Aktivierung von spannungsunabhängigen, calciumabhängigen Kaliumkanälen durch die Entzündungsmediatoren Bradykinin, Histamin und Wasserstoffperoxid in Mäusefibroblasten

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

> vorgelegt von Christina Raspel aus Hachenburg

> > Gießen, Mai 2006

aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie Direktor: Prof. Dr. Florian Dreyer

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

 Gutachter: Prof. Dr. Florian Dreyer
 Gutachter: PD Dr. Michael Bräu Tag der Disputation: 08.12.2006 Meiner Schwester Andrea, die mich mit Stolz erfüllt.

Meinen Eltern Karin und Günther, deren soziales Engagement ich bewundere.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Am Entzündungsgeschehen beteiligte Mediatoren	1
1.2 Funktion von Kaliumkanälen und ihre mögliche Rolle im	3
Entzündungsgeschehen	
2 Material und Methoden	6
2.1 Zellkultur	6
2.1.1 Kultivierung der Zelllinien	6
2.1.1.1 NIH-3T3-Mäusefibroblastenzelllinie	6
2.1.1.2 Baby-Hamster-Kidney-Zelllinie	7
2.1.1.3 BV2-Zelllinie	9
2.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien	9
2.2 Elektrophysiologische Messungen	10
2.2.1 Aufbereitung der Zellen für Patch-Clamp-Experimente	10
2.2.2 Aufbau des Patch-Clamp-Messstands	12
2.2.3 Herstellung von Glas-Mikropipetten ("Patchpipetten")	14
2.2.4 Die Patch-Clamp Technik und Whole-Cell-Ableitungen der Zellen	14
2.2.5 lonenlösungen	16
2.2.6 Osmolarität der Intra- und Extrazellulärlösungen	17
2.2.7 Liquid-Juction Potentiale	17
2.3 Substanzenliste	18
2.3.1 Kälberseren	18
2.3.1.1 Neonatales Kälberserum	18
2.3.1.2 Fetales Kälberserum	18
2.3.2 Lysophosphatidsäure	18
2.3.3 Sphingosin-1-Phosphat	19

2.3.4 Bradykinin	19
2.3.5 Histamin	20
2.3.6 Wasserstoffperoxid	20
2.3.7 Stickstoffmonoxid	20
2.3.8 Substanzen zur Blockade von Ionenkanälen	21
2.3.9 Interleukin-1-ß	22
2.4 Statistische Auswertung und Darstellung	22
3 Ergebnisse	23
3.1 Wirkung von Bradykinin auf den Membranstrom von NIH-3T3-Zellen	23
3.1.1 Pharmakologisches Profil des Bradykinin-induzierten Stroms	25
3.1.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehung des Bradykinin-induzierten Kaliumstroms	26
3.1.3 Reduzierte Aktivierung des Kaliumstroms durch Bradykinin	28
3.1.3.1 Vorinkubation der NIH-3T3-Mäusefibroblasten mit Interleukin-1-ß	28
3.1.3.2 Einfluss veränderter Serumchargen auf den Bradykinin-Effekt	29
3.1.3.3 Einfluss veränderter Zellkulturbedingungen auf den Bradykinin-	30
Effekt	
3.2 Wirkung von Histamin auf den Membranstrom von NIH-3T3-Zellen	31
3.2.1 Aktivierung eines Kaliumstroms durch Histamin	31
3.2.2 Pharmakologisches Profil des durch Histamin induzierten Stroms	32
3.3 Wirkung von Wasserstoffperoxid auf den Membranstrom von NIH-	34
3T3-Zellen	
3.3.1 Pharmakologisches Profil des durch Wasserstoffperoxid induzierten Kaliumstroms	36
3.3.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehung des durch Wasserstoffperoxid induzierten Kaliumstroms	37
3.3.3 Membranschädigende Wirkung von Wasserstoffperoxid	38

3.4 Wirkung von DEA-NO als Stickstoffmonoxid-Donator auf den				
Membranstrom von NIH-3T3-Mäusefibroblasten				
3.5 Mehrfachapplikation von Entzündungsmediatoren	42			
3.6 Einfluss des pH-Wertes auf die Kaliumstromaktivierung	45			
3.6.1 Lysophosphatidsäure-induzierter Kaliumstrom unter sauren Zellkulturbedingungen	45			
3.6.2 Lysophosphatidsäure- und Bradykinin-induzierter Kaliumstrom bei einem pH-Wert von 6,5 in der Extrazellulärlösung	46			
3.7 Kaliumstromaktivierung durch Entzündungsmediatoren an weiteren	48			
Zellinien	10			
3.7.2 Baby-Hamster-Kidney-Zellen	40 49			
4. Diskussion	51			
5. Zusammenfassung	58			
6. Summary	69			
7. Literatur	60			
Danksagung				

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Am Entzündungsgeschehen beteiligte Mediatoren

Entzündungsreaktionen sind ein komplexes Geschehen, in das verschiedenste, körpereigene Substanzen involviert sind. Diese Substanzen werden auch als Entzündungsmediatoren bezeichnet und stellen einen Teil der Abwehrleistung des Körpers dar. Sie sind in der Regel für die bei Entzündungen auftretenden Kardinalsymptome Dolor, Rubor, Calor, Tumor und Functio laesa verantwortlich (Gardner & Oster 1989, Thurston 2000). Entzündungsmediatoren gehören verschiedensten Stoffklassen an (Lecomte & Damas 1984). Typische Vertreter dieser Stoffklassen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

 Tabelle 1: Einteilung der Entzündungsmediatoren und typische Vertreter der unterschiedlichen Stoffklassen

Stoffklasse	typische Vertreter
Phospholipide	Lysophosphatidsäure (LPA)
	Sphingosin-1-Phosphat (S1P)
Kinine	Bradykinin
Biogene Amine	Histamin
Reaktive Sauerstoffverbindungen	Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)
	Stickstoffmonoxid (NO)

Lysophosphatidsäure (LPA) aus der Klasse der Phospholipide wird insbesondere in Thrombozyten, aber auch in anderen Blutzellen durch Spaltung von Phosphatidylsäure gebildet. Im Rahmen von Entzündungsprozessen kann sie besonders durch den Zerfall von Thrombozyten freigesetzt werden (Gaits 1997). LPA kann durch Hydrolyse auch direkt im Serum aus Lysophosphatidylcholin gebildet werden. Bei Gewebsverletzung, Neoplasie oder Entzündungen können im Plasma LPA-Konzentrationen bis zu 100 µM auftreten (Goetzl *et al.* 1998).

Sphingosin-1-Phosphat (S1P), das ebenfalls zur Gruppe der Phospholipide gehört, besitzt eine zu LPA sehr ähnliche Struktur. Wie LPA kann auch S1P bei Gewebsverletzung, Neoplasie oder Entzündungen lokal in höheren Konzentrationen vorliegen (Goetzl & An 1998). Neben ihrer Beteiligung am Entzündungsgeschehen spielen LPA und S1P eine wichtige Rolle bei der Induktion zellulärer Proliferationsprozesse, Änderung der Zelldifferenzierung und beim programmierten Zelltod (Goetzl & An 1998).

Bradykinin, der wichtigste Vertreter der Kinine, ist der stärkste bekannte körpereigene Schmerzbotenstoff (Regoli & Barabe 1980). Bei Entzündung und Entzündungsschmerz ist Bradykinin obligat beteiligt (Holthusen & Kojda 2000). Die Freisetzung aus der Vorstufe Bradykininogen, einem Pseudoglobulin, geschieht im Blutplasma und Gewebe über ein kompliziertes enzymatisches System. (Rocha e Silva 1960, Kaplan 2002). Dieser Vorgang erfolgt entweder spontan oder durch auslösende Noxen, wie Hitze oder pH-Wert-Erniedrigung (Rocha e Silva 1960, Kaplan 2002). Bradykinin wirkt vasodilativ, erhöht die Gefäßpermeabilität, wirkt schmerzinduzierend und führt zu lokaler Überwärmung und ist somit für die Kardinalsymptome Rubor, Tumor, Dolor und Calor verantwortlich (Zweifach 1966, Garcia Leme 1978, Kaczorowski & Garcia 1999). Leukozyten können durch Bradykinin zur Margination (d. h. Haftenbleiben an Venolenwänden) angeregt werden (Costa et al. 2002), was schließlich das Emigrieren in das Interstitium im Rahmen der unspezifischen Abwehrreaktion ermöglicht. In Tumorzellen führt die Aktivierung von Bradykinin-2-Rezeptoren zu einer Veränderung der Zellproliferation (Liebmann & Bohmer 2000).

Histamin als ein typischer Vertreter der biogenen Amine wird aus basophilen Granulozyten und Mastzellen freigesetzt (Lecomte 1975). Es ist der Hauptmediator bei allergischen Reaktionen und vermittelt durch seinen vasodilatierenden und die Gefäßpermeabilität erhöhenden Effekt die Symptome Rubor und Tumor (Vignola *et al.* 1997, Michel *et al.* 2000).

Kürzlich wurde gezeigt, dass auch reaktive Sauerstoffverbindungen im Entzündungsgeschehen eine Rolle spielen (Bychkov 1999). So wird im Rahmen von verschiedenen Erkrankungen Wasserstoffperoxid (H₂O₂) aus neutrophilen Granulozyten und Makrophagen freigesetzt, wobei im Blut Konzentrationen von mehreren hundert mikromolar erreicht werden können (Barlow *et al.* 1998). H₂O₂-Freisetzung spielt im Rahmen von ischämischer Reperfusion, Arteriosklerose und Entzündungen im Bindegewebe eine Rolle (Bychkov 1999).

Ebenfalls aus Zellen des Immunsystems (Makrophagen, Granulozyten), aber auch aus Endothel- und Bindegewebszellen wird als weitere reaktive Sauerstoffverbindung Stickstoffmonoxid (NO) freigesetzt (Eder & DeCoursey 2001). NO vermittelt über cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) die Freisetzung von Enzymen, die das Wachstum von Bakterien hemmen können (Eder *et al.* 1999, Baldridge & Fischer 2001). Man geht auch davon aus, dass der Bradykinin-induzierte Schmerz über die Bradykinin-induzierte Freisetzung von NO vermittelt wird (Corrado & Ballejo 1992, Haley *et al.* 1992, Malinski & Taha 1992).

1.2 Funktionen von Kaliumkanälen und ihre mögliche Rolle im Entzündungsgeschehen

Kaliumkanäle (K⁺-Kanäle) sind die heterogenste Gruppe der Ionenkanäle. Sie kommen in jeder eukaryotischen Zelle vor, wobei diese häufig mehrere Kaliumkanaltypen exprimieren. Kaliumkanäle sind in ein breites Spektrum zellulärer Prozesse eingebunden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Ruhemembranpotentials, modulieren die elektrische Erregbarkeit z. B. von Neuronen und Herzmuskelzellen und tragen zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Ionengleichgewichts bei (Cook 1990, Ford *et al.* 2002). Seit einigen Jahren mehren sich die Hinweise darauf, dass Kaliumkanäle neben diesen "klassischen" physiologischen Funktionen auch bei Proliferationsprozessen (Wonderlin & Strobl 1996), der zellulären Transformation (Rane 1991, Repp *et al.* 1993), der

Zellmigration (Schwab *et al.* 1994, Schwab & Oberleithner 1996), der Zelldifferenzierung (Jones & Ribera 1994, Patil *et al.* 1995) und am programmierten Zelltod (Apoptose) beteiligt sind (Bortner *et al.* 1997, Yu *et al.* 1997). Neuesten Erkenntnissen nach spielen calciumabhängige Kaliumkanäle eine wichtige Rolle in der NO-vermittelten Gefäßrelaxation bzw. Gefäßdilatation (Busse *et al.* 2002).

Erst kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Kaliumkanäle auch durch die am Entzündungsgeschehen beteiligten Phospholipide LPA und S1P aktiviert werden können (Repp et al. 2001). Bei dem an NIH-3T3-Mäusefibroblasten durch LPA oder S1P aktivierbaren Kaliumkanal handelt es sich um einen Ca²⁺abhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit (Repp et al. 1998, 2001). Dieser Kaliumkanaltyp wird durch die Peptidtoxine Charybdotoxin, Iberiotoxin und Margatoxin blockiert, was ein pharmakologisches Profil darstellt 1998. 2001). Hinsichtlich der elektrophysiologischen (Repp et al. und pharmakologischen Eigenschaften besteht jedoch eine Ähnlichkeit zu dem bereits klonierten Ca2+-abhängigen Kaliumkanaltyp hSK4, der auch als hIK1, hIKca oder Gardos-Kanal bezeichnet wird (Ishii et al. 1997).

NIH-3T3-Mäusefibroblasten Die zur Aktivierung dieses in aktivierbaren Kaliumkanaltyps führende Signalkaskade beinhaltet zumindest G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der edg-Familie, die Aktivierung der nicht rezeptorgekoppelten Protein-Tyrosinkinase c-Src und des monomeren G-Proteins Ras (Repp et al. 1998, 2001, Decker 1999). Die Signalkaskade zeigt Homologien zu im Rahmen von Entzündungsprozessen aktivierten Signalkaskaden. Eine Beteiligung G-Proteingekoppelter Rezeptoren ist kürzlich für eine durch den Entzündungsmediator H₂O₂ aktivierte Signalkaskade beschrieben worden. An neonatalen Rattenkardiomyozyten wird z. B. der durch H₂O₂ vermittelte Membranstrom über inhibitorische G-Proteine aktiviert (Nishida 2000). In der Literatur ist beschrieben. dass auch Bradykininrezeptoren über G-Proteine unter der Beteiligung von c-Src und Ras zu einer MAP- (mitogen activated protein-) Kinase-Aktivierung führen (Blaukat et al. 1999, Blaukat 2003). Auch für H₂O₂ wurde die Aktivierung von G-Proteinen und die Aktivierung der Protein-Tyrosinkinase c-Src durch H₂O₂ beschrieben (Abe 1997, Nishida 2000). Weiterhin gibt es erste Hinweise darauf, dass auch H₂O₂ zu einer MAP-Kinase-Kaskade-Aktivierung führen kann (Kevil 2000).

Die Tatsache, dass verschiedene Entzündungsmediatoren aus der Klasse der Phospholipide zu einer Kaliumkanal-Aktivierung führen, lässt vermuten, dass Kaliumkanäle bei der Modulation des Entzündungsgeschehens eine Rolle spielen könnten. Daher sollte in dieser Arbeit der Effekt von Entzündungsmediatoren aus der Klasse der Kinine, der biogenen Amine und der reaktiven Sauerstoffverbindungen auf Kaliumkanäle untersucht und so der Frage einer möglichen Funktion der Kaliumkanäle im Entzündungsgeschehen weiter nachgegangen werden.

Im entzündeten Gewebe werden erniedrigte pH-Werte gefunden. Um diese Bedingungen nachzuahmen, sollte in einem weiteren Teil dieser Arbeit auch untersucht werden, ob durch eine Veränderung des pH-Wertes die Wirkung der Entzündungsmediatoren auf Kaliumkanäle beeinflusst wird.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Kultivierung der Zelllinien

2.1.1.1 NIH-3T3-Mäusefibroblastenzelllinie

Die NIH-3T3-Mäusefibroblastenzelllinie wurde unserem Labor von Dr. H. Maruta (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australien) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich bei der Zelllinie um einen Subklon der NIH-3T3-Zelllinie, die ursprünglich am National Institute of Health (NIH) in Bethesda, USA, durch Drittelung der Kultur mit Trypsin an jedem dritten Tag (3T3) aus einer Primärkultur embryonaler Mäusefibroblasten kloniert wurde (Jainchill *et al.* 1969). Diese Zelllinie wird seit vielen Jahren in Labors weltweit für verschiedenste Fragestellungen und auch für Transfektions- und Transformationsexperimente eingesetzt.

Die NIH-3T3-Zellen wurden in einem Zellkultur-Inkubator (CO₂-Inkubator 6220, Fa. Heraeus, Hanau) bei 37 °C und 95 % Luftfeuchte in einer 94 % Luft / 6 % CO₂ Atmosphäre kultiviert. Als Kulturmedium wurde <u>D</u>ulbecco <u>m</u>odified <u>e</u>agles minimum essential <u>m</u>edium (DMEM) mit 5 % <u>n</u>eonatalem <u>K</u>älber<u>s</u>erum (NKS), 2 mM L-Glutamin, 64,8 mg/l Penicillin-G und 100 mg/l Streptomycin verwendet.

