinkinase C oder dem mitogen aktivierten Proteinkinaseweg, konnten die Erhöhung des IL-6 nicht behindern. Es bleibt damit weiter offen, wie der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor mit dem Zellkern in Verbindung tritt. Eine Möglichkeit wäre, dass sich innerhalb des Transduktionsweges Verzweigungen zu anderen bekannten Transduktionswegen, wie z.B. G<sub>i</sub> oder Map usw. ergeben, die dann mit spezifischen pharmakologischen Werkzeugen genauer untersucht werden könnten.

### 4.2.14 IL6 ist ein wichtiges proinflammatorisches Protein

IL-6 ist das einzige Zytokin, das in dieser Arbeit untersucht worden ist. Von Makrophagen ist bekannt, dass sie auch andere Zytokine sezernieren, wie z.B. IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8 und IL-12. Diese Zytokine sind nur die proinflammatorischen, die auf einen bakteriellen Reiz hin freigesetzt werden. Eine Untersuchung des gesamten Spektrums der Zytokine könnte möglicherweise auch bei anderen Zytokinen Veränderungen gezeigt.

IL-6 ist aber sicherlich eines der wichtigsten Verbindungsstücke zwischen adaptiven und angeborenem Immunsystem. Es spielt eine große Rolle bei dem Ausreifen von Zellen des angeborenen Immunsystems, von Monozyten zu Makrophagen. Aus Monozyten entstehen einerseits dendritische Zellen, die als Antigenpräsentierende Zellen in die Lymphknoten einwandern und dort T-Zellen zur Immunabwehr rekrutieren. Andererseits entstehen aus den Monozyten Makrophagen, deren Hauptaufgabe in der Phagozytose und dem Präsentieren von Antigenen liegt. IL-6 verschiebt das Verhältnis der Reifung der Monozyten zu der Seite der Makrophagen (Chomarat *et al.*, 2000; Mitani *et al.*, 2000). Entsteht durch die ATP stimulierten P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren mehr IL-6 aus schon eingewanderten Makrophagen, so werden mehr von den in den Entzündungsherd einwandernden Monozyten zu Makrophagen ausreifen. Makrophagen reagieren durch die Stimulation von IL-6 mit der erhöhten Expression von M-CSF-Rezeptoren. Die Makrophagen setzen zusätzlich noch M-CSF frei, damit noch mehr Monozyten einwandern (Janeway, 2002). In diesem System reichern sich nun die Phagozyten am Ort der ATP Freisetzung an. Die dendritischen Zellen, nachdem sie Antigene aus dem Medium an ihrer Membran präsentiert haben, wandern in die Lymphknoten und aktivieren dort das adaptive Immunsystem. In den Lymphknoten differenzieren sie T-Zellen zu T<sub>H1</sub> oder T<sub>H2</sub> aus (Abbas & Lichtman, 2003). Zudem aktivieren die durch die dendritischen Zellen stimulierten T-Zellen dort B-Zellen, die mit der sofortigen Antikörperproduktion beginnen. IL-6 kann aber selbst auch zur weiteren Reifung der B-Zellen beitragen und damit weiterhin die Immunantwort stärken.

#### 4.2.15 Danger Modell

„ATP gibt dem Immunsystem zu verstehen, dass am Ort der Zellschädigung eine Gefahr vorliegt.“

Diese Erkenntnis passt sehr gut in das „*Danger-Model*“ von Matzinger (Matzinger, 2002). Endogene Stimuli wie ATP sind wichtige Informationsträger für das angeborene Immunsystem und aktivieren über die Antigen präsentierenden Zellen das adaptive Immunsystem.

Studien der Chemotaxis von Makrophagen und Monozyten haben gezeigt, dass M-CSF (Chomarat *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 2002) und ATP (Honda *et al.*, 2001) als Lockstoff fungieren, die die Zellen zum Ort der Freisetzung führen. Diese Art der Bewegung ist für das Immunsystem von äußerster Wichtigkeit. Der Verlust eines solchen Rezeptors führt in der Knockout-Maus zu Knochenschäden, Verlust der Zähne durch zu hohe Knochendichte, Unfruchtbarkeit, Schädigungen der hämatopoetischen Stammzellen und der Makrophagen im Gewebe (Dai *et al.*, 2002).

Die Veröffentlichung von Honda (Honda *et al.*, 2001) zeigt eine Kopplung der Bewegung der Mikroglia über ein  $G_i$  Protein. Der  $P2Y_2$ -Rezeptor in dieser Arbeit trägt hauptsächlich die Kalziumoszillationen. Er zeigt eine klare Koppelung zum  $G_q$ -Protein (Ralevic & Burnstock, 1998).

