

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Immunchemie und biochemische Mikrobiologie
Leitung: Prof. Dr. E. Th. Rietschel

Untersuchungen zum LPS-Rezeptorkomplex

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Universität zu Lübeck
- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

Vorgelegt von
Martin Papavlassopoulos
aus München

-
- 1. Gutachterin:** Frau PD Dr. Andra Schromm
 - 2. Gutachter:** Herr Prof. Dr. Enno Hartmann
- Vorsitzender:** Herr Prof. Dr. Thomas Peters

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Infektionen	1
1.2. Lipopolysaccharid	3
1.3. Das Immunsystem	7
1.3.1. Das erworbene Immunsystem	8
1.3.2. Das angeborene Immunsystem	9
1.3.3. Der Prozess der Zellaktivierung	9
1.3.4. Der MaxiK-Kanal	19
1.4. Zielsetzung	22
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1. Reagenzien	24
2.1.1. Seren	24
2.1.2. Antikörper und Markerproteine	24
2.1.3. Blocker und Stimuli	25
2.2. Methoden	25
2.2.1. Zellkultur	26
2.2.2. Stimulationen	29
2.2.3. Herstellung zytoplasmatischer und nuklearer Extrakte	30
2.2.4. Herstellung von Zytoplasma- und Membranfraktionen	31
2.2.5. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) und Western-Blot	32
2.2.6. Gelretentionsanalyse (EMSA)	33
2.2.7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	34
2.2.8. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	36
2.2.9. Durchflusszytometrie	39
2.2.10. Patch-Clamp	40
2.2.11. Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM)	45

3. ERGEBNISSE	48
3.1. Einfluss der MaxiK-Blockade auf die Zellaktivierung	48
3.1.1. Spezifität des Paxilline und Selektivität der Wirkung auf die Zellaktivierung	48
3.1.2. Bedeutung der MaxiK-Blockade für die LPS-induzierte Transkription	52
3.1.3. Bedeutung der MaxiK-Blockade für die LPS-induzierten Signalwege	55
3.2. Aktivierung des MaxiK	60
3.2.1. Das HEK293-Transfektionssystem	60
3.2.2. Elektrophysiologische Untersuchungen zur MaxiK-Aktivierung	63
3.3. Lokalisation von MaxiK und Komponenten des LPS-Rezeptorkomplexes	68
3.3.1. Lokalisation des MaxiK in der Zelle	68
3.3.2. Lokalisation von MaxiK und TLR4	69
3.3.3. Dimerisierung des TLR4 und Lokalisation des LBP	71
4. DISKUSSION	73
4.1. Einfluss der MaxiK-Blockade auf die LPS-induzierte Zellaktivierung	74
4.1.1. Änderung des Membranpotentials durch den MaxiK	78
4.1.2. Änderung der Kaliumionen-Konzentration durch den MaxiK	80
4.2. Aktivierung des MaxiK	81
4.2.1. Aktivierung des MaxiK durch Calciumionen und Membrandepolarisation	83
4.2.2. Aktivierung des MaxiK durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung	84
4.3. Interaktion des MaxiK mit Komponenten des LPS-Rezeptorkomplexes	85
ZUSAMMENFASSUNG	89
ABKÜRZUNGEN	90
LITERATURVERZEICHNIS	94
DANKSAGUNG	112
ERKLÄRUNG	115



1. EINLEITUNG

1.1. Infektionen

Unter einer Infektion versteht man das Übertragen, Anhaften oder Eindringen von Krankheitserregern in einen Organismus mit der anschließenden Ausbildung eines Krankheitsbildes. Infektionen werden meist durch Bakterien oder Viren verursacht, aber auch Pilze, eukaryotische Einzeller und Würmer können Infektionen hervorrufen.

Man unterscheidet drei Formen der Infektion:

1. Nosokomiale Infektionen werden durch unbeabsichtigtes Einbringen von Erregern bei der Durchführung medizinischer Eingriffe, wie z.B. durch Katheter oder künstliche Beatmung, verursacht.
2. Endogene Infektionen werden von Keimen verursacht, die kommensal oder sogar symbiotisch die Oberfläche eines Organismus bewohnen und durch eine Wunde oder bei einer Immunschwäche in den Körper eindringen.
3. Exogene Infektionen entstehen durch das Eindringen von pathogenen Keimen aus der Umgebung. Dies kann auf verschiedene Arten vonstatten gehen. Bei einer Tröpfcheninfektion werden die Erreger durch Sekrettröpfchen in der Luft übertragen. Eine Kontaktinfektion entsteht durch die Berührung einer infizierten Oberfläche. Des Weiteren können Infektionen über den Austausch von Körperflüssigkeiten oder durch Vektoren wie Insekten oder Nagetiere verursacht werden.

Eine Infektion kann auf dreierlei Weise verlaufen:

1. Bei einer lokalen Infektion verbleiben die Erreger am Eintrittsort und verursachen nur dort ein Krankheitsbild.
2. Bei einer zyklischen Infektion gelangen die Keime vom Eintrittsort aus über den Blutkreislauf zu ihrem eigentlichen infektiösen Focus, z. B. der Milz oder der Leber.
3. Eine systemische Infektion beruht auf der unkontrollierten Ausbreitung der Keime auf den ganzen Körper. Diese kann zu einer Sepsis (umgangssprachlich: Blutvergiftung) führen.

Die vorliegende Arbeit soll zur Klärung der Vorgänge im menschlichen Immunsystem beitragen, die der Sepsis zu Grunde liegen.

Sepsis

Der Sepsis fallen jedes Jahr zahlreiche Menschen zum Opfer. Es besteht eine Mortalität von annähernd 30% und 215.000 Toten jährlich alleine in den USA (Angus et al., 2001). Eine Sepsis verursacht Gewebsschädigung, Blutdruckabfall und hohes Fieber und kann über Multiorganversagen und irreversiblen Schock zum Tod führen (Manthous et al., 1993;

Lopnow et al., 1993b). Etwa die Hälfte aller Sepsiserkrankungen wird durch Gram-negative Bakterien verursacht. Eine Sepsis beruht häufig auf der unkontrollierten Ausbreitung bakterieller Pathogene im infizierten Organismus. Das angeborene Immunsystem reagiert mit der ungehemmten Produktion inflammatorischer Mediatoren, die bewirken, dass sich der Körper selbst vergiftet. Das Resultat ist im schlimmsten Fall ein Multiorganversagen, man spricht von einem septischen Schock.

Es hat sich gezeigt, dass die unkontrollierte Ausschüttung von Mediatoren maßgeblich von mononukleären Zellen und zwar überwiegend von Makrophagen verursacht wird. Die Aktivierung dieser Zellen ist die Grundlage der Entzündungsreaktion und wird durch die Erkennung bakterieller Virulenzfaktoren, sog. „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs), initiiert. Die Strukturen auf der Wirtszelle, die an der Erkennung der PAMPs beteiligt sind, werden als „pathogen recognition receptors“ bezeichnet. PAMPs sind überwiegend Zellwandbestandteile von Bakterien. Der wirksamste unter diesen Virulenzfaktoren hinsichtlich der Aktivierung von Immunzellen ist das Lipopolysaccharid (LPS) der Gram-negativen Bakterien.

Obwohl dieser Virulenzfaktor seit über einem Jahrhundert bekannt ist - bereits 1892 wurde das Endotoxin der Bakterienart *Vibrio cholerae*, das Cholera Gift, beschrieben (Pfeiffer, 1892) - ist es bis heute nicht gelungen, eine verlässliche Therapie gegen die Sepsis zu finden. Auch nach der Entdeckung bakterizider Wirkstoffe konnte die Zahl der Todesfälle nicht reduziert werden, da das Abtöten der Mikroorganismen die spontane Freisetzung des LPS im infizierten Organismus verstärkt. Nur bakteriostatische Antibiotika vermochten die Todesrate etwas zu verringern.

Da es nicht möglich ist, bakterielle Infektionen vollends zu verhindern, gilt es, zur Entwicklung einer Therapie gegen die Sepsis eine Möglichkeit zu finden, das freigesetzte Endotoxin zu neutralisieren oder die Aktivierung der Immunzellen zu verhindern. Diese Aktivierung, die zur Ausschüttung der Mediatoren führt, ist ein komplexer Vorgang, der trotz einiger Erkenntnisse in den letzten Jahren noch immer zu großen Teilen im Dunkeln liegt. Auf verschiedenen Zelltypen ist eine große Zahl LPS-sensitiver Rezeptoren entdeckt worden, und ein komplexes Netzwerk scheint die intrazelluläre Signaltransduktion zum Zellkern zu bewerkstelligen. Die exakten molekularen Prozesse bei der Zellaktivierung durch LPS müssen noch bestimmt werden, um einen Angriffspunkt und somit einen pharmazeutischen Ansatz zur Heilung oder Verhinderung der Sepsis zu erhalten.

1.2. Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharid ist ein Bestandteil der Zellhülle Gram-negativer Bakterien (Abbildung 1). In dieser ist es eine wichtige Komponente der äußeren Membran und bildet als Hauptbestandteil der Außenschicht mit den Phospholipiden der Innenschicht eine asymmetrische Lipidmatrix (Rietschel et al., 1988; Raetz, 1990). Im Gegensatz zu den bakteriellen Exotoxinen wird es von Mikroorganismen nicht aktiv ausgeschieden, sondern nur durch Tod, Wachstum und Teilung der Bakterienzelle sowie durch das Einwirken von Antibiotika, Antikörpern und des Komplementsystems passiv freigesetzt. Daher wird es auch als Endotoxin bezeichnet.

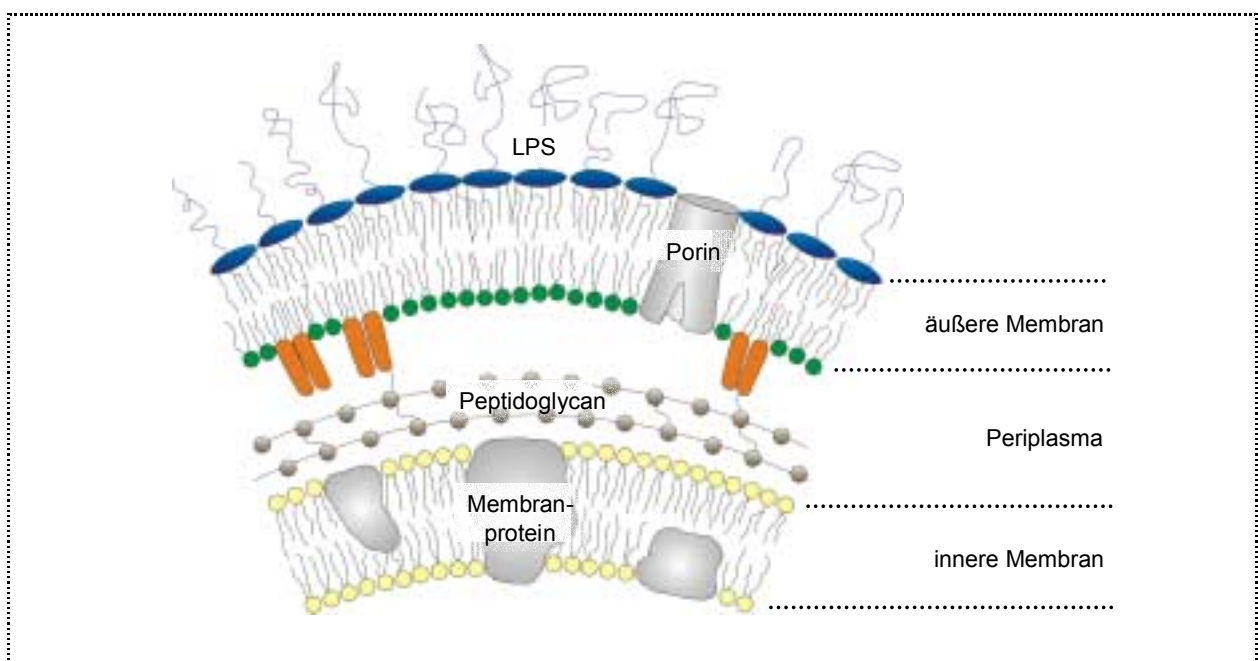


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zellhülle eines Gram-negativen Bakteriums.

Molekulare Struktur

LPS besteht als amphiphiles Molekül aus zwei Teilen, die kovalent aneinander binden: einem hydrophilen Heteropolysaccharid und dem hydrophoben Lipoid A (Abbildung 2).

Die Struktur des Zuckers kann je nach Spezies große Unterschiede aufweisen, während die Lipidkomponente in hohem Maße konserviert ist. Der Zuckeranteil wird in das Kernoligosaccharid und die O-spezifische Kette unterteilt. Die O-spezifische Kette ist die variabelste Komponente des Moleküls und besteht aus bis zu 50 Wiederholungen von Oligosacchariden mit je zwei bis acht Monosacchariden. Sie wird auch als O-Antigen bezeichnet, da sie als Oberflächenbestandteil des Bakteriums dem Wirtsorganismus als

Angriffsziel für Antikörper dient. Aufgrund ihrer hohen Variabilität unter den verschiedenen Bakterien-Stämmen wird sie auch als Merkmal zu deren Klassifikation herangezogen.

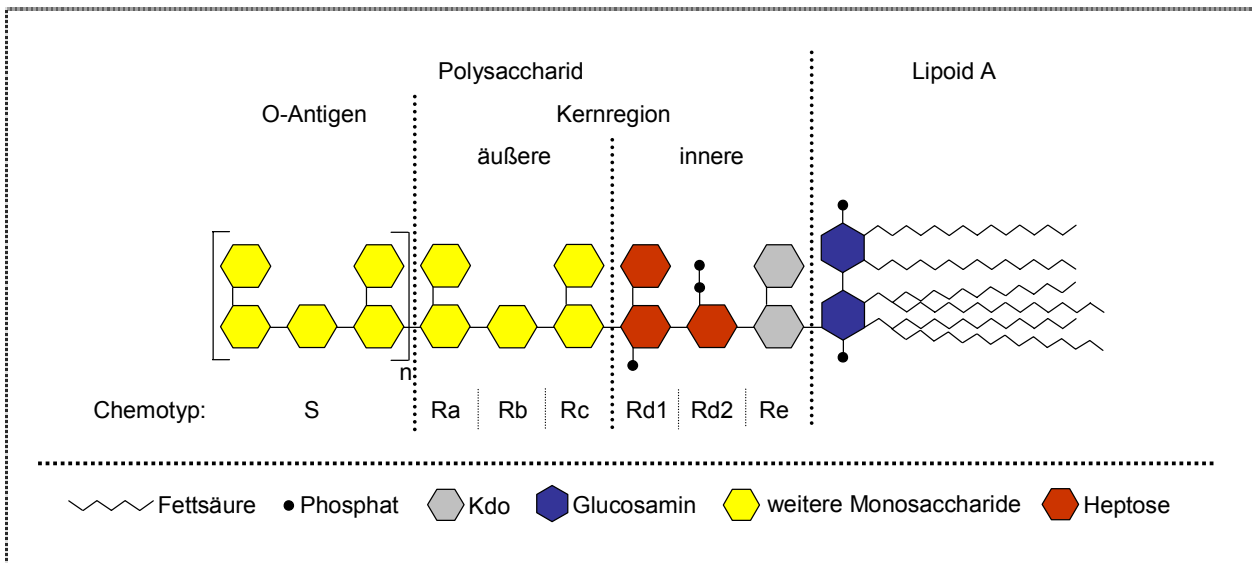


Abbildung 2: Schematische Struktur eines Lipopolysaccharid-Moleküls (Enterobacteriaceae).

Das Kernoligosaccharid wird in den inneren und den äußeren Kernbereich unterteilt. Die Monosaccharide des äußeren Kerns sind hauptsächlich D-Glukose, D-Galactose und N-Acetyl-D-Glucosamin, wohingegen der innere Kern L- oder D-Glycero-D-Manno-Heptose und 2-Keto-3-Deoxyoctanat (Kdo) enthält. Eine variable Zusammensetzung der Zuckerbausteine und das Vorhandensein oder Fehlen von Substituenten wie Phosphat- und Ethanolamingruppen kennzeichnen die Kernregion.

Das hydrophobe Lipoid A (Abbildung 3) ist ein essentieller Bestandteil des LPS und verankert das Molekül in der Bakterienmembran. Es besteht aus einem Grundgerüst und mehreren daran gebundenen Fettsäuren. Bei den Enterobacteriaceae wird das Grundgerüst von zwei $\beta(1\rightarrow6)$ verknüpften Glucosaminen gebildet, die an den Positionen 1 bzw. 4 phosphoryliert sind. Das Kernoligosaccharid ist mit dem Lipoid A über eine Esterbindung an der Position 6 eines der Glucosamine verbunden. Die Fettsäuren sind am Grundgerüst ester- oder amidgebunden (Loppnow et al., 1993a; Holst et al., 1996; Seydel et al., 1999).

Die Lipoid A verschiedener Bakterienarten variieren nur geringfügig hinsichtlich Anzahl, Verteilung, Sättigungsgrad und Länge der Fettsäuren.

Chemotypen des LPS

Die Chemotypen des LPS werden in zwei Gruppen unterteilt, das „smooth“ LPS (S-Form LPS) der Wildtypen und das „rough“ LPS (R LPS) der Raumutanten (s. Abbildung 2)¹. Das S-Form LPS der Bakterien von Wildtyp-Stämmen ist sehr heterogen. Es besteht aus O-Antigen und variabler Zahl an Fettsäuren im Lipoid A (Tetra-, Penta-, Hexaacyl). Im Gegensatz dazu haben Raumutanten kein O-Antigen, sondern nur Kernregionen verschiedener Länge und hexaacyliertes Lipoid A. Man unterscheidet hier mit abnehmender Zahl an Kernzuckern die Chemotypen Ra, Rb, Rc, Rd und Re LPS, wobei Ra LPS über den kompletten Kern verfügt, während Re LPS lediglich zwei Kdo als Kernbausteine enthält.

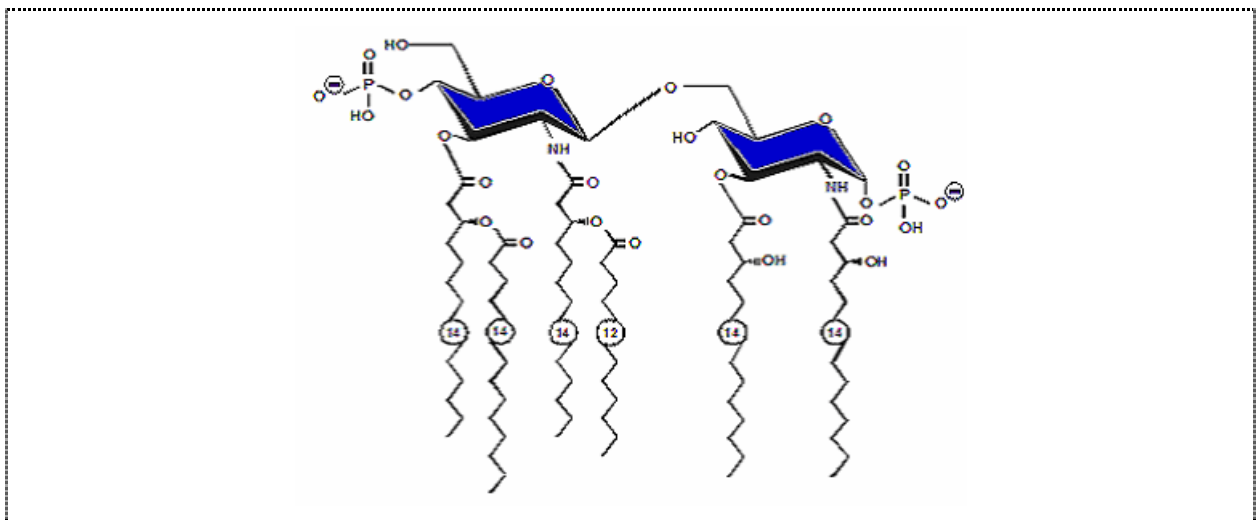


Abbildung 3: Chemische Struktur des Lipoid A aus *Escherichia coli*. Die Zahlen in Kreisen geben die Anzahl der Kohlenstoffatome der Fettsäuren an.

Die strukturellen Unterschiede der Lipoid A verschiedener Mikroorganismen sind nur gering, haben aber bedeutende funktionelle Folgen für die Wirkung des Endotoxins im Wirtsorganismus. Voraussetzung für eine biologische Aktivität ist eine negative Nettoladung des LPS-Moleküls (Schromm et al., 1996). Die Art der biologischen Aktivität wird durch das Vorhandensein von Phosphatgruppen am Lipoid A-Grundgerüst und die Konformation des Lipoid A festgelegt (Schromm et al., 2000). Hier treten zwei Formen auf, konisch und zylindrisch, die maßgeblich von der Anzahl der Fettsäuren abhängen. Penta- und hexaacyliertes Lipoid A weist einen höheren Durchmesser am Fettsäureteil als am Grundgerüst auf und ist somit konisch, während tetraacyliertes Lipoid A einen durchgehend gleichmäßigen Durchmesser besitzt und folglich eine zylindrische Form hat (Abbildung 4).

¹ Die Bezeichnungen „smooth“ und „rough“ beziehen sich auf die Oberflächenbeschaffenheit der Bakterienkolonien. Wildtypenkolonien haben eine glatte Oberfläche, Raumutantenkolonien eine raue.

Daneben wird die Konformation des Lipoid A von Umgebungsvariablen wie pH-Wert, Salzgehalt und Temperatur moduliert.

Supramolekulare Strukturen und biologische Aktivität

LPS wird durch Tod, Wachstum und Teilung der Bakterienzelle sowie durch das Einwirken von Antibiotika, antibakteriellen Peptiden, Antikörpern und des Komplementsystems auf die Bakterien im infizierten Organismus freigesetzt.

Isoliertes LPS kann im Wirtsorganismus diverse Reaktionen auslösen. In geringen Dosen verursacht es eine moderate Aktivierung des Immunsystems, die Infektionen und Tumorbildungen entgegenwirkt (Loppnow et al., 1993b). In größeren Konzentrationen führt es zu Inflammation und Sepsis (Schlag et al., 1991; Matot und Sprung, 2001).

Die Toxizität des LPS im Wirtsorganismus beruht auf dem Lipoid A, das daher auch als endotoxisches Prinzip bezeichnet wird (Rietschel et al., 1989). Es ist an sich keine toxische Substanz, da es den Wirtsorganismus nicht schädigt. Lediglich die Reaktion des Immunsystems auf diesen Pathogenitätsfaktor führt ggf. zur Erkrankung. Lipoid A verfügt somit nur über eine indirekte Toxizität (Schromm und Seydel, 1999).

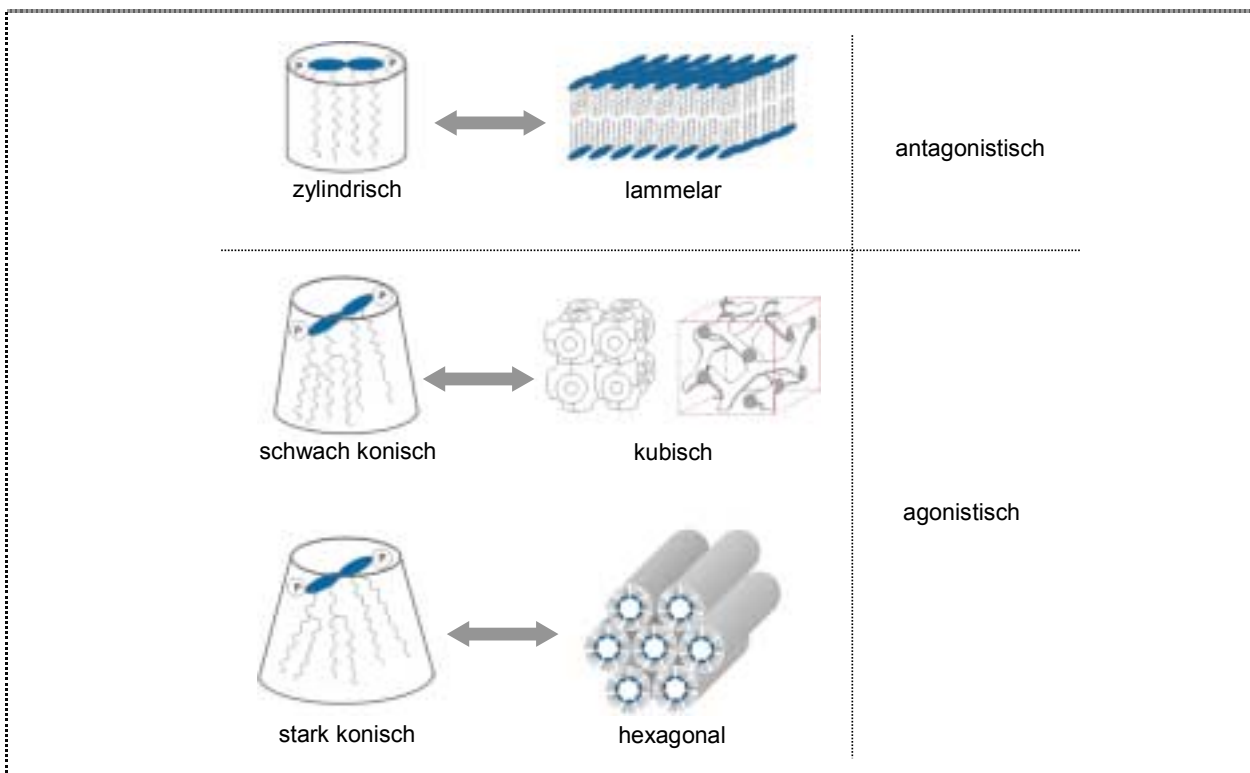


Abbildung 4: Molekülkonformationen des Lipoid A und supramolekulare Strukturen des LPS. Maßgeblich für die Konformation ist die Anzahl der Fettsäuren am Lipoid A. Die Darstellung der Monomere und Aggregate ist nicht maßstabsgerecht (Seydel et al., 1993).

Als amphiphiles Molekül bildet LPS in wässrigen Medien wie Blut ab einer bestimmten Konzentration, der kritischen Aggregatkonzentration („critical micelle concentration“), Aggregate (Aurell und Wistrom, 1998; Buschner, 1999). Deren supramolekulare Strukturen werden maßgeblich von der Konformation der LPS-Monomere bestimmt (Seydel et al., 1999). LPS-Moleküle mit zylindrischer Lipid A-Konformation tendieren zu lamellaren, solche mit konischer Form zu kubischen oder hexagonal-invertierten, also nichtlamellaren Aggregaten (Abbildung 4).

Ebenso beruht die biologische Aktivität des LPS auf dem Lipid A. Nur die konische Konformation wirkt toxisch und wird daher auch endotoxische Konformation genannt. Die zylindrische Form wirkt bei einer Vorinkubation der Aktivierung durch toxisches LPS sogar entgegen. Ebenso ist das Vorhandensein der beiden Phosphatgruppen am Grundgerüst des Lipid A eine Voraussetzung für die Toxizität. Es gilt folglich, agonistisches (toxisches) von antagonistischem LPS zu unterscheiden (Schromm et al., 2000)

1.3. Das Immunsystem

Das Immunsystem ist die Gesamtheit der Organe, Zellen und Moleküle des Körpers, die zu spezifischen Reaktionen auf molekularer und zellulärer Ebene gegen sog. Antigene, also kranke körpereigene Strukturen, körperfremde Substanzen und Krankheitserreger befähigt sind. Durch die ablaufenden Reaktionen werden die Integrität, die Unversehrtheit und die Individualität des einzelnen Organismus aufrechterhalten. Die Organe des Immunsystems sind im gesamten Körper verteilt und werden auch lymphatische Organe genannt. Die Zellen und Moleküle des Immunsystems befinden sich ständig auf Wanderschaft und sind somit überall im Körper vorhanden.

Im Normalfall kann das Immunsystem zwischen gesunden und kranken körpereigenen sowie körperfremden Strukturen unterscheiden, so dass keine Immunreaktion gegen den eigenen gesunden Körper erfolgt.

Das im Laufe der Evolution entwickelte Abwehrsystem des menschlichen Körpers lässt sich in zwei Hauptsysteme gliedern: Die angeborene Immunität, die vor allem bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen von grundlegender Bedeutung ist und die erworbene Immunität gegen jeweils ganz bestimmte Krankheitserreger (Tabelle 1). Letztere richtet sich gegen verkapselte Bakterien und Viren, die eine in der Evolution schnell veränderbare Oberflächenstruktur besitzen. Die angeborenen und erworbenen Abwehrmechanismen sind eng miteinander vernetzt. Das Immunsystem lässt sich aber auch funktional unterteilen, da es über humorale (lösliche) und zelluläre Mechanismen verfügt.

Tabelle 1: Die Unterteilungen des Immunsystems

	zellulär	humoral
erworben	Lymphozyten	Antikörper
angeboren	NK-Zellen Granulozyten Monozyten Makrophagen	Komplementsystem Mediatoren Lysozym Antimikrobielle Peptide (Defensine)

Die meisten Krankheitserreger werden innerhalb weniger Stunden aufgespürt und durch die Mechanismen der angeborenen Immunität zerstört. Da diese nicht antigenspezifisch ist, benötigt sie auch keine lange Anlaufphase. Sollte ein Antigen nicht von dieser ersten Verteidigung des Körpers vernichtet werden, kommt es nach einem Zeitraum von drei bis sieben Tagen zur erworbenen Immunantwort. Dazu muss der Erreger zunächst lokalisiert und erkannt werden. Daraufhin werden Effektorzellen produziert, die spezifisch das Antigen bekämpfen können (Primärantwort). Als Folge entsteht ein immunologisches Gedächtnis, das künftige Immunantworten gegen das Antigen effizienter macht (Sekundärantwort).

1.3.1. Das erworbene Immunsystem

Die erworbene Abwehr entwickelt sich im Gegensatz zur angeborenen erst durch den direkten Kontakt mit einem Krankheitserreger. Es kommt dabei zur Ausbildung von Schutzmaßnahmen, die gezielt gegen einen bestimmten Krankheitserreger gerichtet sind. Während der Immunantwort werden Gedächtniszellen gebildet, welche einem erneuten Angriff des gleichen Erregers entgegenwirken. Darüber hinaus hat das erworbene Immunsystem die Fähigkeit, krankhafte körpereigene Zellen wie Tumorzellen zu erkennen und anzugreifen.

Die erworbene Immunabwehr wird durch Lymphozyten vermittelt. Lymphozyten sind die kleinsten weißen Blutkörperchen. Ihr Anteil an der Gesamtmenge der weißen Blutkörperchen im Blut beträgt etwa ein Viertel. Allerdings befinden sich 98% der Lymphozyten nicht im Blut, sondern in den lymphatischen Organen (Lymphknoten, Lymphbahnen, Milz) und im Knochenmark. Von dort aus wird ständig ein kleiner Teil der Zellen ins Blut abgegeben. Die Lebensdauer der Lymphozyten beträgt zwischen zehn Tagen und mehreren Jahren. Sie entwickeln sich zunächst im Knochenmark und im Thymus, d.h. den primären Organen des Immunsystems, und wandern von dort aus in die sekundären Immunorgane wie Lymphgewebe und Milz.

1.3.2. Das angeborene Immunsystem

Die angeborene Abwehr ist ein schnelles Verteidigungssystem und ist in der Lage, Fremdkörper und Krankheitserreger bereits beim ersten Kontakt unschädlich zu machen. Die neutrophilen Granulozyten, die Monozyten und die Makrophagen sind konstitutiv in allen Geweben vorhanden und akkumulieren zuerst am Ort des Geschehens, z. B. einem Infektionsherd oder einer Wunde. Sie werden über Botenstoffe, die Chemokine, angelockt. Die angeborene Abwehr ist vor allem für die Bekämpfung bakterieller Infektionen von großer Bedeutung. Neben den humoralen und zellulären Mechanismen unterstützen weitere Faktoren die angeborene Immunabwehr. So bieten die Haut, der Magensaft und die Schleimhäute wirkungsvolle Barrieren gegen das Eindringen von Fremdstoffen.

Die angeborene zelluläre Abwehr

Die Zellen der angeborenen Abwehr sind in der Lage, Fremdstoffe zu phagozytieren und zu verdauen. Zu diesen Phagozyten gehören neutrophile und eosinophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten. Die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sind darauf spezialisiert, insbesondere Tumorzellen und Viren unschädlich zu machen. Sie werden durch die von den virusinfizierten Zellen abgesonderten Interferone angelockt. Sie durchlöchern die Zellmembranen dieser Zellen, wodurch diese absterben und das Virus nicht mehr vermehren.

Die angeborene humorale Abwehr

Die angeborene humorale Abwehr besteht aus einer Vielzahl von löslichen Stoffen. Interferone haben eine vorwiegend gegen Viren gerichtete Wirkung. Lysozym ist in verschiedenen Körpersekreten wie Tränenflüssigkeit und Speichel enthalten und greift die Zellwand Gram-positiver Bakterienarten an. Das Komplementsystem ist ein von der Leber gebildetes Enzymsystem, das aus einer Gruppe von etwa 20 Proteinen besteht und zur Abtötung körperfremder Zellen führt. Antimikrobielle Peptide (Defensine) sind körpereigene Antibiotika, welche die Erreger schädigen oder töten. Zytokine sorgen dafür, dass vermehrt Abwehrzellen der angeborenen Abwehr zur Verfügung stehen. Da diese maßgeblich für die Entstehung der Sepsis verantwortlich sind, wird der Ablauf der Zellaktivierung, der zur Produktion der Zytokine führt, im Folgenden näher erläutert.

1.3.3. Der Prozess der Zellaktivierung

Ein essentieller Bestandteil der angeborenen Immunantwort ist die Aktivierung von Abwehrzellen. Sie dient der raschen Alarmierung des Immunsystems und der Rekrutierung von Immunzellen in die infizierten Gewebe. Dieser Vorgang findet unmittelbar nach dem

Kontakt mit einem Erreger statt und ist somit von großer Bedeutung. Die Aktivierung von Immunzellen macht sich in Form von Proliferation, Differenzierung, Phagozytose sowie in der Produktion von Mediatoren und Adhäsionsmolekülen bemerkbar. In den Vordergrund treten hier Monozyten und aus diesen differenzierte Makrophagen, die mit der Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie den Zytokinen Tumor-Nekrose-Faktor α ($\text{TNF}\alpha$), Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 6 (IL-6) aber auch mit antiinflammatorischen Mediatoren wie IL-10 und „transforming growth factor“ (TGF)- β reagieren. Diese Botenstoffe haben immunmodulatorische Wirkungen auf weitere Zellen.

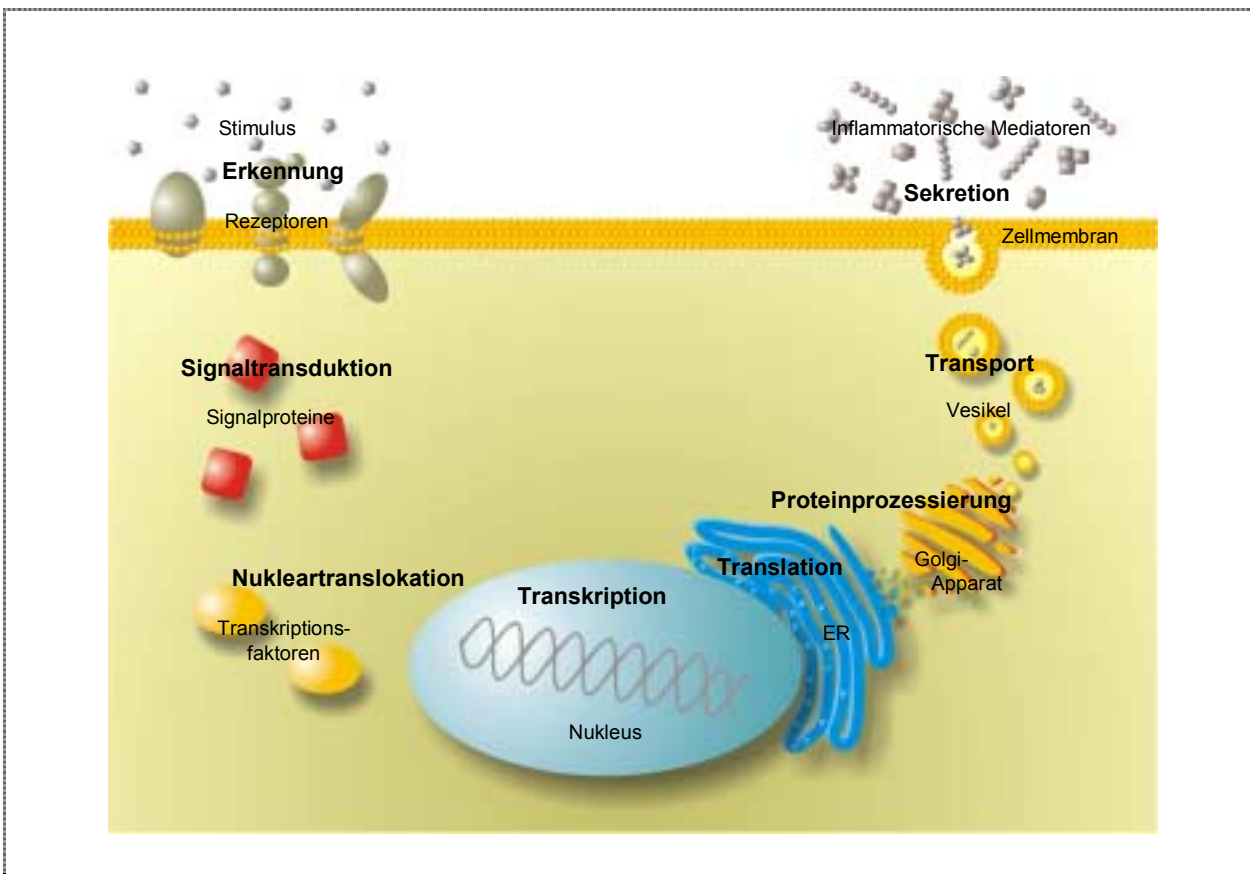


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aktivierung eines humanen Makrophagen. ER endoplasmatisches Retikulum.

Die Aktivierung einer eukaryotischen Zelle wird im Folgenden beispielhaft anhand des Vorgangs in einem humanen Makrophagen beschrieben (Abbildung 5): Der Stimulus wird von Rezeptoren auf der Zellmembran des Makrophagen erkannt. Die Information wird durch die Membran ins Zytoplasma übertragen (transmembrane Signaltransduktion). Dort folgt eine netzwerkartige Abfolge von Protein-Protein-Interaktionen, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und deren Translokation in den Zellkern führt (intrazelluläre Signaltransduktion). Diese wiederum regulieren die Transkription von Mediatoren-kodierender

mRNA, die aus dem Kern in das raue Endoplasmatische Reticulum transportiert wird. Nach der Translation der mRNA in die Proteinbausteine der Botenstoffe, werden diese in den Dictyosomen des Golgi-Apparates modifiziert. Letztendlich werden die Mediatoren in das Blut oder Gewebe sezerniert.

Manche Mediatoren werden konstitutiv synthetisiert, intrazellulär gespeichert und erst im Zuge der Zellaktivierung ausgeschieden.

1.3.3.1. Zellaktivierung durch LPS

Der LPS-Rezeptorkomplex

Mittlerweile ist bekannt, dass die Erkennung des LPS auf der Oberfläche von Immunzellen von mehreren Proteinen bewerkstelligt wird, die auf komplexe Weise zusammenarbeiten. Im Zentrum dieses Komplexes stehen die im Folgenden beschriebenen Proteine.

LPS-bindendes Protein

Das LPS-bindende Protein (LBP) ist ein Glykoprotein, das hauptsächlich in den Hepatozyten der Leber sowie in den Zellen des Darmepithels synthetisiert und an das Blut abgegeben wird (Tobias et al., 1986; Ramadori et al., 1990; Vreugdenhil et al., 1999). Es gehört zu einer Familie Lipid-bindender Proteine und interagiert mit dem hydrophoben Teil des LPS (Schumann et al., 1990), insofern dieses über eine negative Nettoladung verfügt (Schromm et al., 1996). Unter anderem wird LBP im Zuge einer LPS-induzierten Entzündung hochreguliert und ist somit ein Akute-Phase-Protein¹. In niedriger Konzentration bewirkt LBP eine Verstärkung der LPS-induzierten Produktion von Mediatoren, während es in hoher Konzentration, der Akute-Phase-Konzentration, diese Produktion verringert und folglich entzündungshemmend wirkt (Lamping et al., 1998; Gutschmann et al., 2001b).

Unlängst wurde festgestellt, dass LBP nicht nur als „soluble“ LBP (sLBP) im Serum vorkommt, sondern auch in Membranen von Immunzellen interkaliert und dort als „membrane LBP“ (mLBP) an der Zellaktivierung beteiligt ist (Gutschmann et al., 2001a).

Zelldifferenzierungsantigen 14

Als Zelldifferenzierungsantigen („cluster of differentiation“, CD) der Leukozyten wird CD14 von myeloiden Immunzellen produziert, aber auch von Geweben wie Epithelien. Es tritt in zwei Formen in Erscheinung: plasmagelöst, als „soluble“ CD14 (sCD14), und über einen Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker membranständig, als „membrane“ CD14 (mCD14) (Ulevitch und Tobias, 1995). Beide Formen können eine Zellaktivierung vermitteln (Schutt et

¹ Akute-Phase-Proteine werden im Zuge einer Infektion verstärkt synthetisiert

al., 1995; Blondin et al., 1997), wobei LPS an CD14 bindet (Wright et al., 1990; Couturier et al., 1991).

Da CD14 nicht über eine zytoplasmatische Domäne verfügt, ist es nicht in der Lage, eigenständig eine transmembrane Signaltransduktion durchzuführen. Folglich ist das Zusammenwirken mit mindestens einem transmembranen Protein in einem heterogenen LPS-Rezeptorkomplex erforderlich (Ulevitch und Tobias, 1994; Ingalls et al., 1999).

CD14 ist zwar ein Protein mit hoher LPS-Affinität, doch seine Blockierung oder sein Fehlen führen nur zu einer Verringerung und nicht zu einer Blockade der LPS-induzierten Ausschüttung von Botenstoffen durch Immunzellen (Lynn et al., 1993; Jungi et al., 1997).

Toll-like Rezeptor 4 und MD2

Toll wurde ursprünglich als ein Gen zur Kodierung eines transmembranen Rezeptors bei der Gattung *Drosophila* entdeckt. Das Toll Protein erwies sich als ausschlaggebend für die extrazellulär initiierte Steuerung der dorsoventralen Polarisierung bei der Embryonalentwicklung der Fliegen (Stein et al., 1991). Den adulten Fruchtfliegen dient es bei der Immunabwehr von Pilzinfektionen, indem es die Produktion antifungaler Peptide steuert (Lemaitre et al., 1996). Später wurde ein homologes Gen beim Menschen gefunden, hToll. Das exprimierte Protein, der Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) steuert die Expression einiger Gene der angeborenen Immunantwort. Nach der Entdeckung weiterer homologer Rezeptoren unter den Säugetieren wurden diese zur Familie der Toll-like Rezeptoren zusammengefasst. Es handelt sich dabei um Rezeptor-Tyrosinkinasen (Rezeptor Typ 1) (Medzhitov et al., 1997). Die Mitglieder der TLR-Familie weisen als Homologie eine Leucin-reiche Ectodomäne auf. Die zytoplasmatische Domäne der TLR ist jener der IL-1-Rezeptor-Familie homolog, weshalb diese zur Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Familie zusammengefasst werden (Kopp und Medzhitov, 1999). Die zurzeit bekannten TLR unterscheiden sich in ihrem Vorhandensein auf verschiedenen Zellen des Immunsystems und in ihrer Aktivierbarkeit durch verschiedene Stimuli. Der TLR4 wurde als Rezeptor für LPS auf mononukleären Zellen und als Übermittler des Signals in das Zellinnere erkannt (Poltorak et al., 1998). Er ist jedoch nicht eigenständig funktionstüchtig, sondern in einen Komplex eingebunden, der wahrscheinlich neben anderen Proteinen im Kern aus LBP, CD14, TLR4 und dem von der Zelle sekretierten „myeloid differentiation protein 2“ (MD2) besteht, das an den TLR4 bindet (Shimazu et al., 1999). Bei Abwesenheit des MD2 bzw. einer Punktmutation die zum Austausch der Aminosäure an Stelle 95 führt, wurde bisher noch keine Aktivierung des TLR4 festgestellt (Schromm et al., 2001; da Silva et al., 2001). Versuche mit TLR4-defekten Mäusen haben gezeigt, dass dieser Rezeptor von essentieller Bedeutung für die LPS-induzierte Produktion von Botenstoffen durch Makrophagen ist (Hoshino et al., 1999), da diese nicht auf LPS reagieren.

Mögliche weitere Bestandteile des Rezeptorkomplexes

Neben den bisher genannten, werden in der Literatur weitere Membranproteine als Rezeptoren für Endotoxin beschrieben.