Das Passagieren (Lösen der Zellen einer Passage und anschließende Weiterkultivierung in einer neuen Schale) der Zellen erfolgte, wenn der Boden der Petrischalen (94 mm, Greiner GmbH, Nürtingen) dicht mit Zellen bewachsen war (jeden zweiten bis dritten Tag). Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit 5 ml phosphatgepufferter Lösung (PBS = phosphate buffered saline [in mM]: 120 NaCl; 3,4 KCl; 10,1 NaH₂PO₄; 2,2 K₂HPO₄; pH 7,4) gespült. Da die Zellen relativ stark am Petrischalenboden haften, wurde der konfluente Zellrasen anschließend mit 5 ml Trypsin-haltiger (0,05 % w/v) PBS-Lösung behandelt, bis im Lichtmikroskop eine beginnende Ablösung der Zellen vom Petrischalenboden beobachtet werden konnte. Danach wurde die Trypsin-PBS-Lösung abgesaugt. Die nur noch schwach adhärenten Zellen wurden durch kräftiges Abspülen mit Zellkulturmedium (10 ml) und wiederholtes Aufziehen in einer 10 ml Glaspipette vereinzelt. Anschließend wurden der gewünschten Verdünnung entsprechende Volumina der entstandenen

Zellsuspension aufgenommen und auf neue Petrischalen, in die Zellkulturmedium vorgelegt worden war, ausplattiert. Die übliche Verdünnung betrug hierbei ca. 1:3 bis 1:5. Wurden z. B. 3 ml der entstandenen Zellsuspension in 7 ml vorgelegtes neues Zellkulturmedium einpipettiert, so erreichte man eine Verdünnung von 1:3,3. Die verdünnte Suspension wurde durch anschließendes vorsichtiges Schwenken der Zellkulturschale gut verteilt. Für elektrophysiologische Messungen benötigt man kleine Schalen, weshalb die für Messungen verwendeten Zellen mit DMEM-Medium in 35-mm Petrischalen kultiviert wurden.

Teilweise wurden Messungen an NIH-3T3-Zellen durchgeführt, die im BHK-Medium (s. Abschnitt 2.1.1.2) kultiviert und mit EDTA-Lösung (s. Abschnitt 2.1.1.2) abgelöst wurden. Die Kultivierung der BHK-Zellen erfolgte auf gleiche Art und Weise wie die Kultivierung der NIH-3T3-Zellen (s. Abschnitt 2.1.1.2).

2.1.1.2 Baby-Hamster-Kidney-Zelllinie

<u>Baby-Hamster-K</u>idney- (BHK-) Zellen wurden uns von der Arbeitsgruppe von Prof. G. Wengler (Institut für Veterinär-Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt. Die BHK-Zellen sollten für Messungen in saurem Milieu verwendet werden, da sie auf Grund ihrer Herkunft aus der Niere niedrigere pH-Werte gut tolerieren.

Die Kultivierung der BHK-Zellen erfolgte in einem in der Arbeitsgruppe von Prof. Wengler hergestellten so genannten BHK-Medium, das dem DMEM-Medium ähnelt.

Ein Liter BHK-Medium enthält folgende Substanzen:

a) Bestandteile der Eagles Buffered Salt Solution:

NaCl 6800 mg; KCl 100 mg; MgSO₄ x 7H₂0 50 mg; NaH₂PO₄ x 1H₂0 35 mg; Glucose 250 mg; CaCl₂ x 2H₂0 66,3 mg; Phenolrot 0,5 mg

b) Eagles L-Aminosäuren:

Arginin 180 mg; Valin 92 mg; Threonin 96 mg; Histidin 62 mg; Isoleucin 104 mg, Leucin 104 mg, Lysin x HCl 116 mg; Methionin 30 mg, Phenylalanin 64 mg, Tryptophan 20 mg; Tyrosin 52 mg; Cystin 48 mg Alanin 17,8 mg; Asparaginsäure 30 mg, Glutaminsäure 75 mg, Prolin 25 mg, Serin 21 mg, Glycin 100 mg; Asparagin x H₂O 60 mg (Zur besseren Löslichkeit wurden die Aminosäuren zuvor mit HCl angesäuert.)

c) Eagles Vitamine:

Cholinchlorid 0,04 mg; Folsäure 0,04 mg; Meso-Inositol 0,08 mg; Nicotinsäureamid 0,04 mg; Ca-Panthothenat 0,04 mg; Pyridoxalhydrochlorid 0,04 mg; Riboflavin 0,004 mg; Thiamidumdichlorid 0,04 mg

d) weitere Bestandteile:

Glutamin 585 mg; Natriumpyruvat 111 mg, $Fe(NO_3)_3 \times 9H_2O 0,1$ mg; Glucose 3,5 g; Natriumhydrogencarbonat 3,7 g; Penicillin 50000 IE, Streptomycin 25 mg, Gentamycin 50 mg, Neonatales Kälberserum 10 % v/v, aqua bidest ad 1000 ml.

Wie auch die NIH-3T3-Zellen wurden die BHK-Zellen im Zellkulturinkubator bei 37 °C und 95 % Luftfeuchte und einer Atmosphäre von 94 % Luft / 6 % CO₂ kultiviert. Zum Passagieren an jedem 2. bis 3. Tage wurden die BHK-Zellen durch Zugabe von 5 ml EDTA-Lösung (s. Tabelle 2) nach ca. 2 Minuten Einwirkzeit bei 37 °C gelöst. Hierbei entzieht der Chelatbilder EDTA der Lösung freies Calcium, woraufhin die Zellen sich abrunden und so vom Boden ablösen. Nach Absaugen des EDTA-Überstands wurden die BHK-Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und durch wiederholtes Resuspendieren vereinzelt. In zuvor mit ca. 8 ml Medium gefüllten Petrischalen wurden nun etwa 2 ml der Zellsuspension hinzugefügt und die Zellen ausplattiert. Durch leichtes Schwenken wurden die BHK-Zellen verteilt und anschließend im Brutschrank kultiviert.

Tabelle 2: EDTA-Lösung zum Ablösen der Zellen

Substanz	Menge pro Liter	Konzentration
Na ₂ -EDTA x 2 H ₂ O	0,20 g	0,5 mM
NaCl	8,00 g	136,9 mM
KCI	0,20 g	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	1,15 g	8,3 mM
KH ₂ PO ₄	0,20 g	1,5 mM
Glucose	0,20 g	1,0 mM

Das BHK-Medium wurde nicht nur zur Kultivierung von BHK-Zellen genutzt. In einem Teil der vorliegenden Arbeit wurden 3T3-Mäusefibroblasten nicht in DMEM-, sondern in BHK-Medium kultiviert (s. Abschnitt 3.1.3.3) und für Experimente mit Bradykinin herangezogen.

2.1.1.3 BV2-Zelllinie

Bei den BV2-Zellen handelt es sich um murine Mikrogliazellen. Sie wurden uns von der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. C. Eder (Institut für Physiologie der Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt. Sie wurden in gleicher Weise wie die NIH-3T3-Zelllinie kultiviert (s. Abschnitt 2.1.1.1).

2.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Da mit zunehmender Passagezahl die Eigenschaften der Zelllinien variieren können und die Gefahr besteht, diese während des Umsetzens der Zellen zu kontaminieren, wurden unmittelbar nach Erhalt und Anzüchtung der Zelllinien jeweils in mehreren Aliquots Zellen eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Einfrieren und Auftauen der Zellen erfolgte nach einem Standardprotokoll des Labors (Koschinkski 2001).

2.2 Elektrophysiologische Messungen

2.2.1 Aufbereitung der Zellen für Patch-Clamp-Experimente

Die NIH-3T3-Mäusefibroblasten wurden 36 bis 48 Stunden vor einem Experiment in 35 mm Petrischalen in geringer Dichte (ca. 1-2 x 10⁵ Zellen pro Schale) ausplattiert. Es wurde darauf geachtet, dass sich zum Zeitpunkt der Messung noch kein geschlossener Zellrasen gebildet hatte, um die Zellen in ihrer proliferativen Phase messen zu können. Artefakte durch wachstumsgehemmte oder bereits apoptotische (im programmierten Zelltod befindliche) Zellen sollten damit weitgehend vermieden werden. Abbildung 1 zeigt Originalaufnahmen von NIH-3T3-Zellen in der für die Messung üblicherweise verwendeten Zelldichte.



Abbildung 1:

Lichtmikroskopische Aufnahme von NIH-3T3-Zellen. Gezeigt ist die Zelldichte in einer 35 mm Petrischale, wie sie sich nach 36 bis 48 Stunden Kultivierung lichtmikroskopisch darstellt.

Die Zellen waren meist von spindelförmiger Form und hatten bei 200-facher Vergrößerung 2 bis 4 gut sichtbare Ausläufer, die Kontakt zu umliegenden Zellen hatten. Außerdem besaßen sie einige (meist 2 bis 5) bei 400-facher Vergrößerung gut erkennbare und mehrere (meist 5 bis 7) gerade noch erkennbare feine Ausläufer, durch die sie umliegende Zellen kontaktierten.

An den flach ausgebreiteten, adhärenten, zum Teil stark mit anderen Zellen in Verbindung stehenden Zellen war es nicht möglich, das Membranpotential mit Hilfe der Patch-Clamp Technik kontrolliert zu verändern. Zudem war es schwierig, die Patch-Pipette für eine stabile Ableitung an der Zelle zu positionieren. Daher war es notwendig, die Zellen vor dem Versuch in eine abgerundete Form zu überführen. Die Abrundung der Zellen wurde durch Behandlung mit Trypsin-PBS-Lösung (0,05 % w/v) erreicht. Die Trypsin-PBS-Lösung wurde solange auf den Zellen belassen, bis unter mikroskopischer Kontrolle eine Retraktion der Zellen auftrat, die Zellen aber noch ausreichend am Petrischalenboden hafteten (ca. nach 20 bis 30 s Einwirkzeit). Die weitere Ablösung wurde dann durch mehrmaliges Waschen mit trypsinfreier Extrazellulärlösung (s. Abschnitt 2.2.5) gestoppt. Nach etwa 10 Minuten Wartezeit waren die Fibroblasten von sphärischer Gestalt, erschienen transparent und doppeltbrechend (Abb. 2). Die Größe der trypsinierten Zellen lag im Durchschnitt bei einer Länge von 12,9 \pm 0,3 µm und einer Breite von 10,6 \pm 0,4 µm (n = 20).



Abbildung 2: A Typisches lichtmikroskopisches Bild trypsinierter NIH-3T3-Zellen nach 36-48 Stunden Kultivierung. In **B** ist zusätzlich die vom rechten Bildrand kommende Patchpipette zu sehen. Die Aufnahmen entstanden direkt vor (**A**) bzw. während (**B**) einer elektropysiologischen Messung in der Whole-Cell-Konfiguration und zeigen beispielhaft Form, Größe und Lage der üblicherweise zu Patch-Clamp Messungen herangezogenen NIH-3T3-Zellen (aus Koschinkski 2001).

Sehr vereinzelt liegende Zellen, die lichtmikroskopisch keine Kontakte zu anderen Zellen zeigten, wurden nicht für die Messungen verwendet. Die zur Messung herangezogenen Zellen waren von abgerundeter Form, spindel- bis dreieckigbirnenförmig und hatten über wenige Ausläufer Kontakt zu umliegenden Zellen. In

diesem Zustand waren sie für die elektrophysiologischen Experimente gut geeignet. Es wurde darauf geachtet, nur in Größe und Form für die Zellpopulation typische Zellen für eine Messung heranzuziehen. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die Messungen so standardisiert wie möglich durchgeführt werden konnten.

2.2.2 Aufbau des Patch-Clamp Messstands

Der schematische Aufbau der Messanordnung zur Durchführung von Patch-Clamp Experimenten ist in der Abbildung 3 skizziert.



Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Patch-Clamp Messstands nach List electronic EPC 7 users manual der Firma HEKA electronics, modifizierte Darstellung aus Koschinkski 2001. (1) Messkammer mit Badlösung, (2) Patch-Clamp Pipette mit Ableitelektrode und Zelle, (3) Referenzelektrode, (4) Vorverstärker, (5) Ausgangsspannung, über die in Abhängigkeit vom hochohmigen Rückkopplungswiderstand R der Strom berechnet wird, (6) vom Computer vorgegebene Kommandospannung, mit der das einzustellende Potential berechnet wird.

Als Messkammer werden 35 mm Petrischalen verwendet, in denen die Zellen, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, vorbereitet wurden. Die Petrischalen können direkt in eine Halterung eingesetzt werden, die die Zellen im Strahlengang eines Invertmikroskops (Leica DM-IRB, Leica GmbH, Wetzlar) fixiert. Diese Halterung ermöglicht zudem die Kontrolle und Regelung der Temperatur der Badlösung während der Experimente (Temperature Controller, Luigs und Neumann GmbH, Ratingen). In die Messkammer hinein ragen die Badelektrode und die

Pipettenelektrode in einer Borosilkat-Glasmikropipette ("Patchpipette"). Die Patchpipette ist über den Pipettenhalter und einen Silikonschlauch mit einer 50 ml Kolbenspritze verbunden, was das Erzeugen von Über- und Unterdruck in der ermöglicht. Mit Hilfe eines elektromechanisch Patchpipette getriebenen Mikromanipulators (Märzhäuser, Wetzlar-Steindorf) wird die Patchpipette unter mikroskopischer Kontrolle an die Zellen am Boden der Messkammer herangeführt. Die Aufnahme der Ionenströme erfolgt über die in den Elektrolytlösungen der Badkammer bzw. der Patchpipette befindlichen chlorierten Silberelektroden. Die sehr kleinen Ströme (minimal 10⁻¹³ Ampère) werden über den direkt mit den Elektroden in Verbindung stehenden externen Vorverstärker zunächst vorverstärkt und dabei in Spannungssignale umgesetzt. Die Besonderheit des Vorverstärkers liegt dabei in seinem extrem hohen Eingangswiderstand bei kleinem elektrischen Grundrauschen. Ohne den hohen Eingangswiderstand würden die zu messenden Membranpotentiale sofort zusammenbrechen. Der EPC-9 (HEKA, Lambrecht, Pfalz) dient als integrierter Endverstärker, elektronischer Tiefpassfilter und Analog/Digitalwandler, der die bis dahin analogen Signale in digitale Werte umwandelt, die anschließend mit Hilfe eines Computers (Macintosh Quadra 950) verarbeitet, dargestellt und gespeichert werden. Zusätzlich erfolat die Darstellung in Echtzeit analog auf einem Speicheroszillographen (Tektronix GmbH, Köln). Der Computer ermöglicht mit seinem Patch-Clamp Datenaufnahme-Programm (Pulse, HEKA electronics) sowohl eine kontinuierliche Datenaufnahme als auch die Aufnahme von Pulssequenzen in Form von Spannungssprüngen. Hierbei fungiert der Computer auch als programmierbarer Pulsgeber, der vorbereitete, abrufbare Befehlssequenzen zur Ausführung über des Digital/Analogwandlerteil des EPC-9 an das Patch-Clamp Verstärkerteil sendet. Hier wiederum werden die entsprechenden Spannungen generiert, die dann über den Vorverstärker und die chlorierten Silberelektroden zum gewünschten Membranpotential führen. Die Datenanalyse und -aufbereitung erfolgt mit dem gleichen Rechner und dem HEKA-Softwareprogramm Pulse sowie dem Softwareprogramm IGOR (WaveMatrix, Inc., Oregon, USA). Invertmikroskop, Messkammerhalterung und Mikromanipulator befinden sich innerhalb eines Faraday'schen Käfigs und sind pneumatisch gedämpft gelagert, um sowohl elektrische als auch mechanische Störeffekte zu minimieren.

2.2.3 Herstellung von Glas-Mikropipetten ("Patchpipetten")

Für die Messungen wurden in einem mehrstufigen Prozess spezielle Glas-("Patchpipetten") aus Borosilikat-Glaskapillaren Mikropipetten mit Filament (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,87 mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld) mit einem Horizontal-Puller (Flaming-Brown Puller P-97, Sutter Instrument Co., Novato CA, USA) hergestellt, wobei je nach Einstellung Spitzenform und Öffnungsdurchmesser sehr variabel gewählt werden konnten. Danach wurden die Pipettenspitzen mit Hilfe einer Beschichtungs- und Feuerpolier-Apparatur (CPZ101 Pipette Forge, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen) feuerpoliert. Durch das Feuerpolieren kann der Öffnungsdurchmesser der Pipette noch nachträglich Weiterhin verändert werden. werden bei diesem Vorgang mögliche Oberflächenunebenheiten des Glases eingeschmolzen und Verunreinigungen von der Pipettenspitze entfernt. Dies ermöglicht eine Verbesserung des Kontakts zwischen der Glaswand der Pipettenspitze und der Zellmembran.

2.2.4 Die Patch-Clamp Technik und die Whole-Cell-Ableitung der Zellen

Die klassische Whole-Cell-Ableitungskonfiguration der Patch-Clamp Technik ist in Abbildung 4 zusammengefasst.



Abbildung 4:

Die Abbildung zeigt eine klassische Whole-Cell-Ableitungskonfiguration der Patch-Clamp Technik (verändert nach Hamill *et al.* 1981). Erläuterungen siehe Text.