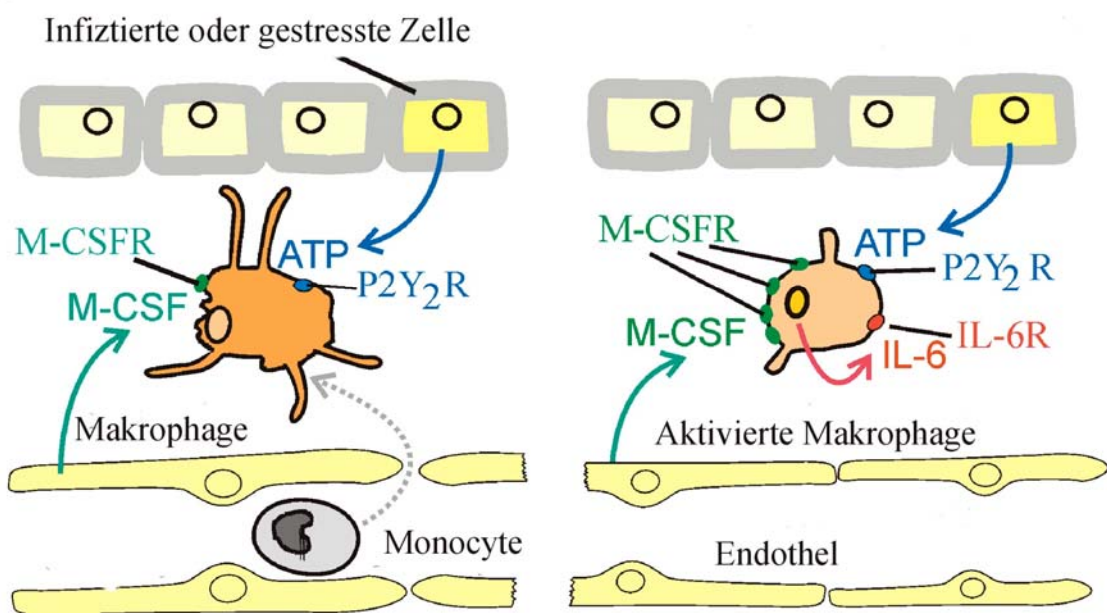
Ob die Kalziumoszillationen ausgelöst durch die Weiterleitung des Signals über das  $G_q$ -Protein auch eine Chemotaxis initiieren, müsste in weiteren Experimenten geklärt werden.

Die vorliegende Arbeit untersuchte nicht die anderen möglichen Zytokine, die durch ATP angeregt werden könnten, dies könnte zu einer Verdeutlichung eines reinen proinflammatorischen oder antiinflammatorischen Prozesses führen.

Meist sind im Immunsystem mehrere Stimuli notwendig, um eine Reaktion des adaptiven Immunsystems oder des angeborenen Immunsystems auszulösen. Aus diesem Grund wäre es interessant herauszufinden, ob ATP eine ähnliche Wirkung hat, wenn es mit LPS zusammen auf die Makrophagen trifft. Auch ein Vergleich über die Toll-Rezeptoren mit ATP könnte weiteren Aufschluß geben. Hitzeschockproteine Hsp70 und Hsp60 werden von Toll-Rezeptoren erkannt. Ihr Zusammenspiel mit ATP könnte sich als besonders interessant darstellen, da es sich dann um ein Zusammentreffen von rein endogenen Substanzen handelt.

ATP könnte aber auch hinsichtlich seiner Bedeutung für die Phagozytose untersucht werden. Phagozytose teilt sich in zwei Phänomene auf, Phagozytose mit Inflammation und ohne Inflammation (Greenberg & Grinstein, 2002). Sicherlich ist die Phagozytose mit der Produktion von Sauerstoffradikalen ein depolarisierender Prozess (DeCoursey, 2003).  $P2Y$ -Rezeptoren könnten hier zur Hyperpolarisierung der Zellen beitragen und damit eine Verlängerung der Arbeitsdauer der NADPH provozieren.

Die Wirkung von ATP passt gut in das *Danger Model* von Polly Matzinger. ATP ist eine Substanz die hauptsächlich von körpereigenen Zellen freigesetzt wird. Es handelt sich hier also um keine Substanz, die irgendein „Fremd“ anzeigt. Die Rezeptoren für ATP sind die Purinrezeptoren. Sie leiten die Information in die Zelle weiter. Die sich im Gewebe schon befindenden Makrophagen ist es möglich auf diese Weise, zusammen mit dem umgebenden Zellen, auf eine Gefahr für den Körper reagieren. Mit der Produktion von M-CSF durch das Endothel und den schon ansässigen Makrophagen werden weiterhin Monocyten zum Ort der ATP-Freisetzung gelockt. Mit dem Eintritt der Monozyten in das Gewebe durch die Gefäße beginnt deren Reifung zu Makrophagen. Monozyten reifen, wie oben erwähnt, zu Makrophagen aus, wenn IL-6 und M-CSF mit ihnen in Kontakt geraten. Das ATP veranlasst die Makrophagen weiterhin IL-6 zu produzieren.



**Abbildung 4-1**

Mögliches Schema, wie ATP als Faktor im Gewebe wirkt. Makrophagen produzieren auf ATP hin verstärkt IL-6. Monocyten wandern über den M-CSF Gradienten ins Gewebe ein. Monocyten reifen mit IL-6 und M-CSF weiterhin zu Makrophagen aus. M-CSFR (M-CSF-Rezeptoren) werden durch IL-6 überexprimiert.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass ATP einen Einfluß auf die Ströme, die Zytokinproduktion und die Kalzium Konzentration von Makrophagen hat.

Eine Wirkung von ATP als *Danger Signal* könnte vorliegen.

## 5 Zusammenfassung

Makrophagen sind in dieser Arbeit in verschiedenen Reifungsstadien elektrophysiologisch charakterisiert worden. Makrophagen sind elektrisch extrem dichte Zellen mit hohen Eingangswiderständen. Ihre Kapazität verändert sich mit der Zeit in Zellkultur, die Membranruhepotenziale zeigen sich entweder durch Kalium- oder Chloridleitfähigkeiten dominiert. In der Stromspannungskurve erkennt man eine Ausprägung des Einwärtsgleichrichters, der sich durch Barium spannungsabhängig blockieren läßt.