P2X und P2Y sind ionotrope Oberflächenrezeptoren der purinergen Rezeptor-Familie P2 und werden durch ATP bzw. UTP aktiviert. Bei den P2 handelt es sich um Calciumionenkanäle (Ballerini et al., 1996). Des Weiteren wurde beschrieben, dass der P2X₇ über eine intrazelluläre LPS-Bindungsstelle verfügt (Denlinger et al., 2001) und die Aktivierung des Kanals bei Gliazellen (Ferrari et al., 1997) und bei Schwann-Zellen (Colomar et al., 2003) zur Ausschüttung von IL-1 führt. Der P2Y₆ ist wie der P2X₇ in der Lage, die LPS-induzierte Zellaktivierung zu verstärken (Chen und Lin, 2001).

Es wird auch eine plasmagelöste Form des murinen TLR4 beschrieben, welche die Ausschüttung von Mediatoren durch Makrophagen verringert (Iwami et al., 2000).

Ein weiterer möglicher Bestandteil des LPS-Rezeptorkomplexes ist der Kaliumionenkanal MaxiK, der weiter unten eingehend vorgestellt wird (s. 1.3.4).

Das Heterodimer CD11/CD18 bildet ein transmembranes Integrin bei Leukozyten und kann eine dem CD14 analoge Funktion übernehmen (Flaherty et al., 1997). Es verfügt zwar über eine zytoplasmatische Domäne, ist jedoch auch ohne diese funktionstüchtig, was dafür spricht, dass es wie CD14 in einen Rezeptorkomplex eingebunden ist (Ingalls et al., 1998).

Die Erkennung des LPS durch den Rezeptorkomplex

Für den Ablauf der LPS-Erkennung werden zwei Modelle diskutiert:

1. Das Obsonierungsmodell schlägt einen LBP-vermittelten Transport von LPS-Monomeren zur Zelloberfläche vor, ein vektorieller Prozess, bei dem LPS-Aggregate durch LBP obsoniert werden. Anschließend werden LPS-Monomere aus den Aggregaten extrahiert und über CD14 und MD2 an TLR4 übermittelt (Gioannini et al., 2004).
2. Nach dem Fusionsmodell ist neben dem sLBP („soluble“ LBP), das frei im Plasma vorliegt, auch eine transmembrane Form, das mLBP („membrane“ LBP) von Bedeutung. Es kann die Interkalation von LPS-Aggregaten in die Zellmembran bewerkstelligen, was zu einer Zellaktivierung führt (Gutsmann et al., 2001b; Mueller et al., 2004).

Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Proteine des LPS-Rezeptorkomplexes bei ruhenden Zellen dissoziiert vorliegen. CD14 scheint sich konstitutiv in „lipid rafts“, speziellen Bereichen der Zellmembran mit hohem Anteil an Cholesterol und Sphingolipiden (Simons und Ikonen, 1997) zu befinden, während TLR4 erst im Zuge einer Stimulation mit LPS in die „lipid rafts“ wandert (Triantafyllou M et al., 2002) und einen Komplex mit MD2 und CD14 bildet.

LPS-induzierte Signalwege

Es zeichnen sich zwei Hauptwege für die TLR4-vermittelte Zellaktivierung durch LPS ab (Abbildung 6).

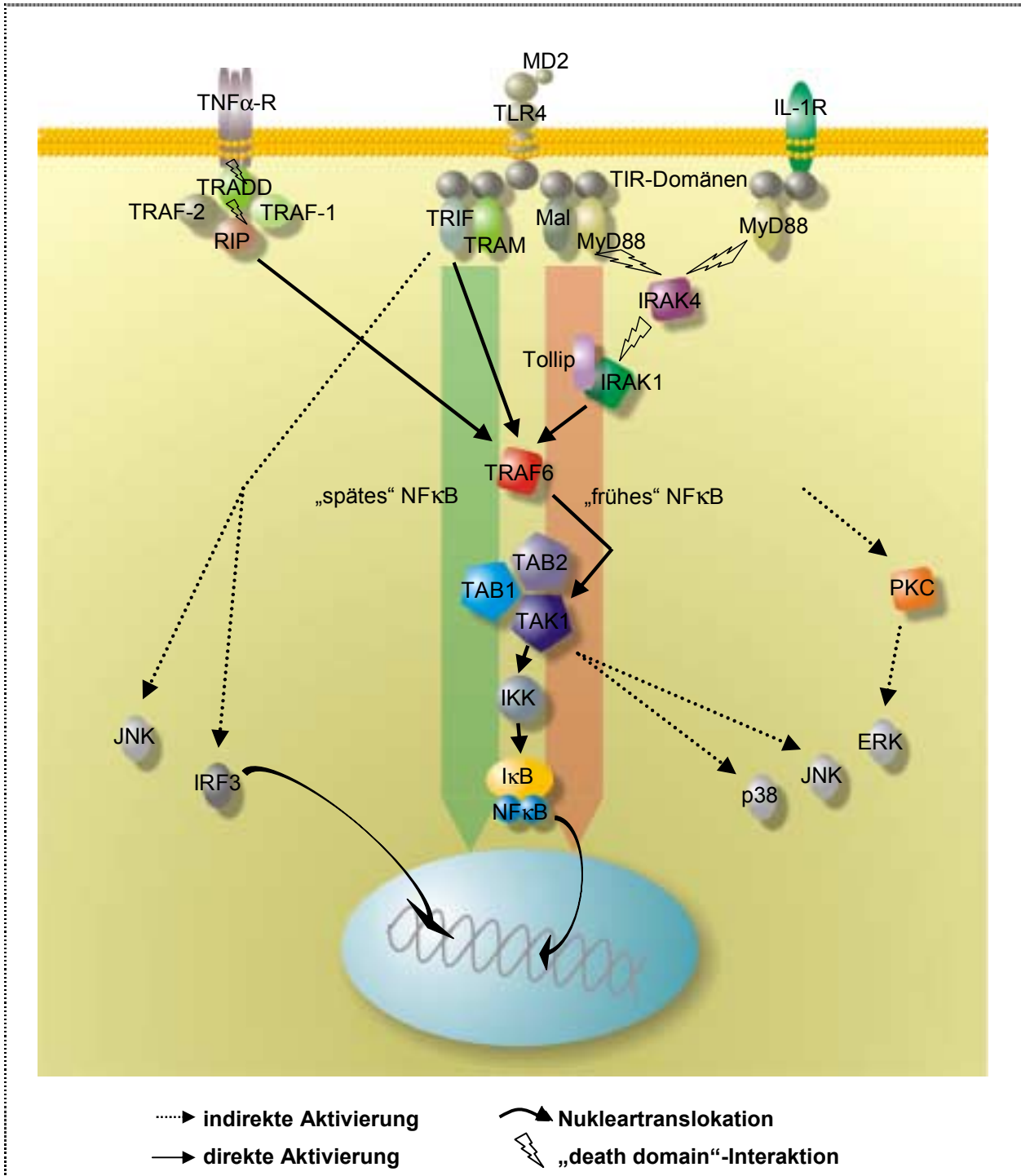


Abbildung 6: Schematische Darstellung der TNF α -, LPS- und IL-1 induzierten Signalwege. (Modifiziert nach Palsson-McDermott und O'Neill, 2004, Takeda und Akira, 2005). Erläuterungen s. Text.

Diese spalten sich bereits bei der Signalübertragung des TLR4 auf dessen intrazelluläre Adapter auf, die ebenfalls über eine TIR-Domäne verfügen. Bisher wurden vier solche Adapter entdeckt: Der „myeloid differentiation factor 88“ (MyD88), das „MyD88 adaptor-like protein“ (MAL oder TIRAP), das „TIR-domain containing adapter molecule“ (TICAM-1 oder TRIF) und das „TRIF-related adapter molecule“ (TRAM oder TICAM-2).

Es werden der MyD88-abhängige und der MyD88-unabhängige Signalweg unterschieden. Der MyD88 Signalweg über MyD88 und MAL führt zu einer frühen Aktivierung von „mitogen activated protein“ (MAP)-Kinasen und des „nuclear factor κ B“ (NF κ B). Der MyD88-unabhängige Signalweg über die Adapter TRIF und TRAM führt zu einer späten Aktivierung der MAP-Kinasen und des NF κ B sowie zur Aktivierung des „interferon regulating factor 3“ (IRF3).

Der MyD88 Signalweg

Zunächst wurde MyD88 als Adapter-Molekül für den TLR4 erkannt (Zhang et al., 1999). MyD88 interagiert mit MAL, welches ebenfalls an den TLR4 bindet, aber nicht wie MyD88 über eine sog. „death domain“ (DD) verfügt, die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (Fitzgerald et al., 2001). Nach Aktivierung des MyD88 assoziiert die DD der „interleukin-1 receptor associated kinase“ (IRAK)-4 mit der DD des MyD88 (Suzuki et al., 2002). IRAK-4 wiederum bewirkt die Dissoziation des Negativregulators „toll interacting protein“ (Tollip) von IRAK-1, indem es an dessen DD bindet (Zhang und Ghosh, 2002). IRAK-1 autophosphoryliert daraufhin und aktiviert den „TNF receptor associated factor“ (TRAF)-6 (Lomaga et al., 1999). TRAF-6 phosphoryliert das „transforming growth factor- β activated kinase (TAK)-1-binding protein“ (TAB)-2, welches mit TAB-1 und der MAP-Kinase-Kinase-Kinase TAK-1 in einem Komplex vorliegt (Qian et al., 2001). Die TAK-1 wird durch TAB-2 aktiviert. Nun spaltet sich der Signalweg. TAK-1 führt zur Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und „c-jun amino-terminal kinase“ (JNK) und des Transkriptionsfaktors NF κ B.

Der MyD88-unabhängige Signalweg

Untersuchungen in MyD88-defizienten Mäusen offenbarten jedoch, dass auch MyD88-unabhängige Mechanismen der Zellaktivierung bestehen müssen (Jiang et al., 2003b). Dieser Weg wird über die Adapter TRIF und TRAM eingeleitet, wobei TRAM als Überträger des Signals vom TLR4 auf TRIF dient (Yamamoto et al., 2002; Oshiumi et al., 2003). TRIF bindet zum einen an TRAF6 und initiiert somit die späte Aktivierung der MAP-Kinasen und des NF κ B (Sato et al., 2003), zum anderen an einen Komplex, der die Aktivierung des IRF3 bewirkt. Dieser besteht aus der „tank-binding kinase“ (TBK)-1, I κ B-Kinase (IKK) ϵ und IRF3, wobei die Bindung des TRIF zur Phosphorylierung des IRF3 durch TBK-1 und IKK ϵ führt (Fitzgerald et al., 2003). IRF3 reguliert die Transkription von Mediatoren wie Interferon- β , IP-

10 („Interferon- γ inducible protein 10“) und Rantes („regulated on activation, normal T cell expressed and secreted“) (McWhirter et al., 2004).

NF κ B

Die NF κ B-Familie umfasst mehrere Proteine, die sich als Homo- oder Heterodimere zum funktionstüchtigen Transkriptionsfaktor zusammenschließen. Die Monomere sind p50, p52, p65, c-Rel und RelB, wobei p50 und p65 das in der Säugerzelle überwiegende Heterodimer bilden (Downey und Han, 1998). Verschiedene Dimere entfalten sehr verschiedene genregulatorische Wirkungen und ermöglichen der Zelle eine selektive Einflussnahme auf die Genexpression.

Im inaktiven Zustand liegt NF κ B an Proteine der NF κ B-Inhibitor-Familie I κ B gebunden vor und wird so im Zytoplasma fixiert (Baldwin, Jr., 1996). Zu dieser Familie gehören die Isoformen I κ B α , I κ B β , I κ B γ und I κ B ϵ . Einer Phosphorylierung des I κ B folgt die kovalente Anlagerung von multiplen Ubiquitineinheiten, woraufhin I κ B durch den 26S-Proteasom-Komplex erkannt und degradiert wird. Dies führt zur Freisetzung des NF κ B und zur Demaskierung von dessen „nuclear localization sequence“. Das Resultat ist die von der „nuclear localization sequence“ gesteuerte Translokation des NF κ B in den Zellkern.

Die Aktivierung des I κ B erfolgt durch die Serin/Threonin-Kinase IKK (Regnier et al., 1997), ein multimerer Komplex, der neben weiteren Untereinheiten aus dem Trimer aus IKK α , IKK β und IKK γ besteht.

MAP-Kinasen

Der Signalweg über die „extracellular signal regulated kinase“ (ERK) ist in höheren Eukaryoten stark konserviert (Buscher et al., 1995). ERK tritt in zwei Isoformen auf, ERK1 (p44) und ERK2 (p42), die im Zuge der Zellaktivierung durch LPS phosphoryliert werden. Die Aktivierung der ERK führt zu einer Aktivierung von weiteren Enzymen im Zytoplasma wie „cytosolic phospholipase A 2“ (Pearce et al., 1996) oder zu einer Translokation der ERK in den Zellkern, wo sie die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie c-Fos (Chen et al., 1993) und „peroxisome proliferator-activated receptor γ “ (Guyton et al., 2001) katalysiert.

Effektoren für ERK1/2 sind MEK1 und MEK2 (Monick et al., 2000), die meist durch Raf phosphoryliert werden (Sanghera et al., 1996). Neben Raf gibt es noch weitere MAP-Kinase-Kinase-Kinasen, die MEK1/2 aktivieren (Pearson et al., 2001). Weiter aufwärts in der Kaskade treten in Abhängigkeit vom Stimulus verschiedene Effektoren auf. Bei der Stimulation mit LPS ist derzeit die Protein Kinase C (PKC) der wahrscheinlichste Kandidat (Asehnoune et al., 2005).

Von p38 wurden vier Isoformen beschrieben, p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ (Downey und Han, 1998). Wie durch die ERK kann auch durch p38 nach der Phosphorylierung eine Aktivierung

weiterer Enzyme wie der „MAP-kinase-interacting kinase“ (Waskiewicz et al., 1997) oder eine Translokation in den Zellkern erfolgen, wo p38 Transkriptionsfaktoren wie „activating transcription factor 2“ aktiviert (Raingeaud et al., 1996).

Als Effektoren der p38 treten, je nach Isoform, die MAPK-Kinase 3 (MKK3) und MAPK-Kinase 6 (MKK6) auf, die beide meist durch TAK-1 aktiviert werden (Terada et al., 1999).

Die JNK ist in drei Isoformen zu finden, JNK1, JNK2 und JNK3. Sie sind verantwortlich für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie „nuclear factor of activated T cells“ (Chow et al., 1997) und c-Jun (Cano et al., 1994).

Die Phosphorylierung der JNK wird durch MKK4 (Derijard et al., 1995) und MKK7 bewerkstelligt (Tournier et al., 1999), die meist durch MEKK4 (Gerwins et al., 1997) und TAK-1 aktiviert werden. Neben MEKK4 bestehen weitere Effektoren für MKK4/7, und weiter aufwärts in der Kaskade sind auch hier mehrere Aktivatoren vorhanden.

1.3.3.2. Zellaktivierung durch IL-1

Für das proinflammatorische Zytokin IL-1 werden zwei Rezeptoren beschrieben. Der IL-1-Rezeptor (IL-1R) Typ 1 (CD121a) vermittelt die Aktivierung von Zellen durch IL-1, während der IL-1-Rezeptor Typ 2 das IL-1 zwar bindet aber keine Signalweiterleitung vermittelt (Docagne et al., 2005). Nach dem derzeitigen Wissensstand ist der Prozess der Zellaktivierung durch IL-1 dem durch LPS sehr ähnlich (s. Abbildung 6), ein Umstand, der auf der Homologie in intrazellulären Domänen (TIR-Domäne) der Rezeptoren beruht. Der IL-1R bedient sich lediglich des Adapters MyD88 und initiiert somit keinen MyD88-unabhängigen Signalweg (Li und Qin, 2005).

1.3.3.3. Zellaktivierung durch TNF α

TNF α hat neben der Eigenschaft, Apoptose in Tumorzellen zu induzieren, eine starke stimulatorische Wirkung auf Immunzellen. Wie in Abbildung 6 skizziert, bindet das trimere Zytokin an TNF α -Rezeptorproteine¹, welche Homotrimere bilden (Naismith und Sprang, 1995) und über eine DD-Interaktion den Adapter „TNF α receptor associated death domain“ (TRADD) aktivieren (Hsu et al., 1995). Nun trennen sich die Signalwege für die Apoptoseinduktion und die Zytokinproduktion. Im Folgenden wird nur auf letzteren der beiden Signalwege eingegangen. TRAF-2, -1 und „receptor interacting protein“ (RIP) binden an

¹ Es existieren 2 Rezeptoren für TNF α , wobei der TNF α -Rezeptor 1 mit höherer Affinität an TNF α bindet (Tartaglia und Goeddel, 1992). Beide Rezeptoren initiieren ähnliche Signalwege.

TRADD und werden aktiviert (Wajant und Scheurich, 2001; Lotocki et al., 2004). Die Aktivierung des NF κ B und JNK erfolgt nun durch TRAF-6 (Kobayashi et al., 2004).

1.3.3.4. Die Bedeutung von Kaliumionenkanälen bei der Zellaktivierung

Seit über einem Jahrzehnt ist bekannt, dass die Aktivierung von Immunzellen eine Modulation von Kaliumionenkanälen bewirkt und dass die Modulation der Kaliumionenströme den Vorgang der Zellaktivierung beeinflusst.

Es wurde oftmals beschrieben, dass die Applikation von Virulenzfaktoren die Aktivierung von Kaliumionenkanälen herbeiführt. Untersuchungen an auswärts und einwärts gerichteten Kaliumionenkanälen in Mikrogliazellen und in Makrophagen zeigten eine Aktivierung der Kanäle durch LPS (Norenberg et al., 1994; Vicente et al., 2003). Aber auch die Verabreichung von Zellwandbestandteilen der Gram-positiven *Streptococcus pneumoniae* führte zur Aktivierung von auswärts gerichteten Kaliumionenkanälen in Mikroglia (Prinz et al., 1999).

Diese Aktivierung von Kaliumionenkanälen scheint für die Zellaktivierung von großer Bedeutung zu sein. Die Verringerung der intrazellulären Kaliumionen-Konzentration ist notwendig für LPS-induzierte IL-1-Produktion in Makrophagen (Perregaux und Gabel, 1994). Die Kaliumionenkanal-Blockade durch Kaliotoxin inhibiert die Produktion von IL-2 und TNF α (Beeton et al., 2001).

In peritonealen Mausmakrophagen und der murinen Makrophagenzelllinie RAW264 wird durch die nicht-selektiven Kaliumionenkanal-Blocker Tetraethylammonium und Chinin die Endotoxin-induzierte TNF α -Ausschüttung inhibiert (Haslberger et al., 1992). Die Zugabe von Chinin zu humanen Alveolarmakrophagen und des Chininderivats Chloroquine zu humanen Blutmonozyten verringern die LPS-induzierte TNF α -Produktion auf mRNA-Ebene (Karres et al., 1998; Weber und Levitz, 2000). Chloroquine inhibiert in murinen RAW 264.7-Zellen zwar nicht die LPS-induzierte Bildung von TNF α -mRNA, aber die Prozessierung von Pro-TNF α zu TNF α (Jeong und Jue, 1997). In murinen Leberzellen bewirkt Chinin die Verringerung verschiedener LPS-induzierter Entzündungssymptome (Gantner et al., 1995).

Da Kaliumionenkanal-Blocker an verschiedenen Punkten der Zellaktivierung angreifen können, ist die Blockade von Ionenkanälen zwar eine wahrscheinliche, aber nicht die einzig denkbare Ursache dieser Wirkungen.

Ebenso wie Kaliumionenkanal-Blocker führt auch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumionen-Konzentration zu einer Abschwächung der Zytokinfreisetzung. So wird z. B. die Zytokinreifung über die Beeinflussung des IL-1 β -konvertierenden Enzyms oder einer benachbarten Protease durch die Kaliumionen-Konzentration reguliert (Walev et al., 1995).

Andererseits wurde aber auch berichtet, dass die Aktivierung von Adenosintriphosphat-sensitiven Kaliumionenkanälen durch Cromakalim den LPS-induzierten Tod von Muskelzellen reduziert (Plachinta et al., 2004).

1.3.4. Der MaxiK-Kanal

1988 wurde der Calciumionen- und Spannungs-abhängige Kaliumionenkanal MaxiK¹ erstmalig beschrieben (Gallin und McKinney, 1988). Er trägt auch den Namen „BK“. Das Gen, welches den MaxiK kodiert, wird „slo“ genannt, abgeleitet von dem Wort „slowpoke“, welches das Gen des MaxiK in *Drosophila* bezeichnet². Die Expression dieses Kanals wird während der Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen hochreguliert (Gallin und McKinney, 1988) und wurde auch auf humanen Alveolarmakrophagen beschrieben (Kakuta et al., 1988). Neben Calciumionen und dem Membranpotential wird er ebenso durch mechanischen Stress, die Adhärenz der Zellen und das Zytokin IL-2 beeinflusst (Martin et al., 1995).

Es wurde aber auch festgestellt, dass LPS Calciumionen- und Spannungs-abhängige Kaliumionenkanäle aktiviert und dass die LPS-induzierte Zellaktivierung durch die Blockade der Kanäle inhibiert wird (Maruyama et al., 1994). In unserer Arbeitsgruppe wurde durch den Einsatz des spezifischen Kanalblockers Paxilline die Zugehörigkeit dieser Kanäle in humanen ausdifferenzierten Blutmakrophagen zu der Gruppe der MaxiK bestätigt (Blunck et al., 2001). Des Weiteren wurde in „excised patches“ ermittelt, dass der MaxiK in humanen Makrophagen ebenso durch weitere Virulenzfaktoren wie Peptidoglycan und Lipoteichonsäure und durch das Zytokin IL-1 aktiviert wird (Scheel, 2002). Eine molekulare Interaktion zwischen dem Kanal und allen Substanzen, die ihn aktivieren ist aufgrund deren verschiedener molekularer Strukturen unwahrscheinlich. Ebenso kann eine Aktivierung des mechanosensitiven MaxiK durch eine Membraninteraktion all dieser aktivierenden Substanzen mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da zumindest IL-1 aufgrund seiner hydrophilen Natur nicht zur Membraninterkalation neigt. Hinzu kommt die Erkenntnis, dass auch bei „excised patches“ viele Strukturen intrazellulärer und membranassoziierter Signalmechanismen funktionstüchtig erhalten bleiben (Bielefeldt und Jackson, 1994) und der MaxiK durch eben solche beeinflusst werden kann. Auch der Umstand, dass die beschriebenen Virulenzfaktoren und IL-1 durch Rezeptoren einer Familie (TIR, s. 1.3.3.1) erkannt werden, die über gemeinsame intrazelluläre Adapter und Signalmoleküle verfügen, spricht für eine indirekte Aktivierung des MaxiK.

¹ Der vollständige Name des Ionenkanals lautet MaxiK-Kanal. Der Einfachheit halber wird er in dieser Arbeit schlicht „MaxiK“ genannt.

² Das Gen des humanen MaxiK heißt hSlo, das der Maus mslo und das der Fruchtfliege dslo.

Neben dem MaxiK wurden weitere Kaliumionenkanäle in der Zytoplasmamembran von Monozyten und Makrophagen beschrieben (Gallin, 1984).

Struktur des MaxiK

Der MaxiK besteht als Homotetramer aus vier Einheiten, die sich jeweils aus zwei Untereinheiten zusammensetzen, den α - und den β -Untereinheiten (Abbildung 7).

Die α -Untereinheit weist eine ausgeprägte Homologie zu den Calciumionen-unabhängigen Spannungs-sensitiven Kaliumionenkanälen des Typs „shaker“ auf, besteht aber nicht aus sechs (S1-S6), sondern sieben transmembranen α -Helices (S0-S6). Diese sind alternierend im Zellinneren und -äußeren durch Verbindungsschleifen („loops“) verbunden. S5 und S6 werden durch den sog. p-loop verknüpft, welcher aus zwei β -Faltblättern besteht, die vom extrazellulären Bereich aus in die Membran ragen und somit die Kanalpore mit dem Selektivitätsfilter bilden. Die S4-Helix ist durch einen hohen Anteil positiv geladener Aminosäuren gekennzeichnet und dient als Spannungssensor (Aggarwal und MacKinnon, 1996; Stefani et al., 1997). Die α -Untereinheit des MaxiK verfügt über vier weitere α -Helices (S7-S10), die an S6 gebunden im Zellinneren liegen und den sog. „tail“ bilden (Meera et al., 1997). Der tail trägt zur Calciumionen-sensitivität des MaxiK bei.

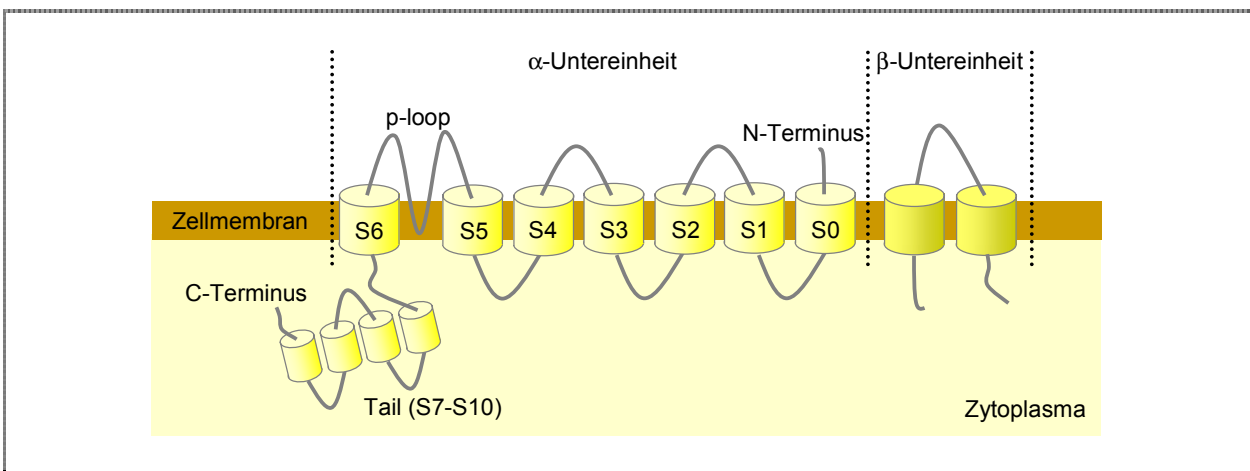


Abbildung 7: Aufbau der Einheiten des MaxiK (Scheel, 2002). Erläuterungen s. Text.

Die β -Untereinheit des MaxiK besteht nur aus zwei transmembranen α -Helices mit intrazellulären Termini. Es werden vier verschiedene β -Untereinheiten (β_1 - β_4) beschrieben, die eine gewebespezifische Verteilung aufweisen (Dworetzky et al., 1996; Tseng-Crank et al., 1996; Brenner et al., 2000; Behrens et al., 2000). Die β -Untereinheiten unterscheiden sich hinsichtlich ihres Einflusses auf die Sensitivität, das Schaltverhalten und die Pharmakologie des MaxiK.

Sensitivität des MaxiK

Der MaxiK besitzt eine sog. "regulator of conductance for potassium"-Domäne mit einer Bindungsstelle für Calciumionen, die das Schaltverhalten des Kanals beeinflusst (Schreiber und Salkoff, 1997). Außerdem verfügt der C-Terminus der α -Untereinheit des MaxiK ebenso wie der N-Terminus der β -Untereinheit über einen hydrophoben Bereich, den sog. „ball“. Bei der Abwesenheit von Calciumionen wandert dieser ball in die Kanalpore und verschließt diese, was als „ball-and-chain“ Mechanismus bezeichnet wird (Wallner et al., 1999).

Die spannungsabhängige Aktivierung von Kaliumionenkanälen wird noch immer kontrovers diskutiert.

Die verantwortlichen Segmente S4 der α -Untereinheiten bewirken bei der Depolarisation der Membran eine Konformationsänderung des gesamten Kanalproteins, die zur Öffnung des Kanals führt. Mehrere Theorien werden hierfür diskutiert: Die S4-Segmente vollziehen dabei entweder eine Rotation (Bezanilla, 2005), eine Bewegung entlang der Achse der Helix in Richtung des extrazellulären Bereichs (Glauner et al., 1999) oder eine paddelartige Bewegung senkrecht zur Zellmembran (Jiang et al., 2003a). Mit der Intensität der Membrandepolarisation steigt die Wahrscheinlichkeit der Kanalöffnung.

1.4. Zielsetzung

Der Prozess der Zellaktivierung durch LPS ist ein intensiv beforschter Vorgang, welcher trotz zahlreicher Erkenntnisse in den letzten Jahren noch viele Fragen aufwirft. Sepsis und septischer Schock werden jedoch nur durch die detaillierte Aufklärung der Vorgänge bei der Immunantwort auf Virulenzfaktoren zufriedenstellend und möglichst frei von Nebenwirkungen behandelt bzw. verhindert werden können.

Nach den bisherigen Erkenntnissen über die Bedeutung des Kaliumionenkanals MaxiK bei der Aktivierung von Makrophagen ist ein pharmakologischer Eingriff in diesem Abschnitt der Zellaktivierung ein aussichtsreicher Ansatz zur Therapie der Sepsis. In Vorgängerarbeiten wurde erkannt, dass der MaxiK durch IL-1 und Virulenzfaktoren wie LPS, Peptidoglycan und Lipoteichonsäure aktiviert wird und dass seine Blockade die Zellaktivierung durch diese Substanzen abschwächt (Blunck, 1999; Scheel, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Fragestellungen behandelt (Abbildung 8):

1. **Über welchen Mechanismus wird der Ionenkanal aktiviert, reagiert der MaxiK auf direkten Kontakt mit den Virulenzfaktoren oder wird er über intrazelluläre bzw. membranassoziierte Signalwege aktiviert?** Die bisherigen Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, dass der MaxiK indirekt durch die verschiedenen Virulenzfaktoren und IL-1 aktiviert wird.
2. **Wie wirkt sich die Blockade des MaxiK auf die molekularen Mechanismen der Zellaktivierung aus, welche Elemente der Aktivierung werden beeinflusst?** Die bisherigen Erkenntnisse legen die Hypothese nahe, dass die Blockade des MaxiK erheblichen Einfluss auf praetranskriptionelle Schritte der Zellaktivierung ausübt. Demzufolge wurde eine Verringerung der LPS-induzierten MAP-Kinasen-Phosphorylierung bzw. der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B erwartet.

Mit Hilfe quantitativer RT-PCR, Gelretentionsanalyse und Western-Blot wurde der erste Fragenkomplex beantwortet. Hier wurden die Auswirkungen der Kanalblockade auf Ebene der Transkription und der Signaltransduktion untersucht.

Die zweite Fragestellung wurde mittels Patch-Clamp Technik und konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie bearbeitet. Es sollte geklärt werden, wie insbesondere der immunstimulatorisch hoch wirksame Virulenzfaktor LPS den Kanal aktiviert und ob Proteine des LPS-Rezeptorkomplexes mit dem MaxiK interagieren.

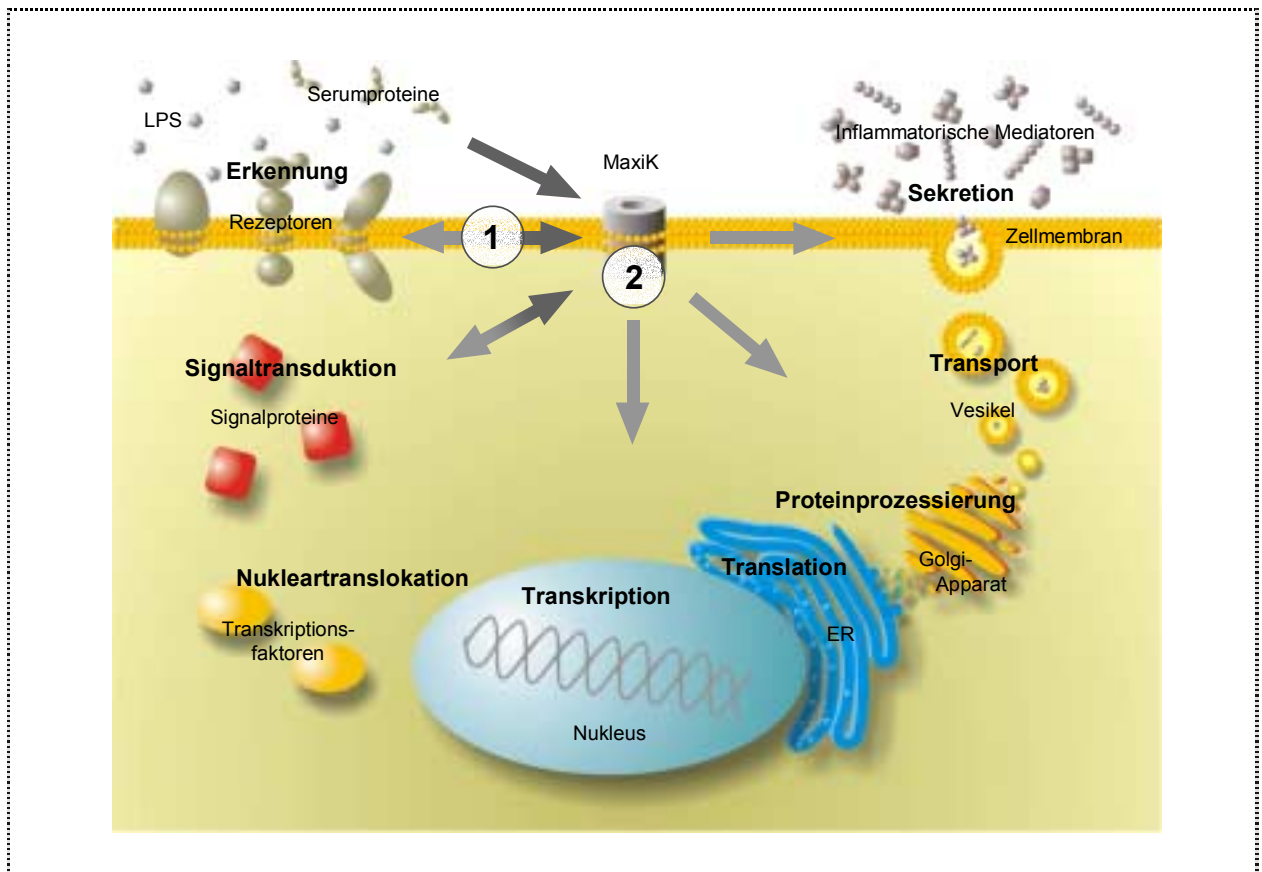


Abbildung 8: Bisher unbekannt Details über die Rolle des MaxiK bei der LPS-induzierten Aktivierung humaner Makrophagen. (1, dunkle Pfeile) Mögliche Mechanismen der Kanalaktivierung durch LPS, (2, helle Pfeile) Mögliche Einflussnahmen der Kanalblockade auf den Prozess der Zellaktivierung. ER endoplasmatisches Reticulum.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Reagenzien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Reagenzien von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.1.1. Seren

Fötales Kälberserum („fetal calv serum“, FCS, Linaris, Bettingen am Main) mit einem Endotoxingehalt von weniger als 10 pg/ml wurde für 30 min bei 56 °C inaktiviert, zu je 50 ml aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Humanes Serum gesunder Spender mit der Blutgruppe AB wurde von Dr. Martin Ernst (Forschungszentrum Borstel) zur Verfügung gestellt, 30 min bei 56 °C inaktiviert, zu je 10 ml aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.1.2. Antikörper und Markerproteine

Antikörper	Hersteller	Verwendung
Kaninchen-anti-human p44/42 MAP-Kinase	Cell Signaling Technology, USA	Western-Blot
Kaninchen-anti-human Phospho-p44/42 MAP-Kin.	Cell Signaling Technology	Western-Blot
Kaninchen-anti-human Phospho-p38 MAP-Kinase	Cell Signaling Technology	Western-Blot
Kaninchen-anti-human MaxiK α -Untereinheit	Alomone Labs, Israel	Western-Blot
Kaninchen-anti-human green fluorescent protein	BD Biosciences, Heidelberg	Western-Blot
Ziege-anti-Kaninchen IgG HRP-Konjugat	Jackson Immuno Research, UK	Western-Blot
Ziege-anti-human I κ B α	Santa Cruz, USA	Western-Blot
Maus-anti-human IL-1 Rezeptor	BD Biosciences	Durchflusszyt.
Maus-anti-human CD14 (biG14)	Biometec, Greifswald	Stimulation
Maus-anti-human TLR4 (HTA125)	Imgenex, USA	CLSM
Ziege-Anti-Maus IgG Alexa Fluor647	Molecular Probes, Karlsruhe	CLSM
Maus-anti-human Golgin 97	Molecular Probes	CLSM
Choleratoxin Untereinheit B Alexa Fluor647	Molecular Probes	CLSM
Anti-human TNF α (Klon 6b)	Intex Ag, Schweiz	ELISA
Anti-human TNF α HRP-Konjugat	Intex AG	ELISA
Maus-anti-human IL-8	Biosource, USA	ELISA
Anti-Maus Streptavidin HRP-Konjugat	Biosource	ELISA
Anti-human NF κ B p50	Santa Cruz	EMSA
Anti-human NF κ B p65	Santa Cruz	EMSA

2.1.3. Blocker und Stimuli

Re LPS aus Bakterien der Spezies *Escherichia coli*, Stamm F515, wurde nach der Phenol-Chloroform-Petrolether Methode (Galanos et al., 1969) extrahiert und in die Triethylammonium-Salzform überführt. S-Form LPS aus Bakterien der Spezies *Escherichia coli*, Stamm K235, wurde nach der Phenol-Wasser Methode (McIntire et al., 1967) extrahiert. Die chemische Struktur der LPS wurde massenspektrometrisch verifiziert und auf Heterogenität bezüglich des Phosphatgehaltes, der Fettsäurezusammensetzung und des Zuckergehaltes untersucht. Die Proben lagen lyophilisiert vor.

Ausschlaggebend für die Wahl der in dieser Arbeit verwendeten LPS war deren immunstimulatorische Wirkung und deren chemische Struktur. Als Wildtyp-LPS dient das S-Form LPS als Stimulus, wie er mit gewissen Variationen in der Struktur und Länge des Polysaccharids in der natürlichen Situation einer Infektion vorliegt. Das Re LPS verfügt über eine homogene, klar definierte Zuckerstruktur. Bei Stimulationsexperimenten an humanen Makrophagen wurde festgestellt, dass sich das Ausmaß der Zellaktivierung durch die verwendeten LPS bei gleichen Konzentrationen in der gleichen Größenordnung bewegte.

Rekombinantes humanes TNF α wurde von PeproTech Inc. (USA) erworben.

IL-1 wurde von R&D Systems (Wiesbaden) bezogen. Um eine Verunreinigung des IL-1 mit LPS auszuschließen, wurde in Stimulationsexperimenten an humanen *in vitro* aus Monozyten differenzierten Makrophagen die Reinheit des IL-1 überprüft. Dazu wurden LPS und IL-1 für jeweils 10 min in 10 μ g/ml Polymyxin B (PMB, Sigma, Deisenhofen), einem polykationischen Antibiotikum, das LPS bindet und inaktiviert, vorinkubiert und anschließend die Zellen mit den Gemischen stimuliert. Die durch 3 ng/ml IL-1-induzierte TNF α -Produktion der Zellen wurde durch PMB nicht verringert, wohingegen die durch 3 ng/ml LPS induzierte TNF α -Ausschüttung der Makrophagen komplett unterbunden wurde. Eine Hitzeinaktivierung (15 min, 95 °C) des IL-1, 10 min vor der Zugabe, verhinderte die TNF α -Ausschüttung der Makrophagen, während eine Hitzebehandlung des LPS die Zellaktivierung nicht inhibierte. Eine LPS-Verunreinigung des IL-1 kann daher ausgeschlossen werden.

Der spezifische MaxiK-Blocker Paxilline wurde von Alomone Labs (Israel) bezogen.

Rekombinantes humanes LBP wurde freundlicherweise von der Firma Xoma Corp. (Berkeley, USA) zur Verfügung gestellt.

2.2. Methoden

Die Inkubationen sowie die Kultivierung der Zellen im CO₂-Brutschrank erfolgten bei 37 °C und 5% Kohlendioxidbegasung. Die Zusammensetzungen der Puffer, Lösungen, usw. werden der Übersichtlichkeit halber am Ende des jeweiligen Absatzes angegeben.

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Humane Makrophagen

Humane mononukleäre Zellen (MNZ) wurden aus dem Blut gesunder Spender isoliert und die Monozyten *in vitro* zu Makrophagen ausdifferenziert. Für die Isolierung wurde Spenderblut (20 IE/ml Heparin) im Verhältnis 1:2 v/v in HBSS („Hank’s balanced salt solution“) verdünnt und je 10 ml Ficoll Dichtegradientenlösung (Biochrom KG) in Zentrifugengläsern (Duranglas, Schott, Mainz) mit 40 ml verdünntem Blut überschichtet. Zur Auftrennung im Dichtegradienten wurde dann bei Raumtemperatur mit einem Schwenkrotor zentrifugiert (35 min, 600 g, Varifuge K, Heraeus, Bremen). Die MNZ in der Interphase wurden abgenommen und in 50 ml Versuchsröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Diese wurden bis auf 50 ml mit HBSS aufgefüllt, leicht vermischt, bei Raumtemperatur zentrifugiert (10 min, 350 g) und der Überstand abgenommen. Dieser Reinigungsvorgang wurde zweimal mit HBSS und einmal mit Medium wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl und Viabilität der Zellen erfolgte lichtmikroskopisch nach Färbung mit 0,4% Trypanblau Lösung (Merck, Darmstadt) in einer Zählkammer (Kleinstquadrante 0,0025 mm², Tiefe 0,1 mm, Neubauer, Hofheim). Für die Ausdifferenzierung der Monozyten zu Makrophagen wurden Teflonbeutel (American Fluoroseal Corporation, USA) mit Medium gespült, maximal 15x10⁷ isolierte MNZ pro Beutel und 40 ml Medium eingefüllt und „macrophage-colony stimulating factor“ (R&D Systems, Wiesbaden) zu einer Endkonzentration von 2 ng/ml zugegeben. Dann wurden die MNZ zur Ausdifferenzierung in Makrophagen für sieben Tage im CO₂-Brutschrank inkubiert. Zur Ernte der Makrophagen wurden die Teflonbeutel 2 h auf Eis abgekühlt und anschließend die Zellsuspension entnommen, in Zentrifugengläser überführt und zentrifugiert (4 °C, 10 min, 400 g). Die Überstände wurden abgenommen, die Zellen in Medium resuspendiert, und die Makrophagen gezählt. Anschließend wurden die Zellen für den Versuch in 96-Kammer-Flachboden-Platten (Greiner, Solingen) ausgesät.

Medium

RPMI NaHCO₃ (Biochrom KG, Berlin), 100 U/ml Penicillin (Biochrom KG), 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom KG), 200 mM Glutamin (Biochrom KG), 4% v/v humanes Serum der Blutgruppe AB

HBSS

10% v/v HBSS (Biochrom KG), 0,35% v/v NaHCO₃ (Biochrom KG)

2.2.1.2. Alveolarmakrophagen der Ratte

Alveolarmakrophagen männlicher Ratten (*Rattus norvegicus*, Charles River Laboratories, USA) wurden nach dem Prinzip der bronchoalveolären Lavage (Wu et al., 2004b) gewonnen und von Dr. Cordula Stamme (Laborgruppe Zelluläre Pneumologie, Forschungszentrum Borstel) zur Verfügung gestellt. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Versuchsröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) auf Eis transportiert und sofort zur Stimulation in 96-Kammer-Flachboden-Platten (Greiner, Solingen) ausgesät.

Medium

RPMI NaHCO₃ (Biochrom KG, Berlin), 100 U/ml Penicillin (Biochrom KG), 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom KG), 200 mM Glutamin (Biochrom KG), 0,2% v/v FCS (Linaris, Bettingen am Main)

2.2.1.3. HEK293 Zellen

HEK293 ist eine humane embryonale Nierenepithelzelllinie („human embryonic kidney“, ATCC: CRL-1573). Diese Zellen exprimieren zwar endogen den IL-1-Rezeptor aber weder TLR4, MD2, CD14, noch MaxiK und zeigen somit keine LPS-Responsivität.

Stabile Transfektionen

Die Bedeutung der verschiedenen Proteine für die Zellaktivierung durch LPS wurde an verschiedenen HEK293-Transfektanten untersucht (Tabelle 2). Eukaryotische Expressionsvektoren für humanes TLR4 und MD2 wurden von Prof. Douglas Golenbock (University of Massachusetts, USA) und der Vektor für die humane α - und β_1 -Untereinheit des MaxiK von Dr. Martin Wallner (University of California, USA) zur Verfügung gestellt. Die Transfektionen wurden mit dem Transfektionsreagenz Polyfect (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Transfizierte Zellen wurden je nach Vektor mit 0,4 µg/ml Geneticin (Gibco BRL, Karlsruhe) oder 500 U/ml Hygromycin (PAA Laboratories, Cölbe) selektioniert und durch Verdünnung in Einzelzellsuspensionen subkloniert. Von jeder Zelllinie wurden drei unabhängige Klone hergestellt, die Expression der heterologen Proteine durchflusszytometrisch analysiert und die Responsivität der Klone auf die Stimuli LPS und IL-1 durch Messung der IL-8-Ausschüttung überprüft. Der MaxiK wurde aus der β_1 -Untereinheit sowie einem Fusionsprotein aus der α -Untereinheit (hSlo) des humanen MaxiK und dem grünfluoreszenten Protein („green fluorescent protein“, GFP) transfiziert. Das GFP lag an der α -Untereinheit intrazellulär am C-Terminus gebunden vor.

Tabelle 2: Die verwendeten stabilen HEK293 Transfektanten

Transfektante	Klon	Vektor	Resistenz	Gen	Protein
HEK293	-	-	-	-	-
HEK293-MaxiK _{GFP}	2E8	pcDNA3	Geneticin	hSlo _{GFP}	MaxiK _{GFP}
HEK293-TLR4	BB12	pcDNA3	Geneticin	hToll	TLR4
HEK293-MaxiK _{GFP} -TLR4/MD2	3D2	pcDNA3	Geneticin	hSlo _{GFP}	MaxiK _{GFP}
		pcDNA3	Geneticin	β ₁ -Untereinheit	TLR4
		pEFBOS	-	huMD2	MD2
		pCEP4	Hygromycin		

Zur Stammerhaltung wurden die HEK293 Zellen alle 3 bis 4 Tage passagiert. Medium, PBS („phosphate buffered saline“, Biochrom KG, Berlin) und Trypsin (10% v/v in PBS) wurden vor dem Passagieren im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das Medium wurde aus den Kulturflaschen abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gespült. Dann wurde zum Verdau der Adhäsionsproteine Trypsin zugegeben und die Zellen für ca. 3 min im CO₂-Brutschrank inkubiert. Nachdem die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst waren, wurde zur Inaktivierung des Trypsins serumhaltiges Medium zugegeben, und 10 - 30% der Zellen wurden in neue Flaschen mit frischem Medium übertragen.

Die stabil transfizierten Zellen wurden mit Hilfe eines MOFLO Zellsortierers (BD Biosciences, Heidelberg) von Dr. Kathleen Marienfeld (Forschungszentrum Borstel) sortiert. Dabei wurde als Selektionskriterium die relative Fluoreszenz der Zellen, die entweder durch das exprimierte GFP im MaxiK-Fusionsprotein oder durch Färbung der anzureichernden Proteine mit entsprechenden Antikörpern verursacht wurde, herangezogen. Die angereicherten Zellen wurden zur weiteren Kultur ausgesät und wiederholt auf hohe Fluoreszenz sortiert. Auf diese Weise wurden hoch exprimierende Transfektanten angereichert.

Medium

Dulbecco's MEM (Biochrom KG, Berlin), 10% v/v FCS (Linaris, Bettingen am Main), 100 U/ml Penicillin (Biochrom KG), 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom KG), 200 mM Glutamin (Biochrom KG)

Transiente Transfektionen

Die Assoziation der TLR4-Proteine zu Homodimeren und die Lokalisation von LBP und TLR4 wurden an transient transfizierten HEK293 Zellen untersucht (Tabelle 3). Dies geschah unter Verwendung von Fusionsproteinen des TLR4 mit CFP („cyan fluorescent protein“) oder YFP („yellow fluorescent protein“). CFP und YFP sind Varianten des GFP, die als Fluoreszenz-

Resonanz-Energie-Transfer-Paar fungieren. Die Vektoren wurden freundlicherweise von Prof. Terje Espevik (Trondheim, Norwegen) zur Verfügung gestellt. Für die transienten Transfektionen mit den TLR4_{CFP} und TLR4_{YFP} Expressionsvektoren wurden HEK293 Zellen am Tag vor der Transfektion zu 5×10^5 Zellen / 500 μ l Medium je Kammer in 8-Kammer-Gefäße (Lab Tek II, Boden mit Deckgläschen, Nunc, Wiesbaden) ausgesät und über Nacht im CO₂-Brutschrank inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 150 μ l serumfreies Medium mit 0,2 μ g Plasmid und 1 μ l Metafecten (Biontex, München) pro Kammer für 20 min bei Raumtemperatur in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) vorinkubiert. Danach wurden 250 μ l serumhaltiges Medium pro Kammer zu den Plasmidsuspensionen gegeben. Das Medium in den 8-Kammer-Gefäßen wurde gegen 250 μ l frisches Medium gewechselt, die Plasmidsuspension zugegeben, die Zellen über Nacht im CO₂-Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop untersucht.

Tabelle 3: Die verwendeten transienten HEK293 Transfektanten

Zelllinie	Vektor	Gen	Protein
HEK293-TLR4/MD2	pcDNA3	hToll	TLR4 (stabil)
	pEFBOS	huMD2	MD2
HEK293-TLR4 _{CFP} -TLR4 _{YFP}	pcDNA3	hToll _{CFP}	TLR4-CFP
	pcDNA3	hToll _{YFP}	TLR4-YFP
	pEFBOS	huMD2	MD2

2.2.2. Stimulationen

Zur Untersuchung der Zellaktivierung wurden 5×10^4 HEK293 Zellen, 10^5 Makrophagen und 10^6 Monozyten / Kammer und 200 μ l Medium in 96-Kammer-Flachboden-Platten (Greiner, Solingen) ausgesät. Die HEK293 Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert, die Immunzellen sofort stimuliert. Zur Stimulation erfolgte die 1. Zugabe, Blocker (Art und Konzentration s. Ergebnisse) bzw. Medium, zu je 20 μ l, und nach 10 min Inkubation im CO₂-Brutschrank die 2. Zugabe, Stimulus (Art und Konzentration s. Ergebnisse) bzw. Medium, zu je 20 μ l. Bei Experimenten mit dem MaxiK-Blocker Paxilline wurden wegen dessen Lichtempfindlichkeit die Platten während dessen Zugabe und der Inkubation abgedunkelt. Die Inkubation erfolgte im CO₂-Brutschrank.

Die Inkubationszeiten waren entsprechend der weiteren Behandlung der Zellen unterschiedlich:

- Zur Bestimmung der MAP-Kinasen mittels Western-Blot (s. 2.2.5) wurde die Inkubation durch Zugabe von Lysepuffer zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 15 und 60 min

(s. Ergebnisse) beendet. Der Proteingehalt der Ganz-Zell-Lysate wurde mit Bradford-Reagenz bestimmt (Bradford, 1976) und die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

Lysepuffer

2% w/v SDS (Bio-Rad, München), 50 mM DTT (Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim), 62,5 mM Tris, 10% v/v Glycerol, pH 6,8, frisch angesetzt

- Zur Quantifizierung des freigesetzten TNF α mittels „enzyme-linked immunosorbent assay“ (s. 2.2.7) wurden die Platten nach 5 h, für den IL-8 ELISA nach 24 h zentrifugiert (300 g, 10 min, Varifuge K, Heraeus) und die zellfreien Überstände abgenommen. Diese wurden bei -20 °C aufbewahrt.
- Für die Bestimmung der I κ B α -Degradation mittels Western-Blot (s. 2.2.5) wurde die Stimulation nach jeweils 0, 20 und 40 min und zur Messung der NF κ B Translokation mittels Gelretentionsanalyse (s. 2.2.6) nach 60 min beendet. Die Proben wurden sofort zur Herstellung zytoplasmatischer und nuklearer Extrakte (s. 2.2.3) weiterverarbeitet.
- Zur Untersuchung der Transkription von Zytokin-DNA mittels quantitativer Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (s. 2.2.8) wurde die Stimulation nach 5 h beendet. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit eiskalter PBS (Biochrom KG, Berlin) bei 4 °C gewaschen, in 35 μ l Puffer RLN (QNeasy, Qiagen, Hilden) pro Kammer aufgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zelllysate zentrifugiert (300 g, 2 min, Minispin Zentrifuge, Eppendorf, Hamburg), die Überstände wurden abgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt.

2.2.3. Herstellung zytoplasmatischer und nuklearer Extrakte

Zur Untersuchung der Proteine des NF κ B-Signalweges wurden zytoplasmatische und nukleare Extrakte hergestellt.

Um proteolytische Reaktionen zu verringern, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Für die Zentrifugationen wurde die Biofuge 17RS (Heraeus, Bremen) verwendet.

Die Zellen wurden einmal mit eiskalter PBS (Biochrom KG, Berlin) und dann in eiskalter PBS (2% v/v FCS) gespült. Anschließend wurden die Zellen durch Schaben mit der Pipettenspitze von den Kammerböden gelöst, die Suspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und zentrifugiert (4 °C, 5 min, 1400 g). Daraufhin wurden die Überstände abgesaugt, die Zellen in je 400 μ l Extraktionspuffer I durch mehrfaches Pipettieren resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nun wurden 25 μ l NP-40 zugegeben, gründlich gemischt, um die Zellen zu lysieren, und zentrifugiert (4 °C, 5 min,

2200 g). Die zytosolischen Extrakte (Überstände) wurden zu je 100 µl Aliquots in 500 µl Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C aufbewahrt. Die Nuklei (Pellets) wurden in 30 µl Extraktionspuffer II resuspendiert, 15 min zur Lyse inkubiert und dann zentrifugiert (4 °C, 5 min, 8000 g). Die Überstände (nukleare Extrakte) wurden in 500 µl Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

Der Proteingehalt der Extrakte wurde bestimmt (Bradford, 1976) und 12 - 15 µg Protein/Probe für die Analyse der zytosolischen und 2 - 5 µg Protein/Probe für die Analyse der nuklearen Extrakte eingesetzt.

Extraktionspuffer I

10 mM Tris, 0,5 mM DTT (Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim), 5 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF, 10 mM KCl, 0,1% v/v Protease Inhibitor (Complete, Roche, Mannheim), 1% v/v EGTA, 10 mM β-Glycerol-Phosphat, 10% w/v Saccharose

Extraktionspuffer II

4 mM Tris, 0,1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM PMSF, 64,5 mM KCl, 0,02% v/v Protease Inhibitor, 0,04% v/v µl EGTA, 1 mM β-Glycerol-Phosphat, 5% v/v Glycerol

2.2.4. Herstellung von Zytoplasma- und Membranfraktionen

Zur Untersuchung der MaxiK-Expression in den transfizierten HEK293 Zellen wurden subzelluläre Fraktionen hergestellt. Die Aufbereitung der Fraktionen wurde mit dem „subcellular proteome extraction kit“ (Calbiochem, USA) durchgeführt. Dabei wurde das Protokoll für „Zellen in Suspension“ verwendet. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4 °C, 300 g, 10 min, Biofuge 17RS, Heraeus, Bremen), in Waschpuffer resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt, dann wurden die Zellen bei 4 °C für 10 min in Extraktionspuffer I auf dem Schüttler PSU 2T plus (Rudolf Franke Labortechnik, Hamburg) inkubiert, um die zytoplasmatische Fraktion aus den Zellen zu lösen, und anschließend die restlichen Zellbestandteile abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 100 g). Die Überstände (Zytoplasmafraktion) wurden abgenommen, zu je 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Das Pellet wurde in Extraktionspuffer II resuspendiert und bei 4 °C für 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurde zentrifugiert (4 °C, 5000 g, 10 min), der Überstand (Membranfraktion) abgenommen und in 0,5 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt) bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.5. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) und Western-Blot

PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Elektrophorese. Hierfür wurden der Generator PowerPac 200 (Bio-Rad, München) und die Elektrophorese-Apparatur MiniProtean 3 Cell (Bio-Rad) verwendet. Die Ganz-Zell-Lysate für die Bestimmung der MAP-Kinasen und die zytoplasmatischen Lysate zur Messung der I κ B α -Degradation wurden nach der Lyse einmal für 10 min im Wasserbad gekocht und vor der PAGE in QIAshredder-Röhrchen (Qiagen, Hilden) zentrifugiert (6700 g, 4 min, Tischzentrifuge Minispin, Eppendorf, Hamburg). Den zytoplasmatischen Lysaten wurde zu 10% v/v Glycerol und zu 2% w/v SDS (Bio-Rad) hinzugefügt. Die Gele wurden mit 0,5 μ l MagicMark (Invitrogen, Karlsruhe) und 20 μ l Probe bei 10 Taschen, bzw. 12 μ l Probe bei 15 Taschen mit je 12 - 15 μ g/ml Protein beladen. Die Elektrophorese wurde bei 200 V durchgeführt.

Elektrophoresepuffer

0,3% w/v Tris, 14,5% w/v Glycin (Serva, Heidelberg), 0,1% w/v SDS (Bio-Rad, München), pH 8,8, bei -4 °C aufbewahrt

Trenngelpuffer

1,5 M Tris, pH 8,8, bei 4 °C aufbewahrt

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris, pH 6,8, bei 4 °C aufbewahrt

Trenngel (12%)

4,1 ml Aqua dest., 2,5 ml Trenngelpuffer, 3 ml Acrylamid (Serva), 100 μ l 10% w/v SDS, 5 μ l TEMED (Serva), 50 μ l 10% w/v APS

Sammelgel (5%)

3 ml Aqua dest., 1,25 ml Sammelgelpuffer, 0,6 ml Acrylamid (Serva), 50 μ l 10% w/v SDS, 5 μ l TEMED, 25 μ l 10% w/v APS

Western-Blot

Die Übertragung der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Western-Blot. Nitrozellulosemembranen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), Filterpapier (Bio-Rad, München) und die Schaumstoffblätter der Blot-Apparatur Mini Protean 3 Cell (Bio-Rad) wurden in Blotpuffer für 10 min eingeweicht und das Gel entsprechend den Herstellerangaben in die Apparatur eingelegt. Der Blot wurde bei 100 V für 1 h mit dem Generator PowerPac 200 durchgeführt. Sämtliche Inkubationen und Reinigungsschritte der Detektion wurden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler PSU 2T plus (Rudolf Franke Labortechnik, Hamburg) bei minimaler Geschwindigkeit durchgeführt. Zunächst wurden die Membranen in 20 ml Blockierpuffer für 1 h inkubiert. Dann erfolgte über Nacht (ca. 16 h) die

Inkubation mit dem Primärantikörper (Art und Konzentration s. Ergebnisse) in 20 ml Blockierpuffer. Anschließend wurde dreimal für 10 - 15 min in 20 ml Waschpuffer gewaschen, mit dem Detektionsantikörper Ziege-anti-Kaninchen IgG Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“, HRP)-Konjugat (80 ng/ml) in 20 ml Waschpuffer für 2 h inkubiert und nochmals wie zuvor gewaschen. Für die Chemilumineszenzdetektion wurden die Membranen bei Raumtemperatur für 5 min in ECL Plus-Reagenz (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Anweisung des Herstellers inkubiert. Die Belichtung und Entwicklung der Filme (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde mit dem Curix 242S (AGFA-Gevaert, Köln) in der Röntgenabteilung der medizinischen Klinik am FZB durchgeführt.

Blotpuffer

0,3% w/v Tris, 1,44% v/v Glycin (Serva, Heidelberg), 20% v/v Methanol

Blockierpuffer

5% w/v BSA, 0,242% w/v Tris, 0,8% w/v NaCl (Riedel-de Haën, Seelze), 0,1% v/v Tween20

Waschpuffer

0,242% w/v Tris, 0,8% w/v NaCl, 0,1% v/v Tween20

Densitometrie

Die densitometrische Analyse wurde mit dem Programm Optimas 6.5 (Media Cybernetics, Gleichen) am PC vollzogen. Dabei wurde der Schwellwert für die Detektion der Banden so gesetzt, dass die schwächste Bande mit dem kleinstmöglichen Wert erfasst wurde. Die Intensitäten der Banden wurden anhand der Negativkontrolle relativiert.

2.2.6. Gelretentionsanalyse (EMSA)

Mit Hilfe der Gelretentionsanalyse („electrophoretic mobility shift assay“, EMSA) ist es möglich, DNA-bindende Moleküle in verschiedenen Kompartimenten der Zelle zu quantifizieren. Hierfür werden radioaktiv markierte Oligonukleotide mit spezifischer Sequenz für bestimmte Transkriptionsfaktoren zu den Proben gegeben und anschließend die entstandenen Protein-Nukleotid-Komplexe elektrophoretisch isoliert. EMSA wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um die Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB in den Kern stimulierter Zellen zu untersuchen.

Für die Markierung wurden 2 µl NFκB-spezifische Oligonukleotide (5' - AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C - 3', Santa Cruz, USA) durch 1 µl T4-Polynukleotidkinase (Roche, Mannheim) unter Zugabe von 11 µl Aqua dest. und 2 µl Kinasepuffer (Roche) bei 37 °C für 60 min mit 4 µl γ ³²P-ATP (Hartmann, Braunschweig) markiert.

Die Verarbeitung der nuklearen Extrakte erfolgte auf Eis. Es wurden max. 6 µl Probe mit 2 - 5 µg/ml Protein mit 7 µl Mastermix für 15 min vorinkubiert. Nun wurden 2 µl der markierten Oligonukleotide zugegeben und für weitere 20 min inkubiert. Die markierten Nukleotid-Proteinkomplexe wurden durch Elektrophorese in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel (150 V, 2 h) von den ungebundenen Oligonukleotiden getrennt.

Zur Kontrolle der Spezifität der verwendeten Oligonukleotide wurden NFκB-positive Proben mit 1 µl unmarkierten NFκB-konsensus Oligonukleotiden (20 µg/ml, Santa Cruz), 10 µl anti-human p65 Antikörper (2 mg/ml, Santa Cruz), 10 µl anti-human p50 Antikörper (2 mg/ml, Santa Cruz) und 5 µl AP-1 consensus Oligonukleotiden (20 µg/ml, Santa Cruz) im Mastermix vorinkubiert und auf einem separaten Gel aufgetrennt.

Die densitometrische Analyse wurde wie für den Western-Blot beschrieben durchgeführt.

Mastermix

3,3 mM MgCl₂, 1,7 nM DTT (Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim), 6,6% v/v Ficoll (Biochrom KG, Berlin), 0,05% v/v NP-40, 50 µg/ml poly (dI/dC) (Santa Cruz), 50 µg/ml poly (dA/dT) (Santa Cruz), 40 mM KCl

Polyacrylamidgel (30%)

31 ml Aqua dest., 2 ml 10 x TBE (Roth, Karlsruhe), 7 ml Acrylamid (Serva, Heidelberg), 20 µl TEMED (Serva), 200 µl APS

2.2.7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Produktion von Zytokinen durch humane Makrophagen und HEK293 Zellen wurde mittels „Sandwich-ELISA“ bestimmt. Bei diesem Verfahren wird ein Zielprotein an einem an fester Phase immobilisierten Fängerantikörper gebunden und durch einen oder zwei Detektionsantikörper nachgewiesen. Diese Art des Verfahrens ermöglicht es, aus einem Proteingemisch (z.B. einem Zellkulturüberstand) spezifisch das gewünschte Zielprotein zu erfassen und gegenüber einem Standard zu quantifizieren.

TNFα ELISA

Die Quantifizierung des von den Zellen im Laufe der Stimulation freigesetzten TNFα wurde durch eine Analyse der Zellkulturüberstände mittels eines „one step-sandwich-ELISA“ für humanes TNFα (Intex AG, Schweiz) durchgeführt. Hierfür wurden 96-Kammer-Flachboden-Platten mit einem anti-human TNFα Antikörper (5 µg/ml) beschichtet. Um eventuell frei gebliebene Stellen auf der Oberfläche der Kammern mit bovinem Serumalbumin (BSA) zu blockieren, wurden die Platten bis zum Einsatz bei 4 °C in Blockierpuffer gelagert.

Für den Test wurde der Blockierpuffer durch Ausschlagen der Platten entfernt, Proben und Standard mit Verdünnungspuffer geeignet verdünnt und zu je 100 µl in die Kammern

gegeben. Zur Detektion wurde nun anti-human TNF α HRP-Konjugat in Verdünnungspuffer zu je 25 μ l in die Kammern gegeben (Endkonzentration 80 ng/ml) und die Platten ca. 20 h bei 4 °C auf dem Schüttler (PSU 2T plus, Rudolf Franke Labortechnik, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit Aqua dest. gewaschen, die Farbreaktion durch Zugabe von 100 μ l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)-Lösung gestartet und nach 5 bis 15 min durch Zugabe von 50 μ l 1 N Schwefelsäure gestoppt. Die Menge des während der Farbreaktion entstandenen Produkts ist direkt von der Menge an Zytokin im Überstand der Proben abhängig. Die Farbtintensität wurde mit einem „ELISA-Reader“ (Rainbow, Tecan, Crailsheim) photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt und der TNF α -Gehalt anhand der Standardkurve quantifiziert. Jeder Wert wurde in Quadruplikaten gemessen. Aus diesen wurde der Mittelwert errechnet und die Standardabweichung (SD) bestimmt.

Blockierpuffer

20 mM Tris, 10 g/l BSA, 0,25 g/l Thimerosal, pH 7,5

Verdünnungspuffer

1 M Tris, 10% v/v FCS (Linaris, Bettingen am Main), 0,5 g/l Thimerosal, pH 9,0

TMB Lösung

10 mM TMB (Fluka, Neu-Ulm), 100 ml/l Aceton, 900 ml/l Ethanol, 80 mM H₂O₂

IL-8 ELISA

Die Messung des von den Zellen im Laufe der Stimulation freigesetzten IL-8 wurde durch eine Analyse der Überstände mittels eines „Sandwich-ELISA“ (IL-8 Cytoset, Biosource, USA) durchgeführt. Hierfür wurden 96-Kammer-Flachboden-Platten mit Maus-anti-human IL-8 Antikörper (50 ng/ml) beschichtet. Um zu blockieren, wurden die Platten bei Raumtemperatur für 2 h in Blockierpuffer geschüttelt.

Für den Test wurde der Blockierpuffer entfernt, die Platten dreimal mit Waschpuffer gespült, Proben und Standard mit Standardpuffer geeignet verdünnt und je 100 μ l in eine Kammer gegeben. Maus-anti-human IL-8 Antikörper wurde zugegeben und die Platten 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (PSU 2T plus, Rudolf Franke Labortechnik, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal gewaschen, 25 μ l Anti-Maus Streptavidin HRP-Konjugat zugegeben (Endkonzentration 80 ng/ml) und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Platten dreimal gewaschen, die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l TMB Lösung gestartet und nach 20 min durch Zugabe von 50 μ l 1 N Schwefelsäure gestoppt. Messung und Auswertung der Proben erfolgten analog dem TNF α -ELISA.

Blockierpuffer

0,8% w/v NaCl (Riedel-de Haën, Seelze), 0,142% w/v Na₂HPO₄, 0,02% w/v KH₂PO₄, 0,02% w/v KCl, 1% w/v BSA, pH 7,4

Standardpuffer

0,8% w/v NaCl, 0,157% w/v Na₂HPO₄, 0,02% w/v KH₂PO₄, 0,02% w/v KCl, 0,5% w/v BSA, 0,1% v/v Tween20, pH 7,4

Waschpuffer

0,9% w/v NaCl, 0,1% v/v Tween20, pH 7,4

TMB Lösung

10 mM TMB (Fluka, Neu-Ulm), 100 ml/l Aceton, 900 ml/l Ethanol, 80 mM H₂O₂

2.2.8. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion („reverse transcriptase polymerase chain reaction“, RT-PCR) beruht auf dem PCR-Prinzip, wobei die RNA zuvor durch eine reverse Transkription in cDNA übersetzt wird.

RNA-Extraktion

Für die RNA-Isolierung aus humanen Makrophagen wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Dabei wurden Nitril-Arbeitshandschuhe getragen und Pipettenspitzen mit Filtereinsätzen (Biosphere, Sarstedt, Nümbrecht) benutzt. Für die Zentrifugationen wurde die Tischzentrifuge Minispin (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Nach dem Auftauen der Lysate (Herstellung s.2.2.2) wurden 600 µl Puffer RLT (mit 1% v/v Mercaptoethanol) zu den Proben gegeben, gut gemischt, die Proben in QIAshredder (Qiagen) pipettiert und zentrifugiert (7000 g, 2 min). Dem Zentrifugat wurden 430 µl Ethanol hinzugefügt, gemischt und daraus 700 µl in RNeasy Minisäulen gegeben. Diese wurden zentrifugiert (6000 g, 15 s) und das Zentrifugat verworfen. Nun wurden die verbleibenden 330 µl der Probe in die Säulen gegeben und ebenso behandelt. Danach wurden in einem Waschschrift 350 µl Puffer RW1 zugegeben, wie zuvor zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Zur Entfernung kontaminierender DNA wurde nun ein DNase-Verdau mit einem „RNase-Free DNase Set“ (Qiagen) durchgeführt. Hierfür wurden 10 µl DNase I mit 70 µl Puffer RDD gemischt, in die Säulen gegeben und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Säule einmal wie zuvor gewaschen. Danach wurden 500 µl Puffer RPE zugegeben, wie zuvor zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt (Zentrifugation 2 min), die Säule in ein neues Auffangröhrchen überführt und wiederum zentrifugiert (6000 g, 1 min), um das Silicagel zu trocknen. Die Säule wurde nun in ein Sammelröhrchen überführt, 30 µl RNase-freies Wasser auf das Silicagel gegeben, zentrifugiert (1 min, 6000 g), nochmals

20 µl RNase-freies Wasser zugegeben und wie zuvor zentrifugiert. Der RNA-Gehalt der Proben wurde bei 260 nm photometrisch mit einem Uvikon 942 (Kontron, Hamburg) bestimmt und die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C aufbewahrt.

Reverse Transkription

Mittels reverser Transkription kann die in Proben enthaltene mRNA in cDNA umgeschrieben und dann durch eine PCR analysiert werden.

Die Behandlung der Proben im Anschluss an die RNA-Extraktion wurde zur Unterbindung von Kontaminationen an einer PCR/UV Arbeitsbank (Coy Laboratories, USA) vollzogen. Dabei wurden Nitril-Arbeitshandschuhe getragen und Pipettenspitzen mit Filtereinsätzen (Biosphere, Sarstedt, Nümbrecht) verwendet.

Die Proben aus der RNA-Extraktion wurden auf 0,2 - 0,5 µg RNA / 11,5 µl mit RNase-freiem Wasser (Qiagen, Hilden) verdünnt. Nun wurde 1 µl Oligo(dT)-Primer (100 µg/ml, MWG, Ebersberg) zugegeben und bei 70 °C für 10 min im Heizblock inkubiert. Die Proben wurden kurz auf Eis abgekühlt, 7,5 µl Mastermix zugegeben und die reverse Transkription bei 42 °C für 52 min im Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Es wurde für jede Probe eine Kontrolle ohne Transkriptase durchgeführt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (15 sec, 6000g, Minispin, Eppendorf, Hamburg) und bei -20 °C aufbewahrt.

Mastermix

46% v/v 5 x First strand buffer (Invitrogen, Karlsruhe), 5 mM DTT (Boehringer-Mannheim, Mannheim), 6% v/v RNasin (Invitrogen), 1,2 mM dNTPs (Invitrogen), 12% v/v Superscript III RNase H-Reverse Transkriptase (Invitrogen), auf Eis angesetzt

PCR

Zur Analyse der Transkription MaxiK-kodierender Gene während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen wurden 0,5 µl cDNA-Probe mit 10,3 µl Mastermix auf Eis vermischt und 30 Zyklen zur Amplifikation der cDNA im Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Zur Kontrolle der eingesetzten cDNA-Mengen wurde β-Actin herangezogen.

MaxiK: 30 s bei 95 °C Denaturierung, 40 s bei 62 °C Anlagerung, 60 s bei 72 °C Amplifikation
β-Actin: 30 s bei 95 °C Denaturierung, 40 s bei 57 °C Anlagerung, 60 s bei 72 °C Amplifikation.

Tabelle 4: Primer für die MaxiK-PCR

humanes Gen	Sequenz (5'→3')	Produktlänge
human MaxiK α sense	GCT ACA GCA CCCC GCAGA CA	560 bp
human MaxiK α antisense	GGG GGA CTA CAG GGG AAA ACA GG	
human β -Actin sense	AGC GGG AAA TCG TGC GTG	309 bp
human β -Actin antisense	CAG GGT ACA TTG TTG TGC	

Den PCR-Produkten wurden 10 μ l entnommen, mit 1 μ l 10 x Auftragspuffer (Eppendorf, Hamburg) gemischt und in einem Agarosegel in einer Wide Mini Sub Cell GT (Bio-Rad, München) mit einem PP3000 Spannungs-Generator (Biometra, Göttingen) bei 100 V für 60 min aufgetrennt. Die DNA wurde durch eine Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht und das Gel mit einer Vario Cam (PCO Computer Optics GmbH, Kelheim) unter UV-Licht fotografiert.

Mastermix

74% v/v RNase-freies Wasser, 5% w/v $MgCl_2$, 12% v/v 10 x PCR-Puffer, 0,24 mM dNTPs, 6% v/v MaxiK-Primer (Tabelle 4), 1% v/v TAQ-Polymerase (Eppendorf, Hamburg), auf Eis angesetzt

Agarosegel (2%)

10% v/v 10 x TBE Puffer (Invitrogen, Karlsruhe), 90% v/v Aqua dest., 2% w/v Agarose (Invitrogen), 100 °C unter Rühren bis Agarose gelöst, 0,01% v/v 0,01 x Ethidiumbromidlg (Serva, Heidelberg)

Quantitative PCR

Durch eine quantitative PCR kann der RNA-Gehalt mehrerer Proben relativ zueinander quantifiziert werden. Die Analyse der Transkription Mediatoren-kodierender Gene wurde mittels quantitativer RT-PCR vollzogen. Hierfür wurden QuantiTect Gene Expression Assays (Qiagen) für die jeweilige Ziel-DNA (s. Tabelle 5) und das QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen) verwendet. Es wurden 10 μ l Master Mix und 2 μ l QuantiTect Assay Mix in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht) zusammengegeben, gut gemischt, das Gemisch in 0,1 ml Strip Tubes (Corbet Research, Australien) überführt und 1 μ l cDNA-Probe zugegeben. Danach wurde die Ziel-DNA im PCR Cycler RotorGene 2000 (Corbet Research, Australien) nach folgendem Programm amplifiziert: Die Proben wurden für 15 min auf 95 °C erhitzt, um die Hot Star Taq DNA Polymerase zu aktivieren. Anschließend wurden 40 - 45 Zyklen zur Amplifikation der cDNA durchgeführt (15 s bei 94 °C Denaturierung, 30 s bei 56 °C Anlagerung und Detektion der Fluoreszenz, 30 s bei 76 °C Amplifikation). Die Detektion des

Produktes erfolgte mittels sequenzspezifischer Sonden mit FAM-Markierung, die erst nach dem Einbau in die DNA-Doppelhelix fluoreszieren, durch Messung der Emission bei 510 nm.

Tabelle 5: Verwendete „Gene Expression Assays“ für die quantitative RT-PCR

humanes Gen	Produktnummer	Hersteller
TNF α	241033	Invitrogen (Karlsruhe)
IL-1 β	241053	Invitrogen
IL-6	241041	Invitrogen
IL-8	241043	Invitrogen
IL-10	241045	Invitrogen
β -Actin	241013	Invitrogen

Die cDNA aus der Stimulation mit der höchsten LPS-Konzentration wurde zu einer Standardreihe verdünnt (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000). Aus den Zyklenzahlen der Standardreihe wurde mittels linearer Regression eine Standardgerade erstellt. Die Zyklenzahlen der Proben wurden auf gleichen β -Actin Gehalt normiert und anhand der Standardgeraden aus der Verdünnungsreihe relativ zueinander quantifiziert, wobei der Wert des wirksamsten Stimulus auf 100% gesetzt wurde.

2.2.9. Durchflusszytometrie

Die Expression des IL-1 Rezeptors auf den HEK293-MaxiK_{GFP} Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie erfasst. Nach diesem Verfahren können einzelne Zellen (oder Partikel) in einem Flüssigkeitsstrom anhand optischer Eigenschaften unterschieden werden. Die Zellen müssen dazu in einer monodispersen Suspension vorliegen. Es können verschiedene Fluoreszenzemissionen der einzelnen Zellen sowie die von den Zellen verursachte Lichtstreuung und Lichtabsorption gemessen werden. Proteine können auf den Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und ihr Gehalt in den verschiedenen Proben durch Fluoreszenzmessung relativ quantifiziert werden. Die Größe der Zellen ist durch die Lichtabsorption, ihre Granularität durch die Lichtstreuung messbar. Neben diesen strukturellen können durch Fluorochromreaktionen auch biochemische und physiologische Parameter, wie z. B. die Änderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und das Membranpotential, erfasst werden.

Zur Auswertung der Proben wurde der FACS-Calibur (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet. Die Datenaufnahme erfolgte an einem Macintosh Rechner mit dem Programm

CELLQuest (BD Biosciences) und die Weiterverarbeitung am PC mit der Software WinMDI (Version 2.8#13, Joe Trotter, Scripps Institute).

Fluoreszenzmarkierung

Zur Färbung des IL-1 Rezeptors auf den HEK293 Zellen wurden je 5×10^5 Zellen in 5 ml Rundbodenröhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) überführt und in einem Waschschrift jeweils 3 ml PBS (Biochrom KG, Berlin) mit 1% v/v FCS (Linaris, Bettingen am Main) zugegeben und zentrifugiert (4 °C, 5 min, 300 g, Varifuge K, Heraeus, Bremen). Daraufhin wurden die Überstände abgesaugt, die Zellen mit 30 µl Maus-anti-human CD121a Antikörperlösung (50 µg/ml) in PBS aufgenommen, gründlich gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde wie zuvor gewaschen. Dann wurden die Überstände abgesaugt, die Zellen mit 4 µg/ml Ziege-Anti-Maus IgG Alexa Fluor647 Antikörper in 30 µl PBS aufgenommen, gründlich gemischt und 30 min abgedunkelt auf Eis inkubiert. Nun wurde wie zuvor gewaschen. Die Überstände wurden wiederum abgesaugt und die Zellen in 300 µl Messpuffer aufgenommen. Transport und Aufbewahrung der Proben erfolgte unter Lichtausschluss, um einem Fluoreszenzverlust vorzubeugen.

Messpuffer

7,1% w/v NaCl, 0,2% w/v KCl, 1,15% w/v Na₂HPO₄, 0,2% w/v KH₂PO₄, 1% w/v NaN₃, pH 7,2

Durchflusszytometrie

Zu Beginn der Messungen wurde in der Software ein absorptionsbedingter Erfassungsbereich für die Datenaufnahme festgelegt. Dies ermöglichte, intakte einzelne Zellen in die Messung aufzunehmen und Zellklumpen (starke Absorption) sowie Bruchstücke (schwache Absorption) weitgehend auszuschließen. Von jeder Probe wurden 10^4 Werte (Zellen) im Erfassungsbereich für die graphische Auswertung aufgezeichnet. Die Proben wurden in den Rundbodenröhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) vor jeder Messung gründlich gemischt.

2.2.10. Patch-Clamp

Bei dieser Methode wird durch das Aufsetzen einer Glaspipette mit einem Spitzendurchmesser von 1 - 3 µm auf eine lebende Zelle ein Membranstück („Patch“) elektrisch isoliert und die Leitfähigkeit darin befindlicher Proteine (z. B. Ionenkanäle) gemessen. Hierbei ist die Erzeugung eines sehr dichten Abschlusses zwischen Membran und Pipettenspitze zur Minimierung von Leckströmen unbedingte Voraussetzung. Dieser

Abschluss wird als „Gigaseal“ bezeichnet, da der elektrische Widerstand zwischen Bad- und Pipettenlösung größer als $1 \text{ G}\Omega$ ist.

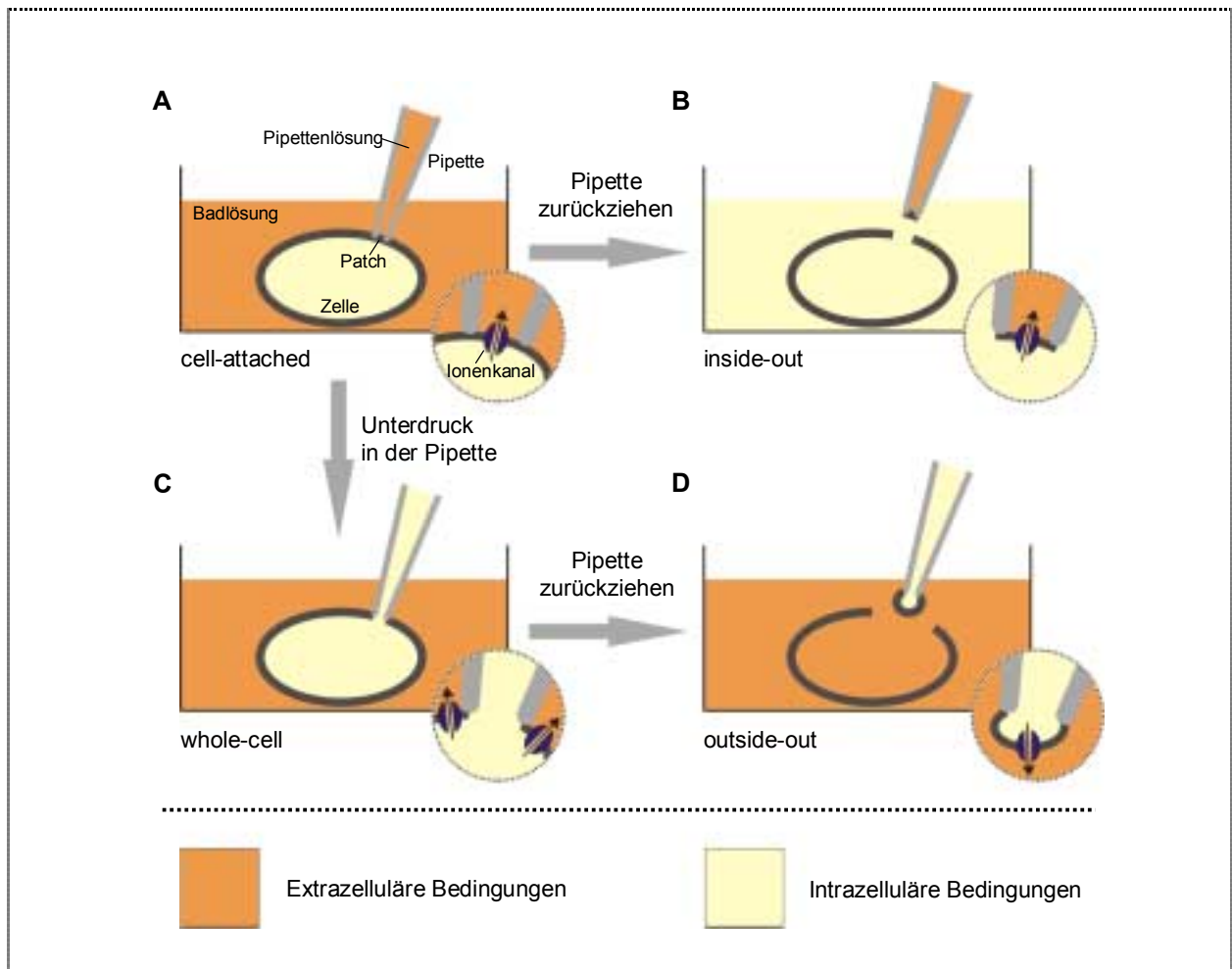


Abbildung 9: Schematische Darstellung der vier Patch-Clamp Konfigurationen (A) cell-attached, (B) inside-out, (C) whole-cell und (D) outside-out.

Die Patch-Clamp Technik erlaubt die Präparation von vier verschiedenen Konfigurationen, die unterschiedliche Untersuchungsbedingungen schaffen. Nach Herstellung des Gigaseals liegt die „cell-attached“ Konfiguration vor (Abbildung 9 A), bei welcher der Stromfluss durch den Patch gemessen werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie verwendet, um die indirekte Aktivierung des MaxiK durch Stimuli in der Badlösung zu untersuchen. Durch Zurückziehen der Pipette kann das Membranstück unter der Pipette aus der Zellmembran gerissen und somit ein „excised patch“ erzeugt werden. Bei dieser „inside-out“ Konfiguration (Abbildung 9 B) zeigt die dem Zytoplasma zugewandte Seite der Zellmembran zur Badlösung. Durch Zugabe von Modulatoren in die Badlösung kann so das Schaltverhalten der Kanäle in Abhängigkeit von intrazellulär wirkenden Substanzen ermittelt werden. Wird - ausgehend von der cell-attached Konfiguration - in der Pipette ein Unterdruck angelegt, so

bricht der Patch auf und es entsteht die „whole-cell“ Konfiguration (Abbildung 9 C). In dieser Konfiguration wird der Stromfluss durch die gesamte Zellmembran messbar. Wird nun wiederum die Pipette zurückgezogen, so zerreißt die Membran und an der Pipettenspitze befindliche Membranstücke schließen sich zusammen - es entsteht die „outside-out“ Konfiguration (Abbildung 9 D). Es handelt sich hierbei ebenfalls um einen „excised patch“, doch zeigt nun die Außenseite der Zellmembran zur Badlösung. Diese Konfiguration wurde verwendet, um den Einfluss von Stimuli in der Badlösung auf den MaxiK zu untersuchen, die direkt oder über membranassoziierte Mechanismen wirken.

Für die Patch-Clamp Messungen wurden HEK293 Zellen zu ca. 10^5 Zellen / 2 ml Medium in Petrischalen (35 x 10 mm, Sarstedt, Nümbrecht) ausgesät und die Zellen über Nacht im CO₂-Brutschrank inkubiert.

Herstellung der Pipetten und Elektroden

Zur Herstellung der Glaspipetten wurden Borosilikatglaskapillaren ($\varnothing_{\text{innen}}=1$ mm, $\varnothing_{\text{ausßen}}=1,5$ mm, Hilgenberg, Malsfeld) verwendet. Diese wurden 30 min in Azeton gebadet und anschließend über Nacht (ca. 16 h) bei 180 °C im Heizinkubator getrocknet. Für die Versuche wurden die Kapillaren mit Sigmacote beschichtet und 24 h inkubiert. Die Pipetten wurden mit einem zweistufigen Pipettenziehgerät (L/M-3P-A, List Elektronik, Darmstadt) aus den Kapillaren gezogen (1. Stufe 21,1 A, 2. Stufe 13,8 A). Zur Glättung der Pipettenspitzen wurden diese unter einem Mikroskop (Zeiss, Winkel) mit einem Glas-beschichteten Platindraht angeschmolzen und bis zum Einsatz staubfrei aufbewahrt. Die Messelektroden wurden aus Silberdraht ($\varnothing=0,5$ mm) hergestellt, der zuvor in einer galvanischen Zelle mit 1 M NaCl Lösung bei 1,5 V für 20 min chloriert wurde.

Messlösungen

Für „cell-attached“ Messungen wurde das Kulturmedium in den Petrischalen vor dem Versuch entfernt, durch 1,8 ml frisches Medium ersetzt und HBSS als Pipettenlösung verwendet.

Für die „outside-out“ Messungen wurde das Kulturmedium vor dem Versuch erneuert und zytoplasmatische Lösung als Pipettenlösung eingesetzt.

HBSS

10% v/v HBSS (Biochrom KG), 0,35% w/v NaHCO₃ (Biochrom KG)

Zytoplasmatische Lösung

140 mM KCl, 5 mM NaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,2

Der Messplatz

Die Patch-Clamp Experimente dieser Arbeit wurden in der Laborgruppe Biophysik des Forschungszentrum Borstel durchgeführt. Der Arbeitsplatz wurde von R. Blunck im Zuge seiner Promotion eingerichtet und ist in dessen Promotionschrift (Blunck, 1999) eingehend beschrieben. Im Folgenden wird daher nur ein Überblick gegeben.

Der Messplatz befand sich zur Abschirmung vor elektromagnetischen Störungen in einem Faraday'schen Käfig. Das Kernstück des Aufbaus war ein Inversmikroskop (DM-IL, Leica Wetzlar), das mit Hilfe einer Quecksilberdampfampe und entsprechenden Filtern als Fluoreszenzmikroskop genutzt wurde. Der Objektisch wurde durch eine Halterung (Typ-2, Lugis&Neumann, Ratingen) für Petrischalen ersetzt, die mit einem Mikromanipulator (Unit B2RMS, Lugis&Neumann) in der Horizontalebene bewegt werden konnte. Die Pipetten wurden in einer Halterung am Vorverstärker befestigt, der über einen dreidimensional beweglichen Mikromanipulator (Unit RME, Lugis&Neumann) ausgerichtet werden konnte. In die Halterung mündete ein Schlauchsystem, über welches der Druck in der Pipette variiert wurde.

Messelektronik

Um Interferenzen bei der Verstärkung der gemessenen Ströme zu verhindern, wurden bis auf das Mikroskop, den Mikromanipulator und den Patch-Clamp Verstärker (LM-PCA, List Elektronik, Darmstadt) alle elektrischen Geräte außerhalb des Faraday'schen Käfigs angebracht und über abgeschirmte Kabel mit den Komponenten innerhalb des Käfigs verbunden. Alle Bestandteile des Aufbaus wurden an einer zentralen Stelle geerdet. Zur Verstärkung der auftretenden Ströme wurde als empfindlicher Strom-Spannungskonverter mit großer Bandbreite der Patch-Clamp Verstärker LM-PCA (List Elektronik) mit einer Bandbreite von 80 kHz bei 20 mV/pA bzw. 50 kHz bei 100 mV/pA eingesetzt. Für einen möglichst kurzen Signalweg von der Pipette zum Verstärker war der Pipettenhalter direkt auf den Vorverstärker montiert. Die erste Verstärkerstufe bildete ein invertierender Verstärker mit sehr hohem Rückkopplungswiderstand (50 G Ω) zur Strom-Spannungskonvertierung. An den positiven Eingang des Operationsverstärkers wurde die gewünschte Membranspannung angelegt. Der Strom-Spannungskonverter regelte den Minuseingang und damit den Pipettenanschluss auf diesen Sollwert nach, so dass diese Spannung stromunabhängig gegen Masse anlag. Die zweite Stufe verstärkte dann die Differenz zwischen Ausgangsspannung und Referenzwert. Über zusätzliche Funktionseinheiten wurde je nach Anwendung die „offset“-Spannung zur Kompensation von Kontaktspannungen an den Elektrolyt-Elektrodengrenzflächen, das Haltepotential V_{hold} sowie ein Rechtecksignal aus einem Funktionsgenerator (Votcraft 7202, Conrad Elektronik, Hirschau) zum „Seal-Test“ auf den positiven Verstärkereingang addiert.

Das Ausgangssignal wurde über ein abgeschirmtes BNC-Kabel zu einem 8-Pol Besselfilter (Frequency Devices, USA) geleitet. Die Filterfrequenz betrug 10 kHz bei einer Abtastfrequenz von 100 kHz. Die gefilterten Signale wurden über eine A/D-Wandlerkarte (Dalanco Spry Model 250, Dalanco, USA) digitalisiert, in einen PC übertragen und auf der Festplatte gespeichert.

Datenaufnahme und Stimulationen

Für die einzelnen Messungen wurde in Schritten von ± 10 mV die angelegte Spannung von 0 auf ± 100 mV geregelt und nach jedem Schritt der Stromfluss durch die Pipette aufgezeichnet. Zur Steuerung des A/D-Wandlers wurde das Programm Sampl250 (Prof. Ulf Hansen, Universität Kiel) benutzt, das den Stromverlauf und die bei den Messungen anliegende Spannung aufzeichnete. Nach der ersten Kontrollmessung wurden die Zellen für 2 min im Ruhezustand belassen und dann eine zweite Kontrollmessung aufgezeichnet. Experimente bei denen die zweite Kontrollmessung eine Verschiebung gegenüber der ersten ergab, wurden verworfen, da weitere Verschiebungen nach Zugabe eines Modulators nur fehlerhaft interpretierbar gewesen wären. Im Anschluss an die zweite Kontrolle wurde der Modulator in 200 μ l HBSS zugegeben und 3 min später eine weitere Messung durchgeführt. Nun erfolgte ggf. die Zugabe eines zweiten Modulators in 200 μ l HBSS und wiederum 3 min später eine weitere Messung.

Datenverarbeitung

Zur Auswertung der aufgenommenen Daten wurde das Programm Day (Prof. Ulf Hansen, Universität Kiel) benutzt. Diese Software ermöglicht es, aus der aufgenommenen verrauschten Zeitreihe eine ideale, d.h. rauschfreie Zeitreihe, zu rekonstruieren und daraus die Offenwahrscheinlichkeit für einen Ionenkanal zu berechnen. Dazu musste zunächst manuell die Nulllinie, also das Niveau, bei dem kein Strom durch den Patch floss - die Kanäle also geschlossen waren - und die Lage der Stromniveaus bei geöffneten Kanälen festgelegt werden. Um die ideale Zeitreihe zu rekonstruieren, wurden mit dem Hinkley-Detektor achter Ordnung die Stromsprünge beim Öffnen und Schließen der Kanäle detektiert und die Sprungzeitpunkte rückwirkend festgelegt (Draber und Schultze, 1994); (Schultze und Draber, 1993). Ein Hinkley-Detektor berechnet die Gesamtzahl der Messpunkte pro Stromniveau, die Verweildauerhistogramme und die Übergangsmatrix, deren Elemente k_{ij} die Häufigkeit der Sprünge von einem Niveau i zu einem Niveau j angeben. Aus der Gesamtzahl der Messpunkte in jedem Niveau wurde dann die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle berechnet. Diese gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit sich mindestens ein Kanal zu einer bestimmten

Zeit t in einem offenen Zustand befindet. Die Offenwahrscheinlichkeit p_{offen} lässt sich dann unter Ausnutzung der Binomialverteilung berechnen:

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

N = Anzahl der Kanäle

i = Anzahl der offenen Kanäle im Niveau

p_i = Besetzungswahrscheinlichkeit des Niveaus i

p_{offen} = Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals.

Es wurde davon ausgegangen, dass die Zahl der Kanäle während der Messung konstant war, dass also weder Kanäle neu exprimiert wurden noch lateral in den Patch diffundierten. Damit ergab sich als minimale Anzahl der Kanäle in einem Patch die maximale Zahl an Kanälen, die in einer Zeitreihe innerhalb einer Messreihe gefunden wurde. Die grafische Darstellung wurde mit dem Programm Excel XP (Microsoft, USA) durchgeführt.

2.2.11. Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM)

Die Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie („confocal laser scanning microscopy“, CLSM) ermöglicht, optische Schnitte bei einer Tiefenschärfe von ca. 1 μm durch ein Präparat zu legen. Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, in der das Objektfeld als Ganzes ausgeleuchtet wird, wird bei der CLSM durch Einbringen einer Illuminationslochblende nur ein scheibenförmiger Objektbereich beleuchtet und das Objektfeld Zeile für Zeile abgerastert. Dies führt zu weniger Streulicht aus benachbarten Bereichen und erhöht somit die Schärfe und den Kontrast des resultierenden Bildes. Das Einbringen einer zweiten, in ihrem Durchmesser veränderbaren Lochblende in die aufnehmende Optik, die in die selbe Objektebene fokussiert wie die beleuchtende Optik (Prinzip der Konfokalität), bewirkt, dass Licht aus tieferen und höheren Objektebenen als der Fokusebene ausgeblendet wird. Dies führt zu einer erheblichen Erhöhung der Bildschärfe durch Reduktion des Streulichtes aus nicht im Fokus liegenden Ebenen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Verteilungen von MaxiK, TLR4 und LBP auf unstimulierten und stimulierten HEK293 Zellen mittels CLSM untersucht. Die CLSM wurde am Institut für Anatomie der Medizinischen Universität zu Lübeck durchgeführt. Als Mikroskop wurde ein invertiertes LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Jena) mit einem 40 x Wasserobjektiv verwendet.

Aufnahme von Einzelbildern und Zeitreihen

Fluoreszenzmarkierung

Es wurden 5×10^4 HEK293 Zellen in 500 μ l Medium pro Kammer in 8-Kammer-Gefäße (Lab Tek II, Boden mit Deckgläschen, Nunc, Wiesbaden) ausgesät und zwei Tage im CO₂-Brutschrank kultiviert, bis sie eine zu ca. 80% konfluente Schicht bildeten. Die Färbung wurde auf Eis durchgeführt, um eine Internalisierung der Antikörper zu minimieren. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen in 50 μ l Antikörperlösung pro Kammer (Art und Konzentration s. Ergebnisse) für 30 min abgedunkelt inkubiert. Nun wurde jede Kammer mit 500 μ l PBS (Biochrom KG, Berlin) vorsichtig gespült. Bei nicht Fluorochrom-gekoppelten Primärantikörpern wurden anschließend 50 μ l PBS mit 4 μ g/ml Ziege-anti-Maus IgG Alexa Fluor647 als Sekundärantikörper bzw. Alexa Fluor488-markiertes LBP zugegeben, für weitere 30 min abgedunkelt inkubiert und nochmals wie zuvor gespült. Dann erfolgte die Zugabe von 450 μ l Medium. Die 8-Kammer-Gefäße wurden mit Parafilm abgedichtet und abgedunkelt auf Eis transportiert.

Das LBP wurde zuvor mit einem „Alexa Fluor488 monoclonal antibody labeling kit“ (Molecular Probes, Karlsruhe) nach Anweisung des Herstellers markiert und bei 4 °C aufbewahrt.

Mikroskopie

Die grünfluoreszenten Farbstoffe GFP und Alexa Fluor488 wurden mit einem Argon-Laser bei 488 nm, das rotfluoreszente Alexa Fluor647 mit einem Helium/Neon-Laser bei 633 nm angeregt. Die Emission wurde mit einem 488/543/633 nm Hauptfarbteiler gemessen. Die grünfluoreszenten Farbstoffe wurden in einem Spektrum von 500 - 630 nm, die rotfluoreszenten Farbstoffe in einem Spektrum von 640 - 800 nm detektiert.

Einzelbilder wurden bei Aufnahmegeschwindigkeit 4 mit 4 Wiederholungen aufgezeichnet. Für die Aufnahmen von Zeitreihen wurden die Zellen mit einer Temperiereinheit (Eigenkonstruktion), die unter dem Objekthalter angebracht wurde, auf 37 °C erwärmt und während der gesamten Messung auf dieser Temperatur gehalten. Es wurden über einen Zeitraum von 10 min in Abständen von je 60 s Aufnahmen bei Aufnahmegeschwindigkeit 5 mit 2 Wiederholungen durchgeführt. Nach 3 min wurden 50 μ l LPS (Art und Konzentration s. Ergebnisse) zugegeben. Die weitere Bildbearbeitung wurde mit dem Programm LSM Image Browser, Version 3.2 (Carl Zeiss) durchgeführt.

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-basierte Messungen

Bei dieser Methode werden zwei Fluorochrome mit spektraler Überlappung verwendet, d. h. das Fluoreszenzspektrum des einen Farbstoffes (Donor) überschneidet sich mit dem Anregungsspektrum des zweiten Farbstoffes (Akzeptor). Wird nun der Donor auf

entsprechender Wellenlänge angeregt und sind beide Farbstoffe in räumlicher Nähe zueinander, findet ein strahlungsloser Energietransfer statt. Dies führt zu einer Fluoreszenzemission des Akzeptors, obwohl dieser nicht direkt angeregt wurde (Abbildung 10). Die Effektivität dieses Energietransfers hängt primär vom Abstand der Farbstoffe zueinander ab. Der Förster-Radius (R_0) gibt an, bei welcher Distanz die Energie-Transfer-Effizienz 50% beträgt. Wird nun der Akzeptor eines Paares durch direkte Anregung mit starker Intensität auf seiner Anregungswellenlänge gebleicht, so findet kein Energietransfer mehr statt, und die Emission des Donors steigt an.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Homodimerisierung des TLR4 mittels FRET-basierter CLSM untersucht. Dazu wurden transient transfizierte HEK293-TLR4_{CFP}-TLR4_{YFP} Zellen verwendet. Hierbei fungieren die Fluorochrome als FRET-Paar ($R_0 = 5 \text{ nm}$), wobei CFP als Donor und YFP als Akzeptor dient (Abbildung 10).

CFP wurde mit einem Argon-Laser bei 458 nm angeregt. Die Emission wurde mit einem 458/514 nm Hauptfarbteiler gemessen. Die Emissionsspektren von CFP und YFP wurden in einem Bereich von 470 - 700 nm mittels der „online fingerprinting“-Funktion der Geräte-Software voneinander getrennt.

Nach der wie zuvor beschriebenen Aufnahme eines Einzelbildes wurde der Akzeptor YFP bei einer Wellenlänge von 514 nm bei 100% Leistung mit 20 Wiederholungen gebleicht. Nun wurde wiederum ein Einzelbild aufgenommen. In dem Bereich der Bleichung wurden nun mit der Geräte-Software Intensitätsanalysen der CFP Emission vor und nach dem Bleichen angestellt und verglichen.

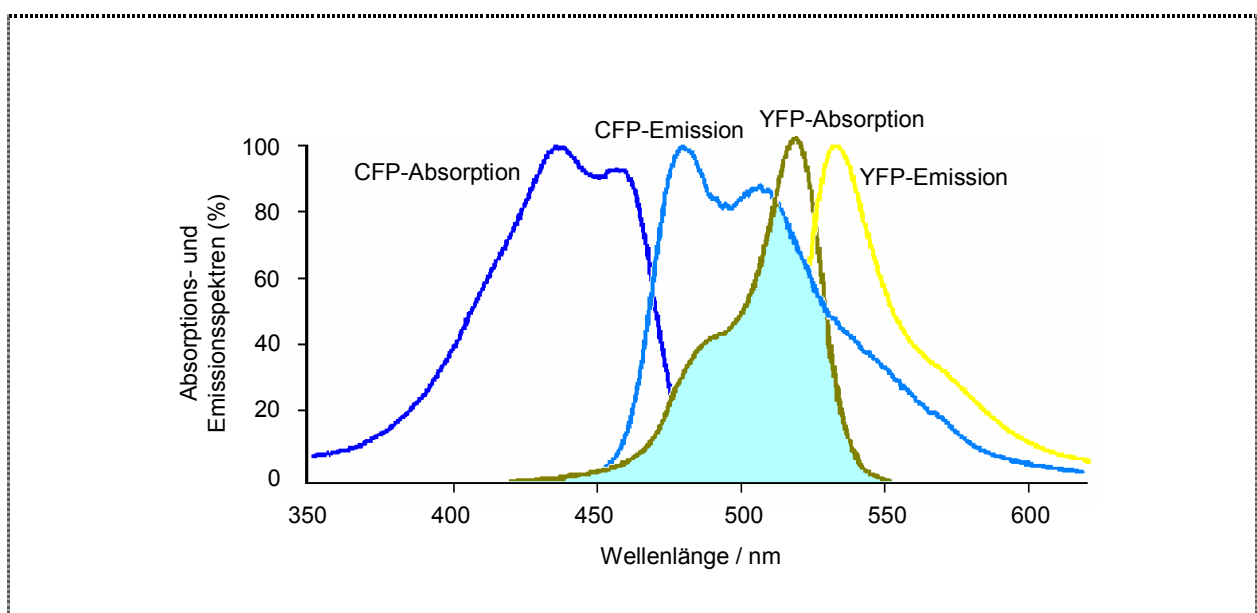


Abbildung 10: Absorptions- und Emissionsspektren des FRET-Paares CFP (Donor) und YFP (Akzeptor). Die farbig unterlegte Fläche markiert den Bereich der Überschneidung von CFP-Emission und YFP-Absorption, der die Grundlage des FRET darstellt.

3. ERGEBNISSE

Die in dieser Arbeit dargestellten Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Für die Untersuchungen an Monozyten und Makrophagen wurden die Versuche an Zellen verschiedener Spender wiederholt. Aufgrund der spenderspezifischen Unterschiede bei der Aktivierung von Primärzellen ist im Ergebnisteil jeweils ein repräsentatives Experiment beispielhaft dargestellt. Ausnahmen werden in den Abbildungsbeschriftungen angegeben.

Die angegebenen Konzentrationen für Modulatoren und Antikörper sind die tatsächlichen Endkonzentrationen in den Versuchsgefäßen.

Die Zugabe der Blocker und Inhibitoren erfolgte stets 10 min vor der Applikation der Stimuli.

3.1. Einfluss der MaxiK-Blockade auf die Zellaktivierung

In vorhergehenden Arbeiten wurde bereits festgestellt, dass die Blockade des Kaliumionenkanals MaxiK mit dem spezifischen MaxiK-Blocker Paxilline die LPS-induzierte TNF α -Produktion durch humane Makrophagen verringert (Blunck et al., 2001). PCR-Experimente zeigten, dass die MaxiK-Blockade die TNF α -Produktion bereits in einem praetranskriptionellen Schritt abschwächt. Auf welche Schritte der Signalweiterleitung in den aktivierten Makrophagen die MaxiK-Blockade einwirkt, konnte noch nicht bestimmt werden.

Neben LPS aktivieren auch andere Virulenzfaktoren, wie Peptidoglycan und Lipoteichonsäure den MaxiK in humanen Makrophagen und auch die von diesen Substanzen verursachte Zytokinausschüttung wird durch die Kanalblockade verringert (Scheel, 2002). Die grundlegenden intrazellulären Zusammenhänge für die Einbindung des MaxiK in den Prozess der Zellaktivierung sind auch bei diesen Stimuli noch weitgehend unbekannt.

3.1.1. Spezifität des Paxilline und Selektivität der Wirkung auf die Zellaktivierung

Ein wichtiges experimentelles Instrument im Rahmen dieser Arbeit war der MaxiK-Blocker Paxilline, ein Mycotoxin, das von dem Pilz *Penicillium paxilli* produziert wird (Knaus et al., 1994). Zur Bestimmung der Spezifität des Paxilline für den MaxiK als Ursache der Inhibition der Zellaktivierung durch LPS wurden Vergleichsstudien an humanen Monozyten und *in vitro* ausdifferenzierten Makrophagen angestellt. Abbildung 11 zeigt, dass durch RT-PCR Experimente keine MaxiK-mRNA in frischen Monozyten detektiert werden konnte (Tag 0). Im Laufe der siebentägigen Ausdifferenzierung der Monozyten zu Makrophagen nahm die Produktion von MaxiK-mRNA stark zu. Bereits am zweiten Tag war ein schwaches Signal zu

vermerken. An den folgenden Tagen verstärkte sich dieses, bis an Tag 4 und 7 in den reifen Makrophagen eine deutliche erhöhte Menge MaxiK-mRNA detektiert werden konnte.

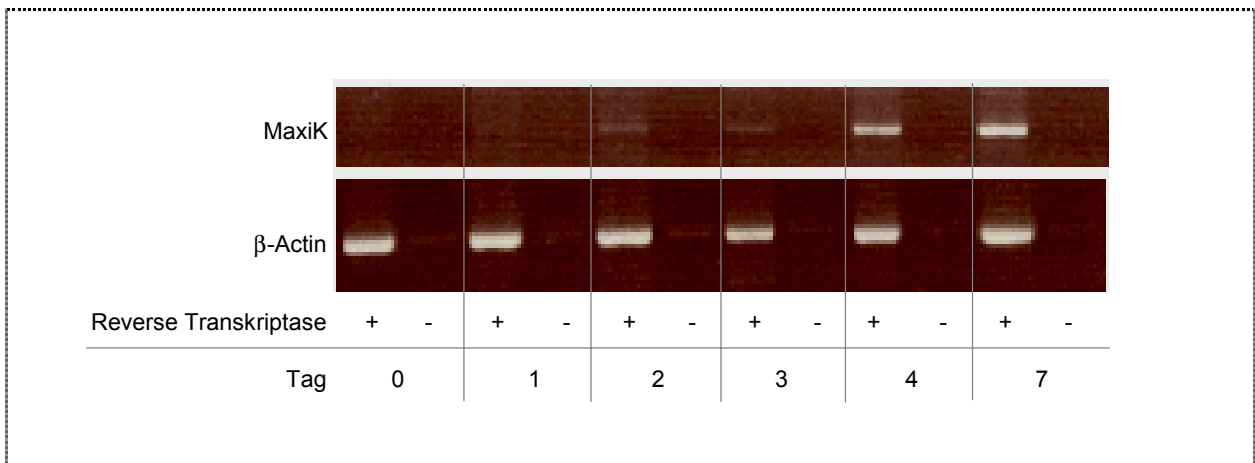


Abbildung 11: MaxiK-mRNA-Produktion während der Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen über einen Zeitraum von sieben Tagen. Die Zellen wurden jeweils an dem angegebenen Tag lysiert und die RNA entnommen. Methode: RT-PCR; 10^5 Zellen / Probe.

Dieser Befund wurde bereits in dieser (Blunck, 1999) und einer anderen Gruppe durch Patch-Clamp Experimente erstellt (Gallin und McKinney, 1988). Auf Monozyten konnte kein MaxiK gefunden werden, während Makrophagen eine starke Expression des Kanals aufwiesen.

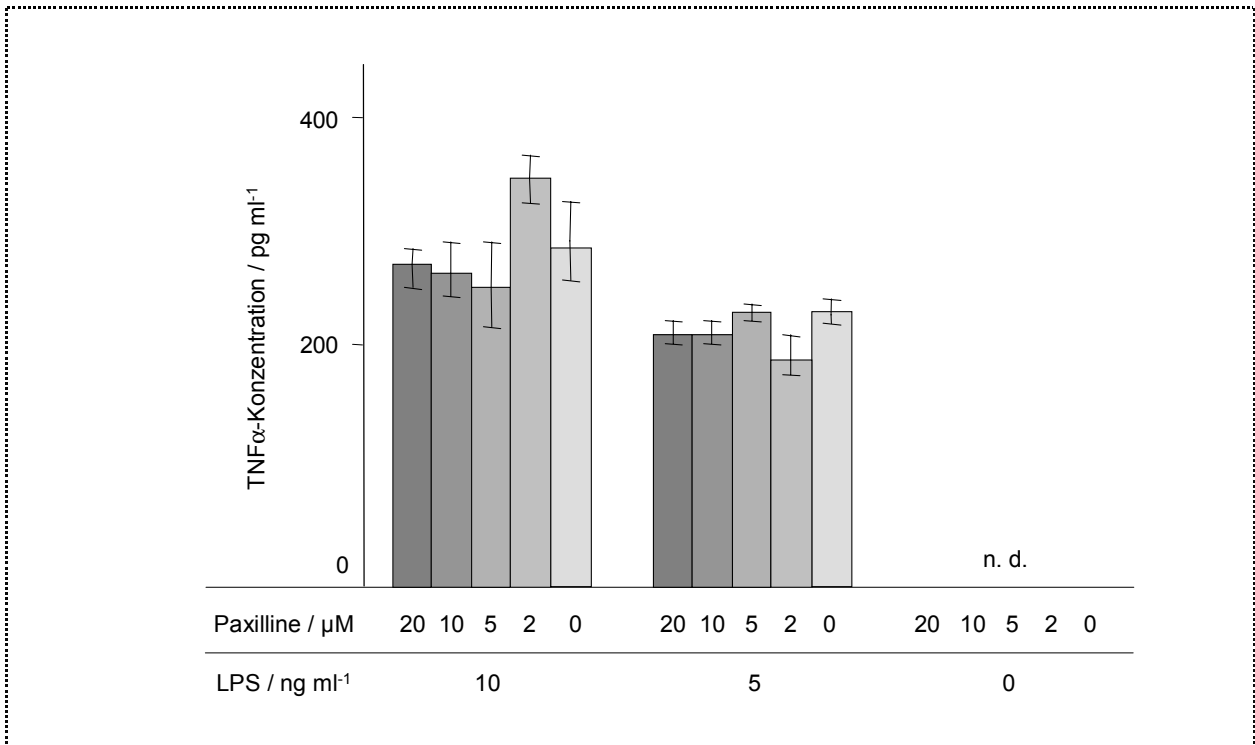


Abbildung 12: Einfluss des Paxilline auf die LPS-induzierte TNF α -Produktion durch humane Monozyten. Die Zellen wurden zunächst 10 min mit Paxilline vorinkubiert, dann erfolgte die Zugabe des Stimulus. n. d.: nicht detektierbar; Methode: ELISA; verwendetes Endotoxin: S-Form LPS.

Aufgrund dieser Erkenntnis war es möglich, die Spezifität der Wirkung des Paxilline auf die LPS-Stimulation von Monozyten ohne MaxiK-Expression mit der auf Makrophagen mit starker MaxiK-Expression zu vergleichen. $\text{TNF}\alpha$ ist ein Zytokin, das von Monozyten und Makrophagen im Zuge der LPS-Stimulation in Abhängigkeit von der LPS-Konzentration produziert wird. ELISA-Analysen von Stimulationsexperimenten zeigten, dass die Zugabe von Paxilline keinen Einfluss auf die LPS-induzierte $\text{TNF}\alpha$ -Produktion durch Monozyten hatte (Abbildung 12). Dies lässt schließen, dass auch hohe Paxilline-Konzentrationen von bis zu $20\ \mu\text{M}$ weder die Viabilität der Monozyten noch deren Aktivierung beeinflussen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Monozyten wurde die LPS-induzierte $\text{TNF}\alpha$ -Produktion in Makrophagen des selben Spenders durch die Zugabe von Paxilline konzentrationsabhängig inhibiert (Abbildung 13 A). Daraufhin wurde untersucht, ob dieses Resultat auf die LPS-induzierte $\text{TNF}\alpha$ -Produktion beschränkt ist. Dazu wurde in einem weiteren Experiment die Wirkung des Paxilline auf die durch LPS verursachte IL-8-Ausschüttung analysiert (Abbildung 13 B). Hier konnte der gleiche Effekt des Paxilline auf die Stimulation der Makrophagen festgestellt werden wie bei der $\text{TNF}\alpha$ -Produktion. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die Produktion von IL-6 festgestellt (nicht gezeigte Daten). Die Blockade des MaxiK hat folglich Auswirkungen auf die Produktion verschiedener Zytokine.

Des Weiteren konnte in diesem Experiment bestätigt werden, dass die Wirkung des Paxilline nicht auf einer unspezifischen Blockade anderer Kaliumionenkanäle, sondern auf der Blockade des MaxiK beruht, da der Kanalblocker bereits bei einer Konzentration von $2\ \mu\text{M}$ eine deutliche Wirkung zeigte. Diese Konzentration findet in der Literatur Bestätigung (DeFarias et al., 1996; Kraft et al., 2003; Sato et al., 2005).

Um festzustellen, ob die Blockade des MaxiK in Makrophagen ein genereller Mechanismus zur Inhibition der Zellaktivierung ist, wurde die Wirkung des Paxilline auf die Stimulation der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ untersucht (Abbildung 14). Auf Ebene der IL-8-Ausschüttung zeigte Paxilline selbst bei einer hohen Konzentration von $20\ \mu\text{M}$ keine inhibierende Wirkung auf die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Zellaktivierung humaner Makrophagen.

Es wurde beschrieben, dass Paxilline neben der Blockade des MaxiK eine Verringerung intrazellulärer Calciumionenströme bewirken kann. Zum einen kann es die Funktion der Calcium-ATPase im endoplasmatischen Reticulum (ER) behindern (Bilmen et al., 2002), zum anderen kann es den Inositol-1,4,5-Trisphosphat Rezeptors (Longland et al., 2000), einem Calciumionen-Kanal im ER blockieren. Die Daten der vorliegenden Experimente zeigen, dass die Inhibition dieser Proteine durch Paxilline hier nicht erfolgte oder keine Auswirkung auf die Stimulationen mit LPS und $\text{TNF}\alpha$ hatte, da die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Aktivierung der Makrophagen und die LPS-induzierte Aktivierung der Monozyten durch Paxilline nicht beeinflusst wurde.

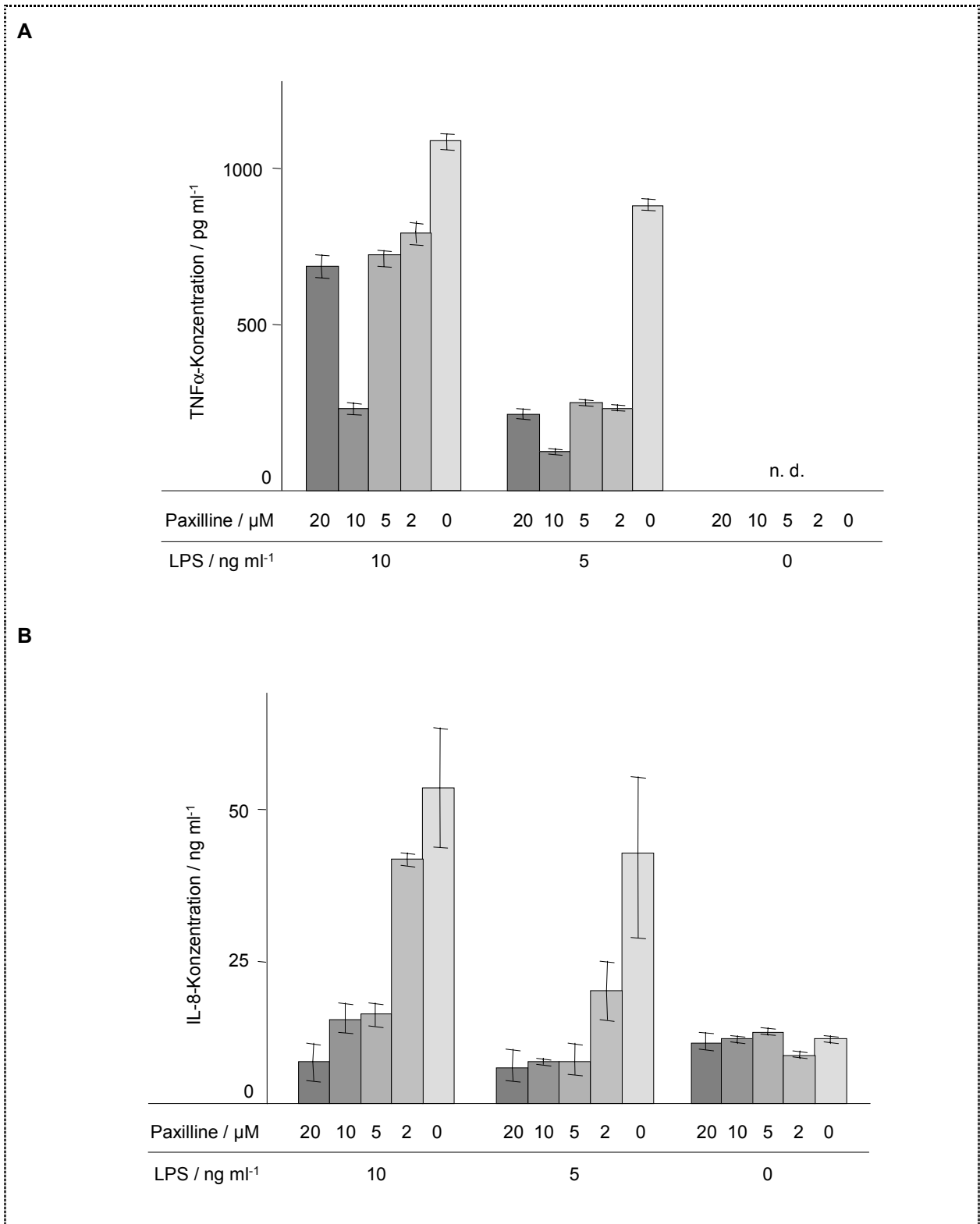


Abbildung 13: Einfluss des Paxilline auf die LPS-induzierte (A) TNF α -Ausschüttung nach 8 h und (B) IL-8-Ausschüttung nach 24 h durch humane Makrophagen. Die Zellen wurden zunächst 10 min mit Paxilline vorinkubiert, dann erfolgte die Zugabe des Stimulus. n. d.: nicht detektierbar; Methode: ELISA; verwendetes Endotoxin: S-Form LPS.

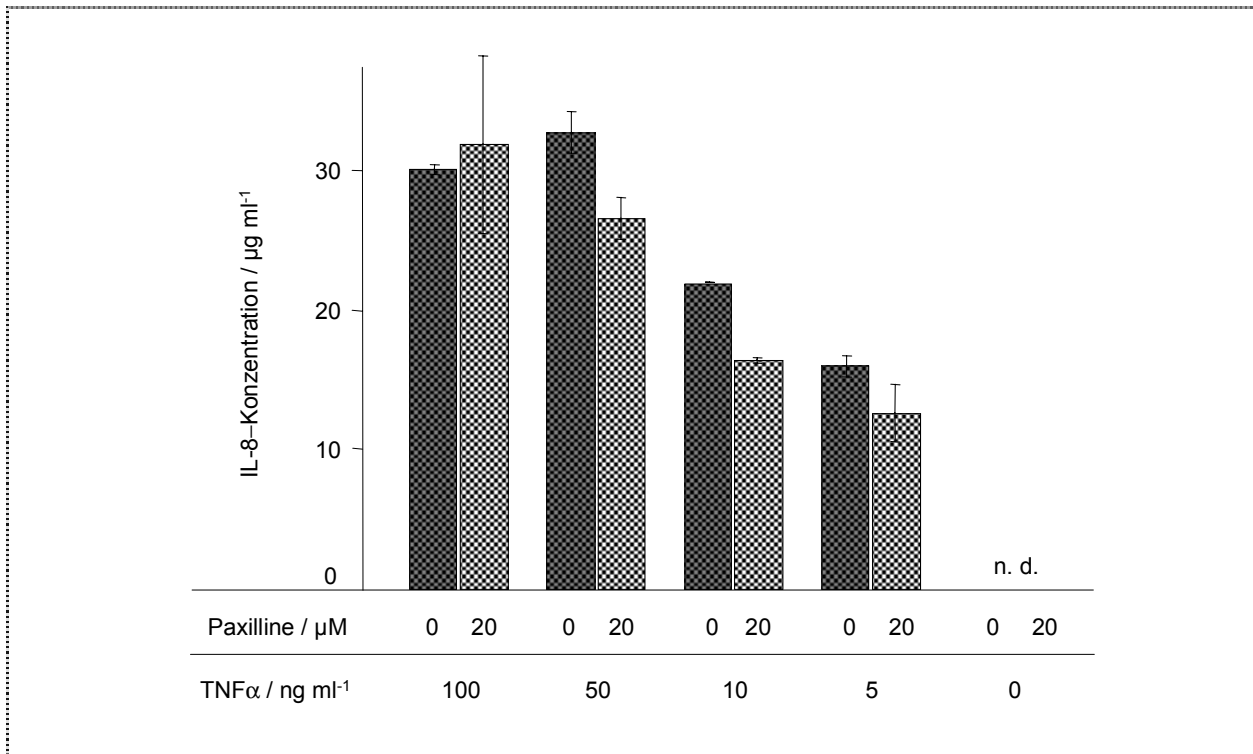


Abbildung 14: Einfluss des Paxilline auf die TNF α -induzierte IL-8-Produktion durch humane Makrophagen. Die Zellen wurden zunächst 10 min mit Paxilline vorinkubiert, dann erfolgte die Zugabe des Stimulus. Methode: ELISA; n. d.: nicht detektierbar.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen klar darauf hin, dass die Wirkung des Paxilline auf einer spezifischen Blockade des MaxiK in humanen Makrophagen beruht, dass keine der beschriebenen Nebenwirkungen des Paxilline einen Einfluss auf die Zellaktivierung ausübt und dass die Kanalblockade weder die Viabilität der Zellen noch deren Aktivierung durch endogene Stimuli, wie TNF α behindert.

3.1.2. Bedeutung der MaxiK-Blockade für die LPS-induzierte Transkription

Wie eingangs erwähnt, wurde bereits festgestellt, dass die Blockade des MaxiK durch Paxilline zu einer Inhibition der LPS-induzierten Transkription TNF α -kodierender Gene in humanen Makrophagen führt (Blunck et al., 2001). Zur Vertiefung dieser Daten wurde zunächst die Wirkung verschiedener Paxilline-Konzentrationen auf die Transkription TNF α -kodierender Gene in humanen Makrophagen ermittelt (Abbildung 15 A). TNF α -mRNA wird im Zuge einer Stimulation hergestellt und kann daher zur Bestimmung der Stimulationsintensität herangezogen werden. Die LPS-induzierte Transkription wurde durch den Kanalblocker Paxilline in allen angewendeten Konzentrationen inhibiert. Die Transkriptionsrate des TNF α

war im Vergleich zu der anderer Zytokine (Abbildung 15 B) relativ gering. Dies bestätigt die Ergebnisse auf Ebene der Zytokinausschüttung.

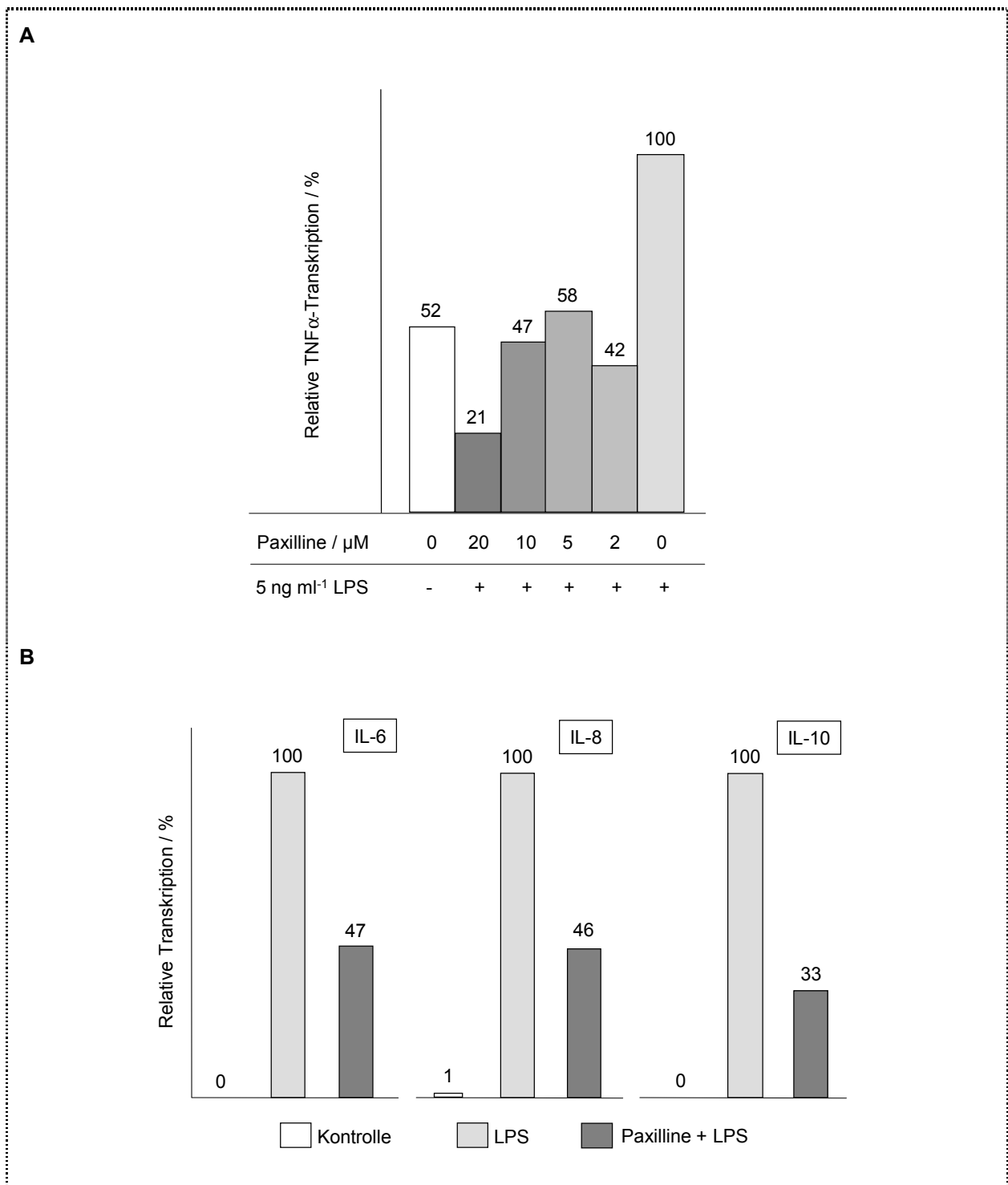


Abbildung 15: Einfluss des Paxilline auf die LPS-induzierte Transkription (A) TNF α -, (B) IL-6-, IL-8- und IL-10-kodierender Gene in humanen Makrophagen. Die Zellen wurden zunächst 10 min mit Paxilline vorinkubiert, dann erfolgte die Zugabe des Stimulus. Konzentrationen: 10 ng/ml LPS, 10 μM Paxilline; Methode: quantitative RT-PCR; verwendetes Endotoxin: S-Form LPS.

Um auch auf dieser Ebene zu ergründen, ob sich dieser Befund auf die Synthese mehrerer Zytokine erstreckt, wurde in einem analogen Versuchsansatz die Bedeutung der Kanalblockade für die Produktion weiterer entzündungsrelevanter Zytokine untersucht. Für die LPS-induzierte Produktion der proinflammatorischen Mediatoren IL-8 und IL-6 konnte ebenfalls der Befund auf Ebene der Zytokinausschüttung bestätigt werden (Abbildung 13 B). Die LPS-induzierte Transkription IL-8- und IL-6-kodierender Gene wurde durch Paxilline deutlich gemindert. Für IL-1 β (Abbildung 16) und das antiinflammatorische IL-10 (Abbildung 15 B) wurde der gleiche inhibitorische Einfluss festgestellt wie für TNF α und IL-8. Demnach ist anzunehmen, dass die Blockade des MaxiK den durch LPS verursachten Vorgang der Zellaktivierung in einem praetranskriptionellen Schritt und in umfangreichem Ausmaß inhibiert.

Auch auf dieser Ebene wurde überprüft, ob die Blockade des MaxiK in Makrophagen ein genereller Mechanismus zur Inhibition der Zellaktivierung ist. Dazu wurde die Wirkung des Paxilline auf die Stimulation der Zellen mit TNF α untersucht. Wie bei der Zytokinausschüttung bewirkte Paxilline auch auf Ebene der Transkription (Abbildung 16) keine Minderung der TNF α -induzierten Zellaktivierung in humanen Makrophagen, während die LPS-induzierte Transkription inhibiert wurde.

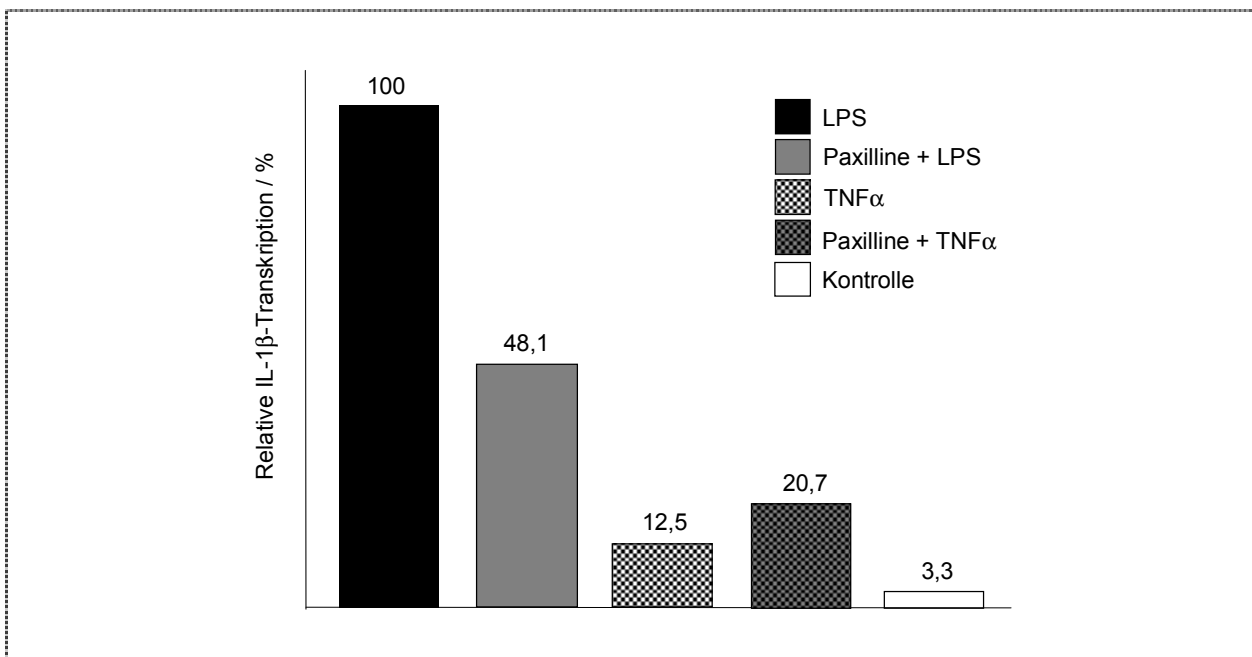


Abbildung 16: Einfluss des Paxilline auf die TNF α -induzierte Transkription IL-1 β -kodierender Gene in humanen Makrophagen. Die Zellen wurden zunächst 10 min mit Paxilline vorinkubiert, dann erfolgte die Zugabe des Stimulus. n. d.: nicht detektierbar; Konzentrationen: 5 ng/ml LPS, 20 μ M Paxilline, 50 ng/ml TNF α ; Methode: quantitative RT-PCR; verwendetes Endotoxin: S-Form LPS.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die inhibierende Wirkung der MaxiK-Blockade durch Paxilline auf die LPS-induzierte Aktivierung humaner Makrophagen bereits auf Ebene der Transkription besteht. Auch hier deutet kein Befund auf einen Einfluss unspezifischer Nebenwirkungen des Paxilline auf die Zellaktivierung hin. Die Aktivierung durch endogene Stimuli, wie $TNF\alpha$ wurde ebenfalls nicht behindert, während die LPS-induzierte Transkription für IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und $TNF\alpha$ verringert wurde. Demzufolge beeinflusst die Blockade des MaxiK praetranskriptionale Ereignisse der Zellaktivierung, die spezifisch die LPS-induzierten aber nicht die $TNF\alpha$ -induzierten Signalwege bestimmen.

3.1.3. Bedeutung der MaxiK-Blockade für die LPS-induzierten Signalwege

Die Wirkung der MaxiK-Blockade auf die LPS-induzierte Transkription Zytokin-kodierender Gene lässt sich nur durch ein Einwirken des Paxilline auf die LPS-induzierten Signalwege in humanen Makrophagen erklären. Von ausschlaggebender Bedeutung sind hier die Signalwege der drei MAP-Kinasen ERK, p38 und JNK sowie des Transkriptionsfaktors $NF\kappa B$. Wie bereits zuvor beschrieben, konnte eine Aktivierung der JNK in Makrophagen durch LPS nicht festgestellt werden (Papavlassopoulos, 2002). Daher wurden die im Zuge der Endotoxin-Aktivierung phosphorylierten MAP-Kinasen ERK und p38 sowie die Nukleartranslokation des Transkriptionsfaktors $NF\kappa B$ untersucht.

