

**Patch–Clamp Untersuchungen an Immunzellen:  
Beteiligung eines Ionenkanals als generelles Prinzip  
bei der Zellaktivierung durch mikrobielle  
Pathogenitätsfaktoren**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian–Albrechts–Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Olaf Scheel  
Kiel 2002

Referent/in: Prof. Dr. Ulrich Seydel

Korreferent/in: Prof. Dr. Ulf-Peter Hansen

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2002

Zum Druck genehmigt: Kiel, .....

.....  
Der Dekan

# Inhalt

<b>1 Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>5</b>
<b>2 Einführung in den biologischen Hintergrund .....</b>	<b>9</b>
2.1 Aktivierung von Immunzellen .....	9
2.2 Aktivatoren immunkompetenter Zellen.....	11
2.2.1 Zellwandkomponenten Gram-positiver Bakterien.....	12
2.2.2 Endotoxine Gram-negativer Bakterien: Struktur-Wirkungsbeziehung.....	13
2.3 An der Signaltransduktion beteiligte Oberflächenstrukturen.....	18
2.3.1 LPS-bindende Proteine und (Ko-) Rezeptoren.....	18
2.3.1.1 Das LPS-bindende Protein LBP.....	19
2.3.1.2 Cluster of Differentiation (CD)14.....	19
2.3.1.3 Weitere LPS-bindende Proteine.....	20
2.3.2 Toll-like Rezeptoren.....	21
2.3.3 Rafts und PDZ-Domänen.....	23
2.3.4 LPS-induzierte Signalübertragung: Aktivierung eines Ionenkanals.....	25
2.4 Stand d. Forschung zur Beteiligung von Ionenkanälen an der Aktivierung von Immunzellen..	26
2.4.1 MaxiK-Kanäle in Monozyten und Makrophagen .....	26
2.4.2 Rolle von Kaliumkanälen bei der Zellaktivierung .....	27
2.4.3 Einfluss von LPS auf MaxiK-Kanäle.....	29
2.4.4 Eigene Vorarbeiten.....	31
<b>3 Kaliumionenkanäle und Patch-Clamp Technik.....</b>	<b>34</b>
3.1 Zellmembranen und Ionentransport.....	34
3.2 MaxiK-Kanäle.....	36
3.3 Patch-Clamp Technik.....	41
3.3.1 Patch-Clamp Konfigurationen.....	42
<b>4 Methoden und Materialien.....</b>	<b>44</b>
4.1 Zellkultur.....	44
4.1.1 Humane Monozyten und Makrophagen.....	44
4.1.2 CHO-Zellen.....	45
4.1.3 HEK-Zellen.....	46
4.1.4 Die murine Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 .....	46
4.2 Chemikalien.....	47
4.2.1 Messlösungen.....	47
4.2.2 Endotoxine, andere bakterielle Virulenzfaktoren und Zytokine.....	48

---

4.2.3 NO–Donatoren.....	49
4.2.4 Kanalmodulatoren und –blocker sowie weitere Agenzien.....	49
4.3 Nachweisreaktionen für die Zellaktivierung.....	50
4.3.1 Stimulation von Zellen durch Virulenzfaktoren.....	50
4.3.2 TNF $\alpha$ –ELISA.....	52
4.3.3 NO–Nachweis.....	53
4.3.4 Nachweis der MAP–Kinasen und der NF– $\kappa$ B–Translokation.....	53
4.4 Elektrophysiologische Messungen.....	54
4.4.1 Präparation der Glaspipetten und Messelektroden.....	54
4.4.2 Der Patch–Clamp Messaufbau.....	55
4.4.2.1 Der Messplatz.....	55
4.4.2.2 Elektronik und Aufnahme der Messdaten.....	57
4.4.3 Auswertung der Patch–Clamp Daten.....	59
4.4.3.1 Einzelkanalmessungen in excised patch Konfigurationen.....	59
4.4.3.2 Whole–Cell Messungen.....	62
4.5 Weitere physikalische Methoden.....	62
4.5.1 Fluoreszenzspektroskopische Resonanz–Energie–Transfer Messungen (FRET).....	62
4.5.2 Massenspektrometrie.....	63
<b>5 Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>65</b>
5.1 Patch–Clamp Messungen in Zelllinien mit dem rekonstituierten MaxiK–Kanal.....	66
5.1.1 Zur Wahl der $\beta$ –Subunit.....	67
5.1.2 CHO–Zellen mit dem MaxiK–Kanal.....	68
5.1.3 HEK–Zellen mit dem MaxiK–Kanal .....	69
5.1.4 Einfluss von LPS auf die Aktivität des rekonstituierten MaxiK–Kanals .....	71
5.2 Aktivierung des MaxiK–Kanals durch Peptidoglycan und Interleukin–1.....	72
5.2.1 MaxiK–Aktivierung durch sPG.....	73
5.2.2 MaxiK–Aktivierung durch Interleukin–1.....	75
5.2.3 Mechanismus der MaxiK–Kanal Aktivierung.....	82
5.2.3.1 Ist der MaxiK–Kanals durch NO aktivierbar?.....	86
5.2.3.2 Erfolgt die MaxiK–Aktivierung über Proteinkinasen?.....	90
5.3 Untersuchungen mit MaxiK–Aktivatoren.....	93
5.3.1 Wirkung der MaxiK–Aktivatoren NS 1608 und NS 004.....	94
5.3.1.1 Einfluss von NS 1608 auf den MaxiK–Kanal in humanen Makrophagen.....	94
5.3.1.2 Einfluss der Kanalaktivatoren auf die Aktivierung von Makrophagen.....	95
5.3.1.3 Einfluss von NS 1608 auf den MaxiK–Kanal in CHO–Zellen.....	99

---

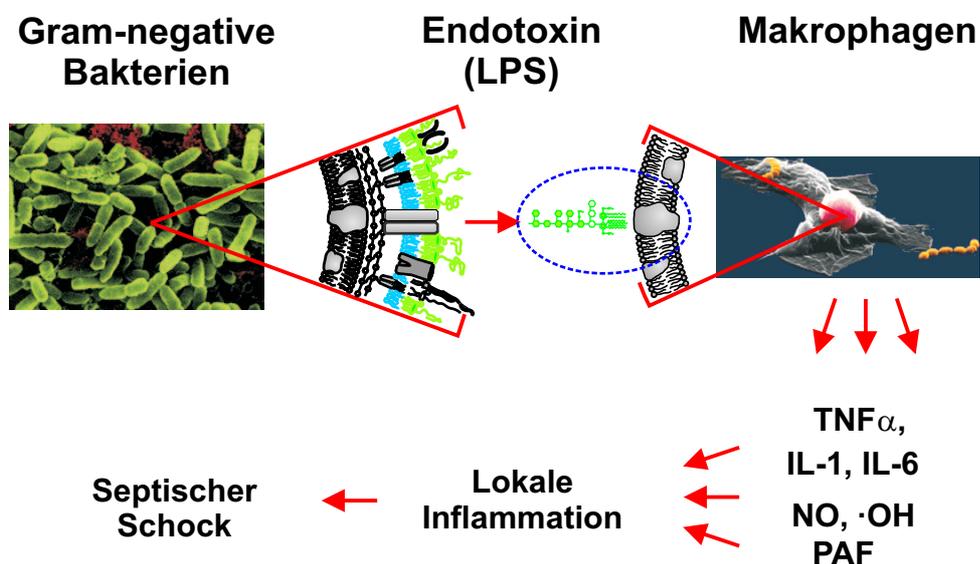
5.3.1.4 Einfluss von NS 1608 auf die ERK-Phosphorylierung und die NF- $\kappa$ B-Translokation in den CHO-Zellen.....	100
5.3.2 Phloretin.....	102
5.4 Blockade des MaxiK-Kanals – Korrelation der elektrophysiologischen Daten und der Zellaktivierung.....	104
5.4.1 LPS und Kanalblocker im Patch-Clamp Experiment.....	105
5.4.2 K <sup>+</sup> -Kanalblocker inhibieren die Zytokinfreisetzung.....	106
5.4.3 Einfluss des extrazellulären Kaliumkonzentration auf die Zellaktivierung.....	107
5.4.4 Einfluss der MaxiK-Blockade auf intrazelluläre Signalkaskaden.....	109
5.4.5 Wo greift die Kanalblockade inhibierend in die Zellaktivierung ein?.....	111
5.4.6 Einsatz weiterer spezifischer MaxiK-Kanalblocker.....	113
5.4.7 Nebenwirkungen der eingesetzten Kanalblocker.....	116
5.5 Der Unterschied zwischen Monozyten und Makrophagen.....	119
5.6 Untersuchungen im Maussystem.....	122
<b>6 Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>127</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>134</b>

## Abkürzungen

BMDM	Bone marrow derived macrophages	LPS	Lipopolisaccharide
cAMP	zykl. Adenosinmonophosphat	LTA	Lipoteichonsäure
ChTX	Charybdotoxin	MAPK	Mitogen activated protein kinase
cGMP	zykl. Guanosinmonophosphat	MyD88	Myeloid differentiation factor 88
CHO	Chinese hamster ovary	mCD14/mLPB	membrangebundenes CD14/LBP
CD	Cluster of differentiation	MSR	Macrophage scavenger receptor
CMC	kritische Mizellenkonzentration	NF- $\kappa$ B	Nuclear factor- $\kappa$ B
CPZ	Chlorpromazin	NO	Nitric oxide
CQ	Chloroquine	PAF	Plättchen aktivierender Faktor
CMC	kritische Mizellenkonzentration	PDZ	PSD-95/Disc-large/ZO-1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	(s)PG	(lösliches) Peptidoglycan
ERK	Extracellular signal regulated kinase	P2X <sub>7</sub> R	purinerges Rezeptor P2X <sub>7</sub>
GPI	Glycosyl Phosphatidylinositol	TEA	Tetraethylammonium
IbTX	Iberiotoxin	TF	Tissue factor
ICE	IL-1 $\beta$ -konvertierendes Enzym	TIR	TLR/IL-1-Rezeptor
IFN	Interferon	TIRAP	TIR associated protein
IL	Interleukin	TLR	Toll like receptor
IL-1-Ra	IL-1-Rezeptorantagonist	TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
iNOS	induzierbare NO-Synthase	TREM-1	Triggering receptor expressed on myeloid cells No. 1
IP3	Inositoltriphosphat		
LBP	LPS-bindendes Protein		
LP	Lipopeptid		

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Wenn Bakterien in den Organismus von Säugern eindringen, kommt es im Rahmen der angeborenen Immunabwehr zur Aktivierung von Endothelzellen, Lymphozyten sowie Monozyten und Makrophagen. Letztere spielen bei der Erkennung und Beseitigung der eingedrungenen Bakterien eine übergeordnete Rolle. Auf den Kontakt mit Virulenzfaktoren, wie z.B. den Membranbestandteilen der Bakterien – dem Lipopolysaccharid (LPS) der Gram-negativen Bakterien, dem Peptidoglycan, den Lipopeptiden und der Lipoteichonsäure der Gram-positiven – reagieren die Makrophagen u.a. mit der Ausschüttung von Botenstoffen (Mediatoren), den Zytokinen wie Interleukin-1, -6, -10 und -12 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$ . Diese freigesetzten Mediatoren regulieren die weitere Immunantwort des Organismus, indem sie ihrerseits Zellen aktivieren. Bei einer zu hohen Konzentration der Virulenzfaktoren und einer dadurch induzierten Freisetzung von Zytokinen kann es zu einer Überreaktion des



**Abbildung 1:** Entstehungsschritte einer Sepsis durch z.B. Gram-negativen Bakterien: Nach dem Eindringen der Bakterien in den Wirt kommt es insbesondere durch bakterielle Membranbestandteile zur Aktivierung von Immunzellen, was zur Ausschüttung verschiedener Botenstoffe führt. Als Folge kann es zu einer lokalen Inflammation und zur Sepsis oder auch zum septischen Schock kommen.

Immunsystem kommen, dem septischen Schock. Hohes Fieber, die Aktivierung von Komplement- und Gerinnungskaskaden und hämodynamische Instabilität können schließlich ein Multiorganversagen zur Folge haben.

Auch wenn in den letzten Jahren vor allem durch molekularbiologische Untersuchungen große Fortschritte bei der Aufklärung der elementaren Schritte der Aktivierung von Monozyten und Makrophagen durch bakterielle Virulenzfaktoren gemacht werden konnten, ist nach wie vor nicht vollständig geklärt, welche Strukturen auf Immunzellen schädliche von unschädlichen Substanzen unterscheiden und davon abhängig ein Signal ins Zellinnere generieren, das die weiteren Schritte der Zellaktivierung triggert. Eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Pathogen-assoziierten Strukturen und der Signaltransduktion spielen neben anderen Proteinen zweifellos die Toll-like Rezeptoren (TLR), für die gezeigt ist, dass sie unterschiedliche bakterielle Produkte erkennen und ein Signal durch die Zytoplasmamembran ins Zellinnere übertragen können.

In der Laborgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel wurde zunächst untersucht, welche physikochemischen Faktoren des LPS Gram-negativer Bakterien dessen endotoxische Aktivität bestimmen. Dabei stellte sich heraus, dass die molekulare Konformation des hydrophoben Teils des amphiphilen LPS-Moleküls, das Lipid A, darüber entscheidet, ob ein LPS endotoxisch aktiv ist oder nicht. Ausgehend von dieser Erkenntnis und von Hinweisen aus der Literatur wurde vorgeschlagen, dass ein mechanosensitiver Ionenkanal in der Membran von Makrophagen durch endotoxisch aktives LPS aktiviert und so ein Signal ins Zellinnere übermittelt wird. Diese Hypothese wurde von Dr. Rikard Blunck erfolgreich im Rahmen seiner Doktorarbeit untersucht. Er konnte durch Patch-Clamp Experimente bestätigen, dass endotoxisch aktives LPS einen  $\text{Ca}^{2+}$ - und Spannungs-abhängigen  $\text{K}^{+}$ -Kanal, den MaxiK-Kanal, in der Zytoplasmamembran humaner ausdifferenzierter Blutmakrophagen

aktiviert und diese Kanalaktivierung die Anforderungen, die an eine Signalübertragung gestellt werden, erfüllt. Nicht geklärt werden konnte, über welchen Mechanismus die Aktivierung des Kanals erfolgte. Neben mechanischem Stress kommen v.a. NO und  $\text{Ca}^{2+}$  als mögliche Aktivatoren des Kanals in Frage.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen sollte in der vorliegenden Arbeit insbesondere untersucht werden, welche generelle Rolle der MaxiK-Kanal bei der Aktivierung von Makrophagen durch mikrobielle Virulenzfaktoren spielt. Da gezeigt ist, dass die TLR eine entscheidende Rolle bei der transmembranen Signalübertragung in Makrophagen spielen, ergibt sich die zentrale Frage, welche Rolle der MaxiK-Kanals neben und im Zusammenwirken mit diesen Proteinen in der Signaltransduktion und Zellaktivierung einnimmt. Wie die TLR eine zentrale Position bei der Signaltransduktion für mikrobielle Virulenzfaktoren einnimmt, spielt der IL-1-Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Zellaktivierung durch Interleukin-1 (IL-1). Da dieser Rezeptor und die TLR zur gleichen Rezeptorfamilie gehören, ist es naheliegend, auch den Einfluss von IL-1 auf den MaxiK-Kanal zu untersuchen.

Aus dieser zentralen Fragestellung ergaben sich folgende Zielsetzungen:

- Ist in humanen Makrophagen der MaxiK-Kanal auch durch andere Virulenzfaktoren als LPS aktivierbar, und erfolgt auch durch IL-1 eine Kanalaktivierung?
- Über welchen Mechanismus erfolgt die Kanalaktivierung durch Virulenzfaktoren und durch IL-1?
- Ist die Zellaktivierung durch diese Substanzen wie auch bei LPS durch eine Blockade des MaxiK-Kanals inhibierbar? An welcher Stelle greift eine Kanalblockade inhibierend in die angestoßenen intrazellulären Signalkaskaden ein?

- Ist es möglich, durch direkte, nicht Pathogen-assoziierte Kanalaktivatoren durch die Aktivierung des MaxiK-Kanals in humanen Makrophagen diese Zellen zur Zytokinproduktion und -freisetzung zu stimulieren?

Aus dieser kurzen Übersicht ergibt sich, dass parallel zu den Patch-Clamp Experimenten zum Einfluss verschiedener bakterieller Produkte und Zytokine sowie Kanalblocker und -aktivatoren auf den Kanal Untersuchungen im biologischen System erforderlich waren. Insbesondere galt es, den Einfluss von MaxiK-Kanalblockern und -aktivatoren auf intrazelluläre Signalkaskaden zu untersuchen.

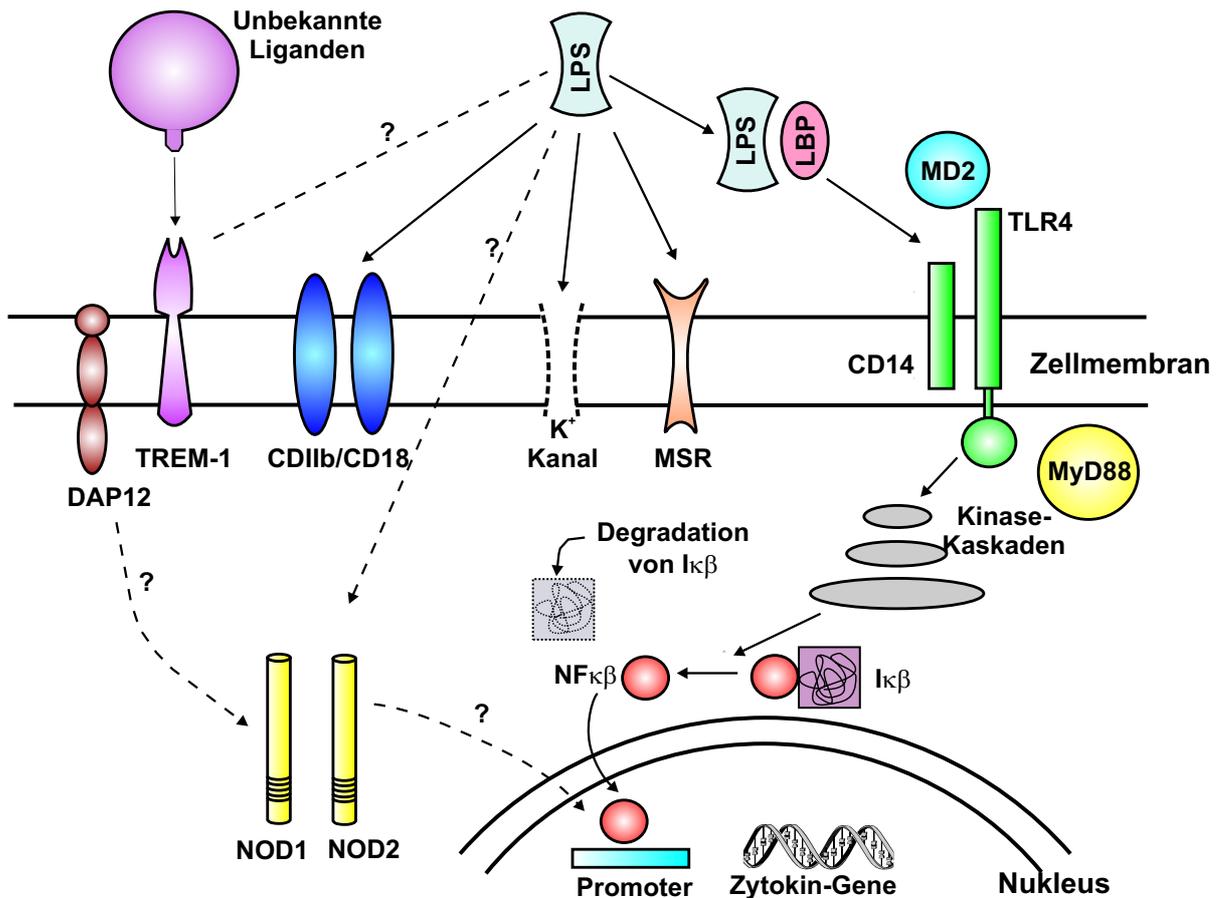
Schließlich ging es darum, erste Messungen an Zelllinien, die mit dem humanen MaxiK-Kanal transfiziert waren, durchzuführen, um mittelfristig Modellsysteme etablieren zu können, in denen sowohl Patch-Clamp Experimente als auch biologische Versuche an Zellen mit definierter Proteinausstattung vorgenommen werden können.

Im folgenden Kapitel 2 wird zunächst eine Einführung in den biologischen Hintergrund der vorliegenden Problematik gegeben. In Kapitel 3 wird dann näher auf die Struktur und Funktion von  $K^+$ -Kanälen eingegangen und auf die Patch-Clamp Technik, die die wichtigste der in dieser Arbeit angewandten Methoden darstellt und mit deren Hilfe sich die Funktion von Ionenkanälen untersuchen lässt. Eine Übersicht über die Methoden und verwendeten Materialien stellt Kapitel 4 dar. Die Ergebnisse der Versuche im Rahmen dieser Arbeit werden in Kapitel 5 präsentiert und im einzelnen diskutiert. Im letzten Kapitel 6 wird dann eine zusammenfassende Ergebnisdiskussion und ein Ausblick auf folgende, sich durch diese Arbeit ergebene Fragestellungen gegeben.

## 2 Einführung in den biologischen Hintergrund

### 2.1 Aktivierung von Immunzellen

Durch verschiedene Virulenzfaktoren wie Lipopolysaccharide (LPS), die Endotoxine Gram-negativer Bakterien, oder Membranbestandteile Gram-positiver Bakterien wie Lipoteichonsäure (LTA), Lipopeptide (LP) und Peptidoglycan (PG) werden immunkompetente Zellen wie Blutmonozyten und -makrophagen angeregt, Botenstoffe zu produzieren und ins Blut freizusetzen. Zu diesen Mediatoren gehören neben Stickstoffmonoxid (NO) und dem Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) vor allem Zytokine, insbesondere Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukine (IL), insbesondere IL-1 und IL-6. Damit diese Zellaktivierung nur gezielt durch Pathogen-assoziierte körperfremde Substanzen erfolgt, ist es notwendig, dass die Zielzellen, also z.B. mononukleäre Zellen (MNC) wie Monozyten und Makrophagen, diese schädlichen Strukturen von unschädlichen unterscheiden können und nur von diesen Substanzen aktiviert werden. Auf der Zielzellmembran müssen sich also Proteine oder Proteinkomplexe befinden, die virulente von nicht virulenten Substanzen unterscheiden und davon abhängig ein Signal durch die Zellmembran ins Zellinnere generieren können, das über intrazelluläre Signalkaskaden schließlich zur Produktion und Freisetzung von Zytokinen und anderen Botenstoffen führt. Die genauen Vorgänge bei der Signaltransduktion und die Rolle der daran beteiligten Proteine sind noch nicht vollständig geklärt. Für alle oben genannten Virulenzfaktoren gilt folgendes Aktivierungsschema: Nach der Freisetzung ins Blut muss der Transport an die Zielzellmembran erfolgen, wo es zu einer direkten oder über Ko-rezeptoren vermittelte Bindung und Aktivierung von signaltransduzierenden transmembranen Proteinen und dem Anstossen von intrazellulären Signalkaskaden kommt. Exemplarisch ist



**Abbildung 2:** Übersicht über die in der Literatur diskutierte Oberflächenstrukturen, die an der Erkennung von LPS und der Signaltransduktion durch die Wirtszellmembran beteiligt sind sowie die getriggerten intrazellulären Signalkaskaden (Abb. nach [27]).

dies in Abb. 2 für die Zellaktivierung durch das LPS Gram-negativer Bakterien dargestellt.

Eine detaillierte Beschreibung der beteiligten Proteine folgt in Kap. 2.3.

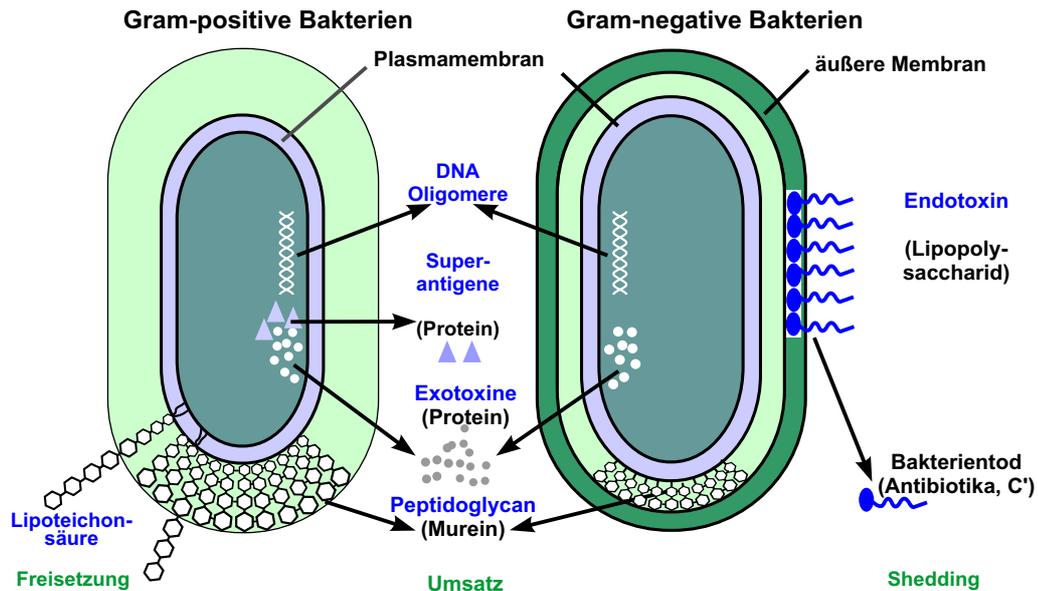
Die intrazellulären Prozesse, die bei der Aktivierung von Immunzellen durch Virulenzfaktoren ablaufen, sind bisher nur zum Teil bekannt. In Monozyten/Makrophagen ist jedoch allgemein akzeptiert, dass nach der Signaltransduktion ins Zellinnere mindestens vier verschiedene Signalkaskaden angestoßen werden, die in der Phosphorylierung von drei sogenannten MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinases*, MAPK) und ihrer Translokation in den Zellkern bzw. der Freisetzung und Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB

(*nuclear factor κB*) enden. Bei den drei MAPK handelt es sich zum einen um die in zwei Isoformen vorliegende ERK1/2 (*extracellular signal regulated kinase*) und die beiden Stress-aktivierten Proteinkinasen JNK (*c-jun N-terminal kinase*) und p38. Als allgemeines Schema gilt, dass die Aktivierung der MAPK über eine Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten erfolgt, die durch eine spezifische MAPK-Kinase (MAPKK) katalysiert wird, welche wiederum durch MAPKK-Kinasen aktiviert werden, die zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen gehören. Diese Kaskaden münden in der Translokation von Transkriptionsfaktoren (z.B. c-jun, NF-κB) in den Zellkern. Dort werden proinflammatorische Gene hochreguliert. Die transkribierte Zytokin-mRNA ist die Grundlage für die Produktion von Pro-Zytokinen, die dann zu Zytokinen reifen und in den extrazellulären Raum freigesetzt werden [3].

Beim septischen Schock kann es infolge einer hohen Konzentration von Virulenzfaktoren im Blut des Wirtes durch die übermäßige Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zur Überreaktion des Immunsystems kommen, was hämodynamische Instabilität, hohes Fieber, die Aktivierung von Komplement- und Gerinnungskaskaden und schließlich Multiorganversagen zur Folge haben kann.

## **2.2 Aktivatoren immunkompetenter Zellen**

Die ursächlichen Auslöser der Immunantwort des Körpers — und damit die einer Sepsis — sind im wesentlichen Zellwandbestandteile von Bakterien, die bei der Teilung der Bakterien oder ihrer Abtötung durch therapeutische Eingriffe und auch durch das Komplementsystem des Wirtes in dessen Blut gelangen und so in Kontakt mit den Zellen des Immunsystems kommen. Im Folgenden werden zunächst die verschiedenen Virulenz-assozi-

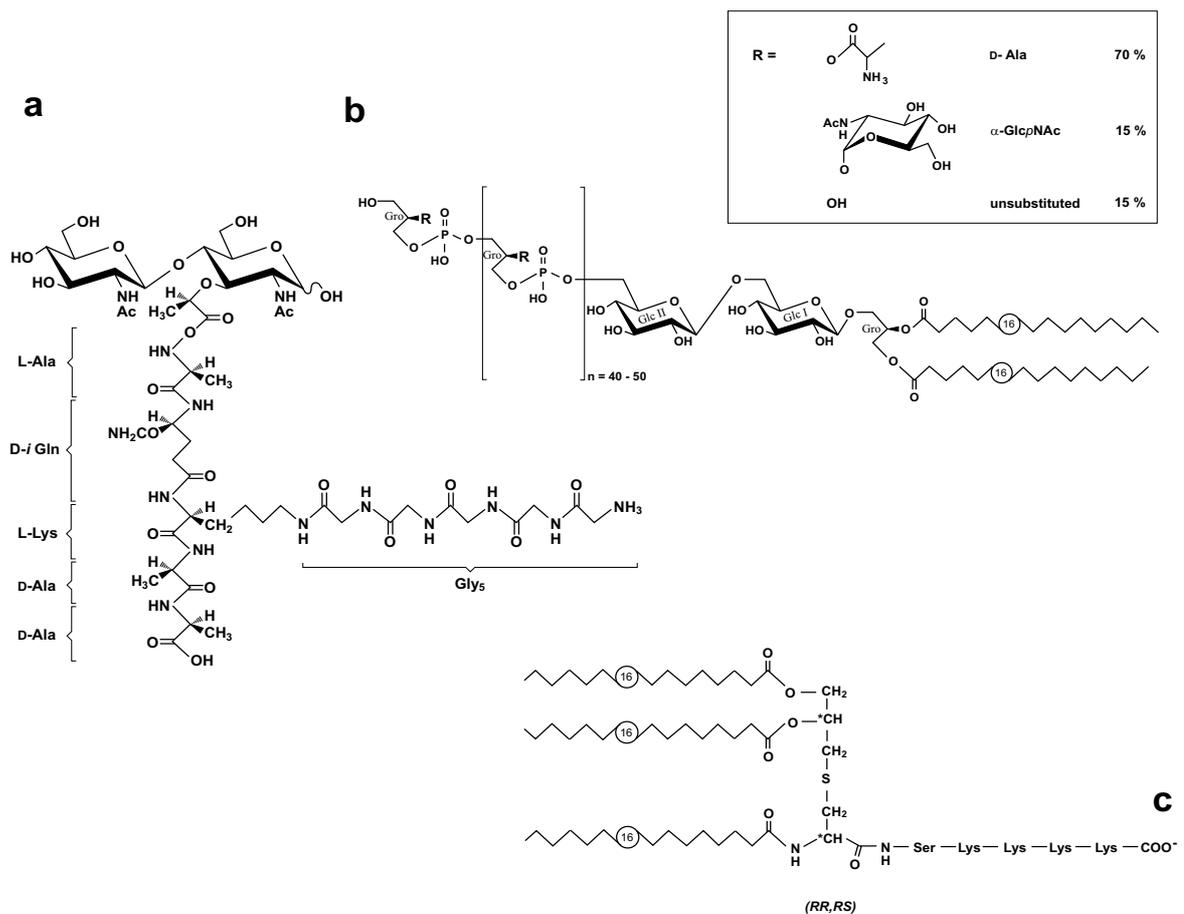


**Abbildung 3:** Bakterielle Faktoren in Sepsis und septischem Schock.

ierten Zellwandbestandteile Gram-positiver Bakterien dargestellt. Auf das LPS, das Endotoxin der Gram-negativen Bakterien, wird detaillierter eingegangen, da die Korrelation der physikochemischen und biologischen Eigenschaften von LPS eine wichtige Grundlage zum Verständnis und zur Motivation zu dieser Arbeit darstellen.

### 2.2.1 Zellwandkomponenten Gram-positiver Bakterien

Gram-positive Bakterien verfügen außerhalb ihrer Zytoplasmamembran über eine Zellwand, die im wesentlichen aus mehreren vernetzten Schichten Peptidoglycan gebildet wird und von verschiedenen weiteren Bestandteilen wie Lipopeptiden und Lipoteichonsäuren durchzogen ist [45]. PG besteht aus einem Polysaccharid- und einem Peptidanteil. Die einzelnen Moleküle sind in Schichten miteinander vernetzt, wobei der exakte Aufbau der Zellwand bis heute diskutiert wird [168]. Die chemischen Strukturen von PG, LTA und LP sind in Abb. 4 dargestellt.



**Abbildung 4:** Zellwandbestandteile Gram-positiver Bakterien: Chemische Strukturen von löslichem Peptidoglycan (a) und Lipoteichonsäure (b) von *Staphylococcus aureus* und dem Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (c).

## 2.2.2 Endotoxine Gram-negativer Bakterien: Struktur-Wirkungsbeziehung

Anders als Gram-positive verfügen Gram-negative Bakterien, deren bekannteste Vertreter *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Salmonella minnesota* sind, über eine äußere Zellmembran, die der im Vergleich wesentlich dünneren Zellwand vorgelagert ist. Lipopolysaccharide bilden den Hauptbestandteil dieser äußeren Membran [147][149]. Wegen ihres amphiphilen Charakters liegen Endotoxine in wässriger Lösung unterhalb der kritischen Mizellkonzentration (CMC) als Monomere vor und bilden oberhalb der CMC Aggregate, wobei die Konzentration der Monomere mit steigender LPS-Konzentration abnimmt [83]. Die

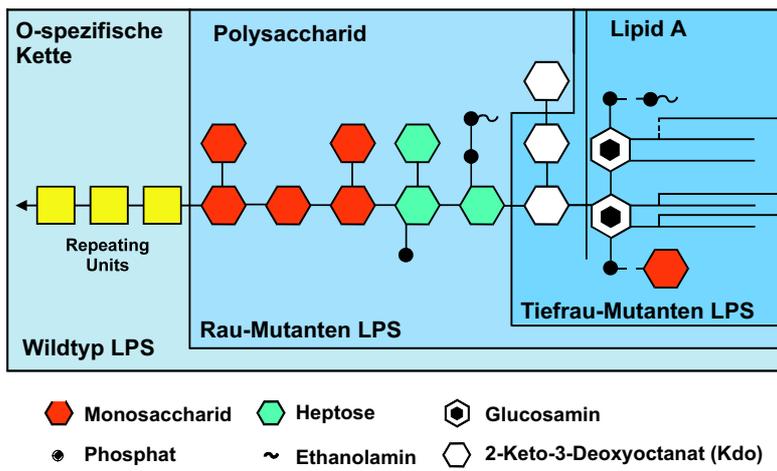
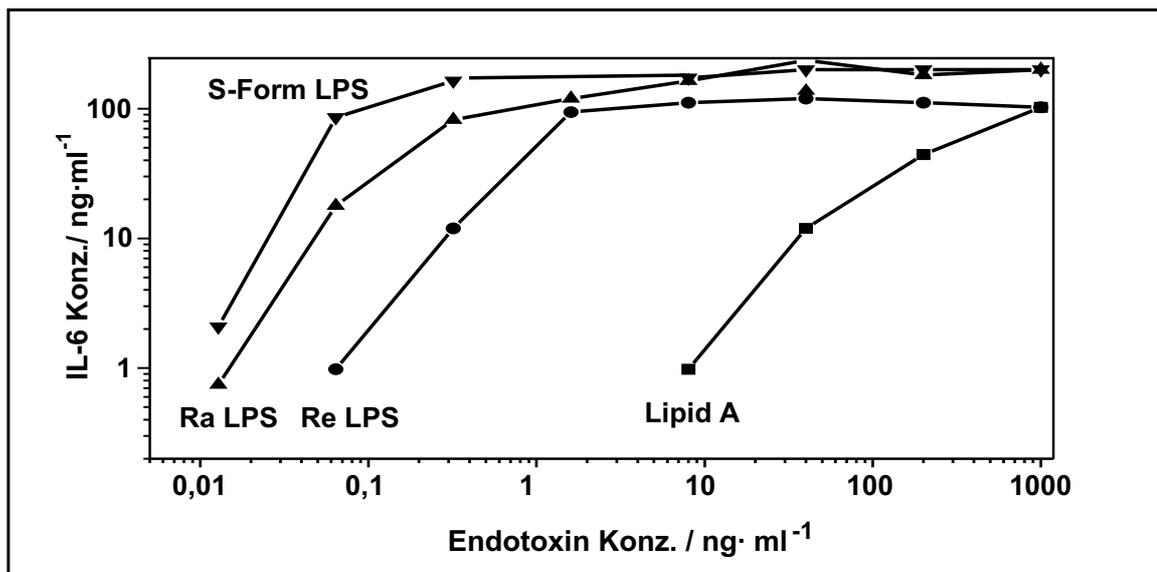


Abbildung 5: Schema der chemischen Struktur von LPS

Frage, ob LPS ihre endotoxische Aktivität in Gestalt von Monomeren oder als Aggregate ausbilden, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe widerlegen zumindest unter serumfreien Bedingungen die Hypothese, dass Re LPS (s.u.) in Form von Monomeren eine höhere endotoxische Aktivität aufweist als Aggregate gleicher Konzentration [178].

In Abbildung 5 ist der schematische Aufbau von enterobakteriellem Wildtyp LPS dargestellt. Der hydrophile Molekülteil umfasst eine O-spezifische Kette aus verschiedenen Glycosylresten und eine Kernregion. Diese wird unterteilt in die äußere und innere Kernregion. Der äußere Kern wird vorwiegend aus Hexosen ( $D$ -Glucose,  $D$ -Galactose,  $M$ -Acetyl- $D$ -Glucosamin) gebildet, der innere Kern aus  $L$ - oder  $D$ -Glycerol- $D$ -Manno-Heptosen und 3-Deoxy- $D$ -Manno-Oct-2-Ulonsäure (Kdo). LPS-Formen ohne O-spezifische Kette stammen von Raumutanten und werden je nach Länge der Kernregion als Ra, Rb, Rc, Rd oder Re LPS bezeichnet [109].

An das Kdo-Disaccharid ist kovalent der hydrophobe, Lipid A genannte Teil des LPS gebunden, der das LPS-Molekül in der Bakterienmembran verankert. Er besteht aus einer Disaccharid-Kopfgruppe aus zwei  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-verknüpften Glucosaminen, die in den Posi-

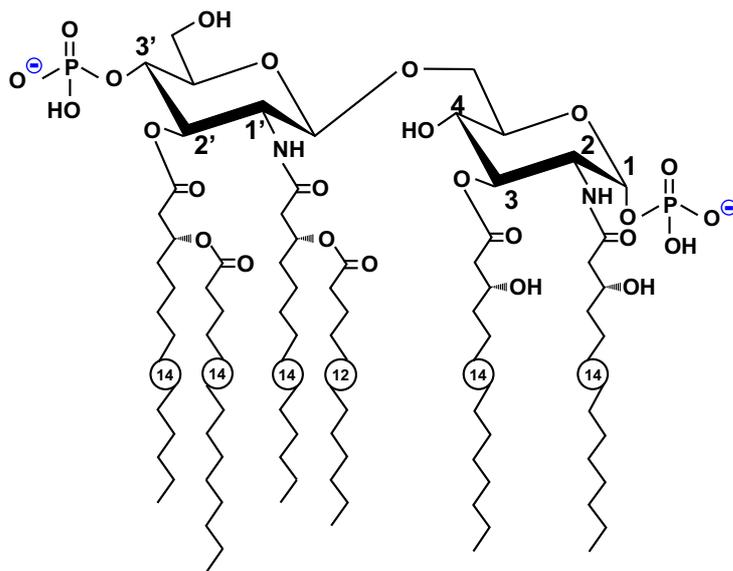


**Abbildung 6:** Endotoxische Aktivität von LPS in Abhängigkeit von der Länge des Polysaccharidanteils: Stimulation von humanen mononukleären Zellen unter serumfreien Bedingungen.

tionen 1 und 4' phosphoryliert<sup>1</sup> sind. Das Disaccharid ist 4-fach mit gesättigten 3-Hydroxy-Fettsäuren acyliert. Dabei können die 3-Hydroxylgruppen der Acylketten mit weiteren gesättigten Fettsäuren verestert sein, sodass bis zu sieben Fettsäuren vorhanden sein können [204]. Dieser hydrophobe Lipid A-Teil bestimmt die Endotoxizität des LPS, also die Fähigkeit, die Ausschüttung von Zytokinen in mononukleären Zellen zu induzieren [48][150]; das Vorhandensein der Kernregion und der O-spezifischen Kette führt lediglich zu einer Steigerung der Endotoxizität [84].

Anhand verschiedener LPS-Formen unterschiedlicher Tiefraumutanten Gram-negativer Bakterien konnte eine Korrelation zwischen der biologischen Aktivität und den physiko-chemischen Eigenschaften des hydrophoben Lipid A-Teils gezeigt werden: Das biologisch aktivste Lipid A ist das in Abbildung 7 dargestellte Lipid A des Re LPS des Stammes F515

<sup>1</sup> Bei LPS einiger Bakterienspezies können die Phosphatgruppen durch andere polare oder unpolare Gruppen substituiert sein.



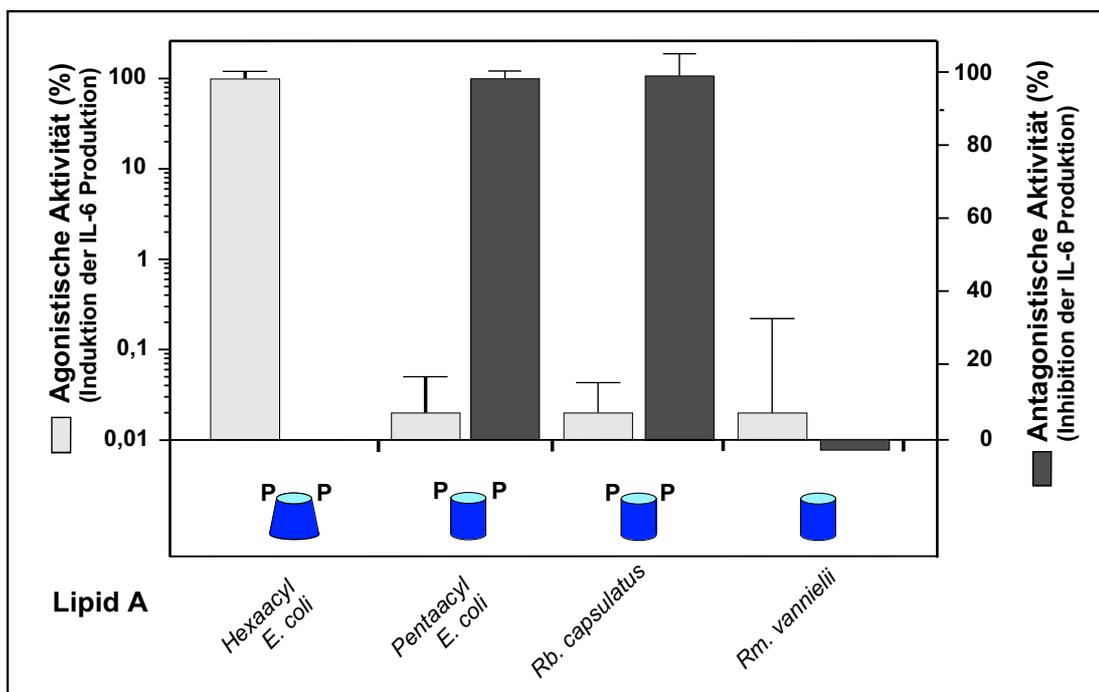
**Abbildung 7:** Chemische Struktur des Lipid A vom LPS von *E. coli* Stamm F515.

von *E. coli* [151]. Es besitzt zwei Phosphatgruppen als Substituenten an den Glucosaminen und ist daher zweifach negativ geladen. Die Glucosamine sind mit je zwei C14–Fettsäureketten acyliert. Am nicht–reduzierenden Glucosamin sind diese Ketten am C3–Atom mit einer C14– bzw. einer C12–Acylokette verestert. Am reduzierenden Glucosamin liegen an den Positionen 3 zwei Hydroxylgruppen vor [204]. Diese Asymmetrie der Acylkettenverteilung im Lipid A–Teil wirkt sich auf die supramolekulare Aggregatstruktur des LPS Moleküls aus. Durch Röntgen–Kleinwinkelbeugung konnte gezeigt werden, dass bei nahezu physiologischem Wassergehalt (ca. 90 %) invertiert kubische Strukturen ausgebildet werden. Aus dieser supramolekularen Aggregatstruktur kann auf die molekulare Konformation des Lipid A–Teils rück geschlossen werden: Invertiert kubische Strukturen werden von konischen Molekülen gebildet, bei denen der Platzbedarf der Kopfgruppe kleiner ist als der der Fettsäureketten [19]. Lamellare Strukturen werden gebildet, wenn der Lipid A–Teil eine zylindrische Konformation aufweist, der Platzbedarf der Kopfgruppe und der Fettsäureketten also gleich ist.

Folgende Variationen der chemischen Struktur des Lipid A von *E. coli* rufen eine Reduzierung der biologischen Aktivität hervor, die mit einem Übergang von einer konischen zu einer zylindrischen molekularen Konformation des Lipid A korreliert ist:

- Das Vorhandensein nur einer oder keiner Verzweigung der Fettsäureketten am nicht-reduzierten Glucosamin (z.B. Pentaacyl oder Tetraacyl Lipid A) oder das Vorliegen einer symmetrischen Verteilung (z.B. 3/3 bei Lipid A von *Chromobacterium violaceum*).
- Substitution kürzerer Acylketten am Lipid A (z.B. beim Lipid A von *Rhodobacter capsulatus*).

LPS mit einem Lipid A-Teil mit zylindrischer Molekülkonformation kann antagonistisch aktiv sein, d.h. im Überschuss (~ 10 fach) kann es die Aktivität von endotoxisch aktiven, also agonistischen LPS-Formen, inhibieren [59][108].



**Abbildung 8:** Zusammenhang der molekularen Konformation von Lipid A, der Nettoladung (repräsentiert durch Phosphate, P) und der biologischen Aktivität.

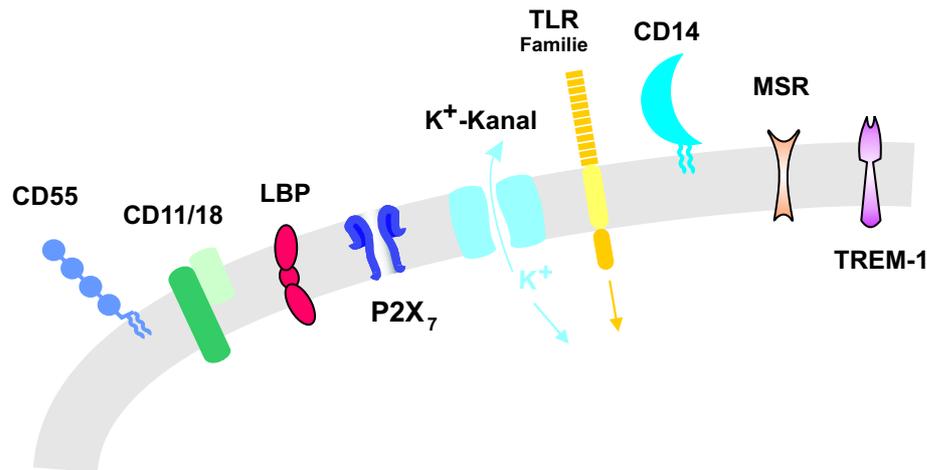
Reduziert man die negativen Ladungen der Kopfgruppe des Lipid A, z.B. indem man die Phosphate durch Heptose oder Galacturonsäure ersetzt, nimmt die Aktivität um drei Größenordnungen ab, da der Transport des LPS an die Zielzellmembran unterbunden wird (siehe Kap. 2.3.1.1) [162]. Ungeladenes Lipid A wie das von *Rhodococcus vanniellii* weist keine, auch keine antagonistische Aktivität mehr auf [161]. Bisher nicht aufgeklärt ist die Rolle der Hydroxylgruppen für die biologische Aktivität des Lipid A. Möglicherweise sind sie an der Bindung an Rezeptorproteine beteiligt. In Abb. 8 ist eine Übersicht über die Korrelation zwischen der molekularen Konformation und der Ladung der Kopfgruppe einerseits und der biologischen Aktivität von Lipid A andererseits gegeben.