Zunächst wird eine mit Intrazellulärlösung (s. Abschnitt 2.2.5) gefüllte Patchpipette mittels eines Mikromanipulators unmittelbar an der Oberfläche der Membran der zu untersuchenden Zelle positioniert. Ein mit einer 50 ml Kolbenspritze auf die Pipettenlösung angelegter leichter Überdruck verhindert dabei das Eindringen von Extrazellulärlösung in die Pipette, sowie Verunreinigungen der Pipettenspitze beim Durchtritt durch die Badlösungsoberfläche oder durch Partikel in der Badlösung. Zudem wird die Zellmembran in der letzten Phase der Annäherung der Pipette durch den Überdruck leicht eingedrückt und zeigt eine Eindellung. Der elektrische Widerstand der Patchpipette wird dabei ständig durch einen Testpuls von 10 mV und Messen des Stroms kontrolliert. Befindet sich die Pipette frei in der Badlösung, so beträgt der Elektrodenwiderstand zwischen 4 und 10 M Ω . Durch Wegnahme des Überdrucks nähern sich Pipette und Zellmembran einander an. Der Widerstand steigt auf etwa 50 bis 100 M Ω an. Durch Erzeugen eines leichten Unterdrucks durch Zug an der Kolbenspritze entsteht ein so enger Kontakt zwischen Membran und der Glaswand der Pipettenspitze, dass der elektrische Widerstand auf 2 bis 50 G Ω ansteigt. Man bezeichnet einen so dichten Kontakt als "Giga-Seal" (Hamill et al. 1981). Ausgehend von dieser Cell-Attached-Konfiguration kann man durch einen Unterdruckpuls oder einen kurzen Spannungsimpuls die Membran unter der Pipettenöffnung durchbrechen und gelangt so zur Whole-Cell-Ableitungs-Konfiguration (Ganzzell-Konfiguration), bei der die Elektrode leitend mit dem Zytoplasma verbunden ist. Dies ist mit einem Abfall des elektrischen Widerstands auf wenige hundert MΩ verbunden. Der Strom fließt nun von der Pipettenspitze über die komplette Zellmembran zur Badelektrode. Die Whole-Cell-Konfiguration ermöglicht somit die Messung der Ionenströme durch die gesamte Membran der Zelle. Alle Experimente werden bei 22° C durchgeführt.

2.2.5 lonenlösungen

Die für die Patch-Clamp Experimente verwendeten Ionenlösungen sind in Tabelle 3 aufgelistet. Bei den Experimenten wurden die als Extrazellulärlösung bezeichneten physiologischen Zellmembranaußenseite Lösungen an der und die als Intrazellulärlösung benannten Lösungen an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran eingesetzt. Die als physiologisch bezeichneten Lösungs-Kombinationen sind durch eine hohe Natriumkonzentration in der Extrazellularlösung (E) und durch eine ebenso hohe Kaliumkonzentration in der Intrazellulärlösung (IBL) gekennzeichnet (s. Tabelle 3). Der pH-Wert der Lösungen wurde mit 1-normaler NaOH-Lösung auf pH 7,35, bzw. für Messungen im sauren Bereich (s. Abschnitt 3.6.2) auf pH 6,5 titriert.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Ionenlösungen

A :	Extrazellulärlösung	1:

Name	NaCl	KCI	MgCl ₂	CaCl ₂	Glucose	HEPES
E	140 mM	3 mM	2 mM	2 mM	15 mM	10 mM

B: In Bezug auf [Ca²⁺]_{frei} "schwach gepufferte" Intrazellulärlösungen:

Name	[Ca ²⁺] _{frei}	KGlut.	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂	BAPTA	HEPES
IBL100n	100 nM	140 mM	20 mM	2 mM	29,69 µM	0,1 mM	10 mM

A: Der Extrazellulär (E)-Puffer wurde mit 1-normaler NaOH-Lösung auf pH 7,35 titriert. Dabei erhöhte sich die Konzentration von Natrium um 4 mM. Für Messungen in saurem pH-Bereich (s. Abschnitt 3.6.2) wurde mit 1-normaler NaOH-Lösung auf pH 6,5 titriert, wobei sich die Konzentration von Natrium um etwa 1 mM erhöhte. **B:** IBL: Intrazellulärpuffer für "physiologische" Lösungskombination, mit <u>B</u>APTA, <u>low buffered</u>, nachgestellte Zahlen/Buchstaben-Kombinationen geben die nominelle freie Ca²⁺-Konzentration des Intrazellulärpuffer an. Der IBL-Puffer wurde mit einer KOH-Lösung auf pH 7,30 titriert, wobei sich die Kaliumkonzentration um etwa 0,3 mM erhöhte.

Die Berechnung der freien Ca²⁺-Konzentration erfolgte nach der Formel:

$$[Ca^{2+}]_{\text{frei}} = K_D \times [Ca^{2+}]_{\text{Einwaage}} / ([Chelator]_{\text{Einwaage}} - [Ca^{2+}]_{\text{Einwaage}}).$$

Mit einer Dissoziationskonstante K_D = 238 nM und einer CaCl₂-Einwaage von 29,69 µM berechnet sich eine freie Ca²⁺-Konzentration von 100 µM.

Es wurde in einem so genannten "schwach" gepufferten System gearbeitet. Die im Bezug auf die freie Ca²⁺-Konzentration schwache Pufferung der Intrazellulärlösung erlaubt im Gegensatz zum "stark" gepufferten System lokal höhere Ca²⁺-Konzentationen, die z. B. durch die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern oder durch Ca²⁺-Ionen, die aus der Extrazellulärlösung durch Ca²⁺-Kanäle einströmen können, zustande kommen.

2.2.6 Osmolarität der Intra- und Extrazellulärlösungen

Die verwendeten Zellen reagieren auf Osmolaritätsunterschiede zwischen Intra- und Extrazellulärlösung häufig mit einer Schwellung oder der Bildung von Membranaussackungen, so genannten schwellungsbedingten "Blebs". Um Membranstromaktivierungen durch Zellschwellung weitestgehend auszuschließen (Ordway et al. 1995), wurden alle eingesetzten Lösungen mit einem Halbmikro-Osmometer (Knauer, Berlin) auf ihre Osmolarität hin überprüft und gegebenenfalls mit Sorbitol (2 M - Stammlösung) auf Isoosmolarität in Bezug auf die Intrazellulärlösung eingestellt. Die verwendeten Extrazellulärpuffer wurden auf die Osmolarität der Intrazellulärlösung entsprechend etwa 315 mOsmol/l eingestellt. Kontrollexperimente zeigten, dass Sorbitol selbst die Ergebnisse nicht beeinflusst.

2.2.7 Liquid-Junction Potentiale

Die bei den verwendeten Lösungen auftretenden Liquid-Junction Potentiale (vergleiche auch Barry & Lynch 1991) betrugen etwa 10 mV. Die Membranpotentiale wurden entsprechend korrigiert.

2.3 Substanzliste

2.3.1 Kälberseren

2.3.1.1 Neonatales Kälberserum

Das verwendete <u>N</u>eonatale <u>K</u>älber<u>s</u>erum (NKS) wurde von der Firma PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich ("Viralex" Newborn Calf Serum, ChargenNo: A03128-217) bezogen. Kurzzeitig wurde auch, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, NKS der Firma PAN-Systems GmbH, Aidenbach (ChargenNo: 971330) verwendet. Alle Seren wurden bei -20 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden sie bei 56 °C komplementinaktiviert. Die Gesamtproteinkonzentration bei beiden NKS-Chargen betrug 60 mg/ml.

2.3.1.2 Fetales Kälberserum

<u>F</u>etales <u>K</u>älber<u>s</u>erum (FKS, Bestellnummer A15-653, ChargenNo: A01428-291) mit der Bezeichnung "Vitalex" Foetal Calf Serum wurde von der Firma PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich bezogen.

Für die Experimente mit Zellen der BHK-Zelllinie wurde uns von der Arbeitsgruppe Prof. G. Wengler (Institut für Veterinärvirologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) FKS der Firma Linaris, Wertheim-Bettingen (ChargenNo: S3111KG) bereitgestellt.

2.3.2 Lysophosphatidsäure

L- α -Lysophosphatidsäure, Oleolyl (C18:1, [cis]-9), (LPA) wurde als Natriumsalz (Molekulargewicht (MG): 458,5 g/mol) bezogen (Sigma, München, Prod. Nr. L7260). Die Reinheit beträgt laut angefordertem Analysenzertifikat 99.5 % (w/w). Die Substanz ist nur gering wasserlöslich und wurde deshalb an fettsäurefreies Albumin (<u>Fetty acid free bovine serum albumin, FAFBSA, 5 % w/v</u>) gekoppelt (Watanabe & Sato 1996). Die Verdünnung erfolgte so, dass in der eingesetzten Lösung (E) 0,5 % (w/v) FAFBSA als Trägersubstanz und gleichzeitig als Schutzkolloid vorhanden war.

Hiermit ergab sich mit der üblicherweise eingesetzten Menge von 50 µl eine Endkonzentration von 0,0125 % w/v FAFBSA in der Badlösung (Volumen 2 ml). Kontrollversuche mit entsprechenden Konzentrationen der Trägersubstanz FAFBSA alleine zeigten bei den elektrophysiologischen Messungen keine Wirkung auf die Membranströme.

2.3.3 Sphingosin-1-Phosphat

Sphingosin-1-Phosphat (MG: 379,5 g/mol) wurde von der Firma Calbiochem-Novabiochem, Bad-Soden bezogen. Die Substanz ist ebenso wie LPA schlecht wasserlöslich und wurde deshalb zunächst in DMSO gelöst und anschließend an fettsäurefreies Albumin (FAFBSA, 5 % v/v) gekoppelt. Die Verdünnung erfolgte so, dass in der eingesetzten Lösung (E) 5 % (v/v) DMSO als Lösungsvermittler und 0,5 % (w/v) FAFBSA als Trägersubstanz und gleichzeitig als Schutzkolloid vorhanden war. Bei den durchgeführten Experimenten ergab sich mit der eingesetzten Menge von 50 µl eine Endkonzentration von 0,1 % (v/v) DMSO und 0,0125 % (w/v) FAFBSA in der Badlösung. Kontrollversuche mit entsprechenden Konzentrationen DMSO und FAFBSA ohne S1P zeigten bei den elektrophysiologischen Messungen keine Wirkung auf die Membranströme.

2.3.4 Bradykinin

Bradykinin (MG: 1060,2 g/mol) wurde von der Firma Sigma, München bezogen und in Extrazellulärlösung (E) mit 0,5 % (w/v) FAFBSA gelöst. FAFBSA diente hierbei als Schutzkolloid zum Absättigen unspezifischer Proteinbindungen. Die verschiedenen Verdünnungen wurden ebenfalls in Extrazellulärlösung (E) mit 0,5 % (w/v) FAFBSA durchgeführt.

2.3.5 Histamin

Histamin (MG: 111,1 g/mol) wurde ebenfalls von der Firma Sigma, München bezogen. Lösungen und Verdünnungen wurden wie von LPA (s. Abschnitt 2.3.2) hergestellt.

2.3.6 Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid wurde als 35 %-ige Lösung (Reinheitsgrad: reinst) von der Firma Merck, Darmstadt bezogen. Bei 20 °C hat die wässrige Flüssigkeit eine spezifische Dichte von 1,13 g/cm³. Die Stammlösung wurde in lichtundurchlässigen Flaschen im Kühlschrank bei +8 °C gelagert. Die Wasserstoffperoxidlösung wurde durch Zugabe entsprechender Volumina E-Puffer auf 0,004 %, 0,012 %, 0,04 %, 0,12 %, 0,4 % und 1,2 % (v/v) verdünnt. Dies entspricht einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von 0,0001 % bis 0,01 % nach Zugabe zur Badlösung (entsprechend etwa 0,04 bis 4 μ M Endkonzentration). Die in abgedunkelten Eppendorfgefäßen aufbewahrten Lösungen wurden an jedem Messtag neu hergestellt und im Verlauf des Tages bei ca. 0 °C gelagert.

2.3.7 Stickstoffmonoxid

Als NO-Donator wurde DEA-NONOate (DEA-NO, 2-(N,N-Diethylamino)-diazenolate-2-oxid (Natriumsalz), MG 155,1 g/mol) von der Firma Alexis, Grünberg verwendet. Es ist gut in Wasser oder Methanol löslich und zerfällt bei 22 °C und pH 7,4 mit einer Halbwertzeit von 16 Minuten in NO und ein Restmolekül (freies Amin). Für eine Temperatur von 37 °C ist eine Halbwertszeit von 2 Minuten angegeben. Das DEA-NO-Pulver wurde zunächst in 0,01 N NaOH gelöst. Diese Lösung bleibt, auf Eis gekühlt, etwa 24 Stunden stabil (Herstellerangabe). Direkt vor dem Einsatz am Messstand wurde die Lösung vom Eis genommen, so dass sie schnell Raumtemperatur (ca. 22 °C) erreichte. Gleichzeitig wurde der pH-Wert der Lösung mit 0,01 N HCI-Lösung auf pH 7,4 eingestellt, wodurch die Freisetzung von NO gestartet wurde. Diese Lösung wurde nun ohne zeitliche Verzögerung für die Patch-Clamp-Experimente verwendet. Da die Titrierung der DEA-NO-Lösung etwa 4 bis 6 Minuten dauerte und bei Raumtemperatur von ca. 25 °C erfolgte und die Messbedingungen bei 21 °C lagen, ist mit einer maximalen NO-Konzentration in der Badlösung nach ca. 10 Minuten nach Applikation der DEA-NO-Lösung zur Badlösung zu rechnen.

2.3.8 Substanzen zur Blockade von Ionenkanälen

Zur Charakterisierung von Membranströmen und der Identifikation einzelner Ionenkanaltypen wurden verschiedene Substanzen als spezifische Ionenkanalblocker eingesetzt.

Peptidtoxine:

Alle Peptidtoxine wurden in Extrazellulärpuffer mit 0,5 % (w/v) fettsäurefreiem bovinen Serumalbumin (FAFBSA) gelöst, um die unspezifische Bindung der Toxine Oberflächen zu minimieren. Die Lösungen wurden mit 40-facher an Endkonzentration angesetzt, bei -20 °C aufbewahrt und erst direkt vor dem Einsatz aufgetaut. Eingesetzt wurden immer 50 µl, was bei einem Badlösungsvolumen von 1950 µl in der Messkammer (35 mm Petrischale) zu einer 40-fachen Verdünnung führt und einer Endkonzentration von 0,0125 % (w/v) FAFBSA in der Badlösung entspricht. Alle Peptidtoxine wurden üblicherweise bis zu einer Maximalkonzentration von 1 µM eingesetzt.

Charybdotoxin (ChTX) ist ein stark basisches Peptid von 37 Aminosäuren (MG: 4296 g/mol) (Gimenez-Gallego *et al.* 1988) aus dem Gift des Skorpions *Leiurus quinquestriatus hebraeus.* Es blockiert sowohl Ca²⁺-abhängige Kaliumkanäle großer und mittlerer Leitfähigkeit (Reinhart *et al.* 1989) als auch Subtypen spannungsabhängiger Kaliumkanäle (Lewis & Cahalan 1988).

Margatoxin (MgTX) ist ein aus 39 Aminosäuren bestehendes Peptid (MG: 4179,0 g/mol), das aus dem Gift des Skorpions *Centruroides margaritatus* isoliert wurde (Garcia-Calvo *et al.* 1991, Knaus *et al.* 1995). Es gilt als selektiver Blocker bestimmter spannungsabhängiger Kaliumkanäle, insbesondere des K_v 1.3 in Lymphozyten.

Iberiotoxin (IbTx) besteht aus 37 Aminosäuren (MG: 4230,9 g/mol) und ist strukturell sehr eng verwandt mit Charybdo- und Margatoxin. Es wurde aus dem Gift des Skorpions *Buthus tamulus* isoliert und gilt als hochspezifisch für Ca²⁺-abhängige Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit, die so genannten Maxi-Kaliumkanäle (Übersicht bei Garcia *et al.* 1999).

Apamin, das kleinste bekannte Peptidtoxin (18 Aminosäuren, MG: 2027,0 g/mol), stammt aus dem Gift der Honigbiene und blockiert selektiv Ca²⁺-abhängige Kaliumkanäle kleiner Leitfähigkeit (Übersicht bei Dreyer 1990).

2.3.7 Interleukin-1-β

Für Versuche, bei denen eine Erhöhung der Bradykinrezeptordichte der NIH-3T3-Zellen erreicht werden sollte (s. Abschnitt 3.1.5.1), wurde rekombinantes murines Interleukin-1-β Biotrend Chemikalien GmbH (Köln) eingesetzt.

2.4 Statistische Auswertung und Darstellung

Die statistischen Auswertungen und die Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism, Version 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Sofern nicht anders gekennzeichnet, erfolgte die Angabe von Mittelwerten \pm SEM (<u>S</u>tandard <u>e</u>rror of the <u>m</u>ean).