3.1.3.1. MAP-Kinasen

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse zur Untersuchung der LPS-induzierten Aktivierung der ERK dargestellt. Die LPS-induzierte Phosphorylierung dieses Enzyms findet nach 15 - 30 min ihren Höhepunkt. Die Aktivierung der ERK nach 15 min (Abbildung 17 A) wurde durch Paxilline nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu unterdrückte ein inhibitorischer Antikörper gegen CD14 die Aktivierung dieses Signalproteins vollständig. In einer Kinetik von 0 - 60 min wurde geprüft, ob eine Abweichung im zeitlichen Verlauf der ERK-Aktivierung durch den Einfluss der MaxiK-Blockade bestand (Abbildung 17 B). Auch hier zeigte Paxilline keine Wirkung. Diese MAP-Kinase steht folglich in keinerlei Abhängigkeit von der Funktion des MaxiK.

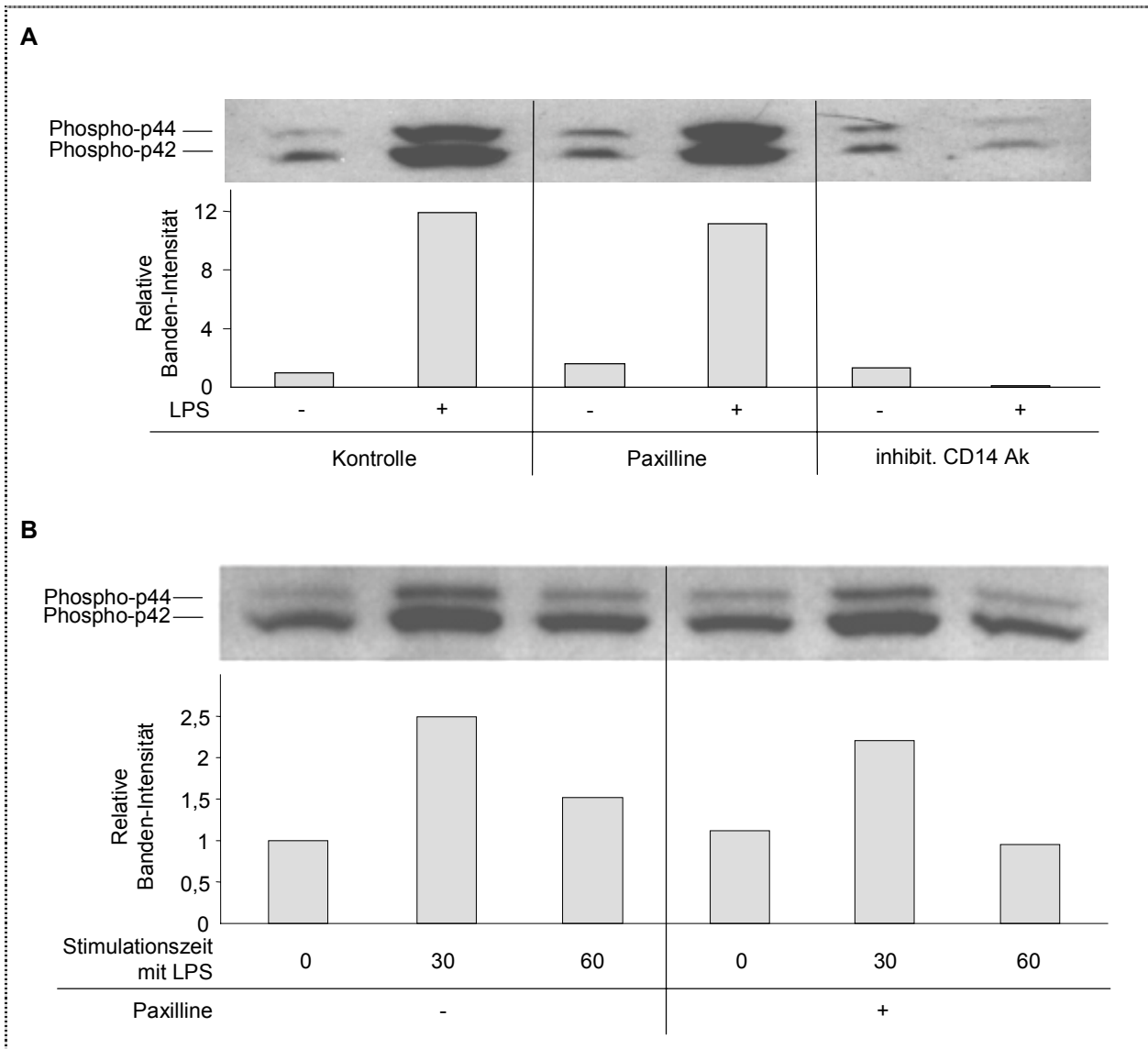


Abbildung 17: Einfluss des Paxilline auf die LPS-induzierte ERK-Phosphorylierung in humanen Makrophagen nach (A) 15 min Stimulation und (B) in einer Kinetik. Die Zellen wurden zunächst 10 min mit Paxilline bzw. CD14 Antikörper vorinkubiert, dann erfolgte die Zugabe des Stimulus. Konzentrationen: 10 ng/ml LPS, 20 µM Paxilline, 10 µg/ml inhibitorischer CD14 Antikörper, 1:2000 Kaninchen-anti-human Phospho-ERK Antikörper; Methode: Western-Blot, Densitometrie: Optimas; verwendetes Endotoxin: Re LPS.

Die MAP-Kinase p38 zeigt nach etwa 15 - 30 min eine maximale Aktivierung durch LPS. Es konnte durch die Zugabe des Kanalblockers eine leichte Verringerung der Phosphorylierung erzeugt werden (Abbildung 18). Dieser Befund wird als nicht ausreichend eingestuft, um allein die drastische Verringerung der Zytokinantwort zu erklären.

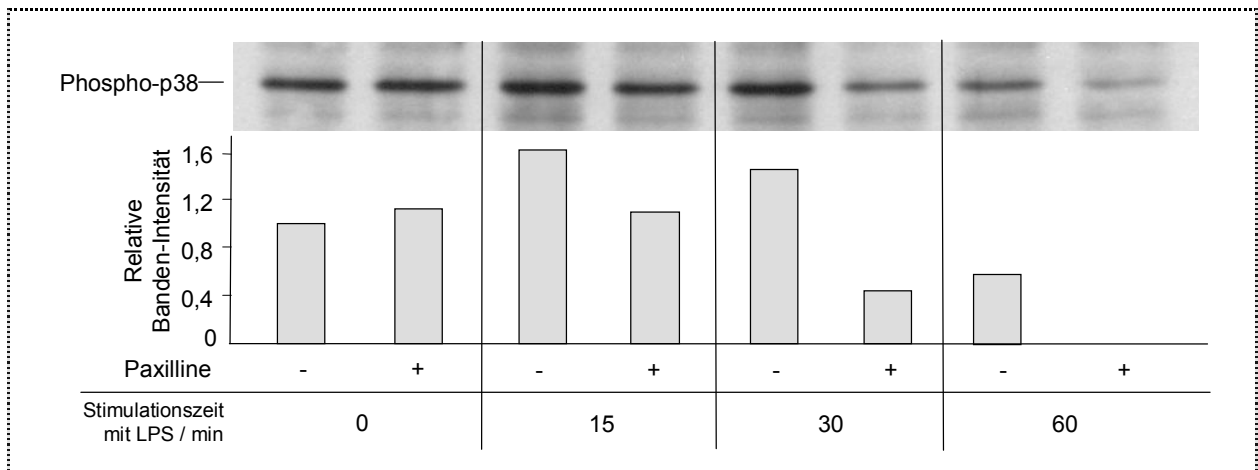


Abbildung 18: Einfluss des Paxilline auf die LPS-induzierte p38-Phosphorylierung in humanen Makrophagen. Die Zellen wurden zunächst 10 min mit Paxilline vorinkubiert, dann erfolgte die Zugabe des Stimulus. Konzentrationen: 10 ng/ml LPS, 20 μ M Paxilline, 1:2000 Kaninchen-anti-human Phospho-p38 Antikörper; Methode: Western-Blot, Densitometrie: Optimas; verwendetes Endotoxin: Re LPS.

3.1.3.2. Der NF κ B-Signalweg

Als weiteres wichtiges Element der LPS-Signalkaskade wurde der Transkriptionsfaktor NF κ B untersucht, welcher im Zuge der Stimulation vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert wird. Diese nukleare Translokation wurde in stimulierten Makrophagen nach 60 min mittels Gelretentionsanalyse nuklearer Extrakte analysiert.

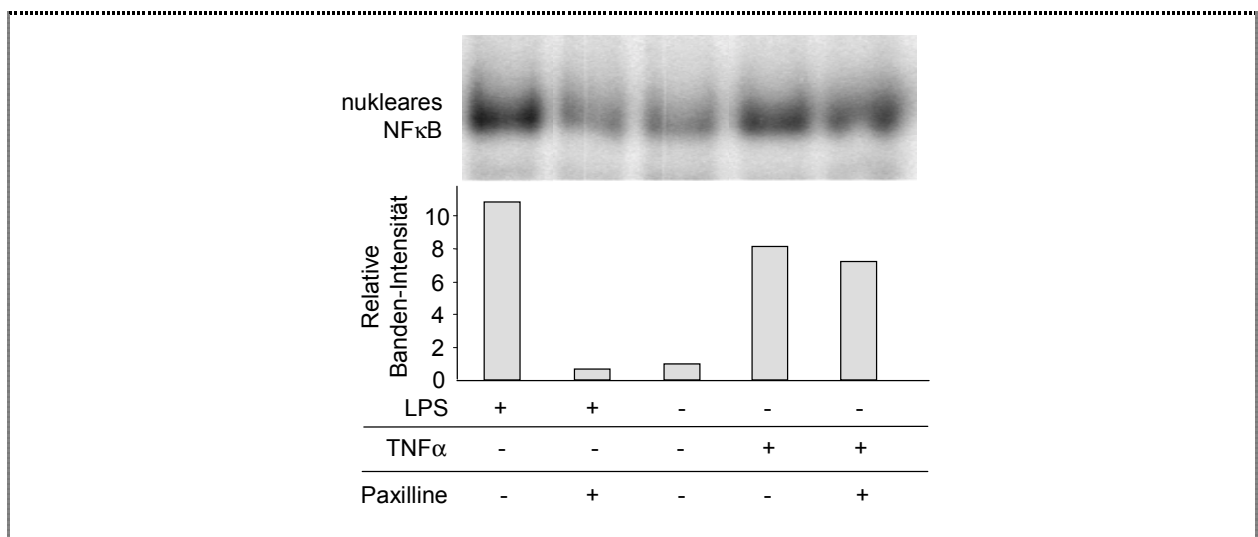


Abbildung 19: Einfluss des Paxilline auf die LPS-induzierte Nukleartranslokation von NF κ B in humanen Makrophagen. Die Zellen wurden zunächst 10 min mit Paxilline vorinkubiert, dann erfolgte die Zugabe des Stimulus. Konzentrationen: 10 ng/ml LPS, 50 ng/ml TNF α , 20 μ M Paxilline; Methode: EMSA, Densitometrie: Optimas; verwendetes Endotoxin: S-Form LPS.

Die Blockade des MaxiK durch Paxilline führte zu einer drastischen Inhibition der LPS-induzierten Nukleartranslokation des NF κ B in humanen Makrophagen nach 60 min (Abbildung 19). Demzufolge ist die Funktionstüchtigkeit des MaxiK essentiell für die LPS-induzierte Translokation des NF κ B.

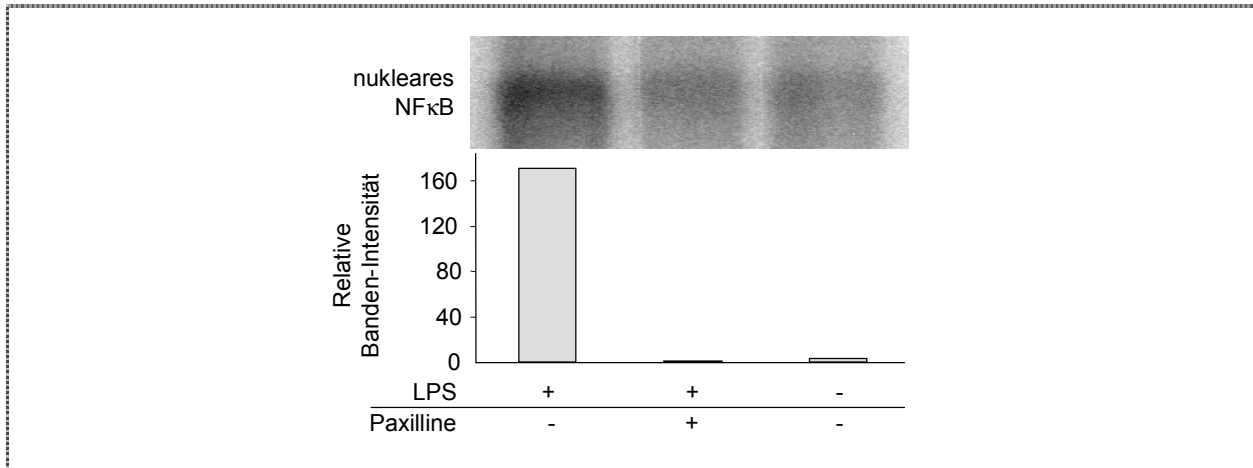


Abbildung 20: Einfluss des Paxilline auf die LPS-induzierte Nukleartranslokation von NF κ B in Alveolarmakrophagen der Ratte. Die Zellen wurden zunächst 10 min mit Paxilline vorinkubiert, dann erfolgte die Zugabe des Stimulus. Konzentrationen: 10 ng/ml LPS, 20 μ M Paxilline; Methode: EMSA, Densitometrie: Optimas; verwendetes Endotoxin: S-Form LPS.

In diesem Versuch wurde des Weiteren die bereits auf Ebene der Zytokinproduktion und der Transkription erkannte Wirkungslosigkeit der Kanalblockade hinsichtlich der Stimulation mit TNF α bestätigt, denn auch die TNF α -induzierte Translokation des NF κ B wurde durch Paxilline nicht beeinflusst.

Um eine mögliche Artspezifität dieser Abhängigkeit des NF κ B-Translokation im Zuge der LPS-Aktivierung humaner Makrophagen zu ergründen und um festzustellen, ob die Generation der Makrophagen *in vitro* für diese Befunde von Bedeutung ist, wurde dieser Versuch daraufhin analog mit *in vivo* ausdifferenzierten Alveolarmakrophagen der Ratte wiederholt. Abbildung 20 zeigt, dass der beobachtete Effekt auf Ebene der NF κ B - Translokation auch an diesen Zellen reproduzierbar war. Der MaxiK ist demnach ein artübergreifendes Element der LPS-induzierten Aktivierung von Immunzellen. Dieses Ergebnis konnte in einem weiteren Experiment mit Alveolarmakrophagen der Ratte bestätigt werden.

Um die Spezifität der verwendeten Nukleotide für die NF κ B-Untereinheit p65 zu prüfen, wurden NF κ B-positive Proben LPS-stimulierter nuklearer Extrakte humaner Makrophagen mit verschiedenen Kontrollreagenzien untersucht. Hierfür wurden die Extrakte zunächst mit der Kontrollsubstanz für 15 min vorinkubiert und dann die markierten NF κ B-spezifischen

Oligonukleotide zugegeben. Abbildung 21 zeigt, dass ein Antikörper gegen humanes p65 die p65-Nukleotid-Komplexe abfing und somit die Bande abschwächte, während ein Antikörper gegen humanes p50 wirkungslos blieb. Die Vorinkubation der Proben mit unmarkierten AP-1-spezifischen Nukleotiden zeigte ebenfalls keine Wirkung. Demzufolge ist kein AP-1 in den Komplexen enthalten. Durch die unmarkierten NF κ B-Nukleotide wurde das freie p65 in den Proben abgefangen. Diese Daten zeigen, dass es sich bei der nachgewiesenen NF κ B-Untereinheit um p65 handelt.

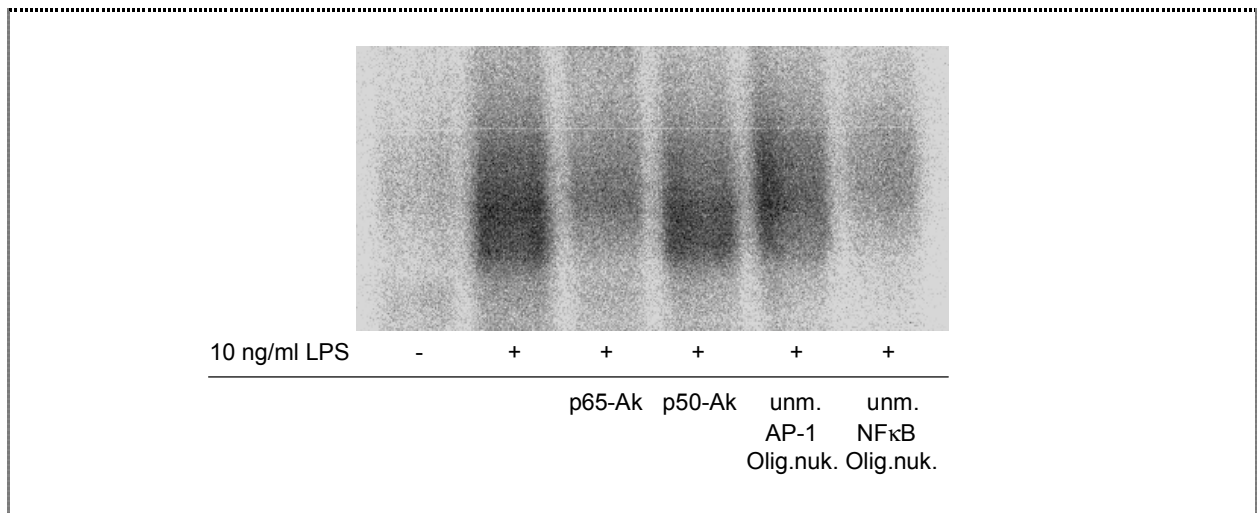


Abbildung 21: Kontrolle der Spezifität der verwendeten EMSA-Sonden in nuklearen Extrakten humaner Makrophagen. AK: Antikörper, unm. Olig.nuk.: unmarkierte Oligonukleotide; Methode: EMSA.

Die Translokation des NF κ B wird durch die Degradation des NF κ B-Inhibitors I κ B ermöglicht, der im Zytoplasma an NF κ B bindet und für dessen Freisetzung erst abgebaut werden muss. Eine Kinetik der LPS-induzierten Degradation der Untereinheit I κ B α des zytoplasmatischen I κ B wurde mittels Western-Blot erstellt. Abbildung 22 zeigt, dass der Abbau des I κ B α nach ca. 20 min seinen Höhepunkt erreicht und dass der im Zuge der LPS-Stimulation nach 20 min eingetretene Abbau des I κ B α durch die MaxiK-Blockade mit Paxilline vollständig unterdrückt wird. Nach 40 min hatte das I κ B α wieder seinen Ausgangswert angenommen. Zu diesem Zeitpunkt ist auch kein Effekt des Paxilline mehr sichtbar. Die Funktion des MaxiK ist folglich bereits für die Degradation des I κ B α vonnöten.

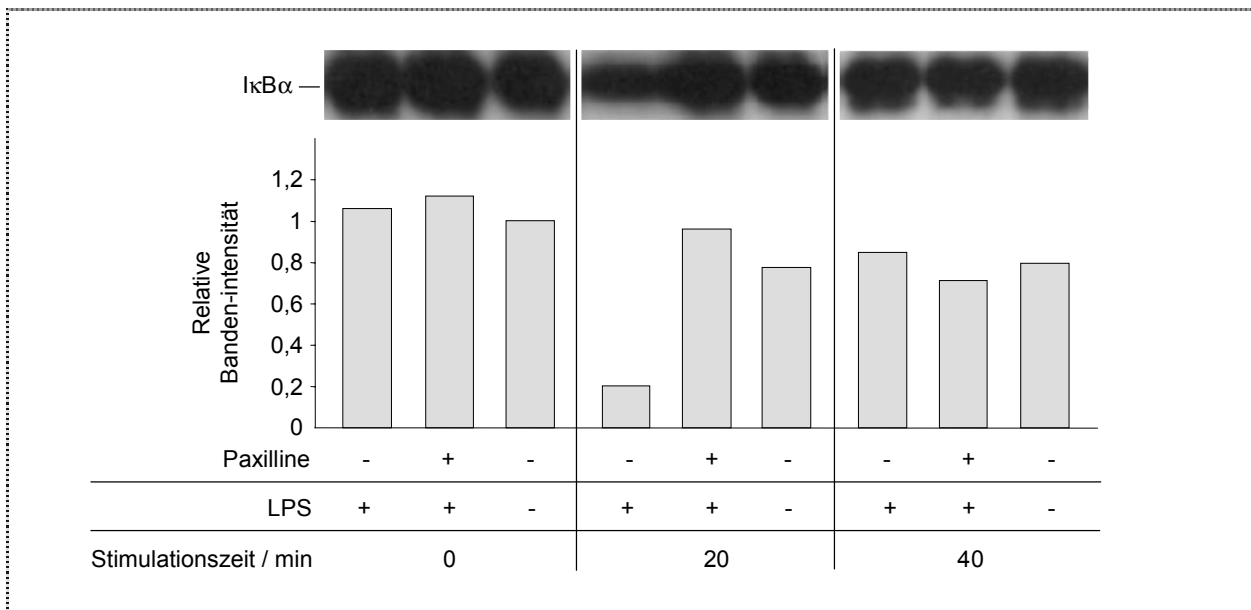


Abbildung 22: Einfluss des Paxilline auf die LPS-induzierte Degradation von IκBα in humanen Makrophagen. Die Zellen wurden zunächst 10 min mit Paxilline vorinkubiert, dann erfolgte die Zugabe des Stimulus. Konzentrationen: 5 ng/ml LPS, 20 μM Paxilline, 100 ng/ml Kaninchen-anti-human IκBα Antikörper; Methode: Western-Blot; verwendetes Endotoxin: S-Form LPS.

3.2. Aktivierung des MaxiK

In vorhergehenden Arbeiten wurde bereits die Bedeutung des Kaliumionenkanals MaxiK bei der Stimulation humaner, *in vitro* aus Monozyten differenzierter Makrophagen mit LPS untersucht. Durch Patch-Clamp Experimente an „excised patches“ (s. 2.2.10) wurde festgestellt, dass die Applikation von LPS binnen weniger Minuten eine Aktivierung des MaxiK in der Zytoplasmamembran von Makrophagen herbeiführt (Blunck, 1999). Dieser Befund legte nahe, dass der Ionenkanal entweder an der Perzeption des LPS beteiligt ist oder während initialer Schritte der Signalweiterleitung aktiviert wird. Bisher konnte jedoch nicht ergründet werden, welcher Mechanismus der Kanalaktivierung zugrunde liegt, d. h. ob die Aktivierung durch einen direkten Kontakt mit dem LPS vonstatten geht oder indirekt über Elemente der induzierten Signalkaskaden erfolgt.

3.2.1. Das HEK293-Transfektionssystem

Um die Mechanismen der MaxiK-Aktivierung im Zuge einer Stimulation untersuchen zu können wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zelllinie HEK293 verwendet. Diese exprimiert zwar endogen den IL-1-Rezeptor aber weder den MaxiK noch die für die LPS-Erkennung essentiellen Proteine TLR4 und MD2. Diese Zellen konnten daher mit verschiedenen Kombinationen dieser Membranproteine transfiziert werden, um ein mögliches Zusammenwirken oder eine Abhängigkeit dieser Proteine voneinander zu ergründen. Der

Kaliumionenkanal wurde als Fusionsprotein mit dem grünfluoreszenten Protein GFP eingesetzt. Im membranständigen Fusionsprotein liegt das GFP intrazellulär an das C-terminale Ende der α -Untereinheiten des MaxiK gebunden vor.

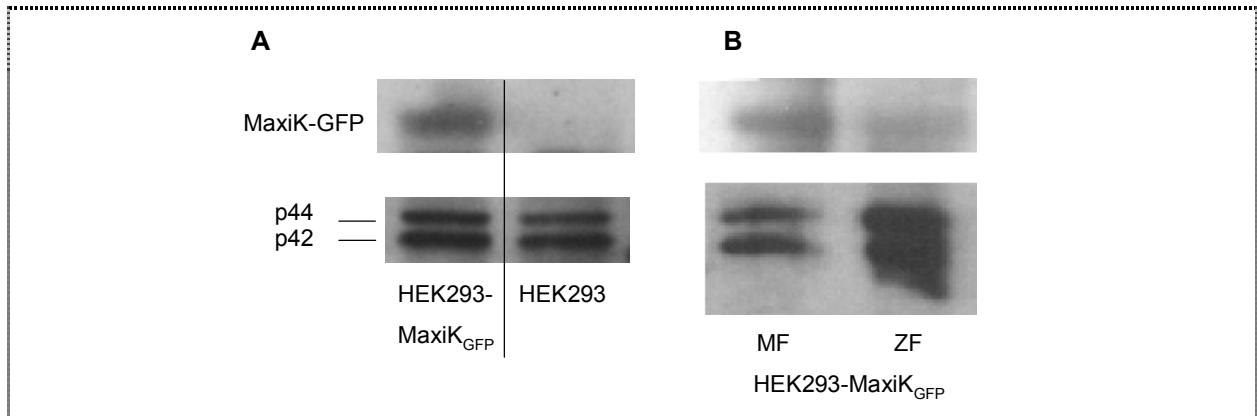


Abbildung 23: Expression des MaxiK_{GFP} Fusionsproteins in stabil transfizierten HEK293-MaxiK_{GFP} und untransfizierten HEK293. A): Ganz-Zell-Lysate, 200 ng/ml GFP Antikörper, 10⁶ Zellen / Bahn; B) Zellfraktionen, 4 μ g/ml MaxiK Antikörper, 10⁷ Zellen / Bahn. MF: Membranfraktion, ZF: Zytoplasmafraktion. Methode: Western-Blot; Kontrolle: 1/2000 Kaninchen-anti-human ERK Antikörper.

Zunächst wurde die Expression der zu untersuchenden Proteine überprüft. Die Expression des MaxiK wurde mittels Western-Blot an Zytoplasma- und Membranfraktionen von HEK293 und HEK293-MaxiK_{GFP} Zellen bestätigt. Im Gegensatz zu den untransfizierten Zellen konnte in den HEK293-MaxiK_{GFP} Zellen der Kanal nachgewiesen werden (Abbildung 23 A). Durch einen Western-Blot von Zellfraktionen wurde festgestellt, dass der MaxiK überwiegend in den Membransystemen exprimiert wird (Abbildung 23 B). Der Erfolg der Fraktionierung wurde durch das zytoplasmatische Enzym ERK bestätigt: In der Zytoplasmafraktion wurde ein deutlich höherer ERK-Anteil detektiert.

Zusätzlich wurde die Expression des MaxiK durch Konfokale Mikroskopie (s. 3.3.1) verifiziert. Abbildung 24 zeigt den durchflusszytometrischen Nachweis des Antikörper-markierten IL-1 Rezeptors auf HEK293-MaxiK_{GFP} Zellen.

Die Expression von TLR4/MD2 in den HEK293-Transfektanten konnte über einen funktionellen Nachweis in Stimulationsexperimenten bestätigt werden (Abbildung 25). Die stabilen Transfektanten zeigten ebenso eine konzentrationsabhängige LPS-Responsivität wie die transienten Transfektanten. Da TLR4 und MD2 für die Immunantwort auf LPS essentiell sind, wurde dies als Bestätigung für die Expression von TLR4 und MD2 angesehen. Zusätzlich wurde diese Expression durch Konfokale Mikroskopie (s. 3.3.2) verifiziert.

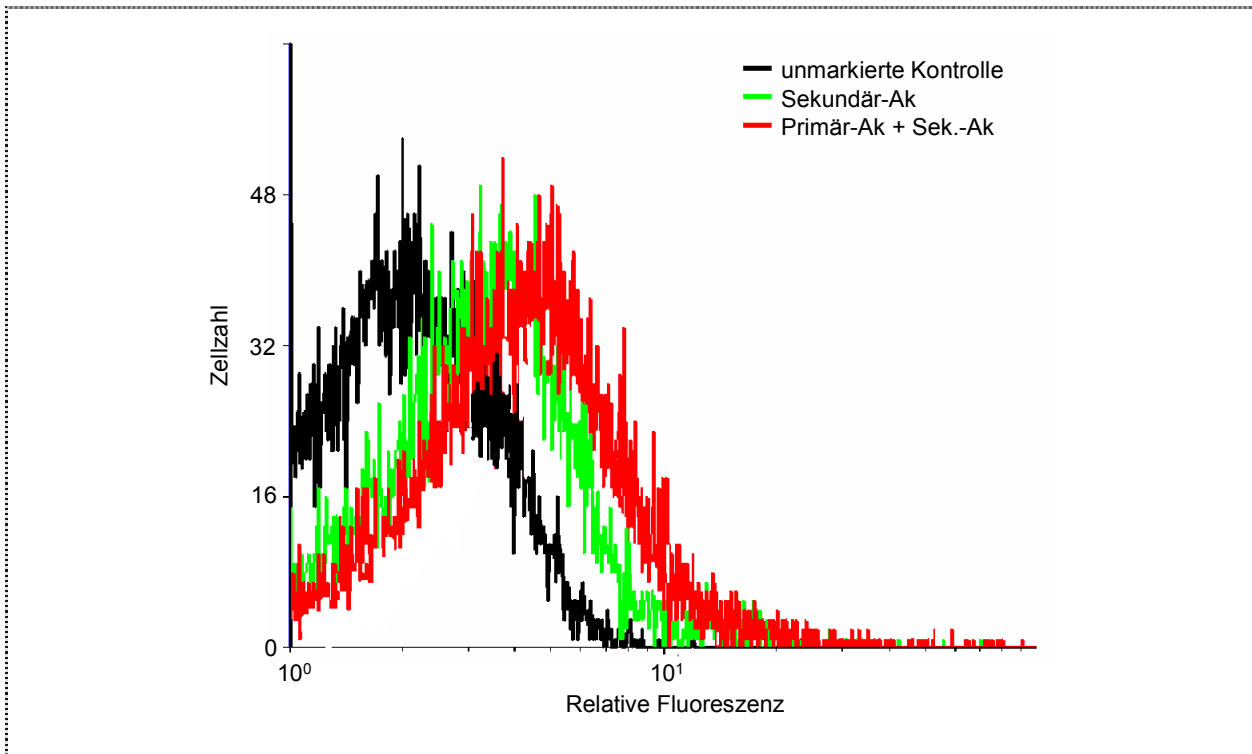


Abbildung 24: Expression des IL-1 Rezeptors (CD121a) auf HEK293-MaxiK_{GFP} Zellen. Methode: Durchflusszytometrie. Primärantikörper: 50 µg/ml anti-human CD121a, Sekundärantikörper: 4 µg/ml Ziege-anti-Maus Alexa Fluor647.

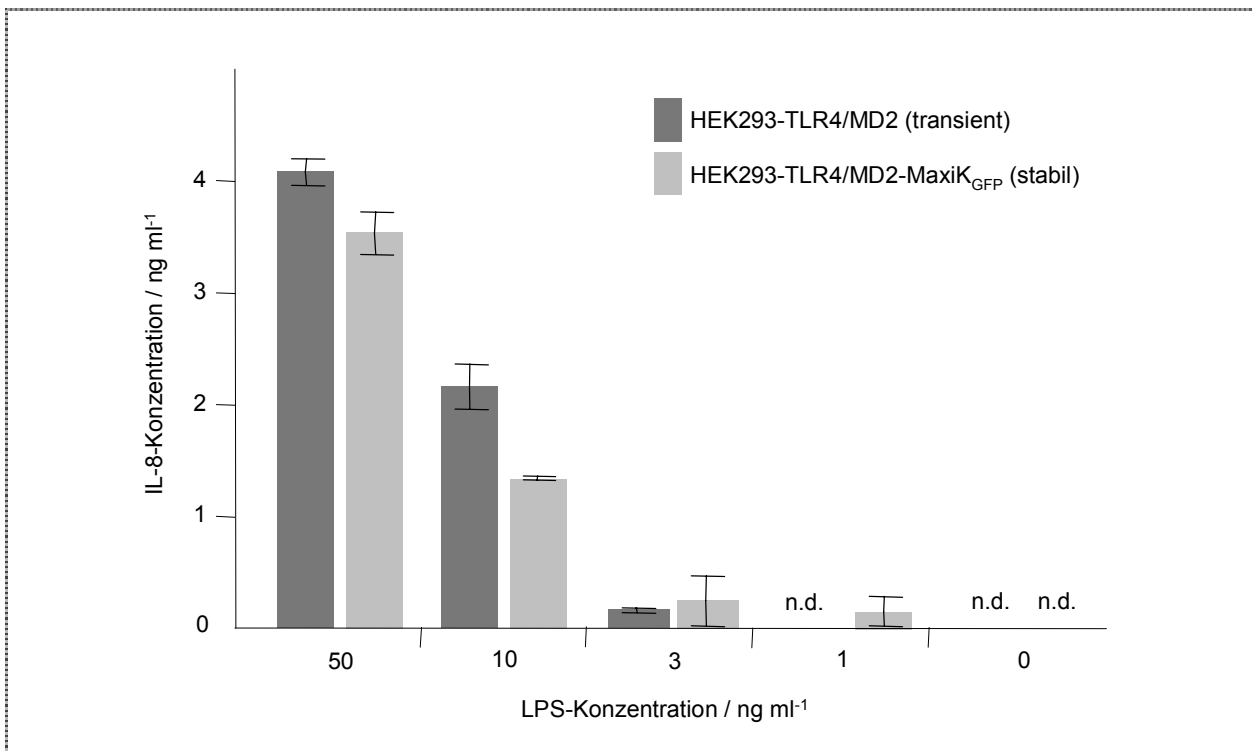


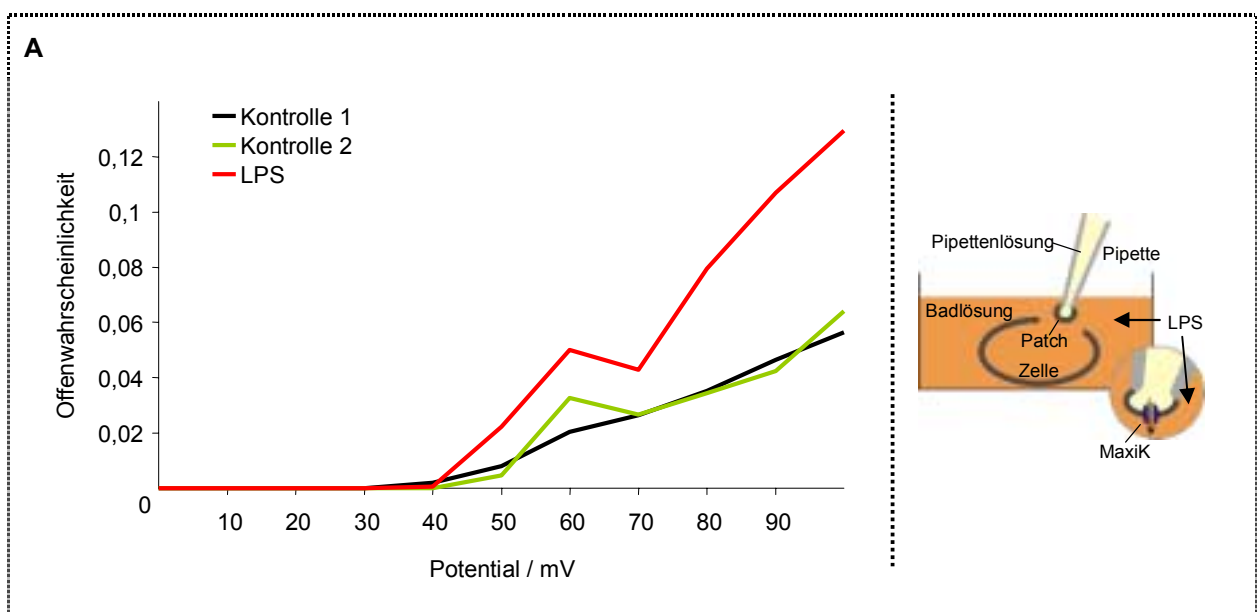
Abbildung 25: Einfluss der verschiedenen Transfektionsarten auf die LPS-induzierte IL-8-Produktion durch HEK293 Zellen. n. d.: nicht detektierbar; Methode: ELISA. verwendetes Endotoxin: Re LPS.

3.2.2. Elektrophysiologische Untersuchungen zur MaxiK-Aktivierung

3.2.2.1. Bestätigung des HEK293-Systems

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits eine Aktivierung des MaxiK in humanen Makrophagen durch LPS festgestellt (Blunck, 1999). Diese Ergebnisse wurden durch Patch-Clamp-Messungen in der outside-out Konfiguration erzielt (s. 2.2.10). Um die Eignung des HEK293-Systems für entsprechende Patch-Clamp-Untersuchungen zu gewährleisten, wurde zunächst dieser Versuch mit HEK293-TLR4/MD2-MaxiK_{GFP} Zellen wiederholt. Abbildung 26 A zeigt, dass die auf Makrophagen festgestellte Kanalaktivierung in outside-out Messungen durch LPS auch auf transfizierten HEK293 Zellen stattfindet - die Zugabe von LPS führte zu einer deutlichen Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit des MaxiK¹.

Der MaxiK wurde durch seinen charakteristisch hohen Einzelkanalstrom von ca. 20 pA charakterisiert (Abbildung 26 B) (Xia et al., 2000; Rezzonico et al., 2002). Die Einzelkanalströme des MaxiK in den folgenden Experimenten zeigten keine Abhängigkeit von den verschiedenen Stimuli und bewegten sich in einem Rahmen von 15 - 20 pA. Demzufolge konnte zum einen eine modulatorische Wirkung der GFP-Markierung auf die Leitfähigkeit des Kanals ausgeschlossen werden und um anderen wurde bestätigt, dass der MaxiK in den HEK293 Zellen ähnliche elektrische Eigenschaften aufweist, wie der MaxiK in humanen Makrophagen.



¹ Das in den Abbildungen angegebene Potential gibt das mit dem Patch-Clamp Verstärker angelegte Potential an, das mit dem natürlichen Membranpotential von ca. -60 mV interferiert.

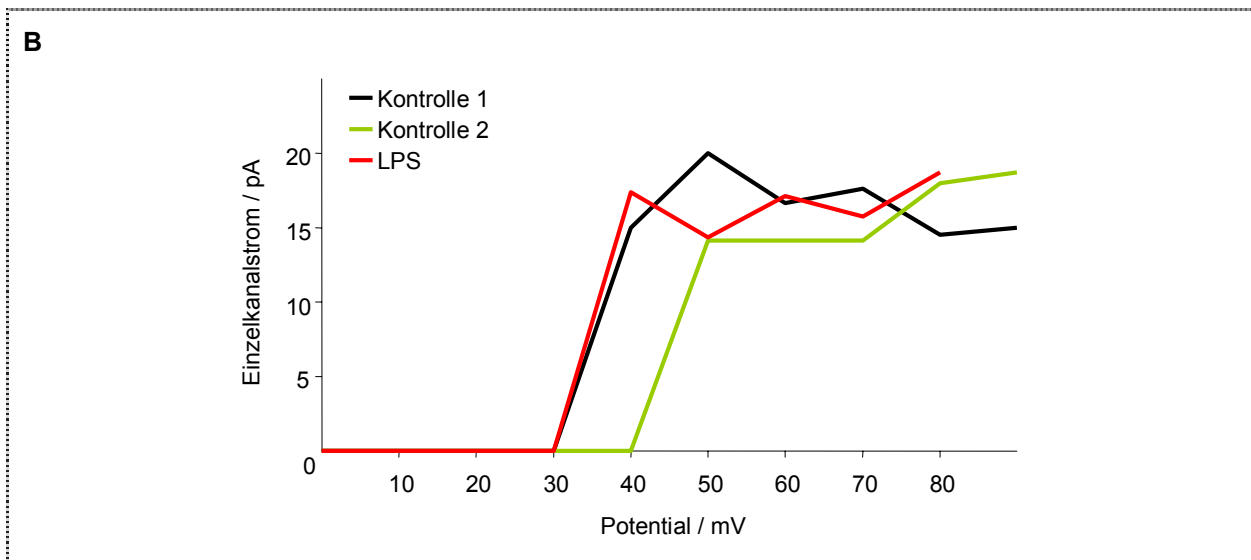


Abbildung 26: (A) Offenwahrscheinlichkeit und (B) Einzelkanalstrom des MaxiK in HEK293-TLR4/MD2-MaxiK_{GFP} Zellen in Abhängigkeit von LPS. Es wurden zunächst im Abstand von 2 min zwei Kontrollmessungen an den unstimulierten Zellen durchgeführt, dann das LPS zugegeben und 3 min später eine weitere Messung vollzogen. Methode: Patch-Clamp, outside out¹; Konzentrationen: 5 ng/ml LPS; verwendetes Endotoxin: Re LPS.

3.2.2.2. Indirekte Aktivierung des MaxiK

Wie eingangs geschildert, konnte bisher nicht geklärt werden, ob der MaxiK im Zuge der Zellaktivierung durch LPS direkt durch den Virulenzfaktor aktiviert wird. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Kanalaktivierung durch eine indirekte Vermittlung der LPS-Stimulation an den MaxiK möglich ist. Hierzu wurde die cell-attached Konfiguration verwendet und das LPS in die Badlösung appliziert, was eine direkte Interaktion mit den Kanälen im Patch ausschließt. Ein Vorversuch stellte sicher, dass bei dieser Konfiguration nicht bereits durch die mechanische Einflussnahme der Zugabe der Modulatoren eine Aktivierung des als mechanosensitiv beschriebenen MaxiK erfolgt (Pacha et al., 1991). Die Zugabe von HBSS führte zu keiner Veränderung in der Aktivität des Kanals (Abbildung 27).

Aufgrund dieses Ergebnisses konnte nun eine mögliche indirekte Modulation des MaxiK-Schaltverhaltens durch IL-1 und LPS untersucht werden. Die in Abbildung 28 dargestellten Experimente zeigen, dass sowohl die Zugabe von LPS als auch die von IL-1 in die Badlösung eine Steigerung der Offenwahrscheinlichkeit des MaxiK hervorrief, was einen indirekten Mechanismus der Kanalaktivierung unterstützt.

¹ Bei der outside-out Konfiguration wird eine positive Spannung angelegt, da der Kanal hier von der Innenseite der Membran aktiviert wird.