Die Entdeckung dieser Arbeit beruht aber auf der Tatsache, dass Applikation von 10  $\mu\text{M}$  ATP auf zwei Wochen alte Makrophagen der Spiegelei-Form Auswärtsströme oszillieren lässt. Die Strom-Oszillationen beruhen auf Oszillationen des zytosolischen Kalziums, die mit Fluoreszenzmessungen nachgewiesen werden konnten. Die Abhängigkeit der Kaliumströme durch Kalzium konnte durch die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration nachgewiesen werden. Stromklemme-Messungen zeigen, dass es durch das Überspülen der gepatchten Makrophage mit 10  $\mu\text{M}$  ATP zuerst zu einer Depolarisation, anschließend zu oszillierenden Hyperpolarisationen kommt. Mit schnellen Spannungssprüngen zwischen den Gleichgewichtspotenzialen für Kaliumkanäle und den Gleichgewichtspotenzialen für unspezifische Kationen-Kanäle ergab sich eine Identifizierung eines frühen Einwärtsstroms, der nicht durch Kalium getragen wurde, und spätere Oszillationen, die nicht von unspezifischen Kationen-Kanälen getragen wurden. Der Kationen-Strom konnte als vom  $\text{P2X}_4$  ligandengesteuertem nicht spezifischen Kationen-Kanal identifiziert werden. Die Oszillationen wurden durch den  $\text{P2Y}_2$ -Rezeptor ausgelöst, die dann über interne Signalwege auf die Kaliumkanäle BK und SK-4 ( $\text{IK}_{\text{Ca}}$  oder IK) wirken. Den größten Einfluß auf die Strom-Oszillationen konnte pharmakologisch in der Spannungsklemme den SK-4 zugewiesen werden. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass auch in der Cell-Attached Konfiguration Kalziumoszillationen gemessen werden konnten, was das Vorkommen der Kalziumoszillationen *in vivo* bestätigt. Zuletzt zeigten die Makrophagen durch 10  $\mu\text{M}$   $\text{ATP}\gamma\text{S}$  einen 40 fachen Anstieg der IL-6 Genexpression, was einen weiteren Einfluß des ATPs als proinflammatorisches *Dangersignal* nahe legt.

## 6 Abkürzungen

AC	=	Adenylat-Cyclase
AHP	=	Afterhyperpolarisation
AS	=	Aminosäure
Bp	=	Basenpaare
BK	=	Big conductance potassium channel
cAMP	=	cyclisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
cDNA	=	komplemetäre DNA
CD	=	Cluster of Differentiation
DAG	=	Diacylglycerol
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
EDHF	=	endothelabhängigen Hyperpolarisationsfaktor
EDRF	=	endothelium derived relaxing factor
EDTA	=	Etyhlendiamintetraessigsäure
EGTA	=	Ethylenglycol- <i>bis</i> ( $\beta$ -aminoethyl)-N,N,N',N',tetraessigsäure



---

GDP	=	Guanindiphosphat
GTP	=	Guanintriphosphat
fMLP	=	N-Formyl-L-Methyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin. Es handelt sich um ein Tripeptid, das die enzymatische Aktivität der Granulozyten und Monozyten stimuliert
HEK	=	„Human embryonic kidney“ (Zelllinie)
HEPES	=	Hydroxyethyl Piperazinyl Ethansulfonsäure
IK	=	Intermediat conductance potassium channel
IL-1	=	Interleukin 1
IL-6	=	Interleukin 6
IL-8	=	Interleukin 8
IL-12	=	Interleukin 12
INS	=	Infectious-Nonselself-Model
IP <sub>3</sub>	=	Inositoltriphosphat (1,4,5)
K2P	=	Kanalfamilie der Kaliumkanäle, die in einer Untereinheit über 2 Poren und 4 Transmembrandomänen verfügt.
kDa	=	Kilodalton
LPS	=	Lipopolysaccharide

---

MAPK	=	mitogen activated protein
MaxiK	=	Siehe BK
NADP	=	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NO	=	Stickstoffmonoxid
NOS	=	Stickstoffmonoxidsynthasen
PAMPs	=	pathogen associated molecular patterns
P2Y	=	Purinrezeptoren der 7 Transmembranomenklasse
P2X	=	Purinrezeptoren die unspezifische Ionenkanäle sind.
PCR	=	Polymerase-Kettenreaktion
PIP <sub>2</sub>	=	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	=	Proteinkinase A
PKC	=	Proteinkinase C
PLC	=	Phospholipase C
PMA	=	Phorbol 12 Myristate 13 Acetat
PRR	=	pattern recognition receptors

---

RNA	=	Ribonukleinsäure
RT-PCR	=	Reverse-Transcription-Polymerasen-Kettenreaktion
SerCa	=	sarcoendoplasmatische Retikulum Kalzium-ATPase
SK	=	Small conductance potassium channel
TASK	=	TWIK related acid sensitive potassium channel
TEA	=	Tetraethylamin
T <sub>H</sub> 1	=	T-Helferzellen
TLR	=	toll like receptors
TNF- $\alpha$	=	Tumornekrosefaktor alpha

## 7 Literaturverzeichnis

- ABBAS, A. K. & LICHTMAN, A. H. (2003). *Cellular and molecular Immunology*. Saunders.
- ABBOTT, G. W., SESTI, F., SPLAWSKI, I., BUCK, M. E., LEHMANN, M. H., TIMOTHY, K. W., KEATING, M. T. & GOLDSTEIN, S. A. (1999). MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 175-187.
- ABBRACCHIO, M. P. & BURNSTOCK, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 445-475.
- AHLUWALIA, J., TINKER, A., CLAPP, L. H., DUCHEN, M. R., ABRAMOV, A. Y., POPE, S., NOBLES, M. & SEGAL, A. W. (2004). The large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel is essential for innate immunity. *Nature* 853-858.
- ALBUQUERQUE, C., OLIVEIRA, S. M., COUTINHO-SILVA, R., OLIVEIRA-CASTRO, G. M. & PERSECHINI, P. M. (1993). ATP- and UTP-induced currents in macrophages and macrophage polykaryons. *Am J Physiol* C1663-1673.
- ARCHER, S. L. & RUSCH, N. J. (2001). *Potassium channels in cardiovascular biology*. Kluwer Academic Plenum Publishers, New York.
- BARGMANN, C. I. (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 2028-2033.
- BARRETT, E. F. & BARRET, J. N. (1976). Separation of two voltage-sensitive potassium currents, and demonstration of a tetrodotoxin-resistant calcium current in frog motoneurons. *J Physiol* 737-774.
- BARRETT, J. N., MAGLEBY, K. L. & PALLOTTA, B. S. (1982). Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J Physiol* 211-230.
- BARRY, P. H. & LYNCH, J. W. (1991). Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol* 101-117.