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von Bradykinin auf den Membranstrom von NIH-3T3-Zellen

Abbildung 5 zeigt ein typisches Beispiel einer Membranstromregistrierung an einer NIH-3T3-Zelle in der Whole-Cell-Konfiguration vor und nach Applikation von 1 μ M Bradykinin. Während der Messung wurde alle 28 s das angelegte Membranpotential für 2 s auf -90 mV hyperpolarisiert. Die NIH-3T3-Zellen zeigten im Ruhezustand bei einem angelegten Membranpotential von +30 mV charakteristischerweise einen Membranstrom von 364 ± 35 pA (n=25). Nach der Registrierung des Ruhemembranstroms für ca. 60 s erfolgte die Applikation von Bradykinin zur Badlösung (Abb. 5).



Abbildung 5: Typischer Zeitverlauf des Membranstroms einer in der Whole-Cell Ableitung gemessenen NIH-3T3-Zelle vor und nach Applikation von Bradykinin (1 µM). Das Membranpotential wurde alternierend für jeweils 28 s auf +30 mV gehalten und für jeweils 2 s auf –90 mV hyperpolarisiert. Die Nulllinie ist durch --0-- gekennzeichnet. Dies entspricht einem Ruhemembranpotential von -33 mV.

Nach einer Latenz von wenigen Sekunden kommt es zu einem Anstieg des Membranstroms. Dieser durch Bradykinin induzierte Membranstrom erreichte bei einem Membranpotential von +30 mV nach etwa 20 Sekunden einen Maximalwert von 1162 ± 141 pA (n=6). Der durch Bradykinin induzierte Membranstrom nahm bei allen untersuchten Zellen innerhalb von 1 bis 2 Minuten nach Erreichen seines Maximums wieder vollständig ab, d. h. die durch Bradykinin induzierte Membranstrom stromaktivierung verläuft transient.

Messungen an 25 Zellen ergaben ein Ruhemembranpotential von -34 \pm 2 mV. Um den Strom vor und nach Bradykinin-Applikation weiter zu charakterisieren, wurden die Membranströme in Abhängigkeit vom Membranpotential gemessen (Abb. 6 A, B). Hierzu wurde die Zelle ausgehend von einem Membranpotential von -50 mV auf zunächst -130 mV und dann jeweils ausgehend von -50 mV in 20 mV-Schritten auf -110 mV bis schließlich +70 mV hyper- bzw. depolarisiert.

Abbildung 6 C zeigt die entsprechende Strom-Spannungsbeziehung vor und Abbildung 6 D nach Bradykinin-Applikation im Maximum der Bradykinin-induzierten Membranstromaktivierung.



Abbildung 6: Membranströme einer NIH-3T3-Zelle vor (**A**) und während der maximalen Bradykinininduzierten Membranstromamplitude (**B**). Ausgehend von einem Haltepotential von -50 mV wurde die Membran für jeweils 100 ms in 20 mV-Schritten von -130 bis + 70 mV verändert. Zwischen den einzelnen Spannungspulsen wurden jeweils für 28 s auf das Haltepotential von -50 mV zurückgeschaltet. **C, D:** Strom-Spannungsbeziehung der in A und B dargestellten Membranstromregistrierungen. Die Stromamplituden wurden in einem Zeitintervall von 10 ms am Ende der 100 ms dauernden Spannungspulse gemessen.

Die NIH-3T3-Zelle zeigt einen unspezifischen, spannungsunabhängigen Membranstrom mit einem Umkehrpotential von -34 mV (Abb. 6 C). Das Umkehrpotential verschob sich von -34 mV auf -77 ± 4 mV (n=6). Diese Verschiebung des Umkehrpotentials in Richtung des Kaliumgleichgewichtpotentials von -98 mV weist darauf hin, dass es sich bei dem an NIH-3T3-Mäusefibroblasten durch Bradykinin induzierten, spannungsunabhängigen Membranstrom um einen Kaliumstrom handeln könnte.

3.1.1 Pharmakologisches Profil des Bradykinin-induzierten Stroms

Um den durch Bradykinin induzierten Membranstrom weiter zu charakterisieren, wurden nun Experimente mit Kaliumkanal-blockierenden Peptidtoxinen durchgeführt. Applizierte man im Maximum des Bradykinin-induzierten Membranstroms das Peptidtoxin Charybdotoxin (ChTx) in einer Konzentration von 300 nM (Abb. 7), so ließ sich der Membranstrom durch das Toxin sofort und vollständig blockieren (n=3).



Abbildung 7: Blockade des Bradykinin-aktivierten Membranstroms durch Charybdotoxin (ChTx). Die Applikationen von Bradykinin (1 μM) und anschließend von Charybdotoxin (ChTx, 300 nM) im Maximum des Bradykinin-induzierten Stroms zur Badlösung sind jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das Haltepotential betrug +30 mV für jeweils 28 s, unterbrochen von jeweils 2 s bei -90 mV. Die Nulllinie ist durch --0-- gekennzeichnet.

Auch die Peptidtoxine Margatoxin (300 nM, n=3) und Iberiotoxin (300 nM, n=3) blockierten diesen Membranstrom vollständig. Für die verwendeten Peptidtoxine ist durch Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bekannt, dass sie an NIH-3T3-Mäusefibroblasten einen LPA- bzw. S1P-induzierten, Ca²⁺-abhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit blockieren (Repp *et al.* 1998). Apamin (300 nM), ein selektiver Blocker Ca²⁺-abhängiger, spannungsunabhängiger Kaliumkanäle kleiner Leitfähigkeit, hatte keinen Einfluss auf den Bradykinininduzierten Membranstrom.

Zusammengenommen lassen die Verschiebung des Umkehrpotentials in Richtung des Kaliumumkehrpotentials, sowie die Übereinstimmung des pharmakologischen Profils des Bradykinin-induzierten Membranstroms mit dem bereits bekannten pharmakologischen Profil des LPA- und S1P-induzierten Kaliumstroms darauf schließen, dass Bradykinin an NIH-3T3-Mäusefibroblasten eine Aktivierung von Ca²⁺- abhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumkanälen hervorruft.

3.1.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehung des Bradykinin-induzierten Kaliumstroms

Abbildung 8 A zeigt die Abhängigkeit der maximalen Bradykinin-induzierten Membranstromamplitude von der eingesetzten Bradykininkonzentration. Man sieht, dass eine maximale Membranstromaktivierung mit einer Konzentration von 1 μ M erreicht wird. Die berechnete halbmaximale effektive Konzentration (EC₅₀-Wert) für die Aktivierung beträgt 22,4 nM. Der Hill-Koeffizient von 1 lässt vermuten, dass es zu einer Wechselwirkung von Bradykininmolekülen zu Bradykinin-Rezeptoren in einem Verhältnis von 1 : 1 kommt. Gleichzeitig kommt es konzentrationsabhängig auch zu einer signifikanten Hyperpolarisation der Zelle mit einem maximalen Wert von -83 ± 3 mV. Dies wurde bereits mit einer Bradykininkonzentration von 0,1 μ M erreicht (Abb. 8 B).



Abbildung 8: Abhängigkeit der maximalen Bradykinin-induzierten Membranstromamplituden (**A**) und der Membranpotentiale (**B**) von der Bradykininkonzentration in NIH-3T3-Zellen. Die Kurve in (**A**) wurde mit Hilfe der Hill-Gleichung I = $I_{max} / (1 + (EC_{50} / [c])^n)$ ermittelt. Dabei ist I die Amplitude des durch Bradykinin-Applikation induzierten Stroms. I_{max} stellt die maximal erreichbare Stromamplitude und [c] die Bradykinin-Konzentration dar. EC₅₀ entspricht der halbmaximal effektiven Bradykinin-Konzentration. n ist der Hill-Koeffizient. Die beste Anpassung der Kurve an die Messwerte wurde mit Hilfe des Least-Square-Fit Verfahrens bei einem Hill-Koeffizient von 1,04 und einem EC₅₀-Wert von 22,3 nM erreicht. Das Haltepotential betrug +30 mV. **B:** Membranpotentiale während der maximalen Membranstromaktivierung in Abhängigkeit von der Bradykininkonzentration. Alle Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte ± SEM aus jeweils 3 bis 8 einzelnen Messungen an verschiedenen Zellen.

3.1.3 Reduzierte Aktivierung des Kaliumstroms durch Bradykinin

Nachdem etwa 3 Monate nach Abschluss der ersten Messreihe mit Bradykinin an NIH-3T3-Mäusefibroblasten weitere Messungen durchgeführt wurden, zeigten die NIH-3T3-Zellen überraschenderweise ein verändertes Verhalten. Auf die Applikation von Bradykinin reagierten sie zum Teil (3 von 8 Zellen) nicht mehr mit der Aktivierung eines zusätzlichen Kaliumstroms. Die maximalen Stromamplituden der 5 auf Bradykinin-Applikation reagierenden Zellen waren signifikant geringer, als in den vorherigen Experimenten. Jedoch war die Wirkung von LPA, die auch über G-Proteine vermittelt wird, im Vergleich zu vorherigen Untersuchungen unverändert (n=8).

Da bekannt ist, dass Zelllinien in Abhängigkeit von ihrer Passagezahl ihre Eigenschaften verändern können, wurden zunächst neue NIH-3T3-Zellen mit einer niedrigen Passagezahl verwendet. Auch diese Zellen zeigten nach Applikation von Bradykinin nur noch geringe oder keine Membranstromaktivierungen (n=10). Als eine mögliche Ursache für den fehlenden Bradykinineffekt wurde die inzwischen gewechselte Serumcharge für die Zellkultur vermutet. Durch den in verschiedenen Serumchargen stark variierenden Gehalt an Mitogenen und Wachstumsfaktoren bestand die Möglichkeit, dass der zur Expression der Bradykininrezeptoren benötigte Faktor nicht in ausreichenden Konzentrationen vorhanden war. Da uns die zuvor benutzte Serumcharge nicht mehr zur Verfügung stand, wurde zunächst nach einer anderen Möglichkeit gesucht, die ursprüngliche Reaktion der Zellen auf Bradykinin zu reproduzieren.

3.1.3.1 Vorinkubation der NIH-3T3-Mäusefibroblasten mit Interleukin-1-β

Von Lungenfibroblasten ist bekannt, dass die Expression von Bradykinin-1-(B1-) Rezeptoren durch Inkubation mit Interleukin-1- β innerhalb von Stunden bis 3 Tagen stark gesteigert werden kann (Phagoo 2001). In der Hoffnung durch Inkubation mit Interleukin-1- β auch an NIH-3T3-Zellen die gesteigerte Expression von Bradykinin-Rezeptoren hervorrufen zu können und somit den ursprünglichen Bradykinin-Effekt
wieder herzustellen, wurden Versuche mit Interleukin-1- β vorinkubierten 3T3-Zellen durchgeführt.

Da die Inkubationsdauer von Interleukin zur Expression des Bradykinin-1-Rezeptors mit Stunden bis Tage angegeben wird, wurden zwei Messreihen (jeweils n=3) durchgeführt, bei denen die 3T3-Zellen 4 bzw. 48 Stunden vor der Messung mit 500 nM Interleukin-1- β vorinkubiert wurden. Zusätzlich wurde eine Messreihe (n=3) durchgeführt, bei der dem Kulturmedium der NIH3T3-Mäusefibroblasten 48 Stunden und zusätzlich nochmals 4 Stunden vor der Messung Interleukin-1- β (500 nM) zugegeben wurde.

In keiner der 3 Messreihen reagierten die Zellen jedoch auf die Applikation von Bradykinin mit einer Aktivierung eines Kaliumstroms. Der frühere Bradykinineffekt konnte somit auf diese Weise nicht reproduziert werden.

3.1.3.2 Einfluss veränderter Serumchargen auf den Bradykinin-Effekt

Neben der Vorinkubation mit Interleukin-1-β wurde versucht, durch die Verwendung einer anderen Serumcharge in der Zellkultur den Bradykinineffekt wieder herzustellen. Dazu wurde statt des zuvor eingesetzten NKS der Firma PAA (s. Abschnitt 2.3.1.1) nun NKS der Firma PAN (s. Abschnitt 2.3.1.1) in gleicher Konzentration (5 %) verwendet. Nach dreimaligem Passagieren der NIH-3T3-Mäusefibroblasten mit diesem Serum wurden Experimente mit 1 µM Bradykinin durchgeführt, woraufhin 4 von 5 Zellen auf eine Bradykinin-Applikation mit einer Kaliumstromaktivierung antworteten. Die induzierte Stromamplitude betrug im Mittel 1057 ± 370 pA (n=4) und war damit etwa so hoch wie die in früheren Experimenten durch Bradykinin induzierte Kaliumstromamplitude. Auch der zeitliche Verlauf entsprach dem der in Abbildung 5 dargestellten Zelle. Unter den veränderten Zellkulturbedingungen zeigten die Zellen jedoch ein sehr schlechtes Sealverhalten, sowie bei der Whole-Cell-Konfiguration außergewöhnlich hohe unspezifische Grundströme (> 1000 pA), so dass nur noch etwa jede dritte Zelle für elektrophysiologische Messungen verwertbar war. Aus diesem Grund wurden die Experimente mit dieser Serumcharge nicht fortgeführt.

3.1.3.3 Einfluss veränderter Zellkulturbedingungen auf den Bradykinin-Effekt

Zusätzlich zu den Versuchen mit Serum anderer Chargen wurden die Zellkulturbedingungen stark modifiziert. Hierzu wurde spezielles Medium (BHK-Medium = Baby-Hamster-Kidney-Medium, s. Abschnitt 2.1.1.2), das uns von der Arbeitsgruppe Prof. G. Wengler (Institut für Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt wurde, statt des üblichen DMEM-Medium verwendet. Außerdem wurde zum Ablösen der Zellen vom Boden der Petrischalen nicht Trypsin, sondern EDTA, ein Chelatbildner (s. Abschnitt 2.1.1.2), verwendet. Es wurde Pankreasenzym vermutet. dass Trypsin als zu einer Schädigung der Membranoberfläche geführt und aus diesem Grund den Rezeptorbesatz der NIH-3T3-Mäusefibroblasten verändert haben könnte.

Die NIH-3T3-Mäusefibroblasten wurden zunächst dreimal passagiert. In den folgenden Experimenten mit den in BHK-Medium kultivierten NIH-3T3-Mäusefibroblasten konnte der Bradykinineffekt wieder reproduziert werden. Nach Applikation von Bradykinin (1 μ M) reagierten die NIH-3T3-Mäusefibroblasten mit einem Kaliumstrom, der im Mittel 750 ± 252 pA betrug (n=4). Die Stromamplitude betrug somit nur etwa 60 % der bei den früheren Experimenten gefundenen Amplitude von 1162 ± 141 pA (n=6). Die ursprünglich gemessenen Bradykinineffekte waren somit reproduzierbar, zeigten jedoch eine geringere Stromamplitude.

Als nächstes sollte geprüft werden, ob auch Entzündungsmediatoren anderer Stoffklassen an NIH-3T3-Zellen eine Aktivierung eines Kaliumstroms bewirken können.

3.2 Wirkung von Histamin auf den Membranstrom von NIH-3T3-Zellen

3.2.1 Aktivierung eines Kaliumstroms durch Histamin

Histamin ist ein klassischer Entzündungsmediator aus der Gruppe der biogenen Amine (Winbery & Libermann 2002). Histamin aktiviert wie Bradykinin G-Protein gekoppelte Kanäle. Deshalb lag es nahe zu prüfen, ob auch Histamin an NIH-3T3-Mäusefibroblasten einen Kaliumstrom zu aktivieren vermag. Hierzu wurden die NIH-3T3-Mäusefibroblasten wie in Abschnitt 2.1.1.1 beschrieben kultiviert und zu Whole-Cell-Messungen (s. Abschnitt 2.2.4) herangezogen. Abbildung 9 zeigt, dass es nach Applikation von Histamin (100 μ M), nach einer kurzen Latenz von wenigen Sekunden zu einer Aktivierung eines zusätzlichen Membranstroms kommt. Innerhalb von etwa 30 s nach Histamin-Applikation wird ein Maximum (n=7) erreicht.



Abbildung 9: Zeitverlauf der Aktivierung eines zusätzlichen Membranstroms an einer NIH-3T3-Zelle durch Histamin (100 μ M). Die Applikation von Histamin zur Badlösung ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das Haltepotential betrug +30 mV für jeweils 18 s, unterbrochen von jeweils 2 s bei –90 mV. Die Nulllinie ist durch --0-- kennzeichnet.

Die maximale Stromamplitude lag bei einem Haltepotential von +30 mV bei 917 \pm 106 pA. Hiermit einhergehend zeigte sich eine Membranhyperpolarisation auf Werte von -85 \pm 2 mV (n=7). Innerhalb der ersten ein bis zwei Minuten nach dem Maximum der Stromaktivierung kam es zur vollständigen Inaktivierung dieses Kaliumstroms.