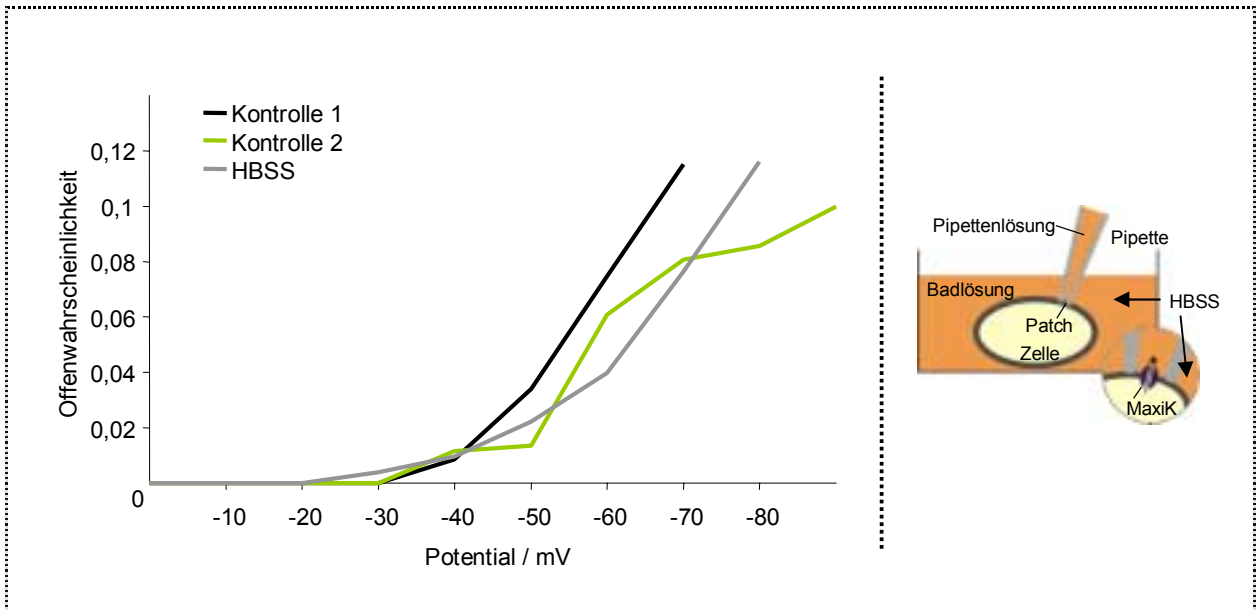
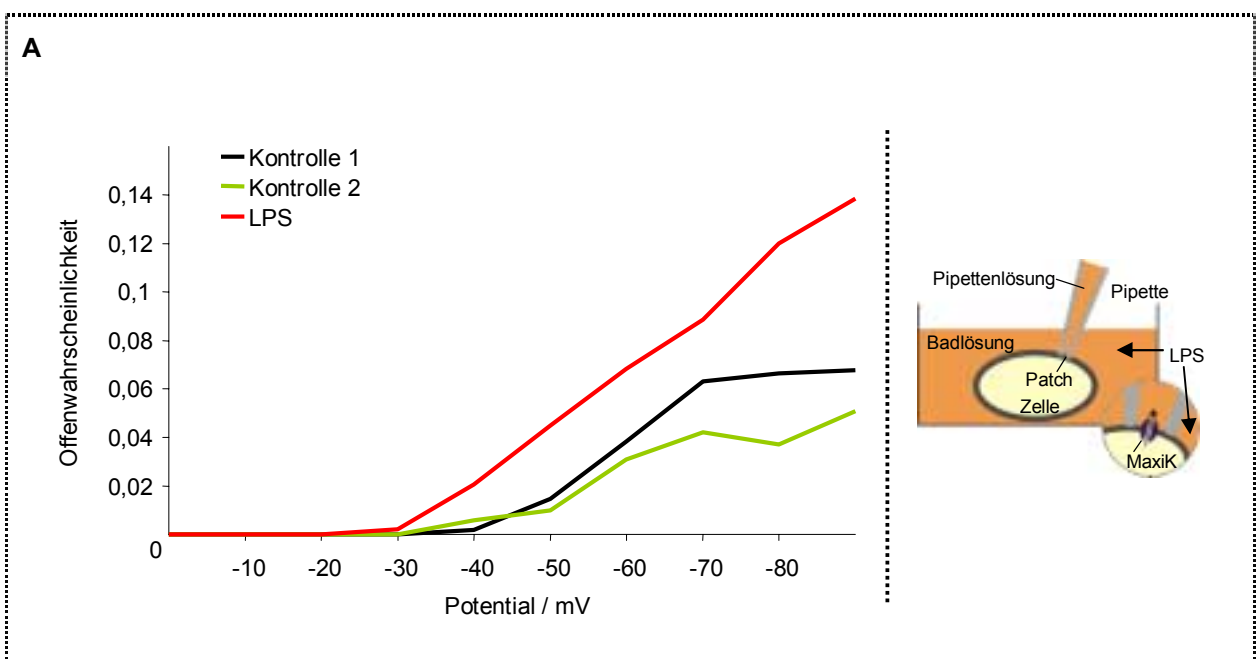


Abbildung 27: Offenwahrscheinlichkeit des MaxiK in HEK293-MaxiK_{GFP}-TLR4/MD2 in Abhängigkeit von der Zugabe von HBSS. Es wurden zunächst im Abstand von 2 min zwei Kontrollmessungen an den unstimulierten Zellen durchgeführt, dann das HBSS zugegeben und 3 min später eine weitere Messung vollzogen. Methode: Patch-Clamp, cell attached¹.



¹ Bei der cell-attached Konfiguration wird im Gegensatz zur outside-out Konfiguration eine negative Spannung angelegt, da der Kanal hier von der Außenseite der Membran aktiviert wird.

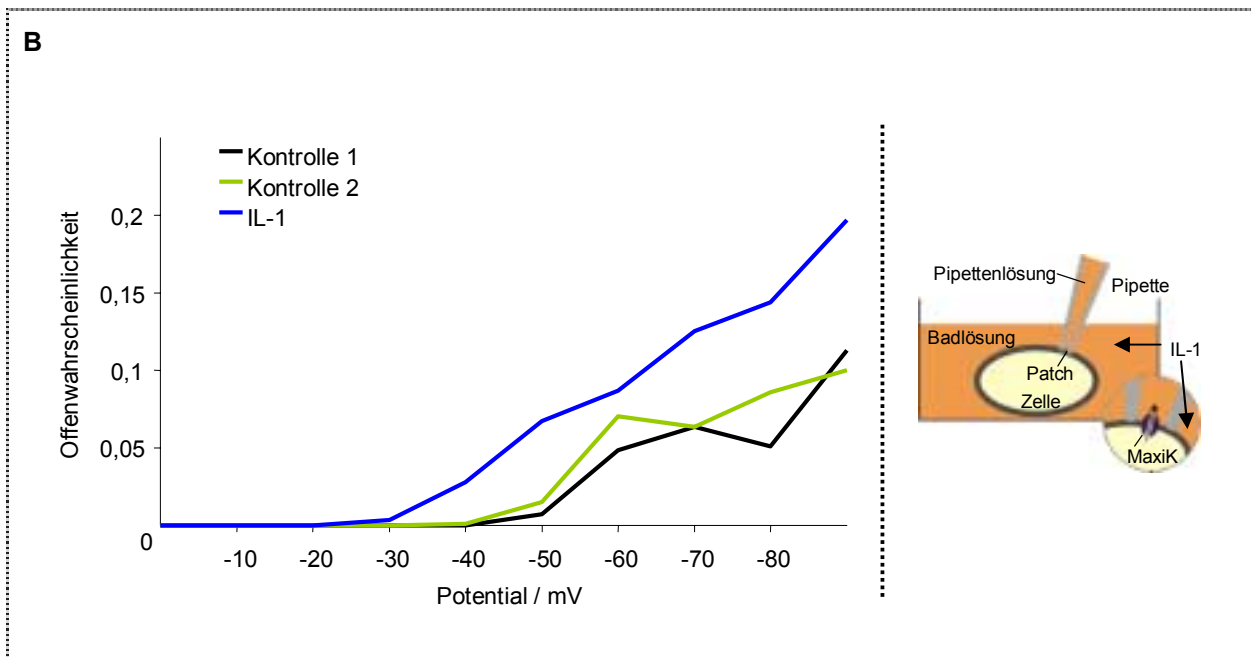


Abbildung 28: Offenwahrscheinlichkeit des MaxiK in HEK293-MaxiK_{GFP}-TLR4/MD2 in Abhängigkeit von (A) LPS und (B) IL-1. Es wurden zunächst im Abstand von 2 min zwei Kontrollmessungen an den unstimulierten Zellen durchgeführt, dann der Stimulus zugegeben und 3 min später eine weitere Messung vollzogen. Methode: Patch-Clamp, cell attached, Konzentrationen: 5 ng/ml LPS, 5ng/ml IL-1; verwendetes Endotoxin: Re LPS.

3.2.2.3. Direkte Aktivierung des MaxiK

Um festzustellen, ob auch eine direkte Aktivierung des MaxiK durch LPS möglich ist, wurde die stabile Transfektante HEK293-MaxiK_{GFP} verwendet, die zwar den Kanal, aber nicht die LPS-Rezeptorproteine TLR4 und MD2 exprimiert. In 5 Experimenten konnte durch die Zugabe von LPS keine Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit festgestellt werden (Abbildung 29 A). Im Gegensatz dazu gelang es, den MaxiK in einem weiteren Versuch nach wirkungsloser Applikation von LPS anschließend mit IL-1 zu aktivieren (Abbildung 29 B). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Aktivierung des MaxiK durch LPS nicht über eine direkte Interaktion des Endotoxins mit dem Ionenkanal vonstatten geht, sondern der Kanal durch andere LPS-induzierte Prozesse aktiviert wird.

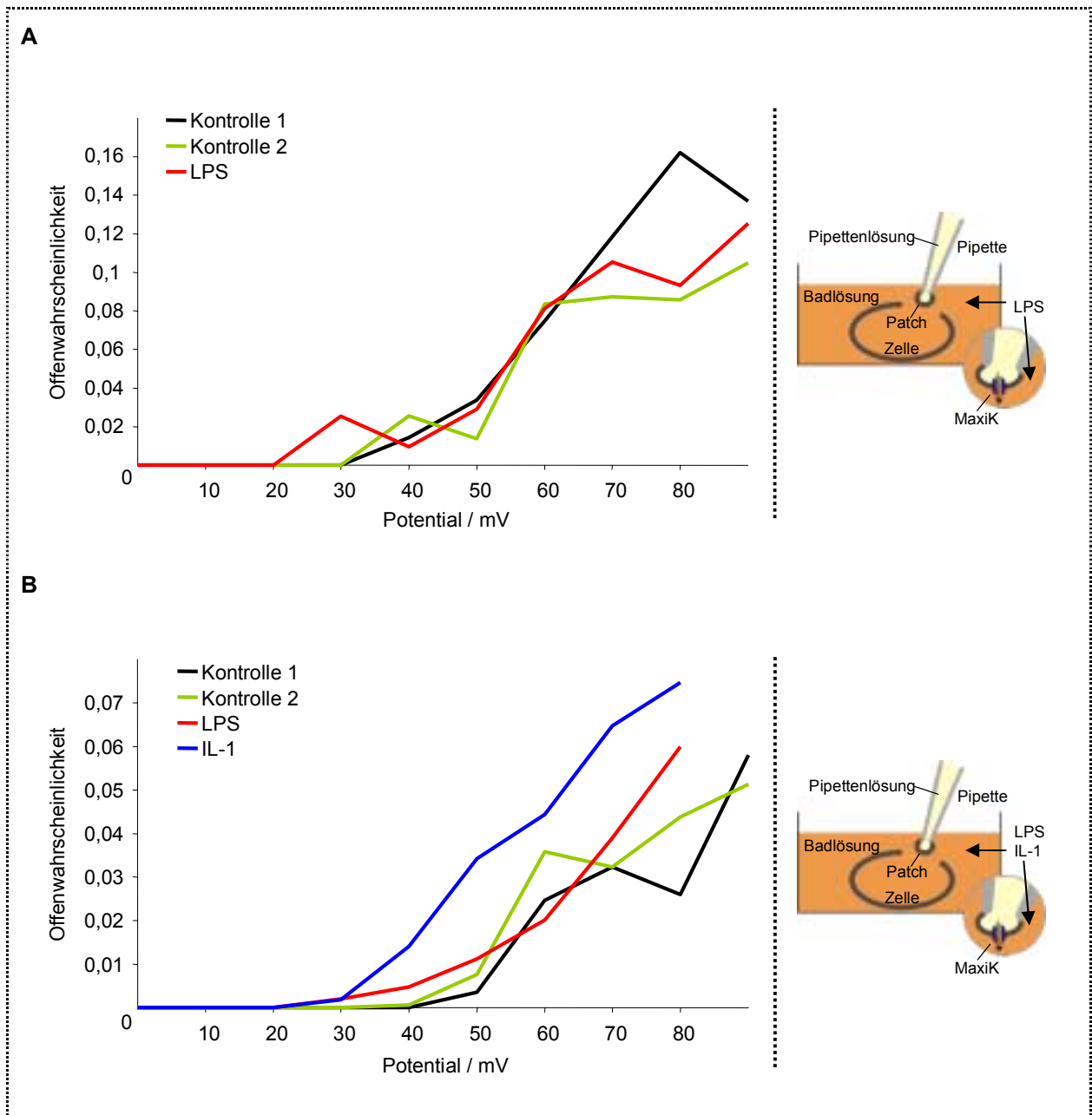


Abbildung 29: Offenwahrscheinlichkeit des MaxiK in HEK293-MaxiK_{GFP} in Abhängigkeit von (A) LPS und (B) IL-1. Es wurden zunächst im Abstand von 2 min zwei Kontrollmessungen an den unstimulierten Zellen durchgeführt, dann LPS zugegeben und 3 min später eine weitere Messung vollzogen. Bei dem Versuch in B) wurde anschließend IL-1 zupipettiert und 3 min später wiederum gemessen. Methode: Patch-Clamp, outside out, Konzentrationen: 5 ng/ml LPS, 5 ng/ml IL-1; verwendetes Endotoxin: Re LPS.

3.3. Lokalisation von MaxiK und Komponenten des LPS-Rezeptorkomplexes

In der Literatur wurde bereits die Formation eines LPS-Rezeptorkomplexes auf Immunzellen beschrieben, in dessen Zentrum TLR4, MD2 und CD14 stehen (s. 1.3.3.1). Diese Proteine liegen in unstimulierten Zellen dissoziiert und nach der Stimulation mit LPS in räumlicher Nähe vor. Die folgenden Experimente sollten klären, ob der MaxiK im Zuge einer solchen Stimulation ebenfalls mit Komponenten des Rezeptorkomplexes assoziiert.

3.3.1. Lokalisation des MaxiK in der Zelle

Die Expression des MaxiK als Fusionsprotein mit GFP ermöglichte diverse Untersuchungen zur Lokalisation des Ionenkanals in der Zelle. Diese wurden mittels Konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) an transfizierten HEK293 Zellen durchgeführt.

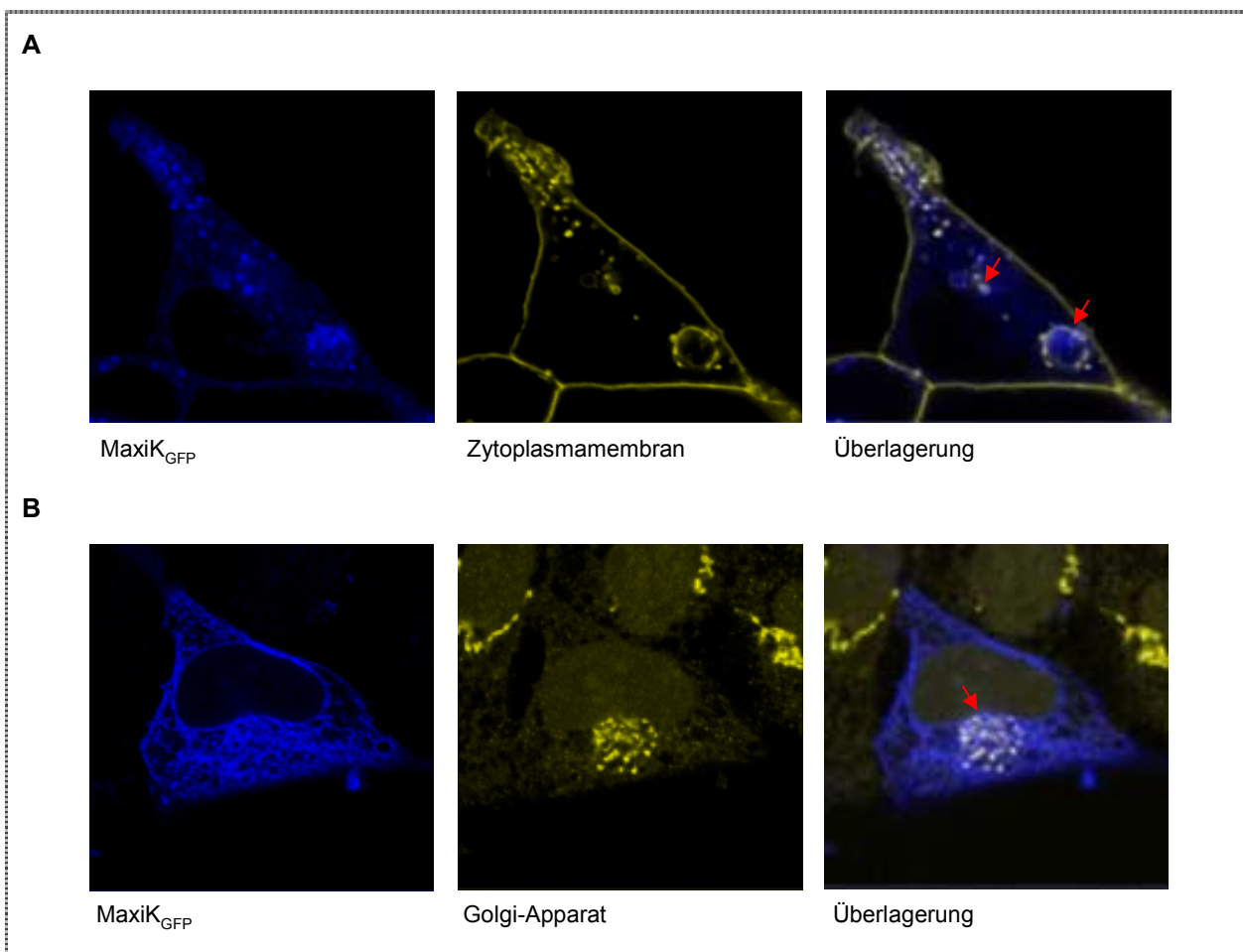


Abbildung 30: Lokalisation von MaxiK_{GFP} (blau) und (A) Zytoplasmamembran (gelb) oder (B) Golgi-Apparat (gelb) in unstimulierten HEK293-MaxiK_{GFP}. Methode: CLSM; Membranfärbung: 1 µg/ml Cholera-toxin Untereinheit B Alexa Fluor647; Färbung des Golgi-Apparates: 1 µg/ml Maus-anti-human Golgin 97, 40 µg/ml Ziege-anti-Maus Alexa Fluor647.

Zunächst wurde mit unstimulierten HEK293-MaxiK_{GFP} Zellen gearbeitet, um ein Bild der räumlichen Verteilung des Ionenkanals in der ruhenden Zelle zu erhalten. In Abbildung 30 A ist eine Aufnahme des MaxiK_{GFP} in Kombination mit einer Zytoplasmamembran-Färbung¹ dargestellt. Wie besonders an den internalisierten Vesikeln (rote Pfeile) zu erkennen ist, wird der Kanal sehr stark in der Membran exprimiert. Dieses Ergebnis bestätigt die bereits mittels Western-Blot erkannte Membranständigkeit des Kaliumionenkanals (s. 3.2.1). Daneben befindet sich der MaxiK auch im Zytoplasma. Die vesikuläre Anordnung verweist auf eine Verteilung in intrazellulären Membransystemen hin. Es ist nicht feststellbar, ob es sich dabei um Kanäle in der Synthesephase handelt. Eine Konzentration des MaxiK im Bereich des Golgi-Apparates (roter Pfeil) ist zu erkennen (Abbildung 30 B).

3.3.2. Lokalisation von MaxiK und TLR4

Im Folgenden wurde die Verteilung von MaxiK_{GFP} und TLR4 im Zuge einer Stimulation von HEK293-MaxiK_{GFP}-TLR4/MD2 Zellen mit LPS untersucht. In unstimulierten Zellen zeigte sich eine deutliche räumliche Trennung der beiden Membranproteine (Abbildung 32). Der Fluoreszenzantikörper-markierte TLR4 war in der Zytoplasmamembran teilweise in hochkonzentrierten Bereichen angesiedelt, die als gelbe Punkte zu erkennen sind. Der MaxiK wies ebenfalls eine Verteilung in distinkte Bereiche auf, die jedoch keine Überschneidung mit denen des TLR4 bildeten.

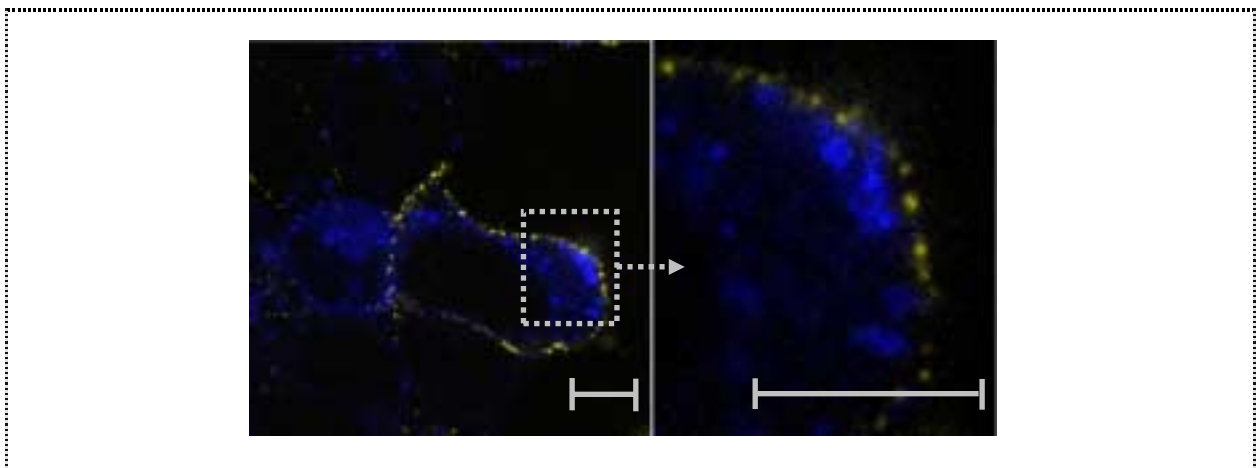


Abbildung 31: Lokalisation von MaxiK_{GFP} (blau) und TLR4 (gelb) in unstimulierten HEK293-MaxiK_{GFP}-TLR4/MD2. Gelb: TLR4, Blau: MaxiK; Konzentrationen: 20 µg/ml Maus-anti-human TLR4, 40 µg/ml Ziege-anti-Maus Alexa Fluor647, 10 ng/ml LPS; Methode: CLSM; Balken: 10 µm.

¹ Für die Zytoplasmamembran-Färbung wurde als Markerprotein die Untereinheit B des AB-Toxins aus *Vibrio cholerae* verwendet, welches an Ganglioside auf der Zellmembran eukaryotischer Zellen bindet.

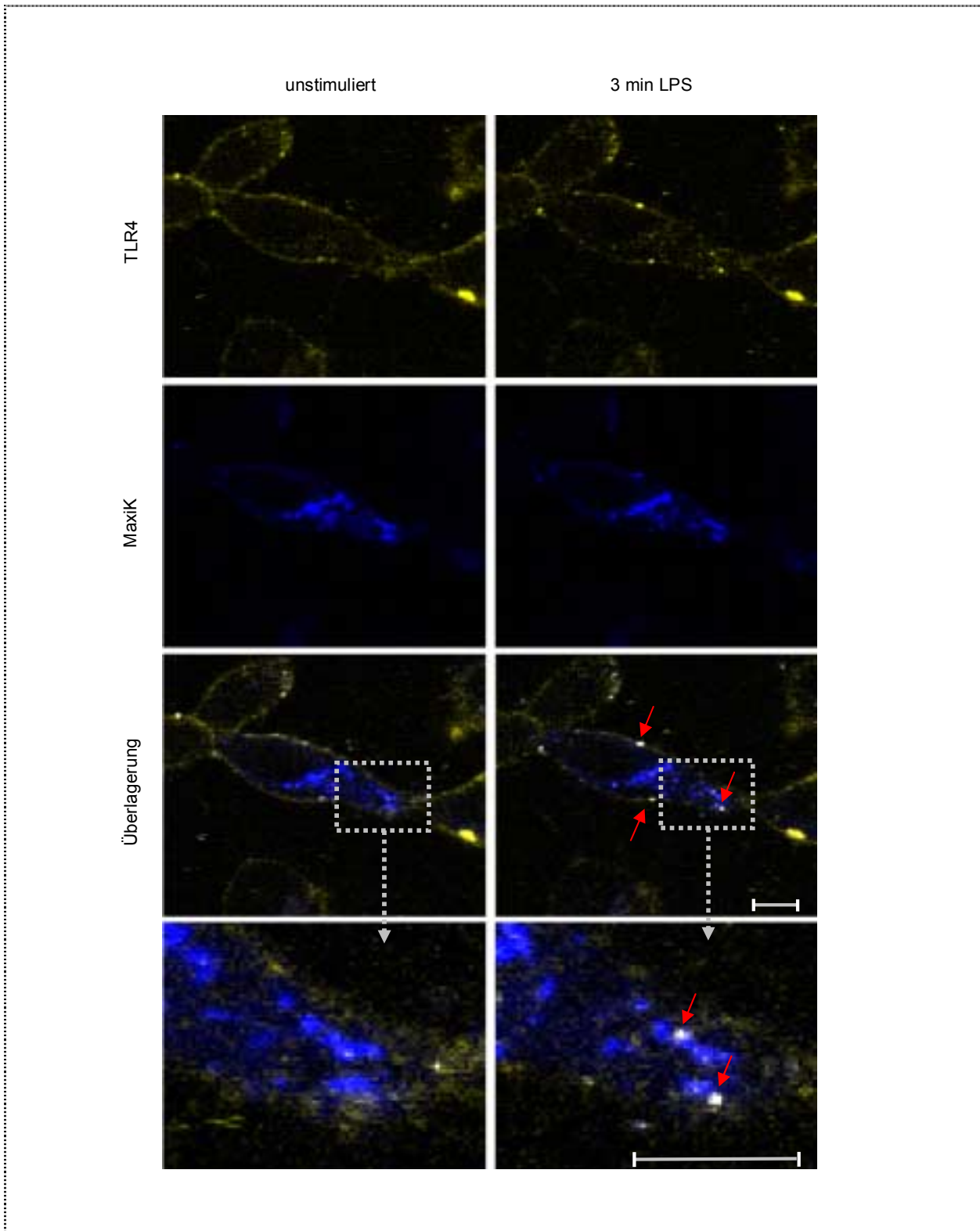


Abbildung 32: Lokalisation von MaxiK_{GFP} (blau) und TLR4 (gelb) in 3 min mit LPS stimulierten HEK293-MaxiK_{GFP}-TLR4/MD2. Gelb: TLR4, Blau: MaxiK, Weiß: Kolokalisation, Rote Pfeile verweisen auf Bereiche der Kolokalisation; Konzentrationen: 20 µg/ml Maus-anti-human TLR4, 40 µg/ml Ziege-anti-Maus Alexa Fluor647, 10 ng/ml LPS; Methode: CLSM; Balken: 10 µm; verwendete Endotoxine: S-Form LPS.

Bereits 3 min nach der Zugabe von LPS traten „weiße Punkte“ auf, die als Resultat der Überlagerung blauer und gelber Punkte entstehen, also einen Hinweis auf eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale und eine räumliche Annäherung von TLR4 und MaxiK im Zuge einer Stimulation mit LPS geben (Abbildung 32 rechts). Die bereits beschriebene Internalisierung des TLR4 im Laufe der Zellaktivierung (Latz et al., 2002) konnte in diesem Experiment bestätigt werden, wobei festgestellt wurde, dass der MaxiK ebenfalls in den internalisierten Vesikeln enthalten war (Abbildung 32, Vergrößerung). Die Detektion des LPS durch die Zelle führt folglich zur Translokation und Annäherung von TLR4 und MaxiK. Dieser Befund wird als Hinweis auf ein funktionelles Zusammenspiel der Membranproteine interpretiert.

3.3.3. Dimerisierung des TLR4 und Lokalisation des LBP

Es wurde beschrieben, dass der TLR4 seine Funktion bei der Zellaktivierung in Form von Homodimeren ausübt (Ozinsky et al., 2000). Für diese Hypothese gibt es jedoch nur wenige experimentelle Belege. Um weitere Erkenntnisse über den Rezeptorkomplexes und den MaxiK zu erhalten, wurde daher zunächst die Dimerisierung des TLR4 mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-basierter Bleichungsversuche (s. 2.2.11) untersucht.

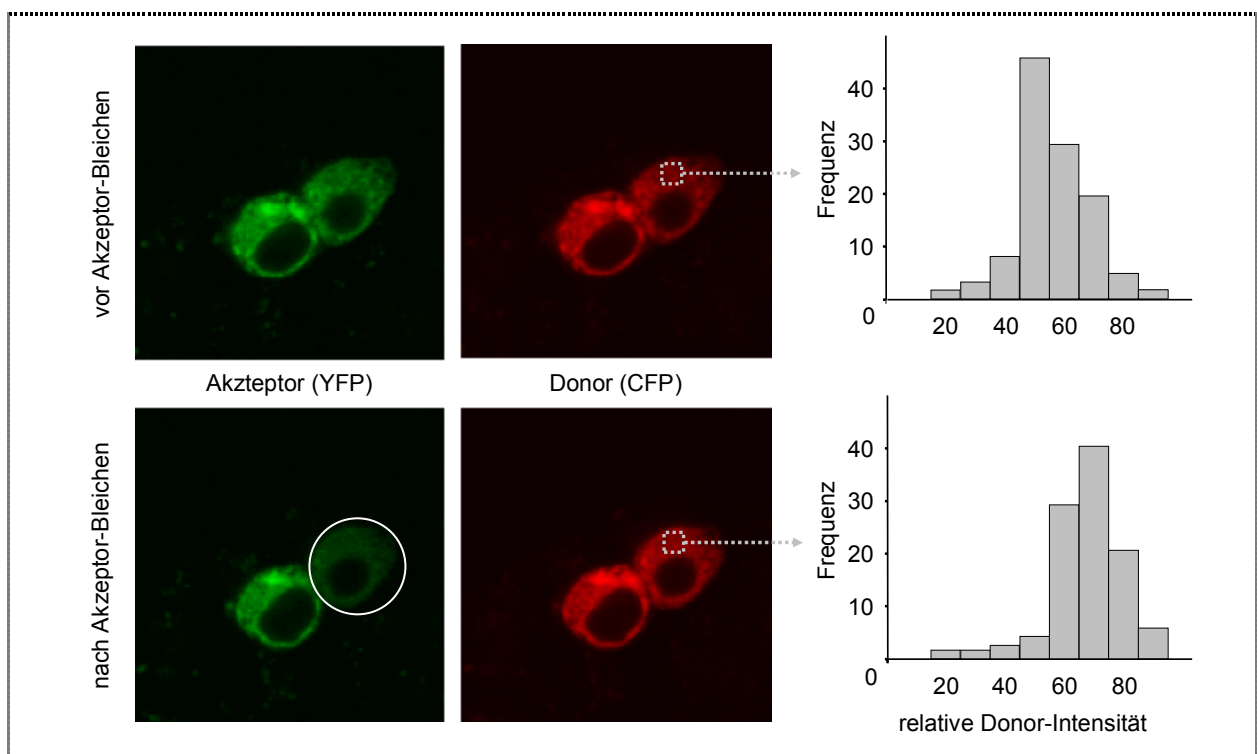


Abbildung 33: Dimerisierung von TLR4_{CFP} (rot) und TLR4_{YFP} (grün) in HEK293-TLR4_{CFP}-TLR4_{YFP}. Die Zellen wurden zunächst photographiert und die relative Donor-Intensität in dem markierten Rechteck ermittelt. Anschließend wurde die mit dem Kreis markierte Zelle auf Wellenlänge des Akzeptors gebleicht und wiederum in dem Bereich des markierten Rechtecks die relative Donor-Intensität bestimmt. Methode: CLSM, FRET.

Hierzu wurden HEK293 Zellen mit den Fusionsproteinen TLR4_{YFP} und TLR4_{CFP} transfiziert (s. 2.2.1.3) Da zwischen CFP und YFP als Donor und Akzeptor bei entsprechender räumlicher Nähe von unter 10 nm ein FRET stattfindet, ist es möglich, die Nähe der Fluoreszenzfarbstoffe durch ein verstärktes Donor-Signal als Resultat auf ein Bleichen des Akzeptors zu bestimmen. Hierzu wurde in den markierten Bereichen in Abbildung 33 vor und nach dem Bleichen mit der Gerätesoftware die Intensität der Donorfluoreszenz bestimmt. Der Anstieg der Donor-Emission¹ nach dem Bleichen bestätigt eine räumliche Assoziation der TLR4-Proteine.

Diese Methode soll in naher Zukunft mit einem entsprechenden FRET-Paar aus TLR4_{CFP} und MaxiK_{YFP} auch weiteren Aufschluss über das tatsächliche Ausmaß der Kolo-kalisation von MaxiK und TLR4 geben.

Als weiterer Bestandteil des Rezeptorkomplexes wurde die Verteilung des mLBP in unstimulierten HEK293 Zellen untersucht. In Abbildung 34 ist die Lokalisation des Fluoreszenzantikörper-markierten TLR4 und einem kovalent fluoreszenzmarkierten LBP in unstimulierten HEK293-TLR4/MD2 Zellen dargestellt. Das LBP zeigt eine membranassoziierte Verteilung in distinkte Bereiche und eine leichte Einwanderung ins Zytoplasma. Ähnlich wie bei TLR4 und MaxiK ist nur eine sehr geringe Kolo-kalisation der beiden Proteine zu verzeichnen. Dieser Versuch soll auf eine mögliche Kolo-kalisation des LBP mit TLR4 und MaxiK im Zuge einer Stimulation der Zellen mit LPS ausgeweitet werden.

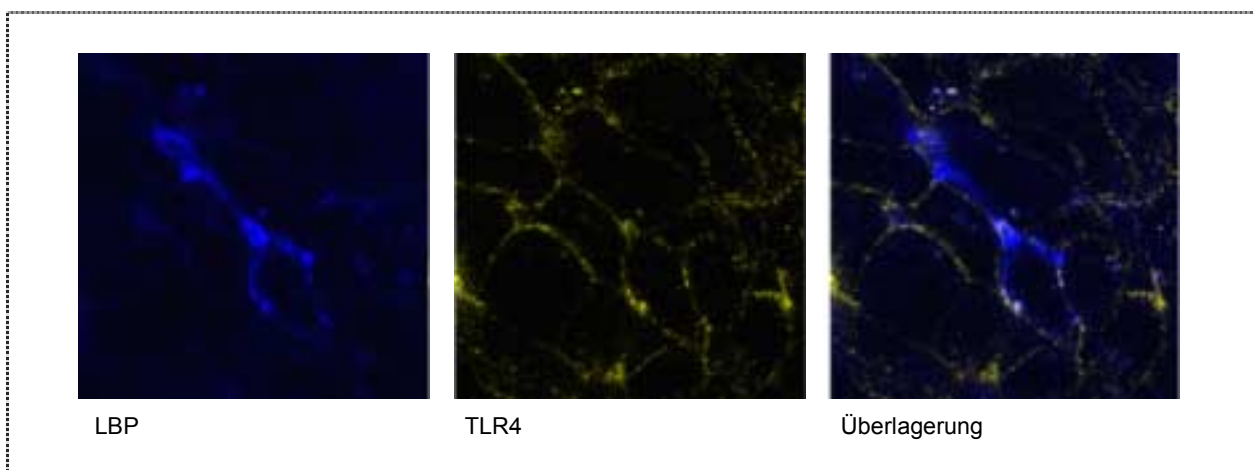


Abbildung 34: Lokalisation von LBP (blau) und TLR4 (gelb) in HEK293-MaxiK_{GFP}-TLR4/MD2. Konzentrationen: 20 µg/ml Maus-anti-human TLR4, 40 µg/ml Ziege-anti-Maus Alexa Fluor647, 1 mg/ml Alexa Fluor488-markiertes humanes LBP; Methode: CLSM.

¹ Der Anstieg der Donor-Intensität ist als Rechtsverschiebung der maximalen Frequenz zu erkennen.

4. DISKUSSION

Die Tatsache, dass Kaliumionenkanälen bei der Aktivierung von Immunzellen durch endogene Aktivatoren wie Interleukine und exogene Stimuli wie das bakterielle Pathogen Lipopolysaccharid aus der Zellhülle Gram-negativer Bakterien eine bedeutende Rolle spielen, ist bereits seit mehreren Jahren bekannt (Haslberger et al., 1992; Maruyama et al., 1994). Die therapeutische Nutzung des Umstandes, dass die Aktivierung von Immunzellen durch spezifische Blocker für Kaliumionenkanäle inhibiert werden kann, wird bereits auf verschiedenen Gebieten angedacht. So wird die Blockade der Spannungs-abhängigen Kaliumionenkanäle Kv1.3 und Kv1.1 zur Behandlung von Zahnwurzelentzündungen vorgeschlagen (Valverde et al., 2005). Des Weiteren wird beschrieben, dass der Kaliumionenkanal „intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel“ bei der experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis eine bedeutende Rolle spielt (Reich et al., 2005). Eben dieser Kaliumionenkanal wird auch als Ansatzpunkt für eine Behandlung der Multiplen Sklerose diskutiert (Madsen et al., 2005). Diese genannten therapeutischen Ansätze beruhen auf der Entdeckung, dass Kaliumionenkanäle bei der Aktivierung von T-Zellen eine wichtige Funktion ausüben und dass die Blockade der Kanäle die Migration und Zytokinproduktion dieser Immunzellen verringert (Beeton et al., 2005).

Ähnliche Erkenntnisse wurden für die Zytokinproduktion durch Makrophagen gewonnen. Es wurde in verschiedenen Arbeitsgruppen erkannt, dass die Aktivierung von Makrophagen durch Lipopolysaccharid, sowie durch weitere bakterielle Virulenzfaktoren wie Peptidoglycan und Lipoteichonsäure, ebenso wie durch das Zytokin IL-1, durch die Blockade von Kaliumionenkanälen verringert werden kann (Blunck et al., 2001; Scheel, 2002; Qiu et al., 2002). Dabei wurde festgestellt, dass der Calciumionen- und Spannungs-abhängige Kaliumionenkanal MaxiK bei der Stimulation humaner Makrophagen mit LPS aktiviert wird und dass die Funktion dieses Ionenkanals für den Prozess der Zellaktivierung von essentieller Bedeutung ist. All diese Virulenzfaktoren sowie das Zytokin IL-1 induzieren die Aktivierung von Makrophagen über Rezeptoren der TLR/IL-1-Familie, die durch eine große Homologie der intrazellulären Domäne (TIR-Domäne) charakterisiert sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen untersucht, die einerseits zur Aktivierung des MaxiK in LPS-stimulierten Makrophagen führen und andererseits die Einflussnahme der Blockade des MaxiK auf die LPS-induzierte Aktivierung der Immunzellen vermitteln.

4.1. Einfluss der MaxiK-Blockade auf die LPS-induzierte Zellaktivierung

Die Funktion des MaxiK ist für die Aktivierung von Makrophagen durch LPS von ausschlaggebender Bedeutung. Wird der Ionenkanal durch den Kanalblocker in seiner Funktion gehemmt, so führt dies zu einer deutlichen Verringerung der Zytokinproduktion (IL-1, TNF α , IL-8, s. 3.1).

Die Blockade des Kanals wurde in der vorliegenden Arbeit durch den MaxiK-spezifischen Ionenkanalblocker Paxilline bewerkstelligt. Die Spezifität dieses Blockers für den MaxiK wurde anhand von Konzentrationsreihen und Vergleichsstudien zwischen Monozyten und Makrophagen überprüft (s. 3.1.1) und konnte gewährleistet werden. Ebenso wurde ein möglicher Einfluss von Nebenwirkungen des Paxilline auf die Zellaktivierung untersucht. Hierzu wird berichtet, dass Paxilline zum einen die Funktion der Calcium-ATPase im endoplasmatischen Reticulum (Bilmen et al., 2002) und zum anderen die Funktion des Inositol-1,4,5-Triphosphat Rezeptors (Longland et al., 2000) im ER inhibieren kann. Da das Paxilline aber weder auf die TNF α -induzierte Aktivierung von Makrophagen noch auf die LPS-induzierte Aktivierung von Monozyten einen Einfluss hatte, kann angenommen werden, dass Nebenwirkungen für die Untersuchung der Einbindung des MaxiK in die Zellaktivierung nicht relevant sind.

Zunächst galt es zu erörtern, ob der MaxiK ein prinzipielles Element zellulärer Aktivierungsmechanismen darstellt. Hierzu wurden Stimulationen von humanen Makrophagen durch TNF α unter Einfluss des spezifischen MaxiK-Blockers Paxilline angestellt und die Produktion von IL-8 durch diese Zellen analysiert (s. 3.1.1). Es stellte sich heraus, dass die Aktivierung der Zellen durch TNF α von der MaxiK-Blockade unbeeinflusst verlief. Der TNF α Rezeptor verfügt nicht wie die TLR über eine TIR-Domäne. Der Kaliumionenkanal ist daher sehr wahrscheinlich als Bestandteil des Aktivierungsmechanismus in Makrophagen einzuordnen, der durch Rezeptoren mit TIR-Domänen angesprochen wird, da seine Aktivierung durch Stimulation von Immunzellen mit IL-1, LPS und weiteren Virulenzfaktoren hervorgerufen wird und die Blockade des Kanals die Aktivierung der Zellen durch diese Stimuli inhibiert (s. 1.4).

In folgenden Experimenten wurde überprüft, ob sich diese Ergebnisse auf Ebene der Transkription Zytokin-kodierender Gene nach Stimulation humaner Makrophagen mit LPS widerspiegeln. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription mehrerer Gene (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , s. 3.1.2) durch die Blockade des MaxiK verringert wurde. Dieser Befund legte nahe, dass sich die Kanalblockade bereits bei den LPS-induzierten Signalwegen auswirkt. Im Gegensatz dazu wurde die TNF α -induzierte Transkription IL-1-kodierender Gene

nicht durch Paxilline beeinflusst, was die Ergebnisse auf Ebene der Zytokinausschüttung bestätigt.

Demzufolge wurden nun die maßgeblichen Signalwege, die im Zuge der Stimulation humaner Makrophagen aktiviert werden, untersucht. Zum einen wurde der Einfluss der MaxiK-Blockade auf die LPS-induzierten MAP-Kinasen ERK und p38 analysiert (s. 3.1.3.1). Es zeigte sich, dass die ERK weder in ihrer Aktivierung noch in ihrer Kinetik beeinflusst wurde. Das Enzym p38 offenbarte nur eine leichte Aktivierung, keine Veränderung in der Kinetik, jedoch eine Verringerung in der Intensität der LPS-induzierten Phosphorylierung unter Einwirkung des MaxiK-Blockers Paxilline. Es wurde bereits zuvor berichtet (Papavlassopoulos, 2002), dass die in der Literatur beschriebene Aktivierung der MAP-Kinase JNK experimentell nicht nachvollzogen werden konnte und daher in diesem Zusammenhang nicht weiter untersucht wurde. Ebenso wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3, der maßgeblich für die Produktion von Mediatoren wie IP-10 („Interferon- γ inducible protein 10“) und Rantes („regulated on activation, normal T cell expressed and secreted“) verantwortlich ist (McWhirter et al., 2004), der aber die Produktion der untersuchten Interleukine und des TNF α nicht wesentlich beeinflusst, nicht untersucht.

Als weiterer LPS-induzierter Signalweg wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B analysiert (s. 3.1.3.2). Es konnte gezeigt werden, dass die LPS-induzierte Nukleartranslokation des NF κ B in humanen *in vitro* ausdifferenzierten Makrophagen durch den MaxiK-Blocker Paxilline drastisch inhibiert wurde, während die TNF α -induzierte Translokation des Transkriptionsfaktors ungehindert stattfand. Dieses Ergebnis konnte auch bei analogen Versuchen an *in vivo* ausdifferenzierten Alveolarmakrophagen der Ratte (*Rattus norvegicus*) erzielt werden. Daraus lässt sich folgern, dass der Mechanismus, mittels welchem der MaxiK in die LPS-bedingte Aktivierung von Makrophagen eingebunden ist, spezieübergreifend und unabhängig von der Art der Ausdifferenzierung der Immunzellen ist. Die Intensität der Wirkung des Paxilline auf diesen Zweig der LPS-induzierten Signalwege wurde als ausschlaggebend für die Verringerung in der Zytokinantwort angesehen. Daher wurde in einem weiteren Schritt die Degradation des zytoplasmatischen Inhibitors für NF κ B, I κ B, näher untersucht. Es erwies sich, dass die Applikation des Paxilline die LPS-bedingte Degradation des I κ B in humanen Makrophagen verringerte, ohne die Kinetik des NF κ B-Inhibitors zu beeinflussen.

Mögliche Mechanismen für die Interaktion des MaxiK bei der Zellaktivierung

Durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse kann der mögliche Einflussbereich des MaxiK auf die LPS-induzierte Zellaktivierung klar eingegrenzt werden (Abbildung 35). Die Kanalblockade verringert die Zellaktivierung in einem praetranskriptionellen Schritt. Die untersuchten Signalwege zeigen eine Abhängigkeit von der Funktion des Kaliumionenkanals bei Signalelementen, die vor der Degradation des NF κ B-Inhibitors I κ B liegen. Da die Aktivierung der Signalwege von p38 und NF κ B durch das Paxilline inhibiert wurden, ohne eine Veränderung der Kinetiken dieser Enzyme zu bewirken und die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK unbeeinflusst blieb, kann gefolgert werden, dass die Funktion des MaxiK für die MyD88-abhängigen und -unabhängigen Signalwege gleichermaßen bedeutsam ist. Diese Schlussfolgerung wird durch den Umstand unterstützt, dass die MaxiK-Blockade die Zellaktivierung durch IL-1 und verschiedene Virulenzfaktoren wie LPS, Peptidoglycan und Lipoteichonsäure behindert (Scheel, 2002) und die Rezeptoren dieser Stimuli verschiedene Adapter rekrutieren (Akira et al., 2003).

Da jedoch die Aktivierung der humanen Makrophagen sowie der Alveolarmakrophagen der Ratte durch TNF α nicht von der Blockade des MaxiK verringert wurde, ist ein Einwirken des Ionenkanals auf gemeinsame Abschnitte LPS- und TNF α -induzierter Signalwege unwahrscheinlich. Es wird daher als wahrscheinlich erachtet, dass die Funktion des MaxiK für die Funktion TIR-Domänen-abhängiger Signalelemente, die vor der Aktivierung des TRAF6 induziert werden, von essentiellen Charakter ist.