- BEHRENS, R., NOLTING, A., REIMANN, F., SCHWARZ, M., WALDSCHUTZ, R. & PONGS, O. (2000). hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family. *FEBS Lett* 99-106.
- BERRIDGE, M. J. & IRVINE, R. F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 197-205.
- BLUNCK, R., SCHEEL, O., MULLER, M., BRANDENBURG, K., SEITZER, U. & SEYDEL, U. (2001). New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: involvement of a K<sup>+</sup> channel in transmembrane signaling. *J Immunol* 1009-1015.
- BO, X., ZHANG, Y., NASSAR, M., BURNSTOCK, G. & SCHOEPFER, R. (1995). A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett* 129-133.
- BOST, K. L. & MASON, M. J. (1995). Thapsigargin and cyclopiazonic acid initiate rapid and dramatic increases of IL-6 mRNA expression and IL-6 secretion in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 285-296.
- BOWLER, J. W., BAILEY, R. J., NORTH, R. A. & SURPRENANT, A. (2003). P2X4, P2Y1 and P2Y2 receptors on rat alveolar macrophages. *Br J Pharmacol* 567-575.
- BOWLER, W. B., BIRCH, M. A., GALLAGHER, J. A. & BILBE, G. (1995). Identification and cloning of human P2U purinoceptor present in osteoclastoma, bone, and osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1137-1145.
- BRAKE, A. J., WAGENBACH, M. J. & JULIUS, D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 519-523.
- BRENNER, R., JEGLA, T. J., WICKENDEN, A., LIU, Y. & ALDRICH, R. W. (2000). Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J Biol Chem* 6453-6461.
- BURNET, F. M. (1962). The immunological significance of the thymus: an extension of the clonal selection theory of immunity. *Australas Ann Med* 79-91.
- CAHALAN, M. D., WULFF, H. & CHANDY, K. G. (2001). Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J Clin Immunol* 235-252.

- CHANDY, K. G. (1991). Simplified gene nomenclature. *Nature* 26.
- CHANG, K., HANAOKA, K., KUMADA, M. & TAKUWA, Y. (1995). Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *J Biol Chem* 26152-26158.
- CHARLIER, C., SINGH, N. A., RYAN, S. G., LEWIS, T. B., REUS, B. E., LEACH, R. J. & LEPPERT, M. (1998). A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 53-55.
- CHAVEZ, R. A., GRAY, A. T., ZHAO, B. B., KINDLER, C. H., MAZUREK, M. J., MEHTA, Y., FORSAYETH, J. R. & YOST, C. S. (1999). TWIK-2, a new weak inward rectifying member of the tandem pore domain potassium channel family. *J Biol Chem* 7887-7892.
- CHEMIN, J., GIRARD, C., DUPRAT, F., LESAGE, F., ROMEY, G. & LAZDUNSKI, M. (2003). Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K<sup>+</sup> channels. *Embo J* 5403-5411.
- CHEN, Z. P., LEVY, A. & LIGHTMAN, S. L. (1994). Activation of specific ATP receptors induces a rapid increase in intracellular calcium ions in rat hypothalamic neurons. *Brain Res* 249-256.
- CHOMARAT, P., BANCHEREAU, J., DAVOUST, J. & PALUCKA, A. K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 510-514.
- CLARKE, L. L. & BOUCHER, R. C. (1992). Chloride secretory response to extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis nasal epithelia. *Am J Physiol* C348-356.
- COLLO, G., NORTH, R. A., KAWASHIMA, E., MERLO-PICH, E., NEIDHART, S., SURPRENANT, A. & BUELL, G. (1996). Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci* 2495-2507.
- COMMUNI, D., GOVAERTS, C., PARMENTIER, M. & BOEYNAEMS, J. M. (1997). Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 31969-31973.
- COMMUNI, D., JANSSENS, R., SUAREZ-HUERTA, N., ROBAYE, B. & BOEYNAEMS, J. M. (2000). Advances in signalling by extracellular nucleotides. the role and transduction mechanisms of P2Y receptors. *Cell Signal* 351-360.

- COMMUNI, D., PARMENTIER, M. & BOEYNAEMS, J. M. (1996). Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 303-308.
- COMMUNI, D., PIROTTON, S., PARMENTIER, M. & BOEYNAEMS, J. M. (1995). Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor. *J Biol Chem* 30849-30852.
- DAI, X. M., RYAN, G. R., HAPPEL, A. J., DOMINGUEZ, M. G., RUSSELL, R. G., KAPP, S., SYLVESTRE, V. & STANLEY, E. R. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 111-120.
- DECOURSEY, T. E. (2003). Interactions between NADPH oxidase and voltage-gated proton channels: why electron transport depends on proton transport. *FEBS Lett* 57-61.
- DECOURSEY, T. E. (2004). During the respiratory burst, do phagocytes need proton channels or potassium channels, or both? *Sci STKE* pe21.
- DECOURSEY, T. E., KIM, S. Y., SILVER, M. R. & QUANDT, F. N. (1996). Ion channel expression in PMA-differentiated human THP-1 macrophages. *J Membr Biol* 141-157.
- DECOURSEY, T. E., MORGAN, D. & CHERNY, V. V. (2003). The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels. *Nature* 531-534.
- DI VIRGILIO, F., CHIOZZI, P., FERRARI, D., FALZONI, S., SANZ, J. M., MORELLI, A., TORBOLI, M., BOLOGNESI, G. & BARICORDI, O. R. (2001). Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 587-600.
- DOLMETSCH, R. E., XU, K. & LEWIS, R. S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 933-936.
- DORSAM, R. T. & KUNAPULI, S. P. (2004). Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin Invest* 340-345.
- DOYLE, D. A., MORAIS CABRAL, J., PFUETZNER, R. A., KUO, A., GULBIS, J. M., COHEN, S. L., CHAIT, B. T. & MACKINNON, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 69-77.

- DWORETZKY, S. I., BOISSARD, C. G., LUM-RAGAN, J. T., MCKAY, M. C., POST-MUNSON, D. J., TROJNACKI, J. T., CHANG, C. P. & GRIBKOFF, V. K. (1996). Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlobeta subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. *J Neurosci* 4543-4550.
- EDER, C. (1998). Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am J Physiol* C327-342.
- EDER, C. & FISCHER, H. G. (1997). Effects of colony-stimulating factors on voltage-gated K<sup>+</sup> currents of bone marrow-derived macrophages. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 198-202.
- EDER, C., KLEE, R. & HEINEMANN, U. (1997). Pharmacological properties of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents of ramified murine brain macrophages. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 233-239.
- EDER, C., KLEE, R. & HEINEMANN, U. (1998). Involvement of stretch-activated Cl<sup>-</sup> channels in ramification of murine microglia. *J Neurosci* 7127-7137.
- ERB, L., GARRAD, R., WANG, Y., QUINN, T., TURNER, J. T. & WEISMAN, G. A. (1995). Site-directed mutagenesis of P2U purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J Biol Chem* 4185-4188.
- FEWTRELL, C. (1993). Ca<sup>2+</sup> oscillations in non-excitable cells. *Annu Rev Physiol* 427-454.
- FISCHER, H. G., EDER, C., HADDING, U. & HEINEMANN, U. (1995). Cytokine-dependent K<sup>+</sup> channel profile of microglia at immunologically defined functional states. *Neuroscience* 183-191.
- FITZ, J. G. & SOSTMAN, A. H. (1994). Nucleotide receptors activate cation, potassium, and chloride currents in a liver cell line. *Am J Physiol* G544-553.
- GALLIN, E. K. (1984). Electrophysiological properties of macrophages. *Fed Proc* 2385-2389.
- GALLIN, E. K. (1986). Ionic channels in leukocytes. *J Leukoc Biol* 241-254.
- GALLIN, E. K. (1989). Evidence for a Ca-activated inwardly rectifying K channel in human macrophages. *Am J Physiol* C77-85.



- GALLIN, E. K. & GALLIN, J. I. (1977). Interaction of chemotactic factors with human macrophages. Induction of transmembrane potential changes. *J Cell Biol* 277-289.
- GALLIN, E. K. & MCKINNEY, L. C. (1988). Patch-clamp studies in human macrophages: single-channel and whole-cell characterization of two K<sup>+</sup> conductances. *J Membr Biol* 55-66.
- GALLIN, E. K. & SHEEHY, P. A. (1985). Differential expression of inward and outward potassium currents in the macrophage-like cell line J774.1. *J Physiol* 475-499.
- GALLIN, E. K., WIEDERHOLD, M. L., LIPSKY, P. E. & ROSENTHAL, A. S. (1975). Spontaneous and induced membrane hyperpolarizations in macrophages. *J Cell Physiol* 653-661.
- GALLUCCI, S. & MATZINGER, P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 114-119.
- GAN, L. & KACZMAREK, L. K. (1998). When, where, and how much? Expression of the Kv3.1 potassium channel in high-frequency firing neurons. *J Neurobiol* 69-79.
- GARCIA, M. L., HANNER, M., KNAUS, H. G., KOCH, R., SCHMALHOFER, W., SLAUGHTER, R. S. & KACZOROWSKI, G. J. (1997). Pharmacology of potassium channels. *Adv Pharmacol* 425-471.
- GARDOS, G. (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 653-654.
- GREENBERG, S. & GRINSTEIN, S. (2002). Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 136-145.
- GRIFFITHS, R. J., STAM, E. J., DOWNS, J. T. & OTTERNESS, I. G. (1995). ATP induces the release of IL-1 from LPS-primed cells in vivo. *J Immunol* 2821-2828.
- HAGIWARA, S. & JAFFE, L. A. (1979). Electrical properties of egg cell membranes. *Annu Rev Biophys Bioeng* 385-416.
- HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. & SIGWORTH, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 85-100.

- HASLBERGER, A., ROMANIN, C. & KOERBER, R. (1992). Membrane potential modulates release of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Mol Biol Cell* 451-460.
- HEGINBOTHAM, L., ABRAMSON, T. & MACKINNON, R. (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K<sup>+</sup> channels. *Science* 1152-1155.
- HILLE, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes, Third edition*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland.
- HILLE, B., TSE, A., TSE, F. W. & BOSMA, M. M. (1995). Signaling mechanisms during the response of pituitary gonadotropes to GnRH. *Recent Prog Horm Res* 75-95.
- HIRUMA, H. & BOURQUE, C. W. (1995). P2 purinoceptor-mediated depolarization of rat supraoptic neurosecretory cells in vitro. *J Physiol* 805-811.
- HONDA, S., SASAKI, Y., OHSAWA, K., IMAI, Y., NAKAMURA, Y., INOUE, K. & KOHSAKA, S. (2001). Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 1975-1982.
- HORN, R. & MARTY, A. (1988). Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 145-159.
- IDZKO, M., DICHMANN, S., PANTHER, E., FERRARI, D., HEROUY, Y., VIRCHOW, C., JR., LUTTMANN, W., DI VIRGILIO, F. & NORGAEUER, J. (2001). Functional characterization of P2Y and P2X receptors in human eosinophils. *J Cell Physiol* 329-336.
- IDZKO, M., PANTHER, E., BREMER, H. C., SORICHTER, S., LUTTMANN, W., VIRCHOW, C. J., JR., DI VIRGILIO, F., HEROUY, Y., NORGAEUER, J. & FERRARI, D. (2003). Stimulation of P2 purinergic receptors induces the release of eosinophil cationic protein and interleukin-8 from human eosinophils. *Br J Pharmacol* 1244-1250.
- ISHII, T. M., SILVIA, C., HIRSCHBERG, B., BOND, C. T., ADELMAN, J. P. & MAYLIE, J. (1997). A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 11651-11656.
- JANEWAY, C. A., JR. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1-13.
- JANEWAY, C. A., JR. (2002). *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

- JANEWAY, C. A., JR. & MEDZHITOV, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 197-216.
- JUDGE, S. I., MONTCALM-MAZZILLI, E. & GALLIN, E. K. (1994). IKir regulation in murine macrophages: whole cell and perforated patch studies. *Am J Physiol* C1691-1698.
- KANNO, T. & TAKISHIMA, T. (1990). Chloride and potassium channels in U937 human monocytes. *J Membr Biol* 149-161.
- KHANNA, R., ROY, L., ZHU, X. & SCHLICHTER, L. C. (2001). K<sup>+</sup> channels and the microglial respiratory burst. *Am J Physiol Cell Physiol* C796-806.
- KIM, S. Y., SILVER, M. R. & DECOURSEY, T. E. (1996). Ion channels in human THP-1 monocytes. *J Membr Biol* 117-130.
- KUBO, Y., BALDWIN, T. J., JAN, Y. N. & JAN, L. Y. (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 127-133.
- KUROKI, M., TAKESHIGE, K. & MINAKAMI, S. (1989). ATP-induced calcium mobilization in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 103-106.
- LAZAROWSKI, E. R., BOUCHER, R. C. & HARDEN, T. K. (2003). Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* 785-795.
- LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 973-983.
- LITTLETON, J. T. & GANETZKY, B. (2000). Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* 35-43.
- LOPATIN, A. N., MAKHINA, E. N. & NICHOLS, C. G. (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 366-369.
- LUSTIG, K. D., SHIAU, A. K., BRAKE, A. J. & JULIUS, D. (1993). Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 5113-5117.

- MAINGRET, F., PATEL, A. J., LAZDUNSKI, M. & HONORE, E. (2001). The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1. *Embo J* 47-54.
- MARTIN, K. A., KERTESY, S. B. & DUBYAK, G. R. (1997). Down-regulation of P2U-purinergic nucleotide receptor messenger RNA expression during in vitro differentiation of human myeloid leukocytes by phorbol esters or inflammatory activators. *Mol Pharmacol* 97-108.
- MARTIN, S. C. & SHUTTLEWORTH, T. J. (1995). Activation by ATP of a P2U 'nucleotide' receptor in an exocrine cell. *Br J Pharmacol* 321-329.
- MATZINGER, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* 301-305.
- MCKINNEY, L. C. & GALLIN, E. K. (1990). Effect of adherence, cell morphology, and lipopolysaccharide on potassium conductance and passive membrane properties of murine macrophage J774.1 cells. *J Membr Biol* 47-56.
- MCMANUS, O. B., HELMS, L. M., PALLANCK, L., GANETZKY, B., SWANSON, R. & LEONARD, R. J. (1995). Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* 645-650.
- MEERA, P., WALLNER, M. & TORO, L. (2000). A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 5562-5567.
- MITANI, H., KATAYAMA, N., ARAKI, H., OHISHI, K., KOBAYASHI, K., SUZUKI, H., NISHII, K., MASUYA, M., YASUKAWA, K., MINAMI, N. & SHIKU, H. (2000). Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. *Br J Haematol* 288-295.
- NEHER, E. (1992). *Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments*. Academic Press, San Diego.
- NEUHOFF, H., NEU, A., LISS, B. & ROEPER, J. (2002). I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J Neurosci* 1290-1302.
- NICKE, A., BAUMERT, H. G., RETTINGER, J., EICHELE, A., LAMBRECHT, G., MUTSCHLER, E. & SCHMALZING, G. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *Embo J* 3016-3028.

- NIMIGEAN, C. M. & MAGLEBY, K. L. (1999). The beta subunit increases the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels by retaining the gating in the bursting states. *J Gen Physiol* 425-440.
- NORTH, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 1013-1067.
- NORTH, R. A. & BARNARD, E. A. (1997). Nucleotide receptors. *Curr Opin Neurobiol* 346-357.
- OLDSTONE, M. B. (1987). Molecular Mimicry and Autoimmune Disease. *Cell* 819-820.
- ORIO, P., ROJAS, P., FERREIRA, G. & LATORRE, R. (2002). New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol Sci* 156-161.
- PARR, C. E., SULLIVAN, D. M., PARADISO, A. M., LAZAROWSKI, E. R., BURCH, L. H., OLSEN, J. C., ERB, L., WEISMAN, G. A., BOUCHER, R. C. & TURNER, J. T. (1994). Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 13067.
- PATEL, A. J. & LAZDUNSKI, M. (2004). The 2P-domain K(+) channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers Arch* 261-273.
- PATEL, A. J., MAINGRET, F., MAGNONE, V., FOSSET, M., LAZDUNSKI, M. & HONORE, E. (2000). TWIK-2, an inactivating 2P domain K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 28722-28730.
- PERSOONS, J. H., SCHORNAGEL, K., TILDERS, F. F., DE VENTE, J., BERKENBOSCH, F. & KRAAL, G. (1996). Alveolar macrophages autoregulate IL-1 and IL-6 production by endogenous nitric oxide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 272-278.
- POLLARD, J. W., HUNT, J. S., WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W. & STANLEY, E. R. (1991). A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. *Dev Biol* 273-283.
- POURRIER, M., SCHRAM, G. & NATTEL, S. (2003). Properties, expression and potential roles of cardiac K<sup>+</sup> channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J Membr Biol* 141-152.
- QIU, M. R., CAMPBELL, T. J. & BREIT, S. N. (2002). A potassium ion channel is involved in cytokine production by activated human macrophages. *Clin Exp Immunol* 67-74.

- RALEVIC, V. & BURNSTOCK, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 413-492.
- REEVES, E. P., LU, H., JACOBS, H. L., MESSINA, C. G., BOLSOVER, S., GABELLA, G., POTMA, E. O., WARLEY, A., ROES, J. & SEGAL, A. W. (2002). Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature* 291-297.
- RENZ, H. (2003). *Integrative klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin*. de Gruyter, New York.
- ROBAYE, B., BOEYNAEMS, J. M. & COMMUNI, D. (1997). Slow desensitization of the human P2Y<sub>6</sub> receptor. *Eur J Pharmacol* 231-236.
- SAH, P. (1996). Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* 150-154.
- SANGUINETTI, M. C. & JURKIEWICZ, N. K. (1990). Two components of cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 195-215.
- SANGUINETTI, M. C. & SPECTOR, P. S. (1997). Potassium channelopathies. *Neuropharmacology* 755-762.
- SCHILLING, T., REPP, H., RICHTER, H., KOSCHINSKI, A., HEINEMANN, U., DREYER, F. & EDER, C. (2002). Lysophospholipids induce membrane hyperpolarization in microglia by activation of IKCa1 Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>(+)</sup> channels. *Neuroscience* 827-835.
- SCHILLING, T., STOCK, C., SCHWAB, A. & EDER, C. (2004). Functional importance of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels for lysophosphatidic acid-induced microglial migration. *Eur J Neurosci* 1469-1474.
- SCHMID-ANTOMARCHI, H., SCHMID-ALLIANA, A., ROMÉY, G., VENTURA, M. A., BREITMAYER, V., MILLET, M. A., HUSSON, H., MOGHRABI, B., LAZDUNSKI, M. & ROSSI, B. (1997). Extracellular ATP and UTP control the generation of reactive oxygen intermediates in human macrophages through the opening of a charybdotoxin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel. *J Immunol* 6209-6215.
- SCHULZE-LOHOFF, E., BITZER, M., OGILVIE, A. & STERZEL, R. B. (1995). P2U-purinergic receptor activation mediates inhibition of cAMP accumulation in cultured renal mesangial cells. *Ren Physiol Biochem* 219-230.

- SEIFERT, R., BURDE, R. & SCHULTZ, G. (1989). Activation of NADPH oxidase by purine and pyrimidine nucleotides involves G proteins and is potentiated by chemotactic peptides. *Biochem J* 813-819.
- SEIFERT, R. & SCHULTZ, G. (1989). Involvement of pyrimidinoceptors in the regulation of cell functions by uridine and by uracil nucleotides. *Trends Pharmacol Sci* 365-369.
- SIMON, J., WEBB, T. E. & BARNARD, E. A. (1995). Characterization of a P2Y purinoceptor in the brain. *Pharmacol Toxicol* 302-307.
- SURPRENANT, A., RASSENDREN, F., KAWASHIMA, E., NORTH, R. A. & BUELL, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 735-738.
- THOMAS, A. P., BIRD, G. S., HAJNOCZKY, G., ROBB-GASPERS, L. D. & PUTNEY, J. W., JR. (1996). Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *Faseb J* 1505-1517.
- TSE, A. & HILLE, B. (1992). GnRH-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations and rhythmic hyperpolarizations of pituitary gonadotropes. *Science* 462-464.
- TSENG-CRANK, J., GODINOT, N., JOHANSEN, T. E., AHRING, P. K., STROBAEK, D., MERTZ, R., FOSTER, C. D., OLESEN, S. P. & REINHART, P. H. (1996). Cloning, expression, and distribution of a Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel beta-subunit from human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 9200-9205.
- UEBELE, V. N., LAGRUTTA, A., WADE, T., FIGUEROA, D. J., LIU, Y., MCKENNA, E., AUSTIN, C. P., BENNETT, P. B. & SWANSON, R. (2000). Cloning and functional expression of two families of beta-subunits of the large conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 23211-23218.
- VALERA, S., HUSSY, N., EVANS, R. J., ADAMI, N., NORTH, R. A., SURPRENANT, A. & BUELL, G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 516-519.
- VALVERDE, M. A., ROJAS, P., AMIGO, J., COSMELLI, D., ORIO, P., BAHAMONDE, M. I., MANN, G. E., VERGARA, C. & LATORRE, R. (1999). Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 1929-1931.
- VAN DER WEYDEN, L., CONIGRAVE, A. D. & MORRIS, M. B. (2000). Signal transduction and white cell maturation via extracellular ATP and the P2Y11 receptor. *Immunol Cell Biol* 369-374.

- VAN RHEE, A. M., FISCHER, B., VAN GALEN, P. J. & JACOBSON, K. A. (1995). Modelling the P2Y purinoceptor using rhodopsin as template. *Drug Des Discov* 133-154.
- VANDENBERG, C. A. (1987). Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2560-2564.
- VERGARA, C., LATORRE, R., MARRION, N. V. & ADELMAN, J. P. (1998). Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 321-329.
- VICENTE, R., ESCALADA, A., COMA, M., FUSTER, G., SANCHEZ-TILLO, E., LOPEZ-IGLESIAS, C., SOLER, C., SOLSONA, C., CELADA, A. & FELIPE, A. (2003). Differential voltage-dependent K<sup>+</sup> channel responses during proliferation and activation in macrophages. *J Biol Chem* 46307-46320.
- VON KUGELGEN, I. & WETTER, A. (2000). Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 310-323.
- WALLNER, M., MEERA, P. & TORO, L. (1996). Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca(2+)-sensitive K<sup>+</sup> channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 14922-14927.
- WALLNER, M., MEERA, P. & TORO, L. (1999). Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: a transmembrane beta-subunit homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 4137-4142.
- WANG, Z. W., KUNKEL, M. T., WEI, A., BUTLER, A. & SALKOFF, L. (1999). Genomic organization of nematode 4TM K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci* 286-303.
- WANNER, S. G., KOCH, R. O., KOSCHAK, A., TRIEB, M., GARCIA, M. L., KACZOROWSKI, G. J. & KNAUS, H. G. (1999). High-conductance calcium-activated potassium channels in rat brain: pharmacology, distribution, and subunit composition. *Biochemistry* 5392-5400.
- WEBB, T. E., FEOLDE, E., VIGNE, P., NEARY, J. T., RUNBERG, A., FRELIN, C. & BARNARD, E. A. (1996a). The P2Y purinoceptor in rat brain microvascular endothelial cells couple to inhibition of adenylate cyclase. *Br J Pharmacol* 1385-1392.



- WEBB, T. E., HENDERSON, D., KING, B. F., WANG, S., SIMON, J., BATESON, A. N., BURNSTOCK, G. & BARNARD, E. A. (1996b). A novel G protein-coupled P2 purinoceptor (P2Y3) activated preferentially by nucleoside diphosphates. *Mol Pharmacol* 258-265.
- WEBB, T. E., SIMON, J., KRISHEK, B. J., BATESON, A. N., SMART, T. G., KING, B. F., BURNSTOCK, G. & BARNARD, E. A. (1993). Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* 219-225.
- WEBSTER, R. O., LARSEN, G. L., MITCHELL, B. C., GOINS, A. J. & HENSON, P. M. (1982). Absence of inflammatory lung injury in rabbits challenged intravascularly with complement-derived chemotactic factors. *Am Rev Respir Dis* 335-340.
- WEIDEMA, A. F., BARBERA, J., DIXON, S. J. & SIMS, S. M. (1997). Extracellular nucleotides activate non-selective cation and Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channels in rat osteoclasts. *J Physiol* 303-315.
- WEIDEMA, A. F., DIXON, S. J. & SIMS, S. M. (2001). Activation of P2Y but not P2X(4) nucleotide receptors causes elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in mammalian osteoclasts. *Am J Physiol Cell Physiol* C1531-1539.
- WICKMAN, K. & CLAPHAM, D. E. (1995). Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev* 865-885.
- WOLKOFF, L. I., PERRONE, R. D., GRUBMAN, S. A., LEE, D. W., SOLTOFF, S. P., ROGERS, L. C., BEINBORN, M., FANG, S. L., CHENG, S. H. & JEFFERSON, D. M. (1995). Purinoceptor P2U identification and function in human intrahepatic biliary epithelial cell lines. *Cell Calcium* 375-383.
- WULFF, H., MILLER, M. J., HANSEL, W., GRISSMER, S., CAHALAN, M. D. & CHANDY, K. G. (2000). Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 8151-8156.
- XIA, X. M., DING, J. P. & LINGLE, C. J. (1999). Molecular basis for the inactivation of Ca<sup>2+</sup>- and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells. *J Neurosci* 5255-5264.
- YAROM, Y., SUGIMORI, M. & LLINAS, R. (1985). Ionic currents and firing patterns of mammalian vagal motoneurons in vitro. *Neuroscience* 719-737.

# Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Jürgen Daut meinen aufrichtigen Dank für die rasche Durchführung dieser Arbeit aussprechen.

Frau HD. Dr. Monika Stengl danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten und für die gute Beratung am Ende der Doktorarbeit.

Bei Dr. Peter Hanley bedanke ich mich für die vielen Diskussionen, die Fluoreszenzmessungen und großartigem Humor.

Vijay Reningunta danke ich für die die molekularbiologische Untersuchungen in dieser Arbeit.

Rainer Sus danke ich für die aufgenommene Filme von Makrophagen und für etliche Zigaretten.

Alexander Dalpke danke ich für den immunologischen Teil dieser Arbeit.

Ein besonderen Dank an Sven Limberg für die erfolgreiche Zusammenarbeit, den „Nacht-Patches“ und vieler Messungen und Abbildungen für die Arbeit.

Dr. Günter Schlichthörl für die Diskussionen und die hervorragende Zusammenarbeit in den Praktika.

Susanne Bamerny für viele interessante Konversation und lustige Anmerkungen.

Dr. Caroline Putzke für raumgreifende Zusammenarbeit und unglaubliche Gespräche.

Sven Wegner danke ich für hervorragende Zusammenarbeit und guten Schach.

Ein besonderer Dank geht an Andrea Hetzel für das Korrekturlesen dieser Arbeit ohne zu nörgeln.

Mein dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe: Brigitte Burk, Marko Burmester, Dr. Niels Decher, Yadong Gao, Robert Graf, Lothar Krapp, Xiantao Li, Roswitha Luzius, Dr. Dr. Kurt Mandrek, Dr. Regina Preisig Müller, Susanne Rinnè, Kersten Schneider, Andrea Schubert, Marylou Zuzarte.

Ich danke meiner WG, die die beste WG der Welt ist.

Nicht zuletzt Danke ich allen Freunden, die mich die ganze Zeit unterstützt haben.

Linda Retzlaff die sich alleine seit einem Jahr sich um meinen Sohn Noel kümmert.

Großen Dank schulde ich meiner ganzen Familie, die immer für mich da war.