Abbildung 10: Strom-Spannungs-Beziehung des durch Histamin (100 µM) aktivierten Membranstroms an einer NIH-3T3-Zelle. Die Abbildung ist repräsentativ für Messungen an 7 verschiedenen Zellen.

Die Strom-Spannungs-Beziehung nach Histamin-Applikation (Abb. 10) zeigt bis zu einem Membranpotential von +30 mV einen nahezu linearen Verlauf. Warum die Stromamplitude bei höheren Membranpotentialen im Gegensatz zum Bradykinininduzierten Membranstrom abnimmt, konnte nicht geklärt werden. Die beobachtete Hyperpolarisation der Zellmembran auf -85 mV in die Nähe des Kaliumgleichgewichtpotentials legte die Vermutung nahe, dass es sich bei dem durch Histamin induzierten transienten Membranstrom ebenfalls um einen Kaliumstrom handelt.

3.2.2 Pharmakologisches Profil des durch Histamin induzierten Stroms

In weiteren Experimenten wurde nun der Effekt kaliumkanalblockierender Peptidtoxine auf den Histamin-induzierten Membranstrom geprüft. Abbildung 11 zeigt die sofortige und vollständige Blockade des durch Histamin aktivierten Kaliumstroms durch Margatoxin (300 nM). Dieser Membranstrom wurde auch durch Charybdotoxin (300 nM, n=3) und Iberiotoxin (300 nM, n=3) vollständig blockiert.



Abbildung 11: Blockade des durch Histamin (100 µM) aktivierten Kaliumstroms durch Margatoxin (300 nM MgTx). Die Applikationen von Histamin (HIS) und Margatoxin zur Badlösung sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das Haltepotential betrug +30 mV für jeweils 18 s, unterbrochen von jeweils 2 s bei -90 mV. Die Abbildung ist repräsentativ für Messungen an 3 verschiedenen Zellen, die Nulllinie ist durch --0-- kennzeichnet.

Die Membranhyperpolarisation nach Histamin-Applikation und das pharmakologische Profil des Membranstroms zeigen, dass Histamin an NIH-3T3-Zellen zur Aktivierung eines Kaliumstroms führt.

Bei Wiederholungen von Experimenten zu einem späteren Zeitpunkt zeigte sich, dass die NIH-3T3-Mäusefibroblasten auf Applikation von Histamin (bis zu 1 mM) ähnlich wie auf die Applikation von Bradykinin nur noch selten (3 von 7 Zellen) und mit einer signifikant geringeren Membranstromamplitude reagierten. Daraufhin vorgenommene Veränderungen des Zellkulturmediums (Kultivierung in BHK-Medium, s. Abschnitt 2.1.1.2) hatten hierauf keinen Einfluss.

3.3 Einfluss von Wasserstoffperoxid auf den Membranstrom von NIH-3T3-Zellen

Da bekannt ist, dass Wasserstoffperoxid am Entzündungsgeschehen beteiligt ist (Bychkov 1999, Barlow & White 1998), sollte geprüft werden, ob Wasserstoffperoxid an NIH-3T3-Mäusefibroblasten ebenfalls zur Aktivierung eines Kaliumstroms führt. Abbildung 12 zeigt einen typischen Zeitverlauf einer Membranstromaktivierung nach Applikation von H_2O_2 (0,003 % v/v). Bereits innerhalb von 20 Sekunden steigt der Membranstrom an und erreicht innerhalb von 20 bis 120 s nach Applikation mit einer Amplitude von 1863 pA sein Maximum. Der Zeitverlauf des durch H_2O_2 aktivierten Membranstroms unterscheidet sich deutlich vom Zeitverlauf des durch Bradykinin (Abb. 5) oder Histamin (Abb. 9) aktivierten Membranstroms. Erst nach etwa 15 Minuten erreicht der Membranstrom die Amplitude vor H_2O_2 -Applikation, während das Zellmembranpotential mit -90 mV weiter hyperpolarisiert ist (Abb. 12).



Abbildung 12: Originalregistrierung des Membranstroms einer NIH-3T3-Zelle nach Applikation von Wasserstoffperoxid, gemessen über einen Zeitraum von etwa 30 min. Die Applikation von H_2O_2 (0,003 % v/v) zur Badlösung ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das Haltepotential betrug +30 mV für jeweils 18 s, unterbrochen von jeweils 2 s bei –90 mV. Die Messung ist repräsentativ für n=3 Zellen, die Nulllinie ist durch --0-- kennzeichnet.

Der H₂O₂-induzierte Membranstrom zeigte bei einem Membranpotential von +30 mV im Mittel eine maximale Amplitude von 1828 \pm 250 pA (n=4 nach Applikation von 0,01 % vol/vol H₂O₂). Während der Aktivierung des Membranstroms kam es zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials auf –91 \pm 5 mV (n=4).



Abbildung 13: Strom-Spannungsbeziehungen des Membranstroms vor H_2O_2 -Applikation (**A**) und während des maximalen H_2O_2 -induzierten Membranstroms (0,01 % H_2O_2 , **B**). Ausgehend von einem Haltepotential von -50 mV wurde die Membran für jeweils 100 ms in 20 mV-Schritten von -130 bis +70 mV verändert. Zwischen den einzelnen Spannungspulsen wurden jeweils für 18 s auf das Haltepotential von -50 mV zurückgeschaltet. Die Stromamplituden wurden am Ende des 100 ms dauernden Spannungspulses gemessen. Die Abbildung ist repräsentativ für Messungen an 22 verschiedenen Zellen.

Abbildung 13 stellt die Strom-Spannungsbeziehungen des Membranstroms vor H₂O₂-Applikation und während des maximalen H₂O₂–induzierten Membranstroms dar. Das Umkehrpotential hat sich von -37 auf -92 mV verschoben, was mit einer Hyperpolarisation der Zelle einherging. Im Gegensatz zu den bislang beobachteten Effekten von z. B. Bradykinin war diese Membranhyperpolarisation auch noch nach 30 Minuten vorhanden. Nach dieser Zeit trat bei den Zellen jedoch eine mikroskopisch erkennbare Schädigung der Zellmembran auf (Bildung von so genannten "Blebs") und eine deutliche Zunahme unspezifischer Membranströme.

Der durch H₂O₂ induzierte Effekt unterscheidet sich somit von den bisherigen durch Bradykinin oder Histamin induzierten Effekten.

3.3.1 Pharmakologisches Profil des durch Wasserstoffperoxid induzierten Kaliumstroms

In weiteren Experimenten wurde nun der Effekt kaliumkanalblockierender Peptidtoxine auf den H_2O_2 -induzierten Membranstrom geprüft. Applizierte man im Maximum des durch H_2O_2 induzierten Membranstroms das Peptidtoxin Margatoxin (300 nM, n=3), so zeigte sich eine sofortige und vollständige Blockade des Stroms (Abb. 14). Ebenfalls konnte durch die Peptidtoxine Charybdotoxin (300 nM ChTx) und Iberiotoxin (300 nM IbTx) eine vollständige Blockade des H_2O_2 -induzierten Stroms erzielt werden (n=3). Im Gegensatz hierzu zeigte die Applikation von Apamin keine Auswirkung auf den Stromverlauf.



Abbildung 14: Blockade des durch H_2O_2 aktivierten Kaliumstroms durch Margatoxin (MgTx, 300nM). Die Applikationen von 0,02% v/v H_2O_2 und MgTx zur Badlösung sind durch Pfeile gekennzeichnet. Das Haltepotential betrug +30 mV für jeweils 18 s, unterbrochen von jeweils 2 s bei –90 mV. Die Nulllinie ist durch --0-- kennzeichnet. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Messungen.

Applizierte man Charybdotoxin nicht im Maximum der Stromaktivierung, sondern nach ca. 10 bis 15 Minuten, so wurde der zusätzliche Strom auch nach dieser langen Zeit vollständig blockiert (n=3). Die Wirkung von Charybdotoxin bewirkte ebenfalls einen Rückgang der Hyperpolarisation auf das ursprüngliche Membranpotential.

Die Verschiebung des Membranpotentials in die Nähe des Kaliumgleichgewichtpotentials sowie das pharmakologische Profil zeigen, dass H₂O₂ zur Aktivierung von Kaliumkanälen führt.

3.3.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehung des durch Wasserstoffperoxid induzierten Kaliumstroms

Abbildung 15 A zeigt die Abhängigkeit der Kaliumstromaktivierung in Abhängigkeit von der eingesetzten H_2O_2 -Konzentration.



Abbildung 15: (**A**) Abhängigkeit der Amplituden des aktivierten Kaliumstroms in NIH-3T3-Zellen von der verwendeten H_2O_2 -Konzentration. Die Kaliumstromamplituden wurden durch Subtraktion der vor H_2O_2 -Applikation gemessenen Membranstromamplituden von den maximalen Membranstromamplituden nach H_2O_2 -Applikation bestimmt. Das Haltepotential der Zellen betrug +30 mV. Die Kurve wurde mit Hilfe der Hill-Gleichung (s. Abb. 8) ermittelt (**B**) Abhängigkeit des Membranpotentials von der verwendeten H_2O_2 -Konzentration. **A/B:** Die Datenpunkte repräsentieren jeweils Mittelwerte ± SEM-Werte aus 3 bis 5 Einzelmessungen.

Eine maximale Amplitude des Kaliumstroms zeigte sich ab einer H₂O₂-Konzentration von 0,01 % (v/v) H₂O₂, entsprechend etwa 3 μ M. Die in Abbildung 15 A dargestellte Kurve wurde mit Hilfe der Hill-Gleichung (s. Abb. 8) ermittelt. Die Kurvenanpassung an die Messwerte erfolgte mit Hilfe des Least-Square-Fit Verfahrens. Die beste Kurvenanpassung ergab sich bei einem Hillkoeffizienten von 2,8 und einem EC₅₀-Wert von 0,0013 % (v/v) H₂O₂, was einer Konzentration von 0,4 μ M entspricht.

3.3.3 Membranschädigende Wirkung von Wasserstoffperoxid

 H_2O_2 besitzt in Konzentrationen etwa entsprechend dem EC₅₀-Wert von 0,0013 % entsprechend 0,4 µM neben dem sofort einsetzenden, elektrophysiologisch messbaren Kaliumstrom-aktivierenden Effekt auch eine die Zellmembran schädigende Wirkung. Bei einer Konzentration von 0,001 % (v/v) H_2O_2 erkennt man nach etwa 30 Minuten lichtmikroskopisch eine deutliche Zellschädigung (Abb. 16 B). Die Veränderungen der Zellmembranen der NIH-3T3-Mäusefibroblasten gehen mit der Bildung von Membranaussackungen (so genannten "Blebs") einher, was deutlich die Schädigung der Zellmembran durch H_2O_2 zeigt.

Bereits bei Applikation von geringen Konzentrationen an H_2O_2 (0,03 % v/v), zeigte sich bei 75 % der untersuchten Zellen ein solcher Membranstrom. Dieser zusätzliche Strom ging nicht mit einer Hyperpolarisation der Zellmembran einher. Es handelt sich hierbei offensichtlich um einen unspezifischen Membranstrom, bedingt durch eine Schädigung der Zellmembran. Erhöht man die Konzentration von H_2O_2 auf 0,3 % (v/v), kommt es innerhalb von Sekunden zu einer starken Zunahme des Membranstroms auf mehr als 3 nA (n=3).

А



Abbildung 16:

NIH-3T3-Mäusefibroblasten vor (A) und 30 Minuten nach (B) Applikation von H_2O_2 (0,001 % v/v) zur Badlösung.

Die Zellmembranen zeigen im Verlauf der H₂O₂-Wirkung zunehmende Ausstülpungen und "Blebs".

В



3.4 Wirkung von DEA-NO als Stickstoffmonoxid-Donator auf dem Membranstrom von NIH-3T3-Mäusefibroblasten

Da die Applikation von H₂O₂ in mikromolaren Konzentrationen, wie sie auch physiologisch vorkommen, zu einer Aktivierung eines Kaliumstroms geführt hatte, stellte sich die Frage, ob auch andere Donoren freier Radikale zu einer Kaliumstromaktivierung führen können. Als Radikaldonor wurde eine DEA-NO-Lösung (20 mM) verwendet. Aus dieser Lösung werden die NO-Radikale bei einer Temperatur von 21 °C in einem Zeitraum von etwa 5 bis 10 Minuten freigesetzt (Angabe des Herstellers, s. Abschnitt 2.3.5.2). Die NIH-3T3-Mäusefibroblasten zeigten nach Applikation von DEA-NO-Lösung (20 mM) keine Aktivierung eines zusätzlichen Stroms (n=6, Abb. 17).



Abbildung 17: Originalregistrierung des Membranstroms einer NIH-3T3-Zelle. Die Pfeile kennzeichnen die Applikation von DEA-NO (20 mM) und LPA (1 μ M) zur Badlösung. Das Haltepotential betrug +30 mV für jeweils 18 s, unterbrochen von jeweils 2 s bei –90 mV. Die Nulllinie ist durch --0-- kennzeichnet.

Applizierte man nach vorausgegangener DEA-NO-Applikation zur Kontrolle der Aktivierbarkeit des Kaliumstroms zusätzlich LPA (Abb. 17), so kam es innerhalb von ca. 10 bis 30 s zu der für LPA typischen transienten Kaliumstromaktivierung (Repp *et al.* 1998, 2001). Umgekehrt konnte jedoch nach vorausgegangener LPA-induzierter Kaliumstromaktivierung nach Applikation von DEA-NO-Lösung bei 3 von 4 Zellen ein geringer transienter Stromanstieg (82 ± 38 pA) beobachtet werden (Abb. 18). Dieser Stromanstieg ging mit einer Membranhyperpolarisation um 13 mV auf -47 ± 5 mV einher (n=3).



Abbildung 18: Originalregistrierung der Kaliumstromaktivierung einer NIH-3T3-Fibroblastenzelle bei sequentieller Applikation von LPA (1 µM), DEA-NO (20 mM) und S1P (1 µM) zur Badlösung. Pfeile kennzeichnen die Applikation. Das Haltepotential betrug +30 mV für jeweils 18 s, unterbrochen von jeweils 2 s bei –90 mV. Die Abbildung ist repräsentativ für n=3 Zellen, die Nulllinie ist durch --0--kennzeichnet.

Dass der relativ geringe Kaliumstrom-induzierende Effekt von DEA-NO nicht dadurch Zustande kommt, dass die Kaliumkanäle der Zellen nicht mehr aktivierbar sind, kann durch den Effekt der nachfolgenden Applikation von Sphingosin-1-Phosphat ausgeschlossen werden. Wie in Abbildung 18 gut zu erkennen ist, führt die Applikation von S1P (1 μ M) zu einem deutlichen Kaliumstromanstieg. Dieser geht mit einer Membranhyperpolarisation der Zelle auf -88 mV einher.

Dass DEA-NO alleine nicht in der Lage war, einen Kaliumstrom zu aktivieren, sondern erst nach vorausgegangener LPA-Applikation, könnte dadurch erklärt werden, dass LPA die Kaliumkanalaktivierbarkeit für DEA-NO "bahnt".

3.5 Mehrfachapplikation von Entzündungsmediatoren

Nachdem in den vorliegenden Experimenten gezeigt werden konnte, dass Entzündungsmediatoren aus den Stoffklassen der Kinine, der biogenen Amine und der reaktiven Sauerstoffverbindungen jeweils zu einer Kaliumstromaktivierung führen können, stellte sich nun die Frage, ob zur Aktivierung dieser Kaliumströme gleiche oder unterschiedliche Signalwege benutzt werden.

Für LPA konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass es in der Whole-Cell-Messkonfiguration nur einmal möglich ist. eine transiente Kaliumstromaktivierung hervorzurufen (Repp et al. 1998). Dies kommt offensichtlich nicht durch eine Inaktivierung der beteiligten Rezeptoren oder Kaliumkanäle zustande, sondern durch einen Verbrauch der zur Rekonstitution der entsprechenden Signalkette notwendigen intrazellulären Moleküle bzw. Metaboliten (Repp et al. 1998, 2001). Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass andere Substanzen wie z. B. S1P auch nach einer erfolgten LPA-induzierten Kaliumstromaktivierung diesen Strom nochmals und mit typischer Amplitude zu induzieren vermögen; allerdings in der Whole-Cell-Konfiguration jeweils nur ein Mal (Repp et al. 2001). Daraus wurde geschlossen, dass zumindest die Substanzen LPA und S1P über unterschiedliche Rezeptoren zunächst unterschiedliche Signalwege antriggern, in einem gemeinsamen Weg münden und dann jeweils die gleichen Kaliumkanäle aktivieren (Repp et al. 2001). Es kommt hier also nicht zu einer funktionellen Kreuzdesensitisierung.