Durch den Nachweis, dass der Ionenkanalblocker Paxilline bei den verwendeten Konzentrationen spezifisch für den MaxiK ist und die beschriebenen Nebenwirkungen des Paxilline für die angestellten Untersuchungen nicht von Bedeutung waren, konnte die verringerte Produktion von Mediatoren durch LPS-stimulierte Makrophagen auf das Ausbleiben MaxiK-bedingter Effekte zurückgeführt werden. Hierzu sind drei Konsequenzen der Aktivierung des MaxiK zu bedenken: Das Öffnen des MaxiK führt i) zu einer Änderung der Kaliumionen-Konzentration im Zellinneren wie im Medium, ii) zu einer Änderung des Potentials über der Zellmembran und iii) zu der Rekrutierung von Fak („focal adhesion kinase“). Letztere wurden als Vermittler der Aktivierung von Osteoblasten durch den mechanisch aktivierten MaxiK erkannt (Rezzonico et al., 2003) Die eigentliche Funktion des Ionenkanals ist hierbei jedoch nicht von Bedeutung, da die Aktivierung des MaxiK durch Prostaglandin E2-vermittelten Calciumionen-Einstrom in die Zelle nicht zur Rekrutierung von Fak führte. Für Fibroblasten wird eine bedeutende Rolle der Fak bei der LPS-induzierten MyD88-abhängigen IL-6-Produktion beschrieben (Zeisel et al., 2005). Da die Aktivierung der Fak jedoch von der Funktion des MaxiK als Transporter von Kaliumionen unabhängig ist und somit auch von den LPS-induzierten Kaliumströmen nicht aktiviert wird, wird diese Kinase

nicht als bedeutender Eingriffspunkt des MaxiK in die LPS-induzierte Zellaktivierung betrachtet.

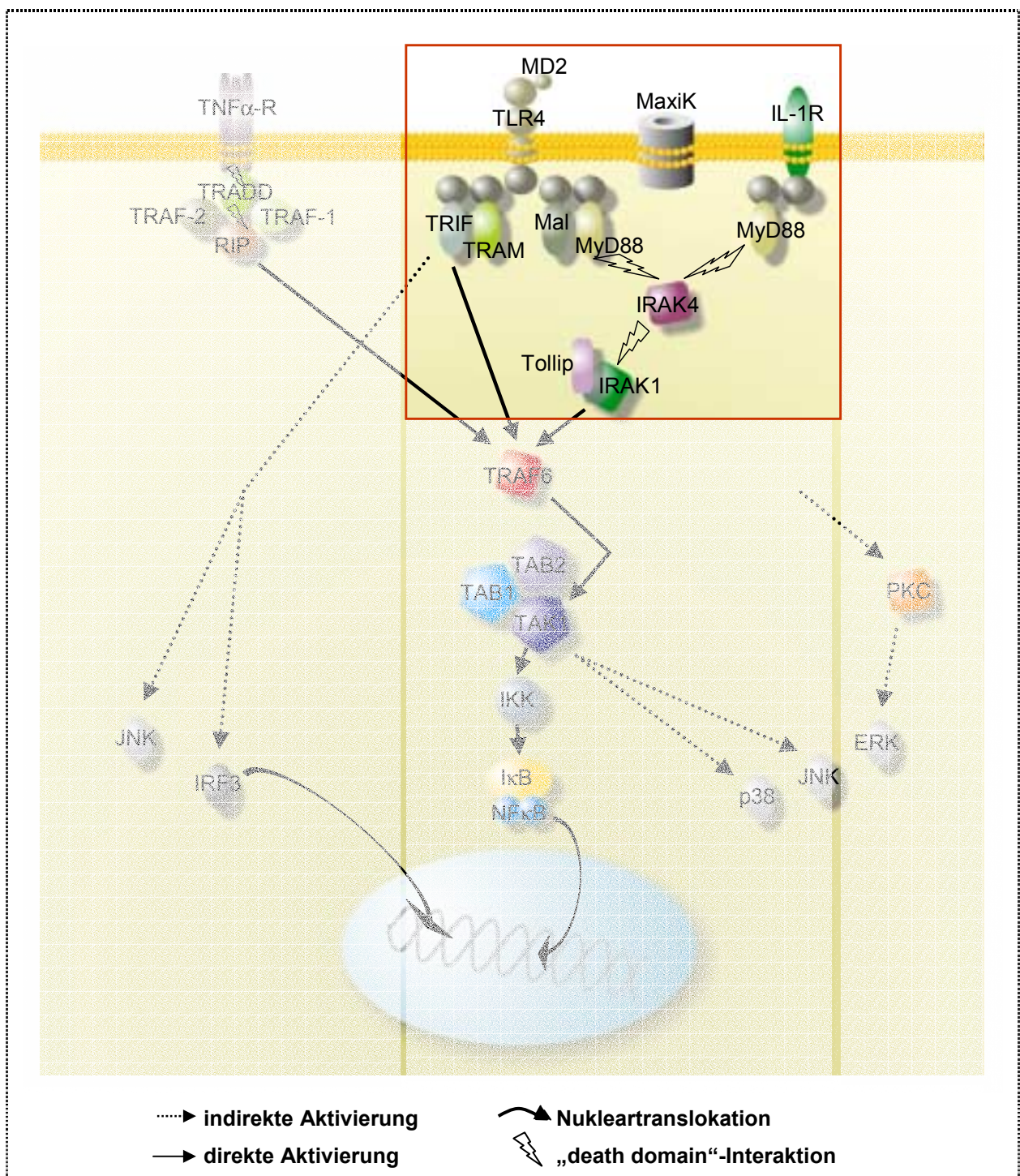


Abbildung 35: Wahrscheinlicher Einflussbereich des MaxiK bei den LPS-induzierten Signalwegen. (Erläuterungen s. Text, Beschreibung der Signalwege s. 1.3.3)

4.1.1. Änderung des Membranpotentials durch den MaxiK

Der MaxiK-bedingte Durchsatz von Kaliumionen bedeutet einen raschen Transport positiver Ladungsträger vom Zytoplasma durch die Zellmembran in das Medium. Dies hat bei ruhendem Membranpotential eine Hyperpolarisation der Zellmembran und bei einer depolarisierten Membran eine Repolarisation zur Folge.

Die Spannungs-abhängigen Kaliumionenkanäle vom Typ des MaxiK reagieren aufgrund ihrer strukturellen Beschaffenheit auf Änderungen des Membranpotentials (Jan und Jan, 1997). Es wird zwar von einer durch LPS induzierten Hyperpolarisation in glatter Muskulatur berichtet (Wu et al., 2004a), jedoch gibt es derzeit weder Hinweise auf derartige Effekte in Immunzellen, noch auf eine Beteiligung des MaxiK an Membranhyperpolarisationen.

Ähnlich ihrer Funktion in Nervenzellen wird für die Calciumionen- und Spannungs-abhängigen Kaliumionenkanäle eine wichtige Rolle bei der Repolarisation der Zellmembran nach einer Depolarisation in aktivierten Immunzellen vermutet (Devaux et al., 2004).

In diesem Zusammenhang wurde die Aktivierung des NADPH-Oxidase (Nox)-Komplexes in Neutrophilen Granulozyten beschrieben, der einen aktiven Elektronentransport durch die Zellmembran und die Membran phagozytischer Vakuolen durchführt. Dies bewirkt zum einen eine Depolarisation der Membran, zum anderen einen Einstrom von Calciumionen in die Zelle (Ahluwalia et al., 2004). Diese Effekte werden durch den MaxiK-vermittelten Ausstrom von Kaliumionen aus der Zelle und in die Vakuolen ausgeglichen (Cross und Segal, 2004). Es wurde erkannt, dass dieser Strom von Kaliumionen in die Lysosomen essentiell für die Aktivierung reaktiver Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) ist, da die Blockade des MaxiK durch den spezifischen Blocker Iberiotoxin die Abtötung phagozytierter Keime durch ROS verhinderte. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Nox4 im Zuge einer Stimulation von transfizierten HEK293 Zellen durch eine Interaktion mit TLR4 aktiviert wird und die Blockade des Nox4 die Aktivierung des NF κ B verhindert (Park et al., 2004). Die Aktivierung des Nox4 wird dabei wahrscheinlich durch das GTP-bindende Protein Rac vermittelt (s. Abbildung 36), das bei der Stimulation von Immunzellen durch LPS aktiviert wird (O'Neill, 2000).

Bei einer gegenseitigen Abhängigkeit der Funktionen von MaxiK und Nox4 besteht hier ein möglicher Einfluss der Kanalfunktion (s. Abbildung 37). Die Blockade des MaxiK könnte zu einer Inhibition des Nox4 und damit zu einer Verringerung der NF κ B-Translokation führen.

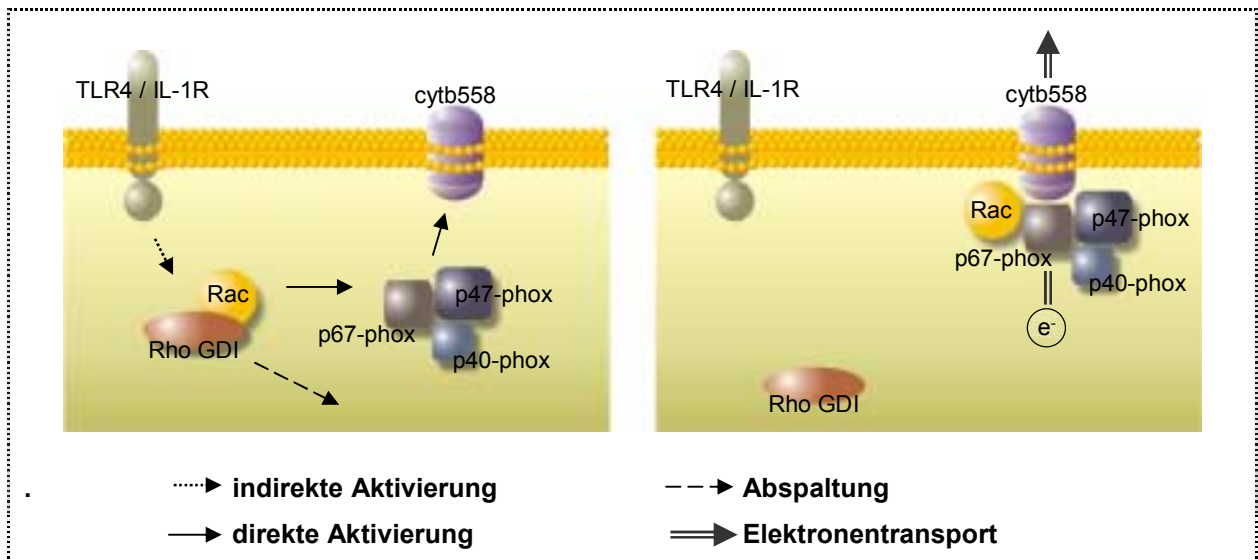


Abbildung 36: Aktivierung des Nox4 durch TLR4-aktiviertes Rac. Nox4 besteht aus dem membranständigen Cytochrom B558 (cytb558) sowie den zytoplasmatischen Proteinen p40-phox, p47-phox und p67-phox, die durch Bindung an Rac aktiviert werden, ihrerseits an cytb558 binden und somit den Komplex aktivieren. Die Aktivierung des Rac wird durch die Abspaltung des „RhoGDP dissociation inhibitors“ (RhoGDI) bewerkstelligt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente durchgeführt, mittels derer untersucht werden sollte, ob das beschriebene Verhalten des Nox4 in Granulozyten auch in humanen Makrophagen nachvollziehbar ist. Eine Aktivierung der Nox4 konnte jedoch nicht gezeigt werden.

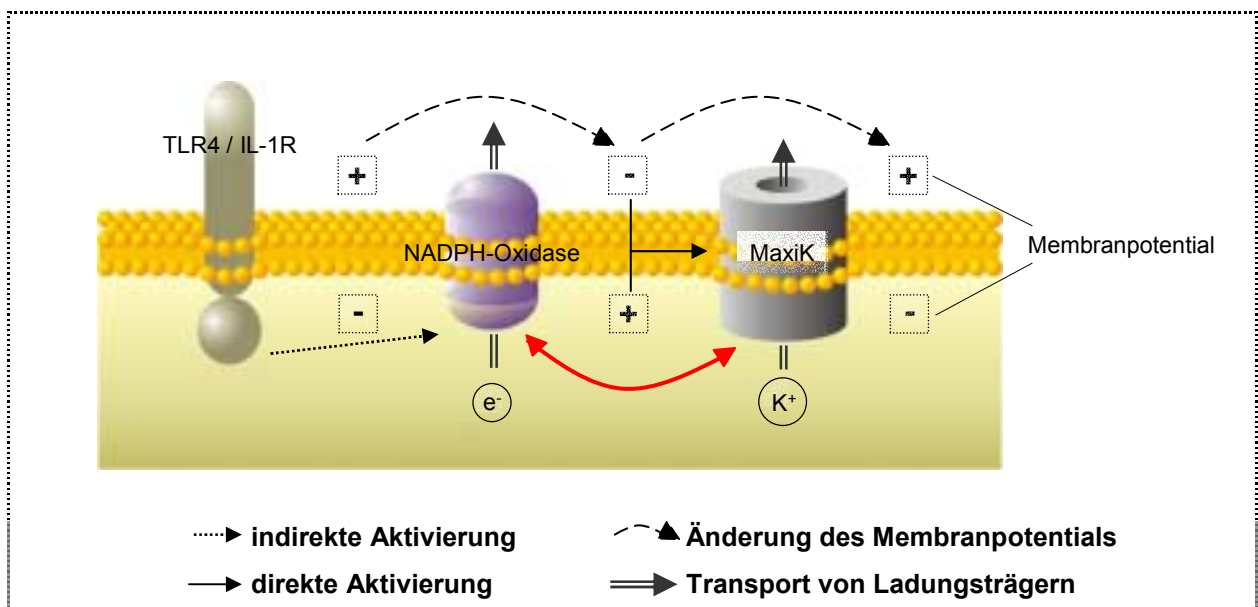


Abbildung 37: Aktivierung des MaxiK durch eine NADPH-Oxidase-bedingte Membrandepolarisation.

4.1.2. Änderung der Kaliumionen-Konzentration durch den MaxiK

Der durch den aktivierten MaxiK verursachte Ausstrom von Kaliumionen hat Auswirkungen auf die intra- und extrazellulären Kaliumionen-Konzentrationen. Die Veränderung der extrazellulären Kaliumionen-Konzentration ist auf einen sehr begrenzten Bereich um die Zelle beschränkt und aufgrund der Diffusion der Ionen nur von kurzer Dauer. Ein Einfluss dieser kurzfristigen und lokal begrenzten Erhöhung der extrazellulären Kaliumionen-Konzentration müsste sich entweder auf den Stimulus selbst, ein Serumprotein oder den Rezeptor des Stimulus auswirken. Die MaxiK-Blockade wirkt sich auf die Zytokinantwort auf mehrere exogene Stimuli, wie LPS, Peptidoglycan und Lipoteichonsäure, sowie auf den endogenen Stimulus IL-1 aus. Eine Interaktion von Kaliumionen mit all diesen heterogenen Substanzen ist unwahrscheinlich. Des Weiteren verfügen diese Stimuli über keine bekannte Gemeinsamkeit bei der Vermittlung durch Serumproteine an die Rezeptoren, was den Einfluss von Kaliumionen an dieser Stelle ebenfalls ausschließt. Die Rezeptoren dieser Substanzen gehören zwar alle der TIR-Familie an, jedoch ist diese durch ausgeprägte Homologie der zytoplasmatischen Domänen geprägt und weist deutliche Unterschiede im extrazellulären Bereich auf (Akira et al., 2003). Außerdem wurden in unserer Arbeitsgruppe durch Stimulation humaner Makrophagen mit LPS unter erhöhter extrazellulärer Kaliumionen-Konzentration ähnliche Ergebnisse erzielt, wie unter Einwirkung des MaxiK-Blockers Paxilline: die Zytokinantwort auf LPS wurde verringert (Scheel, 2002). Es wird daher als unwahrscheinlich betrachtet, dass das Ausbleiben einer veränderten extrazellulären Kaliumionen-Konzentration durch die Blockade des MaxiK für die drastische Verringerung der Zytokinantwort auf LPS verantwortlich ist.

Von größerer Bedeutung könnte die Verringerung der intrazellulären Kaliumionen-Konzentration durch die Aktivierung des MaxiK in Makrophagen bei der Stimulation mit LPS sein. Mehrfach wurde berichtet, dass Caspasen durch verringerte intrazelluläre Kaliumionen-Konzentrationen aktiviert werden (Caballero-Benitez und Moran, 2003; Kahlenberg und Dubyak, 2004). Von besonderem Interesse sind hierbei die Caspasen 1 und 3. Die Caspase 1 wird in Makrophagen der Maus durch die Applikation von LPS und ATP aktiviert (Kahlenberg und Dubyak, 2004). Dabei vermittelt der Calciumionenkanal purinerge P2X₇ (s. 4.2) die Aktivierung der Caspase 1. Auch in Colon-Epithelzellen wird die Caspase 1 über MyD88-unabhängige Mechanismen durch LPS aktiviert. (Singh et al., 2005). In humanen Makrophagen ist die LPS-induzierte IL-1-Produktion von der Aktivierung der Caspase 1 abhängig (Martinon et al., 2002; Basak et al., 2005).

Ebenso wird die Caspase 3 in verschiedenen Zelltypen durch LPS aktiviert (Nolan et al., 2003; Eley et al., 2005). Auch hier spielen MyD88-unabhängige Signalwege (Jung et al., 2005) und der P2X₇ eine bedeutende Rolle (Sylte et al., 2005).

Während für die Caspase 3 eine Abhängigkeit von der MAP-Kinase p38 beschrieben wird (Nolan et al., 2003), bestehen Berichte, die eine Induktion von p38 und NF κ B durch Caspase 1 in LPS-aktivierten 293T Zellen beschreiben (Lamkanfi et al., 2004). Dieser Befund korreliert auf markante Art und Weise mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Demnach ist die Hypothese naheliegend, dass der LPS-induzierte Kaliumionen-Ausstrom durch den MaxiK (möglicherweise durch die LPS-bedingte Aktivierung des P2X₇ vermittelt, s. 4.2) die Caspase 1 aktiviert. Diese wiederum ist für die Induktion von p38 und NF κ B notwendig (s. Abbildung 38). Ein Ausbleiben der Funktion des MaxiK verhindert somit die Aktivierung der Caspase 1, was sich wiederum inhibierend auf die Aktivierung von p38 und NF κ B auswirkt.

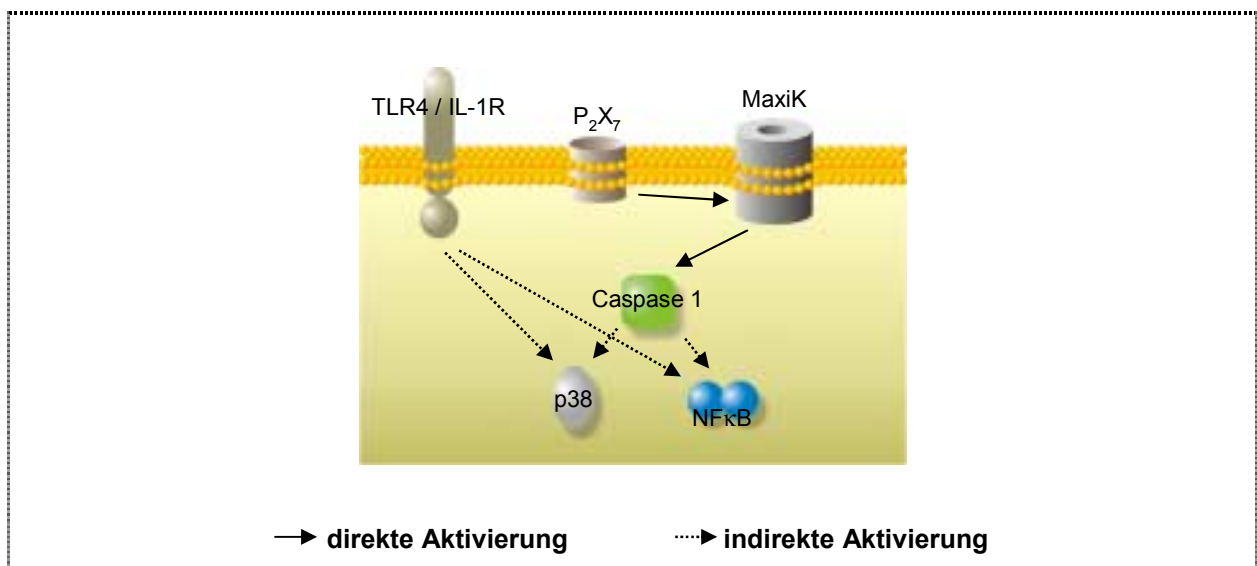


Abbildung 38: Mögliche Abhängigkeit der p38- und NF κ B-Aktivierung von einer MaxiK-induzierten Caspase 1-Aktivierung.

4.2. Aktivierung des MaxiK

In den vorhergehenden Arbeiten zur Aktivierung des MaxiK in humanen, *in vitro* ausdifferenzierten Makrophagen durch LPS wurde festgestellt, dass der Ionenkanal binnen weniger Minuten nach Zugabe des Stimulus eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit aufweist (Blunck, 1999). Da es sich bei diesen Experimenten um Patch-Clamp Versuche in der outside-out Konfiguration (s. 2.2.10) handelte, wurde zunächst angenommen, dass die Kanalaktivierung durch eine direkte Interaktion des LPS mit dem Kanalprotein ausgelöst wird. Es musste davon ausgegangen werden, dass in dieser Konfiguration keine intrazellulären Signalelemente zur Vermittlung einer indirekten Aktivierung zwischen Rezeptor und Ionenkanal zur Verfügung standen. Es erwies sich jedoch, dass nicht nur LPS, sondern auch weitere Virulenzfaktoren wie Peptidoglycan sowie der endogene Stimulus IL-1 den MaxiK aktivieren (Scheel, 2002). Es ist als unwahrscheinlich zu betrachten, dass all diese Stimuli

den MaxiK durch eine direkte Interaktion aktivieren. Zwar verfügen die bakteriellen Virulenzfaktoren über hydrophobe Strukturelemente, die eine Membraninterkalation dieser Moleküle ermöglichen, wodurch eine sterische Einflussnahme auf den mechanosensitiven MaxiK erfolgen könnte, doch gibt es keine Hinweise für eine Membraninteraktion des IL-1. Hinzu kam die Erkenntnis, dass intrazelluläre (und natürlich membranassoziierte) Signalproteine sehr wohl in „excised patches“ funktionstüchtig vorhanden sein können (Bielefeldt und Jackson, 1994; Hall und Armstrong, 2000).

Es wurde daher im Rahmen dieser Arbeit versucht, den Mechanismus der Aktivierung des MaxiK bei der Stimulation humaner Makrophagen mit LPS aufzuklären.

Zu diesem Zweck wurden HEK293 Zellen, die weder den MaxiK noch die Bestandteile des LPS-Rezeptorkomplexes TLR4 und MD2 exprimieren, mit verschiedenen Kombinationen dieser Proteine transfiziert. Die Expression der Proteine und die Responsivität von Zellen, die TLR4 und MD2 exprimieren, auf LPS wurde überprüft und konnte gewährleistet werden (s. 3.2.1).

In diesem Zusammenhang sollte betont werden, dass die angestellten Untersuchungen an einer gentechnisch veränderten Zelllinie und nicht an Primärzellen durchgeführt wurden. Es ist somit nicht mit Sicherheit gegeben, dass nach der Transfektion eines Proteins wie des MaxiK auch die komplette enzymatische Maschinerie zur Modulation der Funktion dieses Proteins in der Zelle vorhanden ist. Obwohl HEK293 Zellen ein bewährtes System zur Untersuchung von transfizierten Ionenkanälen sind (Varghese et al., 2005), musste in diesem konkreten Fall davon ausgegangen werden, dass gewisse regulatorische Elemente, die die Funktion des MaxiK beeinflussen, nicht vorhanden sind.

Unter diesen Voraussetzungen wurde zunächst überprüft, ob die auf Makrophagen erzielten Ergebnisse im HEK293-System reproduziert werden konnten (s. 3.2.2.1). Durch die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des MaxiK nach Stimulation mit LPS konnte gezeigt werden, dass die in Makrophagen in der outside-out Konfiguration festgestellte Aktivierung des Kanals durch LPS auch in HEK293-MaxiK_{GFP}-TLR4/MD2 Zellen stattfindet. Dies lässt schließen, dass die Zelllinie ggf. über die notwendigen intrazellulären Regulatoren zur Aktivierung des MaxiK verfügt. Des Weiteren wurde in diesem Experiment der Einzelkanalstrom des MaxiK in Abwesenheit und Anwesenheit von LPS überprüft. Es zeigte sich, dass, wie bereits bei Makrophagen beobachtet, die Zugabe des LPS zwar eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit, aber keine Veränderung des Einzelkanalstroms in den HEK293 Zellen herbeiführte.

In den folgenden Experimenten sollte dann geklärt werden, ob der MaxiK durch LPS und IL-1 direkt oder indirekt aktiviert wird. Hierfür wurden zunächst Experimente an HEK293-MaxiK_{GFP}-TLR4/MD2 Zellen in der cell-attached Konfiguration durchgeführt (s. 3.2.2.2). Dabei

wurde der Stimulus außerhalb der Pipette zugegeben, so dass die Kanäle im Patch nicht in direkten Kontakt mit LPS und IL-1 kommen konnten. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass der MaxiK sowohl durch LPS als auch durch IL-1 indirekt aktiviert werden konnte. Da eine indirekte Aktivierbarkeit eine direkte Aktivierung des MaxiK durch LPS nicht ausschließt, wurden weitere Versuche in der outside-out Konfiguration durchgeführt. Diesmal wurden jedoch Transfektanten verwendet, die nur den MaxiK, aber nicht TLR4/MD2 exprimierten (s. 3.2.2.3). In keinem von fünf Experimenten konnte eine Aktivierung des MaxiK durch LPS festgestellt werden, wobei in einem der Experimente die nachträgliche Zugabe von IL-1 eine Aktivierung des Kanals herbeiführte. Diesbezüglich sei nochmals erwähnt, dass HEK293 Zellen endogen den IL-1 Rezeptor exprimieren. Aufgrund dieser Befunde ist eine direkte Aktivierung des MaxiK durch LPS unwahrscheinlich. Diese Daten korrelieren mit vorhergehenden Ergebnissen, nach welchen die Inhibition des IL-1 Rezeptors durch einen Antagonisten die Aktivierung des MaxiK in humanen Makrophagen verhinderte (Scheel, 2002).

Diese Ergebnisse weisen auf einen indirekten Mechanismus zur Aktivierung des MaxiK durch LPS und IL-1 hin. Auf der Grundlage der bisher bekannten Mechanismen zur Aktivierung von MaxiK können für eine solche Aktivierung des Ionenkanals drei verschiedene Prozesse angenommen werden. i) Eine LPS- bzw. IL-1 -induzierte Membrandepolarisation, ii) eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration und iii) eine Modulation des MaxiK durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung.

4.2.1. Aktivierung des MaxiK durch Calciumionen und Membrandepolarisation

Eine Membrandepolarisation kann auf mehrere Arten vonstatten gehen. Zum einen wird berichtet, dass der purinerge Calciumionenkanal P2X₇, der von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (Solle et al., 2001), an der Aktivierung der Phagozyten durch LPS beteiligt ist (Aga et al., 2004). Es wird weiterhin beschrieben, dass der Einstrom von Calciumionen in aktivierte Schwann-Zellen maßgeblich durch den P2X₇ bewerkstelligt wird und dass dieser Einstrom für nachfolgende Transporte von Kaliumionen hauptverantwortlich ist (Colomar und Amedee, 2001). Hierbei wird eine kombinatorische Wirkung der erhöhten intrazellulären Calciumionen-Konzentration und der durch den P2X₇ hervorgerufenen Membrandepolarisation zur Aktivierung des MaxiK postuliert.

Des Weiteren kann die bereits beschriebene Membrandepolarisation durch den NADPH-Oxidase-Komplex (s. 4.1.1) eine Aktivierung des MaxiK verursachen.

4.2.2. Aktivierung des MaxiK durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung

Ausgehend von zwei verschiedenen Phosphorylierungszuständen des Kanalproteins werden für die Aktivierung des MaxiK zwei verschiedene Mechanismen beschrieben.

Zum einen besteht die Möglichkeit, dass der MaxiK konstitutiv phosphoryliert vorliegt und unter dem Einfluss von Serin/Threonin-Phosphatasen aktiviert wird (Abbildung 39 A). Dieser Befund wurde zum einen an MaxiK-transfizierten 293T-Zellen festgestellt (Alioua et al., 2002), zum anderen an Nervenzellen (Tian et al., 1998) und Tumorzellen der Rattenhypophyse (Hall und Armstrong, 2000). In den von diesen Arbeitsgruppen angestellten Patch-Clamp Experimenten erwies sich die Applikation von cAMP- (PKA) und cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG) als inhibitorisch für die Kanalfunktion, was schließen lässt, dass die Phosphorylierung des Kanals die Aktivierung verhindert. Dabei werden sämtliche Struktureinheiten des MaxiK, also α - und β -Untereinheit, sowie der Tail als mögliche Phosphorylierungsstellen in betracht gezogen. Zudem wird die Aktivierung von Phosphatasen durch den TLR4 in Makrophagen als ausschlaggebend für die Induktion von Toleranz¹ beschrieben (Ropert et al., 2003). Erstaunlicherweise wird aber auch von einer Aktivierung des MaxiK durch eine PKG-vermittelte Induktion von Phosphatasen berichtet (White et al., 1993).

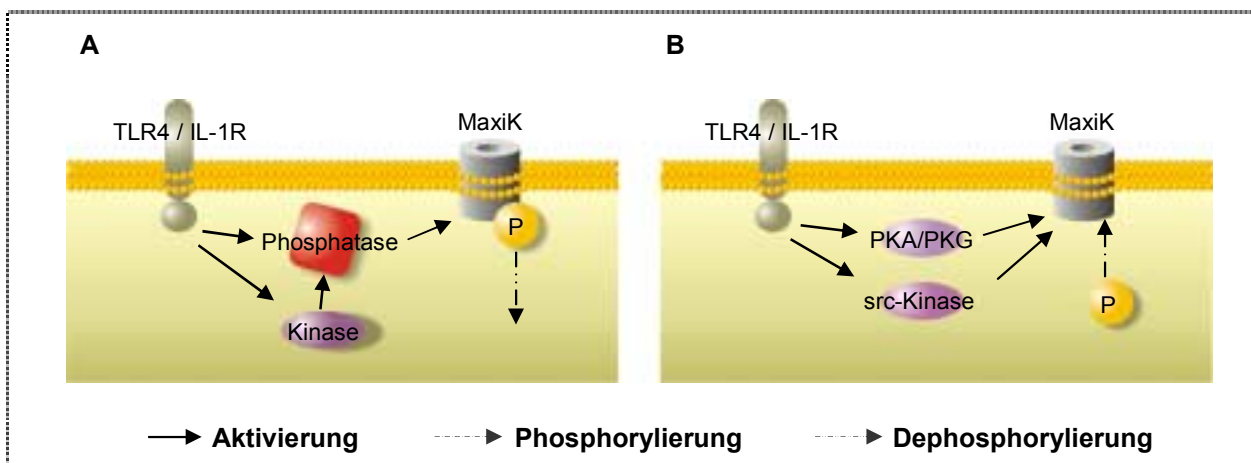


Abbildung 39: Aktivierung des MaxiK durch Dephosphorylierung oder Phosphorylierung intrazellulärer Aminosäurereste. A) Der MaxiK ist konstitutiv phosphoryliert, die Aktivierung erfolgt durch Dephosphorylierung. B) Der MaxiK ist unphosphoryliert, die Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung.

¹ Das Phänomen der LPS-Toleranz stellt sich in LPS-responsiven Zellen ein, die nach einer Stimulation mit LPS bei einer zweiten Stimulation eine deutliche Hyporesponsivität aufweisen.

Zum anderen überwiegen die Berichte über eine Aktivierung des MaxiK durch Phosphorylierung des Kanals (s. Abbildung 39 B). Hierzu wird beschrieben, dass der MaxiK in der glatten Muskulatur durch eine PKG-vermittelte Phosphorylierung aktiviert werden kann (Stockand und Sansom, 1996). Dabei wird eine Phosphorylierung von Serin/Threonin-Resten des Kanals vermutet. Auch die PKG-bedingte Aktivierung des Kanals kann auf der Phosphorylierung an sämtlichen Struktureinheiten des MaxiK beruhen. Es gibt jedoch in der Literatur Hinweise, dass die PKG durch LPS nicht aktiviert, sondern ihre Expression herunterreguliert wird (Browner et al., 2004).

Die Aktivierung des MaxiK in der glatten Muskulatur kann auch durch eine PKA-bedingte Phosphorylierung stattfinden (Schubert und Nelson, 2001). Auch diese Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung von Serin/Threonin-Resten des MaxiK. In Nervenzellen wird die Aktivierung der PKA durch LPS beschrieben, wodurch die Aktivierung des Kanals durch LPS vermittelt werden könnte (Hou und Wang, 2001).

Auch den src Kinasen, einer weiteren Familie von Signalmolekülen, wird eine Rolle bei der Aktivierung des MaxiK durch Phosphorylierung zugeschrieben (Ling et al., 2004). Es existieren zwar Hinweise, dass eine Inhibition des MaxiK in HEK293 Zellen durch eine direkte Phosphorylierung des Kanals durch die C-terminale src Kinase (c-src) stattfinden kann (Alioua et al., 2002), es überwiegen jedoch Berichte gegenteiliger Effekte. Demnach wurde festgestellt, dass die Substitution eines Tyrosin-Restes des MaxiK an Stelle 766 durch Phenylalanin die Phosphorylierung des Kanals durch c-src verhindert und einer Aktivierung des Kanals entgegenwirkt (Ling et al., 2000). Neben weiteren src Kinasen (Aki et al., 2005) wird eine Aktivierung der c-src in LPS-stimulierten Makrophagen beschrieben (Leu et al., 2005). In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits in Patch-Clamp Experimenten festgestellt, dass die vorhergehende Applikation des Kinase-Inhibitors Staurosporine¹ die IL-1-induzierte Aktivierung des MaxiK verhindert (Scheel, 2002). Die Summe dieser Ergebnisse lässt es wahrscheinlich erscheinen, dass der MaxiK im Zuge der Aktivierung humaner Makrophagen mit LPS über eine Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase c-src reguliert wird.

4.3. Interaktion des MaxiK mit Komponenten des LPS-Rezeptorkomplexes

Die Zusammensetzung des LPS-Rezeptorkomplexes und die Mechanismen des Zusammenwirkens seiner Komponenten sind Gegenstand aktueller Forschung. Die detaillierte Zusammensetzung des Rezeptorkomplexes hängt vom Zelltyp ab. Als

¹ Staurosporine ist ein unselektiver Kinase-Inhibitor der sowohl PKA, PKG als auch src Kinasen hemmt

Bestandteile dieses Komplexes auf Makrophagen werden der TLR4 (Poltorak et al., 1998), CD14 (Wright et al., 1990), MD2 (Schromm et al., 2001), LBP (Mueller et al., 2005), CD11/18 (Ingalls und Golenbock, 1995), CD55 (Heine et al., 2001), Hsp70/Hsp90 (Triantafilou et al., 2001) und weitere Membranproteine diskutiert. Unabdingliche Kernstücke sind TLR4 und MD2. Entgegen bisheriger Erkenntnisse hat sich erwiesen, dass LBP nicht nur als serumgelöstes Molekül sondern auch in einer membranständigen Form für die Vermittlung von LPS-Aggregaten an den Rezeptorkomplex verantwortlich ist (Muller M et al., 2003). CD14 ist für die Aktivierung des MyD88-unabhängigen Signalweges von essentieller Bedeutung (Jiang et al., 2005), jedoch nicht grundsätzlich notwendig für die Zellaktivierung. Letzteres gilt auch für die anderen genannten Proteine. Für die durchgeführten Experimente wurde das Hauptaugenmerk auf MaxiK, TLR4/MD2 und LBP gelegt. Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie an transfizierten HEK293 Zellen wurde eine mögliche Einbindung des MaxiK und LBP in den LPS-Rezeptorkomplex analysiert. Die zu untersuchenden Strukturen wurden hierzu fluoreszenzmarkiert (s. Methoden).

Zunächst wurde die Verteilung des Kaliumionenkanals in HEK293-MaxiK_{GFP} Transfektanten analysiert. Die Expression des MaxiK in der Zellmembran konnte durch eine gleichzeitige Färbung der Zytoplasmamembran deutlich gemacht werden (s. 3.3.1). Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen, die mittels Western-Blot an Zellfraktionen erzielt wurden (s. 3.2.1). Daneben zeigte der Ionenkanal eine diffuse zytoplasmatische Verteilung. Eine gleichzeitige Färbung des Golgi-Apparates verdeutlichte, dass der MaxiK eine leichte Verdichtung der Expression in diesem Bereich aufwies. Die vesikulär anmutende Strukturierung der MaxiK-Signale lässt auf eine Verteilung in intrazellulären Membransystemen schließen (s. 3.3.1).

Zur Lokalisation des MaxiK bezüglich des LPS-Rezeptorkomplexes, wurde die Verteilung des Kaliumionenkanals mit der des TLR4 in unstimulierten und LPS-stimulierten HEK293-MaxiK_{GFP}-TLR4/MD2 Zellen verglichen. Wie eingangs erläutert, wurde festgestellt, dass der heterogene LPS-Rezeptorkomplex in unstimulierten Zellen weitgehend dissoziiert vorliegt. In Makrophagen befindet sich das membranständige CD14 in Lipid Rafts, während der TLR4 außerhalb der Lipid Rafts positioniert ist. Im Zuge der Stimulation der Immunzellen mit LPS transloziert der TLR4 ebenfalls in die Lipid Rafts und interagiert mit CD14 (Triantafilou und Triantafilou, 2003). Ebenso werden die Hitzeschockproteine (Hsp) 70 und 90 in die Lipid Rafts rekrutiert und assoziieren mit CD14. Der Komplex wird anschließend internalisiert und in Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert (Latz et al., 2002). Ebendies gilt auch für Hsp 70 und 90 (Triantafilou und Triantafilou, 2004).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in unstimulierten Zellen die Fluoreszenzantikörper-markierten TLR4-Moleküle in distinkten Bereichen auf der Zellmembran konzentriert und lediglich sporadisch mit den Fusionsproteinen aus MaxiK und

GFP kolokalisiert waren. Im Gegensatz dazu ergab die Stimulation der Zellen mit LPS eine deutliche Steigerung der Kolokalisation von MaxiK und TLR4, was auf eine LPS-induzierte räumliche Annäherung zurückzuführen ist. Des Weiteren wurde festgestellt, dass auch der MaxiK in den internalisierten Vesikeln enthalten ist und mit dem Rezeptorkomplex ins Zellinnere transportiert wird. Diese Befunde unterstützen eine Interaktion des MaxiK mit dem Rezeptorkomplex.

In nachfolgenden Versuchen wurde der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen Fusionsproteinen aus TLR4 und dem Donor oder Akzeptor des FRET-Paares CFP und YFP in HEK293 Zellen analysiert. Anhand dieser Methode kann eine Annäherung der Moleküle im Bereich weniger nm nachgewiesen werden. Es ergab sich, dass die Bleichung des Akzeptors zu einer deutlichen Steigerung des Donor-Signals führte, was auf eine enge räumliche Annäherung der exprimierten Fusionsproteine hinweist und eine Oligomerisierung der Moleküle befürwortet. In zukünftigen Untersuchungen soll dieses Experiment mit Fusionsproteinen aus TLR4 und CFP sowie MaxiK und YFP durchgeführt werden, um eine mögliche Aneinanderlagerung von MaxiK und TLR4 aufzuklären.

In der Literatur bestehen bereits Hinweise, dass der MaxiK mit Rezeptoren interagiert. Es wird berichtet, dass bei der Relaxation des Uterus die α -Untereinheit des MaxiK mit dem $\beta(2)$ -adrenergischen Rezeptor durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion kooperiert (Chanrachakul et al., 2004). Die festgestellte räumliche Annäherung von MaxiK und TLR4 erfüllt die Voraussetzung für eine direkte Interaktion der Proteine. Eine solche konnte jedoch mit den zur Verfügung stehenden Mitteln noch nicht untersucht werden.

Die Translokation des MaxiK zu CD14 in Lipid Rafts bedeutet eine Veränderung der Lipidumgebung für den Kanal. Lipid Rafts sind unter anderem durch eine hohe Konzentration an Sphingolipiden und Cholesterol charakterisiert (Ishitsuka et al., 2005). Das in den Sphingolipiden enthaltene Sphingosin hat ebenso wie Cholesterol eine hemmende Wirkung auf die Aktivität des MaxiK (Clarke et al., 2002; Wang et al., 2005). Des Weiteren wurde beschrieben, dass der MaxiK in Membranbereichen mit größerer Dicke eine reduzierte Aktivität aufweist (Yuan et al., 2004). Lipid Rafts verfügen über eine größere Membrandicke als andere Membranbereiche (Gandhavadi et al., 2002). Diese Ergebnisse stehen einer erhöhten Aktivität des MaxiK nach der Translokation in Lipid Rafts entgegen. Es besteht die Möglichkeit, dass TLR4 und MaxiK vor der Translokation in die Lipid Rafts aggregieren, der Kanal aktiviert und nach dem Eintritt in die Lipid Rafts deaktiviert wird.

Als weiterer wichtiger funktioneller Bestandteil des LPS-Rezeptorkomplexes wird LBP beschrieben. Über die Lokalisation des zellassozierten LBP liegen bisher jedoch keine Erkenntnisse vor. Um das Zusammenwirken dieses Serumproteins und des TLR4 bei der Erkennung des LPS zu charakterisieren, wurde die Verteilung des LBP mit der des

Fluoreszenzantikörper-markierten TLR4 verglichen (s. 3.3.3). Hierbei wurde festgestellt, dass sich das zugegebene fluoreszenzmarkierte LBP auf und innerhalb der Zellen befand und eine ähnliche Konzentration in Membran-assoziierten Bereichen aufwies wie der TLR4, ohne jedoch mit dem Rezeptor zu koloalisieren. Dieser Befund korreliert mit den Daten zu MaxiK und TLR4. Das Verhalten von LBP und MaxiK sowie LBP und TLR4 im Zuge einer Stimulation konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit die Funktion des LBP als membraninterkaliertes Protein bestätigt werden. Das LBP konnte nicht nur als in die Membran eingelagert erkannt werden, sondern es wurde festgestellt, dass zu den Zellen gegebenes LBP in diese einwandert. Dieses Ergebnis spricht für eine Rolle des LBP als membranständiger Bestandteil des Rezeptorkomplexes für LPS und unterstützt somit das Fusionsmodell (s. 1.3.3.1)

Durch die Experimente der vorliegenden Arbeit konnte die Bedeutung des Kaliumionenkanals MaxiK für die LPS-induzierte Aktivierung von Makrophagen bestätigt werden. Erstmals konnte eine Assoziation des MaxiK mit Komponenten des LPS-Rezeptorkomplexes sowie die Bedeutung seiner Funktion für LPS-induzierte Signalwege gezeigt werden.

Zusammenfassung

Die Sepsis, hervorgerufen durch mikrobielle Infektionen, verursacht alljährlich weltweit mehrere Millionen Todesfälle. Diese umgangssprachlich als Blutvergiftung bezeichnete Krankheit ist eine Folge der Überreaktion des menschlichen Immunsystems auf Zellwandbestandteile dieser Keime. Bei einer Sepsis durch Gram-negative Bakterien werden Zellen des Immunsystems, vor allem Makrophagen, durch das Lipopolysaccharid (LPS) aus der Hülle der Bakterien aktiviert und reagieren mit der ungebremsen Produktion von Mediatoren, die für die lebensbedrohlichen Symptome der Sepsis verantwortlich sind. Zur Entwicklung einer erfolgreichen Therapie ist es unumgänglich, die intrazellulären Aktivierungsmechanismen der Makrophagen zu ergründen.

Ein heterogener LPS-Rezeptorkomplex auf der Makrophagenmembran bewerkstelligt die Erkennung des LPS und initiiert die Zellaktivierung. Dieser Komplex besteht im Kern aus dem membraninterkalierten Serumprotein LBP, dem membranständigen CD14, dem Toll-like Rezeptor (TLR) 4 und dem globulären MD2. Es wurde gezeigt, dass der Kaliumionenkanal MaxiK in der Zytoplasmamembran der Makrophagen ebenfalls durch das Vorhandensein des LPS aktiviert wird und dass die Blockade des Ionenkanals durch den spezifischen MaxiK-Blocker Paxilline die Aktivierung der Makrophagen drastisch verringert. In dieser Arbeit wurden zum einen die Mechanismen, welche zur Aktivierung des MaxiK durch LPS führen und zum anderen der Einfluss der MaxiK-Blockade auf die intrazellulären Prozesse der Zellaktivierung untersucht.

Anhand von Patch-Clamp-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des MaxiK durch einen indirekten Weg über den LPS-Rezeptorkomplex erfolgt. Durch Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie konnte des Weiteren erstmals erkannt werden, dass der MaxiK während der ersten Minuten der LPS-induzierten Zellaktivierung von einer räumlich distanzierten Position in die Nähe des TLR4 transloziert und mit dem LPS-Rezeptorkomplex internalisiert wird.

Mittels RT-PCR wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass die Blockade des MaxiK durch Paxilline die LPS-induzierte Zytokin-Produktion (von $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, u. a.) bereits auf Ebene der Transkription inhibiert. Durch Gelretentionsanalyse und Western-Blot wurde ein Einfluss der MaxiK-Blockade auf die LPS-induzierten Signalwege über den Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$ und Mitogen aktivierte Proteinkinasen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Signalmoleküle $\text{NF}\kappa\text{B}$ und p38 von der Funktion des MaxiK abhängig sind. Der MaxiK ist demzufolge ein wichtiger Bestandteil der initialen Prozesse der LPS-induzierten Aktivierung humaner Makrophagen.

Wie bereits bei anderen Krankheiten, so z. B. der Autoimmun-Enzephalomyelitis, bietet der MaxiK auch bei der Sepsis eine viel versprechende Ansatzmöglichkeit zur Entwicklung einer Therapie. Weitere Analysen des Einwirkens der MaxiK-Blockade, vor allem auf den $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweg, müssen hierzu durchgeführt werden.

Abkürzungen

A/D	Analog / Digital
AP-1	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches („cyclic“) Adenosinmonophosphat
CD	Zelldifferenzierungsantigen („cluster of differentiation“)
cDNA	kopierte („copy“) DNA
CFP	blaufluoreszentes Protein („cyan fluorescent protein“)
cGMP	zyklisches („cyclic“) Guanosinmonophosphat
CLSM	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie („confocal laser scanning microscopy“)
c-src	C-terminale src-Kinase
DD	„death domain“
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
dNTPs	Desoxyribonukleotide
dSlo	drosophila Slowpoke
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
EMSA	Gelretentionsanalyse („electrophoretic mobility shift assay“)
ER	endoplasmatisches Reticulum
ERK	„extracellular signal regulated kinase“
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“
Fak	„focal adhesion kinase“
FAM	6-carboxy-fluorescein
FCS	Fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FZB	Forschungszentrum Borstel
GFP	grünfluoreszentes Protein („green fluorescent protein“)
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	isotonische Kochsalzlösung („Hank's balanced salt solution“)
HEK	„human embryonic kidney“
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic acid
HRP	Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“)

hSlo	human Slowpoke
Hsp	Hitzeschockprotein
hToll	human Toll
IE	internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1-Rezeptor
IP-10	„Interferon- γ inducible protein 10“
IRAK	IL-1R-assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulierender Faktor
I κ B	Inhibitor des NF κ B
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kdo	3-Desoxy-D-manno-Oct-2-Ulonsäure
Kv	Spannungs-abhängiger Kaliumionenkanal
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MAL	„MyD88 adaptor-like protein“
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
MaxiK	Spannungs- und Calciumionen-abhängiger Kaliumionenkanal
mCD	membranständiges („membrane“) CD
MD	„myeloid differentiation protein“
MEK	MAP-Kinase-Kinase
MEKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MKK	MAP-Kinase-Kinase
mLBP	membranständiges („membrane“) LBP
MNZ	mononukleäre Zellen
mRNA	„messenger“ RNA
mSlo	murines Slowpoke
MyD	„myeloid differentiation factor“
NADPH	reduziertes Nicotin(säure)amid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NF κ B	„nuclear factor“ κ B
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
Nox	NADPH-Oxidase
NP-40	Nonylphenyl-Polyethylen Glycol
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese

ABKÜRZUNGEN

PAMPs	„pathogen associated moleculare patterns“
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PMB	Polymyxin B
PMSF	Phenylsulfonylfluorid
R LPS	„rough“ LPS
Rac	„Ras-related C3 botulinum toxin substrate“
Rantes	„regulated on activation, normal T cell expressed and secreted“
RAW	Maus Makrophagen Zelllinie
RIP	„receptor interacting protein“
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
ROS	„reactive oxygen species“
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
sCD	lösliches („soluble“) CD
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S-Form LPS	„smooth“ LPS
sLBP	lösliches („soluble“) LBP
Slo	Slowpoke
src	zelluläres Homolog des „Rous sarcoma virus“ Onkogens
TAB	„TAK-1-binding protein“
TAK	„TGF β activating kinase“
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	„transforming growth factor“
TICAM	„TIR-domain containing adapter molecule“
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TIRAP	TIR associated protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tollip	„toll interacting protein“
TRADD	„TNF α receptor associated death domain“
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor
TRAM	„TRIF-related adapter molecule“

TRIF	„TIR domain containing adaptor inducing interferon-beta“
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTP	Udenosintriphosphat
UV	ultraviolet
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
YFP	gelbfluoreszentes Protein („yellow fluorescent protein“)

Literaturverzeichnis

- Aga, M., J.J. Watters, Z.A. Pfeiffer, G.J. Wiepz, J.A. Sommer und P.J. Bertics. 2004. Evidence for nucleotide receptor modulation of cross talk between MAP kinase and NF-kappa B signaling pathways in murine RAW 264.7 macrophages. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 286:C923-C930.
- Aggarwal, S.K. und R. MacKinnon. 1996. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 16:1169-1177.
- Ahluwalia, J., A. Tinker, L.H. Clapp, M.R. Duchon, A.Y. Abramov, S. Pope, M. Nobles und A.W. Segal. 2004. The large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel is essential for innate immunity. *Nature* 427:853-858.
- Aki, D., R. Mashima, K. Saeki, Y. Minoda, M. Yamauchi und A. Yoshimura. 2005. Modulation of TLR signalling by the C-terminal Src kinase (Csk) in macrophages. *Genes Cells* 10:357-368.
- Akira, S., M. Yamamoto und K. Takeda. 2003. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem. Soc. Trans.* 31:637-642.
- Alioua, A., A. Mahajan, K. Nishimaru, M.M. Zarei, E. Stefani und L. Toro. 2002. Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:14560-14565.
- Angus, D.C., W.T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo und M.R. Pinsky. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 29:1303-1310.
- Asehnoune, K., D. Strassheim, S. Mitra, K.J. Yeol und E. Abraham. 2005. Involvement of PKCalpha/beta in TLR4 and TLR2 dependent activation of NF-kappaB. *Cell Signal.* 17:385-394.
- Aurell, C.A. und A.O. Wistrom. 1998. Critical aggregation concentrations of gram-negative bacterial lipopolysaccharides (LPS). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253:119-123.
- Baldwin, A.S., Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol* 14:649-683.
- Ballerini, P., M.P. Rathbone, P. Di Iorio, A. Renzetti, P. Giuliani, I. D'Alimonte, O. Trubiani, F. Caciagli und R. Ciccarelli. 1996. Rat astroglial P2Z (P2X7) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport* 7:2533-2537.
- Basak, C., S.K. Pathak, A. Bhattacharyya, D. Mandal, S. Pathak und M. Kundu. 2005. NF-kappaB- and C/EBPbeta-driven interleukin-1beta gene expression and PAK1-mediated caspase-1 activation play

essential roles in interleukin-1beta release from Helicobacter pylori lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Biol. Chem.* 280:4279-4288.

Beeton, C., J. Barbaria, P. Giraud, J. Devaux, A.M. Benoliel, M. Gola, J.M. Sabatier, D. Bernard, M. Crest und E. Beraud. 2001. Selective blocking of voltage-gated K⁺ channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J. Immunol* 166:936-944.

Beeton, C., M.W. Pennington, H. Wulff, S. Singh, D. Nugent, G. Crossley, I. Khaytin, P.A. Calabresi, C.Y. Chen, G.A. Gutman und K.G. Chandy. 2005. Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Mol. Pharmacol.* 67:1369-1381.

Behrens, R., A. Nolting, F. Reimann, M. Schwarz, R. Waldschutz und O. Pongs. 2000. hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family. *FEBS Lett.* 474:99-106.

Bezannilla, F. 2005. The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel. *Trends Biochem. Sci.* 30:166-168.

Bielefeldt, K. und M.B. Jackson. 1994. Intramolecular and intermolecular enzymatic modulation of ion channels in excised membrane patches. *Biophys. J.* 66:1904-1914.

Bilmen, J.G., L.L. Wootton und F. Michelangeli. 2002. The mechanism of inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase by paxilline. *Arch. Biochem. Biophys.* 406:55-64.

Blondin, C., A. Le Dur, B. Cholley, M. Caroff und N. Haeffner-Cavaillon. 1997. Lipopolysaccharide complexed with soluble CD14 binds to normal human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 27:3303-3309.

Blunck, R., O. Scheel, M. Muller, K. Brandenburg, U. Seitzer und U. Seydel. 2001. New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: involvement of a K⁺ channel in transmembrane signaling. *J. Immunol* 166:1009-1015.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Brenner, R., T.J. Jegla, A. Wickenden, Y. Liu und R.W. Aldrich. 2000. Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J. Biol. Chem.* 275:6453-6461.

Browner, N.C., H. Sellak und T.M. Lincoln. 2004. Downregulation of cGMP-dependent protein kinase expression by inflammatory cytokines in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 287:C88-C96.

- Buscher, D., R.A. Hipskind, S. Krautwald, T. Reimann und M. Baccarini. 1995. Ras-dependent and -independent pathways target the mitogen-activated protein kinase network in macrophages. *Mol. Cell Biol.* 15:466-475.
- Blunck, R. 1999. Ein neuer Signalübertragungsmechanismus für die Endotoxin-vermittelte Aktivierung von Makrophagen: der MaxiK-Kanal. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Caballero-Benitez, A. und J. Moran. 2003. Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J. Neurosci. Res.* 71:383-396.
- Cano, E., C.A. Hazzalin und L.C. Mahadevan. 1994. Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun. *Mol. Cell Biol.* 14:7352-7362.
- Chanrachakul, B., F.B. Pipkin und R.N. Khan. 2004. Contribution of coupling between human myometrial beta2-adrenoreceptor and the BK(Ca) channel to uterine quiescence. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 287:C1747-C1752.
- Chen, B.C. und W.W. Lin. 2001. PKC- and ERK-dependent activation of I kappa B kinase by lipopolysaccharide in macrophages: enhancement by P2Y receptor-mediated CaMK activation. *Br. J. Pharmacol.* 134:1055-1065.
- Chen, R.H., C. Abate und J. Blenis. 1993. Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:10952-10956.
- Chow, C.W., M. Rincon, J. Cavanagh, M. Dickens und R.J. Davis. 1997. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* 278:1638-1641.
- Clarke, A.L., S. Petrou, J.V. Walsh, Jr. und J.J. Singer. 2002. Modulation of BK(Ca) channel activity by fatty acids: structural requirements and mechanism of action. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 283:C1441-C1453.
- Colomar, A. und T. Amedee. 2001. ATP stimulation of P2X(7) receptors activates three different ionic conductances on cultured mouse Schwann cells. *Eur. J. Neurosci.* 14:927-936.
- Colomar, A., V. Marty, C. Medina, C. Combe, P. Parnet und T. Amedee. 2003. Maturation and release of interleukin-1beta by lipopolysaccharide-primed mouse Schwann cells require the stimulation of P2X7 receptors. *J. Biol. Chem.* 278:30732-30740.
- Couturier, C., N. Haeffner-Cavaillon, M. Caroff und M.D. Kazatchkine. 1991. Binding sites for endotoxins (lipopolysaccharides) on human monocytes. *J. Immunol.* 147:1899-1904.

- Cross, A.R. und A.W. Segal. 2004. The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1657:1-22.
- da Silva, C.J., K. Soldau, U. Christen, P.S. Tobias und R.J. Ulevitch. 2001. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J. Biol. Chem.* 276:21129-21135.
- DeFarias, F.P., M.F. Carvalho, S.H. Lee, G.J. Kaczorowski und G. Suarez-Kurtz. 1996. Effects of the K⁺ channel blockers pascalitrem-C and paxilline on mammalian smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 314:123-128.
- Denlinger, L.C., P.L. Fiset, J.A. Sommer, J.J. Watters, U. Prabhu, G.R. Dubyak, R.A. Proctor und P.J. Bertics. 2001. Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol* 167:1871-1876.
- Derijard, B., J. Raingeaud, T. Barrett, I.H. Wu, J. Han, R.J. Ulevitch und R.J. Davis. 1995. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267:682-685.
- Devaux, J., C. Beeton, E. Beraud und M. Crest. 2004. [Ion channels and demyelination: basis of a treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by potassium channel blockers]. *Rev. Neurol. (Paris)* 160:S16-S27.
- Docagne, F., S.J. Campbell, A.F. Bristow, S. Poole, S. Vignes, C. Guaza, V.H. Perry und D.C. Anthony. 2005. Differential regulation of type I and type II interleukin-1 receptors in focal brain inflammation. *Eur. J. Neurosci.* 21:1205-1214.
- Downey, J.S. und J. Han. 1998. Cellular activation mechanisms in septic shock. *Front Biosci.* 3:d468-d476.
- Draber, S. und R. Schultze. 1994. Detection of jumps in single-channel data containing subconductance levels. *Biophys. J.* 67:1404-1413.
- Dworetzky, S.I., C.G. Boissard, J.T. Lum-Ragan, M.C. McKay, D.J. Post-Munson, J.T. Trojnacki, C.P. Chang und V.K. Gribkoff. 1996. Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlobeta subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. *J. Neurosci.* 16:4543-4550.
- Eley, A., S. Hosseinzadeh, H. Hakimi, I. Geary und A.A. Pacey. 2005. Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by co-incubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Hum. Reprod.*

- Ferrari, D., P. Chiozzi, S. Falzoni, S. Hanau und F. Di Virgilio. 1997. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J. Exp. Med.* 185:579-582.
- Fitzgerald, K.A., S.M. McWhirter, K.L. Faia, D.C. Rowe, E. Latz, D.T. Golenbock, A.J. Coyle, S.M. Liao und T. Maniatis. 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol* 4:491-496.
- Fitzgerald, K.A., E.M. Palsson-McDermott, A.G. Bowie, C.A. Jefferies, A.S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M.T. Harte, D. McMurray, D.E. Smith, J.E. Sims, T.A. Bird und L.A. O'Neill. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83.
- Flaherty, S.F., D.T. Golenbock, F.H. Milham und R.R. Ingalls. 1997. CD11/CD18 leukocyte integrins: new signaling receptors for bacterial endotoxin. *J. Surg. Res.* 73:85-89.
- Galanos, C., O. Lüderitz und O. Westphal. 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 9:245-249.
- Gallin, E.K. 1984. Calcium- and voltage-activated potassium channels in human macrophages. *Biophys. J.* 46:821-825.
- Gallin, E.K. und L.C. McKinney. 1988. Patch-clamp studies in human macrophages: single-channel and whole-cell characterization of two K⁺ conductances. *J. Membr. Biol.* 103:55-66.
- Gandhavadi, M., D. Allende, A. Vidal, S.A. Simon und T.J. McIntosh. 2002. Structure, composition, and peptide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts. *Biophys. J.* 82:1469-1482.
- Gantner, F., S. Uhlig und A. Wendel. 1995. Quinine inhibits release of tumor necrosis factor, apoptosis, necrosis and mortality in a murine model of septic liver failure. *Eur. J. Pharmacol.* 294:353-355.
- Gerwins, P., J.L. Blank und G.L. Johnson. 1997. Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 272:8288-8295.
- Gioannini, T.L., A. Teghanemt, D. Zhang, N.P. Coussens, W. Dockstader, S. Ramaswamy und J.P. Weiss. 2004. Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:4186-4191.
- Glauner, K.S., L.M. Mannuzzu, C.S. Gandhi und E.Y. Isacoff. 1999. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature* 402:813-817.

- Gutsmann, T., N. Haberer, U. Seydel und A. Wiese. 2001a. Interaction between lipopolysaccharide (LPS), LPS-binding protein (LBP), and planar membranes. *Biol. Chem.* 382:425-434.
- Gutsmann, T., M. Muller, S.F. Carroll, R.C. MacKenzie, A. Wiese und U. Seydel. 2001b. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect. Immun.* 69:6942-6950.
- Guyton, K., R. Bond, C. Reilly, G. Gilkeson, P. Halushka und J. Cook. 2001. Differential effects of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 and a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist on macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 69:631-638.
- Hall, S.K. und D.L. Armstrong. 2000. Conditional and unconditional inhibition of calcium-activated potassium channels by reversible protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275:3749-3754.
- Haslberger, A., C. Romanin und R. Koerber. 1992. Membrane potential modulates release of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Molecular Biology of the Cell* 3:451-460.
- Heine, H., A.J. Ulmer, V.T. el Samalouti, A. Lentschat und L. Hamann. 2001. Decay-accelerating factor (DAF/CD55) is a functional active element of the LPS receptor complex. *J. Endotoxin. Res.* 7:227-231.
- Holst, O., A.J. Ulmer, H. Brade, H.D. Flad und E.T. Rietschel. 1996. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16:83-104.
- Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda und S. Akira. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162:3749-3752.
- Hou, L. und X. Wang. 2001. PKC and PKA, but not PKG mediate LPS-induced CGRP release and [Ca(2+)](i) elevation in DRG neurons of neonatal rats. *J. Neurosci. Res.* 66:592-600.
- Hsu, H., J. Xiong und D.V. Goeddel. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81:495-504.
- Ingalls, R.R. und D.T. Golenbock. 1995. CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 181:1473-1479.
- Ingalls, R.R., B.G. Monks und D.T. Golenbock. 1999. Membrane expression of soluble endotoxin-binding proteins permits lipopolysaccharide signaling in Chinese hamster ovary fibroblasts independently of CD14. *J. Biol. Chem.* 274:13993-13998.

- Ingalls, R.R., B.G. Monks, R. Savedra, Jr., W.J. Christ, R.L. Delude, A.E. Medvedev, T. Espevik und D.T. Golenbock. 1998. CD11/CD18 and CD14 share a common lipid A signaling pathway. *J. Immunol* 161:5413-5420.
- Ishitsuka, R., S.B. Sato und T. Kobayashi. 2005. Imaging lipid rafts. *J. Biochem. (Tokyo)* 137:249-254.
- Iwami, K.I., T. Matsuguchi, A. Masuda, T. Kikuchi, T. Musikacharoen und Y. Yoshikai. 2000. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J. Immunol* 165:6682-6686.
- Jan, L.Y. und Y.N. Jan. 1997. Ways and means for left shifts in the MaxiK channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:13383-13385.
- Jeong, J.Y. und D.M. Jue. 1997. Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J. Immunol* 158:4901-4907.
- Jiang, Y., V. Ruta, J. Chen, A. Lee und R. MacKinnon. 2003a. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423:42-48.
- Jiang, Z., P. Georgel, X. Du, L. Shamel, S. Sovath, S. Mudd, M. Huber, C. Kalis, S. Keck, C. Galanos, M. Freudenberg und B. Beutler. 2005. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat. Immunol* 6:565-570.
- Jiang, Z., M. Zamanian-Daryoush, H. Nie, A.M. Silva, B.R. Williams und X. Li. 2003b. Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J. Biol. Chem.* 278:16713-16719.
- Jung, D.Y., H. Lee, B.Y. Jung, J. Ock, M.S. Lee, W.H. Lee und K. Suk. 2005. TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: a critical role of IFN-beta as a decision maker. *J. Immunol* 174:6467-6476.
- Jungi, T.W., H. Sager, H. Adler, M. Brcic und H. Pfister. 1997. Serum factors, cell membrane CD14, and β_2 integrins are not required for activation of bovine macrophages by lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 65:3577-3584.
- Kahlenberg, J.M. und G.R. Dubyak. 2004. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 286:C1100-C1108.
- Kakuta, Y., H. Okayama, T. Aikawa, T. Kanno, T. Ohyama, H. Sasaki, T. Kato und T. Takishima. 1988. K channels of human alveolar macrophages. *J. Allergy Clin. Immunol* 81:460-468.

- Karres, I., J.P. Kremer, I. Dietl, U. Steckholzer, M. Jochum und W. Ertel. 1998. Chloroquine inhibits proinflammatory cytokine release into human whole blood. *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 274:R1058-R1064.
- Knaus, H.G., O.B. McManus, S.H. Lee, W.A. Schmalhofer, M. Garcia-Calvo, L.M. Helms, M. Sanchez, K. Giangiacomo, J.P. Reuben, A.B. Smith, III und . 1994. Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry* 33:5819-5828.
- Kobayashi, T., M.C. Walsh und Y. Choi. 2004. The role of TRAF6 in signal transduction and the immune response. *Microbes. Infect.* 6:1333-1338.
- Kopp, E.B. und R. Medzhitov. 1999. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11:13-18.
- Kraft, R., P. Krause, S. Jung, D. Basrai, L. Liebmann, J. Bolz und S. Patt. 2003. BK channel openers inhibit migration of human glioma cells. *Pflugers Arch.* 446:248-255.
- Lamkanfi, M., M. Kalai, X. Saelens, W. Declercq und P. Vandenabeele. 2004. Caspase-1 activates nuclear factor of the kappa-enhancer in B cells independently of its enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* 279:24785-24793.
- Lamping, N., R. Dettmer, N.W.J. Schroeder, D. Pfeil, W. Hallatschek, R. Burger und R.R. Schumann. 1998. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J. Clin. Invest.* 101:2065-2071.
- Latz, E., A. Visintin, E. Lien, K.A. Fitzgerald, B.G. Monks, E.A. Kurt-Jones, D.T. Golenbock und T. Espevik. 2002. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J. Biol. Chem.* 277:47834-47843.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart und J.A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
- Leu, T.H., S. Charoenfuprasert, C.K. Yen, C.W. Fan und M.C. Maa. 2005. Lipopolysaccharide-induced c-Src expression plays a role in nitric oxide and TNFalpha secretion in macrophages. *Mol. Immunol.*
- Li, X. und J. Qin. 2005. Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J. Mol. Med.* 83:258-266.
- Ling, S., J.Z. Sheng und A.P. Braun. 2004. The calcium-dependent activity of large-conductance, calcium-activated K⁺ channels is enhanced by Pyk2- and Hck-induced tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 287:C698-C706.

Ling, S., G. Woronuk, L. Sy, S. Lev und A.P. Braun. 2000. Enhanced activity of a large conductance, calcium-sensitive K⁺ channel in the presence of Src tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 275:30683-30689.

Lomaga, M.A., W.C. Yeh, I. Sarosi, G.S. Duncan, C. Furlonger, A. Ho, S. Morony, C. Capparelli, G. Van, S. Kaufman, H.A. van der, A. Itie, A. Wakeham, W. Khoo, T. Sasaki, Z. Cao, J.M. Penninger, C.J. Paige, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, W.J. Boyle, D.V. Goeddel und T.W. Mak. 1999. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.* 13:1015-1024.

Longland, C.L., J.L. Dyer und F. Michelangeli. 2000. The mycotoxin paxilline inhibits the cerebellar inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 408:219-225.

Loppnow, H., H.-D. Flad und E.T. Rietschel. 1993a. The active principle of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) for cytokine induction. *In Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure.* G. Schlag und H. Redl, editors. Springer Verlag, Berlin. 405-16.

Lotocki, G., O.F. Alonso, W.D. Dietrich und R.W. Keane. 2004. Tumor necrosis factor receptor 1 and its signaling intermediates are recruited to lipid rafts in the traumatized brain. *J. Neurosci.* 24:11010-11016.

Lynn, W.A., Y. Liu und D.T. Golenbock. 1993. Neither CD14 nor serum is absolutely necessary for activation of mononuclear phagocytes by bacterial lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 61:4452-4461.

Madsen, L.S., P. Christophersen und S.P. Olesen. 2005. Blockade of Ca²⁺-activated K⁺ channels in T cells: an option for the treatment of multiple sclerosis? *Eur. J. Immunol* 35:1023-1026.

Manthous, C.A., J.B. Hall und R.W. Samsel. 1993. Endotoxin in human disease. Part 2: Biologic effects and clinical evaluations of anti-endotoxin therapies. *Chest* 104:1872-1881.

Martin, D.K., M.R. Bootcov, T.J. Campbell, P.W. French und S.N. Breit. 1995. Human macrophages contain a stretch-sensitive potassium channel that is activated by adherence and cytokines. *J. Membr. Biol.* 147:305-315.

Martinon, F., K. Burns und J. Tschopp. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* 10:417-426.

Maruyama, N., K. Yasunori, K. Yamauchi, T. Aizawa, T. Ohrai, M. Nara, T. Oshiro, L. Ohno, G. Tanura, S. Shimura, H. Saschi, T. Tahishima und K. Shirato. 1994. Quinine inhibits production of tumor necrosis factor- α from human alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10:514-520.

Matot, I. und C.L. Sprung. 2001. Definition of sepsis. *Intensive Care Med.* 27 Suppl 1:S3-S9.

- McIntire, F.C., H.W. Sievert, G.H. Barlow, R.A. Finley und A.Y. Lee. 1967. Chemical, physical, biological properties of a lipopolysaccharide from *Escherichia coli* K-235. *Biochemistry* 6:2363-2372.
- McWhirter, S.M., K.A. Fitzgerald, J. Rosains, D.C. Rowe, D.T. Golenbock und T. Maniatis. 2004. IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:233-238.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt und C.A.J. Janeway. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity [see comments]. *Nature* 388:394-397.
- Meera, P., M. Wallner, M. Song und L. Toro. 1997. Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:14066-14071.
- Monick, M.M., A.B. Carter, D.M. Flaherty, M.W. Peterson und G.W. Hunninghake. 2000. Protein kinase C zeta plays a central role in activation of the p42/44 mitogen-activated protein kinase by endotoxin in alveolar macrophages. *J. Immunol* 165:4632-4639.
- Mueller, M., K. Brandenburg, R. Dedrick, A.B. Schromm und U. Seydel. 2005. Phospholipids inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced cell activation: a role for LPS-binding protein. *J. Immunol* 174:1091-1096.
- Mueller, M., B. Lindner, S. Kusumoto, K. Fukase, A.B. Schromm und U. Seydel. 2004. Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *J. Biol. Chem.* 279:26307-26313.
- Muller M, Scheel O, Lindner B, Gutschmann T und Seydel U. 2003. The role of membrane-bound LBP, endotoxin aggregates, and the MaxiK channel in LPS-induced cell activation. *J Endotoxin Res* 9:181-186.
- Naismith, J.H. und S.R. Sprang. 1995. Tumor necrosis factor receptor superfamily. *J. Inflamm.* 47:1-7.
- Nolan, Y., E. Vereker, A.M. Lynch und M.A. Lynch. 2003. Evidence that lipopolysaccharide-induced cell death is mediated by accumulation of reactive oxygen species and activation of p38 in rat cortex and hippocampus. *Exp. Neurol.* 184:794-804.
- Norenberg, W., P.J. Gebicke-Haerter und P. Illes. 1994. Voltage-dependent potassium channels in activated rat microglia. *J. Physiol* 475:15-32.
- O'Neill, L. 2000. The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem. Soc. Trans.* 28:557-563.

- Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto und T. Seya. 2003. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J. Biol. Chem.* 278:49751-49762.
- Ozinsky, A., K.D. Smith, D. Hume und D.M. Underhill. 2000. Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *J. Endotoxin. Res.* 6:393-396.
- Pacha, J., G. Frindt, H. Sackin und L.G. Palmer. 1991. Apical maxi K channels in intercalated cells of CCT. *Am. J. Physiol* 261:F696-F705.
- Palsson-McDermott, E.M. und L.A. O'Neill. 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113:153-162.
- Park, H.S., H.Y. Jung, E.Y. Park, J. Kim, W.J. Lee und Y.S. Bae. 2004. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J. Immunol* 173:3589-3593.
- Pearce, M.J., T.M. McIntyre, S.M. Prescott, G.A. Zimmerman und R.E. Whatley. 1996. Shear stress activates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) and MAP kinase in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218:500-504.
- Pearson, G., F. Robinson, G.T. Beers, B.E. Xu, M. Karandikar, K. Berman und M.H. Cobb. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22:153-183.
- Perregaux, D. und C.A. Gabel. 1994. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J. Biol. Chem.* 269:15195-15203.
- Pfeiffer, R. 1892. Untersuchungen über das Choleragift. *Zf. f. Hygiene* 11:393-412.
- Plachinta, R.V., M.J. de Klaver, J.K. Hayes und G.F. Rich. 2004. The protective effect of protein kinase C and adenosine triphosphate-sensitive potassium channel agonists against inflammation in rat endothelium and vascular smooth muscle in vitro and in vivo. *Anesth. Analg.* 99:556-61, table.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C.V. Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton und B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
- Prinz, M., O. Kann, H.J. Draheim, R.R. Schumann, H. Kettenmann, J.R. Weber und U.K. Hanisch. 1999. Microglial activation by components of gram-positive and -negative bacteria: distinct and common routes to the induction of ion channels and cytokines. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58:1078-1089.

- Qian, Y., M. Commane, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto und X. Li. 2001. IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B. *J. Biol. Chem.* 276:41661-41667.
- Qiu, M.R., T.J. Campbell und S.N. Breit. 2002. A potassium ion channel is involved in cytokine production by activated human macrophages. *Clin. Exp. Immunol* 130:67-74.
- Raetz, C. 1990. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 59:129-170.
- Raingaud, J., A.J. Whitmarsh, T. Barrett, B. Derijard und R.J. Davis. 1996. *Mol. Cell Biol.* 16:1247-1255.
- Ramadori, G., z.B.K. Meyer, P.S. Tobias, J.C. Mathison und R.J. Ulevitch. 1990. Biosynthesis of lipopolysaccharide-binding protein in rabbit hepatocytes. *Pathobiology* 58:89-94.
- Regnier, C.H., H.Y. Song, X. Gao, D.V. Goeddel, Z. Cao und M. Rothe. 1997. Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 90:373-383.
- Reich, E.P., L. Cui, L. Yang, C. Pugliese-Sivo, A. Golovko, M. Petro, G. Vassileva, I. Chu, A.A. Nomeir, L.K. Zhang, X. Liang, J.A. Kozlowski, S.K. Narula, P.J. Zavodny und C.C. Chou. 2005. Blocking ion channel KCNN4 alleviates the symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Eur. J. Immunol* 35:1027-1036.
- Rezzonico, R., C. Cayatte, I. Bourget-Ponzio, G. Romey, N. Belhacene, A. Loubat, S. Rocchi, E. Van Obberghen, J.A. Girault, B. Rossi und H. Schmid-Antomarchi. 2003. Focal adhesion kinase pp125FAK interacts with the large conductance calcium-activated hSlo potassium channel in human osteoblasts: potential role in mechanotransduction. *J. Bone Miner. Res.* 18:1863-1871.
- Rezzonico, R., A. Schmid-Alliana, G. Romey, I. Bourget-Ponzio, V. Breuil, V. Breitmayer, S. Tartare-Deckert, B. Rossi und H. Schmid-Antomarchi. 2002. Prostaglandin E2 induces interaction between hSlo potassium channel and Syk tyrosine kinase in osteosarcoma cells. *J. Bone Miner. Res.* 17:869-878.
- Rietschel, E.T., L. Brade, U. Schade, U. Seydel, U. Zähringer, S. Kusumoto und H. Brade. 1988. Bacterial endotoxins: Properties and structure of biologically active domains. In *Surface Structures of Microorganisms and their Interaction with the Mammalian Host*. E. Schinner, M.H. Richmond, G. Seibert und U. Schwarz, editors. Verlag Chemie, Weinheim. 1-41.
- Rietschel, E.Th., L. Brade, U. Schade, U. Seydel, U. Zähringer, H. Loppnow, H.-D. Flad und H. Brade. 1989. Bacterial Endotoxins: Relationships Between Chemical Structure and Biological Activity. In *Immunological Adjuvants and Vaccines*. G. Gregoriadis, A.C. Allison und G. Poste, editors. Plenum Publishing Corporation, 61-74.

- Roport, C., M. Closel, A.C. Chaves und R.T. Gazzinelli. 2003. Inhibition of a p38/stress-activated protein kinase-2-dependent phosphatase restores function of IL-1 receptor-associate kinase-1 and reverses Toll-like receptor 2- and 4-dependent tolerance of macrophages. *J. Immunol* 171:1456-1465.
- Sanghera, J.S., S.L. Weinstein, M. Aluwalia, J. Girn und S.L. Pelech. 1996. Activation of multiple proline-directed kinases by bacterial lipopolysaccharide in murine macrophages. *J. Immunol* 156:4457-4465.
- Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda und S. Akira. 2003. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol* 171:4304-4310.
- Sato, T., T. Saito, N. Saegusa und H. Nakaya. 2005. Mitochondrial Ca²⁺-activated K⁺ channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* 111:198-203.
- Scheel, O. 2002. Patch-Clamp Untersuchungen an Immunzellen: Beteiligung eines Ionenkanals als generelles Prinzip bei der Zellaktivierung durch mikrobielle Pathogenitätsfaktoren. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Schlag, G., H. Redl und S. Hallstrom. 1991. The cell in shock: the origin of multiple organ failure. *Resuscitation* 21:137-180.
- Schreiber, M. und L. Salkoff. 1997. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys. J.* 73:1355-1363.
- Schromm, A.B., K. Brandenburg, H. Loppnow, A.P. Moran, M.H. Koch, E.T. Rietschel und U. Seydel. 2000. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur. J. Biochem.* 267:2008-2013.
- Schromm, A.B., K. Brandenburg, E.Th. Rietschel, H.-D. Flad, S.F. Carroll und U. Seydel. 1996. Lipopolysaccharide binding protein (LBP) mediates CD14-independent intercalation of lipopolysaccharide into phospholipid membranes. *FEBS Lett.* 399:267-271.
- Schromm, A.B., E. Lien, P. Henneke, J.C. Chow, A. Yoshimura, H. Heine, E. Latz, B.G. Monks, D.A. Schwartz, K. Miyake und D.T. Golenbock. 2001. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J. Exp. Med.* 194:79-88.
- Schromm, A.B. und U. Seydel. 1999. Endotoxine und Sepsis. In *Infektiologie heute - Zeit zum Umdenken*. H. Wacha, editor. Zuckschwerdt Verlag, Germering/München. 109-23.

- Schubert, R. und M.T. Nelson. 2001. Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol. Sci.* 22:505-512.
- Schultze, R. und S. Draber. 1993. A nonlinear filter algorithm for the detection of jumps in patch-clamp data. *J. Membr. Biol.* 132:41-52.
- Schumann, R.R., S.R. Leong, G.W. Flaggs, P.W. Gray, S.D. Wright, J.C. Mathison, P.S. Tobias und R.J. Ulevitch. 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1429-1431.
- Schutt, C., T. Schilling, U. Grunwald, F. Stelter, S. Witt, C. Kruger und R.S. Jack. 1995. Human monocytes lacking the membrane-bound form of the bacterial lipopolysaccharide (LPS) receptor CD14 can mount an LPS-induced oxidative burst response mediated by a soluble form of CD14. *Res. Immunol* 146:339-350.
- Seydel, U., H. Labischinski, M. Kastowsky und K. Brandenburg. 1993. Phase behaviour, supramolecular structure, and molecular conformation of lipopolysaccharide. *Immunobiol.* 187:191-211.
- Seydel, U., A. Wiese, A.B. Schromm und K. Brandenburg. 1999. A biophysical view on the function and activity of endotoxins. *In Endotoxin in Health and Disease*. D. Morrison, H. Brade, S. Opal und S. Vogel, editors. Marcel Dekker, New York. 195-220.
- Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake und M. Kimoto. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 189:1777-1782.
- Simons, K. und E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- Singh, J.C., S.M. Cruickshank, D.J. Newton, L. Wakenshaw, A. Graham, J. Lan, J.P. Lodge, P.J. Felsburg und S.R. Carding. 2005. Toll-like receptor-mediated responses of primary intestinal epithelial cells during the development of colitis. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 288:G514-G524.
- Solle, M., J. Labasi, D.G. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B.H. Koller, R.J. Griffiths und C.A. Gabel. 2001. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J. Biol. Chem.* 276:125-132.
- Stefani, E., M. Ottolia, F. Noceti, R. Olcese, M. Wallner, R. Latorre und L. Toro. 1997. Voltage-controlled gating in a large conductance Ca²⁺-sensitive K⁺channel (hslo). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:5427-5431.
- Stein, D., S. Roth, E. Vogelsang und C. Nusslein-Volhard. 1991. The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* 65:725-735.

- Stockand, J.D. und S.C. Sansom. 1996. Mechanism of activation by cGMP-dependent protein kinase of large Ca(2+)-activated K⁺ channels in mesangial cells. *Am. J. Physiol* 271:C1669-C1677.
- Suzuki, N., S. Suzuki, G.S. Duncan, D.G. Millar, T. Wada, C. Mirtsos, H. Takada, A. Wakeham, A. Itie, S. Li, J.M. Penninger, H. Wesche, P.S. Ohashi, T.W. Mak und W.C. Yeh. 2002. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416:750-756.
- Sylte, M.J., C.J. Kuckleburg, T.J. Inzana, P.J. Bertics und C.J. Czuprynski. 2005. Stimulation of P2X receptors enhances lipooligosaccharide-mediated apoptosis of endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* 77:958-965.
- Takeda, K. und S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol* 17:1-14.
- Tartaglia, L.A. und D.V. Goeddel. 1992. Two TNF receptors. *Immunol Today* 13:151-153.
- Terada, Y., O. Nakashima, S. Inoshita, M. Kuwahara, S. Sasaki und F. Marumo. 1999. Mitogen-activated protein kinase cascade and transcription factors: the opposite role of MKK3/6-p38K and MKK1-MAPK. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14 Suppl 1:45-47.
- Tian, L., H.G. Knaus und M.J. Shipston. 1998. Glucocorticoid regulation of calcium-activated potassium channels mediated by serine/threonine protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 273:13531-13536.
- Tobias, P.S., K. Soldau und R.J. Ulevitch. 1986. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J. Exp. Med.* 164:777-793.
- Tournier, C., A.J. Whitmarsh, J. Cavanagh, T. Barrett und R.J. Davis. 1999. The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases. *Mol. Cell Biol.* 19:1569-1581.
- Triantafilou M, Miyake K, D.T. Golenbock und Triantafilou K. 2002. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci.* 115:2603-2611.
- Triantafilou, K., M. Triantafilou und R.L. Dedrick. 2001. A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat. Immunol* 2:338-345.
- Triantafilou, M. und K. Triantafilou. 2003. Receptor cluster formation during activation by bacterial products. *J. Endotoxin. Res.* 9:331-335.
- Triantafilou, M. und K. Triantafilou. 2004. Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochem. Soc. Trans.* 32:636-639.

- Tseng-Crank, J., N. Godinot, T.E. Johansen, P.K. Ahring, D. Strobaek, R. Mertz, C.D. Foster, S.P. Olesen und P.H. Reinhart. 1996. Cloning, expression, and distribution of a Ca(2+)-activated K⁺ channel beta-subunit from human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:9200-9205.
- Ulevitch, R.J. und P.S. Tobias. 1994. Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 6:125-130.
- Ulevitch, R.J. und P.S. Tobias. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 13:437-457.
- Valverde, P., T. Kawai und M.A. Taubman. 2005. Potassium channel-blockers as therapeutic agents to interfere with bone resorption of periodontal disease. *J. Dent. Res.* 84:488-499.
- Varghese, A., E.M. Tenbroek, J. Coles, Jr. und D.C. Sigg. 2005. Endogenous channels in HEK cells and potential roles in HCN ionic current measurements. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*
- Vicente, R., A. Escalada, M. Coma, G. Fuster, E. Sanchez-Tillo, C. Lopez-Iglesias, C. Soler, C. Solsona, A. Celada und A. Felipe. 2003. Differential voltage-dependent K⁺ channel responses during proliferation and activation in macrophages. *J. Biol. Chem.* 278:46307-46320.
- Vreugdenhil, A.C., M.A. Dentener, A.M. Snoek, J.W. Greve und W.A. Buurman. 1999. Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. *J. Immunol.* 163:2792-2798.
- Wajant, H. und P. Scheurich. 2001. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33:19-32.
- Walev, I., M. Reske, A. Palmer, A. Valeva und S. Bhakdi. 1995. Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *EMBO J.* 14:1607-1614.
- Wallner, M., P. Meera und L. Toro. 1999. Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channels: a transmembrane beta-subunit homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:4137-4142.
- Wang, X.L., D. Ye, T.E. Peterson, S. Cao, V.H. Shah, Z.S. Katusic, G.C. Sieck und H.C. Lee. 2005. Caveolae targeting and regulation of large conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 280:11656-11664.
- Waskiewicz, A.J., A. Flynn, C.G. Proud und J.A. Cooper. 1997. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* 16:1909-1920.
- Weber, S.M. und S.M. Levitz. 2000. Chloroquine interferes with lipopolysaccharide-induced TNF-alpha gene expression by a nonlysosomotropic mechanism. *J. Immunol* 165:1534-1540.

- White, R.E., A.B. Lee, A.D. Shcherbatko, T.M. Lincoln, A. Schonbrunn und D.L. Armstrong. 1993. Potassium channel stimulation by natriuretic peptides through cGMP-dependent dephosphorylation. *Nature* 361:263-266.
- Wright, S.D., R.A. Ramos, P.S. Tobias, R.J. Ulevitch und J.C. Mathison. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433.
- Wu, C.C., S.J. Chen und C.J. Garland. 2004a. NO and KATP channels underlie endotoxin-induced smooth muscle hyperpolarization in rat mesenteric resistance arteries. *Br. J. Pharmacol.* 142:479-484.
- Wu, Y., S. Adam, L. Hamann, H. Heine, A.J. Ulmer, U. Buwitt-Beckmann und C. Stamme. 2004b. Accumulation of inhibitory kappaB-alpha as a mechanism contributing to the anti-inflammatory effects of surfactant protein-A. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31:587-594.
- Xia, X.M., J.P. Ding, X.H. Zeng, K.L. Duan und C.J. Lingle. 2000. Rectification and rapid activation at low Ca²⁺ of Ca²⁺-activated, voltage-dependent BK currents: consequences of rapid inactivation by a novel beta subunit. *J. Neurosci.* 20:4890-4903.
- Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda und S. Akira. 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420:324-329.
- Yuan, C., R.J. O'Connell, P.L. Feinberg-Zadek, L.J. Johnston und S.N. Treistman. 2004. Bilayer thickness modulates the conductance of the BK channel in model membranes. *Biophys. J.* 86:3620-3633.
- Zeisel, M.B., V.A. Druet, J. Sibilio, J.P. Klein, V. Quesniaux und D. Wachsmann. 2005. Cross talk between MyD88 and focal adhesion kinase pathways. *J. Immunol* 174:7393-7397.
- Zhang, F.X., C.J. Kirschning, R. Mancinelli, X.P. Xu, Y. Jin, E. Faure, A. Mantovani, M. Rothe, M. Muzio und M. Arditi. 1999. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes [In Process Citation]. *J. Biol. Chem.* 274:7611-7614.
- Zhang, G. und S. Ghosh. 2002. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J. Biol. Chem.* 277:7059-7065.



Danksagung

Frau Dr. Andra Schromm, Leiterin der Arbeitsgruppe Immunbiophysik am Forschungszentrum Borstel, danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, die unzähligen Denkanstöße und die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Seydel, Leiter der Laborgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel, für die stetige Unterstützung bei der Planung dieser Arbeit und die Bereitstellung der Laborräume und Geräte.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Ernst Theodor Rietschel, Direktor der Abteilung Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie am Forschungszentrum Borstel, für die Finanzierung meiner Stelle.

Ein besonderer Dank geht an Frau Christine Hamann für die Durchführung der PCR-Experimente und Frau Sabrina Groth für die Durchführung der ELISA.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Mareike Müller für die kritische Durchsicht dieser Arbeit sowie die stetige Diskussionsbereitschaft und Hilfe.

Herrn Prof. Dr. Andreas Gebert möchte ich für die Unterstützung bei der Konfokalen Mikroskopie danken.

Bei Frau Dr. Cordula Stamme, Leiterin der Arbeitsgruppe Zelluläre Pneumologie am Forschungszentrum Borstel, möchte ich mich für die Bereitstellung der Alveolarmakrophagen der Ratte bedanken und Frau Stefanie Adam für die Gewinnung der Makrophagen und die Hilfestellung bei den Gelretentionsanalysen.

Herrn Dr. Martin Ernst, Leiter der Immunzell-Analytik am Forschungszentrum Borstel, möchte ich für die freundliche Bereitstellung des Serums danken.

Für die Bereitstellung des rekombinanten LBP danke ich der Firma Xoma Corp. (Berkeley, USA).

Herrn Dr. Olaf Scheel danke ich für die Einführung in die Patch-Clamp Technik.

Ich danke Prof. Terje Espevik, Prof. Douglas Golenbock und Dr. Martin Wallner für die freundliche Bereitstellung von Plasmiden.

An Frau Maren Lohs herzlichen Dank für die Hilfestellung bei der Anfertigung von Grafiken und Vorträgen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. Sven Hagge für die Hilfe bei der Konstruktion der Temperiereinheit für die Konfokale Mikroskopie bedanken.

Den Arbeitsgruppen Biophysik und Immunbiophysik danke ich für das großartige Betriebsklima (und so manchen entspannten Abend).

Besonders möchte ich meiner Frau Heike und meinem Sohn Elias dafür danken, dass die Wissenschaft nicht das Wichtigste ist.



Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vor noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Antrag auf Zulassung zur Promotion gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Borstel, den