### **2.3 An der Signaltransduktion beteiligte Oberflächenstrukturen**

Im Folgenden werden die wichtigsten im Serum vorkommenden und membrangebundenen Proteine vorgestellt, für die eine Beteiligung an der Zellaktivierung durch Virulenzfaktoren gezeigt ist. Eine besondere Betonung liegt dabei auf den Proteinen, die an der LPS-induzierten transmembranen Signaltransduktion und der anschließend erfolgenden Zellaktivierung beteiligt sind, da diese Prozesse in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Stellung einnehmen. Die Gruppe der TLR wird dabei ausführlich behandelt, da ihnen eine entscheidende Rolle in der Zellaktivierung durch verschiedene bakterielle Produkte zuzusprechen ist. Ebenso wird die Rolle von Ionenkanälen bei der Zellaktivierung gesondert behandelt (Kap. 2.4).

#### **2.3.1 LPS-bindende Proteine und (Ko-) Rezeptoren**

Für eine Vielzahl von Proteinen im Serum und auf der Oberfläche von Immunzellen ist gezeigt, dass sie bakterielle Endotoxine binden oder an der Zellaktivierung durch diese



**Abbildung 9:** Übersicht: An der Signaltransduktion beteiligte Proteine auf der Zyttoplasmamembran von Immunzellen (siehe Text).

beteiligt sind. Insbesondere ist dabei dem LPS-bindenden Protein (LBP) und dem Cluster of Differentiation (CD) 14 eine zentrale Aufgabe beim Transport von LPS aus dem Serum an die eigentlichen Signal-übertragenden Strukturen auf der Zelloberfläche zuzuschreiben.

### 2.3.1.1 Das LPS-bindende Protein LBP

Das 58 kDa Glycoprotein LBP wird in Hepatozyten synthetisiert und ins Blut freigesetzt. LBP ist ein Lipid-bindendes Protein [166] und aggregiert mit dem Lipid A-Teil von LPS, sofern dieser über eine negative Nettoladung verfügt [162]. Als ein Akutphase-Protein wird es während einer LPS-induzierten Inflammation hoch reguliert. Es liegt nicht nur im Blut vor, sondern ist auch in der Zyttoplasmamembran mononukleärer Zellen zu finden, in die es transmembran interkaliert [63]. Bei geringen LPS-Konzentrationen verstärkt LBP die Zytokininduktion, da das membranständige LBP die Einlagerung von LPS in die Zellmembran fördert, also quasi als Fusionsprotein für aggregiertes LPS an die Zielzellmembran mit ihren Rezeptoren agiert. Bei hohen LPS-Konzentrationen wirkt es hingegen entzündungshemmend, da die Konzentration freien LBPs im Blut ansteigt. Dieses freie LBP ist in der

Lage, mizellares LPS zu komplexieren und durch die Bildung von LPS/LBP-Komplexen dessen Einbau in die Zielzellmembran zu verhindern [64]. Für die Aktivierung von Monozyten durch LPS ist LBP nicht zwingend erforderlich.

### *2.3.1.2 Cluster of Differentiation (CD)14*

Die membrangebundene Form des 53 kDa Proteins CD14, mCD14, wird auf Monozyten und Makrophagen exprimiert und ist über einen Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker an deren Zytoplasmamembran verankert [198][206]. Da es keine transmembrane Domäne besitzt, kann es nicht eigenständig ein Signal ins Zellinnere übertragen. Es bindet jedoch hochaffin ( $K_d = 3 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ) an den Lipid A-Teil von LPS und wirkt als primärer LPS-Rezeptor [93]. So wird die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen durch einen blockierenden anti-CD14-Antikörper inhibiert. Nicht LPS-responsive CHO-Zellen<sup>2</sup> können nach Transfektion mit CD14 durch LPS aktiviert werden [39][82]. Bei hohen LPS-Konzentrationen kann jedoch eine CD14-unabhängige Zellaktivierung beobachtet werden [110][162][180]. Dies deutet darauf hin, dass mCD14 LPS bindet und dann nachfolgenden Signalproteinen präsentiert. Neben der membrangebundenen Variante des CD14 gibt es eine im Serum gelöste, das sCD14 [15]. Die Zugabe von sCD14 begünstigt bei CD14-defizienten Zellen die Aktivierung durch LPS und inhibiert die Aktivierung bei mCD14-positiven Zellen, da es, ähnlich dem löslichen LBP, mit den LPS-Aggregaten komplexiert und so kompetitiv dessen Bindung an mCD14 hemmt [70][71][167].

Außer für LPS Gram-negativer Bakterien fungiert CD14 auch als Rezeptor und Transportmolekül zu den Signal-übertragenden Proteinen für gelöstes PG (sPG), PG-Monomere und Lipopeptide Gram-positiver Bakterien und für Lipoteichonsäure [73][125][177][196][197].

---

<sup>2</sup> CHO: Chinese Hamster Ovary

### 2.3.1.3 Weitere LPS-bindende Proteine

Neben dem LBP und CD14 sind weitere Membran-assoziierte Proteine beschrieben, die LPS binden können und an der Signaltransduktion beteiligt sind. So wird für das Heterodimer CD11/18 angenommen, dass es ähnlich dem CD14 in einen Rezeptorkomplex eingebunden ist. Es verfügt zwar über eine transmembrane Domäne, ist aber auch ohne diese funktionstüchtig, so dass es nicht als eigenständiges Signalprotein funktionieren kann, da die Funktionalität des Proteins nicht an die transmembrane Domäne gekoppelt ist [43][81]. Das GPI-verankerte CD55 ist zwar in der Lage, LPS zu binden, kann aber aufgrund der fehlenden Transmembrandomäne selbständig kein Signal ins Zellinnere generieren [42]. Der *triggering receptor expressed on myeloid cells No. 1* (TREM-1) ist ein Rezeptor der Immunoglobulin-Superfamilie und wird auf myeloiden Zellen exprimiert. Er verstärkt die LPS-induzierte Ausschüttung von Mediatoren. Seine Expression auf humanen Monozyten wird im Verlauf einer Sepsis hochreguliert. Die Scavenger Rezeptoren (MSR) binden neben LPS auch weitere polyanionische Liganden, darunter LTA und Lipopeptide. Sie haben keine signalgenerierende Funktion, sondern fangen LPS aus dem Blut und wirken damit inhibierend auf eine LPS-induzierte Zellaktivierung [43][68].

Der purinerge Rezeptor P2X<sub>7</sub> (P2X<sub>7</sub>R) weist in seinem intrazellulären Bereich eine LPS-Bindedomäne auf, die teilweise homolog zur LPS-Bindedomäne von LBP ist [34]. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um einen unselektiven Kationenkanal, der durch ATP aktiviert wird. Durch diese Aktivierung und den dadurch erfolgenden Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen können weitere Ionenströme durch Ca<sup>2+</sup>-sensitive Ionenkanäle induziert werden [28]. Durch Blockade des P2X<sub>7</sub>R durch einen Antagonisten kann in RAW 264.7-Zellen<sup>3</sup> die LPS-indu-

---

<sup>3</sup> RAW 264.7 bezeichnet eine sehr LPS-sensitive murine Makrophagenzelllinie.

zierte iNOS<sup>4</sup>- und NO-Produktion sowie die ERK1/2-Phosphorylierung und NF-κB-Bindung deutlich abgeschwächt werden [79]. Durch Versuche an P2X<sub>7</sub>R-defizienten murinen Peritonealmakrophagen wurde festgestellt, dass ein funktionaler P2X<sub>7</sub>R notwendig für die Reifung des Pro-Zytokins pro-IL-1β zum Zytokin IL-1β und dessen Freisetzung ist und in die Regulation der IL-6-Freisetzung eingreift [172].

### 2.3.2 Toll-like Rezeptoren

Das Protein Toll wurde erstmals als transmembraner Rezeptor bei der Fruchtfliege *Drosophila spec.* entdeckt. Dort ist es wichtig für die dorsoventrale Polarisierung bei der Embryonalentwicklung und steuert in adulten Fliegen die Immunabwehr gegen Pilze. Bei Menschen wurden dann in allen lymphatischen Geweben (u.a. Monozyten, Makrophagen, Leukozyten) homologe Proteine gefunden, die zur Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR) zusammengefasst werden [99][118]. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Rezeptor-Tyrosinkinasen. Durch die Bindung eines Liganden dimerisieren die Monomere dieses Rezeptortyps und es findet eine Tyrosin-Autophosphorylierung an der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptordimers statt, welches dann enzymatisch aktiv wird. Die Mitglieder dieser Rezeptorfamilie weisen eine Leuzin-reiche extrazelluläre Domäne auf. Die zytoplasmatische Domäne ist homolog zur Zytoplasmadomäne der IL-1 Rezeptoren bei Säugern und wird daher als Toll/IL-1-Rezeptor (TIR) Homologie Domäne bezeichnet [99][133]. TLR und IL-1 Rezeptoren aktivieren über ähnliche intrazelluläre Signalwege NF-κB, durch dessen Translokation in den Nukleus die mRNA-Produktion der Zytokine angeregt wird, die dann

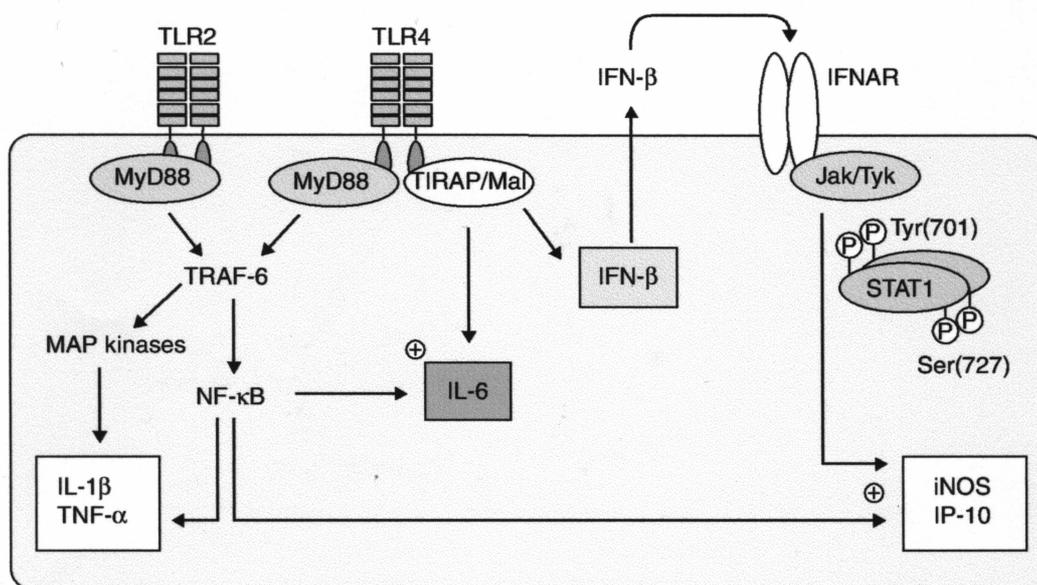
---

4 iNOS: *inducible nitric oxide synthase*, ein Enzym, das in Zellen für die Produktion von NO verantwortlich ist.

zur Bildung der Zytokin-mRNA führt. Es kommt zur Produktion von Pro-Zytokinen, die dann zu Zytokinen reifen und in den extrazellulären Raum freigesetzt werden [3].

Es sind bisher zehn unterschiedliche humane TLR beschrieben, die als Rezeptoren für unterschiedliche bakterielle Produkte fungieren (*pattern recognition receptors*) und abhängig vom Liganden unterschiedliche Antworten auf diesen in den Wirtszellen bewirken können [135].

So erkennt TLR4 CD14-vermittelt das LPS Gram-negativer Bakterien [26][29][142]. Eine direkte Bindung von LPS an TLR4 ist bisher nicht nachgewiesen. Versuche mit TLR4-defizienten Mäusen haben gezeigt, dass dessen Vorhandensein essentiell für die Zellaktivierung durch LPS ist [77][143][146]. Für die TLR4-abhängige Aktivierung ist zudem die Anwesenheit des Proteins MD-2 notwendig, ohne dessen Bindung an TLR4 keine LPS-Aktivierung erfolgen kann [163][170][203]. Die Transfektion von CHO-Reporter-Zellen mit TLR4



**Abbildung 10:** Intrazelluläre Signalkaskade des TLR-Pfades: Alle TLR aktivieren mittels MyD88 MAP-Kinasen und NF-κB. Die Aktivierung führt schließlich zur Produktion und Freisetzung der Zytokine IL-1β und TNFα. Für die Aktivierung über TLR4 wird ein weiteres Adapterprotein benötigt, TIRAP. Abbildung aus [7].

von Mensch, Hamster bzw. Maus hat gezeigt, dass der Genotyp des exprimierten TLR4 bestimmt, welche LPS-Strukturen von Immunzellen als agonistisch und antagonistisch erkannt werden [104]. Der TLR2 ist in der Lage, verschiedene bakterielle Produkte wie Peptidoglycan oder Lipopeptide zu erkennen [46][94][105]. Dabei erfolgt abhängig vom Liganden eine Heterodimerisierung mit anderen TLR [135]; über diesen Mechanismus scheint so eine Modulation der intrazellulären Signalkaskade und der Zellantwort möglich [186]. Die intrazellulären Signalwege, die durch die Aktivierung über TLR2 oder TLR4 getriggert werden, verlaufen im wesentlichen nach dem gleichen Schema: Über das Adapterprotein MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) [119] kommt es zur Aktivierung der MAP-Kinasen und der NF- $\kappa$ B-Translokation. Bei der Aktivierung über TLR4 wird ein weiteres Adapterprotein, TIRAP (*TIR associated protein*)/Mal (*MyD88-adaptor like*) benötigt [76]. Eine schematische Darstellung der intrazellulären Signalkaskaden, die über TLRs aktiviert werden, ist in Abb. 10 dargestellt.

Ligand	Toll-like Rezeptoren
Produkte Gram-positiver Bakterien wie PG, LTA	TLR2/1-Heterodimere
virale doppelsträngige RNA	TLR3
LPS Gram-negativer Bakterien, Taxol, u.a.	TLR4-Homodimer
Flagellin	TLR5
Lipopeptide (LP, MALP)	TLR2/6-Heterodimere
bakterielle DNA (CpG-Motive)	TLR9

**Tabelle 1:** Bakterielle Virulenzfaktoren als Liganden der TLRs (nach [4] und [186]).

### 2.3.3 Rafts und PDZ-Domänen

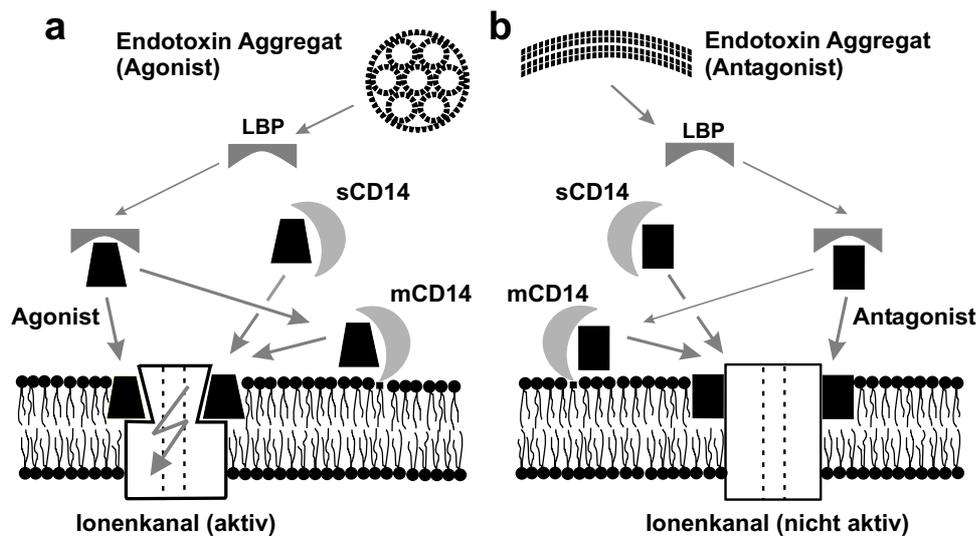
Ein seit einigen Jahren lebhaft diskutiertes Konzept zur Interaktion von verschiedenen Membranproteinen stellen die sogenannten *lipid rafts* (Lipid-Flöße) dar. In diesen cho-

lesterol- und sphingolipidreichen Domänen in Phospholipidmembranen sind verschiedene Proteine wie Liganden-abhängige Rezeptoren, NO-Synthasen, Proteinkinasen und signal-transduzierende Proteine kolokalisiert und können funktionell interagieren [89][139][181]. So wird angenommen, dass bei der Zellaktivierung durch verschiedene bakterielle Produkte u.a. Rezeptormoleküle wie mCD14, mLBP oder CD55 und mögliche transmembrane Signal-transducer wie TLR in Proteinclustern zusammenwirken [139][182]. Triantafilou et al. beschreiben, dass auf Immunzellen durch den Kontakt mit LPS heterogene Proteincluster – mit oder auch ohne CD14 und TLR – gebildet werden, über die die Zellaktivierung erfolgen kann [180][182]. Es ist zudem gezeigt, dass bestimmte K<sup>+</sup>-Kanäle in diesen Rafts akquiriert werden können und ihre Aktivität durch die im Vergleich zur normalen Membranumgebung veränderte Lipidzusammensetzung moduliert wird [112].

Auch in sogenannten PDZ-Domänen sind Cluster von unterschiedlichen Proteinen zu finden, die durch PDZ-Proteine zusammengehalten werden und funktionell aneinander gekoppelt sind [148]. So ist gezeigt, dass in *Drosophila spec.* ein makromolekularer Proteinkomplex existiert, in dem der Photorezeptor InaD über PDZ-Domänen mit weiteren Proteinen wie einem Kalziumkanal und G-Proteinen interagiert [169][184]. Im humanen System ist ein InaD-homologes Protein mit PDZ-Domänen beschrieben [140].

### **2.3.4 LPS-induzierte Signalübertragung: Aktivierung eines Ionenkanals**

Da, wie in Kap. 2.2.2 dargestellt, zumindest für humane Wirtszellen die physiko-chemischen Eigenschaften die biologische Aktivität von Endotoxinen bestimmen, liegt es nahe anzunehmen, dass die Erkennung von Endotoxinen und die Unterscheidung zwischen agonistischem und antagonistischem LPS durch den transmembranen Signaltransduktion aufgrund eben dieser physikochemischen Charakteristika erfolgt. Es ist gezeigt, dass sowohl



**Abbildung 11:** Modell für die transmembrane Signalübertragung über einen Ionenkanal: Sowohl agonistisches als auch antagonistisches LPS wird über Transportproteine in die Zellmembran transportiert und interkaliert in diese. Der Agonist aktiviert den Ionenkanal, ein Signal durch die Zellmembran wird übertragen (a). Der Antagonist führt zu keiner Kanalaktivierung aber zu einer Blockade der „Bindungsstelle“ für einen Agonisten, es wird kein Signal generiert (b).

für agonistisches als auch für antagonistisches LPS die Existenz der Ladungen an den Kopfgruppen für die Bindung an CD14 und LBP bzw. den Einbau in die Zielzellmembran essentiell ist. Somit muss ein transmembranes Signalprotein in der Lage sein, in Abhängigkeit der unterschiedlichen molekularen Konformation des Lipid A-Teils vom LPS – konisch bei Agonisten, zylindrisch bei Antagonisten – ein Signal ins Zellinnere zu generieren. Ausgehend von der Annahme, dass es zu einem LBP-vermittelten Einbau von LPS in die Zielzellmembran kommt, was zu mechanischem Stress in dieser führen kann, ist in unserer Arbeitsgruppe ein Modell für die LPS-induzierte transmembrane Signalübertragung entwickelt worden, in dessen Zentrum die Aktivierung eines  $K^+$ -Kanal steht, der durch den Einbau von LPS in die Membran von Immunzellen durch agonistisches LPS mit einer konischen Konformation des Lipid A aktiviert wird. Antagonistisches LPS mit einem zylindrischen Lipid A führt zu keiner Aktivierung des Kanals, wohl aber zu einer Blockierung der Bindungsstelle, und inhibiert

somit eine Aktivierung durch einen Agonisten. Eine Aktivierung des Kanals resultiert in einem Ausstrom von Kaliumionen entlang des elektrochemischen Gradienten und so zu einer lokalen Änderung der intrazellulären  $K^+$ -Konzentration, durch die intrazelluläre Prozesse getriggert werden könnten.

## **2.4 Stand der Forschung zur Beteiligung von Ionenkanälen an der Aktivierung von Immunzellen**

Im Folgenden wird eine Übersicht der bisher bekannten relevanten Arbeiten gegeben, die sich mit der Rolle von Kaliumkanälen bei der Zellaktivierung durch LPS befassen. Dabei werden zum einen Arbeiten vorgestellt, in denen ein direkter Zusammenhang zwischen Kaliumkanälen und der LPS-induzierten Zytokinproduktion und -freisetzung aufgezeigt wird und zum anderen Untersuchungen präsentiert, in denen die Aktivierungsmechanismen von Ionenkanälen durch LPS untersucht wurde.

### ***2.4.1 MaxiK-Kanäle in Monozyten und Makrophagen***

Verschiedene Kaliumkanäle sind in der Zytoplasmamembran von Monozyten und Makrophagen beschrieben [49][50]. Während die Bedeutung der einwärts gerichteten  $K^+$ -Kanäle in der Regulierung des Membranpotentials liegt, war zunächst unklar, welche Funktion der von Gallin und McKinney beschriebene  $Ca^{2+}$ - und spannungssensitive  $K^+$ -Kanal mit einer Leitfähigkeit von ca. 240 pS haben könnte. Dieser Kanal, der während der Ausdifferenzierung von MNC zu Makrophagen hoch reguliert wird [50], weist die Eigenschaften der  $K^+$ -Kanäle auf, die heute als MaxiK-Kanäle bezeichnet werden (siehe Kap. 3.2). Martin et al. haben gezeigt, dass dieser Kanal nicht nur durch intrazelluläres Kalzium, sondern auch durch Adhärenz, mechanischen Stress und das Zytokin IL-2 aktiviert werden kann [113].

MaxiK-Kanäle sind auch auf humanen Alveolarmakrophagen beschrieben [87], und von Maruyama et al. ist eine Korrelation zwischen Kanalblockade und der LPS-induzierten Zellaktivierung gefunden worden [111]. In unserer Arbeitsgruppe konnte durch den Einsatz spezifischer Kanalblocker die Zugehörigkeit dieses Kanals in humanen ausdifferenzierten Blutmakrophagen zu der Gruppe der MaxiK-Kanäle bestätigt werden [17][158].

### *2.4.2 Rolle von Kaliumkanälen bei der Zellaktivierung*

Verschiedene Gruppen haben gezeigt, dass Kaliumkanalblocker in verschiedenen Zellen und Geweben die Endotoxin-induzierte Zytokinausschüttung unterdrücken können, was auf eine Beteiligung von Kaliumkanälen an den Prozessen der Zellaktivierung schließen lässt. So haben Haslberger et al. [67] gezeigt, dass durch die nicht-selektiven  $K^+$ -Kanalblocker  $BaCl_2$ , Tetraethylammonium (TEA) und Chinin in peritonealen Mausmakrophagen und der murinen Makrophagenzelllinie RAW 269 die Endotoxin-induzierte  $TNF\alpha$ -Ausschüttung inhibiert wird. Einen abschwächenden Einfluss der Kanalblocker auf die Produktion von  $TNF\alpha$ -mRNA konnten sie nicht feststellen. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kommen Jeong und Jue [85], die gezeigt haben, dass das Chininderivat Chloroquine (CQ) in murinen RAW 264.7-Zellen zwar nicht die LPS-induzierte Bildung von  $TNF\alpha$ -mRNA und die NF- $\kappa$ B-Aktivität beeinflusst, aber die Reifung von Pro- $TNF\alpha$  zu  $TNF\alpha$  unterbindet und so zu einer verringerten  $TNF\alpha$ -Ausschüttung führt. Dagegen inhibiert in humanen Alveolarmakrophagen die Zugabe von Chinin und in humanen Blutmonozyten CQ die LPS-induzierte  $TNF\alpha$ -Produktion auf mRNA-Ebene [88][111]. Dieser Unterschied in der Wirkung von Chinin bzw. CQ auf die Aktivierung von Zellen im murinen bzw. humanen System wird durch die Daten von Weber et al. untermauert, die in humanen Blutmonozyten eine Ver-

minderung der TNF $\alpha$ -mRNA-Produktion und TNF $\alpha$ -Freisetzung, aber keinen Einfluss auf die NF- $\kappa$ B-Aktivität durch CQ festgestellt haben [195]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass durch Chinin verschiedene LPS-induzierte Entzündungssymptome in murinen Leberzellen unterdrückt werden können [53]. Da Chinin und CQ an mehreren Prozessen des Zellstoffwechsels angreifen können, ist die Blockade von Ionenkanälen jedoch nur ein denkbarer Wirkungsmechanismus dieser Substanzen.

In humanen Monozyten ist darüber hinaus beschrieben, dass durch K<sup>+</sup>-Kanalblocker die LPS-induzierte Expression des Membran-assoziierten Glycoproteins Tissue Factor (TF) inhibiert wird [30]. In der humanen Tumorzelllinie THP-1 findet diese Inhibierung auf Ebene der Genexpression statt. Dies deutet darauf hin, dass auch für dieses Merkmal der Zellaktivierung die Funktion von K<sup>+</sup>-Kanälen sicher gestellt sein muss. Für Goldfischmakrophagen ist außerdem gezeigt, dass eine Blockade von K<sup>+</sup>-Kanälen die LPS-induzierte iNOS-Produktion und NO-Freisetzung verringert [174].

Wird die Funktion der K<sup>+</sup>-Kanäle nicht durch Kanalblocker, sondern durch eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration gestört, führt auch dies zu einer Abschwächung der Zytokinfreisetzung. Valev et al. haben insbesondere gezeigt, dass nicht die Zytokinproduktion (hier: IL-1 $\beta$ ) sondern die Zytokinreifung über die Beeinflussung des IL-1 $\beta$ -konvertierenden Enzyms ICE oder einer benachbarten Protease durch die Kaliumkonzentration reguliert wird [188].

Es liegen also klare Hinweise vor, dass durch eine Blockade von K<sup>+</sup>-Kanälen die Aktivierung von Immunzellen gestört wird. Dabei gibt es jedoch in Abhängigkeit der verwendeten Kanalblocker und der untersuchten Zellen deutliche Unterschiede, an welcher Stelle in den Signalkaskaden die Kanalblockade inhibierend auf die Zellaktivierung wirkt.

### 2.4.3 Einfluss von LPS auf MaxiK-Kanäle

Für einen Einfluss von Endotoxinen auf die Aktivität von Spannungs- und  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Kaliumkanälen gibt es verschiedene Belege in der Literatur. Die Mechanismen, die dabei zu einer Aktivierung der Ionenkanäle durch LPS führen, sind jedoch bisher nicht eindeutig geklärt. Maruyama et al. [111] schlagen vor, dass die von ihnen beobachtete Aktivierung von MaxiK-Kanälen<sup>5</sup> nach extrazellulärer Zugabe von LPS zu humanen Alveolarmakrophagen durch eine Veränderung der intrazellulären Konzentration freien Kalziums zu der von ihnen beobachteten Erhöhung der MaxiK-Aktivität nach Endotoxinzugabe führt. Dies wird durch die Arbeiten von Letari et al. [103] und Bader et al. [8] unterstützt, die eine LPS-induzierte Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beobachtet haben. Misra et al. haben gezeigt, dass durch CQ, Chinin und Chinidin in Makrophagen diese Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unterdrückt werden kann [124], was wiederum eine Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanälen verhindern könnte. Dagegen haben Haslberger et al. [67] keinen Einfluss von LPS auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und auch nicht auf das Membranpotential feststellen können. Hoang et al. haben an excised inside-out Patches von vasculären glatten Muskelzellen gezeigt, dass – im Gegensatz zu einer Zugabe an die Zellaußenseite – durch die Zugabe von LPS an die innere Seite der Zellmembran in relativ hohen Konzentrationen von 10 bis 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eine reversible Aktivierung von MaxiK-Kanälen erzielt werden kann [74]. Dabei ist die beobachtete Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit abhängig von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, aber nicht spannungsabhängig. Durch den Einsatz von detoxifiziertem LPS und aufgereinigtem Lipid A von *E. coli* konnten sie zeigen, dass die Kanalaktivierung dabei nicht Lipid-vermittelt geschieht [75]. Als Mechanismus

---

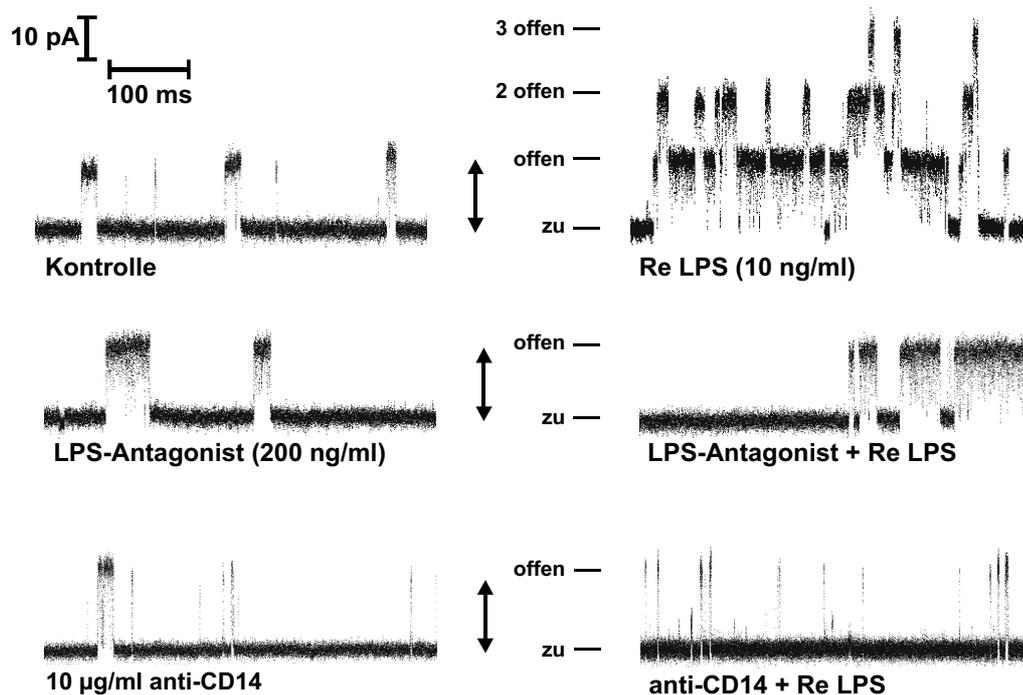
5 Es wurde zudem die Aktivierung eines kleineren, ebenfalls spannungs- und  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven  $\text{K}^+$ -Kanals beobachtet.

der Kanalaktivierung schlagen sie stattdessen vor, dass intrazelluläres LPS einen Aktivierungspfad anstößt, der über NO-Synthasen und möglicherweise die Erzeugung von cGMP zur Phosphorylierung des MaxiK-Kanals und damit seiner Aktivierung führt. Offen bleibt bei ihnen jedoch, ob und wie die nötigen Proteine für so einen Aktivierungspfad in einem excised Patch funktionell erhalten bleiben. Als Modell für stabile Proteinkomplexe greifen sie auf das Modell der PDZ-Domänen zurück, in denen eine Kollokalisierung funktionelle Verbindung von Ionkanälen und weiteren am Signalling beteiligten Proteinen vorzufinden ist. Eine direkte Aktivierung von MaxiK-Kanälen durch NO wurde in verschiedenen Geweben beobachtet. So haben Chen et al. [25] gezeigt, dass die LPS-induzierte NO-Produktion in der glatten Aorta-Muskulatur von Ratten zu einem Anstieg der MaxiK-Aktivität führt. Als weitere Möglichkeit einer indirekten Kanalaktivierung durch LPS ist auch eine Phosphorylierung des MaxiK-Kanals und eine damit einhergehende Modulation der Kanalaktivität denkbar. Neben der Aktivierung des Kanals über verschiedene Proteinkinasen [6][164] ist beschrieben, dass auch über Src Tyrosin-Kinasen, die bei der Zellaktivierung durch LPS aktiviert werden [10][18][72] und die in Lipid Rafts in möglichen Signalkomplexen lokalisiert sind [89], MaxiK-Kanäle aktiviert werden können [106]. Für  $\text{erg K}^+$ -Kanäle konnte durch Immunkoprezipitation und Patch-Clamp Experimente ein direkter Einfluss von Src-Kinasen auf die Aktivität des Kanals gezeigt werden [23]. Als möglicher Mechanismus der Kanalmodulation in Rafts wäre daneben der Einfluss der speziellen Lipidzusammensetzung in diesen Domänen denkbar. Da MaxiK-Kanäle in ihrer Aktivität durch die Zusammensetzung der umgebenden Lipidmatrix [20] und auch durch Fettsäuren direkt [92] beeinflusst werden, könnte hier ein Zusammenhang zwischen Raft-vermittelter Zellaktivierung und der Regulation von Ionkanälen bestehen.

An Microglia, Makrophagen-ähnlichen Zellen im Gehirn und Zentralen Nervensystem wurde festgestellt, dass durch LPS Gram-negativer Bakterien, aber auch durch Zytokine und Zellwandbestandteile Gram-positiver Bakterien  $K^+$ -Kanäle induziert werden [22][145]. Diese Kanäle sind bisher nicht näher charakterisiert, zeigen aber bezüglich des whole-cell Stromes Ähnlichkeiten zu MaxiK-Kanälen.

#### *2.4.4 Eigene Vorarbeiten*

Dr. Rikard Blunck hat in seiner Dissertation in unserer Arbeitsgruppe grundlegende elektrophysiologische Untersuchungen zur Beteiligung des MaxiK-Kanals in humanen Blutmakrophagen an der Zellaktivierung durch Endotoxine Gram-negativer Bakterien durchgeführt. Patch-Clamp Untersuchungen haben gezeigt, dass während der Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen die Expression eines Spannungs- und  $Ca^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanals mit einer Leitfähigkeit von 240 pS hochreguliert wird. Dieser Kanal konnte anhand seiner elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften eindeutig als sogenannter MaxiK-Kanal identifiziert werden. In Patch-Clamp Experimenten in der excised Patch outside-out Konfiguration wurde dieser Kanal durch die extrazelluläre Zugabe endotoxisch aktiver Lipopolysaccharide in physiologisch relevanten Mengen konzentrationsabhängig aktiviert. Diese Aktivierung lässt sich durch eine Verschiebung der Kennlinie der Offenwahrscheinlichkeit zu weniger positiven Membranpotentialen quantifizieren. Ein Einfluss auf die Einzelkanalleitfähigkeit konnte nicht festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass durch das LPS kein direkter Einfluss auf die Kanalpore ausgeübt wird. Dies wird durch das Anpassen der aufgezeichneten Zeitreihen an das Modell  $C=O=G$  unterstützt, da hier LPS zu einer Verschiebung aus dem lange geschlossenen Zustand C in den offenen Zustand O führt, wohingegen kein Einfluss auf das schnelle Öffnen und Schließen innerhalb der ak-



**Abbildung 12:** Die Aktivierung des MaxiK-Kanals erfüllt die Charakteristiken der LPS-induzierten Signaltransduktion: Die Ausschnitte aus Zeitreihen aus excised outside-out Patches zeigen, dass der MaxiK-Kanal durch LPS aktiviert werden kann (oben) und dass diese Aktivierung durch die vorherige Applikation eines LPS-Antagonisten (mitte) oder eines blockierenden CD14-Antikörpers (unten) unterdrückt werden kann [16].

tiven Bursts, also auf den Übergang O=G, gefunden wurde. Dies ist jedoch zum Beispiel nach der Zugabe von Kanalblockern der Fall, die direkt an der Porenregion des Kanalproteins angreifen.

Die Aktivierung des MaxiK-Kanals durch LPS erfüllt die entscheidenden Anforderungen, die an ein Signaltransduktionsereignis zu stellen sind: Als wichtigster Aspekt ist zu nennen, dass nur endotoxisch aktive Lipopolysaccharide zu einer Kanalaktivierung führen, nicht jedoch die endotoxisch inaktiven: Agonistisch wirkende Endotoxine wie Re LPS von *E. coli*, also LPS mit hoher biologischer Aktivität und einer konischen Konformation des Lipid A-Teils, führen zu einer Aktivierung des Kanals, antagonistische Endotoxinstrukturen wie der Lipid A-

Precursor Lipid IVa (das synthetische Analogon wird als Compound 406 bezeichnet), der eine zylindrische Konformation aufweist und in Zellkulturexperimenten eine Aktivierung durch agonistisches LPS inhibieren kann, haben keinen Einfluss auf die Kanalaktivität. Wird Compound 406 jedoch vor einer Zugabe eines Agonisten in zehnfachem Überschuss appliziert, wird die Aktivierung des Kanals inhibiert, das heißt, dass antagonistische Lipid A-Strukturen auch als LPS-Antagonist hinsichtlich der Kanalaktivierung wirken. Die Zugabe einer Mischung aus dem hydrophoben Ionenkanalblocker Chlorpromazin (CPZ) und antagonistischem Pentaacyl-Lipid A, einem Lipid A mit zylindrischer Molekülkonformation, hat eine Aktivierung des MaxiK-Kanals zur Folge. Da unter Anwesenheit von CPZ die im Röntgenbeugungsexperiment beobachteten lamellaren supramolekularen Strukturen (zylindrische Konformation) des Pentaacyl-Lipid A in invertiert kubische Strukturen (konische Konformation) übergehen, ist damit gezeigt, dass in Übereinstimmung mit den in Zellkulturversuchen gewonnenen Daten auch die Kanalaktivierung entscheidend von der molekularen Konformation des Lipid A-Teils der Endotoxine abhängt. Zudem ist, ebenfalls analog zu Zellkulturversuchen, die LPS-induzierte Kanalaktivierung CD14-abhängig. Durch Zugabe eines blockierenden Anti-CD14-Antikörpers wird die Aktivierung des MaxiK-Kanals durch LPS inhibiert.

Die Beteiligung des MaxiK-Kanals an der Aktivierung von Makrophagen zeigt sich zudem darin, dass in Makrophagen die Endotoxin-induzierte Ausschüttung von Zytokinen durch Substanzen, die den MaxiK-Kanal blockieren, deutlich reduziert werden kann [17]. Des Weiteren konnte durch RT-PCR-Nachweis gezeigt werden, dass durch die Zugabe des Kanalblockers Paxilline auch eine Hemmung der LPS-induzierten Produktion von mRNA der Zytokine IL-6 und TNF $\alpha$  auftritt. Bei diesen Versuchen sind jedoch Fragen offen geblieben, die für die Bedeutung des MaxiK-Kanals bei der Signaltransduktion durch LPS von ent-

scheidender Bedeutung sind: Zum einen gab es widersprüchliche Effekte bei unterschiedlichen Konzentrationen des Kanalblockers Paxilline; zum anderen wurde in einem Experiment gefunden, dass zwar durch 10  $\mu\text{M}$  Paxilline die Ausschüttung von  $\text{TNF}\alpha$  inhibiert wurde, nicht aber die Bildung von  $\text{TNF}\alpha$ -mRNA. Dieses Experiment ist besonders interessant, da es darauf hindeutet, dass eine Blockade von Kaliumkanälen möglicherweise erst die Reifung oder Freisetzung von Zytokinen beeinflusst, wie es von Haslberger et al. [67] und Valev et al. [188] vorgeschlagen wurde (siehe 2.4.2).

## 3 Kaliumionenkanäle und Patch-Clamp Technik

Da die Rolle von  $K^+$ -Kanälen bei der Zellaktivierung eine zentrale Frage in der vorliegenden Arbeit darstellt, wird in diesem Kapitel auf die Funktion und den Aufbau dieser transmembranen Proteine eingegangen. Es wird insbesondere die Gruppe der MaxiK-Kanäle vorgestellt. Am Ende dieses Abschnitts folgt eine Einführung in die Patch-Clamp Technik, der Methode, mit der Ionenkanäle hinsichtlich ihrer Funktion und Regulation untersucht werden können.

### 3.1 Zellmembranen und Ionentransport

Die Lipiddoppelschicht der Zellmembran ist impermeabel für Ionen. Durch aktiven Transport durch Ionenpumpen kommt es zu einer asymmetrischen Ladungsverteilung über der Membran, also einem elektrochemischen Gradienten. Dieser Gradient kann durch passiven Ionenfluss durch sog. Ionenkanäle zur Erzeugung elektrischer Signale ausgenutzt werden, durch die verschiedene Prozesse in der Zelle angestoßen und reguliert werden können. Der Zusammenhang zwischen dem Membranpotential  $E$ , den Ionenkonzentrationen und der Permeabilität der Membran für die einzelnen Ionen wird durch die Goldman-Gleichung beschrieben:

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{p_{Na} [Na^+]_o + p_K [K^+]_o + p_{Ca} [Ca^{2+}]_o + p_{Cl} [Cl^-]_i}{p_{Na} [Na^+]_i + p_K [K^+]_i + p_{Ca} [Ca^{2+}]_i + p_{Cl} [Cl^-]_o} \right)$$

mit

$$\begin{aligned} E_{rev} &= \text{Umkehrpotential} \\ R &= \text{universelle Gaskonstante} \end{aligned}$$

$T$	=	Temperatur
$F$	=	Faradaykonstante
$p_x$	=	Permeabilität der Membran für das Ion X
$[X]_{i/o}$	=	Ionenkonzentration X innen/außen

Ionenkanäle können durch verschiedenen Faktoren aktiviert werden, z.B. durch

- das Membranpotential
- die Konzentration eines aktivierenden Liganden wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder cGMP
- mechanische Reize,

und eine Vielzahl von Faktoren moduliert ihre Aktivität. Da die Ionenkanäle sehr selektiv für die einzelnen Ionenarten sind, kommt es bei einer Aktivierung eines Kanals zur gezielten Veränderung einer Ionenkonzentration. Die Hauptfunktion von Natriumkanälen ist die Generierung von Aktionspotentialen, die von Kalziumkanälen die Freisetzung von Kalzium als Second-Messenger in der Zelle. MaxiK-Kanäle spielen bei der Regulation und Modulation der Zellfunktionen eine wichtige Rolle.

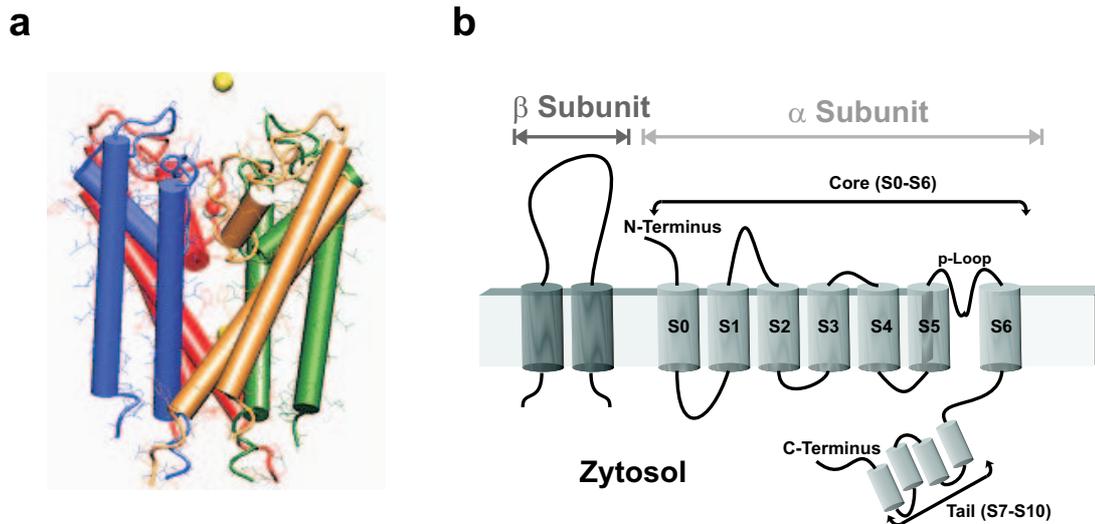
Da ein spannungsabhängiger und  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver Kaliumkanal (MaxiK-Kanal) im zentralen Interesse dieser Arbeit steht, wird im folgenden detailliert auf die Struktur und Funktion dieser Kanalfamilie eingegangen.

### 3.2 MaxiK-Kanäle

Die Gruppe der  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten MaxiK-Kanäle wird unterteilt in die der nicht Spannungs-abhängigen Kanäle mit einer kleinen oder mittleren Leitfähigkeit<sup>6</sup> (bis ca. 100 pS) und in die der Spannungs-abhängigen mit einer hohen Leitfähigkeit von bis zu 250 pS. Wegen dieser großen Leitfähigkeit werden diese Kanäle als MaxiK-Kanäle oder auch BK

---

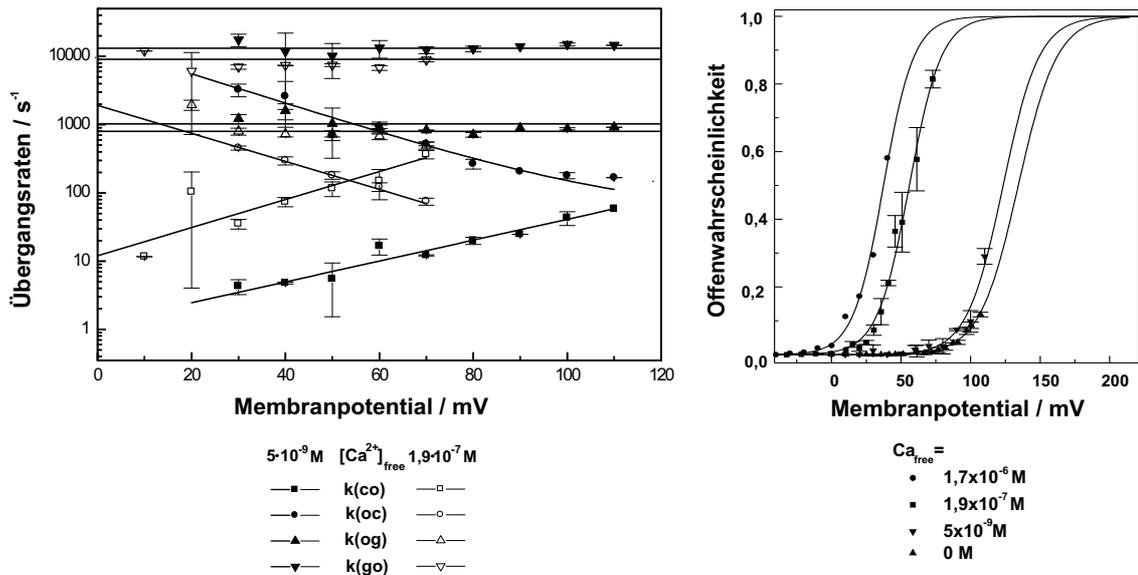
<sup>6</sup> Die Angabe der Leitfähigkeit gilt für eine symmetrische  $\text{K}^+$ -Konzentration von ca. 140 mM.



**Abbildung 13:** Proteinstruktur des KcsA Kanals aus *Streptomyces Lividans* (a, nach [37]) und schematische Darstellung der Domänen des MaxiK-Kanals (b).

bezeichnet<sup>7</sup>. MaxiK-Kanäle werden aus vier Untereinheiten, den  $\alpha$ -Subunits gebildet, die mit weiteren Untereinheiten, den  $\beta$ -Subunits, assoziiert sein können. Die  $\alpha$ -Subunits der MaxiK-Kanäle (Abb. 13b) weisen eine hohe Sequenzhomologie zu den Spannung- aber nicht  $\text{Ca}^{2+}$ - gesteuerten  $\text{K}^+$ -Kanälen des *Shaker*-Typs auf. Diese bestehen aus sechs  $\alpha$ -heli-kalen transmembranen Domänen, S1 bis S6, mit extrazellulären Verbindungsloops zwischen S1 und S2 sowie S3 und S4 und intrazellulären Loops zwischen S2 und S3 sowie S4 und S5. Die Segmente S5 und S6 sind durch den extrazellulären p-Loop verbunden, der aus zwei  $\beta$ -Faltblättern besteht, die von außen in die Membran eintauchen und die eigentliche Pore mit dem Selektivitätsfilter bilden. Durch die Kristallisation des bakteriellen  $\text{K}^+$ -Kanals KcsA aus *Streptomyces lividans* (Abb. 13a) [37], der nur aus der Porenregion (TM1-TM2, entsprechend S5-S6) besteht, konnte der Permeationsprozess von  $\text{K}^+$ -Ionen durch die Pore weitgehend aufgeklärt werden. Der Spannungssensor der *Shaker*- und der MaxiK-Kanäle, die in

<sup>7</sup> Eine weitere Bezeichnung für diese Kanäle ist *slo*, abgeleitet von *slowpoke*, einer *Drosophila*-Mutante mit der MaxiK-Variante *dslo*; humane MaxiK werden als *hslo* bezeichnet, murine als *mslo*.



**Abbildung 14:** Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit des MaxiK-Kanals in ausdifferenzierten humanen Blutmakrophagen. (Daten aus [16] und [158]).

Abwesenheit von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> rein Spannungs-gesteuert schalten [175], ist in dem Segment S4 lokalisiert, in dem besonders viele positiv geladene Aminosäuren vorliegen [2]. MaxiK-Kanäle besitzen eine zusätzliche transmembrane Domäne, S0; der N-Terminus der Aminosäureketten ragt daher in den extrazellulären Bereich [121][189]. Außerdem exprimieren die MaxiK-Kanäle vier weitere hydrophobe Domänen S7 bis S10 am Segment S6, die in den intrazellulären Bereich ragen [121]. Dieser sogenannte *Tail* ist mitverantwortlich für die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität der MaxiK-Kanäle. Zusätzlich zu den  $\alpha$ -Subunits können MaxiK-Kanäle über  $\beta$ -Subunits verfügen. Diese Untereinheiten bestehen aus zwei transmembranen Domänen mit intrazellulären N- und C-Termini und einem extrazellulären Verbindungsloop. Neben einer generellen Steigerung der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität [117][120][190] hat der Typ der assoziierten  $\beta$ -Subunits unterschiedliche Auswirkungen auf die Funktion und Eigenschaften des MaxiK-Kanals (siehe unten). Ein Ionenfluss durch den MaxiK-Kanal kommt zustande, wenn abhängig vom Membranpotential beim Erreichen eines bestimmten Wertes das Span-

nungs-sensitive S4-Segment transloziert, was dann zum Öffnen der Pore führen kann. Mit steigender intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration tritt diese Aktivierung des Kanals schon bei negativeren Spannungen auf, d.h. die Kennlinie der Offenwahrscheinlichkeit verschiebt sich in den negativen Bereich (Abb. 14). Die molekularen Mechanismen für das Schaltverhalten der MaxiK-Kanäle sind in Grundzügen aufgeklärt, zum Teil jedoch noch kontrovers diskutiert:

- **Spannungsabhängigkeit:** Bei steigendem Membranpotential kommt es zu einer Konformationsänderung im Kanalprotein durch eine Rotation der S4-Helix in der Membran [13][24], möglicherweise kombiniert mit einer Bewegung dieses Segmentes entlang der Achse der Helix [58][102][173]. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit für eine allosterische Konformationsänderung, die zum Öffnen des Kanals führt, erhöht.
- **Kalziumsensitivität:** Der C-Terminus der  $\alpha$ -Subunit und der N-Terminus der  $\beta$ -Subunit weisen je einen hydrophoben Bereich aus  $\alpha$ -Helices auf, den sogenannten *Ball*. Bei einer Anlagerung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen kommt es zu einer Konformationsänderung des *Tails*, der zu einer Translokation des *Balls* in die Pore hinein führt, wodurch der Kanal inaktiviert. Dieses Schließen nennt man *Ball-and-Chain-Mechanismus* [190]. Dieser Effekt ist abhängig von der assoziierten  $\beta$ -Subunit. Des Weiteren ist in der sog. RCK-Domäne (von: regulator of conductance for  $\text{K}^+$ ) des Kanals eine weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle beschrieben [86][160], über die die Kanalaktivität moduliert wird. Durch das Zusammenwirken beider Mechanismen lässt sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit über einen Konzentrationsbereich von 0,5  $\mu\text{M}$  bis 50 mM erklären [201].

In den letzten Jahren sind in unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen verschiedene  $\beta$ -Subunits gefunden bzw. kloniert worden, die sich in mindestens vier Familien,  $\beta_1$  bis  $\beta_4$ , ein-

	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\beta_4$
Vorkommen	glatte Muskulatur	Herzmuskel, Niere, Hippocampus, Ovarien	Testis, Plazenta, Pankreas, Leber	Gehirn, zentrales Nervensystem
Einfluss auf die Kinetik des MaxiK	Erhöhung $\text{Ca}^{2+}$ - u. Spannungsabhängigkeit, Verlangsamung d. Aktivierung und Inaktivierung, Verschiebung der Aktivierungskurve zu neg. Potentialen, Kanal vorwiegend im Burst-Mode	Erhöhung d. $\text{Ca}^{2+}$ - Sensitivität, schnelle Inaktivierung, Verschiebung der Aktivierungskurve zu neg. Potentialen, Verlangsamung d. Inaktivierung	etwas schnellere Aktivierung, in Abhängigkeit des Subtypes (a-d) Einfluss auf Inaktivierung	Verlangsamung d. Aktivierung, Erhöhung d. $\text{Ca}^{2+}$ - Abhängigkeit, Verschiebung der Aktivierungskurve abhängig v. $[\text{Ca}^{2+}]_i$
Pharmakologie	Erhöhung der ChTX-Sensitivität, Verringerung d. IbTX-Sensitivität	Verringerung der ChTX-Sensitivität		kein Block durch ChTX und IbTX im nM Bereich
Aktivatoren	aktivierbar durch DHS-1 <sup>8</sup> , $\beta$ ES	aktivierbar durch DHS-1, nicht $\beta$ ES		aktivierbar durch $\beta$ ES
Literatur	[40],[117],[130],[183],[187],[189]	[21],[134],[185],[190],[200]	[12],[21],[185]	[12],[21],[122],[183],[193]

**Tabelle 2:** Übersicht über die bisher beschriebenen  $\beta$ -Subunits des MaxiK. Der Einfluss auf Schaltkinetik und Pharmakologie ist jeweils im Vergleich zu einem nur aus  $\alpha$ -Subunits, MaxiK( $\alpha$ -), gebildeten MaxiK-Kanals angegeben. MaxiK( $\alpha$ -) sind durch den Aktivator DHS-1 nur in Konzentrationen im mM-Bereich aktivierbar, die Aktivatoren NS 1608, NS 1619, NS 004 und MaxiK-diol wirken unabhängig von der  $\beta$ -Subunit.

8 DHS-1: Dehydrosoyasaponin 1

teilen lassen. Diese verschiedenen  $\beta$ -Subunits beeinflussen die Sensitivität auf intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ , das Inaktivierungsverhalten und die Pharmakologie des MaxiK-Kanals, also die Modulation seines Schaltverhaltens durch verschiedene Substanzen. So bestimmt z.B. die  $\beta$ -Subunit maßgeblich die Sensitivität des MaxiK-Kanals für die selektiven Kanalblocker Charybdotoxin (ChTX) [54][65][66] und Iberiotoxin (IbTX) [122] sowie die Aktivierbarkeit des Kanals durch  $\beta$ -Estradiol ( $\beta$ ES) [187]. In Tabelle 2 ist eine Übersicht über die bisher beschriebenen  $\beta$ -Subunits des MaxiK-Kanals und ihres Einflusses auf dessen Eigenschaften zusammengestellt.

### **3.3 Patch-Clamp Technik**

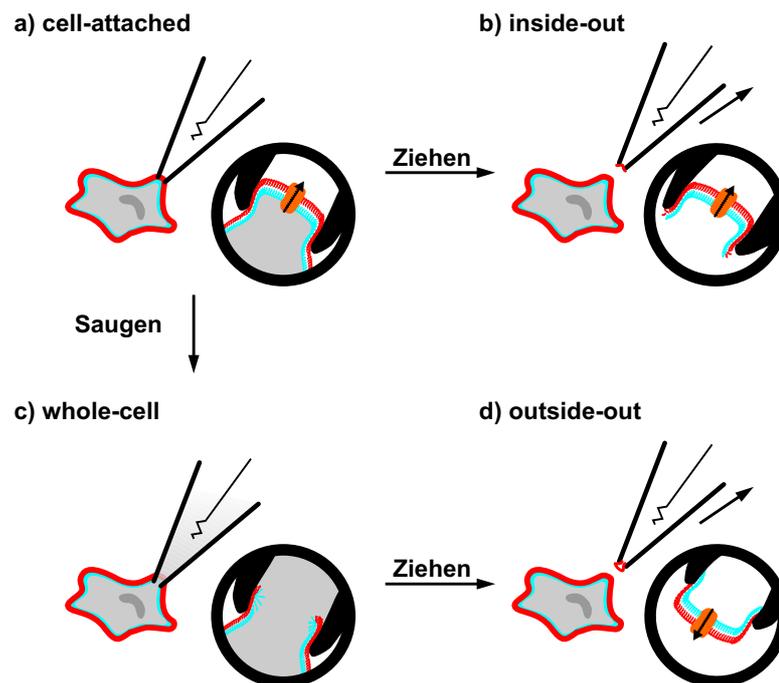
Die von E. Neher und B. Sakmann 1976 entwickelte Patch-Clamp Methode [128] ermöglicht es, mit Hilfe einer sehr feinen Glaspipette, die auf die Zellmembran aufgesetzt wird, ein kleines Membranstück elektrisch gegenüber der Umgebung zu isolieren und so elektrische Ströme durch einzelne oder wenige Kanalproteine in der Membran zu messen. Der entscheidende Schritt bei der Durchführung von Patch-Clamp Experimenten ist eine erfolgreiche Bildung des *Gigaseals*, d.h. die Pipettenspitze muss so fest an der Zellmembran haften, dass es zu einem elektrischen Widerstand  $\geq 1 \text{ G}\Omega$  zwischen der Membranfläche unter der Spitze und der Badlösung kommt. Diese enge Verbindung der Membran mit der Pipette wird durch Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoff- und Salzbrücken hervorgerufen.

#### **3.3.1 Patch-Clamp Konfigurationen**

In Abb. 15 sind die verschiedenen Patch-Clamp Konfigurationen dargestellt, die zur Untersuchung unterschiedlicher Problemstellungen präpariert werden können. Die *cell-at-*

*tached* Konfiguration (a) liegt bereits vor, wenn nach Aufsetzen der Pipette auf die Zelloberfläche ein Gigaseal gebildet ist. In dieser Konfiguration werden die Ströme durch Kanäle in dem Membranstück unter der Pipettenspitze gemessen. Da die Zelle und die Membran intakt bleiben, können in dieser Anordnung intrazelluläre Effekte auf die Ionenkanäle untersucht werden.

Wird in der cell-attached Konfiguration ein Unterdruck an die Pipette angelegt, kann das Membranstück unter der Pipettenspitze aufgebrochen werden, sodass eine Verbindung zwischen dem Zellinneren und dem Inneren der Messpipette besteht und ein Lösungsaustausch in den intrazellulären Bereich stattfinden kann (b). Diese Anordnung wird als *whole-cell* Konfiguration bezeichnet. Es wird die Stromantwort aller Kanäle auf angelegte Spannungspulse



**Abbildung 15:** Patch-Clamp Konfigurationen: Nach Bildung des Gigaseals liegt die cell-attached Konfiguration vor (a). Durch Zurückfahren der Pipette erhält man einen Patch in der inside-out Konfiguration (b). Wird bei der cell-attached Konfiguration die Membran unter der Pipettenöffnung aufgebrochen, liegt die whole-cell Konfiguration vor (c), aus der man durch Zurückziehen der Pipette in die outside-out Konfiguration gelangen kann (d).

gemessen. Die Messung von Schaltkinetiken, insbesondere der Aktivierung und Inaktivierung von Ionenkanälen, wird oft in dieser Konfiguration durchgeführt.

Wird aus der cell-attached Konfiguration die Pipette von der Zelloberfläche zurück bewegt, erhält man die *inside-out* Konfiguration (c): Der von der Zelle abgelöste Membranflicken befindet sich so an der Pipettenspitze, dass seine Innenseite zur Badlösung zeigt und die Außenseite Kontakt mit der Lösung in der Pipette hat. Bewegt man die Pipette aus der whole-cell Konfiguration von der Zelloberfläche weg, erhält man einen *outside-out* Patch (d). Das Membranstück ist ebenfalls von der Zelle entfernt; im Gegensatz zur *inside-out* Konfiguration weist jedoch die Außenseite des Membranpatches zur Badlösung. Damit ist es leicht möglich, wie im physiologischen System Wirkstoffe an die Außenseite der Zellmembran zu applizieren. *Inside-out* und *outside-out* Konfiguration werden auch als *excised patch* Konfigurationen bezeichnet. In beiden Fällen wird der Strom durch die Kanäle in dem aus der Zellmembran herausgelösten Patch gemessen. Nach Applikation von Wirkstoffen ist es so möglich, direkte oder membranvermittelte Effekt dieser auf die Kanäle zu messen, da auf die Kanäle rückwirkende Effekte aus dem Zellinneren ausgeschlossen werden können. Ein Einfluss Membran-assoziiertes Proteine in dem gepatchten Membranstück auf die Kanäle in diesem ist jedoch nicht auszuschließen.

## 4 Methoden und Materialien

### 4.1 Zellkultur

In biologischen Stimulationsassays und Patch-Clamp Experimenten wurden verschiedene Zelltypen eingesetzt: Zum einen Primärzellen wie humane Blutmonozyten und daraus differenzierte Makrophagen, zum anderen die Zelllinien RAW 264.7-, CHO (*chinese hamster ovary*)- und HEK (*human embryo kidney*)- Zellen. In CHO- und HEK-Zellen, die nativ keine MaxiK-Kanäle exprimieren, wurde der MaxiK-Kanal transfiziert, um Modellsysteme zu erhalten, in denen sowohl in Zellkultur- als auch in Patch-Clamp Experimenten die Bedeutung dieses Kanal an der Zellaktivierung untersucht werden kann.

#### 4.1.1 Humane Monozyten und Makrophagen

Aus dem Vollblut gesunder Spender werden durch Hypaque-Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen (MNC) extrahiert. Diese wurden dann in einem Nährmedium (RPMI 1640 (Biochrom) mit 4 % humanem AB-Serum, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 200 mM L-Glutamin (PS/G, Biochrom)) in Plexiglas-Petrischalen (12x30 mm; Sarstedt, Nümbrecht) ausgesät (Zelldichte:  $1-2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) und für 2 h in einen Brutschrank bei 6 % CO<sub>2</sub> und 37 °C gestellt. In dieser Zeit adhärieren die Monozyten im Gegensatz zu den Lymphozyten am Boden der Petrischalen [101]. Die Lymphozyten wurden durch Wechseln des Mediums nach 2 h abgewaschen. Das neue Medium beinhaltet zusätzlich zum ursprünglichen in einer Konzentration von 2 ng/ml den Differenzierungsfaktor Macrophage-colony stimulating factor M-CSF (R&D Systems, Wiesbaden), der die Reifung von Monozyten zu Makrophagen fördert [11]. Die Petrischalen wurden nach dem Medium-

wechsel für mindestens 6 Tage bei oben beschriebenen Bedingungen im Brutschrank inkubiert. Nach 7 Tagen wurde ggf. ein Mediumwechsel vorgenommen. Alternativ fand die Reifung von Makrophagen anstatt in Petrischalen unter gleichen Bedingungen in Teflonbeuteln (CellGenix, Freiburg) statt; die Makrophagen wurden dann nach 7 Tagen in Petrischalen überführt.

#### 4.1.2 CHO-Zellen

Für Zellkultur- und Patch-Clamp Experimente wurde die Fibroblastenzelllinie CHO aus Ovarien chinesischer Hamster verwendet, die entweder mit der  $\alpha$ -Subunit (human BKCA  $\alpha$ -Subunit) oder mit der  $\alpha$ - und der  $\beta_4$ -Subunit (human KCNMB4) des humanen MaxiK-Kanals heterolog transfiziert war, im folgenden CHO( $\alpha/-$ ) bzw. CHO( $\alpha/\beta_4$ ) genannt. Die Zellen wurden mit einem Plasmid kotransfiziert, das für das Fluorochrom GFP (*green fluorescent protein*) kodierte. Über die Fluoreszenz der erfolgreich transfizierten Zellen konnte so in einem gewissen Maße die Stabilität der transfizierten DNA überwacht werden. Grundlage für die Transfektion war die Reporterzelllinie 3E10 [33]. Diese Zelllinie, die einen funktionalen Hamster-TLR4 und verschiedene Zytokinrezeptoren wie den TNF $\alpha$ -Rezeptor exprimiert, ist nach Transfektion mit humanem CD14 im Gegensatz zu normalen CHO-Zellen LPS-responsiv. Sie ist zudem mit einem Plasmid kotransfiziert, das die cDNA des humanen Tac Antigens unter transkriptioneller Kontrolle durch den E-Selektin Promoter mit Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B enthält. Bei Aktivierung der 3E10-Zellen durch LPS oder TNF $\alpha$  kommt es nach der Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern zur Hochregulation des humanen Tac-Gens und der anschließenden Expression von CD25 auf der Zelloberfläche. Dieses kann durch eine Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern leicht z.B. in einem

*Fluorescence-activated cell sorter* (FACS, Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA) nachgewiesen werden (siehe hierzu [138]).

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) gezogen und für Patch-Clamp Experimente ebenfalls in Petrischalen ausgesät. Das Zellmedium war Ham's F-12 (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom), 2 % PS/G, 400 Units/ml Hygromycin B und bei den mit dem MaxiK-Kanal transfizierten Zellen zusätzlich 1 mg/ml Geneticin 418 (Gibco). Zur Stammerhaltung wurden die Zellen alle 2 bis 3 Tage passagiert.

#### 4.1.3 HEK-Zellen

Die humane Zelllinie HEK 293 wurden als weiteres Transfektionssystem für den MaxiK-Kanal benutzt. Diese Zellen wurden ebenfalls mit der  $\alpha$ - und der  $\beta_4$ -Subunit des humanen MaxiK-Kanals stabil transfiziert. Es wurde bei diesen Zellen ein  $\alpha$ -Subunit-Konstrukt transfiziert, das für ein C-terminal markiertes GFP-Fusionsprotein codiert, so dass auch hier die erfolgreiche Transfektion anhand der Fluoreszenz der Zellen kontrollierbar war. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 6 % CO<sub>2</sub> und 37 °C in Kulturflaschen (NUNC) kultiviert und für die Patch-Clamp Versuche in Petrischalen überführt. Das Zellkulturmedium war Dulbecco's MEM (Biochrom, Berlin) mit 2 % PS/G, 10 % FCS und zusätzlich 1 mg/ml Geneticin 418.

#### 4.1.4 Die murine Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7

Die murine Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 wurde in Kulturflaschen (NUNC) in Dulbecco's MEM (Biochrom, Berlin) mit 2 % PS/G und 10 % FCS im Brutschrank bei 6 %

CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Für Patch–Clamp Versuche wurden sie in diesem Medium in Petrischalen ausgesät, zu Stimulationsversuchen in 96well–Platten (NUNC).

## 4.2 Chemikalien

### 4.2.1 Messlösungen

Für die Patch–Clamp Versuche wurden die Petrischalen mit den Zellen unabhängig vom Typ vor den Versuchen aus dem Brutschrank genommen. Das Zellkulturmedium wurde dann für whole–cell, cell–attached und outside–out Experimente gegen Hank’s Balanced Salt Solution (HBSS, Biochrom, Berlin) ausgetauscht.

HBSS: 137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,84 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,26 mM CaCl<sub>2</sub>, 4,17 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1000 mg/ml Glucose, 10 ng/ml Phenolrot, pH 7,2.

Für inside–out Messungen wurde als Badlösung eingesetzt:

140 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7,2.

Als Pipettenlösung wurde bei inside–out und cell–attached Messungen HBSS benutzt. Bei whole–cell und outside–out Versuchen wurde folgende Lösung eingesetzt:

140 mM KCl, 5 mM NaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7,2.

Alle Lösungen wurde nach der Herstellung steril filtriert. Bei der Badlösung für die inside–out Versuche und bei der Pipettenlösung für whole–cell und outside–out Versuche wurde zudem durch die Zugabe von CaCl<sub>2</sub> und EGTA (Sigma, Deisenhofen) der Gehalt an freiem

Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{frei}}$ ) eingestellt [44] und fluoreszenzspektroskopisch mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Farbstoff Fura-2 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) überprüft.

$[\text{Ca}^{2+}] / \mu\text{M}$	EGTA / $\mu\text{M}$	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$
0	5000	$< 10^{-9}$
0,97	1,92	$1,5 \cdot 10^{-7}$
1,54	1,73	$1 \cdot 10^{-6}$

**Tabelle 3:**  $\text{Ca}^{2+}$ - und EGTA-Konzentrationen zum Einstellen des Gehalts an freiem  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 4.2.2 Endotoxine, andere bakterielle Virulenzfaktoren und Zytokine

Die eingesetzten Endotoxine wurden nach der Phenol/Chloroform/Petrolether-Methode [48] aus der Bakterienmembran extrahiert, aufgereinigt und lyophilisiert. Zum Ansetzen der Stammlösungen (1 ng/ml) wurde die eingewogene Menge LPS mit der entsprechenden Menge pyrogenfreien Wassers (Braun, Melsungen) versetzt, geschüttelt und in einem Ultraschallbad für ca. 10 min beschallt. Die Suspension wurde dann in mindestens drei Zyklen für je 30 min auf 64 °C erhitzt und auf 4 °C abgekühlt und dann bei -20 °C eingefroren. Die für die Experimente aufgetauten und angesetzten Ansätze wurden bei 4 °C maximal 3 Wochen aufbewahrt. Vor der Verdünnung der Suspension für Messungen wurde sie für 5 min im Ultraschallbad beschallt. Im Ergebnisteil dieser Arbeit wird, ohne auf die genaue Herkunft oder chemische Struktur einzugehen, bei agonistischen LPS generell die Bezeichnung LPS verwandt.

Lösliches Peptidoglycan wurde von Dr. U. Zähringer (FZB) zur Verfügung gestellt, Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> von Dr. Wiesmüller (Universität Tübingen) und Lipoteichonsäure von Dr. T. Hartung (Universität Konstanz).

### 4.2.3 NO–Donatoren

Es wurden zwei verschiedene NO–Donatoren eingesetzt:

- Bei **P7070** ( $K_2Ru(NO)Cl_5$ , Molecular Probes, Leiden, Niederlande) handelt es sich um einen photolabilen NO–Donor, der nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht (Absorptionsmaximum = bei 516 nm) NO freisetzt [127]. P7070 wurde in Wasser gelöst und der üblichen kalziumfreien (5 mM EGTA) zytosolischen Lösung für die Patch–Clamp Experimente zugegeben. Die Freisetzung von NO wurde durch Bestrahlung für 10 s mit einem Industriestroboskop (siehe Kap. 4.4.2.1) erreicht.
- **NOR–3** ( $C_8H_{13}N_3O_4$ , Sigma, Deisenhofen) ist ein NO–Donor, der in wässriger Lösung spontan NO freisetzt ( $T_{1/2} = 30$  min) [95]. NOR–3 wurde in DMSO (10 mg/ml) gelöst und dann 1:20 in die Messlösung verdünnt.

Die Kontrolle der NO–Freisetzung erfolgte jeweils qualitativ durch die Griess–Reaktion (siehe Kap. 4.3.3).

### 4.2.4 Kanalmodulatoren und –blocker sowie weitere Agenzien

Die Kanalaktivatoren NS 004 und NS 1608 sind von der Firma NeuroSearch (Ballerup, Dänemark) zur Verfügung gestellt worden. Sie wurden als Stammlösung in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und für die Stimulationsassays in dem entsprechenden Medium, für Patch–Clamp Experimente in HBSS verdünnt.

Taxol und Phloretin wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen. Sie wurden in Methanol bzw. Ethanol gelöst und für die jeweiligen Versuche mit dem entsprechende Medium verdünnt.

Die Kanalblocker Iberiotoxin, Charybdotoxin, Paxilline, Penitrem A, Verruculogen und Kaliotoxin sowie der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin wurden von Alomone Labs (Jerusa-

lem, Israel) erworben, entsprechend der jeweiligen Produktbeschreibung gelöst und gelagert und für die Versuche mit dem entsprechenden Medien verdünnt.

Alle übrigen Kanalblocker wurden von der Firma Sigma bezogen, in Stammlösungen gelöst und ebenfalls vor Verwendung mit geeigneten Medien verdünnt.

Humanes IL-1 $\beta$  und der IL-1-Rezeptor-Antagonist wurden bei R&D Systems erworben, der IP3-Rezeptorantagonist 2APB bei Biotrend (Köln).

### 4.3 Nachweisreaktionen für die Zellaktivierung

Zur Bestimmung der Aktivierung von Zellen wurden verschiedene biologische Assays eingesetzt. In humanen Makrophagen und MNC wurde die Freisetzung des Zytokins TNF $\alpha$  und die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege (Phosphorylierung von MAPK) untersucht. In der murinen Zelllinie RAW 264.7 wurde die NO- und in Zusammenarbeit mit Dr. N. Reiling (FZB) die TNF $\alpha$ -Freisetzung untersucht. In CHO-Zellen wurden ebenfalls intrazelluläre Signalwege untersucht sowie die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus.

Bei allen biologischen Experimenten wurde durch eine Trypanblaufärbung die Lebendzellzahl bestimmt. Diese war, wenn nicht anders angegeben,  $\geq 90$  % der Gesamtzellzahl.

#### 4.3.1 Stimulation von Zellen durch Virulenzfaktoren

Zur Stimulation der humanen MNC und Makrophagen durch Virulenzfaktoren oder K<sup>+</sup>-Kanalaktivatoren wurden die Zellen in 96-Well Rundbodenplatten (Nunc, Wiesbaden) in RPMI 1640 mit 2 % PS/G und ggf. 4 % humanem AB-Serum überführt. Die Zelldichte betrug, wenn nicht anders angegeben, bei Makrophagen  $1 \cdot 10^5$  Zellen / ml, bei MNC  $1 \cdot 10^6$

Zellen / ml. Die Stimuli wurden aus ihren Stammlösungen mit RPMI 1640 verdünnt und je 20 µl Stimulus pro Well zu den Zellen pipettiert. Wurden zusätzlich K<sup>+</sup>-Kanalblocker eingesetzt, wurden diese ebenfalls aus ihren Stammlösungen mit RPMI 1640 verdünnt und in einer Menge von je 20 µl zu den Zellansätzen gegeben. Die Kanalblocker wurden dabei jeweils 10 bis 15 min vor den Stimuli appliziert (siehe hierzu 5.4.5). Die RPMI-Ausgangsmenge in den Wells wurde so gewählt, dass die Gesamtmedienmenge 200 µl/Well betrug. Die Zellen wurden dann, je nach Nachweisreaktion, für 4 bis 24 h bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die RAW 264.7-Zellen wurden zur Stimulation mit Virulenzfaktoren in einer Dichte von  $2 \cdot 10^5$  Zellen / ml im entsprechenden Medium in 96-Well Rundbodenplatten überführt. Die Kanalblocker wurden wie bei den humanen Zellen appliziert. Für die TNF $\alpha$ -Bestimmung wurden zellfreie Überstände nach 4 h Stimulation abgenommen. Für die NO-Bestimmung wurden die Zellen zusätzlich zu den Virulenzfaktoren mit 100 U/ml IFN $\gamma$  inkubiert, um die Bildung des Enzyms iNOS zu induzieren. Nach 24 h wurden zellfreie Überstände abgenommen.

Die Details der Stimulation der CHO-Zellen zum Nachweis der NF- $\kappa$ B-Translokation und der MAPK-Phosphorylierung sind in [138] zu finden.

Sämtliche dargestellten biologischen Versuche sind, wenn nicht anders angemerkt, mindestens dreimal durchgeführt worden. Die Fehlerbalken in den entsprechenden Grafiken ergeben sich durch die Doppelbestimmungen innerhalb eines Versuchsansatzes. Bei den abgebildeten Western-Blots und FACS-Daten handelt es sich um die Darstellung eines repräsentativen Experiments.

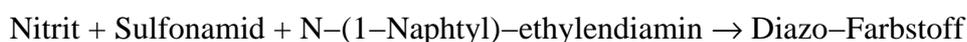
### 4.3.2 TNF $\alpha$ -ELISA

Um die Zytokinausschüttung von stimulierten Zellen zu messen, wurden die Mikrotiterplatten zentrifugiert (10 min, 300 g), zellfreie Überstände abgenommen und bis zur Durchführung der Zytokinbestimmung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Zytokinkonzentrationen im Überstand humaner Zellen wurden in einem Sandwich-ELISA bestimmt. Dazu wurden Flachboden-Mikrotiterplatten (96-Well, NUNC) mit einem monoklonalen Antikörper gegen TNF $\alpha$  (5  $\mu\text{g/ml}$ ; Gallati, Schweiz) beschichtet. Die freien Stellen auf der Polystyroloberfläche wurden mit BSA (10 % m/v) abgedeckt und die Platten in einem Blockpuffer (20 mM Tris/HCl; pH=7,5; 10 g/l BSA; 0,25 g/l Thimerosal), der vor der Verwendung der Platten entfernt wurde, bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zum Einsatz gelagert. Die Zellkulturüberstände und der Standard (rekombinantes TNF $\alpha$ ) wurden mit Verdünnungspuffer (1,0 M Tris/HCl; pH=9,0; 100 ml/l FCS; 0,5 g/l Thimerosal; 1g/l Phenol) verdünnt und zu je 100  $\mu\text{l}$  pro Well auf die Platten pipettiert. Nach Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  des 1:500 im Verdünnungspuffer gelösten Sekundärantikörpers (POD-Konjugat) wurden die Platten 16 bis 24 h bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die freien Antikörper durch sechsmaliges Waschen mit Aqua bidest von der Platte entfernt. Durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Substratlösung pro Well (TMB [3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Fluka, Neu-Ulm]/H $_2$ O $_2$  in alkoholischer Lösung : Kaliumcitrat = 1:20; pH = 4,1) wurde dann die Farbreaktion gestartet und nach 5 bis 15 min mit der Stopplösung (1 N Schwefelsäure) abgebrochen. Bei der Farbreaktion wurde das Substrat enzymatisch gespalten. Das Produkt dieser Reaktion war photometrisch nachweisbar, und der Zytokingehalt hing proportional vom gespaltenen Substrat ab. Die photometrische Bestimmung wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem ELISA-Reader (Rainbow, Tecan, Crailsheim) vorgenommen und auf die Standardkurve normiert.

Die Zytokinkonzentration in Überständen muriner Zellen wurde analog in einem Sandwich-ELISA nach Angaben des Herstellers (R & D Systems) gemessen.

### 4.3.3 NO-Nachweis

Die Aktivierung der RAW 264.7-Zellen wurde im Zellkultursystem anhand der NO-Freisetzung bestimmt. In wässriger Lösung und an Luft oxidiert dieser Botenstoff rasch zu Nitrit (NO<sub>2</sub>) und zu Nitrat (NO<sub>3</sub>). Es ist hier in den Zellkulturüberständen das NO<sub>2</sub> mit einem kommerziellen Nachweiskit (Roche Diagnostics, Mannheim) nachgewiesen worden, dessen Prinzip auf der sog. Griess-Reaktion basiert:



Der entstehende Farbstoff kann aufgrund seiner Absorption bei 540 nm quantitativ im ELISA-Reader nachgewiesen werden und anhand einer NaNO<sub>2</sub>-Standardreihe (Merck) der NO<sub>2</sub>-Gehalt im Überstand bestimmt werden.

Für den NO-Nachweis wurden die Zellen in 96well-Platten ausgesät und für 24 h mit den jeweiligen Substanzen stimuliert.

### 4.3.4 Nachweis der MAP-Kinasen und der NF-κB-Translokation

Die Versuche zum Nachweis phosphorylierter und unphosphorylierter MAPK sowie zur NF-κB-Translokation sind von M. Papavlassopoulos in Rahmen seiner Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt worden und dort detailliert dokumentiert [138]. Daher werden hier nur die Grundlagen der angewandten Techniken dargestellt.

Um Proteine verschiedener Massen, also z.B. MAP-Kinasen, voneinander zu trennen und nachzuweisen, werden diese beim sog. Western Blot durch eine Detergenzlyse aus der Zelle gelöst, durch eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach ihrer molekularen Masse

getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt, auf der sie mit spezifischen Antikörpern markiert werden. Die Antikörper dienen als Träger eines Enzyms, das eine chemolumineszente Reaktion katalysiert. Die dabei entstehende Strahlung kann auf einem entsprechenden Film sichtbar gemacht werden.

Die NF- $\kappa$ B-Translokation auf den CD25-Reporterzellen wurde indirekt über die CD25-Expression an der Zelloberfläche nachgewiesen. Dazu wurde das CD25 mit einem spezifischen fluoreszierenden Antikörper markiert und die Zellen anhand ihrer Fluoreszenz mittels eines FACS (FACS Calibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) quantitativ erfasst.

In humanen Makrophagen wurde die NF- $\kappa$ B-Translokation indirekt über die I $\kappa$ B-Degradation nachgewiesen. Per Western Blot wurde die Konzentrationsdifferenz an zytoplasmatischem I $\kappa$ B ermittelt, die als Hinweis auf eine nukleare Translokation von NF- $\kappa$ B diente.

## 4.4 Elektrophysiologische Messungen

### 4.4.1 Präparation der Glaspipetten und Messelektroden

Die Pipetten für die Messungen wurden aus Borosilikatglaskapillaren ( $\varnothing_{\text{ausßen}} = 1,5 \text{ mm}$ ,  $\varnothing_{\text{innen}} = 1 \text{ mm}$ ; innen mit einem Filament zum Aufsaugen der Lösung in die Spitze; Hilgenberg, Malsfeld), die in Azeton für 30 min gewaschen und bei 180 °C für 6 h getrocknet wurden, an jedem Versuchstag frisch hergestellt. Um eine stumpf zulaufende Spitze zu gewährleisten, die das Durchstechen der Zellmembran durch die Pipette verhindern sollte, wurden die Pipetten mit einem speziellen zweistufigen Pipettenziehgerät (L/M-3P-A, List-Elektronik, Darmstadt) hergestellt. Der Heizstrom beim Ziehen der Pipetten betrug bei der ersten Stufe 21,1 A, bei der zweiten 13,6 bis 14,0 A. Um die Abrisskante an der Pipetten-

spitze zu glätten und so eine erfolgreiche Präparation eines Patches zu fördern, wurden die Pipettenspitzen unter einem Mikroskop (Zeiss, Winkel) mittels eines Heizdrahts aus Platin angeschmolzen. Zur Vermeidung einer elektrostatischen Aufladung der Pipettenspitzen durch Glühelktrodenemission des Drahtes wurde dieser mit Glas beschichtet. Die fertigen Pipetten wurden bis zur Verwendung staubgeschützt in einem geschlossenen Kästchen aufbewahrt. Der Pipettenwiderstand wurde anhand des Testsignals nach Eintauchen der Pipette in die Badlösung überprüft und lag im Bereich von 5,5 bis 6 M $\Omega$ .

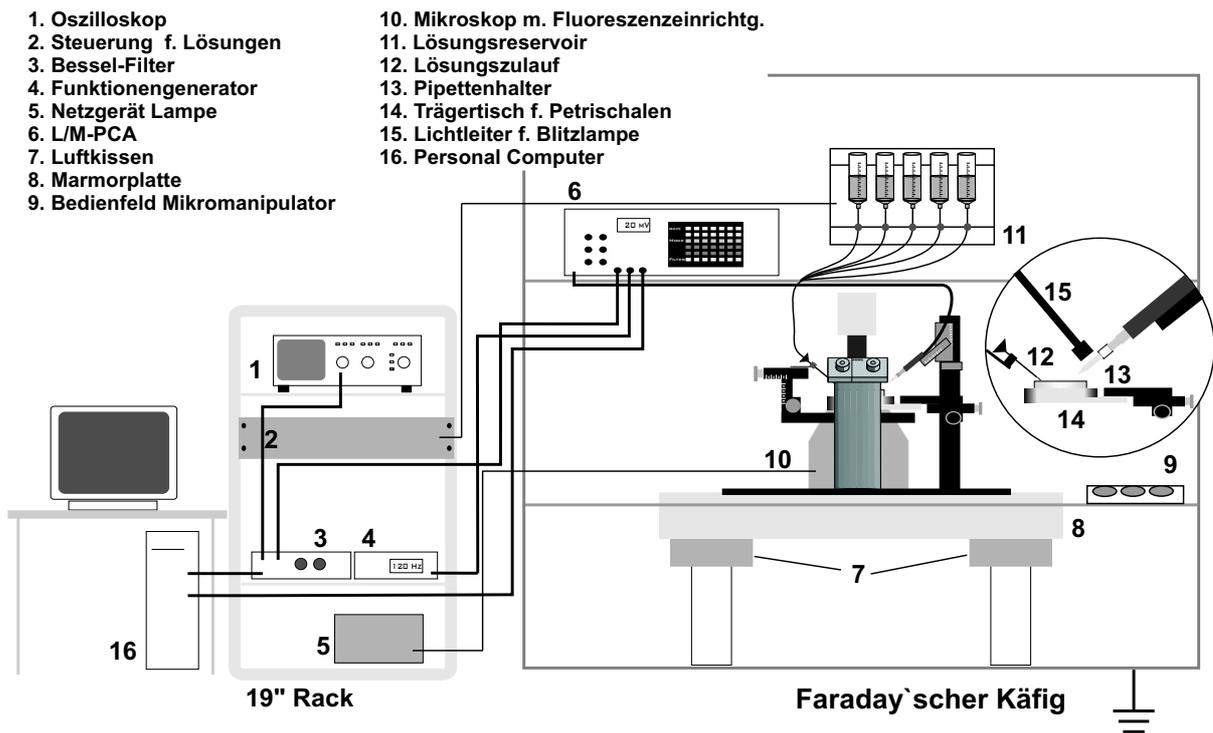
Als Messelektroden wurden Ag/AgCl-Elektroden verwendet. Dafür wurde Silberdraht ( $\varnothing = 0,5$  mm) in einer galvanischen Zelle mit 1 M NaCl-Lösung bei einer Spannung von 1,5 V für 20 min chloriert.

#### 4.4.2 Der Patch-Clamp Messaufbau

Der Patch-Clamp Arbeitsplatz, an dem die Messungen zu dieser Arbeit durchgeführt wurden, ist von R. Blunck im Rahmen seiner Promotion in unserer Arbeitsgruppe aufgebaut worden und seiner Promotionsschrift eingehend beschrieben [16]. Die folgende Beschreibung wird sich daher auf die grundlegenden Bestandteile des Aufbaus beschränken.

##### 4.4.2.1 Der Messplatz

Da bei Patch-Clamp Experimenten extrem kleine elektrische Ströme gemessen werden, ist der gesamte Aufbau darauf ausgelegt, elektromagnetische Störungen abzuschirmen und zu vermeiden. Daher wird die Messkammer durch einen Faraday'schen Käfig abgeschirmt. Zur Vermeidung mechanischer Störungen erfolgt der Aufbau des Experimentierplatzes auf einem luftgefederten Tisch mit einer Marmorplatte. Im Zentrum des Aufbaus steht ein Phasenkontrast-Inversmikroskop (Leica DM-IL, Leica, Wetzlar), das durch den Einsatz



**Abbildung 16:** Patch-Clamp Aufbau; der eigentliche Messplatz ist in einem Faraday'schen Käfig aufgebaut, Zuleitungen in den Käfig sind gegen elektromagnetische Felder abgeschirmt.

geeigneter Filter und der Verwendung einer Quecksilberdampfampe als Beleuchtung zu Fluoreszenzmessungen verwendet werden kann. Anstelle des Objektisches des Mikroskops wird eine Halterung (Typ-2, Luigs & Neumann, Ratingen) für die Petrischalen mit den zu untersuchenden Zellen benutzt, die über einen Mikromanipulator (Unit B2RMS, Luigs & Neumann) in X-Y-Richtung bewegt werden kann. An einem weiteren, dreidimensionalen Mikromanipulator (Unit RME, Luigs & Neumann), der über ein Bedienfeld mit verschiedenen Geschwindigkeiten bewegt werden kann, befindet sich der Vorverstärker, auf den direkt die Halterung für die Messpipette angebracht ist. Über ein Schlauchsystem kann entweder mittels einer Wassersäule ein Überdruck oder durch Saugen ein leichter Unterdruck an die Pipette angelegt werden. Über einen Sterilfilter (Sarstedt, Nürnberg) wird ein Kontakt des Experimentators beim Saugen mit möglicherweise infektiösem Material ausgeschlossen. An

einem dritten Mikromanipulator (MM33, List-Elektronik, Darmstadt) ist eine Pipette zum Zufügen von Lösungen in die Petrischale angebracht; die Zugabe der Lösungen erfolgt über Silikonschläuche (Kronlab, Sinsheim) aus 8 Spritzenreservoirs und ist über elektronisch ansteuerbare Magnetventile regulierbar (SPS-8, List-Elektronik). Über einen Lichtleiter (Schott-FOSTEC, Polytec, Waldbronn) mit einem Linsenaufsatz (Schott-FOSTEC A08080) können hochenergetische Lichtblitze aus einem Stroboskop (BVS 020, Ploytec; Xe-Blitzlampe, elektrische Blitzenergie bis zu 2,16 J) auf die Patch-Clamp Pipette gerichtet werden. Der Wellenlängenbereich des Blitzlichtes reichte von 300 bis 1100 nm mit einem Maximum bei 400 bis 500 nm. Das Stroboskop wird über eine einfache externe Schaltung (Eigenbau) und einen Druckschalter getriggert.

#### 4.4.2.2 Elektronik und Aufnahme der Messdaten

Zur möglichst rauschfreien Verstärkung der gemessenen Ströme sind bis auf das Mikroskop, den Mikromanipulator und den Patch-Clamp Verstärker (LM-PCA, List Elektronik) sämtliche elektrischen Geräte außerhalb des Faraday'schen Käfig positioniert und ggf. über abgeschirmte Kabel mit den Komponenten innerhalb des Käfigs verbunden. Alle Bestandteile des Aufbaus sind an einer zentralen Stelle geerdet. Zur Verstärkung der auftretenden Ströme wird als empfindlicher Strom-Spannungskonverter mit großer Bandbreite der Patch-Clamp Verstärker LM-PCA (List-Elektronik) mit einer Bandbreite von 80 kHz bei 20 mV/pA bzw. 50 kHz bei 100 mV/pA eingesetzt. Für einen möglichst kurzen Signalweg von der Pipette zum Verstärker ist der Pipettenhalter direkt auf den Vorverstärker montiert. Die erste Verstärkerstufe bildet ein invertierender Verstärker mit sehr hohem Rückkopplungswiderstand ( $50 \text{ G}\Omega$ ) zur Strom-Spannungskonvertierung. An den positiven Eingang des Operationsverstärkers wird die gewünschte Membranspannung angelegt. Der Strom-Spannungs-

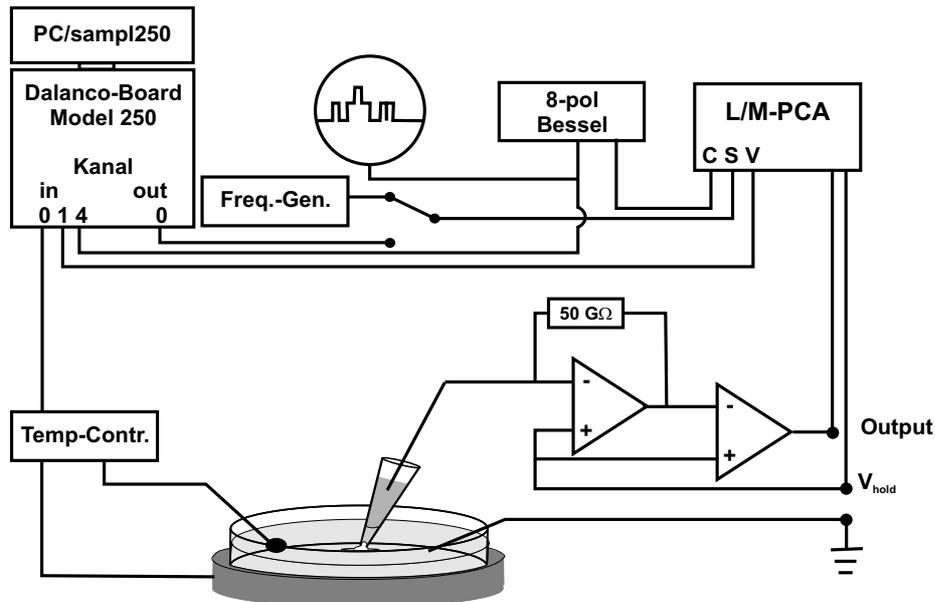
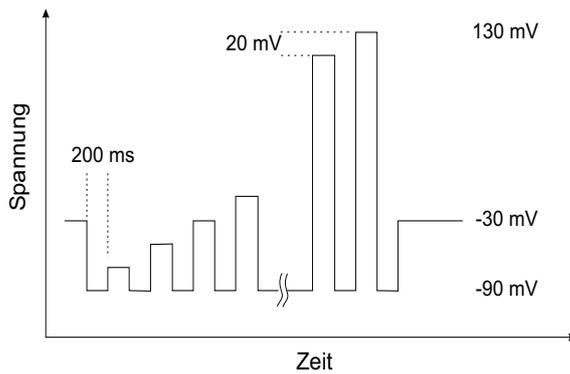


Abbildung 17: Patch-Clamp Elektronik.

konverter regelt den Minuseingang und damit den Pipettenanschluss auf diesen Sollwert nach, so dass diese Spannung stromunabhängig gegen Masse anlag. Die zweite Stufe verstärkt dann die Differenz zwischen Ausgangsspannung und Referenzwert. Über zusätzliche Funktionseinheiten wird je nach Anwendungsart die Offsetspannung zur Kompensation von Kontaktspannungen an den Elektrolyt-Elektrodengrenzflächen, das Haltepotential  $V_{\text{hold}}$  sowie ein Rechtecksignal aus einem Funktionsgenerator (Voltcraft 7202, Conrad Elektronik, Hirschau) zum Sealtest auf den positiven Verstärkereingang addiert. Das Ausgangssignal wird über ein abgeschirmtes BNC-Kabel zu einem 8-Pol Besselfilter (Frequency Devices, Haverhill, USA) geleitet. Die Filterfrequenz betrug 10 kHz bei einer Abtastfrequenz von 100 kHz. Das gefilterten Signale werden über eine A/D-Wandlerkarte (Dalanco Spry Model 250, Dalanco, Rochester, USA) digitalisiert, in einen PC übertragen und auf der Festplatte gespeichert. Zur Steuerung des A/D-Wandlers wurde für excised-patch Messungen das Programm sampl250 (Arbeitsgruppe Biophysik, Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Kiel) benutzt, das den Stromverlauf und die bei den Messungen anliegende



**Abbildung 18:** Spannungsprotokoll für whole-cell Messungen.

Spannung aufgezeichnete. Für whole-cell Messungen wurde das Programm DACQ-Manager V 0.1 (Dalanco) benutzt, mit dem neben der Aufnahme der gemessenen Spannungen mit einer Samplefrequenz von 40 kHz das Anlegen von Spannungsprotokollen aus entsprechenden Dateien möglich war. Die Dateien mit den Protokollen wurden mit einem einfachen C-Programm erstellt. Es wurde ein treppenförmiges Spannungsprotokoll verwendet, das in Abb. 18 skizziert ist.

#### 4.4.3 Auswertung der Patch-Clamp Daten

Abhängig von der Patch-Clamp Konfiguration wurde unterschiedliche Software zur Visualisierung und quantitativen Auswertung der aufgezeichneten Daten eingesetzt.

##### 4.4.3.1 Einzelkanalmessungen in excised patch Konfigurationen

Zur Auswertung der aufgenommenen Zeitreihen in den excised-patch Konfigurationen outside-out und inside-out wurde das Programm Day<sup>9</sup> (Arbeitsgruppe Biophysik, Zentrum für Molekularbiologie, Universität Kiel) benutzt. Diese Software ermöglichte es, aus der aufgenommenen verrauschten Zeitreihe eine ideale, d.h. rauschfreie Zeitreihe zu rekonstruieren und daraus die Offenwahrscheinlichkeit für einen Ionenkanal zu berechnen. Dazu

<sup>9</sup> Es wurde die Software in der Version 1.0.2 für das Betriebssystem Linux benutzt.

musste zunächst interaktiv die Nulllinie, also das Niveau, bei dem kein Strom durch den Patch floss und die Kanäle also geschlossen waren, und die Lage der Stromniveaus bei geöffneten Kanälen festgelegt werden. Um die ideale Zeitreihe zu rekonstruieren, wurden mit dem Hinkley–Detektor achter Ordnung die Stromsprünge beim Öffnen und Schließen der Kanäle detektiert und die Sprungzeitpunkte rückwirkend festgelegt [38][165]. Das Funktionsprinzip ist in der Diplomarbeit [158] und den entsprechenden Originalarbeiten detailliert beschrieben. Der Hinkley–Detektor berechnet die Gesamtzahl der Messpunkte pro Stromniveau, die Verweildauerhistogramme und die Übergangs–Matrix, deren Elemente  $k_{ij}$  die Häufigkeit der Sprünge von einem Niveau  $i$  zu einem Niveau  $j$  angeben. Aus der Gesamtzahl der Messpunkte in jedem Niveau und der Gesamtmessdauer wird dann die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle berechnet, die angibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit sich ein bestimmter Kanal zu einer bestimmten Zeit  $t$  in einem offenen Zustand befindet. Die Offenwahrscheinlichkeit  $p_{\text{offen}}$  lässt sich dann unter Ausnutzung der Binominalverteilung berechnen [57]:

$$p_i = \binom{N}{i} (1 - p_{\text{offen}})^{N-i} p_{\text{offen}}^i$$

mit  $N = \text{Anzahl der Kanäle}$

$i = \text{Anzahl der offenen Kanäle im Niveau}$

$p_i = \text{Besetzungswahrscheinlichkeit des Niveaus } i$

$p_{\text{offen}} = \text{Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals.}$

Bei den excised–patch Messungen wurde davon ausgegangen, dass die Zahl der Kanäle während der Messung konstant war, dass also weder Kanäle neu exprimiert wurden noch lateral in den Patch diffundierten. Damit ergab sich als minimale Anzahl der Kanäle in einem Patch die maximale Zahl an Kanälen, die in einer Zeitreihe innerhalb einer Messreihe gefunden wurde.

Die weitere Verarbeitung der Messwerte (grafische Darstellung, Korrektur der Offenwahrscheinlichkeit für die gesamte Messreihe) wurde mit den Programmen `pc-plot` und `Origin6` (Microcal, USA) durchgeführt.

Zur weiteren kinetischen Beschreibung des Schaltens des Kanals wurde dieses mit einem Hidden-Markov-Modell analysiert [100]. In diesem Modell wird der Kanal durch eine Anzahl von Zuständen  $Q_i$  mit den zugehörigen Besetzungswahrscheinlichkeiten  $q_i(t)$  beschrieben, die mit den Übergangsraten  $k(ij)$  ineinander übergehen können. Die Zustände können dabei einem geschlossenen oder geöffneten Status des Kanals entsprechen. Mit den Voraussetzungen, dass die Übergangsraten von der Vorgeschichte des Systems unabhängig sind und der Linearität des Systems, lässt sich in diesem Modell ein System vollständig durch eine Differentialgleichung erster Ordnung beschreiben:

$$\frac{d\mathbf{q}(t)}{dt} = \mathbf{K} \cdot \mathbf{q}(t)$$

Dieses Gleichungssystem wird gelöst durch:

$$\mathbf{q}(t) = \mathbf{q}(0) \cdot \exp(\mathbf{K} \cdot t) \quad ,$$

wobei der Vektor  $\mathbf{q}(t)$  die Besetzungswahrscheinlichkeiten der möglichen Zustände des Kanals und die Matrix  $\mathbf{K}$  die Übergangsraten  $k(ij)$  von einem Zustand  $Q_i$  zu einem Zustand  $Q_j$  enthält.

Auf Grundlage dieses Modells wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Programm `downhill` (Arbeitsgruppe Biophysik, ZBM, Universität Kiel) durch einen direkten Zeitreihenfit mittels Minimierung der Maximumlikelihood durch einen Simplexalgorithmus die Übergangsmatrix  $\mathbf{K}$  bestimmt [5]. Zur Beschreibung des Schaltens des MaxiK-Kanals wurde dabei ein Modell mit zwei geschlossenen Zuständen gewählt:  $C=O=G$ . Der Zustand C repräsentiert die inaktiven Phasen des Kanals zwischen den Bursts erhöhter Kanalaktivität und

der Zustand G das kurze Schliessen des Kanals während der Bursts. Von beiden geschlossenen Zuständen ist der Übergang in den offenen Zustand O möglich.

#### 4.4.3.2 *Whole-Cell Messungen*

Zur Auswertung wurden den aufgezeichneten Rohdaten mit den Programmen `dacq2asc` und `dacq2dat` zunächst zum Import in die entsprechende Auswertungssoftware konvertiert. Zur Ansicht und Aufbereitung für eine grafischen Darstellung der Daten wurde das Programm `wholeplot` benutzt, ein in Perl/Tk geschriebenes Frontend zu `gnuplot` (open source Software). Zur Erstellung von U/I-Kurven aus den Daten wurde das Programm `Analysis v.0.98` (Dept. of Physiology, UCLA, USA) sowie `Origin6` benutzt.

Die verschiedenen Patch-Clamp Versuche sind mindestens dreimal wiederholt worden, wenn nichts anderes im Text vermerkt ist. Bei den dargestellten Ausschnitten aus den Zeitreihen handelt es sich um typische Daten für die entsprechende Versuchsreihe. Bei den dargestellten Offenwahrscheinlichkeiten und Übergangsraten wurden die Daten, die in mehreren Messdurchgängen an einem Patch gewonnen wurden, gemittelt.

## 4.5 Weitere physikalische Methoden

### 4.5.1 *Fluoreszenzspektroskopische Resonanz-Energie-Transfer Messungen (FRET)*

Die FRET-Methode wird verwendet, um den Einbau von Substanzen in Lipidliposomen nachzuweisen [199]. Dazu wurden Liposomen mit verschieden farbstoffmarkierten

Lipiden hergesellt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass eingestrahktes Licht der Wellenlänge  $\lambda_1 = 470$  nm zu einer Anregung des Farbstoffs NBD (Molecular Probes, Leiden, NL), im folgenden als Donor bezeichnet, führt. Aus diesem Grundzustand kann es entweder zu einer Fluoreszenzemission mit einer Wellenlänge von  $\lambda_2 = 531$  nm oder zu einem Übertrag der Anregungsenergie auf den Farbstoff Rh (Akzeptor), der dann Licht mit einer Wellenlänge von  $\lambda_3 = 593$  nm emittiert. Die Intensität des Energietransfers hängt dabei in einem Bereich von 1 bis 10 nm von der räumlichen Entfernung der beiden Farbstoffmoleküle ab. Bei dem Einbau unmarkierter Substanzen in die Liposomen vergrößert sich der Abstand von Donor und Akzeptor: Der Energietransfer sinkt, und es steigt die Intensität des Donorsignals an. Die Messungen wurden an einem Spektrometer (Fluorolog F1 T11, Spex, Edison, USA) durchgeführt. Die Phosphatidylserin (PS)-Liposomen wurden in *phosphate buffered saline*-Puffer, kurz PBS, präpariert. Details dazu und zur Durchführung der Messungen siehe z.B. [62].

#### 4.5.2 Massenspektrometrie

Die chemische Struktur, insbesondere die Acylierungsmuster der verwendeten Endotoxine wurde massenspektrometrisch überprüft. Die Messungen wurden mit einem MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption time-of-flight*) Massenspektrometer (Bruker-Reflex III, Bruker-Franzen Analytik, Bremen) durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden die gelösten, zu analysierenden Substanzen in einer Mischung mit DHB (*2,5-Dihydroxybenzoe Säure*, Aldrich, Steinheim), gelöst in Methanol mit Trifluoressigsäure und Acetonitril, auf den Probensteller aufgebracht. Nach dem Abdampfen der Lösungsmittel liegt eine Matrix vor, aus der durch Beschuss mit einem Stickstofflaser ( $\lambda = 337$  nm) geladene Pro-

---

benfragmente freigesetzt werden, die im elektrischen Feld ( $U_{\text{Beschleunigung}} \geq 20 \text{ kV}$ ) beschleunigt werden. Anhand der Flugzeit der Fragmente läßt sich deren Verhältnis  $m/e$  bestimmen und ihre Masse ermitteln.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die experimentellen Ergebnisse vorgestellt und im Detail diskutiert. Im anschließenden 6. Kapitel folgt dann eine übergreifende zusammenfassende Diskussion.

Es werden zunächst die ersten Patch-Clamp Messungen an CHO-Zellen mit dem rekonstituierten humanen MaxiK-Kanal dargestellt. Es folgen die Ergebnisse der Patch-Clamp Experimente zur Aktivierbarkeit des Kanals in humanen Blutmakrophagen durch lösliches Peptidoglycan aus der Membran Gram-positiver Bakterien und durch das Zytokin IL-1. An diese Ergebnisse schließen Experimente an, die einen Beitrag zur Aufklärung der Mechanismen der Kanalaktivierung durch diese Substanzen leisten sollen.

Parallel zu den elektrophysiologischen Messungen wurde zum einen der Einfluss von MaxiK-Kanalaktivatoren auf die Zellaktivierung untersucht. Neben der TNF $\alpha$ -Freisetzung wurde dabei auch der Einfluss auf intrazelluläre Signalkaskaden betrachtet. Zum anderen wurde die Wirkung von Kanalblockern auf die Zellaktivierung durch Virulenzfaktoren und IL-1 untersucht. Ergänzend zu den Messungen zum Einfluss der Blocker auf die Zytokin-freisetzung nach Stimulation mit Pathogen-assoziierten Substanzen wurde der Einfluss der Blocker auf verschiedene intrazelluläre Signalwege untersucht.

Abschließend werden Untersuchungen zur Rolle des MaxiK-Kanals bei der Zellaktivierung in humanen MNC und in verschiedenen murinen Zellen vorgestellt.

## 5.1 Patch–Clamp Messungen in Zelllinien mit dem rekonstituierten MaxiK–Kanal

Bei den Patch–Clamp Versuchen an humanen Blutmakrophagen traten mehrere Schwierigkeiten auf, die durch die Rekonstitution des MaxiK–Kanals in Zelllinien umgangen werden sollten:

- Die Verfügbarkeit der Zellen war dadurch begrenzt, dass immer ein Blutspender zur Verfügung stehen musste. Die Gewinnung der Zellen aus dem Spenderblut war relativ zeitaufwändig, die Zeit, die die isolierten MNC zur Ausdifferenzierung zu Makrophagen brauchten, mindestens sechs Tage, erschwerte eine flexible Versuchsplanung.
- Der Zustand der kultivierten Zellen schwankte von Woche zu Woche mitunter stark. Zudem war bzgl. des Aktivierungszustands der Zellen und damit der Sensitivität gegenüber bakteriellen Virulenzfaktoren von einer Spenderabhängigkeit auszugehen. Insbesondere zeigte sich von Charge zu Charge eine schwankende Expression und Aktivität der untersuchten Ionenkanäle. Des Weiteren unterscheiden sich die Primärzellen auch in ihrem Differenzierungsgrad, so dass die Expression und Funktion einzelner Proteine von Zellen zu Zellen differieren kann.
- Es war nur schwer möglich, an den humanen Makrophagen Patch–Clamp Messungen in der whole–cell Konfiguration durchzuführen. Kam es zu guter Seal–Bildung in dieser Konfiguration, waren die Patche in der Regel nicht lange genug stabil, um den Einfluss von zugegebenen Agenzien auf die Kanäle zu untersuchen. Whole–cell Messungen haben im Vergleich zu excised Patch Messungen den Vorteil, dass der Einfluss von Substanzen auf alle Kanäle in einer Zelle gemessen werden kann und nicht nur auf eine kleine Zahl von Kanälen in einem excised Patch, was statistische Effekte also minimieren sollte.

Durch die Transfektion des MaxiK-Kanals in CHO- und HEK-Zellen sollten diese Schwierigkeiten umgangen werden. Diese Zellen werden in Kultur gehalten und stehen praktisch in beliebiger Zahl und im Prinzip jederzeit zur Verfügung. Eine Spenderabhängigkeit kann ausgeschlossen werden, und es kann von einer insgesamt homogeneren Qualität der Zellen ausgegangen werden. Der wesentliche Vorteil dieser Rekonstitutionssysteme gegenüber Primärzellen liegt zudem darin, dass durch die gezielte Kotretransfektion eines Rezeptors z.B. CD14 mit dem MaxiK-Kanal auf der Zelloberfläche exprimiert werden kann, was die Untersuchung eines möglichen Zusammenwirkens des MaxiK-Kanals mit Proteinen des Signaltransduktionsapparates systematisch ermöglichen könnte.

Als Rekonstitutionssysteme wurden HEK-Zellen und verschiedene Klone von CHO-Zellen gewählt, die beide häufig als Rekonstitutionssystem für Ionenkanäle zu elektrophysiologischen Untersuchungen verwendet werden. Beide Zellsysteme wurden entweder mit der  $\alpha$ -Subunits oder mit der  $\alpha$ - und der  $\beta_4$ -Subunit des humanen MaxiK-Kanals transfiziert.

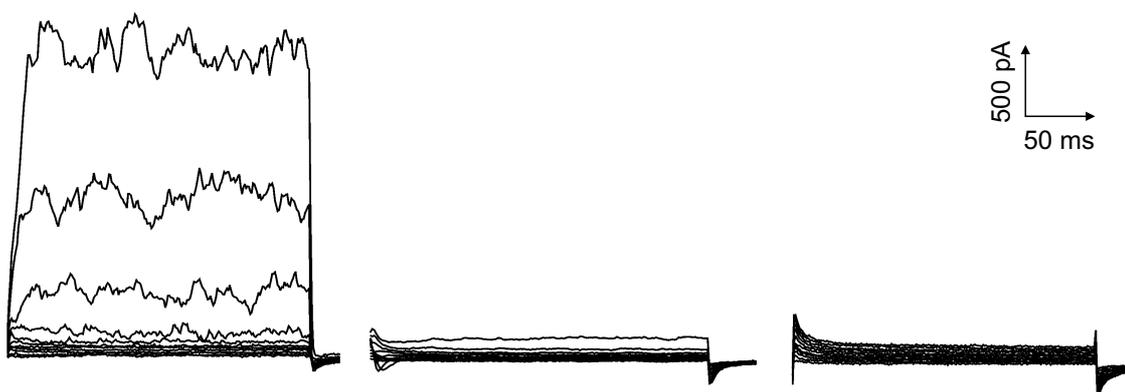
### 5.1.1 Zur Wahl der $\beta$ -Subunit

Da bisher keine molekularbiologischen Untersuchungen zur Identifikation der  $\beta$ -Subunit des MaxiK-Kanals in humanen Blutmakrophagen veröffentlicht sind und die Etablierung der benötigten Techniken den Rahmen dieser Arbeit überschritten hätte, wurde anhand der pharmakologischen Charakterisierung und der Eigenschaften des Schaltverhaltens des Kanals in Makrophagen versucht, die  $\beta$ -Subunit zu charakterisieren und für die Transfektion in Zelllinien auszuwählen. Wie in der Diplomarbeit [158] und in der Dissertation von R. Blunck [16] gezeigt, konnte der MaxiK-Kanal in Blutmakrophagen durch den selektiven MaxiK-Kanalblocker Iberitoxin nur in relativ hohen Konzentrationen von über 50 nM ge-

blockt werden. Für eine Blockade durch Charybdotoxin mussten effektive Konzentrationen von 100 nM und mehr eingesetzt werden. Verglichen mit Literaturdaten ist dies für diesen hocheffizienten Wirkstoff eine sehr hohe Konzentration, so dass der vorliegende Kanal als relativ unsensitiv für diese beiden MaxiK–Blocker angesehen werden konnte. Dies deutete darauf hin, dass in Markophagen eine Subunit des Types  $\beta_1$  oder  $\beta_4$  vorliegen könnte (siehe Tab. 2). Für die Transfektion wurde die humane  $\beta_4$ –Subunit (human KCNMB4) ausgewählt.

### 5.1.2 CHO–Zellen mit dem MaxiK–Kanal

In CHO Wildtyp–Zellen (CHO–K1) sind drei  $K^+$ –Kanäle beschrieben [171]. In Messungen an diesen Zellen fand S. Roes aus unserer Arbeitsgruppe im Vergleich zu transient mit der  $\alpha$ –Subunit des humanen MaxiK–Kanals transfizierten Zellen nur ein unregelmäßiges und zu vernachlässigendes Auftreten dieser originären Ströme [153]. Auch in whole–cell Messungen an den CHO–K1–Zellen konnte kein nennenswerter  $K^+$ –Strom nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 19:** Einfluss der Kanalblocker TEA (30 mM, mitte) und Paxilline (20 μM, rechts) auf den whole–cell–Strom durch den MaxiK–Kanal in CHO( $\alpha/\beta_4$ )–Zellen. Links: Kontrolle ohne Kanalblocker. Die Blocker wurden ca. 5 min vor den Messungen in die Badlösung gegeben.

Zur Rekonstitution des Kanals wurde der Klon 3E10 gewählt. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um einen Klon, der durch die Transfektion von humanem CD14 LPS-sensitiv ist (siehe 4.1.2). Es wurden sowohl Zellen mit der humanen  $\alpha$ -Subunit, CHO( $\alpha$ -) und der  $\alpha$ - und  $\beta_4$ -Subunit, CHO( $\alpha/\beta_4$ ) hergestellt. Von jedem Zelltyp wurde jeweils ein Klon mit dem funktionalen Kanal in Kultur übernommen. Da an CHO-Zellen nur mit der  $\alpha$ -Subunit schon umfangreiche Untersuchungen durchgeführt worden waren [153], konzentrierten sich die Patch-Clamp Versuche mit diesen Zellen auf den Klon 4E1, der beide Subunits des humanen Kanals heterolog exprimiert. In Abb. 19 ist eine typische Patch-Clamp Messung in der whole-cell Konfiguration an diesen Zellen zu sehen. Die Inkubation der Zellen vor der Messung mit den Kanalblockern TEA (30 mM) bzw. Paxilline (20  $\mu$ M) führte zu einer nahezu kompletten Inhibierung des  $K^+$ -Stroms durch die Zellen.

Allerdings traten bei diesem Klon zwei Probleme auf, die die Nützlichkeit dieser Zellen stark beeinträchtigten: Die Expression der Kanäle nahm nach mehrfachem Passagieren der Zellen deutlich ab, was es notwendig machte, regelmäßig neue Zellen aus der Stammpopulation aufzutauen und anzuziehen. Ein weiteres Problem lag in der unerwartet hohen Schwankung der Expressionsdichte auf der Zelloberfläche. In der excised outside-out Konfiguration konnte bei Zellen aus der gleichen Petrischale, also bei exakt gleichen Kulturbedingungen, eine Schwankungsbreite der Zahl der Kanäle im Patch bei gleichen Messbedingungen von 2 bis zu 6 Kanälen gefunden werden. In Patchen aus anderen Chargen konnten zum Teil über 10 Kanäle in einem Patch gefunden werden. Dieses Phänomen stellte zwar nur eine geringe Beeinträchtigung bei der Untersuchung der Wirkung von Kanalblockern auf die Kanäle dar; um jedoch den Einfluss von möglichen Kanalaktivatoren oder gar eine Inhibierung der Aktivierung durch verschiedene Antagonisten eindeutig zu bestimmen, war es daher notwendig,

direkt nach der Kontrollmessung den zu untersuchenden Wirkstoff zu der Zelle in die Petri-schale zu applizieren und dann am selben Patch einen Einfluss auf den  $K^+$ -Strom zu messen. Es war nicht möglich, Zellen mit Wirkstoffen vorzuinkubieren, was eine deutlich höhere Ausbeute an verwertbaren Messungen bedeutet hätte, da die Zugabe von Wirkstoffen bzw. ihre Einwirkzeit von einigen Minuten oft die Zerstörung des Gigaseals zur Folge hatte.

### 5.1.3 HEK-Zellen mit dem MaxiK-Kanal

HEK-Zellen verfügen normalerweise über keine MaxiK-Kanäle und exprimieren an ihrer Oberfläche auch kein CD14 oder TLR4/MD-2. Somit bieten sich diese Zellen besonders an, durch sinnvoll gewählte Kotransfektion dieser und weiterer Proteine ihr Zusammenwirken bei der Signaltransduktion zu untersuchen. Zudem eignen sich HEK-Zellen besonders gut für Patch-Clamp Messungen.

Es wurden HEK-Zelllinien stabil mit der  $\alpha$ -Subunit und der  $\alpha$ - und  $\beta_4$ -Subunit des humanen MaxiK-Kanals hergestellt. In whole-cell Patch-Clamp Messungen zeigte sich, dass die Transfektion auch in diesen Zellen zu einer Expression der funktionalen Kanäle führte (Daten nicht gezeigt).

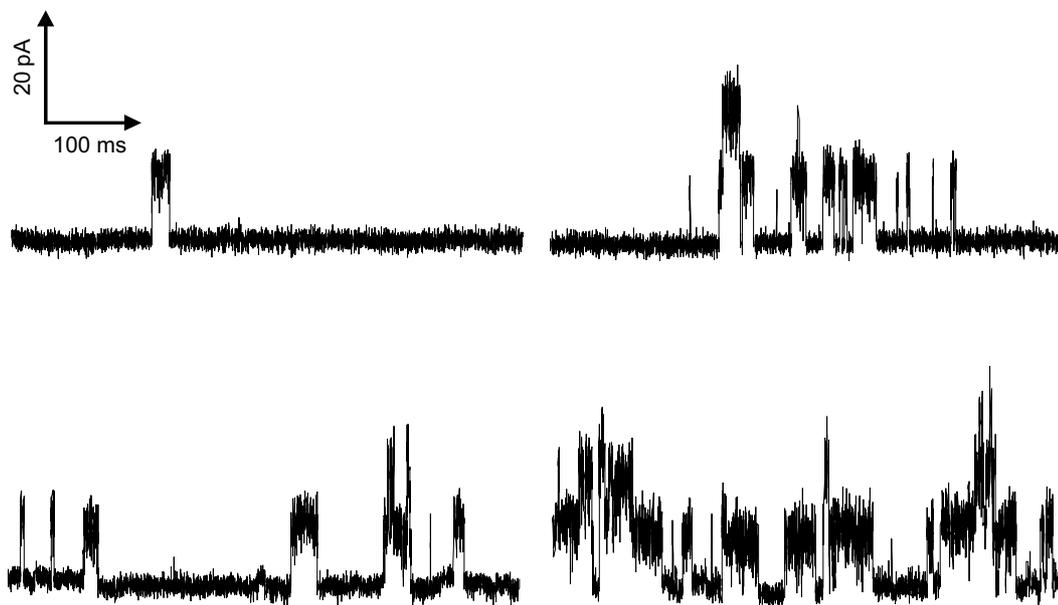
Um HEK-Zellen herzustellen, die über CD14, TLR4/MD-2 und den MaxiK-Kanal verfügten, wurde versucht, eine HEK-Zelllinie mit CD14 und TLR4/MD-2 transient mit der GFP-markierten  $\alpha$ - und der  $\beta_4$ -Subunit des Kanals zu transfizieren. Diese Versuche zeigten bisher jedoch keinen Erfolg, sodass Experimente mit solchen Zellen bisher nicht durchgeführt werden konnten.

Im Vergleich zu den ausdifferenzierten Blutmakrophagen erwiesen sich trotz der oben geschilderten Probleme bisher insbesondere die CHO-Zellen als das besser zu handhabende

System. Es ist, wenn die Zellen in Kultur vorliegen, eine deutlich flexiblere Versuchsplanung möglich. Patch-Clamp Messungen können in sämtlichen Konfigurationen vorgenommen werden. Mit der Etablierung dieses Systems und ersten Messungen mit LPS und IL-1 (siehe 5.1.4 und 5.2.2) ist damit ein wichtiger Schritt getan, um das Zusammenwirken des MaxiK-Kanals und weiteren Proteinen des Signaltransduktionsapparates untersuchen zu können.

### 5.1.4 Einfluss von LPS auf die Aktivität des rekonstituierten MaxiK-Kanals

Nach der Rekonstitution des MaxiK-Kanals in den CHO-Zellen wurde untersucht, ob durch die extrazelluläre Zugabe von LPS ein Einfluss auf die Aktivität des Kanals zu beobachten war. In Wildtyp-CHO-Zellen mit der transient transfizierten  $\alpha$ -Subunit des humanen MaxiK-Kanals konnte durch extrazelluläre Zugabe von bis zu 750 ng/ml LPS — das stellt eine ausgesprochen hohe LPS-Konzentration dar: Immunzellen reagieren auf Konzen-



**Abbildung 20:** Ausschnitt aus Zeitreihen eines outside-out Patches von CHO( $\alpha/\beta_4$ )-Zellen bei einem Membranpotential von 70 (links) bzw. 90 mV (rechts). Oben: Kontrollmessung; unten: nach Zugabe von LPS (50 ng/ml). Die Pipettenlösung enthielt 5 mM EGTA.

trationen  $\leq 1$  ng/ml, eine Aktivierung des MaxiK-Kanals in humanen Makrophagen kann bei 5 ng/ml LPS beobachtet werden — kein Einfluss auf die Aktivität des Kanals festgestellt werden [153]. Im Gegensatz zu diesen Zellen exprimierten die CHO 3E10-Zellen mit dem Kanal jedoch humanes CD14 und Hamster-TLR4, sodass möglicherweise über diese Moleküle vermittelt ein Einfluss von LPS auf den Kanal denkbar war.

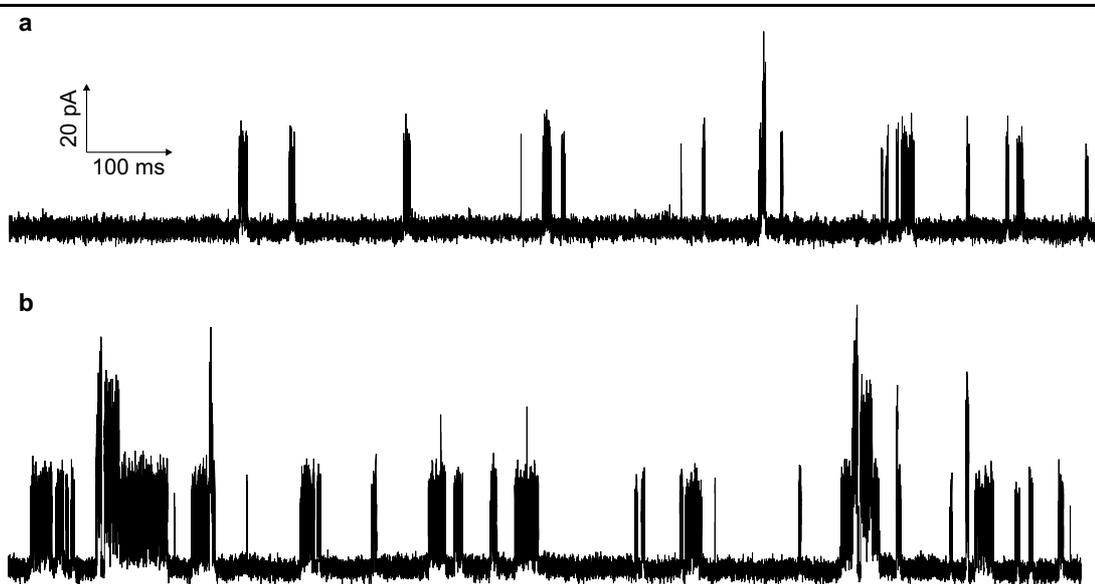
Während sich bei Messungen in der whole-cell Konfiguration kein Hinweis auf eine Aktivierung der Zellen durch 200 ng/ml LPS Messungen ergaben, führte in zwei Messungen in der outside-out Konfiguration die Zugabe von LPS zu einer Steigerung der Aktivität des Kanals (Abb. 20). In vier weiteren Messungen war jedoch bei 200 ng/ml LPS keine MaxiK-Aktivierung des Kanals zu beobachten, wohl aber bei einer Messung nach der auf die LPS-Zugabe folgenden Applikation des MaxiK-Kanalaktivators NS 1608 (20  $\mu$ M). Weitere Versuche zur genaueren Klärung eines reproduzierbaren Einflusses von LPS auf den rekonstituierten Kanal in diesen Zellen sind daher zur Klärung dieser Frage noch durchzuführen.

## 5.2 Aktivierung des MaxiK-Kanals durch Peptidoglycan und Interleukin-1

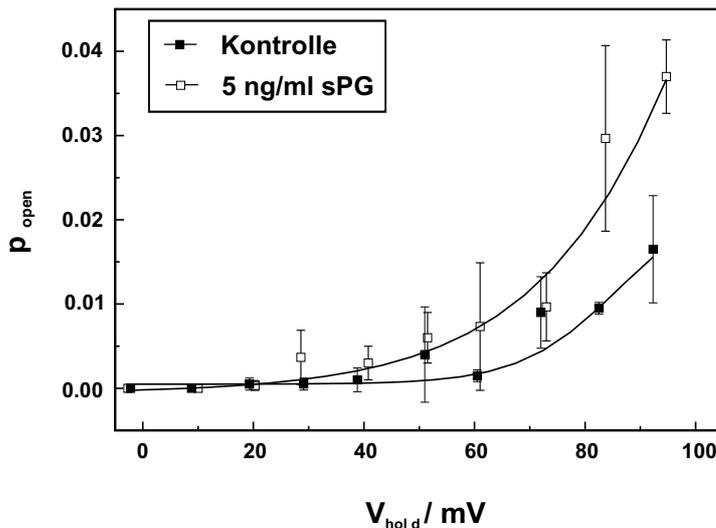
Es stellte sich die Frage, ob auch andere Aktivatoren der Zellantwort von Makrophagen außer endotoxisch aktiver Endotoxine Gram-negativer Bakterien zu einer Aktivierung des MaxiK-Kanals führen. Daher wurde untersucht, welchen Einfluss zum einen Peptidoglycan, der Hauptbestandteil der äußeren Hülle Gram-positiver Bakterien und Ligand des TLR2 und zum anderen das Zytokin IL-1, welches über den IL-1-Rezeptor vermittelt Immunzellen aktiviert [51][157], auf die Aktivität des MaxiK-Kanals hatten.

### 5.2.1 MaxiK-Aktivierung durch sPG

Um die Wirkung von PG auf den MaxiK-Kanal in humanen Makrophagen zu untersuchen, wurde es in gelöster Form (sPG) wie beschrieben an outside-out Patche von Makrophagen appliziert. Die Endkonzentration im Bad betrug  $5 \mu\text{M}$ , was der Menge entsprach, mit der humanen Immunzellen durch sPG aktiviert werden können. Wegen der geringen Menge an zur Verfügung stehender Substanz konnte keine Bestimmung einer Dosis-Wirkungs-Relation durchgeführt werden. Parallel zu den Patch-Clamp Experimenten wurde in humanen ausdifferenzierten Blutmakrophagen der Einfluss der Kanalblocker TEA und Paxilline auf die sPG-induzierte Zytokinfreisetzung untersucht. Bei outside-out Patchen der Zytoplasmembran humaner Blutmakrophagen war nach Zugabe von sPG eine Erhöhung der Aktivität des MaxiK-Kanals im Vergleich zu den Kontrollmessungen zu beobachten. Diese Aktivierung bedeutete eine deutliche Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit (siehe Abb. 22). Im Zytokinassay zeigte sich, dass humane Makrophagen durch die Zugabe von sPG in einem Konzen-



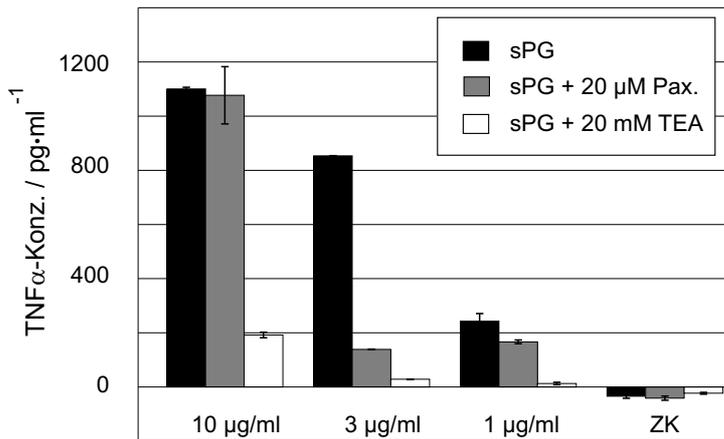
**Abbildung 21:** Ausschnitte aus Zeitreihen eines outside-out Patches der Zytoplasmembran humaner Makrophagen in Abwesenheit (a) und Anwesenheit (b) von  $5 \mu\text{M}$  sPG. Das angelegte Membranpotential war  $V_{\text{hold}} = 80 \text{ mV}$ . In der Pipettenlösung befanden sich  $5 \text{ mM}$  EGTA, was  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} \leq 10^{-9} \text{ M}$  bedeutete.



**Abbildung 22:** Offenwahrscheinlichkeit  $p_{\text{open}}$  des MaxiK-Kanals in einem outside-out Patch aus der Membran von humanen Blutmakrophagen in Abhängigkeit vom angelegten Membranpotential  $V_{\text{hold}}$ .

trationsbereich von 1 bis 10  $\mu\text{g/ml}$  konzentrationsabhängig zur Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert werden konnten (Abb. 23). Diese Aktivierung der Zellen konnte durch die Zugabe von Blockern des MaxiK-Kanals vor der Stimulation mit sPG inhibiert werden. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, führte sowohl der unspezifische Kanalblocker TEA (20 mM) als auch der spezifische Blocker Paxilline (20  $\mu\text{M}$ ) zu einer deutlichen Senkung der ausgeschütteten  $\text{TNF}\alpha$ -Menge im Vergleich zu den stimulierten Zellen ohne zugegebene Kanalblocker. Sowohl bei den Patch-Clamp Daten als auch bei den Zellkulturexperimenten ist zu bedenken, dass sPG im Vergleich zu LPS in deutlich größeren Mengen appliziert werden musste, um vergleichbare Effekte auf die Aktivierung des MaxiK-Kanals bzw. die Zellaktivierung hervorzurufen.

Vergleicht man die chemische Struktur von LPS (Abb. 5, Seite 14) und sPG (Abb. 4, S.13), dann fällt auf, dass sPG über keine ausgeprägte hydrophobe Domäne verfügt, wie LPS mit dem Lipid A-Teil. Eine Membraninterkalation und eine direkte membranvermittelte Kanalmodulation wie für LPS angenommen, erscheint daher unwahrscheinlich. Auch besteht bisher keine Vorstellung darüber, wie die Aktivität von sPG mit dem Konformationsmodell



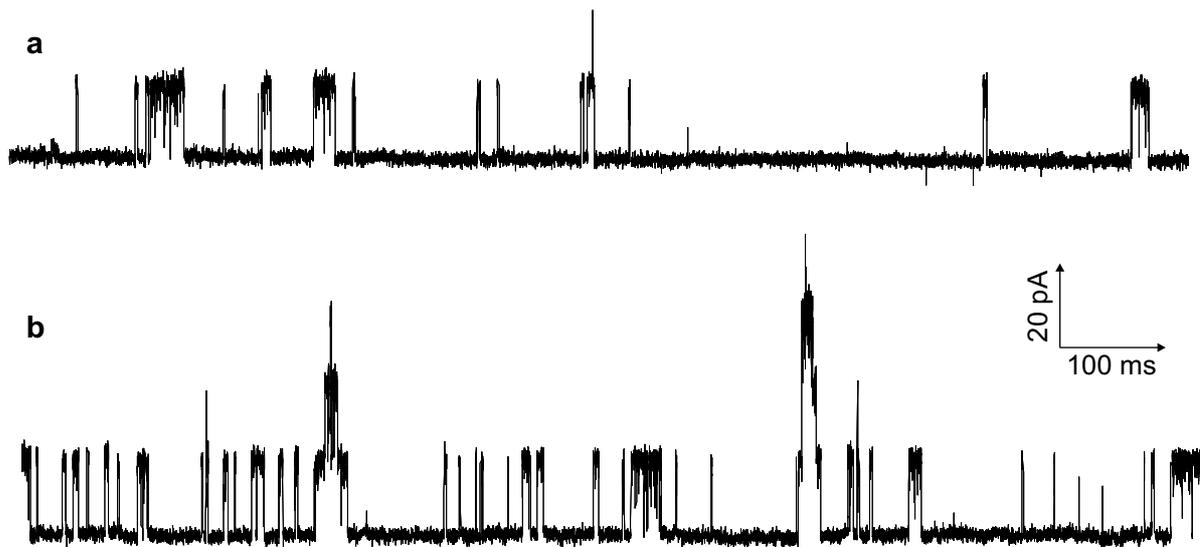
**Abbildung 23:** Einfluss der Kanalblocker Paxilline und TEA auf die sPG-induzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung aus humanen Blutmakrophagen.

für LPS (Kap. 2.2.2) in Einklang zu bringen ist. Beide Virulenzfaktoren triggern als Liganden verschiedener TLR aber ähnliche intrazelluläre Signalpfade, so dass hier möglicherweise ein gemeinsamer Mechanismus für die Kanalaktivierung zu suchen ist.

In Untersuchungen an Microglia haben Prinz et al. [145] festgestellt, dass durch Zellwandbestandteile Gram-positiver Bakterien (PCW) ein auswärtsgerichteter K<sup>+</sup>-Strom und die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine induziert wurde. Beide Effekte ließen sich auch durch IFN $\gamma$  und LPS Gram-negativer Bakterien hervorrufen. Dabei war die Aktivierung durch LPS CD14- und LBP-abhängig, nicht jedoch die durch PCW. Ein Inhibitor der ERK-Phosphorylierung führte zwar zu einer Blockade der PCW-induzierten Zytokinausschüttung, nicht jedoch des K<sup>+</sup>-Stroms, was darauf hindeutete, dass der auftretende Kanal nicht über diese MAPK moduliert wurde.

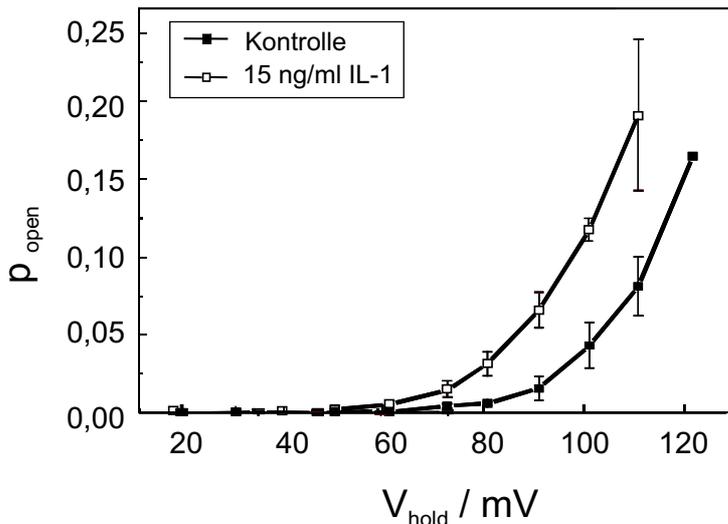
### 5.2.2 MaxiK-Aktivierung durch Interleukin-1

Nachdem nach der Aktivierung des Kanals durch den TLR4-Liganden LPS auch die Aktivierbarkeit des MaxiK-Kanals durch den TLR2-Liganden sPG gezeigt war, stellte sich nun die Frage, ob die Kanalaktivierung generell mit einer Zellaktivierung über Rezeptormoleküle mit der TIR-Domäne korreliert ist. Daher wurde in Patch-Clamp Experimenten an



**Abbildung 24:** Zeitreihenausschnitte eines outside-out Patches von humanen Makrophagen bei einem Membranpotential von 90 mV in Abwesenheit von IL-1 (a) oder Anwesenheit von 15 ng/ml IL-1 (b). Durch eine EGTA-Konzentration von 5 mM in der Pipettenlösung war deren Gehalt an freiem  $\text{Ca}^{2+} \leq 10^{-9}$  M.

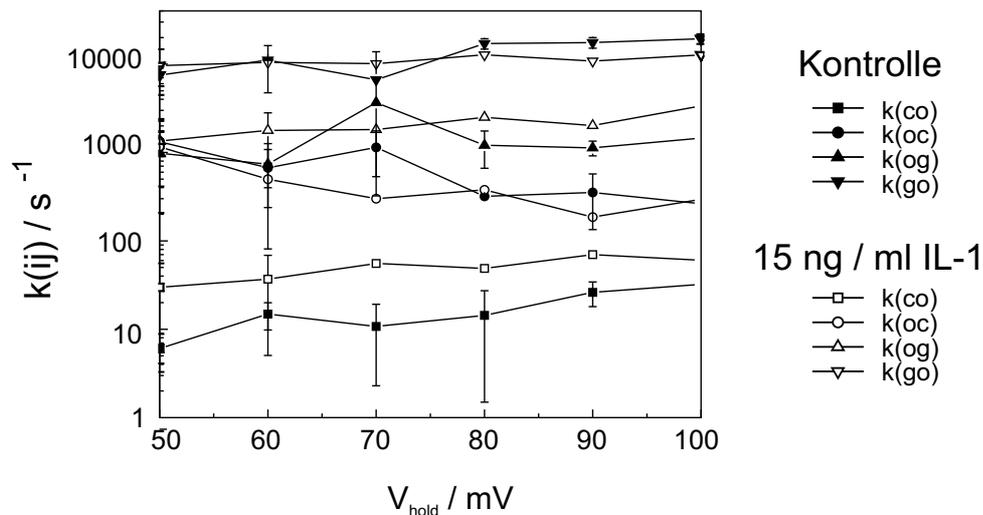
outside-out Patchen von humanen Blutmakrophagen untersucht, ob auch durch die Applikation des Zytokins IL-1 eine Aktivierung des MaxiK-Kanals erfolgt. Analog zu den Experimenten mit sPG wurde auch hier parallel der Einfluss der Kanalblockade durch TEA und Paxilline auf die IL-1-induzierte Zellaktivierung mittels  $\text{TNF}\alpha$ -Bestimmung untersucht. In 3E10-CHO-Zellen, die sehr sensitiv auf IL-1 reagieren und die mit dem humanen MaxiK-Kanal transfiziert waren, wurde in Patch-Clamp Experimenten ebenfalls der Einfluss von IL-1 auf den MaxiK-Kanal untersucht.



**Abbildung 25:** Einfluss von IL-1 auf die Offenwahrscheinlichkeit  $p_{\text{open}}$  des MaxiK-Kanals in humanen Makrophagen in Abhängigkeit vom Membranpotential  $V_{\text{hold}}$  in einem outside-out Patch ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} \leq 10^{-9} \text{ M}$ ).

Es zeigte sich, dass IL-1 in einer Konzentration von  $\geq 10 \text{ ng/ml}$  zu einer reproduzierbaren Aktivierung des MaxiK-Kanals in outside-out Patches bei humanen Blutmakrophagen führte. In Abb. 24 ist anhand der gezeigten Ausschnitte aus den aufgezeichneten Zeitreihen ein deutlicher Anstieg der Aktivität der Kanäle in dem Patch nach Zugabe des IL-1 im Vergleich zur Kontrollmessung zu erkennen. Diesem Anstieg entsprach eine deutlich erhöhte Offenwahrscheinlichkeit  $p_{\text{open}}$  (Abb. 25). Eine Verstärkung der Kanalaktivität durch IL-1 war nicht nur bei einer zytosolischen Lösung in der Pipette mit einer Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+} \leq 10^{-9} \text{ M}$  zu beobachten, sondern auch bei einer höheren Konzentration freien  $\text{Ca}^{2+}$  ( $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ ). Es konnten keine umfangreichen Untersuchungen zu einer Konzentrationsabhängigkeit der Aktivierung des MaxiK-Kanals unternommen werden. Bei den Messungen, die zu dieser Fragestellung durchgeführt wurden, hielten die Patches nicht so lange, dass nach der Zugabe eine höheren IL-1-Menge eine Bestimmung der Kanalaktivität möglich gewesen wäre.

In den Ausschnitten aus den Zeitreihen (Abb. 24) lässt sich erkennen, dass nach der Zugabe von IL-1 die Aktivität des MaxiK-Kanals insgesamt höher schien. Die Pausen zwischen den

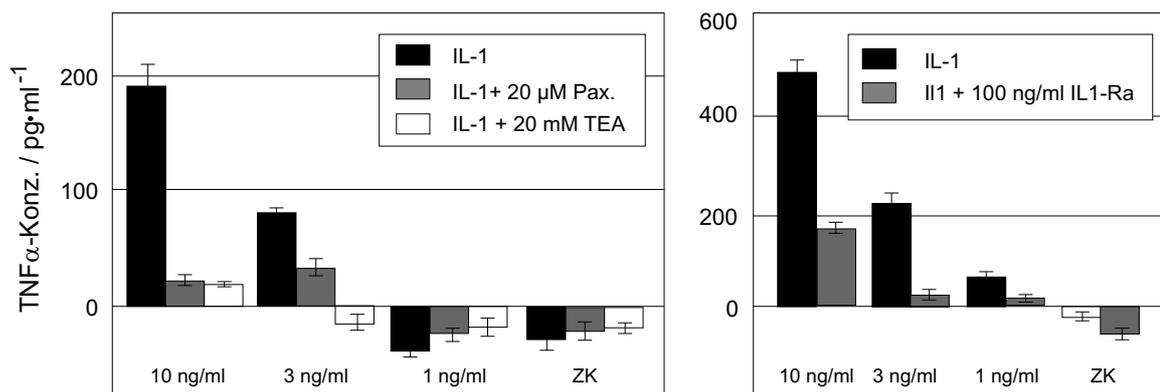


**Abbildung 26:** Einfluss von IL-1 auf die Übergangsraten  $k(ij)$  des MaxiK-Kanals in einem outside out Patch im Modell C=O=G.

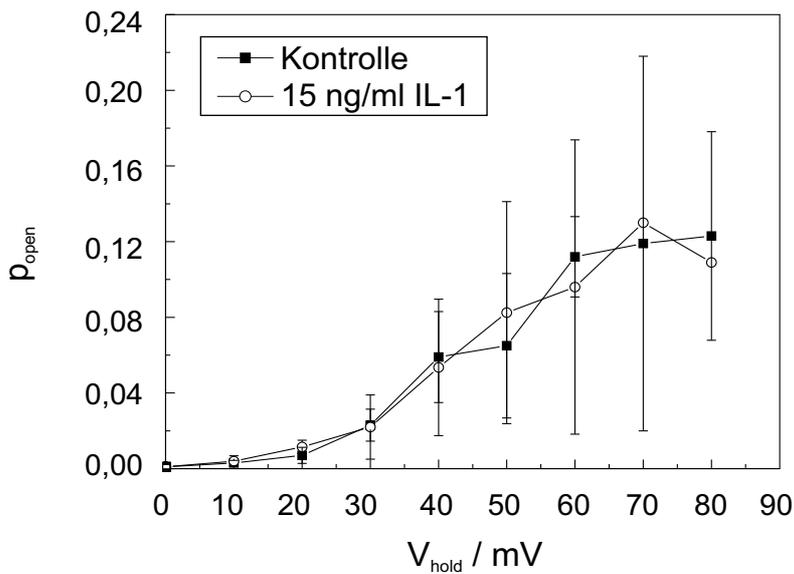
sog. Bursts (Phasen höherer Kanalaktivität) waren verkürzt, wohingegen das Schalten in diesen Bursts offensichtlich nicht durch IL-1 beeinflusst war. Um dies näher zu untersuchen, wurden die Übergangsraten  $k(ij)$  des MaxiK-Kanals in dem kinetischen Modell C=O=G mittels eines direkten Zeitreihenfits basierend auf einem Hidden-Markov-Modell bestimmt. In diesem Modell stellen die Zustände C und G jeweils Geschlossen-Zustände dar – *closed* für die langen Pausen zwischen den Bursts und *gap* für das kurze Schließen in den Bursts – und O den offenen Zustand *open*. Es hat sich gezeigt, dass dieses Modell gut geeignet ist, das Schaltverhalten des MaxiK-Kanals in excised Patches und die Wirkung verschiedener Kanalmodulatoren zu beschreiben [16][158]. Wie aus Abb. 26 ersichtlich, führte die Zugabe von IL-1 zu einem deutlichen Anstieg der Übergangsrate  $k(co)$  und einem leichten Absinken von  $k(oc)$ , während  $k(og)$  und  $k(go)$ , die das schnelle Schalten in den Bursts repräsentierten, nicht durch IL-1 beeinflusst wurden. Insbesondere der Anstieg von  $k(co)$  erklärte zum einem den Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit nach IL-1-Zugabe, da diese bei  $p_{open} \leq 0,5$  weitestgehend von dem Verhältnis  $k(co)/k(oc)$  bestimmt wird [16]; zum anderen bedeutete der Anstieg

von  $k(\text{co})$  und das Absinken von  $k(\text{oc})$  anschaulich eine Verkürzung der inaktiven Phasen des Kanals zwischen den Bursts, was deutlich in den Zeitreihen zu erkennen war. Eine ähnliche Veränderung auf die Übergangsraten war durch die Anwesenheit von LPS gefunden worden [16], was auf einen ähnlichen Mechanismus der Kanalaktivierung durch LPS und IL-1 hinweist.

Im Zellkultursystem konnte durch eine Stimulation von humanen Blutmakrophagen mit 1 ng/ml bis 10 ng/ml IL-1 reproduzierbar die konzentrationsabhängige Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  in den Überstand induziert werden. Wurden die Zellen vor der Stimulation mit IL-1 mit MaxiK-Kanalblockern inkubiert, so war analog zu den Experimenten mit LPS eine deutliche Inhibierung der Zytokinfreisetzung zu beobachten. In Abb. 27 ist ein repräsentativer Datensatz zu diesen Versuchen dargestellt: Durch eine Vorinkubation der Zellen mit 20  $\mu\text{M}$  Paxilline oder 20 mM TEA konnte die IL-1-induzierte  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung durch die Makrophagen fast vollständig inhibiert werden. Um auszuschließen, dass die Aktivierung der Zellen durch Endotoxinverunreinigungen in der IL-1-Präparation erfolgten, wurde untersucht, ob die Zellaktivierung durch einen spezifischen IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1-Ra)



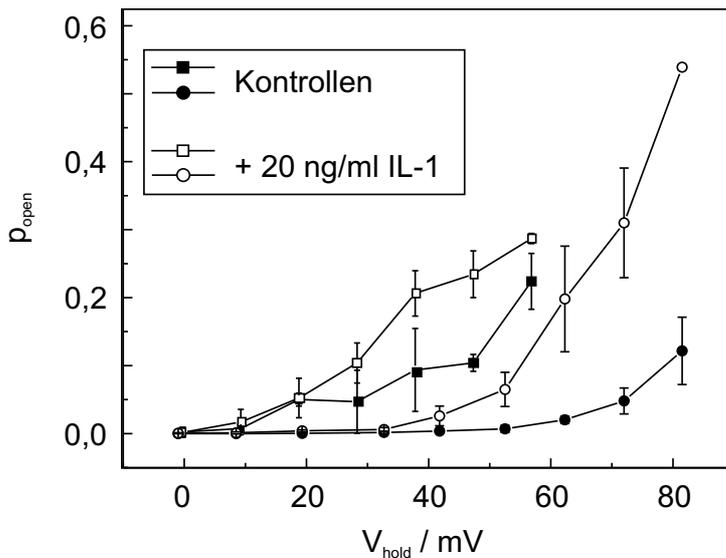
**Abbildung 27:** Einfluss von  $\text{K}^+$ -Kanalblockern (links) und von einem IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1-Ra, rechts) auf die IL-1-induzierte  $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung in humanen Blutmakrophagen (links:  $1 \cdot 10^5$  Zellen / Well, rechts:  $1 \cdot 10^6$  Zellen / Well). Bei den Zellkontrollen (ZK) wurde kein IL-1 zugegeben. Es konnte kein Einfluss des IL-1Ra auf die LPS-induzierte  $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 28:** Offenwahrscheinlichkeit  $p_{\text{open}}$  des MaxiK-Kanals in humanen Blutmakrophagen in einem outside-out Patch in Abhängigkeit des Membranpotentials  $V_{\text{hold}}$  in Anwesenheit des IL-1-Ra (400 ng/ml) vor (Kontrolle) und nach Zugabe von IL-1 (15 ng/ml).

[60][111] abgeschwächt werden konnte. Wie in Abb. 27 dargestellt, führte eine Vorinkubation der Zellen mit einem mindestens 10-fachen Überschuss des Antagonisten zu einer dramatischen Reduktion der IL-1-induzierten  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung, so dass angenommen werden kann, dass in der Tat eine Zellaktivierung durch IL-1 vorlag und eben diese durch den Einsatz von MaxiK-Kanalblockern unterdrückt wurde. Ergänzende Kontrollmessungen, die ausschlossen, dass eine eventuelle LPS-Kontaminationen des IL-1 eine Aktivierung durch IL-1 vortäuscht, waren die Hitzeinaktivierung des IL-1 und eine LPS-Neutralisierung durch Polymyxin B und die folgende Bestimmung der biologischen Aktivität der entsprechend behandelten Substanzen. Beide Tests wurden durchgeführt und bestätigten die „Reinheit“ des IL-1 (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die in den Patch-Clamp Experimenten beobachtete Aktivierung des MaxiK-Kanals durch IL-1 ebenfalls über den IL-1-Rezeptor vermittelt wurde, wurde der Badlösung bei den Patch-Clamp Experimenten der IL-1-Ra zugegeben und die Aktivität des MaxiK-Kanals nach anschließender Zugabe von IL-1 untersucht. Bei einer Konzentration des IL-1Ra von 400 ng/ml konnte in outside-out Patch-Clamp Messungen nach Zugabe von



**Abbildung 29:** Einfluss von IL-1 auf die Offenwahrscheinlichkeit  $p_{\text{open}}$  des MaxiK-Kanals in CHO-3E10 Zellen in Abhängigkeit des Membranpotentials  $V_{\text{hold}}$  in outside-out Patchen. Es sind zwei Messungen an zwei unterschiedlichen Zellen dargestellt (jeweils Kreise bzw. quadratische Symbole).

15 ng/ml IL-1 in die Badlösung reproduzierbar die Aktivierung des MaxiK-Kanals inhibiert werden (Abb. 28).

An CHO( $\alpha/\beta_4$ )-Zellen wurde sowohl in der whole-cell Konfiguration als auch an excised outside-out Patchen untersucht, ob die Zugabe von IL-1 die Aktivität des MaxiK-Kanals in diesem System beeinflusste. Die bisher — in noch begrenzter Zahl — durchgeführten Messungen zu dieser Fragestellung gaben einen deutlichen Hinweis, dass auch in diesem System der rekonstituierte Kanal durch extrazellulär zugegebenes IL-1 aktivierbar war. Während in der whole-cell Konfiguration nach Zugabe von 20 ng/ml IL-1 nur in einer von drei Messungen eine Erhöhung des Gesamtstroms zu beobachten war und in den anderen beiden keine Veränderung des Gesamtstroms auftrat, zeigte sich in den zwei Messungen in der outside-out Konfiguration, dass die Aktivität des MaxiK-Kanals nach IL-1-Applikation deutlich zunahm (Abb. 29). Messungen mit dem Rezeptorantagonisten wurden in diesem System bisher nicht durchgeführt.

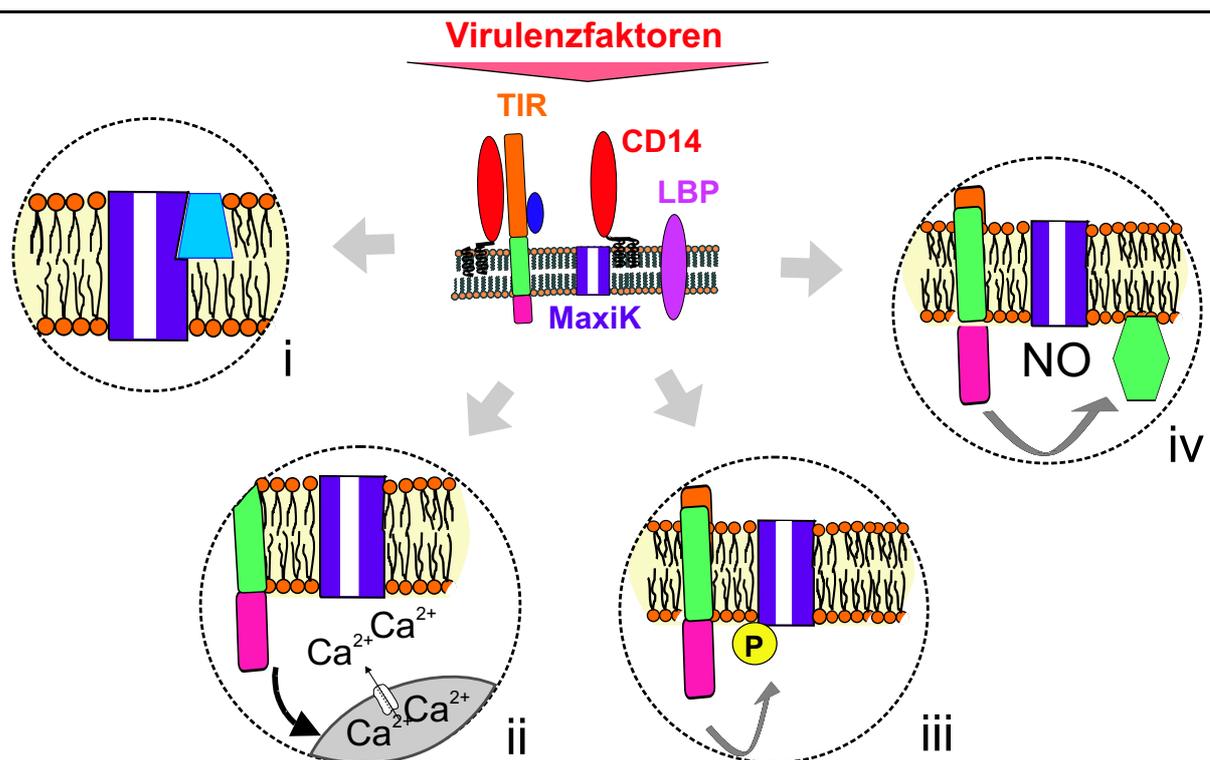
Zusammengefasst zeigen diese Daten deutlich, dass der MaxiK-Kanal sowohl in ausdifferenzierten humanen Makrophagen als auch in CHO( $\alpha/\beta_4$ )-Zellen durch das Zytokin IL-1 aktiviert werden kann und dass diese Aktivierung offenbar über den IL-1-Rezeptor vermittelt wird, was in den CHO-Zellen allerdings noch zu verifizieren ist. Da nicht anzunehmen ist, dass IL-1 in die Zytoplasmamembran eingebaut wird (siehe dazu 5.2.3), ist eine Modulation des Kanals auf diesem Wege unwahrscheinlich. Vielmehr ist davon auszugehen, dass es sich bei der Aktivierung um einen sekundären Effekt handelt, der einer Aktivierung des IL-1-Rezeptors folgt. In der Literatur gibt es bisher nur wenige Hinweise auf eine Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen durch Zytokine [80][113][116][145]. Interessant ist jedoch, dass Martin et al. und Nelson et al. auf humanen Makrophagen gezeigt haben, dass ein auswärts gerichteter  $K^+$ -Kanal durch das pro-inflammatorische Zytokin IL-2 aktivierbar ist [113][129]. Den Mechanismus für diese Aktivierung konnten sie jedoch nicht erklären. Für die von verschiedenen Gruppen untersuchte Aktivierung von  $K^+$ -Kanals in Microglia, also Makrophagen-ähnlichen Zellen im Zentralen Nervensystem und Gehirn, durch  $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$  und auch bakterielle Virulenzfaktoren ist bisher kein Mechanismus beschrieben worden. Prinz et al. [145] nehmen wie auch Ilschner et al. [80] an, dass über intrazelluläre Wege die Kanalaktivierung getriggert wird.

### 5.2.3 Mechanismus der MaxiK-Kanal Aktivierung

Da gezeigt ist, dass neben dem LPS Gram-negativer Bakterien auch sPG, ein Zellwandbestandteil Gram-positiver Bakterien und das Zytokin IL-1 in excised outside-out Patchen den MaxiK-Kanal in humanen ausdifferenzierten Blutmakrophagen aktiviert, stellt sich die Frage, über welche Mechanismen diese Kanalaktivierung erfolgen kann. Verschie-

dene Möglichkeiten der Aktivierung des MaxiK-Kanals durch endotoxisch aktives LPS waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit denkbar:

- i. Basierend auf dem Konformationsmodell, d.h. einer Korrelation zwischen der Molekülform des Lipid A-Teils von LPS und seiner biologischen Aktivität, führt der Einbau agonistischen LPS mit einer konischen Konformation des Lipid A-Teils möglicherweise über mechanischen Stress zu einer Modulation des MaxiK-Kanals.
- ii. Es findet keine direkte Aktivierung des Kanals statt; stattdessen steigt durch eine LPS-induzierte Freisetzung des Second-Messengers Kalzium oder das Öffnen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen die MaxiK-Kanalaktivität über eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an.

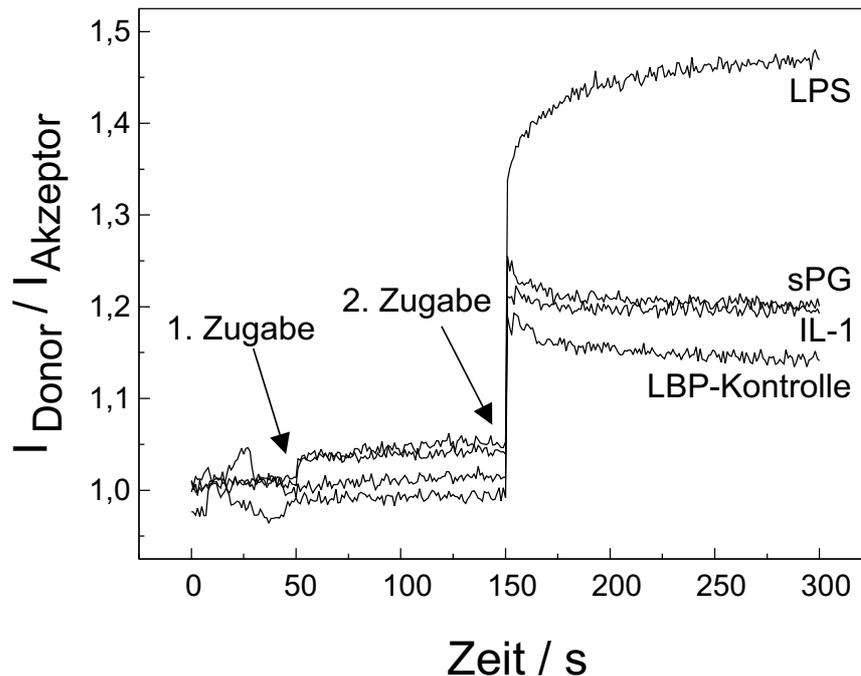


**Abbildung 30:** Mögliche Mechanismen der Aktivierung des MaxiK-Kanals durch Virulenzfaktoren: (i) direkte Aktivierung durch in die Membran interkalierte Virulenzfaktoren; nach einer Signaltransduktion über TLR oder den IL-1-Rezeptor kommt es (ii) zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ , (iii) zur Phosphorylierung des Kanals oder einer Aktivierung über G-Proteine oder (iv) es wird intrazellulär NO gebildet, das den Kanal aktiviert.

iii. Es kommt zu einer indirekten Kanalaktivierung durch die Aktivierung Membran-assoziiierter Signalkaskaden, z.B. eine Phosphorylierung des Kanals über Proteinkinasen oder die Aktivierung von G-Proteinen.

iv. Da in verschiedenen Geweben die Aktivierbarkeit des MaxiK-Kanals gezeigt ist und NO bei der Zellaktivierung in verschiedenen Organismen gebildet wird, ist auch diese Möglichkeit der Kanalaktivierung denkbar.

Nimmt man an, dass LPS, sPG und IL-1 über einen gemeinsamen Mechanismus zur Aktivierung des MaxiK-Kanals in humanen Makrophagen führen, sprechen verschiedenen Gründen gegen die erste Hypothese: Die den MaxiK-Kanal aktivierende Wirkung von löslichem Peptidoglycan, für das keine Korrelation der molekularen Konformation der Moleküle und ihrer biologischen Aktivität besteht und vor allem die Kanalaktivierung durch das Zytokin IL-1, für das eindeutig eine Bindung an direkt an den IL-1-Rezeptor nachgewiesen ist [157], deuten darauf hin, dass nicht die physikochemischen Charakteristika entscheidend für die Aktivierung sind. Es konnte in FRET-Messungen an Phosphatidylserin (PS)-Liposomen auch kein Hinweis darauf gefunden werden, dass diese Aktivatoren in die Membran von Makrophagen eingebaut werden, wie es für LPS der Fall ist (Abb. 31). Damit scheidet ein gemeinsamer Mechanismus einer direkten membranvermittelten Aktivierung des Kanals durch diese Substanzen aus. Für LPS alleine betrachtet, ist dieser Mechanismus einer Kanalaktivierung weiterhin nicht auszuschließen; eine Untersuchung des Einflusses der umgebenen Lipidmatrix auf den Kanal könnte idealerweise an Membranmodellen vorgenommen werden.



**Abbildung 31:** FRET-Messungen zum LBP-vermittelten Einbau von LPS, sPG und IL-1 in PS-Liposomen. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des Verhältnisses von Donor- zu Akzeptorintensität. 50 s nach Messbeginn wurde jeweils 10  $\mu\text{l}$  der entsprechenden gelösten Substanz zugegeben (1. Zugabe), was zu keiner nennenswerten Änderung der Intensitätenverhältnisse führte. Nach 150 s wurde jeweils 5,5  $\mu\text{l}$  LPB (1 mg/ml) zugegeben (2. Zugabe); danach konnte bei LPS ein deutlicher Anstieg des Intensitätsverhältnisses beobachtet werden, was auf einen LBP-vermittelten Einbau des LPS in die PS-Liposomen hindeutete. Bei IL-1, sPG und bei der Kontrollmessung mit LPB in PBS trat lediglich ein Hub des Intensitätsverhältnisses auf, der auf eine Interaktion des LPB mit den PS-Liposomen [64], nicht aber auf einen Einbau von IL-1 oder sPG in die Liposomen hindeutete.

Gegen eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und einer darauf folgenden Kanalaktivierung spricht, dass bei den Patch-Clamp Messungen in der Pipettenlösung  $\text{Ca}^{2+}$  durch 2 bzw. 5 mM EGTA gepuffert und so einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration entgegen gewirkt wurde. Eine deutliche Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wäre daher nur durch eine Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in dem Membranpatch zu erzielen gewesen, da eine Freisetzung aus notwendigerweise membrangebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Stores aufgrund des weitaus größeren Flüssigkeitsvolumens in der Pipette neutralisiert worden wäre. Allerdings ist zu bedenken, dass es in der

Literatur diverse Hinweise auf eine LPS-induzierte Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Makrophagen gibt [8][14][103]. In eigenen Versuchen mit mit Farbstoff beladenen Zellen konnte weder mittels konfokaler Mikroskopie an einzelnen Zellen noch durch photometrische Versuche an Zellpopulationen ein Hinweis auf eine Steigerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach LPS-Zugabe festgestellt werden, während nach Zugabe von FMLP<sup>10</sup> eine deutliche Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Wegen der Komplexität des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signallings kann nach bisheriger Datenlage ein Einfluss einer steigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aber nicht völlig ausgeschlossen werden.

Da LPS als Ligand von TLR4 und sPG von TLR2 beschrieben sind und IL-1 über den IL-1-Rezeptor ein Signal ins Zellinnere übermittelt und die Kanalaktivierung durch den IL-1-Rezeptor unterbunden werden konnte, ist es vielmehr denkbar, dass der gemeinsame Schlüssel zum Mechanismus der MaxiK-Kanalaktivierung bei den intrazellulären Domänen der TLR- und des IL-1-Rezeptors zu suchen sind, bzw. bei Prozessen, die direkt nach der Aktivierung der Rezeptoren angestoßen werden und die dann auf den Kanal einwirken. Da die Kanalaktivierung in excised outside-out Patches erfolgte, müssten diese Prozesse über Membran-assoziierte Proteine getriggert werden. Die Analyse der Veränderung der Übergangsraten zeigte zudem, dass IL-1 in gleicher Weise auf das Schaltverhalten des MaxiK-Kanals wirkte wie LPS, nämlich durch eine Verschiebung der Übergangsraten  $k(\text{co})$  und in geringem Maße auch von  $k(\text{oc})$  zu weniger positiven Membranpotentialen<sup>11</sup>. Ein möglicher Weg eines solchen gemeinsamen Regulationsmechanismus wäre die Aktivierung des Kanals durch direkte Phosphorylierung bzw. Aktivierung durch Proteinkinasen, wie vor allem in Zellen der glatten

---

10 FMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) führt zur Steigerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern [154][159].

11 Es sei an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Analyse der Übergangsraten in dieser Problemstellung bestenfalls Koinzidenzen liefern kann. Die molekularen Effekte, die LPS und IL-1 auf das Kanalprotein haben, können so nur phänomenologisch verglichen werden.

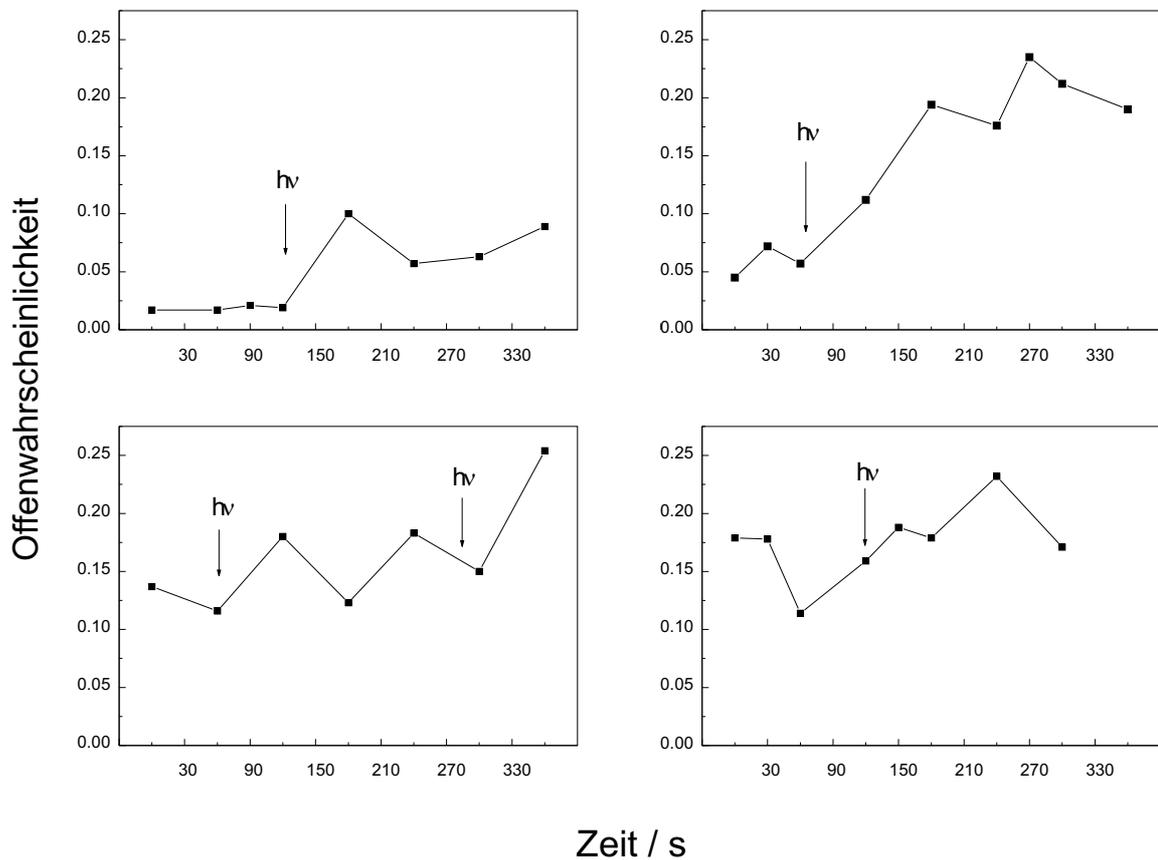
Muskulatur beschrieben (zur Übersicht: [164]). Eine denkbar Möglichkeit ist eine Aktivierung über Membran-assoziierte Src-Proteinkinansen. Es ist gezeigt, dass über eine Phosphorylierung dieser Kinasen die Aktivität von MaxiK-Kanälen moduliert werden kann [106]. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass über TLR Src-Kinasen Endotoxin-induziert aktiviert werden [18][72]. Ein ähnlicher Weg ist die Kanalaktivierung über cGMP-abhängige Proteinkinassen [6][152][164]. Auch wenn keine detaillierten Analysen des Einflusses dieser Faktoren auf das Schaltverhalten von MaxiK-Kanälen durchgeführt wurden, deuten die in den entsprechenden Veröffentlichungen dargestellten Zeitreihen und Offenwahrscheinlichkeiten darauf hin, dass eine Aktivierung insbesondere durch cGMP-abhängige Proteinkinassen phänomenologisch der Aktivierung durch LPS oder IL-1 ähneln [6][152][179]. Für cGMP ist gezeigt, dass es LPS-induziert freigesetzt wird. Da in der Literatur bisher nur wenigen Belege zu finden sind, dass MaxiK-Kanäle über G-Proteine moduliert werden [202], wurde diese Möglichkeit bisher nicht weiter untersucht, zumal eine Blockade von G-Proteinen in der Zellkultur viele schwer zu differenzierende inhibitorische Effekte auslösen würde. Für humane  $erg$   $K^+$  Kanäle ist eine G-Protein vermittelte Aktivierung jedoch gezeigt, so dass dieser Weg auf jeden Fall nicht ausgeschlossen werden kann [9].

Zwei der möglichen Aktivierungswege wurden im Rahmen dieser Arbeit im Patch-Clamp Experiment näher untersucht, nämlich eine mögliche Aktivierung des Kanals durch NO und über Proteinkinassen.

### 5.2.3.1 *Ist der MaxiK-Kanals durch NO aktivierbar?*

Zum Nachweis einer Aktivierung des MaxiK-Kanals durch intrazelluläres NO wurden zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze gewählt: Erstens wurde an excised Patches in der outside-out Konfiguration gemessen. Der Pipettenlösung (5 mM EGTA, also

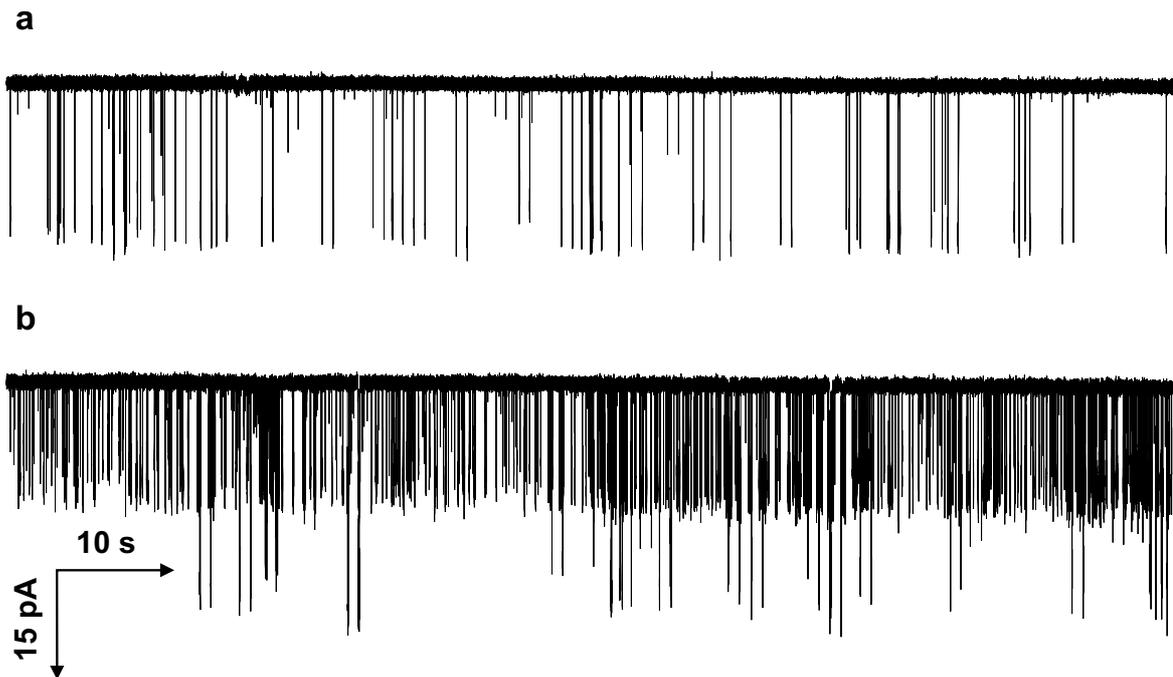
$[Ca^{2+}]_{\text{frei}} \leq 10^{-9}$  M) wurde dabei die Substanz P7070 zugegeben. P7070 setzt durch Photolyse NO frei. Durch 10 s Lichtzufuhr über einen an ein Stroboskop angeschlossenen direkt auf die Pipette gerichteten Lichtleiter wurde die NO-Freisetzung erreicht. Die Ströme wurden über 30 s aufgezeichnet, wobei die angelegte Membranspannung konstant gehalten wurde. Um die Größe der aufgenommenen Dateien zu begrenzen, wurde bei diesen Messungen die Samplefrequenz auf 50 kHz herabgesetzt. Zweitens wurden Versuche mit dem NO-Donor NOR-3 durchgeführt, der in wässriger Lösung NO freisetzt. Bei diesen Versuchen wurde in der inside-out Konfiguration gemessen. Die angelegte Membranspannung wurde auch hier konstant gehalten, und es wurden kontinuierlich 1 min lange Messungen des Stroms aufge-



**Abbildung 32:** Zeitliche Entwicklung der Offenwahrscheinlichkeit des MaxiK-Kanals nach Freisetzung von NO durch P7070 in der Patch-Pipette bei vier outside-out Patches der Zytoplasmamembran humaner Blutmakrophagen bei einem Membranpotential  $V_{\text{hold}} = 70$  mV. Die Pfeile markieren die Freisetzung von NO durch Bestrahlung der Pipette.

zeichnet. Bei beiden NO-Donatoren kann keine genaue Angabe zur effektiven freigesetzten NO-Konzentration gemacht werden. Für P7070 ergibt eine obere Abschätzung der NO-Konzentration nach Photolyse  $10\ \mu\text{M}$  in der Pipettenlösung, bei NOR-3 in einem Messzeitraum von 10 min ca.  $100\ \mu\text{M}$  in der Badlösung.

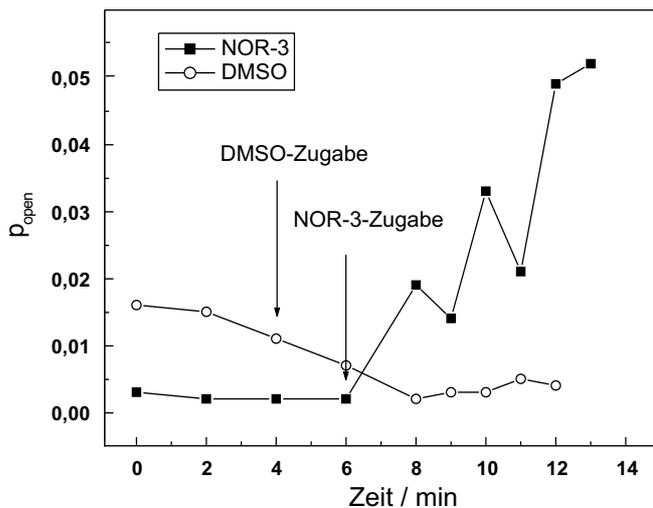
In zwei von vier Versuchen wurde mit P7070 nach der Bestrahlung der Pipette mit dem caged-NO eine deutliche Aktivierung des MaxiK-Kanals und damit eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit beobachtet (Abb. 32 oben). In den zwei anderen Messungen war ebenfalls eine Steigerung der Kanalaktivität feststellbar, allerdings in geringerem Maße (Abb. 32 unten). Bei allen vier Versuchen war auffällig, dass die Aktivität der Kontrollen, also vor der Bestrahlung und damit der Freisetzung des NO zum Teil deutlich höher war als in vergleichbaren Messungen in Abwesenheit von P7070. In den beiden Messungen, in denen nach NO-Freisetzung ein sehr starker Anstieg der Kanalaktivität beobachtet wurde, waren die Aktivitäten bei den Kontrollen im Vergleich zu den beiden anderen Messungen relativ gering. Dies könnte darauf hin deuten, dass bei diesen Messungen vor der NO-Freisetzung die NO-Konzentration in der Pipettenlösung schon deutlich erhöht war und so nach Bestrahlung durch die weitere Freisetzung die Konzentration nur noch geringfügig erhöht wurde. Um diese Ergebnisse experimentell abzusichern, wurden daher die Versuche auch mit dem NO-Donor NOR-3 durchgeführt, der in wässriger Lösung mit der Zeit ( $T_{0,5} = 30\ \text{min}$ ) NO abgibt. Da NOR-3 in DMSO gelöst war und ein Einfluss dieses Lösungsmittels auf die Aktivität des MaxiK-Kanals ausgeschlossen werden musste, wurden als Kontrollmessungen Versuche durchgeführt, in denen DMSO in einer vergleichbaren Menge wie bei den NOR-3 Experimenten appliziert wurde. Es konnte nur jeweils eine Messung mit NOR-3 und mit DMSO ausgewertet werden, da nicht mehr inside-out Patche ausreichend lange stabil waren. Es zeigte sich, dass, wie in den Ausschnitten aus den Zeitreihen in Abb. 33 deutlich zu erkennen



**Abbildung 33:** Ausschnitte aus Zeitreihen von inside-out Patches an humanen Makrophagen in Abwesenheit (a) und (b) 5 min nach Zugabe des NO-Donors NOR-3 (25  $\mu$ l, 10 mg/ml auf 2 ml Gesamtvolumen) bei einem Membranpotential  $V_{\text{hold}} = -50$  mV. Die Badlösung enthielt 5 mM EGTA und damit kein freies  $\text{Ca}^{2+}$ , die Samplefrequenz betrug 50 kHz gesenkt.

ist, nach der Zugabe von NOR-3 ein deutlicher Anstieg der Kanalaktivität zu beobachten war. Die Offenwahrscheinlichkeit stieg nach Zugabe von NOR-3 in die Badlösung über mehrere Minuten deutlich an (Abb. 34). Diese zeitliche Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit ist aufgrund der erwähnten Freisetzung von NO durch NOR-3 mit einer Halbwertszeit von 30 min plausibel. Bei der Kontrollmessung mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels DMSO konnte keine Erhöhung der Kanalaktivität beobachtet werden.

Die Messungen zeigen deutlich, dass der MaxiK-Kanal in humanen Makrophagen durch intrazelluläres NO aktiviert werden kann. Auch wenn es in der Literatur nur wenige Hinweise auf eine Pathogenitätsfaktor-induzierte NO-Produktion in humanen Makrophagen gibt [136][137], zeigen diese Ergebnisse, dass sog. Second Messenger auch den hier untersuchten

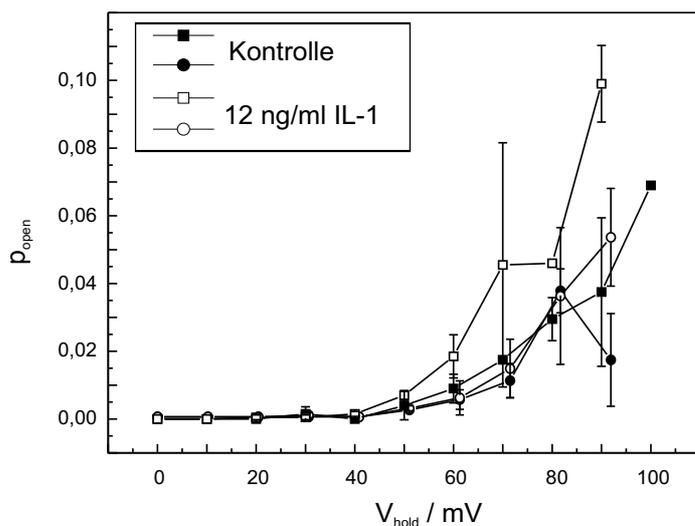


**Abbildung 34:** Offenwahrscheinlichkeit des MaxiK-Kanals nach Zugabe des NO-Donors NOR-3 (■) bzw. des Lösungsmittels DMSO (○) (25 µl auf 2 ml Badlösung).

Kanal modulieren können. Ob allerdings in excised Patchen alle intrazellulären Komponenten, die zur NO-Synthese benötigt werden, funktionell erhalten bleiben, und somit die in excised outside-out Patchen beobachtete Kanalaktivierung durch LPS, sPG und IL-1 auf diesen Mechanismus zurückzuführen ist, bleibt zu untersuchen. In Endothelzellen gibt es Hinweise darauf, dass NO-Synthasen in Rafts an die Plasmamembran gebunden sein können [32][55][141].

### 5.2.3.2 Erfolgt die MaxiK-Aktivierung über Proteinkinasen?

Da die Aktivierung des MaxiK-Kanals in humanen Blutmakrophagen in excised outside-out Patchen durch LPS, sPG und auch durch IL-1 erfolgen konnte, liegt es aus oben angeführten Gründen nahe anzunehmen, dass diese für die drei Aktivatoren über einen gemeinsamen intrazellulären, aber Membran-assoziierten Pfad erfolgt. Daher wurde untersucht, wie sich die Anwesenheit des unselektiven Proteinkinase-Inhibitors Staurosporin in der Patch-Pipette auf die Aktivierung des MaxiK-Kanals in humanen Makrophagen in der outside-out Konfiguration durch IL-1 auswirkte. Staurosporin ist ein Zell-permeabler Inhibitor



**Abbildung 35:** Offenwahrscheinlichkeit  $p_{\text{open}}$  des MaxiK-Kanals in Abhängigkeit des Membranpotentials  $V_{\text{hold}}$ . Es sind zwei Messungen dargestellt: Die quadratischen Symbole zeigen eine Messung ohne Staurosporin, die runden Symbole eine Messung mit Staurosporin (200 nM) in der Pipettenlösung. Die gefüllten Symbole repräsentieren jeweils die Kontrollmessungen ohne IL-1, die offenen die Messungen nach Zugabe von IL-1 (12 ng/ml).

der PKC ( $IC_{50} = 0,7$  nM), der in höheren Konzentrationen auch andere Proteinkinasen inhibiert (PKA:  $IC_{50} = 7$  nM; PKG:  $IC_{50} = 8,5$  nM) [155].

Wie in Abb. 35 zu erkennen ist, stieg nach Zugabe von IL-1 (12 ng/ml) ohne Staurosporin in der Pipettenlösung die Aktivität des MaxiK-Kanals an (quadratische Symbole). Bei Anwesenheit des Proteinkinase-Inhibitors Staurosporin (200 nM) in der Patch-Pipette, also an der Innenseite des Membranpatches, kam es nach Zugabe der gleichen Menge IL-1 nicht zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals (runde Symbole). Die Aktivität lag im gleichen Bereich wie die der Kontrollmessungen. In zwei weiteren Experimenten unter gleichen Bedingungen lagen nach IL-1-Zugabe die Offenwahrscheinlichkeiten sogar deutlich unter denen der Kontrolle. Es scheint die Aktivierung des Kanals über IL-1 in Abhängigkeit von Proteinkinasen zu erfolgen, obwohl diese Aussage durch weitere Messungen noch bestätigt werden muss. Ob auch die LPS-induzierte Aktivierung durch Staurosporin inhibierbar ist, ist noch zu zeigen.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass es einen der transmembranen Signaltransduktion nachgeschalteten Weg gibt, über den verschiedene Liganden der TIR-

Familie die Aktivierung des MaxiK-Kanals hervorrufen. Eine Beteiligung von Membran-assoziierten Proteinkinasen, die es noch näher zu bestimmen gilt, scheint dabei sehr wahrscheinlich. Für die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) [152][179], für cAMP-abhängige Proteinkinasen (PKA) [192] und für Src Kinasen [106] ist gezeigt, dass sie zu einer Aktivierung von MaxiK-Kanälen führen können. Durch Phosphorylierung des Kanals an der C-terminaler Domäne wird diese Modulation des Kanals induziert [6][47][191]. Da es Hinweise darauf gibt, dass diese Proteinkinasen in funktionaler Nachbarschaft zu dem Kanal in der Membran lokalisiert sind und diese Kopplung in excised Patches erhalten bleibt [61][205], ist es denkbar, dass über diesen Weg in der Tat ein gemeinsamer Mechanismus der Aktivierung des Kanals durch bakterielle Virulenzfaktoren und IL-1 vorliegen könnte.

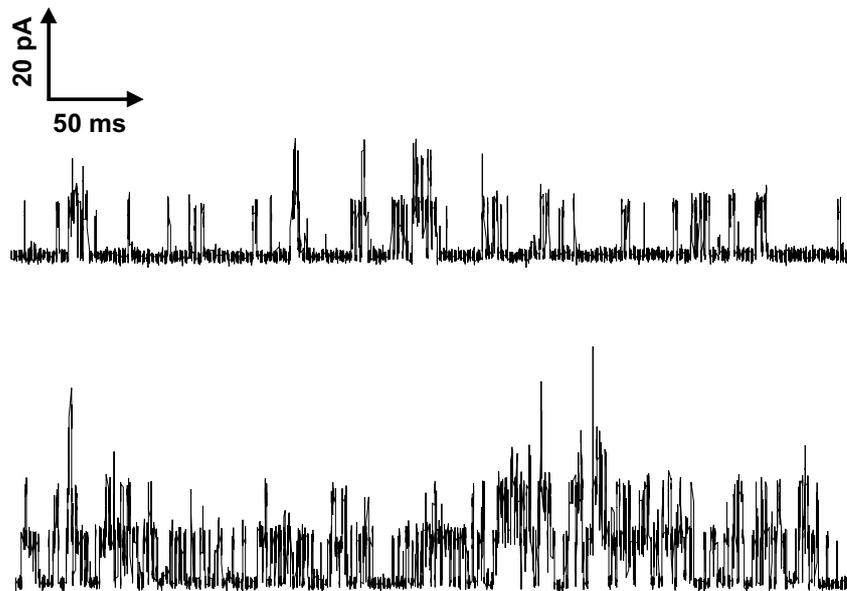
Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben diesem vorgeschlagenen gemeinsamen Mechanismus LPS, das im Gegensatz zu IL-1 und sPG über eine hydrophobe Domäne verfügt und in Phospholipidmembranen LPB-vermittelt interkaliert, über eine direkte oder Lipidmatrix-vermittelte Wechselwirkung den MaxiK-Kanal aktiviert. Angesichts der Korrelation der molekularen Konformation des Lipid A-Teils und der endotoxischen Aktivität von LPS ist es möglich, dass in Makrophagen durch eine direkte Aktivierung des MaxiK-Kanals durch LPS eine Modulation der Zellaktivierung erzielt werden kann.

Nicht untersucht wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Wirkung des Zytokins TNF $\alpha$  auf den MaxiK-Kanal. R. Blunck hatte keine aktivierende Wirkung dieses Zytokins auf den MaxiK-Kanal in der Membran ausdifferenzierter humaner Blutmakrophagen feststellen können [16]. Da allerdings bei diesen Messungen nicht parallel in Stimulationsversuchen die Wirksamkeit von TNF $\alpha$  festgestellt wurde, und es während der Versuche zu der vorliegenden Arbeit wiederholt Probleme mit der biologischen Wirksamkeit von TNF $\alpha$  gab, sollte der

Einfluss auf den Kanal mit auf seine biologische Aktivität getestetem TNF $\alpha$  erneut untersucht werden. So könnte ein gemeinsamer Mechanismus der Kanalaktivierung genauer charakterisiert und insbesondere die Frage beantwortet werden, ob die Kanalaktivierung über Virulenzfaktoren und Zytokine auf Liganden der TIR/IL-1-Familie beschränkt ist oder auch die Aktivierung anderer transmembraner Signalproteine zu einer Aktivierung des MaxiK-Kanals führt.

### 5.3 Untersuchungen mit MaxiK-Aktivatoren

Wir und andere haben gezeigt, dass die Aktivierung des MaxiK-Kanals durch LPS in humanen Makrophagen einen initialen Schritt bei der Zellaktivierung darstellt und dass eine Blockade des Kanals durch spezifische und unspezifische Kanalblocker zu einer Unterdrückung der Zellaktivierung führt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Kanal durch sPG und IL-1 aktivierbar ist und eine Blockade in humanen Makrophagen zu einer Inhibierung der TNF $\alpha$ -Freisetzung führt. Somit ergibt sich die Frage, ob andererseits die Aktivierung des MaxiK-Kanals durch einen speziellen Agonisten — kein Virulenzfaktor oder Zytokin — hinreichend ist, um Immunzellen zur Produktion und Freisetzung von Zytokinen anzuregen. Daher wurden verschiedene Substanzen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den MaxiK-Kanal in humanen Makrophagen und in CHO-Zellen zu aktivieren. In beiden Zellsystemen wurde parallel untersucht, ob der Einsatz der möglichen Aktivatoren einen Einfluss auf die Zellaktivierung hat, also zu einer Freisetzung von Zytokinen bzw. der Phosphorylierung von MAPK führte.



**Abbildung 36:** Ausschnitte aus Zeitreihen eines outside-out Patches von humanen Makrophagen bei einem angelegten Membranpotential  $V_{\text{hold}} = 70 \text{ mV}$ . Oben: Kontrollmessung; unten: Nach Zugabe des MaxiK-Kanalaktivators NS 1608 ( $10 \mu\text{M}$ ).

---

Es wurden zum einen die Substanzen NS 1608 und NS 004 von der Firma NeuroSearch, die als sehr potente Aktivoren des MaxiK-Kanals beschrieben sind [131][132] eingesetzt, und zum anderen wurde die Wirkung von Phloretin auf den MaxiK-Kanal in humanen Makrophagen untersucht, für das bisher nicht beschrieben war, ob es eine aktivierende Wirkung auch auf den MaxiK-Kanal in Blutmakrophagen hat.

### 5.3.1 Wirkung der MaxiK-Aktivatoren NS 1608 und NS 004

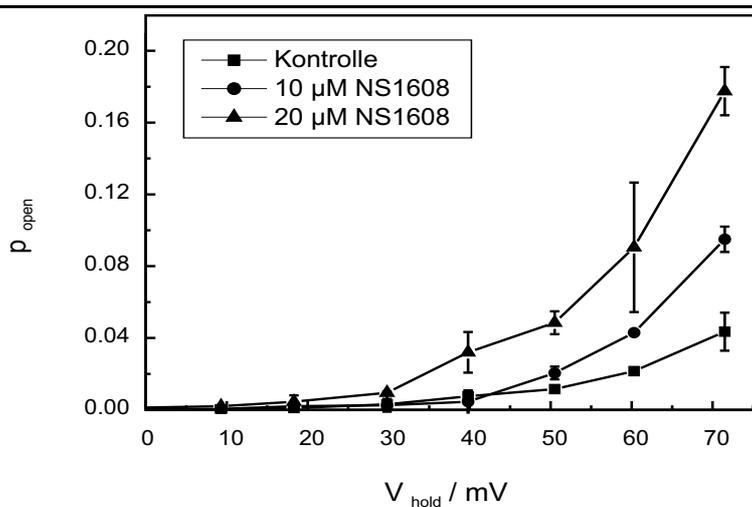
NS 1608 und NS 004 [156][176] wurden in verschiedenen biologischen Assays eingesetzt. Für Patch-Clamp Experimente wurde zunächst nur NS 1608 benutzt, da dieses als der spezifischere Aktivator beschrieben ist [78]. Aufgrund der Erkenntnisse, die mit dieser Substanz gewonnen wurden, sind dann keine weiteren aufwendigen Patch-Clamp Untersuchungen mit dem ähnlichen aber weniger effektiven Aktivator NS 004 notwendig gewesen.

### 5.3.1.1 Einfluss von NS 1608 auf den MaxiK-Kanal in humanen Makrophagen

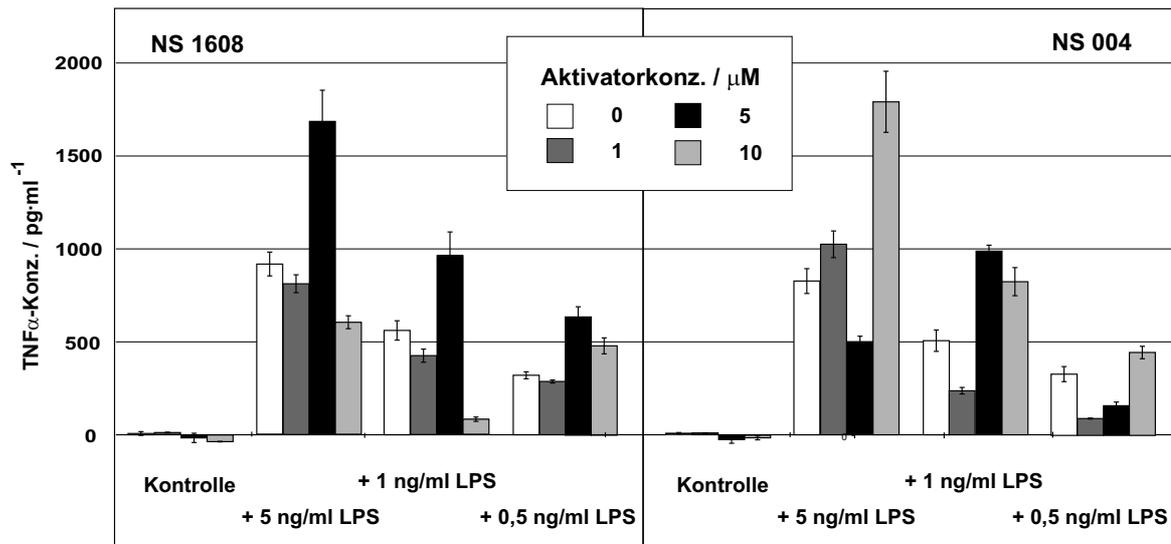
Die Zugabe von NS 1608 in einem Konzentrationsbereich von 2 bis 20  $\mu\text{M}$  zu excised outside-out Patchen der Zellmembran von humanen Makrophagen führte bei sämtlichen Messungen innerhalb von wenigen Minuten zu einem sehr starken Anstieg der Kanalaktivität (Abb. 36) und somit der Offenwahrscheinlichkeit des MaxiK-Kanals (Abb. 37). Die Einzelkanalleitfähigkeit wurde dabei durch die Anwesenheit des Kanalaktivators nicht beeinflusst. In whole-cell Patchen an humanen Blutmakrophagen wurde ebenfalls eine deutliche Aktivierung des Kanals beobachtet (Daten nicht gezeigt).

### 5.3.1.2 Einfluss der Kanalaktivatoren auf die Aktivierung von Makrophagen

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde in der Zellkultur an humanen Blutmakrophagen untersucht, ob eine Aktivierung des MaxiK-Kanals durch NS 1608 ausreichend ist für die Zellaktivierung. Dazu wurde der Einfluss von NS 1608 auf die  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung sowie auf intrazelluläre Signale wie die Phosphorylierung von MAP-Kinasen und die NF- $\kappa\text{B}$ -Translokation untersucht.



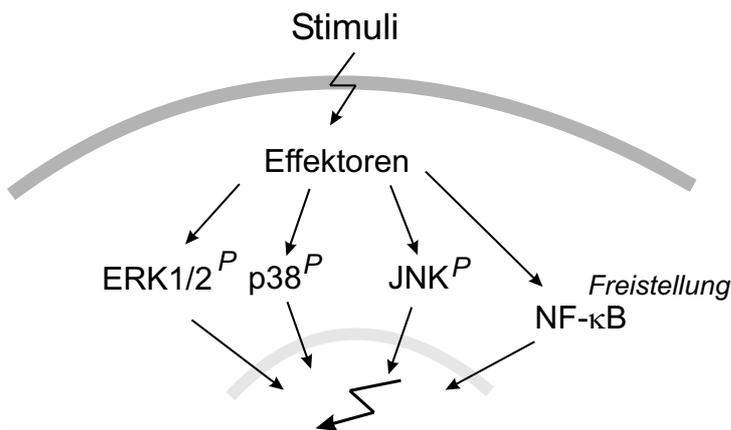
**Abbildung 37:** Offenwahrscheinlichkeit  $p_{\text{open}}$  des MaxiK-Kanals in humanen Blutmakrophagen in einem outside-out Patch in Abwesenheit bzw. Anwesenheit des MaxiK-Kanalaktivators NS 1608 in Abhängigkeit vom angelegten Membranpotential  $V_{\text{hold}}$ .



**Abbildung 38:** Einfluss der MaxiK-Aktivatoren NS 1608 und NS 004 in Anwesenheit verschiedener LPS-Konzentrationen bzw. ohne LPS („Kontrolle“) auf die Zytokinfreisetzung aus humanen Makrophagen.

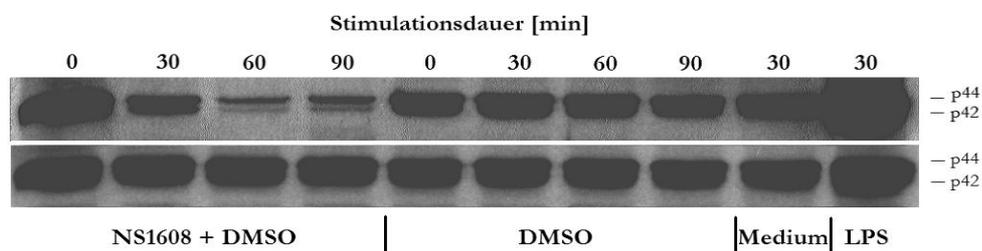
Die Zellen wurden zur Zytokinbestimmung, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, mit den Kanalaktivatoren NS 1608 und NS 004 und mit LPS stimuliert. Es wurde anschließend die TNF $\alpha$ -Konzentration im Überstand gemessen. Zur Untersuchung des Einflusses auf die intrazellulären Prozesse wurden die Zellen wie in 4.3.1 beschrieben stimuliert. Die Phosphorylierung der MAP-Kinasen sowie die Degradation von I $\kappa$ B, ein indirektes Maß für die NF- $\kappa$ B-Translokation, wurde per Western-Blot nachgewiesen. Da die Aktivatoren in DMSO gelöst waren, wurde bei diesen Versuchen neben der üblichen Medienkontrolle eine weitere Kontrollmessung mit DMSO durchgeführt, um den Einfluss dieses Lösungsmittels auf die Zellen zu untersuchen.

Wie in Abb. 38 zu erkennen ist, konnte durch die Inkubation der Zellen mit NS 1608 und NS 004 alleine keine Zytokinausschüttung induziert werden. Auch wurde durch die gemeinsame Zugabe von LPS und den Aktivatoren in verschiedenen Konzentrationen keine eindeutige Erhöhung der TNF $\alpha$ -Freisetzung im Vergleich zur Stimulation nur mit LPS beobachtet.

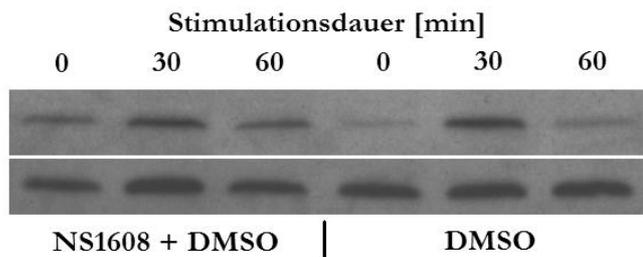


**Abbildung 39:** Schematische Übersicht über die hier untersuchten intrazellulären Signalkaskaden, die nach Stimulation mit LPS aktiviert werden.

Die erhöhten TNF $\alpha$ -Konzentrationen, die in dem in Abb. 38 wiedergegebenen Stimulationsexperiment bei 5 ng/ml LPS + 5  $\mu$ M NS 1608 bzw. + 10  $\mu$ M NS 004 auftraten, konnten in weiteren Versuchen nicht reproduziert werden. Vielmehr zeigte sich, dass bei Aktivatorkonzentrationen oberhalb von 5  $\mu$ M eine systematische konzentrationsabhängige Abschwächung der TNF $\alpha$ -Freisetzung zu beobachten war. Neben der Zytokinfreisetzung wurde untersucht, ob durch die Aktivatoren intrazelluläre Signalkaskaden, die an der Zellaktivierung durch LPS und IL-1 beteiligt sind (Abb. 39), angestoßen werden. Ein aktivierender Einfluss auf die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden wie der Phosphorylierung von ERK1/2 (Abb. 40) und p38 (Abb. 41) sowie der Degradation von I $\kappa$ B (Daten nicht gezeigt) konnte nach Stimulation der Zellen mit NS 1608 nicht beobachtet werden. Es zeigte sich in Anwesenheit des



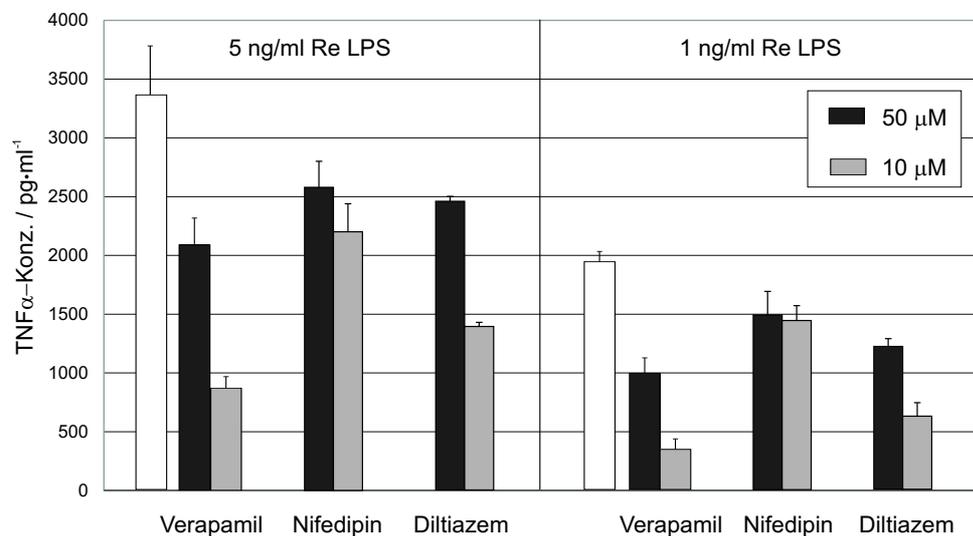
**Abbildung 40:** Kinetik der phosphorylierten (obere Reihe) und der gesamten (untere Reihe) ERK in humanen Blutmakrophagen ( $5 \cdot 10^5$  Zellen / Probe) nach Stimulation mit DMSO (0,1 %) und NS 1608 (10  $\mu$ M in DMSO); Nachweise mittels Western-Blot.



**Abbildung 41:** Zeitlicher Verlauf der Bildung phosphorylierter (obere Reihe) und der gesamten (untere Reihe) p38 in humanen Makrophagen ( $5 \cdot 10^5$  Zellen / Probe) nach Stimulation mit  $5 \mu\text{M}$  NS 1608 bzw. DMSO (0,05 %); Nachweise mittels Western-Blot.

Lösungsmittels DMSO eine leichte ERK1/2- und p38-Phosphorylierung, die bei Anwesenheit von NS 1608 im Falle von p38 nicht über und im Falle von ERK1/2 deutlich unter der beobachteten Aktivierung durch das Lösungsmittel DMSO alleine lag. Im Falle der ERK-Phosphorylierung trat in Anwesenheit von NS 1608 und DMSO sogar eine Abschwächung auf (Abb. 40).

Diese Daten deuten darauf hin, dass offenbar die Aktivierung des MaxiK-Kanals alleine nicht für eine Aktivierung der untersuchten Signalwege in Makrophagen ausreicht. Es ist allerdings zu bedenken, dass ein möglicher stimulierender Effekt der Kanalaktivatoren auf die



**Abbildung 42:** Einfluss von verschiedenen Ca $^{2+}$ -Kanalblockern auf die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung in humanen Blutmakrophagen nach Stimulation mit LPS.

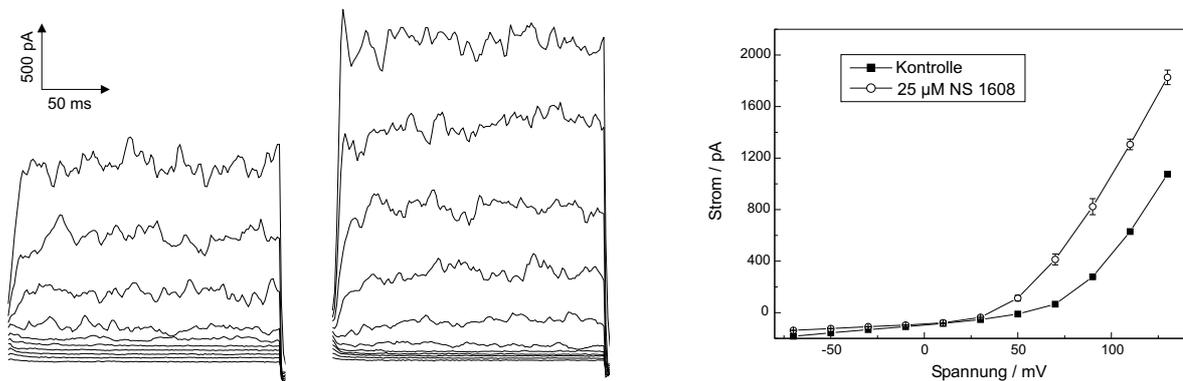
Zellen durch eine zweite Eigenschaft dieser Substanzen unterdrückt wurde: In den Konzentrationen, die für die Aktivierung des MaxiK-Kanals benötigt wurden, wirken beide Aktivatoren auch inhibierend auf  $K_{ATP}$ -Kanäle und verschiedene Typen von  $Ca^{2+}$ -Kanälen<sup>12</sup>[156][176]. Da für verschiedene Zellen beschrieben ist, dass eine Blockade unterschiedlicher  $Ca^{2+}$ -Kanäle die LPS-induzierte Produktion und Freisetzung von Zytokinen inhibieren kann [31][69][115][194] und letzteres durch den Einsatz von verschiedenen Inhibitoren von L-type  $Ca^{2+}$ -Kanälen auch in den humanen Makrophagen beobachtet werden konnte (Abb. 42), ist davon auszugehen, dass auch bei einer Aktivierung der Zytokinproduktion durch die Kanalaktivatoren dieser Effekt durch die Inhibition der Zytokinfreisetzung und möglicherweise -produktion durch den blockierenden Einfluss auf  $Ca^{2+}$ - Kanäle überlagert wurde.

### 5.3.1.3 Einfluss von NS 1608 auf den MaxiK-Kanal in CHO-Zellen

Wie in den humanen Makrophagen konnte auch an transfizierten CHO Zellen, die die  $\alpha$ -Subunit oder die  $\alpha$ - und  $\beta_4$ -Subunit des humanen MaxiK-Kanals heterolog exprimierten, bei Anwesenheit von NS 1608 in einem Konzentrationsbereich von 5 bis 50  $\mu$ M eine deutlich höhere Aktivität des Kanals im Vergleich zu den Kontrollmessungen ohne den Kanalaktivator beobachtet werden. Dies zeigte sich sowohl in einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit in outside-out Patchen als auch in einer deutlichen Zunahme des Gesamtstroms in der whole-cell Konfiguration. Abb.43 zeigt eine repräsentative Messung des Einflusses von NS 1608 auf den Gesamtstrom in CHO( $\alpha/\beta_4$ )-Zellen in der whole-cell Konfiguration. Schon nach weniger als 2 min nach Zugabe des Aktivators war eine Erhöhung der Kanalaktivität zu beobach-

---

<sup>12</sup> Persönliche Korrespondenz mit S.P. Olesen, 12.02.2002



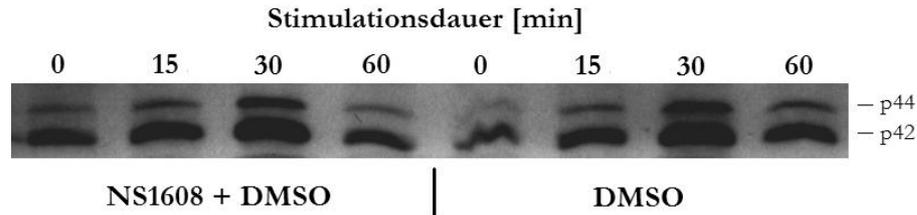
**Abbildung 43:** Einfluss des MaxiK Aktivators NS 1608 (25 µM) auf den Gesamtstrom in CHO Zellen mit der  $\alpha$ - und der  $\beta_4$ -Subunit des humanen MaxiK-Kanals. Links: Kontrolle, Mitte: nach Zugabe von NS 1608; Rechts: Berechneter Gesamtstrom durch die Zellmembran in Abhängigkeit von der angelegten Spannung.

teten. Ein ähnliches Verhalten war auch bei den Experimenten an humanen Makrophagen beobachtet worden.

#### 5.3.1.4 Einfluss von NS 1608 auf die ERK-Phosphorylierung und die NF- $\kappa$ B-Translokation in den CHO-Zellen

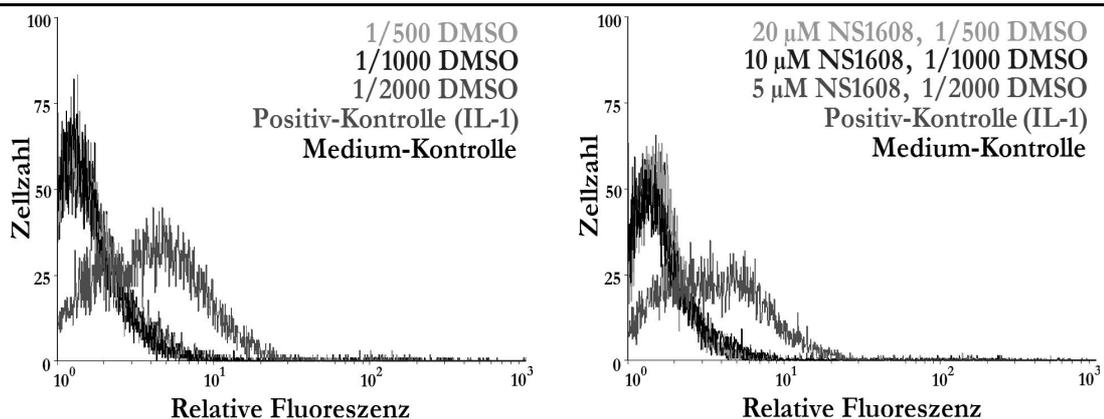
Auch in den CHO( $\alpha/\beta_4$ )-Zellen wurde untersucht, ob durch den Kanalaktivator NS 1608 ein Einfluss auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 sowie auf die NF- $\kappa$ B-Translokation ausgeübt wird. Die Zellen wurden dazu wie in [138] beschrieben stimuliert und behandelt, die Phosphorylierung der MAP-Kinasen mittels Western-Blot und die NF- $\kappa$ B-Translokation indirekt über die CD25-Expression im FACS bestimmt.

Die Zugabe von 5 µM NS 1608 führte zu eine Zunahme des phosphorylierten Anteils an ERK1/2 in einem ähnlichen Maße und mit vergleichbarer Kinetik wie bei Stimulation mit agonistischem LPS. Da allerdings auch bei der Lösungsmittelkontrolle mit 0,05 % DMSO diese Effekte zu beobachten waren, konnte aus diesen Daten keine Aussage über einen Effekt



**Abbildung 44:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von phosphorylierter (oben) und der gesamten (unten) ERK in CHO-Zellen mit dem MaxiK-Kanal ( $2,5 \cdot 10^5$  Zellen / Probe) in Abhängigkeit der Stimulationsdauer mit  $5 \mu\text{M}$  NS 1608 bzw. DMSO (0,05 %); Nachweis per Western-Blot.

des Kanalaktivators auf die ERK-Phosphorylierung gemacht werden. Eine CD25-Expression infolge der Stimulation mit NS 1608 (5, 10 und  $20 \mu\text{M}$ ) konnte, wie in Abb. 45 zu erkennen ist, in diesen Zellen ebenfalls nicht festgestellt werden, was darauf hindeutete, dass durch die Kanalaktivatoren keine Translokation von NF- $\kappa\text{B}$  induziert wurde. Nicht ausgeschlossen wurde dabei bislang die Möglichkeit, dass auch hier der blockierende Einfluss von NS 1608 auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle nach einer eventuell induzierten NF- $\kappa\text{B}$ -Translokation die Expression des Reporter-Proteins CD25 oder auch die NF- $\kappa\text{B}$ -Translokation selbst unterdrückte. Untersuchungen mit verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblockern, u.a. Nifedipine, Verapamil und Diltiazem, die in humanen Makrophagen zu einer Inhibierung der LPS-induzierten TNF $\alpha$ -Freisetzung



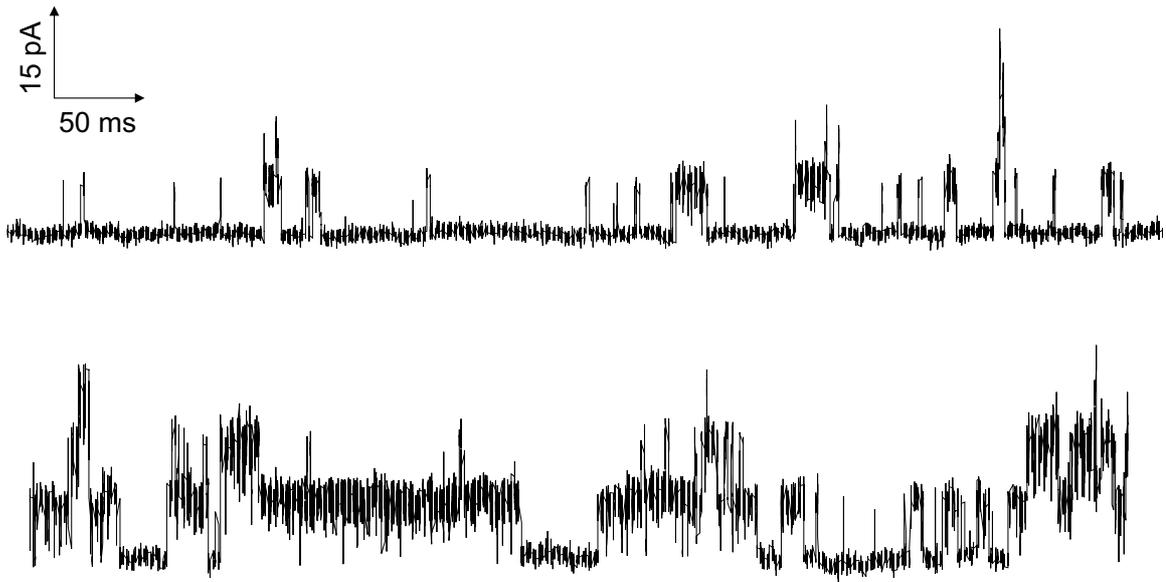
**Abbildung 45:** CD25-Expression in CHO( $\alpha/\beta_1$ )-Reporterzellen mit dem MaxiK-Kanal nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen NS 1608 (rechts) und des Lösungsmittels DMSO (links).

führten, deuten jedoch darauf hin, dass zumindest die NF- $\kappa$ B-Translokation nicht durch eine Blockade von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen beeinflusst wurde [31][115].

Zusammengefasst muss festgestellt werden, dass die Messungen mit den Substanzen NS 1608 und NS 004 keine eindeutigen Aussagen zuließen, ob die Aktivierung des MaxiK-Kanals ausreichend für eine Zellaktivierung war, da zum einen Effekte, die durch das Lösungsmittel DMSO hervorgerufen wurden, und zum anderen wahrscheinlich die Blockade von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen durch diese Substanzen eine klare Zuordnung und Abgrenzung der beobachteten Effekte verhinderte. Insbesondere die nicht induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen in Makrophagen deutet jedoch darauf hin, dass diese Signalwege über die Aktivierung des MaxiK-Kanals nicht getriggert oder, wie in Abb. 40 zu erkennen ist, sogar inhibiert werden. Das Ausbleiben der NF- $\kappa$ B-Translokation nach Stimulation mit NS 1608 liefert im besten Fall lediglich einen Hinweis darauf, dass die Kanalaktivierung nicht ausreicht, zumindest diesen Signalpfad zu aktivieren.

### 5.3.2 Phloretin

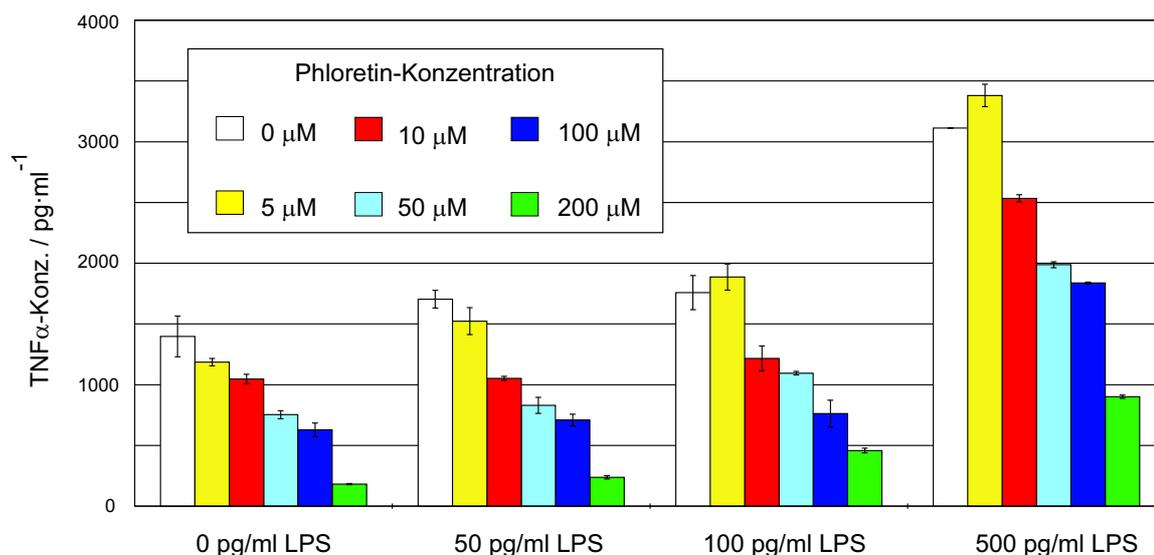
Es wurde untersucht, ob durch Zugabe von Phloretin, das als Aktivator für MaxiK-Kanäle in Nervenzellen beschrieben ist [98], die Aktivität des MaxiK-Kanals auch in humanen Makrophagen moduliert werden kann. Die Substanz wurde daher bei Patch-Clamp Experimenten in der outside-out Konfiguration in Konzentrationen von 50 bis 100  $\mu$ M eingesetzt. Nach Zugabe von Phloretin in einer Konzentration von 100  $\mu$ M konnte in 2 von 5 in outside-out Patches von humanen Blutmakrophagen eine Aktivierung des MaxiK-Kanals



**Abbildung 46:** Ausschnitt aus Zeitreihe eines outside-out Patches von humanen Makrophagen in Abwesenheit (oben) und Anwesenheit von Phloretin (100  $\mu\text{M}$ ; unten).  $V_{\text{hold}} = 60 \text{ mV}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} = 1,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ .

beobachtet werden. Im Vergleich mit der Substanz NS 1608 der Firma NeuroSearch war der aktivierende Effekt von Phloretin auf den Kanal jedoch deutlich schwächer.

In Zellkulturversuchen wurde untersucht, ob in Anwesenheit von Phloretin in humanen Immunzellen die Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  induziert werden, bzw. eine Verstärkung der LPS-induzierten  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung erzielt werden kann. Wie der Abb. 47 zu entnehmen ist, konnte durch die Stimulation von humanen Blutmakrophagen durch Phloretin in einem Konzentrationsbereich von 5 bis 200  $\mu\text{M}$  keine  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung induziert werden. Wurde Phloretin in diesen Konzentrationen zusammen mit LPS zu den Zellen gegeben, zeigte sich noch stärker als bei NS 1608 und NS 004 ein inhibierender Effekt auf die LPS-induzierte  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung der Zellen, der konzentrationsabhängig zunahm. Phloretin wirkte also einerseits als Aktivator des MaxiK-Kanal und andererseits als Inhibitor der LPS-induzierten  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung.



**Abbildung 47:** Einfluss von Phloretin auf die TNF $\alpha$ -Ausschüttung durch humane ausdifferenzierte Blutmakrophagen ( $10^6$  Zellen / ml).

Wie die Untersuchungen mit NS 1608 und NS 004 deuten auch diese Daten daraufhin, dass die Aktivierung des MaxiK-Kanals alleine in humanen Blutmakrophagen nicht ausreicht, die Zytokinproduktion und -freisetzung zu induzieren. Offenbar muss wie bei den Substanzen NS 1608 und NS 004 auch bei Phloretin bedacht werden, dass wahrscheinlich Effekte auf andere Zellfunktionen durch diese Substanz die Kanal-aktivierende Wirkung im Zellsystem beeinflussen. So ist bekannt, dass durch Phloretin zwei K<sup>+</sup>-Kanäle [98] und ebenfalls L-type Ca<sup>2+</sup>-Kanäle [144] geblockt werden und es einen inhibierenden Einfluss auf die Proteinkinase C (PKC) ausübt [97]. Gerade dieser Effekt könnte bei Phloretin die inhibitorische Wirkung erklären.

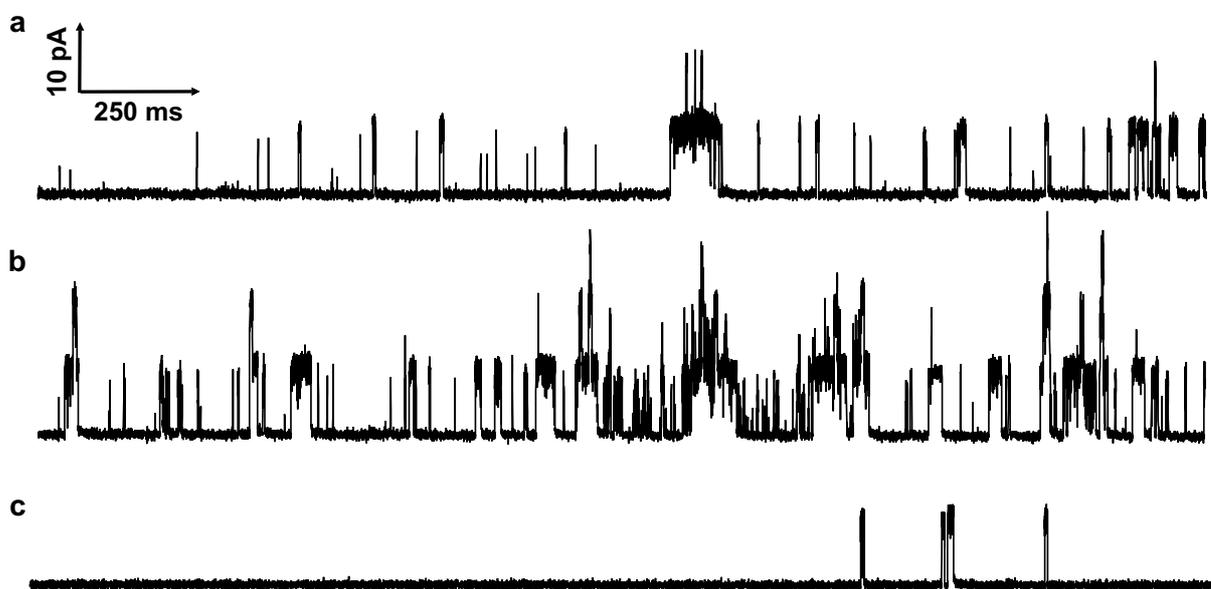
#### 5.4 Blockade des MaxiK-Kanals – Korrelation der elektrophysiologischen Daten und der Zellaktivierung

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Experimente dargestellt, in denen detailliert der Einfluss einer Blockade des MaxiK-Kanals in humanen Makrophagen und

auch in CHO-Zellen auf die Zellaktivierung durch Virulenzfaktoren untersucht wurde. Es wurden neben der  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung insbesondere der Einfluss der Kanalblockade auf die Aktivierung von MAPK untersucht, also auf Prozesse der intrazellulären Signalkaskaden, die nach einer Signalübertragung durch die Zytoplasmamembran getriggert werden und die schließlich zur Produktion von Zytokin-mRNA führen.

#### 5.4.1 LPS und Kanalblocker im Patch-Clamp Experiment

In meiner Diplomarbeit wurde gezeigt, dass LPS und die Kanalblockern TEA bzw. Chinin simultan appliziert unabhängig voneinander auf das Schalten des MaxiK-Kanals in der Membran humaner Makrophagen wirken [158], was darauf hindeutet, dass Blocker und LPS an verschiedenen Targets am Kanal wirken. Da es sich bei diesen Substanzen um unselektive Blocker handelt, wurde neben TEA der selektive MaxiK-Blocker Paxilline quasi als Standardblocker in den Zellkultur-Versuchen eingesetzt. Paxilline blockte in Patch-Clamp



**Abbildung 48:** Ausschnitt aus Zeitreihen von outside-out Patchen humaner Blutmakrophagen bei einem Membranpotential von 80 mV. Kontrolle (a), nach Zugabe von 20 ng/ml LPS (b) und nachträglicher Zugabe von Paxilline (5 $\mu$ M) (c).

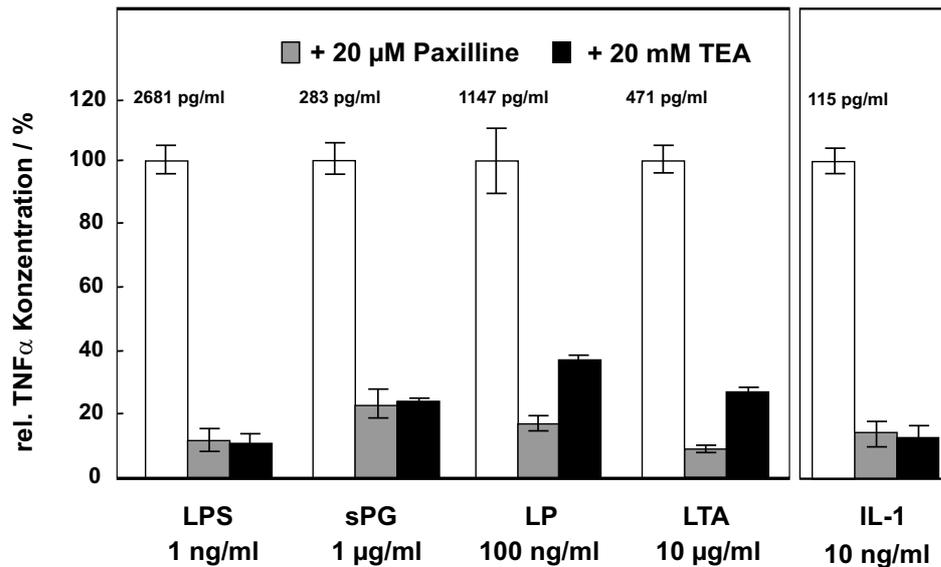
Experimenten in der outside-out und in der whole-cell Konfiguration bei einer effektiven Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  reproduzierbar den MaxiK-Kanal in humanen Makrophagen. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  wurde nicht in allen Fällen eine Blockade des Kanals beobachtet.

Wurde der Kanal vor der Zugabe von Paxilline durch die Zugabe von LPS aktiviert, konnte dieser durch die nachträgliche Applikation des Blockers komplett geblockt werden. In Abb. 48 ist anhand der Ausschnitte aus den aufgezeichneten Zeitreihen zu erkennen, dass die Aktivität des MaxiK-Kanals nach LPS-Zugabe im Vergleich zur Kontrolle zunahm. Die anschließende Zugabe von Paxilline (Badkonzentration = 5  $\mu\text{M}$ ) führte dann zu der nahezu vollständigen Inhibierung des Kanals, wie es in vergleichbaren Messungen auch für Paxilline allein zu beobachten war. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit den Daten aus der Diplomarbeit, die zeigen, dass ab einer bestimmten Konzentration eines Kanalblockers der MaxiK-Kanal auch nach Aktivierung durch LPS inhibiert werden kann [158]. Eine Aktivierung eines geblockten Kanals durch Paxilline konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Kanalblockade und die Aktivierung durch LPS stellen also weitgehend unabhängige Prozesse dar.

#### *5.4.2 $\text{K}^+$ -Kanalblocker inhibieren die Zytokinfreisetzung*

Im Zytokinassay wurde zusätzlich zu den oben schon vorgestellten Versuchen mit LPS, sPG und IL-1 auch für weitere Virulenzfaktoren, nämlich Lipopeptid und Lipoteichonsäure, untersucht, ob durch die Applikation von Kanalblockern die Zytokinproduktion beeinflusst werden konnte. Dazu wurden unter den üblichen Versuchsbedingungen humane Blutmakrophagen in An- bzw. Abwesenheit von Paxilline oder TEA mit verschiedenen



**Abbildung 49:** Einfluss der  $K^+$ -Kanalblocker Paxilline und TEA auf die Zytokinfreisetzung von Makrophagen ( $1 \cdot 10^5$  Zellen / ml) nach Stimulation mit verschiedenen bakteriellen Virulenzfaktoren und IL-1. Stimulationsdauer: 4 h. Die Daten für die Virulenzfaktoren bzw. für IL-1 stammen aus verschiedenen Stimulationsansätzen.

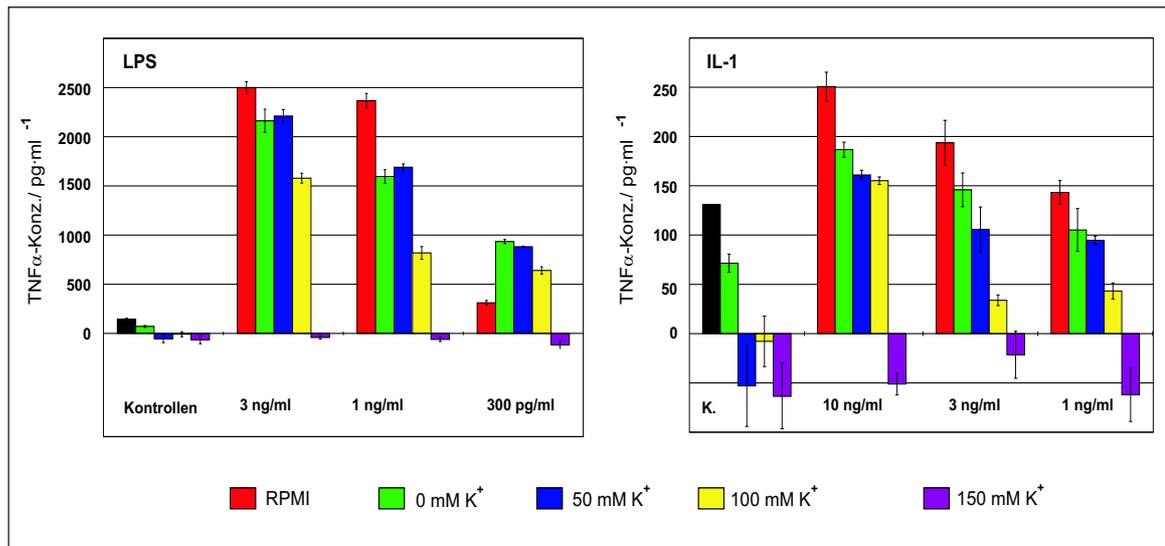
Konzentrationen der bakteriellen Produkte LPS, sPG, LP oder LTA oder mit IL-1 stimuliert.

Nach 4 h wurde die  $TNF\alpha$ -Konzentration im Überstand bestimmt.

Es zeigte sich, dass neben LPS und sPG auch die weiteren Virulenzfaktoren LP und LTA in konzentrationsabhängiger Weise humane Makrophagen zur  $TNF\alpha$ -Produktion und Freisetzung aktivierten. Durch die vorherige Applikation mit den MaxiK-Kanalblockern Paxilline und TEA konnte bei allen Virulenzfaktoren, aber auch bei IL-1 diese  $TNF\alpha$ -Freisetzung unterdrückt werden, wie in Abb. 49 für einen repräsentativen Datensatz gezeigt ist.

### 5.4.3 Einfluss des extrazellulären Kaliumkonzentration auf die Zellaktivierung

Eine Blockade von MaxiK-Kanälen hat zunächst einmal als direkte Folge, dass der Ausstrom von  $K^+$ -Ionen aus der Zelle entlang des elektrochemischen Gradienten unterbunden



**Abbildung 50:** Einfluss der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration auf die TNF $\alpha$ -Produktion in humanen Blutmakrophagen nach Stimulation mit LPS und IL-1. Die  $K^+$ -Konzentration wurde durch Mischung zweier Lösungen mit 150 mM KCl bzw. 150 mM NaCl eingestellt. Beide Lösungen enthielten zudem 10 mM HEPES, 1,2 mM MgCl $_2$ , 1 mM CaCl $_2$ , sowie 5 mM Na $_2$ HPO $_4$  bzw. 5 mM KH $_2$ PO $_4$  (pH = 7,2).

wird. Dieser Ausstrom muss sich daher anstatt der Blockade von  $K^+$ -Kanälen auch durch die Einebnung dieses Gradienten unterdrücken lassen. Daher wurde in Stimulationsexperimenten untersucht, wie sich eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf die LPS-induzierte Zellaktivierung und Zytokinfreisetzung auswirkt.

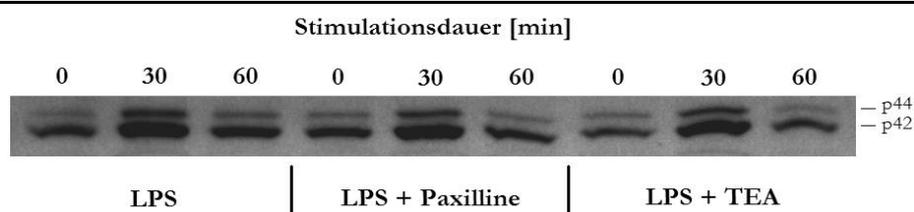
Dazu wurden Makrophagen zur Stimulation mit LPS in Zellmedien mit unterschiedlichem Kaliumgehalt überführt. Die Stimulationen mit verschiedenen Endotoxinkonzentrationen wurden dabei wie beschrieben durchgeführt. Die Überstände wurden nach 4 h Inkubationszeit abgenommen und der TNF $\alpha$ -Gehalt bestimmt.

Wie in Abb. 50 zu erkennen ist, führte eine im Vergleich zum normalen Zellkulturmedium ( $[K^+] \approx 5$  mM) erhöhte  $K^+$ -Konzentration von 100 bzw. 150 mM zu einer deutlichen Abnahme der TNF $\alpha$ -Freisetzung nach Stimulation mit LPS oder IL-1. Dass die Zellen in dieser unphysiologischen Umgebung „funktionstüchtig“ blieben, wurde zum einen durch die

Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau überprüft; zum anderen wurde untersucht, ob die Zellen nach einem erneuten Medienwechsel nach 4 h Stimulation bei erhöhter  $K^+$ -Konzentration noch in der Lage waren, auf die Stimulation mit LPS oder IL-1 mit einer Zytokinfreisetzung zu reagieren. Dies war der Fall. Da auch keine erhöhte Anzahl toter Zellen festzustellen war, konnte von einer prinzipiellen Funktionstüchtigkeit der Zellen ausgegangen werden.

#### 5.4.4 Einfluss der MaxiK-Blockade auf intrazelluläre Signalkaskaden

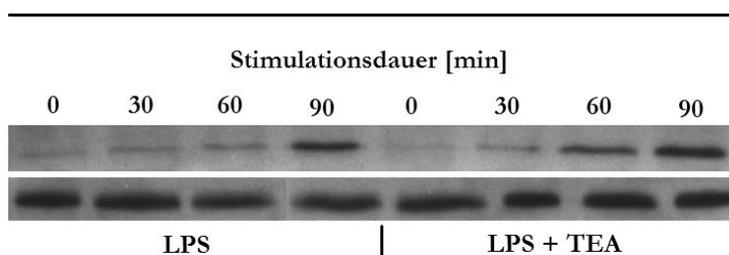
Ausgehend von den Ergebnissen aus der Dissertation von R. Blunck, dass durch die Blockade des MaxiK-Kanals in humanen Makrophagen durch Paxilline die Produktion von Zytokinen auf Transkriptionsebene inhibiert werden kann [16], wurde an humanen Blutmakrophagen und an CHO-Zellen mit und ohne MaxiK-Kanal untersucht, ob ein Einfluss der Kanalblockade auf Prozesse oberhalb der Bildung von Zytokin-mRNA in der Endotoxin-induzierten Signalkaskade beobachtet werden kann [138]. Dazu wurde der Einfluss der Blockade des MaxiK-Kanals auf die Endotoxin-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2, p38 und JNK und auf die NF- $\kappa$ B-Translokation untersucht. Dabei ergab sich sowohl bei den Makrophagen als auch bei beiden CHO-Zelllinien, dass durch die Stimulation der Zellen durch agonistisches LPS (2,5 bzw. 10 ng/ml) eine Phosphorylierung der MAP-



**Abbildung 51:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von phosphorylierter ERK in Makrophagen nach Stimulation mit 10 ng/ml LPS allein und in Anwesenheit von 10  $\mu$ M Paxilline bzw. 2 mM TEA. Nachweis per Western-Blot.

Kinasen ERK1/2 und p38 sowie die NF- $\kappa$ B-Translokation erfolgte. Eine reproduzierbare Phosphorylierung der JNK konnte nicht festgestellt werden. Die Inkubation mit Kanalblockern (10 min, 10 mM TEA oder 10  $\mu$ M Paxilline) vor der Stimulation mit LPS hatte bei keiner der untersuchten Zelltypen einen abschwächenden Einfluss auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen oder die NF- $\kappa$ B-Translokation. Auch fand keine inhibitorische Veränderung der Enzymkinetiken im Vergleich zu den stimulierten Zellen in Abwesenheit der Kanalblocker statt. Beispielhaft für diese Befunde ist in Abb. 51 und 52 der zeitliche Verlauf der Menge des phosphorylierten und unphosphorylierten ERK1/2 bzw. p38 in humanen Makrophagen nach der Stimulation mit LPS und in Anwesenheit von Kaliumkanalblockern dargestellt. Dabei fällt bei der Kinetik der p38-Bildung (Abb. 52) auf, dass in Anwesenheit des Kanalblockers TEA die LPS-induzierte p38-Phosphorylierung etwas früher einsetzt als ohne den Blocker.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass keiner der untersuchten Signalwege über die Aktivierung bzw. Inhibierung des MaxiK-Kanals reguliert wird. Es werden jedoch noch weitere intrazelluläre Pfade für die LPS-induzierte Zellaktivierung wie die Aktivierung der Src Kinasen oder der Proteinkinase C diskutiert, für die ein Einfluss des MaxiK-Kanals noch zu untersuchen ist. Bei den CHO-Zellen ist zudem zu bedenken, dass die Wildtyp Zellen nicht über den MaxiK-Kanal verfügen und somit ein Einfluss der Kanalblocker auf die Zellaktivierung nicht zu erwarten war. Da die CHO-Zellen auch ohne den MaxiK-Kanal aktivierbar

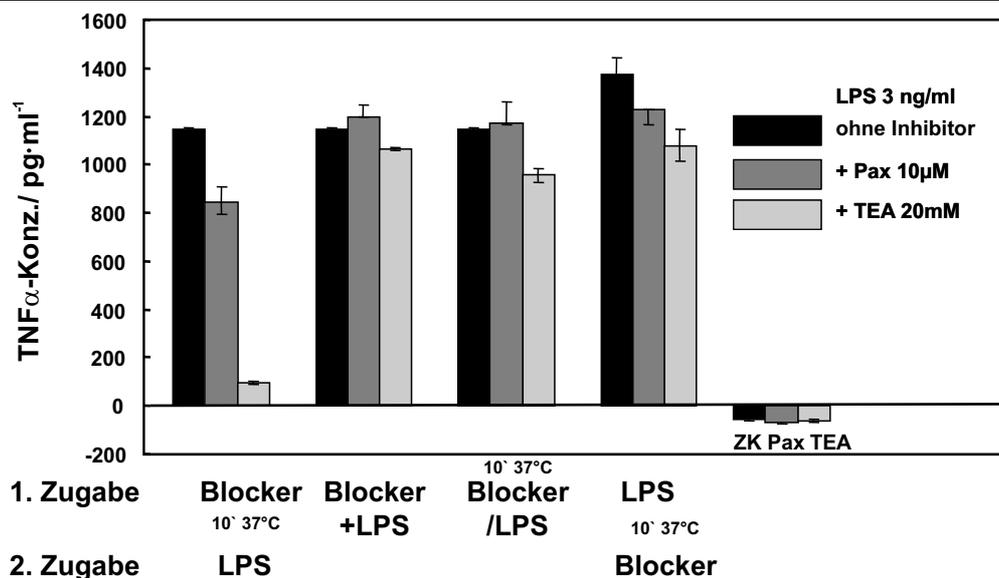


**Abbildung 52:** Zeitlicher Verlauf der Bildung von phosphorylierter p38 (oben) und der gesamten p38 (unten) in Makrophagen nach Stimulation mit LPS (10 ng/ml) in Ab- und Anwesenheit von TEA (10 mM).

sind, ist durch die Blockade des in die Zellen transfizierten Kanals eine Inhibierung des ja funktionellen Signalling-Apparates nicht zwingend zu erwarten.

#### 5.4.5 Wo greift die Kanalblockade inhibierend in die Zellaktivierung ein?

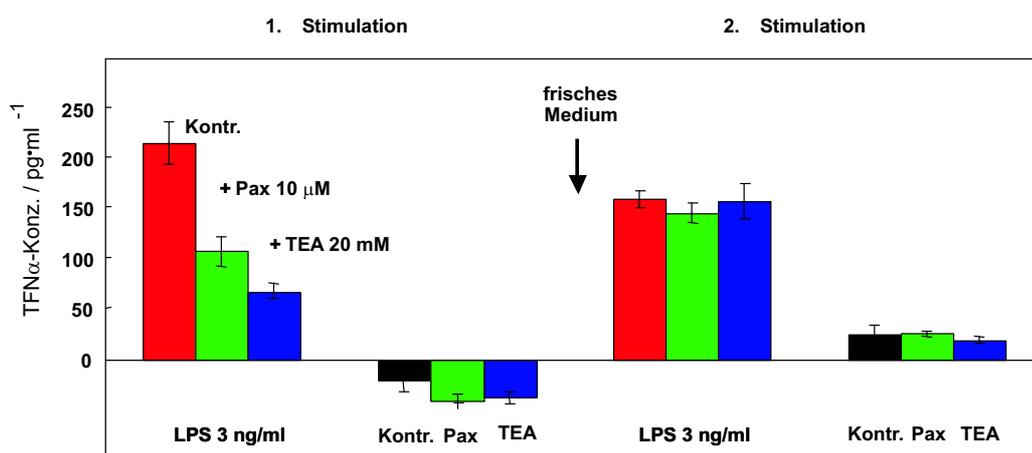
Falls die Aktivierung des MaxiK-Kanals in ausdifferenzierten humanen Blutmakrophagen ein initialer Schritt in der transmembranen Signaltransduktion und der Zellaktivierung darstellt, sollte durch eine Blockade des Kanals auch eine Störung in einem frühen Schritt der Zellaktivierung auftreten. Die im vorangehenden Abschnitt dargelegten Ergebnisse, dass keine der untersuchten intrazellulären Signalpfade durch die Kanalblockade gestört wurde, können diese Annahme nicht belegen. Dass jedoch durch die Kanalblocker eine Inhibierung der Zytokin-mRNA-Bildung inhibiert werden konnte [16], deutet darauf hin, dass die Kanalblockade in einem frühen Stadium der Zellaktivierung wirksam wirkt und nicht z.B. erst bei der Zytokinreifung, wie von Valev et al. als Mechanismus für die Inhibition der IL-1-Freisetzung durch hohe extrazelluläre  $K^+$ -Konzentrationen gezeigt [188].



**Abbildung 53:** Einfluss des Zeitpunktes der Zugabe der Kanalblocker und des LPS  $TNF\alpha$ -Ausschüttung in humanen Makrophagen.

Um einen Anhaltspunkt zu gewinnen, in welchem zeitlichen Stadium die Blockade des MaxiK-Kanals inhibierend auf die Zellaktivierung wirkt, wurde bei verschiedenen Zugabereihenfolgen von Blockern und LPS die TNF $\alpha$ -Ausschüttung humaner Blutmakrophagen untersucht. Wie in Abb. 53 zu erkennen ist, erfolgte eine Reduktion der LPS-induzierten TNF $\alpha$ -Ausschüttung nur dann, wenn die Kanalblocker TEA und Paxilline vor der Stimulation mit LPS zugegeben wurden. Bei gleichzeitiger Zugabe von Blocker und LPS konnte keine Abschwächung der TNF $\alpha$ -Ausschüttung beobachtet werden, unabhängig davon, ob LPS und Blocker für 10 min bei 37 °C vorinkubiert wurden oder nicht. Ebenso zeigten die Kanalblocker keine Wirkung, wenn sie nach der LPS-Stimulation appliziert wurden. Da aber der MaxiK-Kanal, wie in 5.4.1 gezeigt, auch dann inhibiert wird, wenn ein Kanalblocker nach der LPS-Zugabe appliziert wird, muss ein Effekt der Kanalblockade auf die LPS-induzierte Zellaktivierung sehr schnell auftreten.

Darauf deutet auch die Tatsache hin, dass im Stimulationsexperiment die Blocker ausgewaschen werden können. Um dies zu zeigen, wurden zu den Zellen wie üblich zunächst die



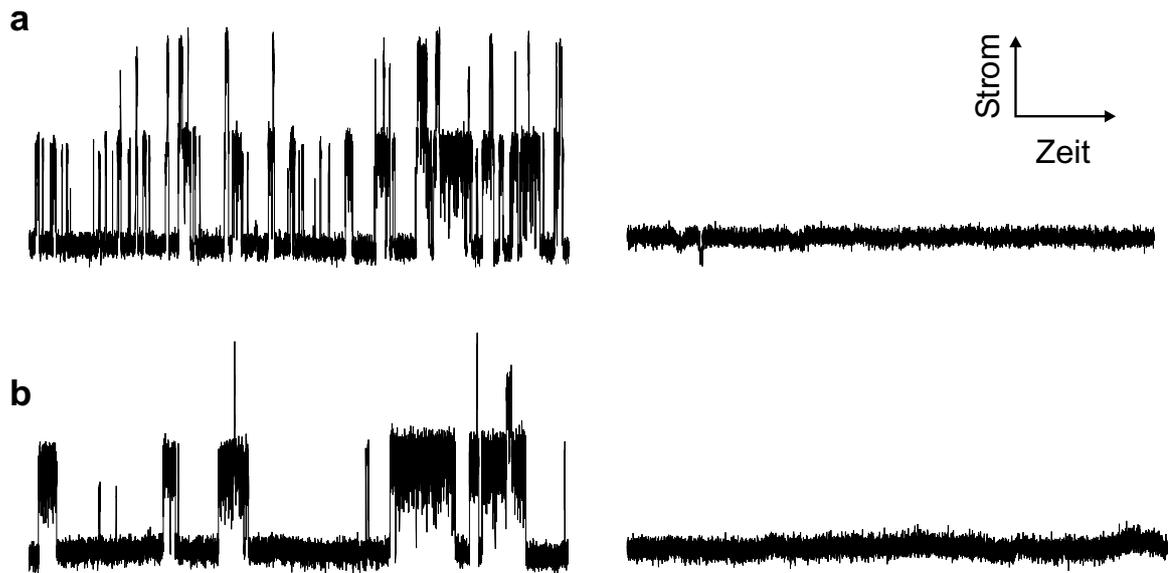
**Abbildung 54:** Stimulation von humanen Makrophagen mit LPS in Anwesenheit der Kanalblocker Paxilline und TEA (1. Stimulation). Nach 4 h wurden die Überstände abgenommen und die Zellen in frischem Medium ohne Blocker erneut mit LPS stimuliert und nach 4 h die TNF $\alpha$ -Konzentration im Überstand bestimmt (2. Stimulation).

Blocker Paxilline (10  $\mu$ M) und TEA (20 mM) zugegeben, dann folgte die Stimulation mit LPS (3 ng/ml). Nach 4 h Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und die Zellen gewaschen und dann erneut mit LPS stimuliert. Wie Abb. 54 zu entnehmen ist, konnte auch nach einer Inkubation der Zellen mit den Kanalblockern nach deren Entfernung die TNF $\alpha$ -Freisetzung durch LPS induziert werden.

Diese Daten untermauern die Hypothese, dass in einem frühen Stadium der Zellaktivierung durch LPS die Blockade des MaxiK-Kanals ein inhibierender Einfluss auf die Signalkaskade ausgeübt wird. Es liegt also nahe anzunehmen, dass entweder die Signaltransduktion durch die Membran oder eine der ersten intrazellulären Signalkaskaden durch die Kanalblockade gestört wird und nicht erst ein später ablaufender wie die Reifung oder Sekretion der Zytokine. Zur genauen Klärung dieser Frage sind jedoch weitere Versuche, z.B. zum Einfluss der Kanalblocker auf die Zytokinreifung, unerlässlich.

#### 5.4.6 Einsatz weiterer spezifischer MaxiK-Kanalblocker

Neben dem MaxiK-Kanalblocker Paxilline waren im Rahmen der Dissertation R. Bluncks auch die MaxiK-spezifischen Blocker Charybdotoxin (ChTX) [56] und Iberitoxin (IbTX) [52] eingesetzt worden. Beide Substanzen sind im Gegensatz zu dem Mycotoxin Paxilline Polypeptide, die im Gift von Skorpionen zu finden sind. Obwohl beide Substanzen (wenn auch in relativ hohen Konzentrationen) den Strom durch den MaxiK-Kanal inhibierten, konnte mit beiden im Stimulationsassay keine reproduzierbare Unterdrückung der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung erreicht werden [16]. Daher wurden mit Penitrem A und Verruculogen zwei Substanzen eingesetzt, die wie Paxilline zu der Gruppe der tremorgene Indol-Alkaloide gehören. Beide sind als hochselektive Blocker des MaxiK-Kanals beschrieben. In mikromolarer bzw. nanomolarer extrazellulärer Zugabe führen sie zu einer In-

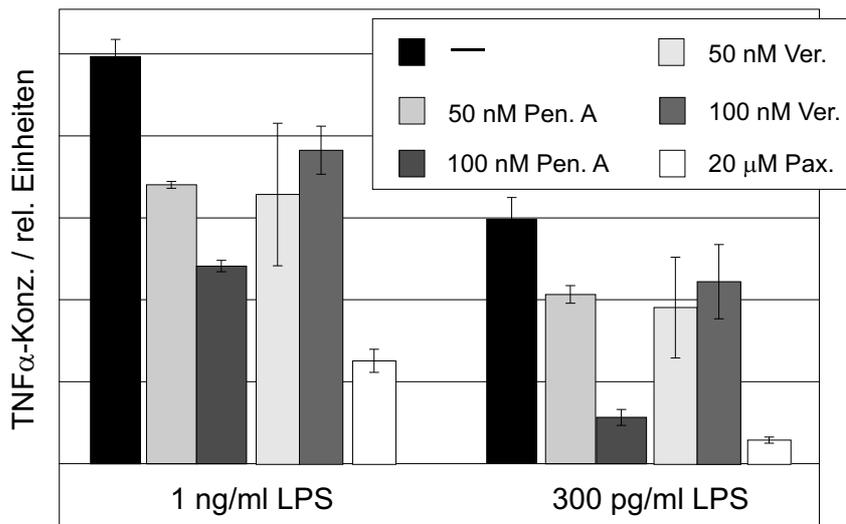


**Abbildung 55:** Einfluss der MaxiK-Kanalblocker Penitrem A (a) und Verruculogen (b). Links jeweils 1 s lange Ausschnitte der aufgezeichneten Zeitreihen der Kontrollmessungen, rechts nach Zugabe der Blocker (200 nM Penitrem A, 100 nM Verruculogen). Outside-out Patches bei einem Membranpotential von 90 mV.

aktivierung dieser Kanäle [96]. Es wurde daher der Einfluss von Penitrem A und Verruculogen auf die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung in humanen Blutmakrophagen untersucht. Begleitend zu den Zellkulturexperimenten wurden Patch-Clamp Versuche durchgeführt, um die blockierende Wirkung dieser Substanzen auf den MaxiK-Kanal zu überprüfen.

Bei einer Badkonzentration von 100 nM Penitrem A konnte in einem von zwei Versuchen, bei 200 nM bei allen Versuchen (n=4) in der outside-out Konfiguration eine nahezu vollständige Blockade des MaxiK-Kanals in der Zellmembran humaner Makrophagen beobachtet werden. Es ließ sich kein Einfluss des Blockers auf die Einzelkanalleitfähigkeit, die anhand des bei den blockierten Kanälen sporadischen auftretenden Öffnens bestimmt wurde, feststellen.

Nach der Zugabe des Blockers Verruculogen konnte in vier outside-out Patches bei einer Badkonzentration von 100 nM Verruculogen eine starke Verminderung der Offenwahrscheinlichkeit festgestellt werden, bei zwei Messungen trat ein kompletter Block des MaxiK-



**Abbildung 56:** Einfluss der spezifischen MaxiK-Kanalblocker Penitrem A, Verruculogen und Paxilline auf die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung von humanen Blutmakrophagen. Die unstimulierten Kontrollen sind zur besseren Übersicht nicht dargestellt.

Kanals auf, d.h. es wurden in den aufgezeichneten Zeitreihen keine Schaltereignisse gefunden. Bei einer Konzentration von 50 nM Verruculogen konnte eine deutliche Verringerung der Offenwahrscheinlichkeit beobachtet werden (n=1). Bei Konzentrationen oberhalb von 150 nM trat bei allen Messungen (n=3) eine nahezu komplette Inhibierung des Kanals auf. Anhand der Schaltvorgänge, die nach der Applikation dieses Blockers noch auftraten, konnte festgestellt werden, dass die Einzelkanalleitfähigkeit des MaxiK-Kanals durch diese Substanz im Falle des Öffnen des Kanals nicht beeinflusst wurde.

In den Zellkulturexperimenten konnten ebenso wie mit ChTX und IbTX keine eindeutigen Daten gewonnen werden, die eine Korrelation zwischen Kanalblockade und Inhibition der TNF $\alpha$ -Freisetzung aufgezeigt hätten. In einem Konzentrationsbereich, in dem durch Penitrem A und Verruculogen eine nahezu komplette Blockade des MaxiK-Kanals im Patch-Clamp Experiment zu erzielen war, also bei Konzentrationen von 100 nM, konnte lediglich in einem Stimulationsexperiment eine leicht abschwächende Wirkung dieser Blocker auf die

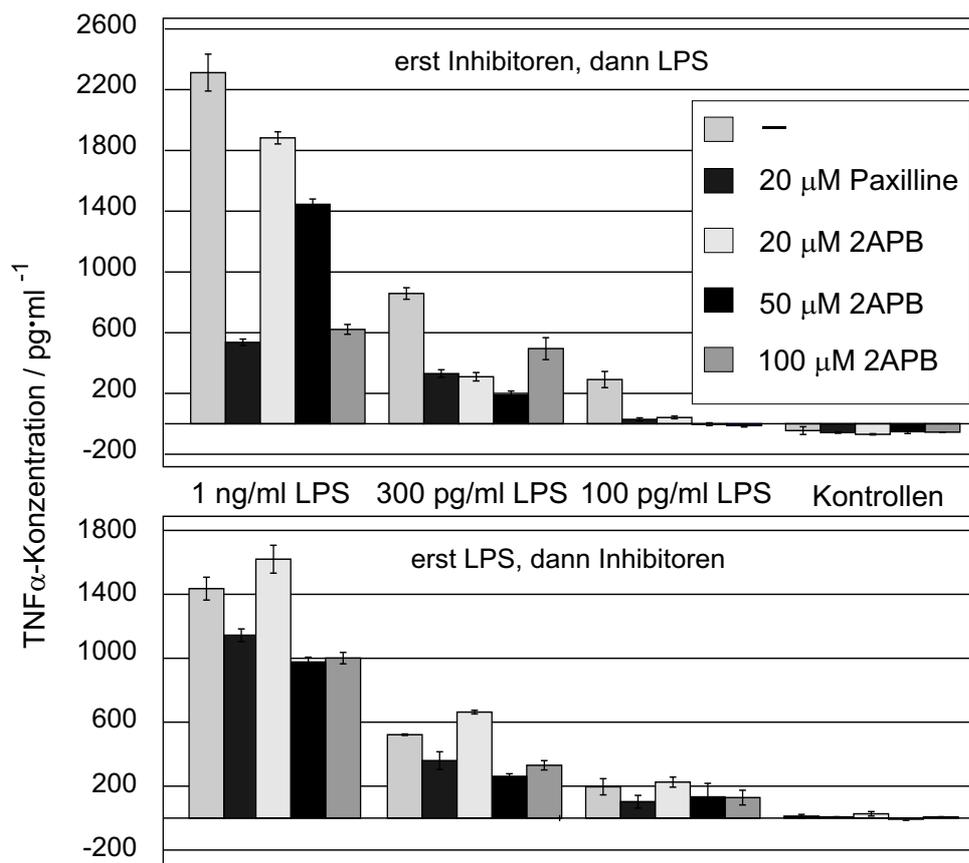
TNF $\alpha$ -Freisetzung von humanen Makrophagen beobachtet werden (Abb. 56). Versuche, in denen diese Blocker in Konzentrationen  $\geq 1 \mu\text{M}$  eingesetzt wurden, sind bisher nicht unternommen worden.

#### 5.4.7 Nebenwirkungen der eingesetzten Kanalblocker

Dass zwar mit Paxilline, nicht aber mit anderen spezifischen MaxiK-Kanalblockern reproduzierbar eine Inhibierung der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung zu beobachten war, kann verschiedene Gründe haben. Es ist zum einen möglich, dass auch in Bezug auf die Wirksamkeit dieser anderen Blocker eine Spenderabhängigkeit oder eine Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Makrophagen zum Tragen kommt. Möglich ist auch, dass, wie wiederholt bei Paxilline festgestellt, die Wirksamkeit der Substanzen von Ansatz zu Ansatz schwankt. So waren Paxilline und ChTX von der Firma Sigma deutlich weniger potent als die gleichen Substanzen von der Firma Alomone Labs (später wurden die Blocker generell von Alomone Labs bezogen). Eine weitere Möglichkeit für die nicht beobachtete Inhibierung der Zellaktivierung durch die anderen Blocker ist deutlich schwerwiegender; es ist nämlich denkbar, dass nicht der Kanal-blockierende Effekt des Paxillines zur Hemmung der Zytokinfreisetzung führte, sondern andere Prozesse in den Zellen beeinflusst werden. Über weitere Effekte von Paxilline ist bisher bekannt, dass es als Inhibitor des Inositol 1,4,5-Triphosphat-Rezeptor (IP3-R) wirkt [107]. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um einen IP3-sensitiven K<sup>+</sup>-aktivierten Ca<sup>2+</sup>-Kanal [123], der beim Öffnen Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Retikulum freisetzt und so zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt. Da gezeigt ist, dass in Anwesenheit von Curcumin, einem Inhibitor des IP3-R [41], in humanen Blutmonozyten und Alveolarmakrophagen die LPS- und PMA<sup>13</sup>-induzierte Freisetzung von

---

<sup>13</sup> PMA (Phorbol 12 myristate 13 acetate) aktiviert u.a. Proteinkinase C.



**Abbildung 57:** Einfluss von Paxilline und dem IP3-R-Antagonisten 2APB auf die LPS-induzierte Freisetzung von TNF $\alpha$  aus humanen Makrophagen. Oben: Die Zellen wurden mit dem Antagonisten für 10 min vorinkubiert, dann wurde das LPS; unten ist die Zugabereihenfolge anders herum.

pro-inflammatorischen Zytokinen inhibiert wird [1], wurde in humanen ausdifferenzierten Blutmakrophagen und RAW 264.7-Zellen untersucht, welche Wirkung der IP3-R-Antagonist 2APB (2-Aminoethoxydiphenylborat) [114] auf die LPS-induzierte Freisetzung von TNF $\alpha$  bzw. NO hatte.

Wie in Abb. 57 (oben) zu erkennen ist, führte die Zugabe von Paxilline (20  $\mu$ M) und auch von 2APB (20 bis 100  $\mu$ M) vor der Stimulation mit LPS zu einer deutlichen Abschwächung der TNF $\alpha$ -Freisetzung. Wurde zunächst LPS und dann die Antagonisten appliziert, fiel diese abschwächende Wirkung bei beiden Substanzen deutlich geringer aus (untern). Auch in den

LPS-stimulierten RAW-Zellen wurde ähnlich wie für Paxilline eine Inhibierung der NO-Freisetzung durch 2APB beobachtet (Abb.61 auf S. 126).

Diese Daten haben weit reichende Folgen für die bisher unternommenen Untersuchungen, da nicht mehr sicher gefolgert werden kann, dass die Blockade des MaxiK-Kanals durch Paxilline der entscheidende Faktor in der Unterdrückung der Zytokinfreisetzung ist. Vielmehr ist es ebenso möglich, dass über eine direkte Blockade des IP3-R durch Paxilline eine Steigerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration verhindert wird, was sich dann auf Schritte in der Zellaktivierung oder Zytokinprozessierung auswirkt. Ausgehend von den Literaturdaten und den in Kap. 5.3 gezeigten Daten zum Einfluss der verschiedenen Kanalaktivatoren und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblockern auf die Zytokinfreisetzung muss davon ausgegangen werden, dass eine Störung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation zu einer Unterdrückung der Zytokinfreisetzung führt. Da sich andererseits MaxiK-Kanäle und der IP3-R pharmakologisch ähneln [107] — auch Chinin blockt sowohl den IP3-R [124] als auch den MaxiK-Kanal [158] — und auch die Tatsache, dass MaxiK-Kanalaktivatoren  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle blockieren, ist es allerdings ebenfalls denkbar, dass der IP3-R-Antagonist 2APB nicht nur auf den IP3-R wirkt, sondern auch inhibierend auf MaxiK-Kanäle wirkt. Bei den bisher durchgeführten Patch-Clamp Messungen konnte jedoch kein Einfluss von 100  $\mu\text{M}$  2APB auf den MaxiK-Kanal in humanen Makrophagen und in CHO( $\alpha/\beta_4$ )-Zellen festgestellt werden.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann somit nicht klar bestimmt werden, welcher der Effekte von Paxilline zur Abschwächung der Zytokinfreisetzung führt.

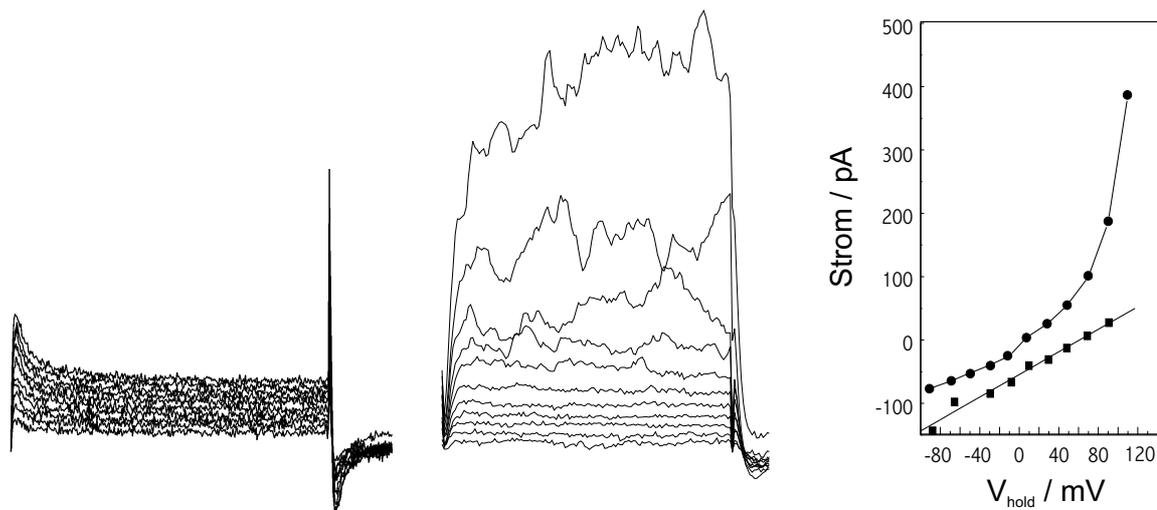
Als zweiter MaxiK-Kanalblocker wurde TEA eingesetzt, ein unselektiver Blocker spannungsabhängiger  $\text{K}^+$ -Kanäle. Bei diesem Blocker ist nicht auszuschließen, dass durch die unselektive Blockade anderer  $\text{K}^+$ -Kanäle in der Makrophagenmembran die Zellfunktionen

dahingehend gestört werden, dass die Reifung und Freisetzung von Zytokinen nach der Zellaktivierung inhibiert wird. Da Valev et al. bei einer erhöhten extrazellulären  $K^+$ -Konzentration die Inhibierung der IL- $1\beta$ -Freisetzung auf die Blockade der Zytokinreifung zurückführen konnten [188], ist ein ähnlicher Mechanismus bei TEA nicht auszuschließen, zumal bisher kein Hinweis gefunden wurde, dass TEA zu einer Inhibierung von Prozessen in der gesamten Signalkaskade vor der Zytokinfreisetzung führte. Auf eine unspezifische Wirkung des TEA auf andere Kanäle und damit auf die Zellfunktion deuten zudem die Stimulationsexperimente an murine RAW 264.7-Zellen hin (siehe 5.6). Um die NO-Freisetzung von diesen Zellen zu messen, wurden sie in Abwesenheit und Anwesenheit von TEA bzw. Paxilline für 48 h mit LPS stimuliert. Während die Zellen in Anwesenheit von Paxilline diese Zeit überlebten, starben die Zellen in Anwesenheit von TEA bei Konzentrationen von 20 mM nach 48 h zu einem großen Teil ab (Lebendzellzahl  $\approx$  50 %). Dies war auch der Fall, wenn bei diesen Zellen das Standardzellkulturmedium durch ein Medium mit erhöhter  $K^+$ -Konzentration ersetzt wurde. Auch hier starben die RAW 264.7-Zellen nach 48 h ab, was den Verdacht erhärtet, dass über eine unselektive Blockade von  $K^+$ -Kanälen die Zellfunktion durch TEA beeinträchtigt wird.

Damit ist für beiden verwendeten MaxiK-Kanalblockern ein Einfluss auf andere zelluläre Prozesse neben der Blockade des MaxiK-Kanals nicht auszuschließen.

### 5.5 Der Unterschied zwischen Monozyten und Makrophagen

Gallin und McKinney haben bereits gezeigt, dass der MaxiK-Kanal auf Blutmakrophagen während des Ausdifferenzierens hochreguliert wird [50]. Dies wurde auch von R. Blunck an den für die hier beschriebenen Versuche verwendeten Makrophagen in excised Patches gezeigt [17]. Weiterhin konnte auch in whole-cell Messungen an frisch isolierten elutrierten

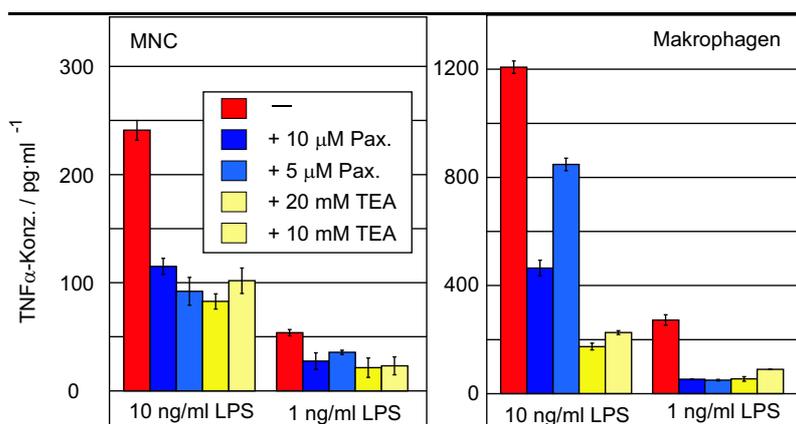


**Abbildung 58:** Whole-Cell Messungen an frisch isolierten Blutmonozyten (li.) und an ausdifferenzierten Makrophagen (mi.). Wie in der linearen Strom-Spannungskennlinie (re., quadratische Symbole) zu sehen ist, handelt es sich bei den in den Monozyten gemessenen Strömen lediglich um Leckströme.

MNC einen Tag nach dem Aussäen in die Petrischalen kein Hinweis auf ein Vorhandensein des MaxiK-Kanals gefunden werden (Abb. 39).<sup>14</sup> Im Gegensatz zur Hochregulation des MaxiK-Kanal gibt es jedoch Hinweise darauf, dass während des Aufdifferenzierens zumindest auf Alveolarmakrophagen die Zahl der TLR2 und TLR4 sowie CD14 auf der Zelloberfläche herunterreguliert wird (D. Drömann, 24. Arbeitstagung der norddeutschen Immunologen, 16. Nov. 2001, Borstel). Da jedoch Makrophagen dennoch sensitiver auf Virulenzfaktoren wie LPS reagieren, stellt sich die Frage, ob die Hochregulation des MaxiK-Kanals eine Verschiebung der signaltransduzierenden Modulatoren der Zellantwort von den TLR zum Kanal bedeutet.

<sup>14</sup> Wegen der Schwierigkeiten beim Patchen dieser im Vergleich zu ausdifferenzierten Makrophagen kleinen und weniger fest adhären Zellen wurden bisher keine Messungen durchgeführt, um das Vorhandensein anderer Ionenkanäle in diesen Zellen genauer zu untersuchen.

Da der MaxiK-Kanal in Monozyten — wenn überhaupt<sup>15</sup> — nur in sehr geringer Zahl auf der Zelloberfläche exprimiert wird, sollte man erwarten, dass ein deutlich geringerer Einfluss des MaxiK-Kanalinhibitors Paxilline und auch des unselektiven K<sup>+</sup>-Kanalblockers TEA auf die Virulenzfaktor-induzierte Zytokinausschüttung auftritt. In der Gesamtheit der durchgeführten Stimulationsexperimente war dies jedoch nicht zu beobachten. Vielmehr zeigte sich wie auch bei Makrophagen eine zum Teil deutliche Abschwächung der TNF $\alpha$ -Freisetzung (Abb. 59) in Anwesenheit der Blocker. Ebenso wurde diese auch bei MNC durch eine hohe extrazelluläre K<sup>+</sup>-Konzentration inhibiert (Abb. 60). Letzteres und der Einfluss von TEA auf die Zytokinfreisetzung könnte auf eine Blockade anderer K<sup>+</sup>-Kanäle in den Zellen hinweisen. Allerdings gibt es wegen der Schwierigkeiten bei Patch-Clamp Messungen in der Literatur kaum direkte Hinweise auf K<sup>+</sup>-Kanäle in frisch isolierten MNC. Es ist auf diesen Zellen ein einwärtsgerichteter K<sup>+</sup>-Kanal beschrieben [50], und es ist möglich, dass ein unregelmäßig auf Makrophagen auftretender auswärtsgerichteter Kanal [49][158] auch auf frisch isolierten MNC exprimiert ist. Ausgehend von Daten an ähnlichen Kanälen in humanen THP-1 Monozyten ist anzunehmen, dass dieser Kanal durch TEA geblockt werden kann [91]. Die inhibierende Wirkung des Paxillines in Monozyten kann allerdings auch dafür sprechen, dass



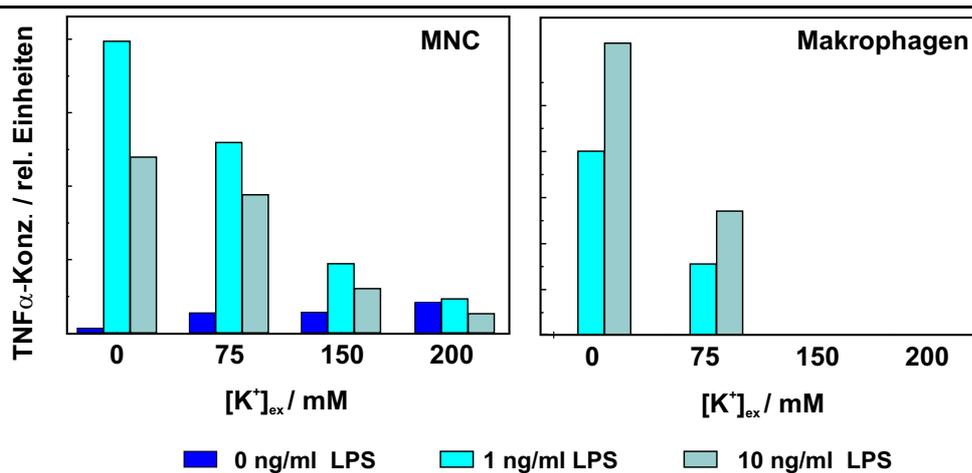
**Abbildung 59:** Einfluss der Kanalblocker Paxilline und TEA auf die TNF $\alpha$ -Freisetzung in frisch isolierten MNC (li.) und ausdifferenzierten Makrophagen (re.). Die Kontrollen sind zur besseren Übersicht nicht abgebildet.

15 Die Versuchreihen zum Nachweis einer möglichen Regulation der MaxiK-mRNA in Monozyten während des Differenzierens zu Makrophagen haben in unserer Laborgruppe gerade begonnen. Mit ersten Ergebnissen zu dieser Fragestellung ist in Kürze zu rechnen.

ein nicht mit der Kanalblockade assoziierter Effekt dieser Substanz für die Inhibierung der Zytokinfreisetzung verantwortlich war, wie schon in 5.4.7 diskutiert, da eine Blockade anderer  $K^+$ -Kanäle durch Paxilline bisher nicht beschrieben ist, allerdings ein Einfluss auf die Regulation der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration.

## 5.6 Untersuchungen im Maussystem

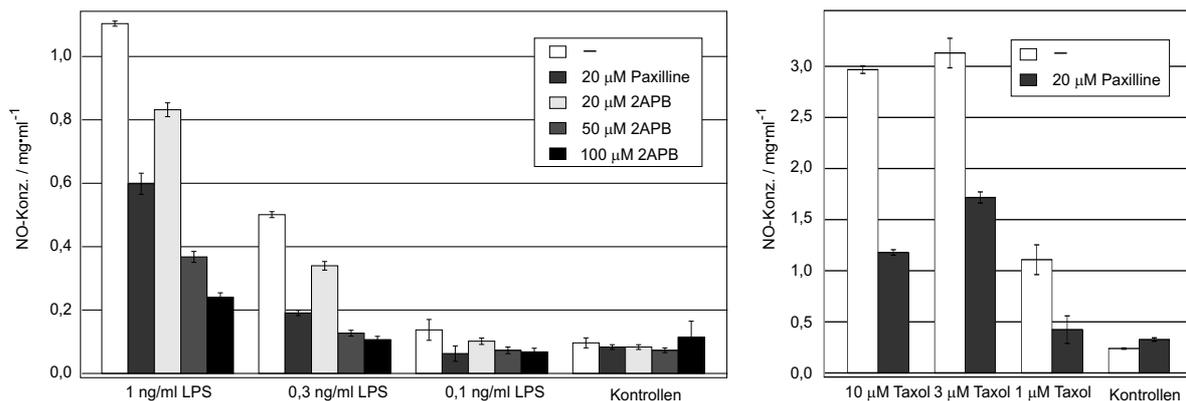
Neben den molekularbiologischen Ansätzen, also der Konstruktion von geeigneten Zellsystemen, sind genetisch veränderte Mäuse, sogenannte Knock-out Mäuse, das wichtigste Modellsystem zur Beantwortung immunologischer Fragestellungen. Daher ist es konsequent zu untersuchen, ob auch in diesen Organismen Kaliumkanäle an der Aktivierung von Immunzellen durch bakterielle Virulenzfaktoren, insbesondere LPS, beteiligt sind. Es wurde in Zusammenarbeit mit M. Müller am Institut für Molekulare Medizin und Zellforschung der Universität Freiburg der Einfluss des MaxiK-Kanalblockers Paxilline auf die Aktivierung von Mausmakrophagen untersucht. Dazu wurden murine Knochenmarkmakrophagen (BMDM) des LPS-sensitiven Mausstammes C57Bl/10 ScSn und des LPS-insensitiven



**Abbildung 60:** Einfluss der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration auf die LPS-induzierte  $TNF\alpha$ -Freisetzung in frischen Blutmonocyten und ausdifferenzierten Makrophagen. Die  $TNF\alpha$ -Menge bei der jeweils stärksten Zytokinausschüttung ist jeweils als 100 % gesetzt worden; die anderen Werte wurden darauf normiert.

Stammes C57Bl/10 ScCr, der keinen funktionalen TLR4 exprimiert, in Anwesenheit und Abwesenheit von Paxilline mit endotoxisch aktivem LPS stimuliert. Per Western-Blot wurde die Bildung von phosphorylierter und unphosphorylierter ERK1/2 nachgewiesen sowie, basierend auf der Griess-Reaktion, die NO-Freisetzung gemessen. Dabei zeigte sich, dass in den LPS-sensitiven Stämmen erwartungsgemäß durch Stimulation mit 10 bis 1000 ng/ml LPS sowohl die ERK-Phosphorylierung als auch eine NO-Freisetzung induziert wurde. Durch gleichzeitige Inkubation mit Paxilline in den Konzentrationen 10, 20 und 40  $\mu\text{M}$  konnte die NO-Freisetzung konzentrationsabhängig inhibiert werden. Durch 20 und 40  $\mu\text{M}$  Paxilline konnte ebenfalls die Bildung von phosphorylierter ERK1 und ERK2 vollständig inhibiert werden. Bei den LPS-refraktären Zellen konnte nur durch die sehr große Menge von 1000 ng/ml LPS eine NO-Freisetzung induziert werden, die jedoch deutlich unter der Freisetzung bei den sensitiven Zellen lag. Diese Restaktivität konnte durch Paxilline (10  $\mu\text{M}$ ) völlig unterdrückt werden. Wie in den sensitiven Zellen fand auch in den refraktären Zellen durch die LPS-Stimulation überraschend eine deutliche Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung statt. Durch 40  $\mu\text{M}$  Paxilline konnte diese ebenfalls komplett geblockt werden. Neben der Tatsache, dass Paxilline in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt wurde, zeigte besonders die ERK-Phosphorylierung der refraktären Zellen, die sich in anderen Experimenten an diesen Zellen nicht bestätigte [126], dass diese Versuchsreihen lediglich als Vorversuche betrachtet werden durften.

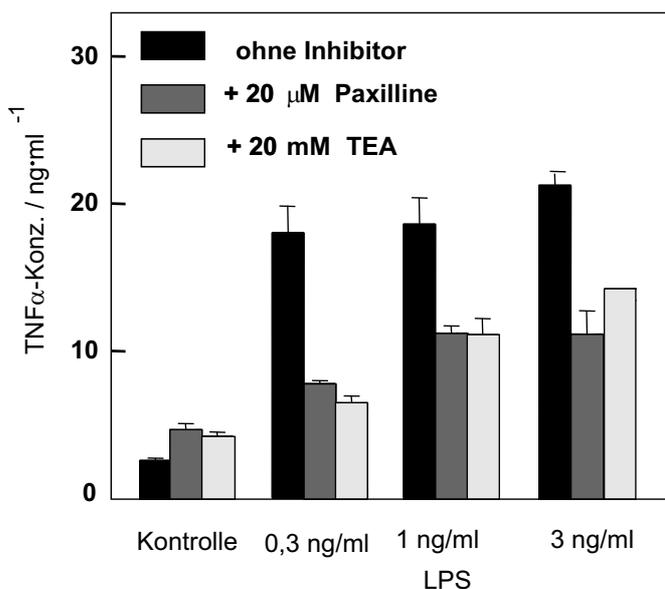
Ausgehend von diesen Hinweisen wurde in RAW 264.7-Zellen, einer murinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie, die sehr sensitiv auf LPS reagiert, der Einfluss von TEA, Paxilline und des IP3-Rezeptorantagonisten 2APB auf die NO-Freisetzung nach Stimulation der Zellen untersucht. Neben LPS wurde hier als Aktivator der Zellantwort der TLR4-Agonist Ta-



**Abbildung 61:** Einfluss des MaxiK-Kanalblockers Paxilline und des IP3-Rezeptorantagonisten 2APB auf die NO-Freisetzung in LPS-stimulierten RAW 264.7-Zellen und von Paxilline auf bzw. Taxol-stimulierte RAW 264.7-Zellen ( $2 \cdot 10^5$  Zellen / Well, mit IFN $\gamma$  geprimt, 24 h stimuliert).

xol [90] eingesetzt, der in murinen Zellen wie LPS zu einer Zellaktivierung und der damit verbundenen Ausschüttung von Botenstoffen wie Zytokinen oder NO führt [35][36].

Wie in Abb. 61 an einem repräsentativen Datensatz zu erkennen, kam es nach 24 h Stimulation sowohl durch LPS als auch durch Taxol zu einer konzentrationsabhängigen NO-Freisetzung in den RAW 264.7-Zellen. Bei beiden Aktivatoren führte die Applikation von 20 µM Paxilline zu einer deutlichen Verringerung der freigesetzten NO-Menge. Durch den IP3-Rezeptorantagonisten 2APB kam es zu einer konzentrationsabhängigen Abschwächung der NO-Ausschüttung. Dies erhärtet den Verdacht, dass nicht nur die blockierende Wirkung dieser Substanz auf den MaxiK-Kanal für die Abschwächung der Freisetzung von Mediatoren verantwortlich ist, sondern auch dessen antagonistische Wirkung auf den IP3-Rezeptor. Wurden die Zellen mit 20 mM TEA für 24 h inkubiert, führte dieses zum Absterben fast aller Zellen. Auch eine Inkubation in einem Medium mit erhöhtem K<sup>+</sup>-Gehalt bewirkte diesen Effekt, was darauf hindeutete, dass durch eine unspezifische Blockade verschiedener K<sup>+</sup>-Kanäle in diesen Zellen deren Funktion grundlegend gestört wurde. Die Lebendzellzahl in Gegenwart von Paxilline und 2APB lag dagegen nur unwesentlich unter der der Kontrollen.



**Abbildung 62:** Einfluss von TEA und Paxilline auf die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung in RAW 264.7-Zellen nach 4 h Stimulation.

In Zusammenarbeit mit Dr. N. Reiling aus der Laborgruppe Molekulare Infektiologie des FZB wurde außerdem der Einfluss der Kanalblocker auf die TNF $\alpha$ -Freisetzung in diesen Zellen untersucht und festgestellt, dass sowohl durch TEA (20 mM) als auch Paxilline (20  $\mu$ M) die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung abgeschwächt wurde (Abb. ). Da für diese Bestimmung aus dem Zellansatz nach 4 h ein Teil der Überstände aus den Wells abgenommen wurde, wurde keine Bestimmung der Lebendzellzahl durchgeführt, so dass die reduzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung in Gegenwart von TEA möglicherweise auf eine geringere Zahl noch lebender Zellen zurückzuführen war. Desweiteren wurde an murinen Knochenmarkmakrophagen des Stammes BALB/c untersucht, welchen Einfluss die MaxiK-Kanalblocker Paxilline und TEA auf die Aktivierung dieser Zellen hatten. Dazu wurden die Zellen zum einen mit LPS (10 ng/ml) und zum anderen mit einem Stamm des Mykobakteriums *M. avium*<sup>16</sup> stimuliert. Beide Stimuli führten zu einer Aktivierung der Zellen und der damit verbundenen Freisetzung von TNF $\alpha$ . Diese Zytokinfreisetzung konnte bei keinem der beiden Stimuli durch

<sup>16</sup> Mycobakterien aktivieren Makrophagen TLR2-vermittelt.

Paxilline (5  $\mu\text{M}$ ) oder TEA (20 mM) inhibiert werden. Auch konnte kein abschwächender Einfluss der Kanalblocker auf die induzierte ERK1/2- und p38-Phosphorylierung in den Mauszellen beobachtet werden. In parallel dazu durchgeführten Versuchen an humanen Blutmakrophagen konnte dagegen in Übereinstimmung mit den in Kap. 5.4.2 dargestellten Ergebnissen die Zytokinfreisetzung nach Stimulation mit LPS und *M. avium* durch die Kanalblocker TEA und Paxilline signifikant unterbunden werden. Dass keine Inhibierung der ERK1/2- und p38-Phosphorylierung festgestellt wurde, widerspricht den oben vorgestellten Daten von M. Müller. Vielmehr zeigten sich deutliche Parallelen zu den Untersuchungen an humanen Makrophagen und CHO-Zellen, bei denen durch Kanalblocker ebenfalls keine Inhibition von MAPK nachzuweisen war.

Durch RT-PCR konnte in RAW 264.7, nicht aber in den BMDM der BALB/c-Mäuse die mRNA der  $\alpha$ -Subunit des (murinen) MaxiK-Kanal nachgewiesen werden. Diese Daten liefern eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede der Wirkung der Kanalblocker in den Stimulationsexperimenten. Da Paxilline in den BALB/c-Makrophagen keinen Einfluss auf die TNF $\alpha$ -Freisetzung hatte, könnte in diesen Zellen die Untersuchung des Einflusses des IP3-Rezeptorantagonisten 2APB auf die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung entscheidend zur Klärung der Frage beitragen, ob die MaxiK-Blockade durch Paxilline oder aber dessen Wirkung auf den IP3-Rezeptor und damit auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Regulation der Zellen die Zytokinfreisetzung in humanen Makrophagen und den RAW 264.7-Zellen verursacht.

In Patch-Clamp Versuchen an den RAW 264.7-Zellen konnten keine eindeutigen Hinweise auf die Expression des MaxiK-Kanals auf der Oberfläche dieser Zellen gefunden werden. Da das Patchen dieser Zellen sich allerdings bisher als problematisch erwiesen hat, sind in Zu-

---

kunft noch weitere Versuche im Hinblick auf diese Fragestellung zu unternehmen, insbesondere der Einsatz von Kanalblockern und –aktivatoren.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des MaxiK-Kanals in humanen ausdifferenzierten Blutmakrophagen für die Zellaktivierung durch mikrobielle Virulenzfaktoren und IL-1 zu untersuchen. Ausgehend von der Aktivierbarkeit des Kanals durch LPS Gram-negativer Bakterien sollte geklärt werden, ob auch andere Pathogen-assoziierte Faktoren einen aktivierenden Einfluss auf diesen Kanal ausüben und über welche Mechanismen eine Kanalaktivierung erfolgt. Ferner galt es zu untersuchen, ob die Kanalaktivierung als solche in humanen Blutmakrophagen zur Zytokinproduktion und -freisetzung führt. Basierend auf den bisherigen Hinweisen, dass die Blockade des Kanals die LPS-induzierte Zytokinausschüttung unterdrückt, sollte dies auch für weitere Virulenzfaktoren geprüft und der Einfluss der Kanalblockade auf intrazelluläre Prozesse der Zellaktivierung charakterisiert werden. Patch-Clamp Messungen an transfizierten Zelllinie sollten durchgeführt werden, um Modellsysteme für zukünftige Untersuchungen zu etablieren.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass in humanen Makrophagen der MaxiK-Kanal nicht nur bei der Aktivierung durch LPS, sondern auch durch andere Virulenzfaktoren wie sPG und IL-1 eine zentrale Rolle spielt. So konnte an excised outside-out Patchen gezeigt werden, dass diese Substanzen zu einer Aktivierung des MaxiK-Kanals führen, und zwar als ein frühes, Membran-assoziiertes Ereignis bei der Zellaktivierung. In parallel dazu durchgeführten Stimulationsassays wurde gezeigt, dass — ähnlich wie bei LPS — auch hier eine Inkubation der Zellen mit Blockern des MaxiK-Kanals wie TEA und Paxilline zu einer Unterdrückung der Zytokinausschüttung führt. Zudem zeigte sich, dass auch die Zellaktivierung durch die Virulenzfaktoren Lipopeptid und LTA sowie durch Mycobakterien durch die Blockade des MaxiK-Kanals inhibiert werden konnte. Nicht nur durch die

Blockade von  $K^+$ -Kanälen, sondern auch durch die Verhinderung des  $K^+$ -Ausstroms durch eine erhöhte extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration konnte die  $TNF\alpha$ -Freisetzung in humanen ausdifferenzierten Makrophagen und in frisch isolierten Monozyten inhibiert werden. Damit ist gezeigt, dass die für die Prozesse der Zellaktivierung durch verschiedene Aktivatoren die Funktionalität des Kanals erforderlich ist. Dies wird durch die Zellkulturversuche in murinen Zellen bestätigt. In der makrophagenähnliche Zelllinie RAW 264.7, in denen durch PCR die mRNA des murinen MaxiK-Kanals nachgewiesen wurde, führte Paxilline sowohl zu einer Abschwächung der  $TNF\alpha$ -als auch der NO-Freisetzung. Auch in diesen Zellen wurde durch den Kanalblocker nicht nur die Freisetzung der Mediatoren nach Stimulation mit LPS inhibiert; auch bei Stimulation mit dem TLR4-Agonisten Taxol konnte die Freisetzung von NO durch Paxilline signifikant vermindert werden. Die Blockade des Kanals scheint damit unabhängig vom Stimulus zu einer Unterdrückung der Ausschüttung von Botenstoffen zu führen.

Um aufzuklären, auf welcher Ebene die Kanalblockade auf intrazelluläre Signalfade einwirkt, wurde Untersuchungen zum Einfluss der Blockade des MaxiK-Kanals auf intrazelluläre Prozesse bei der Zellaktivierung durchgeführt, die zeigten, dass in humanen Makrophagen die Kanalblockade auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK keinen Einfluss hat. Da aber in Anwesenheit von Paxilline die LPS-induzierte  $TNF\alpha$ -mRNA-Bildung unterdrückt wird, kann dies darauf hindeuten, dass über die Aktivierung des MaxiK-Kanals durch LPS ein weiterer, bisher nicht untersuchter Aktivierungspfad angeschaltet wird. Ein Einfluss von MaxiK-Blockern auf die Aktivierung von Src-Kinasen und Proteinkinasen ist unter diesem Gesichtspunkt noch zu untersuchen.

Es konnten keine Hinweise darauf gefunden werden, dass die Aktivierung des MaxiK-Kanals durch spezifische Aktivatoren zu einer Zellaktivierung führten. Da in diesen Versuchen je-

doch störende Nebeneffekte der eingesetzten Substanzen bzw. der Lösungsmittel auftraten, konnte diese Problematik nicht endgültig geklärt werden.

Es wurde in CHO-Zellen der MaxiK-Kanal mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Subunit funktional rekonstituiert. An diesen Zellen konnte eine Aktivierung des MaxiK-Kanals in excised outside-out Patchen durch IL-1 eindeutig belegt werden. Für die Aktivierbarkeit des Kanals in diesen Zellen durch LPS wurden erste Hinweise gefunden. Wie in den humanen Zellen konnte jedoch auch in diesen Zellen kein Einfluss von Kanalblockern auf die untersuchten intrazellulären Signalkaskaden festgestellt werden.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Aktivierung des MaxiK-Kanals durch verschiedene Liganden der TLR/IL-1-Rezeptorfamilie induziert werden kann. Da die Gemeinsamkeit dieser Aktivatoren — LPS, sPG und IL-1 — nicht in ihren physikochemischen Eigenschaften liegt, sondern darin, dass sie TIR-Domänen-vermittelt transmembran die Aktivierung intrazellulären Signalkaskaden triggern, ist es möglich, dass über diesen Weg, d.h. über einen gemeinsamen Mechanismus die Kanalaktivierung induziert wird. Da es in der Literatur viele Hinweise darauf gibt, dass MaxiK-Kanäle über verschiedene, auch Membran-assoziierte Proteinkinasen moduliert werden können und diese auch in die Zellaktivierung durch Virulenzfaktoren involviert sind, liegt es nahe, einen solchen Weg für die Kanalaktivierung anzunehmen. Erste Daten mit dem Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin und die Aktivierbarkeit des rekonstituierten Kanals in CHO-Zellen durch IL-1 erhärten diese Hypothese.

Eine Kanalaktivierung über intrazelluläre Pfade stellt allerdings ein sekundäres Ereignis dar und widerspricht zunächst der These, dass es sich bei der MaxiK-Kanalaktivierung um ein initiales Ereignis im transmembranen Signalling handelt. Die ausbleibende Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden durch spezifische MaxiK-Aktivatoren in CHO-Zellen und

humanen Makrophagen und der Zytokinproduktion in Makrophagen deuten zudem darauf hin, dass die Aktivierung des Kanals alleine nicht hinreichend für eine Zellaktivierung ist.

Damit stellt sich die Frage, welche Bedeutung der MaxiK-Kanal in humanen Makrophagen bei der transmembranen Signaltransduktion und bei der Zellaktivierung spielt. Es ist denkbar, dass die Funktion des MaxiK-Kanals in einer Modulation der Zellaktivierung liegt. Im Gegensatz zu TLR4 und CD14, die bei der Differenzierung humaner Monozyten zu Makrophagen herunterreguliert werden, steigt die Zahl der MaxiK-Kanäle auf der Zelloberfläche im Laufe der Differenzierung an. Somit könnte es sein, dass neben dem Signalpfad über die TLR die Aktivierung des MaxiK-Kanals — möglicherweise direkt durch in die Membran eingebautes LPS — regulierend auf die Zellaktivierung wirkt.

Schwer einzuschätzen ist beim derzeitigen Kenntnisstand die Target-Spezifität der MaxiK-Kanalblocker. Zum einen wurde kein Einfluss der Blocker TEA und Paxilline auf verschiedene intrazelluläre Signalpfade oberhalb der mRNA-Bildung von Zytokinen gefunden. Das könnte daran liegen, dass durch die Blockierung des MaxiK-Kanals ein alternativer, bisher nicht unter diesem Gesichtspunkt untersuchter Signalweg gestört wird. Zum anderen ist es jedoch auch möglich, dass nicht die beobachtete Unterdrückung der TNF $\alpha$ -Freisetzung nicht auf die MaxiK-Kanal blockierende Wirkung von TEA und Paxilline zurückzuführen ist. Insbesondere für Paxilline lässt sich z.Zt. nicht ausschließen, dass die Inhibierung der TNF $\alpha$ -Freisetzung auf einer Inhibierung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Signallings und der daraus resultierenden Verhinderung der Zytokinsekretion beruht. Klärend könnten hier Versuche an murinen BMDM wirken, die keinen MaxiK-Kanal besitzen und somit eine Trennung der beiden Effekte ermöglichen sollten.

Dass auch die MaxiK-Kanalaktivatoren NS 1608 und NS 004 inhibierend auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle wirkten und zu einer Inhibition der  $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung führten, macht deutlich, dass der Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei der Zellaktivierung bei weiteren Untersuchungen erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte.

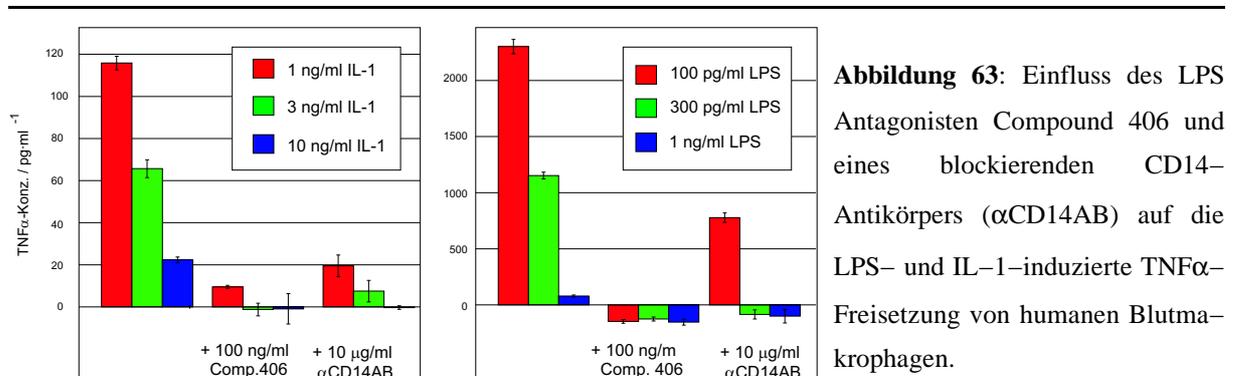
Im Laufe dieser Arbeit ist deutlich geworden, dass beim jetzigen Kenntnisstand auf das Hinzuziehen weiterer, insbesondere biochemischer Techniken nicht verzichtet werden kann. An erster Stelle steht hier die Untersuchung, ob humane frisch isolierte MNC tatsächlich keine MaxiK-mRNA besitzen. Nach dem Nachweis der mRNA des MaxiK-Kanals in verschiedenen murinen Zellen sollte die Expression des MaxiK-Kanals an der Oberfläche verschiedener Zellen untersucht werden. Da seit einiger Zeit Antikörper gegen verschiedene Epitope des MaxiK-Kanals kommerziell erhältlich sind, können diese Experimente alsbald durchgeführt werden. Insbesondere die Fragestellung, ob durch bakterielle Virulenzfaktoren und IL-1 möglicherweise eine Phosphorylierung des Kanals stattfindet, sollte so zu klären sein. Durch Immunokoprecipitation ließe sich zudem untersuchen, ob die Aktivierung membranständiger Kinasen mit einer eventuellen Kanalphosphorylierung einhergeht. Weitere Patch-Clamp Versuche zum möglichen Einfluss der Phosphorylierung auf die Aktivität des Kanals sollten diesen Ansatz ergänzen.

Sowohl auf biochemischem als auch auf biophysikalischem Wege über die Fluoreszenzmarkierung der verschiedenen Proteine sollte untersucht werden, ob in der Membran von Immunzellen eine Kollokalisierung des MaxiK-Kanals mit Rezeptorproteinen wie TLRs nachzuweisen ist.

Um einen möglichen direkten membranvermittelten Einfluss von LPS auf das Schalten des MaxiK-Kanals zu untersuchen, wäre eine Rekonstituierung des Kanals in künstliche Membransysteme, wie sie in unserer Arbeitsgruppe etabliert sind, denkbar.

In der Laborgruppe Biophysik wird zur Zeit der Einsatz eines Rasterkraftmikroskopes (AFM) zur Untersuchung der Struktur biologischer Membranen und eingebetteter Membranproteine etabliert. Mit dieser Technik sollte eine biophysikalische Untersuchung zur Zusammensetzung von Membranpatches und Wechselwirkungen z.B. von LPS und membrangebundenen Rezeptormolekülen möglich sein, die die molekularbiologischen und biochemischen Techniken zur Untersuchung dieser Fragen sinnvoll ergänzen würde.

Nach wie vor nicht zufrieden stellend geklärt ist der Einfluss der Aktivierung bzw. Blockade des MaxiK-Kanals auf die intrazellulären Signalkaskaden und Prozesse der Zellaktivierung. Da jedoch die entsprechenden Methoden z.B. zum Nachweis intrazellulärer Zytokine z.Zt. in der Laborgruppe etabliert werden, sollte in naher Zukunft eine Antwort auf diese Fragen gegeben werden können. Zur genaueren Aufklärung der Interaktionen der verschiedenen Rezeptormoleküle und des MaxiK-Kanals wird die Konstruktion geeignet kotransfizierter Zelllinien beitragen. In diesem Zusammenhang ist es besonders interessant, dass in Anwesenheit eines inhibierenden antiCD14-Antikörpers und auch in Anwesenheit des antagonistischen Lipid A-Analogons compound 406 nicht nur, wie hinlänglich bekannt ist, die LPS-



induzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung inhibiert werden kann, sondern auch die IL-1-induzierte (Abb. 63). Dies lässt sich anhand der bisher bekannten Daten zum Zusammenwirken der Signalproteine und der Mechanismen des Antagonismus bestimmter LPS-Strukturen nicht erklären und zeigt, dass offenbar ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Rezeptor- und Signaltransduktionsmoleküle und ihrer Antagonisten bei der Stimulation von Makrophagen durch Virulenzfaktoren aufzuklären ist.

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Abe Y, Hashimoto S, Horie T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res* 1999; 39(1):41–47.
- 2 Aggarwal SK, MacKinnon R. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 1996; 16(6):1169–1177.
- 3 Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Adv Immunol* 2001; 78:1–56.
- 4 Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol* 2001; 2(8):675–680.
- 5 Albertsen A, Hansen UP. Estimation of kinetic rate constants from multi-channel recordings by a direct fit of the time series. *Biophys J* 1994; 67:1393–1403.
- 6 Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L. The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 1998; 273(49):32950–32956.
- 7 Armant MA, Fenton MJ. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol* 2002; 3(8):3011.1–3011.6.
- 8 Bader MF, Taupenot L, Ulrich G, Aunis D, Ciesielski-Treska J. Bacterial endotoxin induces [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients and changes the organization of actin in microglia. *Glia* 1994; 11(4):336–344.
- 9 Barros F, Gomez-Varela D, Vilorio CG, Palomera T, Giraldez T, Pena P de la. Modulation of human erg K<sup>+</sup> channel gating by activation of a G protein-coupled receptor and protein kinase C. *J Physiol* 1998; 511(2):333–346.
- 10 Beaty CD, Franklin TL, Uehara Y, Wilson CB. Lipopolysaccharide -induced cytokine production in human monocytes: role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *Eur J Immunol* 1994; 24(6):1278–1284.
- 11 Becker S, Warren M K, Haskill S. Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum free cultures. *J Immuno* 1987; 139(11):3703–3709.
- 12 Behrens R, Nolting A, Reimann F, Schwarz M, Waldschütz R, Pongs O. hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel  $\beta$  subunit family. *FEBS Lett* 2000; 474:99–106.

- 13 Bezanilla F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 2000; 80(2):555–592.
- 14 Bhattacharyya J, Sayeed MM. Alternations in intracellular calcium during sepsis. *Indian J Physiol Pharmacol* 1997; 41(4):344–352.
- 15 Blondin C, Le Dur A, Cholley B, Caroff M, Haeffner-Cavaillon N. Lipopolysaccharide complexed with soluble CD14 binds to normal human monocytes. *Eur J Immunol* 1997; 27:3303–3309.
- 16 Blunck R. Ein neuer Signalübertragungsmechanismus für die Endotoxin-vermittelte Aktivierung von Makrophagen: der MaxiK-Kanal. 1999; Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades, Universität Kiel.
- 17 Blunck R, Scheel O, Müller M, Brandenburg K, Seitzer U, Seydel U. New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: involvement of a K<sup>+</sup> channel in transmembrane signaling. *J Immunol* 2001; 166:1009–1015.
- 18 Boulet I, Ralph S, Stanley E, Lock P, Dunn AR, Green SP, Phillips WA. Lipopolysaccharide – and interferon-gamma induced expression of hck and lyn tyrosine kinases in murine bone marrow-derived macrophages. *Oncogene* 1992; 7(4):703–710.
- 19 Brandenburg K, Seydel U, Schromm AB, Loppnow H, Koch MHJ, Rietschel ET. Conformation of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharide. *J Endotoxin Res* 1996; 3(3):173–178.
- 20 Bregestovski PD, Bolotina VN. Membrane fluidity and kinetics of Ca<sup>2+</sup>-dependent potassium channels. *Biomed Biochim Acta* 1989; 48:382–387.
- 21 Brenner R, Jegla TJ, Wickenden A, Liu Y, Aldrich RW. Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel  $\beta$  subunits, hKCNMB3 and hKCMNB4. *J Biol Chem* 2000; 275(9):6453–6461.
- 22 Caggiano AO, Kraig RP. Prostaglandin E2 and 4-aminopyridine prevent the lipopolysaccharide-induced outwardly rectifying potassium current and interleukin-1 $\beta$  production in cultured rat microglia. *J Neurochem* 1998; 70(6):2357–2368.
- 23 Cayabyab FS, Schlichter LC. Regulation of an ERG K<sup>+</sup> channel by Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2002; 277(16):13673–13681.
- 24 Cha A, Snyder GE, Selvin PR, Bezanilla F. Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature* 1999; 402:809–813.
- 25 Chen SJ, Wu CC, Yang SN, Lin CI, Yen MH. Abnormal activation of K<sup>+</sup> channels in aortic smooth muscle of rats with endotoxic shock: electrophysiological and functional evidence. *Brit J Pharmacol* 2000; 131:213–222.
- 26 Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4

- mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; 274:10689–10692.
- 27 Cohen J. TREM-1 in sepsis. *Lancet* 2001; 358:776–778.
- 28 Colomar A, Amedee T. ATP stimulation of P2X<sub>7</sub> receptors activates three different ionic conductances on cultured mouse Schwann cells. *Eur J Neurosci* 2001; 14:927–936.
- 29 Correia J da Silva, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 2001; 276:21129–21135.
- 30 Crutchley DJ, Conanan LB, Que BG. K<sup>+</sup> channel blockers inhibit Tissue-Factor expression by human monocytic cells. *Circ Res* 1995; 76(1):16–20.
- 31 Cuschieri J, Gourlay D, Garcia I, Jelacic S, Maier RV. Slow channel calcium inhibition blocks proinflammatory gene signaling and reduces macrophage responsiveness. *J Trauma* 2002; 52(3):434–442.
- 32 Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC. Modulation of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitritesynthesis in cholesterol enriched endothelial cell membranes. *Biochem Pharmacol* 1995; 49(11):1589–1600.
- 33 Delude RL, Yoshimura A, Ingalls RR, Golenbock DT. Construction of a lipopolysaccharide reporter cell line and its use in identifying mutants defective in endotoxin, but not TNF- $\alpha$ , signal transduction. *Jour Immunol* 1998; 161:3001–3009.
- 34 Denlinger L, Fisette PL, Sommer JA, Watters JJ, Prabhu U, Dubyak GR, Proctor RA, Bertics PJ. The nucleotide receptor P2X<sub>7</sub> contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolisaccharide. *J Immunol* 2001; 167:1871–1876.
- 35 Ding AH, Porteu F, Sanchez E, Nathan CF. Shared actions of endotoxins and Taxol on TNF receptors and TNF release. *Science* 1990; 248:370–372.
- 36 Ding AH, Sanchez E, Nathan CF. Taxol shares the ability of bacterial lipopolysaccharide to induce tyrosine phosphorylation of microtubule-associated protein kinase. *J Immunol* 1993; 151:5596–5602.
- 37 Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 1998; 280:69–77.
- 38 Draber S, Schultze R. Detection of jumps in single-channel data containing subconductance levels. *Biophys J* 1994; 67:1404–1413.
- 39 Durieux JJ, Vita N, Popescu O, Guette F, Calzada-Wack J, Munker R, Schmidt RE, Lupker J, Ferrara P, Ziegler-Heitbrock HW. The two soluble forms of the

- lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes. *Eur J Immunol* 1994; 24:2006–2012.
- 40 Dworetzky SI, Boissard CG, Lum–Ragan JT, McKay MC, Post–Munson DJ, Trojnacki JT, Chang CP, Gribkoff VK. Phenotypic alteration of a human BK (hsl $\alpha$ ) channel by hSlob subunit coexpression: Changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. *J Neuroscience* 1996; 16(15):4543–4550.
- 41 Dyer JL, Khan SZ, Bilmen JG, Hawtin SR, Wheatley M, Javed MU, Michelangeli F. Curcumin: a new cell–permeant inhibitor of the inositol 1,4,5–triphosphate receptor. *Cell Calcium* 2002; 31(1):45–52.
- 42 el–Samalouti VT, Schletter J, Chyla I, Lentschat A, Mamat U, Brade L, Flad HD, Ulmer AJ, Hamann L. Identification of the 80–kDa LPS–binding protein (LMP80) as decay–accelerating factor (DAF, CD55). *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;23:259–269.
- 43 Fenton MJ, Golenbock DT. LPS–binding proteins and receptors. *J Leukocyte Biol* 1998; 64:25–32.
- 44 Findlay I, Dunne MJ, Petersen OH. ATP–sensitive inward rectifier and voltage– and calcium–activated K<sup>+</sup> channels in cultured pancreatic islet cells. *J Membr Biol* 1985; 83:169–175.
- 45 Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JJ (eds). Gram–positive pathogens. Washington: ASM Press, 2000:1–24.
- 46 Flo TH, Halaas O, Lien E, Ryan L, Teti G, Golenbock DT, Sundan A, Espevik T. Human toll–like receptor 2 mediates monocyte activation by listeria monocytogenes, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *J Immunol* 2000; 164:2064–2069.
- 47 Fukao M, Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, Keef KD. Cyclic GMP–dependent protein kinase activates cloned BK<sub>Ca</sub> channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072\*. *J Biol Chem* 1999; 274(16):10927–10935.
- 48 Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L, Freudenberg M, Schade U, Imoto M, Yoshimura H, Kusumoto S, Shiba T. Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem* 1985; 148:1–5.
- 49 Gallin EK. Calcium– and voltage–activated Potassium channels in human macrophages. *Biophys J* 1984; 46:821–825.
- 50 Gallin EK, McKinney LC. Patch–clamp studies in human macrophages: single–channel and whole–cell characteristics of two K<sup>+</sup> conductances. *J Membr Biol* 1988; 103:55–66.

- 51 Gallis B, Prickett KS, Jackson J, Slack J, Schooley K, Sims JE, Dower SK. IL-1 induces rapid phosphorylation of the IL-1 receptor. *Jour Immunol* 1989; 143:3235–3240.
- 52 Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contacin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem* 1990; 265(19):11083–11090.
- 53 Gantner F, Uhlig S, Wendel A. Quinine inhibits release of TNF, apoptosis, necrosis, and mortality in a murine model of septic liver failure. *Eur J Pharmacol* 1995; 294:353–355.
- 54 Garcia-Calvo M, Knaus HG, Garcia ML, Kaczorowsky GJ, Kempner ES. Functional unit size of the charybdotoxin receptor in smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4718–4722.
- 55 Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93(13):6448–6453.
- 56 Gimenez-Gallego G, Navia MA, Reuben JP, Katz GM, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Purification, sequence and model structure of ChTX, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:3329–3333.
- 57 Glasbey CA, Martin RJ. The distribution of numbers of open channels in multi-channel patches. *J Neurosci Methods* 1988; 24:283–287.
- 58 Glauner KS, Mannuzzu LM, Ghandi CS, Isacoff EY. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature* 1999; 402:813–817.
- 59 Golenbock DT, Hampton RY, Qureshi N, Takayama K, Raetz CR. Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J Biol Chem* 1991; 266:19490–19498.
- 60 Granowitz EV, Clark BD, Vannier E, Callahan MV, Dinarello CA. Effect of interleukin-1 (IL-1) blockade on cytokine synthesis: I. IL-1 receptor antagonist inhibits IL-1-induced cytokine synthesis and blocks the binding of IL-1 to its type II receptor on human monocytes. *Blood* 1992; 79(9):2356–2363.
- 61 Gray PC, Scott JD, Catterall WA. Regulation of ion channels by cAMP-dependent protein kinase and A-kinase anchoring proteins. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8(3):330–334.
- 62 Gutschmann T. Untersuchungen zu Wirkungsmechanismen zwischen polykationischen antimikrobiellen Substanzen und rekonstituierten Membranmodellen. 1997; Diplomarbeit, Universität Kiel.
- 63 Gutschmann T, Haberer N, Carroll SF, Seydel U, Wiese A. Interaction between

- lipopolysaccharide (LPS), LPS-binding protein (LBP), and planar membranes. *Biol Chem* 2001; 382:425–434.
- 64 Gutschmann T, Müller M, Carroll SF, MacKenzie RC, Wiese A, Seydel U. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect Immun* 2001; 69:6942–6950.
- 65 Hanner M, Schmalhofer WA, Munujos P, Knaus HG, Kaczorowski GJ, Garcia ML. The  $\beta$ -Subunit of the high conductance calcium-activated potassium channel contributes to the high-affinity receptor for charybdotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:2853–2858.
- 66 Hanner M, Vianna-Jorge R, Kamassah A, Schmalhofer WA, Knaus HG, Kaczorowski GJ, Garcia ML. The  $\beta$ -subunit of the high conductance calcium-activated potassium channel. *J Biol Chem* 1998; 273(26):16289–16296.
- 67 Haslberger A, Romanin C, Koerber R. Membrane potential modulates release of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Mol Biol Cell* 1992; 3:451–460.
- 68 Haworth R, Platt N, Keshav S, Hughes D, Darley E, Susuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J Exp Med* 1997; 186:1431–1439.
- 69 Hayashi M, Yamaji Y, Nakazato Y, Saruta T. The effects of calcium channel blockers on nuclear factor kappa B activation in the mesangium cells. *Hypertens Res* 2000; 23:521–525.
- 70 Haziot A, Rong GW, Bazil V, Silver J, Goyert SM. Recombinant soluble CD14 inhibits the LPS-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  production by cells in whole blood. *J Immunol* 1994; 152:5568–5876.
- 71 Haziot A, Rong GW, Silver J, Goyert SM. Recombinant soluble CD14 mediates the activation of endothelial cells by lipopolysaccharide. *J Immunol* 1993; 151:1500–1507.
- 72 Herrera-Velit P, Reiner NE. Bacterial lipopolysaccharide induces the association and coordinate activation of p53/56lyn and phosphatidylinositol 3-kinase in human monocytes. *J Immunol* 1996; 156(3):1157–1165.
- 73 Heumann D, Barras C, Severin A, Glauser MP, Tomasz A. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun* 1994; 62(7):2715–2721.
- 74 Hoang LM, Chen C, Mathers DA. Lipopolysaccharide rapidly activates K<sup>+</sup> channels at the intracellular membrane face of rat cerebral artery smooth muscle cells. *Neurosci* 1997; 231:25–28.
- 75 Hoang LM, Mathers DA. Internally applied endotoxin and the activation of BK

- channels in cerebral artery smooth muscle via a nitric oxide-like pathway. *Brit Jour Pharmacol* 1998; 123:5–12.
- 76 Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001; 2:835–841.
- 77 Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol* 1999; 162:3749–3752.
- 78 Hu S, Kim HS, Fink CA. Differential effects of the BK<sub>Ca</sub> channel openers NS 004 and NS 1608 in porcine coronary arterial cells. *Eur J Pharmacol* 1995; 294:357–360.
- 79 Hu Y, Fiset PL, Denlinger LC, Guadarrama AG, Sommer JA, Proctor RA, Bertics PJ. Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 1998; 273:27170–27175.
- 80 Ilschner S, Ohlemeyer C, Gimpl G, Kettenmann H. Modulation of potassium currents in cultured murine microglia cells by receptor activation and intracellular pathways. *Neurosci* 1995; 66(4):983–1000.
- 81 Ingalls RR, Golenbock D. CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1995; 181:1473–1479.
- 82 Ingalls RR, Monks BG, Savedra R, Jr., Christ WJ, Delude RL, Medvedev AE, Espevik T, Golenbock DT. CD11/CD18 and CD14 share a common lipid A signaling pathway. *J Immunol* 1998; 161:5413–5420.
- 83 Israelachvili JN. Intermolecular and surface forces, 2 ed. London: Academic Press, 1991:366–394.
- 84 Jahr TG, Sundan A, Lichenstein HS, Espevik T. Influence of CD14, LBP and BPI in the monocyte response to LPS of different polysaccharide chain length. *Scand J Immunol* 1995; 42:119–127.
- 85 Jeong JY, Jue DM. Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Immunol* 1997; 158:4901–4907.
- 86 Jiang Y, Pico A, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Structure of the RCK domain from *E. coli* K<sup>+</sup> channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron* 2001; 29(3):593–601.
- 87 Kakuta Y, Okayama H, Aikawa T, Kanno T, Ohyama T, Sasaki H, Kato T, Takishima T. K channels of human alveolar macrophages. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81:460–468.
- 88 Karres I, Kremer JP, Dietl I, Steckholzer U, Jochum M, Ertel W. Chloroquine inhibits proinflammatory cytokine release in human whole blood. *Am J Physiol* 1998;

- 274:1058–1064.
- 89 Katagiri YU, Kiyokawa N, Fujimoto J. A role for lipid rafts in immune cell signaling. *Microbiol Immunol* 2001; 45(1):37469.
- 90 Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M. Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complexes mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem* 2000; 275(4):2251–2254.
- 91 Kim SY, Silver MR, DeCoursey TE. Ion channels in human THP-1 monocytes. *J Membr Biol* 1996; 152(2):115–130.
- 92 Kirber MT, Ordway RW, Clapp LH, Walsh JV Jr., Singer JJ. Both membrane stretch and fatty acids directly activate large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1992; 297(1,2):24–28.
- 93 Kirkland TN, Finley F, Leturcq D, Moriaty A, Lee JD, Ulevitch RJ, Tobias PS. Analysis of lipopolysaccharide binding by CD14. *J Biol Chem* 1993; 268:24818–24823.
- 94 Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T, Rothe M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1998; 188:2091–2097.
- 95 Kita Y, Hirasawa Y, Maeda K, Nishio M, Yoshida K. Spontaneous nitric oxide release accounts for the potent pharmacological actions of FK409. *Eur J Pharmacol* 1994; 257:123–130.
- 96 Knaus HG, McManus OB, Lee SH, Schmalhofer WA, Garcia-Calvo M, Helms LMH, Sanchez M, Giangiacomo K, Reuben JP, Smith AB, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Tremorgenic inole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry* 1994; 33:5819–5828.
- 97 Kobori M, Shinmoto H, Tsushida T, Shinohara K. Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells by inhibition of glucose transmembrane transport. *Cancer Lett* 1997; 119(2):207–212.
- 98 Koh DS, Reid G, Vogel W. Effect of the flavoid phloretin on  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel in myelinated nerve fibres of *Xenopus laevis*. *Neurosci Lett* 1994; 165:167–170.
- 99 Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:13–18.
- 100 Korn SJ, Horn R. Statistical discrimination of fractal and Markov models of single-channel gating. *Biophys J* 1988; 54:871–877.
- 101 Krause SW, Kruetz M, Andreesen R. Isolation, characterization and cultivation of human monocytes and macrophages. In: Kaufmann SHE, Kabelitz D, eds. *Immunology of Infection*. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 1998:663–684.

- 102 Larsson HP, Baker OS, Dhillon DS, Isacoff EY. Transmembrane movement of the shaker K<sup>+</sup> channel S4. *Neuron* 1996; 16:387–397.
- 103 Letari O, Nicosia S, Chiavaroli C, Vacher P, Schlegel W. Activation by bacterial lipopolysaccharide causes changes in the cytosolic free calcium concentration in single peritoneal macrophages. *J Immunol* 1991; 147(3):980–983.
- 104 Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 2000; 105(4):497–504.
- 105 Lien E, Sellati Tj, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 1999; 274(19):33419–33425.
- 106 Ling S, Woronuk G, Sy L, Lev S, Braun AP. Enhanced activity of a large conductance, calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel in the presence of Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2000; 275(39):30683–30689.
- 107 Longland CL, Dyer JL, Michelangeli F. The mycotoxin paxilline inhibits the cerebellar inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *Eur J Pharmacol* 2000; 408:219–225.
- 108 Loppnow H, Brade H, Durrbaum I, Dinarello CA, Kusumoto S, Rietschel ET, Flad HD. IL-1 induction-capacity of defined lipopolysaccharide partial structures. *J Immunol* 1996; 142:3229–3238.
- 109 Lüderitz O, Freudenberg MA, Galanos C, Lehmann V, Rietschel ET, Shaw DH. Lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. *Curr Top Membr Trans* 1982; 17:79–151.
- 110 Lynn WA, Liu Y, Golenbock DT. Neither CD14 nor serum is absolutely necessary for activation of mononuclear phagocytes by bacterial lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1993; 61:4452–4461.
- 111 Marsh CB, Moore SA, Pope HA, Wewers MD. IL-1ra suppresses endotoxin-induced IL-1 beta and TNF-alpha release from mononuclear phagocytes. *Am J Physiol* 1994; 267(1 Pt 1):39–45.
- 112 Martens JR, Navarro-Polanco R, Coppock EA, Nishiyama A, Parshley L, Grobaski T D, Tamkun MM. Differential targeting of shaker-like potassium channels to lipid rafts. *J Biol Chem* 2000; 275(11):7443–7446.
- 113 Martin DK, Bootcov MR, Campbell TJ, French PW, Breit SN. Human macrophages contain a stretch-sensitive potassium channel that is activated by adherence and cytokines. *J Membr Biol* 1995; 147(3):305–315.
- 114 Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of

- Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- induced Ca<sup>2+</sup> release. *J Biochem* 1997; 122(3):498–505.
- 115 Matsumori A, Nunokawa Y, Sasayama S. Nifedipine inhibits activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Life Sci* 2000; 67:2655–2661.
- 116 McLarnon JG, Franciosi S, Wang X, Bae JH, Choi HB, Kim SU. Acute actions of tumor necrosis factor- $\alpha$  on intracellular Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> currents in human microglia. *Neurosci* 2001; 104(4):1175–1184.
- 117 McManus OB, Helms LMH, Pallanck L, Ganetzki B, Swanson R, Leonhard RJ. Functional role of the  $\beta$ -subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron* 1995; 14:645–650.
- 118 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CAJ. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394–397.
- 119 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CAJ. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998; 2:253–258.
- 120 Meera P, Wallner M, Jiang Z, Toro L. A calcium switch for functional coupling between  $\alpha$ (hsl $\alpha$ ) and  $\beta$  subunits (Kv,Cab) of maxi K channels. *FEBS Lett* 1996; 382:84–88.
- 121 Meera P, Wallner M, Song M, Toro L. Large conductance voltage- and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0–S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9–S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:14066–14071.
- 122 Meera P, Wallner M, Toro L. A neuronal  $\beta$  subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(10):5562–5567.
- 123 Mezna M, Michelangeli F. Alkali metal ion dependence of inositol-1,4,5-triphosphate induced calcium release from rat cerebellar microsomes. *J Biol Chem* 1995; 270:28097–28102.
- 124 Misra UK, Gawdi G, Pizzo SV. Chloroquine, quinine and quinidine inhibit calcium release from macrophage intracellular stores by blocking inositol 1,4,5-triphosphate binding to its receptor. *J Cell Biochem* 1997; 64:225–232.
- 125 Muhvic D, El-Samalouti V, Flad HD, Radosevic-Stasic B, Rukavina D. The involvement of CD14 in the activation of human monocytes by peptidoglycan monomers. *Mediators Inflammation* 2001; 10:155–162.
- 126 Müller M, Pfannes SDC, Ayoub M, Hoffmann P, Wolfgang G. Immunostimulation by the synthetic lipopeptide P<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>: TLR4-independent activation of the ERK1/2 signal transduction pathway in macrophages. *Immunology* 2001; 103:49–60.

- 127 Murphy KP, Williams JH, Bettache N, Bliss TV. Photolytic release of nitric oxide modulates NMDA receptor-mediated transmission but does not induce long-term potentiation at hippocampal synapses. *Neuropharmacology* 1994; 33(11): 1375–1385.
- 128 Neher E, Sakmann B. Single channel current recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976; 260:799–802.
- 129 Nelson DJ, Jow B, Jow F. Lipopolysaccharide induction of outward potassium current expression in human monocyte-derived macrophages: lack of correlation with secretion. *J Membr Biol* 1992; 125(3):207–218.
- 130 Nimigean CM, Magleby KL. The  $\beta$ -subunit increases the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels by retaining the gating in the bursting states. *J Gen Physiol* 1999; 113:425–439.
- 131 Oleson SP. Urea and amide derivatives and their use in the control of cell membrane potassium channels. *NeuroSearch* WO94/22807 1994.
- 132 Oleson SP, Watjen F. Benzimidazole derivatives, their preparation and use. *NeuroSearch* EPA 0477819A2 1992.
- 133 O'Neill LA, Dinarello CA. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today* 2000; 21:304–311.
- 134 Orio P, Rojas P, Toro L, Latorre R. MaxiK channel activation by estradiol and tamoxifen: role of the extracellular domain of the  $\beta_1$ -subunit. *Biophys J* 2002; 82(1):205.
- 135 Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(25):13766–13771.
- 136 Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrument DD, Trotta T, Statlino R, Saccia M, Mitolo V, Brandonisio O. Incucible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Int J Clin Res* 1999; 29(3):122–127.
- 137 Panaro MA, Brandonisio O, Sisto M, Acquafredda A, Leogrande D, Fumarola L, Mitolo V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. *Clin Exp Med* 2001; 1(3):137–143.
- 138 Papavlassopoulos M. Charakterisierung der intrazellulären Signalkaskade in Endotoxin-aktivierten Zellen. 2002; Diplomarbeit, Universität Kiel.
- 139 Pfeiffer A, Böttcher A, Orso E, Kapinsky M, Nagy P, Bodnar A, Spreitzer I, Liebisch G, Drobnik W, Gempel K, Horn M, Holmer S, Hartung T, Multhoff G, Schütz G, Schindler H, Ulmer AJ, Heine H, Stelter F, Schütt C, Rothe G, Szollosi J, Damjanovich S, Schmitz G. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol* 2001;

- 31:3153–3164.
- 140 Philipp S, Flockerzi V. Molecular characterization of a novel human PDZ domain protein with homology to INAD from *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* 1997; 413(2):243–248.
- 141 Pollock JS, Klinghofer V, Fostermann U, Murad F. Endothelial nitric oxide synthase is myristylated. *FEBS Lett* 1992; 309(3):402–404.
- 142 Poltorak A, Ricciardi–Castagnoli P, Citterio S, Beutler B. Physical contact between lipopolysaccharide and Toll–like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(5):2163–2167.
- 143 Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi–Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57Bl/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282:2085–2088.
- 144 Prevarskaya N, Skryma R, Vacher P, Bresson–Bepoldin L, Odessa MF, Rivel J, San Galli F, Guerin J, Dufy–Barbe L. Gonadotropin–releasing hormone induced  $Ca^{2+}$  influx in nonsecreting pituitary adenoma cells: role of voltage–dependent  $Ca^{2+}$  channels and protein kinase C. *Mol Cell Neurosci* 1994; 5(6):699–708.
- 145 Prinz M, Kann O, Draheim HJ, Schumann RR, Kettenmann H, Weber JR, Hanisch UK. Microglia activation by components of Gram–positive and –negative bacteria: Distinct and common routes to the induction of ion channels and cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58(10):1078–1089.
- 146 Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. Endotoxin–tolerant mice have mutations in toll–like receptor 4 (TLR4). *J Exp Med* 1999; 189:615–625.
- 147 Raetz C. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:129–170.
- 148 Ranganathan R, Ross EM. PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Curr Biol* 1997; 7(12):770–773.
- 149 Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Müller–Loennies S, Mamat U, Zähringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Loppnow H, Schonbeck U, Flad HD, Hauschildt S, Schade UF, Di Padova F, Kusumoto S, Schumann RR. Bacterial endotoxins: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 216:39–81.
- 150 Rietschel ET, Brade L, Schade U, Seydel U, Zähringer U, Loppnow H, Flad HD, Brade H. Bacterial Endotoxins: Relationships Between Chemical Structure and Biological Activity. In: Gregoriadis G, Aliison AC, Poste G, eds. *Immunological Adjuvants and Vaccines*. Plenum Publishing Corporation, 1989:61–74.
- 151 Rietschel ET, Kirikae T, Loppnow H, Zabel P, Ulmer J, Brade H, Seydel U, Zähringer U, Schlaak M, Flad H–D, Schade U. Molecular aspects of the chemistry and

- biology of endotoxin. In: Sies H, Flohe L, Zimmer G, eds. *Molecular Aspects of Inflammation*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1991:207–231.
- 152 Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT. cGMP-dependent protei kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993; 265(1 Pt 1):C299–C303.
- 153 Roes S. Patch-Clamp Messungen an einem Ionenkanal nach Rekonstitution in einer Zelllinie: Etablierung eines definierten Messsystems. 2001; Diplomarbeit, Universität Kiel.
- 154 Rossi AG, McMillan RM, MacIntyre DE. Agonist-induced calcium flux, phosphoinositide metabolism, aggregation and enzyme secretion in human neutrophils. *Agents Actions* 1988; 24(3–4):272–282.
- 155 Ruegg UT, Burgess GM. Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10(6):218–220.
- 156 Sargent CA, Grover GJ, Antonaccio MJ, McCullough JR. The cardioprotective, vasorelaxant and electrophysiological profile of the large conductance calcium-activated potassium channel opener NS 004. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 266(3):1422–1429.
- 157 Scapigliati G, Ghiara P, Bartalini A, Taglibue A, Boraschi D. Differential binding of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  to receptors on B and T cells. *FEBS Lett* 1989; 243:394–398.
- 158 Scheel O. Charakterisierung der Wechselwirkung von Kanalblockern mit dem MaxiK-Kanal in der Makrophagenmembran. 1999; Diplomarbeit, Universität Kiel.
- 159 Schondorf M, Bidlingmaier F, von Ruecker AA. Protein kinase C regulates IL-8 and fMLP induced cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> increase in human granulocytes by receptor modulation measurements by flow cytometry. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197(2):549–555.
- 160 Schreiber M, Salkoff L. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J* 1997; 73:1355–1363.
- 161 Schromm AB, Brandenburg K, Loppnow H, Moran AP, Koch MHJ, Rietschel ET, Seydel U. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur J Biochem* 2000; 267:2008–2013.
- 162 Schromm AB, Brandenburg K, Rietschel ET, Flad HD, Carroll SF, Seydel U. Lipopolysaccharide binding protein (LBP) mediates CD14-independent intercalation of lipopolysaccharide into phospholipid membranes. *FEBS Lett* 1996; 399:267–271.
- 163 Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K, Golenbock DT. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med* 2001; 194:79–88.
- 164 Schubert R, Nelson MT. Protein kinases: tuners of the BK<sub>Ca</sub> channel in smooth

- muscle. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22(10):505–512.
- 165 Schultze R, Draber S. A nonlinear filter algorithm for the detection of jumps in patch-clamp data. *J Membr Biol* 1993; 132:41–52.
- 166 Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249:1429–1431.
- 167 Schütt C, Schilling T, Grunwald U, Schonfeld W, Kruger C. Endotoxin–neutralizing capacity fo soluble CD14. *Res Immunol* 1992; 143:71–78.
- 168 Seltmann G, Holst O. The bacterial cell wall, 1 ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer–Verlag, 2002:211–215.
- 169 Shieh BH, Zhu MY. Regulation of the TRP  $\text{Ca}^{2+}$  channel by INAD in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 1996; 16(5):991–998.
- 170 Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukidome K, Miyake K, Kimoto M. MD–2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll–like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189:1777–1782.
- 171 Skryma R, Prevarskaya P, Vacher P, Dufy B. Voltage–dependent ionic conductances in Chinese hamster ovary cells. *Am Jour Physiol* 1994; 267:C544–C553.
- 172 Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA. Altered cytokine production in mice lacking  $\text{P2X}_7$  receptors. *J Biol Chem* 2001; 276(1):125–132.
- 173 Sonnleitner A, Mannuzzu LM, Terakawa S, Isacoff EY. Structural rearrangements in single ion channels detected optically in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(20):12759–12764.
- 174 Stafford JL, Galvez F, Gross GG, Belosevic M. Induction of nitric oxide and respiratory burst response in activated goldfish macrophages requires potassium channel activity. *Dev Comp Immunol* 2002; 26:445–459.
- 175 Stefani E, Ottolia M, Noceti F, Olcese R, Wallner M, Latorre R, Toro L. Voltage–controlled gating in a large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ –sensitive  $\text{K}^+$ –channel (hslo). *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:5427–5431.
- 176 Stroebaek D, Christophersen P, Holm NR, Moldt P, Ahring PK, Johansen TE, Olesen SP. Modulation of the  $\text{Ca}^{2+}$ –dependent  $\text{K}^+$  channel, hslo, by the substituted diphenylurea NS 1608, paxilline and internal  $\text{Ca}^{2+}$ . *Neuropharmacol* 1996; 35(7):903–914.
- 177 Sugawara S, Arakaki R, Rikiishi H, Takada H. Lipoteichoic acid acts as an antagonist and an agonist of lipopolysaccharide on human gingival fibroblasts and monocytes in a CD14–dependent manner. *Infect Immun* 1999; 67(4):1623–1632.

- 178 Takayama K, Mitchell DH, Din ZZ, Mukerjee P, Li C, Coleman DL. Monomeric Re lipopolysaccharide from *Escherichia coli* is more active than the aggregate form in the *Limulus* amoebocyte lysate assay and in inducing Egr-1 mRNA in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 1994; 269:2241–2244.
- 179 Taniguchi J, Furukawa KI, Shigekawa M. Maxi K<sup>+</sup> channel are stimulated by cyclic guanosin monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 1993; 423:167–172.
- 180 Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick RL. A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nature Immunol* 2001; 2(4):338–344.
- 181 Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt12):2603–2611.
- 182 Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 2002; 23(6):301–304.
- 183 Tseng-Crank J, Godinot N, Johansen TE, Ahring PK, Strobaek D, Mertz R, Foster CD, Olesen SP, Reinhart PH. Cloning, expression, and distribution of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel  $\beta$ -subunit from human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9200–9205.
- 184 Tsunoda S, Sierralta J, Sun Y, Bodner R, Suzuki E, Becker A, Socolich M, Zuker CS. A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature* 1997; 388(6639):243–249.
- 185 Uebele VN, Lagrutta A, Wade T, Figueroa DJ, Liu Y, McKenna E, Austin CP, Bennett PB, Swanson R. Cloning and functional expression of two families of  $\beta$ -subunits of the large conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 2000; 275(30):23211–23218.
- 186 Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:103–110.
- 187 Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C, Latorre R. Acute activation of Maxi-K channels (hsl $\alpha$ ) by Estradiol binding to the  $\beta$  subunit. *Science* 1999; 285:1929–1931.
- 188 Walev I, Reske K, Palmer M, Valeva A, Bhakdi S. Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *EMBO J* 1995; 14(8):1607–1614.
- 189 Wallner M, Meera P, Toro L. Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:14922–14927.
- 190 Wallner M, Meera P, Toro L. 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 USA* 1999; 96:4137–4142.

- 191 Wang J, Zhou Y, Wen H, Levitan IB. Simultaneous binding of two protein kinases to a calcium-dependent potassium channel. *J Neurosci* 1999; 19(10):RC4.
- 192 Wang ZW, Kotlikoff MI. Activation of  $K_{Ca}$  channels in airway smooth muscle cells by endogenous protein kinase A. *Am J Physiol* 1996; 271(1Pt 1):L100–L105.
- 193 Wanner SG, Koch RO, Koschak A, Trieb M, Garcia ML, Kaczorowsky GJ, Knaus HG. High-conductance calcium-activated potassium channels in rat brain: Pharmacology, distribution, and subunit composition. *Biochemistry* 1998; 38:5392–5400.
- 194 Watanabe N, Suzuki J, Kobayashi Y. Role of calcium in tumor necrosis factor- $\alpha$  production by activated macrophages. *J Biochem* 1996; 120:1190–1195.
- 195 Weber SM, Levitz SM. Chloroquine interferes with lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  gene expression by a nonlysosomotropic mechanism. *J Immunol* 2000; 165:1534–1540.
- 196 Weidemann B, Schletter J, Dziarski R, Kusumoto S, Stelter F, Rietschel ET, Flad HD, Ulmer AJ. Specific binding of soluble peptidoglycan and muramylpeptide to CD14 on human monocytes. *Infect Immun* 1997; 65(3):858–864.
- 197 Wooten RM, Morrison TB, Weis JH, Wright SD, Thieringer R, Weis JJ. The role of CD14 in signaling mediated by outer membrane lipoproteins of *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 1998; 160:5485–5492.
- 198 Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249:1431–1433.
- 199 Wu P, Brand L. Resonance Energy Transfer: Methods and Applications. *Anal Biochem* 1994; 218:1–13.
- 200 Xia XM, Ding JP, Lingle CJ. Molecular basis for the inactivation of  $Ca^{2+}$ - and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells. *J Neurosci* 1999; 19(13):5255–5264.
- 201 Xia XM, Zeng X, Lingle CJ. Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 2002; 418:880–884.
- 202 Yamaki F, Kaga M, Horinouchi T, Tanaka H, Koike K, Shigenobu K, Toro L, Tanaka Y. MaxiK channel-mediated relaxation of guinea-pig aorta following stimulation of IP receptor with beraprost via cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 364(6):538–550.
- 203 Yang H, Young DW, Gusovsky F, Chow JC. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated Toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J Biol Chem* 2000; 275:20861–20866.

- 204 Zähringer U, Lindner B, Rietschel ET. Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1994; 50:211–276.
- 205 Zhou XB, Wang GX, Ruth P, Hüneke B, Korth M. BKCa channel activation by membrane-associated cGMP kinase may contribute to uterine quiescence in pregnancy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279:C1751–C1759.
- 206 Ziegler–Heitbrock HWL, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 1993; 14:121–125.

---

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Hamburg, den 05. November 2002

.....

---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Seydel, Leiter der Laborgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel, für die Bereitstellung der Promotionsstelle und die interessante und vielschichtige Aufgabenstellung. Durch sein stetes Interesse und seine große Diskussionsbereitschaft hat er äußerst konstruktiv und motivierend diese Arbeit wissenschaftlich betreut.

Herrn Prof. Dr. Ernst T. Rietschel, Direktor des Institutsbereichs Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie am FZB, danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Rikard Blunck und Frau Dr. Andra B. Schromm, die mit ihren konstruktiven Anregungen und ihrer fachlichen Unterstützung eine große Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit waren.

Bei Frau Dipl. Phys. Stefanie Roes und Herrn Dipl. Biol. Martin Papavlassopoulos bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit.

Frau Sabrina Groth und Frau Kerstin Stephan gilt mein großer Dank für die technische Unterstützung im Bereich der Zellkultur und für die Durchführung ungezählter Stimulationsexperimente. Frau Christine Hamann danke ich für die FRET- und Fluoreszenz-Messungen, Frau Helga Lüthje für die Isolierung und Aufreinigung der Endotoxine und Frau Maren Lohs für die hilfreiche Unterstützung beim Anfertigen von Grafiken.

Ich danke Frau Dipl. Biol. Antje Blumenthal und Herrn Dr. Norbert Reiling aus der Laborgruppe Molekulare Infektiologie für ihre Mithilfe bei den Versuchen in murinen Zellen.

Für die aufmerksame Durchsicht dieser Arbeit danke ich Dr. Klaus Brandenburg und Dr. Kai Hünemörder.

Mein herzlicher Dank geht an alle Mitglieder der Laborgruppe Biophysik, die durch das großartige Betriebsklima eine wichtige Grundlage zum Gelingen dieser Arbeit bereitet hat.

Ich danke Dr. U. Zähringer, Dr. T. Hartung und Dr. Wiesmüller für die Bereitstellung der verwendeten Virulenzfaktoren und S.P. Olesen von der Firma NeuroSearch für die Bereitstellung der Kanalaktivatoren.

Dem VEIAP e.V. sei für die finanzielle Unterstützung gedankt.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, die mich während meines Studiums unterstützt und somit diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Besonders bedanke ich mich bei Sandra für die große Unterstützung und das liebevolle Verständnis, besonders gegen Ende dieser Arbeit.