Daher sollte nun mit Hilfe von sequentieller Mehrfachapplikation überprüft werden, ob zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Entzündungsmediatoren Kreuzdesensitisierungen auftreten oder ob deren Signalwege zunächst jeweils unabhängig ("parallel") verlaufen, um schließlich spätestens am Effektormolekül, dem Kaliumkanal, zu konvergieren. Abbildung 19 zeigt, dass LPA (1 µM) nach einer vorausgegangenen Kaliumstromaktivierung durch Bradykinin (0,1 µM) erneut zu einer für LPA typischen Kaliumstromaktivierung führt. Die Amplituden der durch Badykinin und LPA induzierten Kaliumströme waren nicht signifikant unterschiedlich hoch (n=6). Umgekehrt konnte auch nach vorausgegangener LPA-Applikation durch Bradykinin eine erneute Kaliumstromaktivierung erzielt werden (Abb. 20).



Abbildung 19: Sequentielle Aktivierung eines Kaliumstroms in einer NIH-3T3-Mäusefibroblastenzelle durch Applikation von Bradykinin (0,1 μ M) und LPA (1 μ M) zur Badlösung (der Zeitpunkt der Applikation ist durch einen Pfeil gekennzeichnet). Das Haltepotential betrug +30 mV für jeweils 18 s, unterbrochen von jeweils 2 s bei –90 mV. Die Abbildung ist repräsentativ für 6 Zellen, die Nulllinie ist durch --0-- kennzeichnet.

Als dritte Substanz wurde dann S1P appliziert, das wiederum einen Kaliumstrom mit annähernd gleicher Stromamplitude aktivierte (Abb. 20).



Abbildung 20: Membranstromaktivierungen einer NIH-3T3-Zelle nach sequentieller Applikation (durch entsprechende Pfeile gekennzeichnet) von LPA (1 μ M), Bradykinin (1 μ M) und S1P (1 μ M). Das Haltepotential betrug +30 mV für jeweils 18 s, unterbrochen von jeweils 2 s bei –90 mV. Die Nulllinie ist durch --0-- kennzeichnet. Die Abbildung ist repräsentativ für n=4 Messungen.

Vergleicht man den LPA-induzierten Kaliumstrom aus den Experimenten, bei denen LPA als erste Substanz appliziert wurde, mit den Ergebnissen der Experimente, bei denen LPA als zweite Substanz appliziert wurde, so zeigte sich in der Amplitude und Dauer der Aktivierung kein signifikanter Unterschied (n=4). Auch S1P induzierte

unabhängig von der Position in der Applikationssequenz die für eine alleinige Applikation von S1P typische Membranstromamplitude (n=6).

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch nach Applikation von Histamin die Applikation von LPA und Bradykinin (n=3) zu einer für die Substanzen typischen, transienten Stromaktivierung führt (Abb. 21).



Abbildung 21: Sequentielle Aktivierung eines Kaliumstroms in einer NIH-3T3-Mäusefibroblastenzelle durch die Applikation von Histamin (100 μ M), LPA (1 μ M) und Bradykinin (1 μ M) zur Badlösung (durch entsprechende Pfeile markiert). Das Haltepotential betrug +30 mV für jeweils 18 s, unterbrochen von jeweils 2 s bei -90 mV. Die Abbildung ist repräsentativ für n=3 Messungen, die Nulllinie ist durch --0---kennzeichnet.

Ebenso führte die Applikation von H_2O_2 nach vorheriger Applikation eines anderen Entzündungsmediators zu einer schnellen und für H_2O_2 typischen, lang anhaltenden Kaliumstromaktivierung (n=5, Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigten sich LPA, S1P, Bradykinin, Histamin und H₂O₂, die in unterschiedlichen Experimenten sequentiell in wechselnder Reihenfolge appliziert wurden, in der Aktivierung eines Kaliumstroms als unabhängig voneinander. Die sequentielle Aktivierung eines Kaliumstroms durch die unterschiedlichen Substanzen lässt darauf schließen, dass tatsächlich unterschiedliche Signalwege für die Entzündungsmediatoren existieren müssen, die sich gegenseitig nicht beeinflussen (d. h. keine Kreuzdesensitisierung), jedoch jeweils zu einer Kaliumstromaktivierung führen.

Ob es eine gemeinsame Endstrecke dieser Signalwege gibt, oder ob die Signalwege erst am Kaliumkanal selbst konvergieren, ist bisher ungeklärt. Denkbar wäre auch, dass jeder Signalweg als Endpunkt seine "eigenen" Kaliumkanäle aufweist.

3.6 Einfluss des pH-Wertes auf die Kaliumstromaktivierung

3.6.1 Lysophosphatidsäure-induzierter Kaliumstrom unter sauren Zellkulturbedingungen

Ein wichtiger Faktor bei Entzündungsreaktionen ist die Erniedrigung des pH-Wertes im entzündeten Gewebe. In der Literatur sind intrazelluläre pH-Wertverschiebungen in entzündeten Gelenken bis auf pH 5,7 beschrieben (Andersson *et al.* 1999). Da vermutet wird, dass Kaliumkanäle eine Rolle im Entzündungsgeschehen spielen, sollte geprüft werden, ob sich eine Veränderung des pH-Wertes auf die Amplituden oder die Aktivierbarkeit der Kaliumströme auswirkt. Dazu wurden zunächst Experimente unter abgewandelten Zellkulturbedingungen durchgeführt. NIH-3T3-Mäusefibroblasten wurden 7 Tage bei einem CO₂-Gehalt von 20 % im Begasungsgemisch kultiviert. Als Kontrolle dienten NIH-3T3-Mäusefibroblasten derselben Charge, die bei den üblichen Zellkulturbedingungen mit 6 % CO₂ kultiviert wurden. Die mittels eines pH-Meters (Single Pore Plast, Hamilton, nach der Methode der Gefrierpunkterniedrigung) gemessenen pH-Werte des Zellkulturmediums betrugen hierbei pH 6,98 ± 0,10 bei 20 % CO₂ (n=3) gegenüber pH 7,45 ± 0,07 bei 6 % CO₂ (n=3).

Die unter den o. g. Bedingungen 7 Tage in saurem Milieu (20 % CO₂ entsprechend pH 7,0) kultivierten NIH-3T3-Mäusefibroblasten zeigten bei elektrophysiologischen Messungen (pH der Extrazellulärlösung = pH 7,35) keine signifikante Veränderung der Grundmembranströme (Abb. 22). Die Amplitude der durch LPA-induzierten Kaliumströme dagegen war bei den mit 20 % CO₂ im Begasungsgemisch vorinkubierten Zellen jedoch hochsignifikant (p < 0,001) auf weniger als die Hälfte reduziert (Abb. 22).



Abbildung 22: Membranstromamplituden von NIH-3T3-Zellen im Ruhezustand (Grundmembranstrom) und durch Lysophosphatidsäure (LPA, 1 μ M) induzierte Kaliumstromamplituden bei 6 % CO₂ (entsprechend pH 7,5) und 20 % CO₂ im Begasungsgemisch der Zellkultur (entsprechend pH 6,98). Die Membranstrommessungen wurden bei einem pH-Wert von 7,35 in der Extrazellulärlösung durchgeführt. Das Haltepotential lag bei +30 mV. Die mit * gekennzeichneten Amplituden sind hochsignifikant unterschiedlich zueinander mit p < 0,001.

3.6.2 Lysophosphatidsäure- und Bradykinin-induzierter Kaliumstrom bei einem pH-Wert von 6,5 in der Extrazellulärlösung

Da eine längerfristige Veränderung des pH-Wertes durch Umstellung der Zellkulturbedingungen an NIH-3T3-Mäusefibroblasten zu einer hochsignifikanten Verminderung der durch LPA induzierbaren Kaliumströme geführt hatte, sollte nun überprüft werden, ob auch eine nur kurzfristige Erniedrigung des pH-Wertes zu einer Reduktion der induzierbaren Kaliumströme führen würde.

Daher wurden nun Experimente mit reduziertem pH-Wert der Extrazellulärlösung durchgeführt. Hierzu wurden die unter normalen Zellkulturbedingungen (6 % CO₂ im Begasungsgemisch) kultivierten NIH-3T3-Mäusefibroblasten (wie in Abschnitt 2.1.1.1

dargestellt) für die Messung vorbereitet, wobei zum Spülen der Zellen sowie zur Messung selbst eine Extrazellulärlösung (E) (s. Abschnitt 2.2.5) benutzt wurde, der mit 1-normaler NaOH-Lösung auf pH 6,5 (statt wie zuvor auf pH 7,35) eingestellt worden war.



Abbildung 23: LPA- und Bradykinin-induzierte Kaliumstromaktivierungen an NIH-3T3-Zellen in Abhängigkeit vom pH-Wert der Extrazellulärlösung. Das Haltepotential betrug +30 mV. Die mit * gekennzeichneten Amplituden sind hochsignifikant unterschiedlich zueinander mit p < 0,001. n = Zahl der Messungen.

Nach Applikation von LPA zeigten die NIH-3T3-Mäusefibroblasten bei pH 6,5 in der Extrazellulärlösung eine Kaliumstromaktivierung, die hochsignifikant niedriger war, als die Stromamplitude durch LPA bei pH 7,35. Wie die Abbildung 26 weiterhin zeigt, erniedrigte sich die Bradykinin-induzierte Kaliumstromamplitude durch die pH-Werterniedrigung der Extrazellulärlösung von 7,35 auf 6,5 nicht signifikant.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der pH-Wert des Mediums auf die Aktivierbarkeit der durch LPA induzierten Kaliumströme einen deutlichen Effekt ausübt, wobei nicht nur längerfristige, sondern auch kurzfristige Änderungen des pH-Wertes eine hochsignifikante Reduktion der Aktivierbarkeit bewirken.

3.7 Kaliumstromaktivierung durch Entzündungsmediatoren an weiteren Zelllinien

Abschnitten In den vorhergehenden wurde gezeigt, verschiedene dass Entzündungsmediatoren aus unterschiedlichen Stoffklassen an NIH-3T3-Mäusefibroblasten zu einer Kaliumstromaktivierung führen. Nun sollte untersucht werden, ob auch andere Zelltypen auf Applikation eines Entzündungsmediators mit der Aktivierung eines Kaliumstroms reagieren.

3.7.1 Murine Mikrogliazellen (BV2-Zellen)

Bei BV2-Zellen handelt es sich um murine Mikrogliazellen, die eine Vielzahl unterschiedlicher Ionenkanäle exprimieren können, von denen bisher 12 beschrieben wurden (Eder 1998, Schilling *et al.* 2002). Da erst kürzlich in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. C. Eder (Institut für Physiologie der Charité, Berlin) gezeigt werden konnte, dass LPA an BV2-Zellen zu einer Kaliumstromaktivierung führt (Schilling *et al.* 2002), lag es nahe, die Aktivierbarkeit dieses Membranstroms auch für andere Entzündungsmediatoren zu überprüfen.

Abbildung 24 zeigt, dass Bradykinin (1 μ M) an BV2-Zellen zu keiner Änderung des Membranstroms führte (n=3). Als Kontrolle für die Aktivierbarkeit des Kaliumstroms wurde jeweils LPA appliziert, woraufhin es jeweils zu einer Kaliumstromaktivierung kam.



3.7.2 Baby-Hamster-Kidney-Zellen

Die <u>Baby-Hamster-Kidney-</u> (BHK-) Zellen wurden wie in Abschnitt 2.1.1.2 beschrieben kultiviert. Sie zeigten bei Membranpotentialen im Bereich von -130 bis -50 mV einen spannungsunabhängigen Membranstrom mit einer sehr kleinen Amplitude und ein Umkehrpotential von etwa -35 mV (Abb. 25). Ab einem Haltepotential von -50 bis -30 mV aktiviert zusätzlich ein spannungsabhängiger Kaliumauswärtsstrom (delayed outward rectifier). Die zugehörige Strom-Spannungsbeziehung ist in Abbildung 25 B dargestellt.



Abbildung 25: Membranströme einer BHK-Zelle in Abhängigkeit vom Membranpotential. **A:** Das Membranpotential wurde für jeweils 4 ms in 20 mV-Schritten von -130 bis +70 mV verändert. Zwischen den einzelnen Spannungspulsen wurde auf das Membranpotential von -50 mV zurückgeschaltet. **B:** Strom-Spannungsbeziehung der in A gezeigten Membranströme. Man erkennt im Bereich von -130 mV bis -50 mV einen spannungsunabhängigen Membranstrom relativ kleiner Amplitude. Das Umkehrpotential liegt bei -35 mV. Ab ca. -30 mV wird ein spannungsabhängiger Kaliumstrom aktiviert.

Um Überlagerungen der möglicherweise durch Entzündungsmediatoren induzierbaren Membranströme mit den vorhandenen, spannungsaktivierten Membranströme zu vermeiden, wurden die BHK-Zellen bei einem Haltepotential von -30 mV gemessen. Die Applikation von 1 μ M Bradykinin (Abb. 25) führte im Mittel zu einer Membranstromaktivierung von 538 ± 301 pA (n=8). Die Stromaktivierung ging mit einer Hyperpolarisation der BHK-Zellen auf -89 ± 2 mV einher (n=8).



Abbildung 26: Aktivierung eines Membranstroms in einer BHK-Zelle durch Applikation von Bradykinin (1 µM, durch einen Pfeil gekennzeichnet), gemessen bei einem Haltepotential von -30 mV. Die Abbildung ist repräsentativ für n=8 Messungen, die Nulllinie ist durch --0-- kennzeichnet.

Zur pharmakologischen Charakterisierung wurde im Maximum des durch Bradykinin induzierten Membranstroms der Kaliumkanalblocker Charybdotoxin (300 nM) appliziert, wodurch der zusätzliche Membranstrom vollständig blockiert wurde (n=3). Blockierbarkeit die Diese durch Charybdotoxin und beobachtete Membranhyperpolarisation auf etwa -89 mV zeigen, dass es sich bei dem durch Bradykinin an BHK-Zellen aktivierten Membranstrom um einen Kaliumstrom handelt. Somit konnte für den Entzündungsmediator Bradykinin gezeigt werden, dass diese Substanz an sehr unterschiedlichen Zelltypen zu einer Kaliumstromaktivierung führen kann. Im Gegensatz dazu zeigen Ergebnisse an Mäuse-Mikrogliazellen (BV2-Zellen), dass es Zelltypen gibt, die nicht mit einer Kaliumstromaktivierung auf Bradykinin reagieren.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Entzündungsmediatoren Bradykinin, Histamin und Wasserstoffperoxid in NIH-3T3-Mäusefibroblasten zur transienten Aktivierung spannungsunabhängiger, calciumabhängiger Kaliumkanäle führen. Ein entsprechender Bradykinin-induzierter Kaliumstrom konnte auch in <u>Baby-Hamster-Kidney-</u> (BHK)- Zellen aktiviert werden. Für das Peptid Bradykinin aus der Stoffklasse der Kinine konnte in NIH-3T3-Mäusefibroblasten eine halbmaximale Kaliumstrom-Aktivierung (EC₅₀-Wert) bei einer Konzentration von 22,4 nM gemessen werden. Für Wasserstoffperoxid (H₂O₂) aus der Stoffklasse der reaktiven Sauerstoffverbindungen konnte eine halbmaximale Kaliumstrom-Aktivierung in NIH-3T3-Mäusefibroblasten bei einer Konzentration von 0,0013 % (v/v) H₂O₂ (entsprechend etwa 0,4 µM) erreicht werden. Die Kaliumstrom-Aktivierung durch die Entzündungsmediatoren Bradykinin, Histamin oder Wasserstoffperoxid führte jeweils zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials von -34 mV auf Werte um -85 mV.

Der in NIH-3T3-Zellen durch Bradykinin, Histamin und H_2O_2 aktivierte Kaliumstrom ließ sich durch die Skorpiontoxine Charybdotoxin, Iberiotoxin und Margatoxin in Konzentrationen von 300 nM vollständig blockieren, während Apamin, ein Bestandteil des Gifts der Honigbiene, keine Wirkung auf den Kaliumstrom zeigte.

Dieses elektrophysiologische und pharmakologische Profil der zu Grunde liegenden Kaliumkanäle, entspricht den Kaliumkanälen, die auch durch die Phospholipide Lysophosphatidsäure und Sphingosin-1-Phosphat aktiviert werden (Repp *et al.* 1998, 2001). Dieser Kaliumkanaltyp hat eine Leitfähigkeit von 32 pS für einwärts und 12 pS für auswärts gerichtete Kaliumströme und wird als hSK4 (synonym hIK1, hIK_{Ca} oder Gardos-Kanal) bezeichnet (Ishii *et al.* 1997, Joiner 1997, Logsdon 1997, Khanna 1999). Die Aktivierung dieses Kaliumkanaltyps erfolgt über eine Signalkaskade, die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der edg-Familie, die Proteintyrosinkinase c-Src sowie das monomere G-Protein Ras beinhaltet (Repp *et al.* 1998, 2001).

Da es sich bei den Bradykinin- und Histaminrezeptoren auch um G-Proteingekoppelte Rezeptoren handelt (Blaukat *et al.* 1999, Blaukat 2003), liegt die Vermutung nahe, dass die zum Kaliumkanal führende Signalkaskade ebenso die Proteintyrosinkinase c-Src sowie das monomere G-Protein Ras beinhaltet. Zu den typischen Eigenschaften des Bradykinin- oder Histamin-induzierten Kaliumstroms in NIH-3T3-Mäusefibroblasten gehört die spontane Inaktivierung innerhalb der ersten 2 Minuten nach Erreichen der maximalen Stromamplitude. Eine ähnliche Inaktivierung ist für den LPA-aktivierten Kaliumstrom (Repp et al. 1998) und den S1P-aktivierten Kaliumstrom (Repp et al. 2001) bekannt. Diese Inaktivierung wird nicht durch den Verlust intrazellulärer Siganalwegskomponenten verursacht und ist offenbar auch keine spezifische Eigenschaft der Strom tragenden Kaliumkanäle (Repp et al. 1998, 2001, Birringer 2004), weil sequentielle Aktivierungen verschiedener Substanzen, z. B. LPA, Bradykinin oder Histamin jeweils zu einer gleichen, transienten Kaliumstromaktivierung führen. Es wird vermutet, dass die Inaktivierung auf einen veränderten Grundzustand des G-Protein-gekoppelten Rezeptors, über den die Kaliumstromaktivierung vermittelt wird, zurückzuführen ist (Repp et al. 1998, 2001, Birringer 2004). Die elektrophysiologische und pharmakologische Ähnlichkeit der beiden Kanäle lässt vermuten, dass es sich bei dem Bradykinin- bzw. Histamin-induzierten Kaliumkanal um das murine Homolog zum humanen SK4-Kanal handelt.

Als Vertreter der Stoffklasse der reaktiven Sauerstoffverbindungen wurden Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Stickstoffmonoxid (NO) untersucht.

 H_2O_2 induziert in NIH-3T3-Mäusefibroblasten einen transienten Kaliumstrom von gleicher Amplitude wie die durch LPA, S1P oder Bradykinin induzierten Kaliumströme. Diese Stromaktivierung ging ebenfalls mit einer starken Membranhyperpolarisation auf Werte von -90 mV einher. Der H_2O_2 -induzierte Kaliumstrom zeigte das gleiche pharmakologische Profil, wie der Bradykinin- oder Histamin-induzierte Kaliumstrom, denn auf die Applikation von Margatoxin, Iberiotoxin oder Charybdotoxin (jeweils 300 nM) ließ sich der H_2O_2 -induzierte Strom sofort und vollständig blockieren, wohingegen Apamin (300 nM) keine Wirkung auf die Kaliumstrom, wie der LPA-, S1P-, Bradykinin- oder Histamin-induzierte durch die Aktivierung von spannungsunabhängigen, Ca²⁺-abhängigen Kaliumkanälen mittlerer Leitfähigkeit, entsprechend dem hSK4 entsteht.

Die Bradykinin-, Histamin-induzierten Kaliumströme erreichten bereits innerhalb der ersten Minute nach Applikation ihr Maximum und inaktivierten innerhalb von 1 bis 2 Minuten nach Erreichen des Maximums vollständig. Diese Kinetik entsprach der Aktivierung und Inaktivierung von LPA- und S1P-induzierten Kaliumströmen. Im Gegensatz hierzu zeigte die H₂O₂-induzierte Kaliumstromaktivierung einen über etwa 15 Minuten andauernden Inaktivierungsprozess. Dieser ging mit einer Hyperpolarisation der Zellmembran einher, die entsprechend lange anhielt. Weiterhin zeigte sich der Kaliumstrom auch noch nach etwa 15 Minuten durch die klassischen Peptidtoxine blockierbar. Denkbar wäre, dass die H₂O₂-Applikation zwar zur Öffnung des gleichen Kaliumkanaltyps wie LPA, S1P oder Bradykinin führt, die zu diesem Kaliumkanal führenden Signalkaskade hier jedoch mindestens einen anderen nicht inaktivierenden Baustein (z. B. ein anderes G-Protein) besitzt, so dass die Kaliumstrominaktivierung stark verzögert.

Bereits durch Applikation halbmaximaler Konzentrationen H₂O₂ kam es nach etwa 30 Minuten zu einer Schädigung der Zellmembran, die durch die Zunahme unspezifischer Membranströme und lichtmikroskopisch durch das Auftreten so genannter Blebs gekennzeichnet war.

Erst kürzlich wurde Literatur in der beschrieben, dass reaktive über Angiotensin-2-vermittelte Sauerstoffverbindungen NAD(P)H-Oxidase-Aktivierung zu vaskulären Entzündungsprozessen und Zellhypertrophie führen (Cai et al. 2003). Über Angiotensin-2-vermittelte Stimulation der zellulären Superoxidase werden verschiedene zelluläre Entzündungsprozesse stimuliert und H₂O₂ freisetzt (Tummala et al. 1999). Die darauf folgende Signalkaskade beinhaltet unter anderem die Aktivierung einer Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) und die Phosphadidylinositol-3-Kinase (PI3K) (Kevil 2000, Nishida 2000, Cai et al. 2003). Ebenfalls wurde in der Literatur die Aktivierung der ßy-Untereinheit von G-Proteinen und Aktivierung der Tyrosinkinase c-Src beschrieben (Abe et al. 1997, Nishida et al. 2000), was eine deutliche Ähnlichkeit zu der zum spannungsunabhängigen, Ca²⁺abhängigen Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit führenden Signalkaskade ergibt (Repp *et al.* 1998). Des Weiteren ist bekannt, dass H₂O₂ Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) inaktiviert, was die lang anhaltende Stromaktivierung erklären könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch andere Applikationsfolgen, z. B die Applikation von LPA oder Bradykinin nach voraus gegangener Histamin-Applikation zu einer erneuten, der ersten gleichenden Kaliumstromaktivierung führen. Die Aktivierung des Ca²⁺-abhängigen Kaliumstroms an NIH-3T3-Mäusefibroblasten wird über unterschiedliche Signalkomponenten wie z. B. verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt.

Im Rahmen von Entzündungsprozessen wird NO aus Makrophagen und Granulozyten, aber auch aus Endothel- und Gewebszellen freigesetzt (Eder 1998, Eder *et al.* 2001) und scheint die Hauptrolle bei der Entstehung von Schmerz zu spielen. Das aus DEA-NO (100 nM) freigesetzte NO führt in Cell-Attached- und Inside-out-Patch-Clamp-Experimenten in bovinen chromaffinen Zellen zur Aktivierung eines Ca²⁺-abhängigen Kaliumstroms (Chen *et al.* 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Applikation des Stickstoffradikaldonators DEA-NO (20 mM) in NIH-3T3-Mäusefibroblasten auch nach einer Messdauer von 16 Minuten keine Aktivierung eines Kaliumstroms beobachtet werden.

Nach vorausgegangener und vollständig abgeklungener LPA-induzierter Kaliumstromaktivierung, führte die DEA-NO-Applikation bei 3 von 4 Zellen zu einer geringen, jedoch messbaren transienten Stromaktivierung von 82 ± 38 pA. Diese ging mit einer ebenfalls geringen Membranhyperpolarisation einher. DEA-NO (20 mM) hatte als Einzelsubstanz keinen Einfluss auf den Membranstromverlauf von NIH-3T3-Zellen. Offenbar führte eine Applikation von LPA zu einer Bahnung der Kaliumstromaktivierung durch DEA-NO, wenn auch die Membranstromantwort sehr gering war.

Nach Abschluss des ersten Teils der Experimente sollten nach etwa 2 Monaten weitere Bradykinin-Experimente an NIH-3T3-Mäusefibroblasten durchgeführt werden. Die NIH-3T3-Zellen reagierten jedoch nach Applikation von Bradykinin mit einer Amplitude von etwa der Hälfte als in den vorangegangenen Experimenten. Weiterhin reagierten nach Applikation von Bradykinin 3 von 8 Zellen nicht mehr mit der Aktivierung eines Kaliumstroms. Als eine mögliche Ursache für den reduzierten Bradykinineffekt wurde das inzwischen gewechselte Serum, das in der Zellkultur

verwendet wird, vermutet. Es ist jedoch bekannt, dass der Gehalt an Mitogenen und Wachstumsfaktoren in verschiedenen Serumchargen stark variieren kann. So bestand die Möglichkeit, dass der zur Expression der Bradykininrezeptoren benötigte Faktor nicht mehr in ausreichenden Konzentrationen in der Serumcharge vorhanden war. Inzwischen werden auf dem Markt serumfreie Medien angeboten (z. B. von Vivascience Göttingen, Promocell Heidelberg u. a.). Sie haben den Vorteil, dass sie ausschließlich aus in genau definierten Mengen eingewogenen Substanzen bestehen und somit jede Serumcharge die gleiche Zusammensetzung enthält (Cell Culture Service, Hamburg). Experimente mit serumfreiem Medium könnten zu Klärung beitragen.

Man unterscheidet 2 Typen von Bradykininrezeptoren, den B1- und den B2-Rezeptor, die nur zu 36 % homolog sind. Bei beiden Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Oberflächenrezeptoren mit 7 transmembranen Domänen (Hess *et al.* 1992, 1994, Menke *et al.* 1994, Hall 1997). Während die B2-Rezeptoren in unterschiedlichsten Geweben konstitutiv exprimiert werden, kann die Expression von B1-Rezeptoren durch verschiedene Stimuli induziert werden. Z. B. steigt die B1-Rezeptordichte unter Stress stark an (Marceau 1995, Campbell 2001). Weiter ist bekannt, dass durch Stimuli wie Interleukin-1- β oder Tumor-Nekrose-Faktor- α z. B. in Lungenfibroblasten oder Alveolarmakrophagen B1-Rezeptoren exprimiert werden (Phagoo 1999, 2001, Tsukagoshi 1999). Über die Dichte von B1- und B2-Rezeptoren an Mäusefibroblasten liegen bisher keine Daten vor.

Es wurde daher versucht, durch Vorinkubation der 3T3-Zellen mit Interleukin-1- β in der Zellkultur und am Messtand über eine möglich Induktion des Rezeptors, die ursprüngliche Bradykinin-induzierte Kaliumstromaktivierung wieder herzustellen. Der ursprüngliche Bradykinineffekt konnte jedoch nicht erreicht werden.

Im entzündeten Gewebe kommt es häufig zu einer Erniedrigung des pH-Wertes. Um diese Bedingungen nachzuahmen, wurden zunächst Experimente mit NIH-3T3-Mäusefibroblasten durchgeführt, die 7 Tage lang in leicht saurem Milieu (20 % CO₂ entsprechend pH 6,98 statt pH 7,5) kultiviert wurden. Während die NIH-3T3-Mäusefibroblasten keine signifikanten Veränderungen der unspezifischen

Membranströme zeigten, war die Amplitude der LPA-induzierten Kaliumströme dagegen bei den in saurem Milieu kultivierten NIH-3T3-Mäusefibroblasten hoch signifikant auf weniger als die Hälfte reduziert.

Auch die alleinige Veränderung des pH-Wertes der Extrazellulärlösung von pH 7,35 auf pH 6,5 bei den elektrophysiologischen Messungen ohne vorherige Kultivierung der NIH-3T3-Mäusefibroblasten in saurem Millieu, führte zu einer hoch signifikanten Erniedrigung der LPA-induzierten Kaliumstrom-Amplituden. Die Applikation von Bradykinin unter diesen Messbedingungen führte zu keiner signifikant reduzierten Kaliumstromaktivierung (s. Abschnitt 3.6.3).

Zum Einen kommt es durch die Kultivierung der NIH-3T3-Zellen bei einem Begasungsgemisch von 20 % CO₂ zu einer längerfristigen Erniedrigung des pH-Wertes auf 6,98, was die Empfindlichkeit des Rezeptors oder einer anderen Komponente der Signalkette erniedrigen könnte. Weiterhin führte auch die kurzfristige Erniedrigung der pH-Wertes der Extrazellulärlösung auf 6,5 zu einer reduzierten Kaliumstromantwort auf LPA. Die Ursache könnte eine verminderte Affinität des Rezeptors für LPA sein.

Es konnte somit gezeigt werden, dass das die Aktivierung des LPA-induzierten Kaliumstroms bei Kultivierung der NIH-3T3-Mäusefibroblasten unter sauren Zellkulturbedingungen oder unter Verwendung saurer Extrazellulärlösung signifikant reduziert war. Somit könnte die Erniedrigung pH-Wertes des Gewebes eine Rolle in der Vermittlung von Entzündungsgeschehen spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die zur Kaliumstromaktivierung führenden Signalkaskaden für Bradykinin, Histamin, Wasserstoffperoxid, LPA und S1P nicht identisch sind. Jedoch ist es sehr wahrscheinlich, dass sich die Signalkaskaden in ihrem Aufbau ähneln und zumindest als Signalwegskomponenten G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der edg-Familie, die Proteintyrosinkinase c-Src, sowie das monomere G-Protein Ras beinhalten. Dies führt dann zur Aktivierung ein und desselben Kaliumkanaltyps, dem spannungsunabhängigen, Ca²⁺-abhängigen Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit.

In wie weit dieser Kaliumkanaltyp eine Rolle im Entzündungsgeschehen spielt, ist bisher nicht bekannt. Auffallend ist, dass die Wirksamkeit von LPA bei saurem pH eine drastisch reduziert ist. In wie weit dies durch eine veränderte Affinität der Substanzen zum Rezeptor zu Stande kommt, bleibt unklar.

Bisher ist nicht bekannt, ob dieser Kaliumkanaltyp auch in glatten Muskelzellen oder Endothelzellen eine Rolle spielt. Zu vermuten ist, dass die Hyperpolarisation der Zelle die calciumvermittelte Kontraktion der glatten Muskelzellen verhindert und somit zu einer Gefäßdilatation und einer erhöhten Gefäßpermeabilität, und somit zu den Kardinalsymptomen Rubor, Tumor und Calor führt.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Entzündungsmediatoren Bradykinin aus der Stoffklasse der Kinine, Histamin aus der Stoffklasse der biogenen Amine und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) aus der Stoffklasse der reaktiven Sauerstoffverbindungen in NIH-3T3-Mäusefibroblasten zu einer transienten Aktivierung eines spannungsunabhängigen, Ca²⁺-abhängigen Kaliumstroms führen. Der induzierte Kaliumstrom ging jeweils mit einer deutlichen Hyperpolarisation der Zellen einher und ließ sich durch die Peptidtoxine Charybdotoxin, Margatoxin und Iberiotoxin in nanomolaren Konzentrationen vollständig blockieren. Ein durch Bradykinin aktivierbarer Kaliumstrom konnte auch in Baby-Hamster-Kidney (BHK)-Zellen nachgewiesen werden. Ein Kaliumstrom mit diesem elektrophysiologischen und pharmakologischen Profil wird auch durch die Phospholipide Lysophosphatidsäure (LPA) und Sphingosin-1-Phosphat aktiviert. Weiterhin besteht eine große elektrophysiologische und pharmakologische Ähnlichkeit zum humanen und murinen SK4-Kaliumkanaltyp. Daher liegt die Vermutung nahe, dass dem durch Entzündungsmediatoren induzierten Kaliumstrom dieser Kaliumkanaltyp zugrunde liegt.

Die Bradykinin- und Histamin-induzierten Kaliumströme erreichten bereits innerhalb der ersten Minute nach Applikation ihr Maximum und inaktivierten innerhalb von 1 bis 2 Minuten nach Erreichen des Maximums vollständig. Im Gegensatz hierzu zeigte die H₂O₂-induzierte Kaliumstromaktivierung einen über etwa 15 Minuten andauernden Inaktivierungsprozess.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass NIH-3T3-Zellen auf die sequentielle Applikation von Entzündungsmediatoren verschiedener Stoffklassen mit einer sequentiellen Membranstromaktivierung reagieren, wobei die jeweiligen Membranstromamplituden sich nicht signifikant unterschieden. Weiterhin wurde die Kaliumstrom-Aktivierbarkeit bei NIH-3T3-Zellen untersucht, die unter sauren Zellkulturbedingungen kultiviert oder die vor den elektrophysiologischen Messungen in saurer Extrazellulärlösung gehalten worden waren, das heißt, bei pH-Werten, wie sie auch im entzündeten Gewebe vorkommen. Dabei zeigte sich, dass die Amplitude des LPA-induzierten Kaliumstroms jeweils signifikant reduziert war.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Aktivität von spannungsunabhängigen, Ca²⁺-abhängigen Kaliumkanälen durch Entzündungsmediatoren moduliert wird. In weiteren Untersuchungen muss nun die Bedeutung dieser Kaliumkanäle im Rahmen von Entzündungsprozessen geklärt werden.

6 Summary

The present study shows for the first time that the inflammation mediators bradykinin of the substance group of kinins, histamine of the group of biogenous amines and hydrogen peroxide (H_2O_2) of the group of reactive oxygen molecules transiently activate a voltage-independent, Ca²⁺-dependent potassium current in NIH-3T3 mouse fibroblasts. The activated potassium current led to a large membrane hyperpolarisation and was completely blocked by the peptide toxins charybdotoxin, margatoxin and iberiotoxin in nanomolar concentrations. A similar potassium current was activated by bradykinin in baby-hamster-kidney (BHK-) cells. A potassium current with this electrophysiological and pharmacological profile is also activated by the phospholipids lysophosphatic acid (LPA) and sphingosine-1-phosphate. In addition, a considerable electrophysiological and pharmacological similarity exists to the human and murine SK4 potassium channel type. This indicates that the potassium current induced by inflammation mediators is carried by this potassium channel type.

The potassium currents that were induced by bradykinin and histamine reached their maximal amplitude within the first minute after application. Complete inactivation occurred within 1 to 2 minutes after the maximum. In contrast, the H_2O_2 -induced potassium current showed an inactivation process of more than 15 minutes.

The present study also shows that in NIH-3T3-cells the sequential application of diverse inflammation mediators leads to a sequential membrane current activation, without significant differences in amplitudes.

Furthermore, the activation of potassium currents was investigated in NIH-3T3 cells that were either kept under acidic cell culture conditions or transferred to acidic extracellular solution prior to the electrophysiological measurements, i. e. at pH values that exist in inflamed tissue. Under these conditions the amplitude of the LPA-induced potassium current was significantly reduced.

The present data show that the activity of voltage-independent, Ca^{2+} -dependent potassium channels is modulated by inflammation mediators. Further studies are now necessary to define the role of these potassium channels in the inflammation process.

7 Literatur

- Abe J. (1997) c-Src is required for oxidative stress-mediated activation of big mitogen-activated protein kinase 1. *J Biol Chem* **272**: 20389-94.
- Andersson S. E, Lexmuller K., Johansson A., Ekstorm G. M. (1999) "Tissue and intracellular pH in normal periarticular soft tissue and during different phases of antigen induced arthritis in the rat.PG 2018-24." *J Rheumatol* **26**(9).
- Baldridge W. H., Fischer A. J. (2001) Nitric oxide donor stimulated increase of cyclic GMP in the goldfish retina. *Vis Neurosci* **18**: 849-56.
- Barlow R. S., White, R. E. (1998) Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *Am J Physiol* **275**: H1283-9.
- Barry P. H., Lynch J. W. (1991) Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol* **121**: 101-17.
- Birringer J. (2004) Modulation von calciumabhängigen Kaliumkanälen und Calciumkanälen durch Phospholipide in Mäusefibroblasten und glatten Muskelzellen. Dissertation am Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. 58-66.
- Blaukat A. (2003) Structure and signalling pathways of kinin receptors. *Andrologia* **35**: 17-23.
- Blaukat A., Pizard A., Rajerison R. M., Alhenc-Gelas F. (1999) Activation of mitogenactivated protein kinase by the bradykinin B2 receptor is independent of receptor phosphorylation and phosphorylation-triggered internalization. *FEBS Lett* **451**: 337-41.
- Bortner C. D., Huges F. M., Cidlowski J. A. (1997) A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem* **272**: 32436-42.
- Busse R., FissIthaler B., Flemming I. (2002) NO ist nicht alles EDHF: Renaissance der endothelialen Eicosanoide. *Physiologie Foschung, Lehre, Öffentlichkeit* Deutsche Physiologische Gesellschaft **14** 13-23.
- Bychkov R. (1999) Hydrogen peroxide, potassium currents, and membrane potential in human endothelial cells. *Circulation* **99**: 1719-25.
- Cai H. (2003) The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* **24**: 471-8.
- Campbell D. J. (2001) The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**: 1060-5.
- Chen C. H., Houichi H., Ohnaka M. (1998) Nitric oxide activates Ca²⁺ -activated K⁺ channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci Lett* **248**: 127-9.

- Cook N. S. (1990) Potassium channels. Structure, Classification, function and therapeutical potential. Ellis Horwood Limited, Chichester **25** 63-8.
- Corrado A. P., Ballejo G. (1992) Is guanylate cyclase activation through the release of nitric oxide or a related compound involved in bradykinin-induced perivascular primary afferent excitation? Agents Actions Suppl **36**: 238-50.
- Costa S. K., Moreno R. A., Esquisatto L. C. (2002) Role of kinins and sensory neurons in the rat pleural leukocyte migration induced by Phoneutria nigriventer spider venom. *Neurosci Lett* **318**: 158-62.
- Decker K. (1999) Aktivierung eines Ca²⁺-abhängigen, spannungsunabhängigen K⁺-Kanals in Mäusefibroblasten durch die onkogene Rezeptortyrosinkinase des Katzensarkomvirus. *Dissertation am Fachbereich Physik der Justus-Liebig-Universität Gießen*.
- Dreyer F. (1990). Peptide toxins and potassium channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **115**: 93-36.
- Eder C. (1998) Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am J Physiol* **275**: C327-42.
- Eder C., DeCoursey T. E. (2001) Voltage-gated proton channels in microglia. *Prog Neurobiol* **64**: 277-305.
- Eder C., Schilling T., Heinemann U., Haas D., Hailer N., Nitsch R. (1999) Morphological, immunophenotypical and electrophysiological properties of resting microglia in vitro. *Eur J Neurosci* **11**: 4251-61.
- Ford J. W., Stevens E. B., Bushfield M. (2002) Potassium channels: gene family, therapeutic relevance, high-throughput screening technologies and drug discovery. *Prog Drug Res* **58**: 133-68.
- Gaits F. (1997) Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis. *FEBS Lett* **410**: 54-8.
- Garcia Leme J. (1978) Bradykinin-System. Inflammation. J. R. F. Vane, S. H., *Springer-Verlag.* **50/1:** 464-522.
- Garcia M. L., Hanner M., Knaus H. G., Slaughter R., Kaczorowski G. J. (1999) Scorpion toxins as tools for studying potassium channels. *Methods Enzymol* **294**: 624-39.
- Garcia-Calvo M., Vazquez J., Garcia M. L. (1991) Characterization of the solubilized charybdotoxin receptor from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* **30**: 11157-64.
- Gardner P., Oster Z. H. (1989) Rubor, dolor, calor, tumor, and radionuclide scans. *N Engl J Med* **321**: 970-2.

- Gimenez-Gallego G., Navia M. A., Reuben J. P., Garcia M. L. (1988) Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 3329-33.
- Goetzl E. J., An S. (1998) Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *Faseb J* **12**: 1589-98.
- Haley J. E., Dickenson A. H., Schachter M. (1992) Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology* **31**: 251-8.
- Hall J. M. (1997) Bradykinin receptors. Gen Pharmacol 28: 1-6.
- Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. J. (1981) Improved patchclamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**: 85-100.
- Hess J. F. (1994) Differential pharmacology of cloned human and mouse B2 bradykinin receptors. *Mol Pharmacol* **45**: 1-8.
- Hess J. F. (1992) Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **184**: 260-8.
- Holthusen H. K., Kojda G. (2000) Die Rolle von NO bei der Entstehung und Verarbeitung von Schmerz. *MMP 23.* **10**: 323-328.
- Jainchill J. L., Candler E. L., Anderson N. G. (1969). Isolation of T antigen from solid hamster tumors induced by adenovirus type 31. *Proc Soc Exp Biol Med* **130**(3): 770-5.
- Ishii T. M., Silvia C., Hirschberg B., Bond C. T., Adelman J. P. (1997) A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11651-6.
- Joiner W. J. (1997) hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11013-8.
- Jones S. M., Ribera A. B. (1994) Overexpression of a potassium channel gene perturbs neural differentiation. *J Neurosci* **14**: 2789-99.
- Kaczorowski G. J., Garcia M. L. (1999) Pharmacology of voltage-gated and calciumactivated potassium channels. *Curr Opin Chem Biol* **3**: 448-58.
- Kaplan A. P. (2002) Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol* **109**: 195-209.
- Kevil C. G. (2000) H₂O₂-mediated permeability: role of MAPK and occludin. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**(1): C21-30.

- Khanna R. (1999) hSK4/hIK1, a calmodulin-binding K_{Ca} channel in human Tlymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J Biol Chem* **274**: 14838-49.
- Knaus H. G., Koch R. O., Eberhart A., Kaczorowski G. J., Garcia M. L., Slaughter R. S. (1995) [125I]margatoxin, an extraordinarily high affinity ligand for voltagegated potassium channels in mammalian brain. *Biochemistry* 34: 13627-34.
- Koschinski A. (2001) Eigenschaften, Regulation und physiologische Bedeutung eines durch Lysophosphatidsäure aktivierbaren calciumabhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumkanals in murinen und humanen Zellen. *Dissertation am Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen.* 48-62.
- Lecomte J. (1975) General pharmacologic properties of silybine and silymarine in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **214**: 165-76.
- Lecomte J., Damas J. (1984) The concept of mediators in acute inflammatory reactions. *Ann Biol Clin* **42**: 27-30.
- Lewis R. S., Cahalan M. D. (1988) Subset-specific expression of potassium channels in developing murine T lymphocytes. *Science* **239**: 771-5.
- Liebmann C., Bohmer F. D. (2000) Signal transduction pathways of G proteincoupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling. *Curr Med Chem* **7**(9): 911-43.
- Logsdon N. J. (1997) A novel gene, hK_{Ca}4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem* **272**: 32723-6.
- Malinski T., Taha Z. (1992) Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* **358**: 676-8.
- Marceau F. (1995) Kinin B1 receptors: a review. Immunopharmacology 30: 1-26.
- Menke J. G. (1994) Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem* **269**: 21583-6.
- Michel L., Jean-Louis F., Levy D., Dubertret L. (2000) Humoral and cellular responses to histamine and pollen allergen in a skin chamber model: effect of mizolastine. *Ann Allergy Asthma Immunol* **85**: 64-9.
- Nishida M. (2000) G alpha(i) and G alpha(o) are target proteins of reactive oxygen species. *Nature* **408**: 492-5.
- Ordway R. W., Petrou S., Singer J. J. (1995) Stretch activation of a toad smooth muscle K⁺ channel may be mediated by fatty acids. *J Physiol* **484**: 331-7.

- Patil N., Cox D. R., Bhat D., Faham M., Myers R. M., Peterson A. S. (1995) A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nat Genet* **11**: 126-9.
- Phagoo S. B. (1999) Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1-beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. *Mol Pharmacol* **56**: 325-33.
- Phagoo S. B. (2001) Bradykinin B1 receptor up-regulation by interleukin-1beta and B1 agonist occurs through independent and synergistic intracellular signaling mechanisms in human lung fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* **298**: 77-85.
- Rane S. G. (1991) A Ca²⁺-activated K⁺ current in ras-transformed fibroblasts is absent from nontransformed cells. *Am J Physiol* **260**: C104-12.
- Regoli D., Barabe J. (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* **32**: 1-46.
- Reinhart P. H., Chung S. Levitan I. B. (1989) A family of calcium-dependent potassium channels from rat brain *Neuron* **2**: 1031-41.
- Repp H., Birringer J., Koschinski A., Dreyer F. (2001) Activation of a Ca²⁺-dependent K⁺ current in mouse fibroblasts by sphingosine-1-phosphate involves the protein tyrosine kinase c-Src. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **363**: 295-301.
- Repp H., Draheim H., Ruland J., Seidel G., Beise J., Presek P., Dreyer F. (1993) Profound differences in potassium current properties of normal and Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3403-7.
- Repp H., Koschinski A., Decker K., Dreyer F. (1998) Activation of a Ca²⁺-dependent K⁺ current in mouse fibroblasts by lysophosphatidic acid requires a pertussis toxin-sensitive G protein and Ras. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **358**: 509-17.
- Rocha e Silva M. (1960) Release of Bradykininn and the mechanism of production of a "thermic edema" in the rats's paw. *Med. exp. Basel* **3**: 371-382.
- Schilling T., Repp H., Richter H., Koschinski A., Heinemann U., Dreyer F., Eder C. (2002) Lysophospholipids induce membrane hyperpolarization in microglia by activation of IKCa1 Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Neuroscience* **109** 827-35.
- Schwab A., Oberleithner H. (1996) Plasticity of renal epithelial cells: the way a potassium channel supports migration. *Pflugers Arch* **432**: R87-93.
- Schwab A., Gabriel K., Oberleithner H. (1994) Oscillating activity of a Ca²⁺-sensitive K⁺ channel. A prerequisite for migration of transformed Madin-Darby canine kidney focus cells. *J Clin Invest* **93**: 1631-6.
- Thurston A. J. (2000) Of blood, inflammation and gunshot wounds: the history of the control of sepsis. *Aust N Z J Surg* **70**: 855-61.
- Tsukagoshi H. (1999) Regulation by interleukin-1beta of gene expression of bradykinin B1 receptor in MH-S murine alveolar macrophage cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 476-82.
- Tummala P. E. (1999) Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* **100**: 1223-9.
- Vignola A. M., Merendino A. M., Pace E., Chanez P., Siena L., Profita M., Bonsignore G. (1997) Markers of acute airway inflammation. *Monaldi Arch Chest Dis* **52**: 83-5.
- Watanabe S., Sato T. (1996) Effects of free fatty acids on the binding of bovine and human serum albumin with steroid hormones. *Biochim Biophys Acta* **1289**: 385-96.
- Winbery S. L., Lieberman P. L. (2002) Histamine and antihistamines in anaphylaxis. *Clin Allergy Immunol* **17**: 287-317.
- Wonderlin W. F., Strobl J. S. (1996) Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol* **154**: 91-107.
- Yu S. P., Yeh C. H., Sensi S. L., Gwag B. J., Choi D. W. (1997) Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* 278: 114-7.
- Zweifach B. W. (1966) Microcirculatory effects of polypeptides. Hypotensive Polypeptides. E. G. Erdös. *Springer*, Berlin-Heidelberg-New York, 84-9.

Danksagung

Herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Florian Dreyer für seine allgegenwärtige Unterstützung bei meiner Promotion bedanken. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr und hat mich fortwährend ermutigt. Nicht nur sein fachliches Wissen, sondern vor allem sein herzlicher Umgang ist vorbildlich.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Holger Repp für seine Gedankenanstöße, seine Unterstützung bei der Korrektur meiner Arbeit und vor allem die stets nette Zusammenarbeit bedanken. Seine Wortspiele heiterten stets auf.

Ohne Herrn Dr. Andreas Koschinskis stete Hilfe bei kleinern und größeren Reparaturen am Messstand und ohne Herrn Dr. Jan A. Birringers kompetente und geduldige Anleitung "rund ums patchen" wäre ich schon in den Anfängen gescheitert! Vielen Dank - ihr seid spitze!

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Frau Christiane Zibuschka bedanken. Sie hat dafür gesorgt, dass immer genügend Materialien zur Verfügung standen. Wenn "Not am Mann" war, half sie gerne in der Zellkultur aus.

Allen Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden danke ich für die gute Zusammenarbeit und das "nette Klima". Ihr habt die Arbeit häufig schmackhaft gemacht!

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie. Wie sehr ich meinen Eltern Karin und Günther Raspel für Ihre Unterstützung danke, lässt sich nicht in Worte fassen. Ihr habt mir nicht nur das Studium ermöglicht, sondern seid immer für mich da. Meiner Schwester Andrea und meinem Freund Tilo Hanfstingl danke ich ebenso herzlich. Geduldig habt ihr mich motiviert und mir Kraft zum durchhalten gegeben. Ich freue mich darauf, jetzt mehr Zeit mit Euch verbringen zu können!

Lebenslauf

Geburtsdatum

Familienstand

Geburtsort

Persönliche Daten

Christina Raspel Georg-Stieler-Str. 1 36093 Künzell 19.06.1978 Hachenburg (Westerwald) ledig deutsch

Schulausbildung

Staatsangehörigkeit

08/1984 - 07/1988	Grundschule Westerburg
08/1988 - 07/1990	Gemeinsame Orientierungsstufe, Westerburg
08/1990 - 07/1993	Konrad-Adenauer-Gymnasium, Westerburg
08/1993 - 11/1993	Carlyle-High-School, Carlyle, IL, USA
11/1993 - 06/1997	Konrad-Adenauer-Gymnasium, Westerburg
06/1997	Abitur

Hochschulbildung

07/1997 - 07/1999	Vorklinisches Studium, Humanmedizin
	Justus-Liebig-Universität, Gießen
09/1999	Ärztliche Vorprüfung
08/1999	Klinisches Studium, Humanmedizin
	Justus-Liebig-Universität, Gießen
08/2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Borufsaushildung	

Berufsausbildung

seit 07/2004

Promotionsarbeit

seit 09/2000

Tätigkeit als Ärztin an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum Fulda, Fulda

Promotion am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen