

Aus dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin – Zelluläre  
Neurowissenschaften  
Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einzelkanalmessungen zur Charakterisierung eines  
CCL21-abhängigen Chloridkanals auf Mikrogliazellen**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Hannes Kiesewetter  
aus  
Bad Saarow - Pieskow

Gutachter: 1. Prof. Dr. H. Kettenmann  
2. Prof. Dr. Ch. W. Steinhäuser  
3. Prof. Dr. A. Reichenbach

Datum der Promotion: 19.09.2008

---

<b>Inhaltsangabe</b>	3
<b><u>1. Einleitung</u></b>	5
<b>1.1. Das Immunsystem des Gehirns</b>	5
<b>1.2. Die Mikroglia</b>	6
1.2.1. Die Ontogenese der Mikroglia	6
1.2.2. Die ramifizierte Mikroglia	8
1.2.3. Die aktivierte Mikroglia	9
<b>1.3. Chemokine</b>	11
1.3.1. Chemokinrezeptoren	14
1.3.2. Wirkungsweise des Chemokinsystems	15
1.3.3. Chemokine und das Zentrale Nervensystem	16
1.3.4. Chemokine bei pathologischen Prozessen im ZNS	18
1.3.5. Das Chemokin CCL21	19
<b>1.4. Ionenkanäle in mikroglialen Membranen</b>	20
1.4.1. Chloridkanäle der Mikrogliazelle	23
<b>1.5. Ziele</b>	25
<b><u>2. Material und Methoden</u></b>	26
<b>2.1. Präparation der Mikrogliazellkulturen</b>	26
<b>2.2. Lösungen</b>	27
<b>2.3. Die Patch-clamp-Technik</b>	28
2.3.1. Der Patch-clamp-Arbeitsplatz	30
2.3.2. Verschiedene Patch-clamp-Konfigurationen	31
2.3.3. Spannungsprotokolle	34
2.3.4. Reduktion von Störsignalen und elektrischem Rauschen	36
2.3.5. Patch-Pipetten zur Einzelkanalmessung	37
2.3.6. Auswertung der Ergebnisse	38
<b>2.4. Imaging von Chloridionen</b>	40
<b><u>3. Ergebnisse</u></b>	42
<b>3.1. Experimente an einzelnen Ionenkanälen</b>	42
3.1.1. Einzelkanalexperimente bei einem Potential von 50 mV	43
3.1.2. Einzelkanalmessungen mit einem Sprungprotokoll	46
3.1.3. Perforierender Patch-clamp-Modus	50

---

<b>3.2. Imaging-Experimente mit kultivierten Mikrogliazellen</b>	53
3.2.1. Experimente mit unterschiedlichen Chloridkonzentrationen	53
3.2.2. Experimente mit Ammoniumchlorid-Applikation	55
3.2.3. Experimente mit CCL21-Applikation	57
<b><u>4. Diskussion</u></b>	59
<b>4.1. Das Chemokin CCL21 und ein Ionenkanal auf Mikroglia</b>	60
4.1.1. CCL21 aktiviert einen Chloridkanal auf Mikrogliazellen	60
4.1.2. CCL21 aktiviert einen Liganden-gesteuerten Ionenkanal	61
4.1.3. Ähnlichkeit zu anderen Liganden-gesteuerten Ionenkanälen	61
<b>4.2. Imaging in kultivierten Mikroglia zeigt Veränderung der Chloridhomöostase nach CCL21-Stimulation</b>	62
<b>4.3. Mikrogliazellen exprimieren CCL21-Rezeptoren <i>in vitro</i></b>	63
<b>4.4. CCL21 als Bindeglied zwischen Neuron und Mikroglia</b>	64
<b>4.5. Die Rolle von CCL21 bei der Migration von Zellen</b>	65
<b>4.6. Die klinische Bedeutung von CCL21 und Chloridkanälen</b>	66
4.6.1. Der Einfluss von Chloridkanälen auf die Migration von intrazerebralen Tumorzellen	67
4.6.2. Der Einfluss von CLL21 auf die Migration von Progenitor-Zellen	67
4.6.3. Die Wirkung von CCL21 auf Zellen des Immunsystems	68
4.6.4. CCL21 als Mediator nach traumatischen Läsionen des ZNS	69
4.6.5. Die Rolle von CCL21 in der Pathologie der Multiplen Sklerose	69
<b><u>5. Literaturverzeichnis</u></b>	70
<b><u>6. Zusammenfassung</u></b>	85
<b><u>7. Anhang</u></b>	87
7.1. Abkürzungen	88
7.2. Symbole und Einheiten	86
7.3. Danksagung	89
7.4. Lebenslauf	90
7.5. Eidesstattliche Erklärung	91

## 1. Einleitung

### 1.1. Das Immunsystem des Gehirns

Das zentrale Nervensystem wurde lange Zeit als ein durch die Blut-Hirn-Schranke vom Immunsystem abgeschirmtes Organ betrachtet. Eine intakte Blut-Hirn-Schranke stellt eine Barriere für Immunzellen, Antikörper und andere immunologische Moleküle dar (Hickey *et al.*, 1991). Das komplexe Wechselspiel zwischen Rezeptoren und Mediatoren erlaubt es aktivierten T-Lymphozyten jedoch, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und ins Hirngewebe einzudringen (Lassmann, 1997) sowie dieses auch wieder zu verlassen, wenn kein passendes Antigen präsentiert wird (Hart and Fabry, 1995).

Neben Blutleukozyten sind unter anderem Endothelzellen und Mikrogliazellen an entzündlichen Vorgängen im Gehirn beteiligt. Einfluss auf Abwehrreaktionen nehmen weiterhin auch Astrozyten, welche unter pathologischen Bedingungen in der Lage sind Zytokine zu produzieren und auszuschütten (Asensio and Campbell, 1999).

Da nur Mikrogliazellen im Gehirn voll kompetent immunologisch wirken, stellen sie die residenten Makrophagen des Gehirns dar (Benveniste, 1997).

Mit Makrophagen verbindet sie nicht nur die Expression ähnlicher Oberflächenmoleküle beispielsweise Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC), sondern auch die Fähigkeit zur Phagozytose (Asensio and Campbell, 1999), die Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen und die Präsentation von Antigenen. Mikrogliazellen sind über das gesamte Gehirn verteilt und stellen 10-20 % der Gliazellen im Gehirn dar (Altman, 1994).

## 1.2. Die Mikroglia

### 1.2.1. Die Ontogenese der Mikroglia

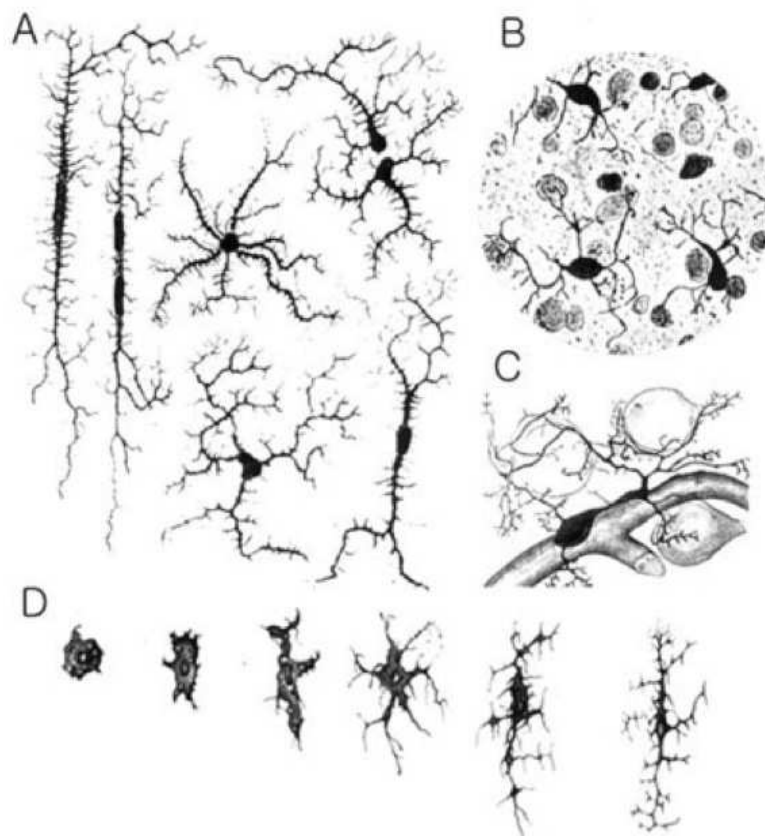
Als Franz Nissl gegen Ende des 19. Jahrhunderts Stäbchenzellen als reaktives Element bei neurodegenerativen Erkrankungen im Gehirn beobachtete, war das mit der damaligen Lichtmikroskopie eine beeindruckende und entscheidende Entdeckung. Ramon y Cajal spezifizierte diese Befunde später mit seinen Metallimprägnierungsverfahren als das „*tercer elemento*“, das dritte Element von Zellen anderer Morphologie im Nervensystem.

Del Rio-Hortega entdeckte 1932 an spezifischen Stellen im Gehirn eine Anhäufung von pialen Zellen, die er als „*fountains of microglia*“ bezeichnete (Rio-Hortega PD, 1932). Diese Zellen wandern während der Embryogenese aus der *Pia mater* ins Gehirn ein, verteilen sich im Gehirn und nehmen die Morphologie von Mikrogliazellen an.

Die ontogenetische Herkunft der Mikrogliazellen ist bis heute immer noch umstritten. Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass sie sich, wie alle anderen Zelltypen des Gehirns, aus dem Neuroektoderm ableiten (Richardson *et al.*, 1993). So können sich aus Kulturen von embryonalen Neuralrohrzellen Mikrogliazellen entwickeln. Andere Beobachtungen sprechen für einen mesodermalen (pialen) Ursprung (Ashwell, 1991). Das jüngste, im allgemeinen gültige Modell ist die Abstammung von Vorläuferzellen des mononukleären Phagozytensystems. Demnach wandern die Vorläuferzellen der Mikroglia über Blutgefäße, die Hirnhäute (drei Membranen, die das Rückenmark und das Gehirn umgeben) oder Ventrikel (Ausbuchtungen bzw. Kammern im Gehirn) in das Zentralnervensystem (ZNS) ein und durchlaufen während der Invasion eine Transformation (Cuadros and Navascues, 1998). In Mäusen zeigten intensive Untersuchungen, dass die amöboiden Zellen sich zwischen Tag drei bis fünf postnatal durch das Gewebe zu ihren jeweiligen Zielorten bewegen. Dort verändern sie ihre Morphologie, indem sie verzweigende Ausläufer ausbilden, bis sie schliesslich homogen verteilt im Hirnparenchym als sogenannte ramifizierte Mikroglia an ihrem Bestimmungsort bleiben.

Eine Vielzahl von Untersuchungen stützt die These, dass Mikroglia sich aus einwandernden Monozyten entwickeln. Mehrere Untersuchungen zeigten durch

den Einsatz unterschiedlicher Markierungstechniken die Transformation von Monozyten zu Mikroglia (Kaur *et al.*, 2001; Leong and Ling, 1992; Ling, 1979). Die Verwandtschaft von Mikroglia und Monozyten wird durch weitere Befunde gestützt. So wurden intrazelluläre Markerenzyme für Monozyten wie zum Beispiel 5'-Nukleosidase (Kaur *et al.*, 1984), Thyamin-Pyrophosphatase (Kaur *et al.*, 1987) und Nukleotidphosphatase (Murabe and Sano, 1983), nicht-spezifische Esterase (Ling *et al.*, 1982) auch in Mikroglia gefunden. Weiterhin können Mikroglia mit den gleichen spezifischen Antikörpern wie Makrophagen gefärbt werden, wie Perry *et al.* 1985 erstmals zeigten. Beispiele dafür sind Marker wie F4/80 (Perry *et al.*, 1985) oder der OX-42 Antikörper gegen CD11b (Streit *et al.*, 1988) welche genutzt werden, um die Zellen immunhistochemisch im Hirngewebe zu detektieren.



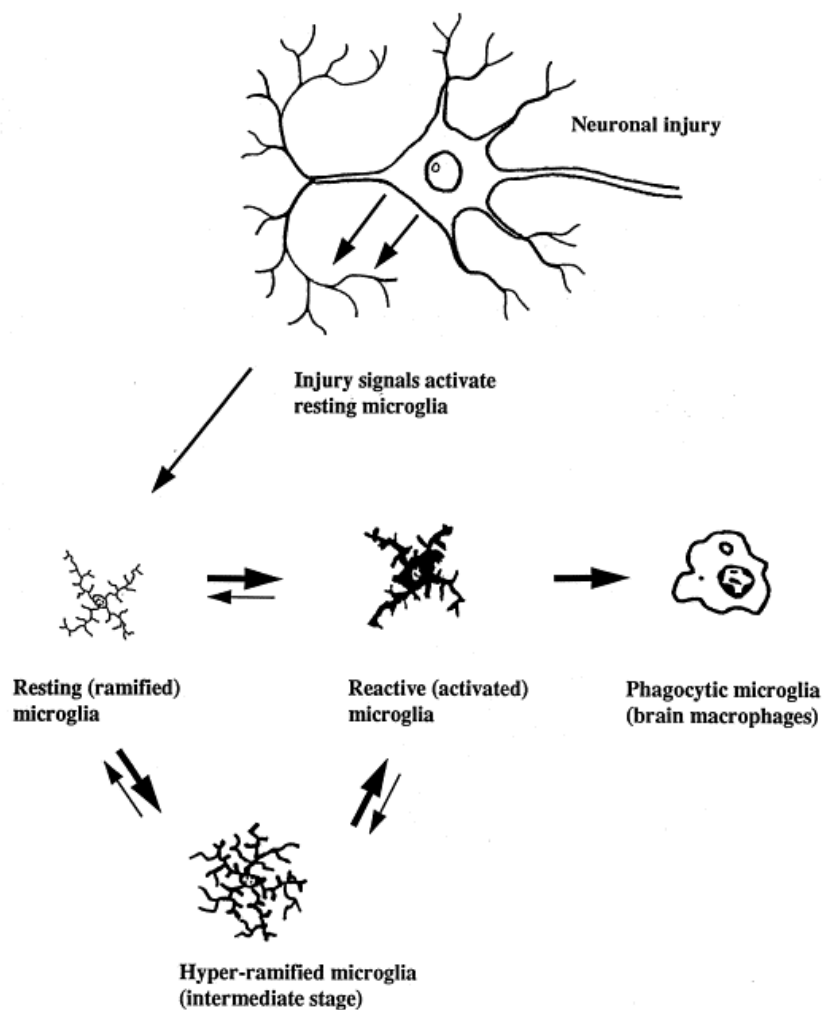
**Abbildung 1:** Mikroglia in historischer Darstellung (A: del Rio Hortega P and Penfield W., 1932; B: Glees P., 1955; C: Penfield W., 1932; D: Kershman J., 1939) Zusammengefaßt in: „Microglia In Health And Disease“ (Kim and de Vellis, 2005).

### 1.2.2. Die ramifizierte Mikrogliazelle

Im adulten Gehirn befinden sich die Mikrogliazellen in sogenanntem ruhenden Zustand. In diesem besitzen die Mikrogliazellen eine ramifizierte Morphologie, das heißt, einen kleinen Zellkörper, lange Verzweigungen und eine niedrige Expression von Oberflächenantigenen wie beispielsweise den Komplementrezeptor C3b (Wu *et al.*, 1994). Mit Hilfe von Einbringung radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA wurde eine geringe Zellteilungsrate im gesunden Hirngewebe nachgewiesen (Lawson *et al.*, 1992). In akuten Schnittpräparaten wurde gezeigt, dass ramifizierte Mikrogliazellen keine spannungsabhängigen Ströme und ein niedriges Membranpotential besitzen (Boucsein *et al.*, 2000).

Die stark verzweigte Mikroglia überwacht ihre Umgebung auf subtile Änderungen, die pathologischen Zuständen vorangehen, wie zum Beispiel Ungleichheiten der Ionenhomeostase (Gehrmann *et al.*, 1993), wozu wahrscheinlich die einzigartige Ausstattung der Mikroglia mit Membrankanälen notwendig ist (Kettenmann and Ilschner, 1993; Kettenmann *et al.*, 1990). Neueste Untersuchungen mit *in vivo* Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie- Experimenten zeigen, dass Mikrogliazellen in ruhendem Zustand ihre weiten Verzweigungen nutzen, um ihre Umgebung zu überwachen (Nimmerjahn *et al.*, 2005) und durch die Bewegung Ihrer *processus* in der Lage sind, auch kleinste homöostatische Änderungen wahrzunehmen.





**Abbildung 2:** Zusammenhang zwischen neuronalen Signalen und der Transformation von Mikrogliazellen vom ruhenden in den aktivierten Zustand (aus Streit, 1996).

### 1.2.3. Die aktivierte Mikroglia

Durch eine pathologische Veränderung oder durch eine Entzündungsreaktion im Gehirn werden Mikrogliazellen aktiviert. Aktivierte Mikroglia werden im Verlaufe unterschiedlichster Erkrankungen beobachtet: nach mechanischer Traumatisierung, zerebraler Intoxikation oder Ischämie, bei bakteriellen und viralen Infektionen oder bei neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel Morbus Alzheimer (Minghetti and Levi, 1998). Die Aktivierung der Mikroglia erfolgt nach einem stereotypen Schema, welches weitestgehend unabhängig von

---

der Ursache abzulaufen scheint. Zuerst ändern sie ihre Morphologie, wobei die verzweigten Ausläufer drastisch verkürzt werden und die Mikroglia ein recht kompaktes, amöboides Erscheinungsbild annehmen. In diesem Stadium der Aktivierung lassen sich gehäuft erhöhte Proliferationsraten beobachten (Streit *et al.*, 1988). Parallel dazu weisen Mikrogliazellen eine umfassende Adaption ihrer Antigeneigenschaften auf. So werden zuerst schwach detektierbare Antigene verstärkt, aber auch neue Rezeptoren exprimiert (Perry *et al.*, 1985; Perry and Gordon, 1987). Außerdem werden die Zellen migratorisch aktiv und wandern zum Ort der Läsion. Je nach Art der pathologischen Situation treten unterschiedliche Reaktionsabläufe auf.

Ein Tiermodell, welches häufig zum Studium der Funktion von Mikroglia eingesetzt wird, ist das Modell der peripheren Fazialisläsion. Mit isolierter Durchtrennung des Nervus facialis und damit einhergehender Zerstörung des zugehörigen Hirnnervenkernes, ohne Schädigung des umliegenden Hirngewebes, kann die Einwanderung und Reaktion von Mikrogliazellen im Gehirn bei intakter Blut-Hirn-Schranke beobachtet werden (Moran and Graeber, 2004). Bei Aktivierung gruppieren sich Mikrogliazellen in einem als „*neuronal stripping*“ bezeichneten Prozess um geschädigte Neurone und blockieren deren Eingangssynapsen. Vermutlich dient diese Unterbrechung der Transmission sowie der Interaktion mit umliegenden Astrozyten und die gemeinsame Ausschüttung trophischer Faktoren wie z.B. *transforming growth factor  $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1) der Regeneration (Streit *et al.*, 1988; Heese *et al.*, 1998; Kiefer *et al.*, 1993). Kommt es hingegen zu neuronaler Degeneration oder zu einer Invasion infektiöser Erreger, so transformieren Mikroglia zu phagozytotisch aktiven Gehirnmakrophagen, die neuronale Rückstände aus dem Gehirnparenchym entfernen.

Die Transformation wird zusätzlich von einer Anpassung der Oberflächenantigene begleitet. So werden Histokompatibilitäts-Antigene (*major histocompatibility complex* = MHC) exprimiert (Steiniger and van der Meide, 1988), wodurch Mikroglia zur Präsentation von Antikörpern (*antigen presenting cell* = APC) fähig sind. Im Vergleich zu peripheren Immunzellen sind sie jedoch relativ schwache APCs (Flugel *et al.*, 1999).

---

Aktivierte Mikroglia sind in der Lage, einige potentiell zytotoxische Substanzen zu sezernieren. Hierzu zählen beispielsweise Wasserstoffperoxid, Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid oder das Zytokin Tumornekrosefaktor  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ). Die Präsenz von irreparabel beschädigten Neuronen nach einem pathologischen Ereignis könnte zu weiteren Schäden führen. So erscheint es sinnvoll, dass Mikroglia aktiv eingreifen, den neuronalen Zelltod zum Wohle des umgebenden Gewebes beschleunigen und die Zellreste phagozytieren (Streit, 2002). Auch während der Entwicklung des ZNS spielen Mikroglia durch Induktion von Apoptose bei „überflüssigen“ Zellen eine wichtige Rolle (Streit, 2001).

### 1.3. Chemokine

Zellen können auf unterschiedliche Art und Weise mit- und untereinander kommunizieren. Als Signalmoleküle in immunologischen Prozessen spielen die Chemokine eine wichtige Rolle. Mit einem Molekulargewicht von 8 – 14 Kilodalton (kD) (Baggiolini, 1998) regulieren Chemokine das migratorische Verhalten und die Aktivierung von Immunzellen (Karpus and Ransohoff, 1998). Eine Störung in der Chemokinbildung, Chemokinfreisetzung beziehungsweise in der Aktivierung von Immunzellen und deren Invasionsantrieb kann zu einer chronischen Entzündung führen. Mehr als 50 unterschiedliche Proteine bilden die Familie der Chemokine. Man unterteilt die aus 68 bis 120 Aminosäuren bestehenden Chemokine in vier strukturelle Gruppen. Dabei sind für die Nomenklatur die Zahl und die Anordnung der ersten beiden von vier konservierten Cysteinen an dem aminoterminalen Ende entscheidend (Luster, 1998).

Die CXC oder  $\alpha$ -Familie, die CC oder  $\beta$ -Familie und die CX3C oder  $\delta$ -Familie besitzen vier konservierte Cysteine. Die  $\gamma$ -Familie, die C-Chemokine dagegen nur zwei. Die CXC-Chemokine besitzen eine nicht konservierte Aminosäure (X) zwischen den ersten beiden Cysteinen. Bei den CC-Chemokinen befinden sich die ersten zwei Cysteine nebeneinander, die C-Chemokine dagegen haben zwei der vier konservierten Cysteine verloren.

---

Im Gegensatz zu Zytokinen, ebenfalls wichtigen Signalmolekülen, weisen Chemokine stark konservierte strukturelle Motive auf (drei  $\beta$ -Faltblätter und eine  $\alpha$ -Helix). Sie können an verschiedene Chemokinrezeptoren binden und vermitteln ihre Signale über sogenannte G-Proteine. Chemokine werden von einer Vielzahl verschiedener Zellen gebildet und wirken auf sie, wobei ihre Synthese durch zelluläre Aktivierung, andere Mediatoren oder mechanische Reize ausgelöst wird. Charakteristische Funktion der Chemokine sind das Auslösen der Chemotaxis (Aktivierung des kontraktiven Zytoskeletts), Aktivierung der Sekretion anderer Botenstoffe (Freisetzung intrazellulärer Granula), erhöhte Rezeptorexpression und verstärkte Adhärenz der Zellen, Bildung von bioaktiven Lipiden (Arachidonsäurestoffwechsel) und die Freisetzung von toxischen Sauerstoffmetaboliten.

Die Anregung der Bewegung ist wahrscheinlich die interessanteste Funktion der Chemokine. Chemokine können in ihrem funktionellen Verhalten mit den klassischen chemotaktischen Agonisten wie C5a, platelet activating factor oder Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin verglichen werden. Die verschiedenen Chemokine mit chemotaktischer Wirkung auf unzählig verschiedene Zellen sind Bestandteil unzähliger Bücher und Publikationen. Neben den chemotaktischen Effekten auf verschiedene Zellarten besitzen Chemokine eine Reihe nicht-chemotaktischer Effekte. Wie oben erwähnt, sind Chemokine in den letzten Jahren als immer bedeutender für Kommunikationsprozesse innerhalb verschiedener Zellpopulationen in den Vordergrund getreten. Sie sind in der Lage die Sekretion von weiteren Mediatoren beispielsweise Interleukinen (Zimmermann *et al.*, 2003) und die Freisetzung anderer Metabolite zu fördern. Chemokine spielen sowohl in physiologischen aber auch in pathologischen Prozessen eine Rolle. So sind beispielsweise die CXC-Chemokine IL-8 und GRO- $\alpha$  an der Regeneration von Geweben und der Wundheilung beteiligt. Im Gegensatz dazu ist beispielsweise das CC-Chemokin MIP-1 $\beta$  an der Bildung von Atheromen bei arteriosklerotischen Plaques beteiligt (Waehre *et al.*, 2006).

Kein Chemokin vermittelt nur eine einzige Wirkung auf eine bestimmte Population von Zellen. Ein Chemokin kann an verschiedene Chemokinrezeptoren binden

und Chemokinrezeptoren können verschiedene Chemokine binden. Chemokine sind redundant wirksam. Zum Beispiel binden die Chemokine CCL2, CCL7, CCL8, CCL12 und CCL13 alle an den CC-Rezeptor-2, jedoch können die Chemokine CCL7, CCL8 und CCL13 auch an andere Chemokinrezeptoren wie zum Beispiel CCR1 und CCR3 binden. Bindet ein Chemokinrezeptor unterschiedliche Chemokine, so gehören diese Chemokine in der Regel in dieselbe Chemokingruppe. Bisher ist nur ein Chemokinrezeptor (CXCR3) beschrieben, der Chemokine sowohl aus der CXC- als auch aus der CC-Chemokinfamilie binden kann (Soto *et al.*, 1998).

<u>Zytokin</u>	<u>Cysteinposition innerhalb der Aminosäuresequenz</u>
CX3C:	... <b>CXXXC</b> .....C.....C
CXC:	... <b>CX_C</b> .....C.....C
CC:	... <b>C</b> .....C.....C
C:	..... <b>C</b> .....C.....C

**Abbildung 3. Klassifikation der Chemokinfamilie**, C steht für ein konserviertes Cystein, X für eine beliebige Aminosäure. Punkte stellen nicht konservierte Aminosäurepositionen dar. Die Linie kennzeichnet Positionen, an denen Aminosäuren in der Sequenz fehlen (Lücken im Alignment).

Die meisten Zellen exprimieren verschiedene Rezeptoren für Chemokine. Ist ein Ligand oder Rezeptor nicht funktionell, können alternative Chemokine oder Rezeptoren die biologische Funktion übernehmen. Zum Beispiel gibt es acht verschiedene CXC-Chemokine, die an den CXC-Rezeptor-2 binden und ihn aktivieren können. Ist der CXCR2 nicht funktionell, können Granulozyten über die Aktivierung des CXCR1 durch CXCL8 oder CXCL6 angelockt werden. Diese Kombinationsvielfalt an Chemokinen und Rezeptoren macht das Chemokinsystem sehr robust gegenüber Ausfällen. Dies konnte durch den Einsatz von *Knock-out*-Mäusen, die entweder ein Chemokin oder einen Chemokinrezeptor nicht exprimieren, bestätigt werden (Mantovani, 1999b). Nur

geringe Veränderungen bezüglich des Phänotyps und der Entwicklung waren die Folge.

Die Redundanz von Chemokinen spielt zum Beispiel beim Eintritt des M-tropischen Stranges von HIV über CCR5 eine Rolle (Pal *et al.*, 1997). Der Verlust von CCR5 scheint eine Resistenz gegenüber HIV-Infektionen zu verleihen (Dean *et al.*, 1996).

Chemokine werden entweder konstitutiv, das heißt permanent oder induziert exprimiert. In Lymphorganen zum Beispiel werden konstitutiv Chemokine exprimiert und kontrollieren dort möglicherweise die Wanderung von Zellen unter physiologischen Bedingungen (Mantovani, 1999b).

Induzierbare Chemokine werden als Antwort auf mikrobielle, entzündliche oder andere pathologische Signale synthetisiert und bewirken die Attraktion von Immunzellen. Ferner gibt es noch konstitutiv exprimierte Chemokine, die unter pathologischen Bedingungen auch induziert werden können und somit in beiden Gruppen auftreten.

### **1.3.1. Chemokinrezeptoren**

Chemokine binden auf der Zelloberfläche an Chemokinrezeptoren (Rollins, 1997). Bis jetzt sind heptahelikale Rezeptoren charakterisiert, welche über Guanosin-triphosphat-(GTP)-bindende Proteine (G-Proteine) gekoppelt sind (Dohlman *et al.*, 1991).

Die Nomenklatur der Chemokinrezeptoren entspricht der Nomenklatur der Chemokine. Rezeptoren, die CXC-Chemokine binden, werden als CXC-Rezeptoren (CXCR) bezeichnet. Bisher sind 16 verschiedene Chemokinrezeptoren kloniert (Murphy *et al.*, 2000). Das sind fünf CXCR (CXCR1-CXCR5), zehn CCR (CCR1-CCR10) und ein CX3C-Rezeptor (CX3CR1).

Während die Transmembrandomänen und die zweite und dritte intrazelluläre (zytoplasmatische) Domäne der Chemokinrezeptoren konserviert sind, variieren die Aminosäuresequenzen der amino- und carboxyterminalen Enden. Generell wird die Bindungsspezifität der Liganden durch die Sequenz des freien Aminosäure-Endes in Kombination mit der Sequenz der extrazellulären Domäne

---

definiert. Das intrazelluläre carboxyterminale Ende dieser Rezeptoren ist reich an Serin und Threonin, die möglicherweise wichtig für eine Kopplung über G-Proteine sind (Murphy *et al.*, 2000). Die strukturelle Konformation und Aminosäuresequenz der intrazellulären Loops entscheidet über die Spezifität der G-Protein-Kopplung (Damaj *et al.*, 1996). Viele Chemokinrezeptoren sind an G $\alpha$ i-Rezeptoren gekoppelt da die meisten biologischen Funktionen der Chemokine durch Pertussis-Toxin geblockt werden können (Luster, 1998).

Da es jedoch biologische Funktionen gibt, die nicht unterdrückt werden können, dürften weitere G-Proteine in der Signaltransduktionskaskade eine Rolle spielen.

### **1.3.2. Wirkungsweise des Chemokinsystems**

Chemokine sind, wie oben beschrieben, in ihrer Wirkung redundant, können also verschiedene Wirkungen vermitteln.

Wie werden demnach spezifische Reaktionen reguliert? Dies kann auf unterschiedlichen Wegen passieren: dabei spielen die Chemokin/Rezeptor-Verfügbarkeit, eine dynamische Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor auf der Zelloberfläche und unterschiedliche Signaltransduktionswege eine Rolle.

Die zwei folgenden Beispiele beschreiben die Regulation durch Beeinflussung der Chemokin/Rezeptor-Verfügbarkeit: Bei der Differenzierung von Epithelzellen oder Leukozyten variiert die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren je nach Stadium. Damit werden programmierte Antworten auf spezifische Chemokine ermöglicht (Murphy *et al.*, 2000). Fast alle mononukleären Zellen können Chemokine produzieren, jedoch ist die zelluläre Expression der Chemokinrezeptoren stark variabel und diktiert die zellulären Antworten.

Eine Kontrolle der Chemokinwirkung durch dynamische Interaktionen kann folgendermaßen beschrieben werden: Auch wenn zwei Chemokinrezeptoren mit ähnlicher Ligandenbindung auf derselben Zelle vorhanden sind, treten für diese Rezeptoren in der Regel Unterschiede in der Bindungsaffinität der Liganden auf (Devalaraja and Richmond, 1999). Weiterhin kann ein Rezeptor nach Bindung des Liganden Konformationsänderungen unterliegen, welche ihn für einen weiteren Bindungspartner blockieren. Als dritter Kontrollmechanismus gelten die

---

vielen Möglichkeiten die der Transduktionsweg bietet. Die Interaktion eines Chemokins mit seinem Rezeptor kann zu dem Austausch von GTP mit Guanosindiphosphat (GDP) führen und zur Ablösung der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins. Die freien  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten können unterschiedliche intrazelluläre Signalwege aktivieren wie zum Beispiel den der zyklischen Adenosinmonophosphat/Proteinkinase oder A-Weg, den Mikrotubuli-assoziierten-Proteinkinase-Weg (MAP), den Phosphatidylinositol-Kalzium-Proteinkinase-Weg (C-Weg) und den C-Jun-N-terminalen-Kinase-Weg (JNK) (Preininger and Hamm, 2004). Es verdichten sich ebenso immer mehr Beweise für einen Zusammenhang (*cross talk*) zwischen diesen Wegen (Xia *et al.*, 1995).

### 1.3.3. Chemokine und das Zentrale Nervensystem

Seit ungefähr 10 Jahren beschäftigen sich Wissenschaftler mit Chemokinen im ZNS. In vielen Arbeiten wurden Beweise erbracht, dass alle Zellen des ZNS funktionelle Chemokinrezeptoren exprimieren können. Chemokine sind beteiligt an der Entwicklung des Gehirns, an Migration, Differenzierung und Proliferation von Neuronen und Gliazellen. Dabei werden die reaktiven Chemokine von den konstitutiv exprimierten Chemokinen unterschieden. Chemokine, die bei pathologischen Vorgängen im zentralen Nervensystem gebildet und bei Entzündungsprozessen ausgeschüttet werden, sind nach neuesten Publikationen mehrfach mit neurodegenerativen Veränderungen beziehungsweise Erkrankungen assoziiert. Am häufigsten wurden bis heute CX3CL1 (*fractalkine*) und CXCL12 (*stroma cell derived factor 1 alpha*) beschrieben, welche von Neuronen und Astrozyten gebildet werden (Bajetto *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 1998; Mantovani, 1999a) Weiterhin zeigen viele Publikationen, dass die gliale Chemokinproduktion von Zytokinen, bakteriellen Toxinen,  $\beta$ -Amyloid oder viralen Proteinen abhängig ist.

Die entsprechenden Rezeptoren werden auf der Oberfläche von Gliazellen, Neuronen und Immunzellen exprimiert. Es wurde gezeigt, dass in vielen Fällen Mediatoren wie TGF- $\beta$ 1 oder IFN- $\gamma$  auslösend für eine Insertion der Rezeptor in die Membran sind (Han *et al.*, 2001).



---

Chemokine, die konstitutiv in Hirnzellen vorkommen, sind immer noch wenig erforscht. Eine wichtige Rolle spielen Chemokine in der Differenzierung und Migration multipotenter Progenitorzellen während der Entwicklung des Hirngewebes. Es werden Ähnlichkeiten mit dem Mechanismus der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen beschrieben (McManus *et al.*, 1998).

Bolin *et al.* (1998) erforschten *in vitro* die Differenzierung des nozizeptiven Phänotyps der *dorsal root* Ganglienzellen (DRG) durch RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) und MCP-1 $\alpha$  (*Monocyte chemoattractant protein 1*). *Stroma cell derived factor* und sein Rezeptor CXCR4 spielen eine fundamentale Rolle in der Migration von Neuronen innerhalb der Kleinhirnentwicklung (Bajetto *et al.*, 2001). In CXCR4  $-/-$  Mäusen war die fetale Entwicklung des Zerebellums stark beeinträchtigt. Die Migration von Zellen aus dem *Stratum granulosum externum* in das *Stratum granulosum internum* erfolgte nicht wie üblich nach der Geburt, sondern schon embryonal. Die Zerebella der Tiere zeigten eine starke Malformation ohne Foliation (Ma *et al.*, 1998; Tachibana *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1998). Im Menschen wurde in embryonalem Nervengewebe die Expression von CCL2 (Meng *et al.*, 1999) durch Neurone und CXCR3 (Van Der *et al.*, 2001) durch Astrozyten bewiesen, die Rolle in der menschlichen Hirnentwicklung bleibt jedoch noch ungeklärt. Es wird spekuliert, dass Astrozyten mit Hilfe von Chemokinen sogar Einfluss auf die neuronale Verarbeitung und Verschaltung haben. Es häufen sich Hinweise dafür, dass Astrozyten durch Expression von Chemokinen möglicherweise Einfluss auf die Neurotransmission ausüben. Es gibt Experimente, welche beschreiben, dass Astrozyten durch Glutamatfreisetzung einen Einfluss auf die synaptische Transmission haben (Bezzi and Volterra, 2001). Der normalerweise nur in Neuronen vermutete Botenstoff Glutamat, welcher eine enorme Rolle im Prozess neuronaler Verschaltung hat, kann auch von Astrozyten sezerniert werden. In neueren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Chemokine die Glutamat-Ausschüttung in Astrozyten regulieren. Neben diesen neuen Erkenntnissen konnte ebenso gezeigt werden, dass das Chemokin CXCL12 nicht nur eine

Ca<sup>2+</sup>-Elevation in kultivierten Granulazellen bewirkt, sondern auch die synaptische Aktivität in Purkinjezellen in Kleinhirnschnitten beeinflusst.

Damit ist die Rolle der Chemokine im ZNS nicht nur allein auf die Induktion von Zellbewegungen beschränkt.

#### **1.3.4. Chemokine bei pathologischen Prozessen im ZNS**

Die Charakterisierung der Funktionen von Chemokinen bei pathologischen Prozessen im ZNS ist Grundlage vieler Arbeiten. Im Gehirn sorgen Chemokine für die Einwanderung von Leukozyten während Entzündungsprozessen. Es wird vermutet, dass Immunzellen Konzentrationsgradienten von Chemokinen folgen und so zu dem entzündeten Gewebe gelangen. Die Nähe der Astrozyten und Mikroglia zur Blut-Hirn-Schranke lässt vermuten, dass diese Zellen die Einwanderung von Immunzellen regulieren (Bajetto *et al.*, 2001).

Fast bei allen neurodegenerativen Erkrankungen wurde neben der Aktivierung von Gliazellen auch die Expression von Chemokinen beschrieben. Eine häufig untersuchte degenerative ZNS Erkrankung ist die Multiple Sklerose (MS). In einem Modell für die MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) wurde gezeigt, dass CCR2<sup>-/-</sup> Tiere keine MS-Pathologie zeigen. (Fife *et al.*, 2000; Izikson *et al.*, 2000). Weiterhin wurde im Modell keine Infiltration von Makrophagen gefunden (Huang *et al.*, 2001).

Bei der Alzheimer-Krankheit wird angenommen, dass Chemokine, welche in der Umgebung der amyloiden Plaques produziert werden, Gliazellen anziehen und aktivieren und es somit zu einer lokalen Entzündungsreaktion um die Plaques herum kommt (Xia and Hyman, 1999)

Auch bei der Infektion mit dem HI-Virus spielen Chemokinrezeptoren im ZNS eine Rolle. Die Rezeptoren CXCR4 und CCR5 werden bei Eindringen des Virus in die Mikrogliazelle benutzt, und neuere Ergebnisse zeigen, dass Chemokine eventuell eine Rolle bei der Manifestation der *AIDS related dementia* spielen (Miller and Meucci, 1999). Hippocampale Neurone von Patienten mit HIV-Enzephalitis haben eine höhere Expression von Chemokinrezeptoren als Patienten ohne Infektion (Petito *et al.*, 2001).

---

Neuere Ergebnisse zeigen, dass Chemokine Einfluss auf Tumorwachstum und Tumorausdehnung (Rempel *et al.*, 2000) haben. Ebenso werden altersbedingte Gehirnveränderungen wie zum Beispiel hirnatrophische Prozesse (Felzien *et al.*, 2001) von Chemokin-Ausschüttung und -Rezeptorexpression begleitet. Ferner hat es sich in den letzten Jahren immer deutlicher gezeigt, dass eine komplexe Kombination aus Chemokinen im zentralen Nervensystem nicht nur für die ursprünglich angenommene Rekrutierung von Immunzellen verantwortlich ist, sondern weitaus komplexere Kreisläufe erwartet werden können.

### 1.3.5. Das Chemokin CCL21

Eine wichtige Rolle bei physiologischen und pathologischen Prozessen im ZNS spielt das Chemokin CCL21 (Synonyme: SLC, TCA4, 6CKine oder Exodus-2).

CCL21 wurde zuerst als Ligand für den CC-Rezeptor-7 identifiziert. Soto und Mitarbeiter zeigten darüber hinaus eine Affinität zum CXC-Rezeptor-3 (Soto *et al.*, 1998).

Imaging-Experimente, die das intrazelluläre  $Ca^{2+}$  beurteilen können, zeigten in CXCR3-transfizierten Mäusen, dass lediglich CXCL9, CXCL10 und CCL21 einen Kalziumanstieg auslösten. Damit wurde erstmals gezeigt, dass ein CC-Chemokin spezifisch an einen CXC-Rezeptor binden kann. Eine andere mögliche Bindungsstelle zeigte sich am CC-Rezeptor-7 (Yoshida *et al.*, 1998). Interessanterweise bindet humanes CCL21 nur an den CC-Rezeptor-7 während murines CCL21 zusätzlich noch an den CXCR3-Rezeptor bindet. Gezeigt wurde, dass in CXCR3-transfizierten Mäusen humanes CCL21 keine Kalziumantwort auslösen kann (Jen *et al.*, 1999), während CCL21 der Maus sowohl nach Bindung an CCR7 als auch an CXCR3 einen Konzentrationsanstieg von Kalzium induzieren kann. Da CCL21 der Maus und des Menschen nur in 70 % ihrer Peptidsequenz übereinstimmen und der CXCR3-Rezeptor im Aminosäureterminus zwischen Mensch und Maus zu nur 86 % identisch ist, werden speziesspezifische Eigenschaften durch diese variierenden Bereiche begründet, (Soto *et al.*, 1998).

CCL21 wird im zentralen Nervensystem von Neuronen und Astrozyten gebildet. Biber und Mitarbeiter (Biber *et al.*, 2001) konnten mit immunhistochemischen

Färbemethoden zeigen, dass CCL21 in Neuronen im Kortex vorhanden ist und dass diese in Kultur bei neuronalem Schaden CCL21 ausschütten. In den abgestorbenen Neuronen konnte außerdem CCL21 mRNA nachgewiesen werden. CCL21 ist ein funktioneller Ligand von auf Mikrogliazellen exprimiertem CXCR3. Es wird angenommen, dass CCL21 als ein wichtiger Mediator zwischen verletzten Neuronen und Mikrogliazellen notwendig ist (Chen *et al.*, 2002).

Humane Mikrogliazellen zeigen eine maximale migratorische Antwort bei einer CCL21-Konzentration von 0,1-1nM (Biber *et al.*, 2002b). Es wurde eine Bindung an CXCR3 nachgewiesen, wobei neben dem Rezeptor auch die Zellart eine Rolle spielte. CXCR3-transfizierte HEK293-Zellen zeigten keine Migration nach CCL21 Stimulierung, während im Kontrollversuch mit CXCL9 und CXCL10 eine Reaktion beobachtet werden konnte.

Elektrophysiologische Untersuchungen an Mikrogliazellen zeigten, dass CCL21 eine interessante Rolle im Informationsaustausch zwischen Mikroglia und Neuronen spielt, Chemokine also für die Mikroglia-Neuron-Interaktion von steigendem Interesse werden könnten. Nach Bindung an CXCR3 triggert CCL21 einen Kalziumanstieg und einen darauf folgenden Chloridstrom in der Mikrogliazelle (Rappert *et al.*, 2002). Im Patch-clamp-Experiment kam es bei Ganzzelleableitungen 30 Sekunden nach lokaler Applikation von CCL21 zu einer zehn Minuten andauernden Leitfähigkeitsänderung. Dieser Strom reagierte sensitiv auf Chloridkanalblocker, woraus geschlossen werden kann, dass die Änderung hauptsächlich durch einen Chloridstrom getragen wird (Rappert *et al.*, 2002).

Basierend auf diesem Ergebnis beschäftigte ich mich in der folgenden Arbeit mit der genaueren physikalischen Charakterisierung des Kanals, der für diese Leitfähigkeitsänderung verantwortlich ist.

#### **1.4. Ionenkanäle in mikroglialen Membranen**

Im gesunden adulten Gehirn befinden sich Mikrogliazellen im nicht aktivierten Zustand und werden während Entzündungsprozessen und nach neuronalem Schaden aktiviert.

---

In vielen Patch-clamp-Untersuchungen wurde gezeigt, dass Mikrogliazellen eine große Anzahl an Ionenkanälen exprimieren. Allein sechs verschiedene Kaliumkanal-Typen wurden in den letzten Jahren charakterisiert. In Kultur und *in situ* exprimieren Mikrogliazellen spezifische Kanaltypen für unterschiedliche Ionen. Das wichtigste Kriterium in der Beschreibung von Kanaltypen in aktivierbaren Zellen ist die Unterscheidung zwischen dem aktivierten und ruhenden Zustand. Die physiologischen Eigenschaften der Mikrogliazelle wurden deshalb in den seltensten Fällen an ruhenden sondern, durch den Prozess der Kultivierung, an aktivierten Zellen untersucht.

Akut isolierte Hirnschnitte sind bis heute die Experimente, welche am nächsten mit der *in situ* Experimenten verglichen werden können. Patch-clamp-Experimente ließen an Schnitten aus Kortex, Striatum oder *Nervus facialis* erkennen, dass Mikroglia keine spannungsaktivierten Ströme in Ruhe exprimieren (Boucsein *et al.*, 2000).

Mit Hilfe des Fazialiskernmodells, bei welchem Zellen *in situ* im Fazialiskern aktiviert werden, konnte gezeigt werden, dass sich die Stromantwort ändert. In diesem Modell werden mit Durchtrennung des *Nervus facialis* bei intakter Blut-Hirn-Schranke Mikrogliazellen durch Motoneurone, die auf den lokal entfernten Axonschaden reagieren, aktiviert (Blinzinger and Kreutzberg, 1968). 12 Stunden nach der Fazialisdurchtrennung kommt es zu einem einwärts-gerichteten Strom von Kaliumionen und nach 24 Stunden wurde ein zusätzlicher Auswärtsstrom beobachtet. Sieben Tage nach Axotomie zeigt die Zelle wieder das Stromprofil der ruhenden Zelle (Boucsein *et al.*, 2000). Ähnliche Veränderungen im Stromprofil können auch während der Entwicklung der Zellen beobachtet werden. Während der Invasion aus den Blutgefäßen ins Hirngewebe zeigen amöboide Mikroglia ein ähnliches Stromprofil wie in einem frühen Aktivierungsstadium, nämlich ausschließlich einwärts gerichtete Ströme.

In Kultur zeigen Mikrogliazellen ein charakteristisches Stromprofil, welches sich von *in situ* Experimenten unterscheidet. Fast alle kultivierten Mikroglia besitzen als „Markenzeichen“ einen einwärts gerichteten Kaliumstrom, welcher nicht mit der Morphologie oder dem Stadium der Ramifizierung in Zusammenhang steht. Dieser Kaliumkanal (Ilschner *et al.*, 1995) hat eine Einzelkanalleitfähigkeit von 30

---

pS. Die Öffnungswahrscheinlichkeit wächst mit Hyperpolarisation. Es scheint, dass dieser Kanal das Membranpotential auf -70 mV setzt.

Auswärts gerichtete Ströme konnten in unstimulierten kultivierten Zellen nicht beobachtet werden, woraus zu schließen ist, dass sich eine kultivierte Mikrogliazelle in einem ähnlichen Stadium wie die frühe pathologisch aktivierte Zelle befindet (Kettenmann *et al.*, 1990).

LPS-Gabe bringt die Zelle in einen vollständig aktivierten Zustand, begleitet von Freisetzung verschiedener Substanzen wie NO, TNF $\alpha$  oder IL6. Nach Stimulation mit LPS kommt es zu einem auswärtsgerichteten Strom mit Reduktion des einwärts gerichteten Stromes (Draheim *et al.*, 1999).

Die Expression von auswärts gerichteten Kaliumkanälen steht in engem Zusammenhang mit dem Aktivierungszustand der Zelle. In amöboiden beziehungsweise ruhenden Mikroglia ist dieser Strom nicht nachweisbar. Einige Untersuchungen zeigen, dass es sich um einen Kv1.3 Subtyp handeln muss (Norenberg *et al.*, 1993; Schilling *et al.*, 2000), wobei aber auch der Kv1.5 Subtyp in aktuelleren Arbeiten als Kandidat für aktivierende Eigenschaften in Betracht gezogen wird (Pannasch *et al.*, 2006). Funktionell scheinen diese Kanäle an der Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung eines negativen Membranpotentials nach Depolarisation beteiligt zu sein.

Auch Makrophagen zeigen diese Kanaleigenschaften (Eder, 1998). Schmidtmayer *et al.* (1994) zeigten Natriumkanalströme, die nach direktem Kontakt mit Astrozyten begleitet von der Transformation in ramifizierte Zellen auftraten. Diese Aussage konnte auch an Monozyten reproduziert werden.

Die Mikrogliazelle exprimiert außerdem Protonenkanäle (Eder and Heinemann, 1996), welche nicht in Zusammenhang mit dem Aktivierungszustand der Zelle stehen (Klee *et al.*, 1999). Protonenströme sind abhängig vom intrazellulären und extrazellulären pH-Wert. Zusätzlich scheinen Protonenströme auf Zellschwellung zu reagieren und eine Rolle im Ablauf der Phagozytose zu spielen (Moriyama *et al.*, 2000). Bis jetzt wurden in Mikrogliazellen keine ligandenaktivierten Ionenkanäle beschrieben.

---

Eine weitere große Gruppe von Kanalproteinen in mikroglialen Membranen sind Chloridkanäle und in den letzten Jahren wurden immer mehr Erkenntnisse zu Aufgaben und zur Funktionsweise dieser wichtigen Proteine gewonnen.

#### **1.4.1. Chloridkanäle der Mikrogliazelle**

Chlorid ist ein sehr häufig vorkommendes Anion in biologischen Systemen. In den Anfängen wurde Chlorid häufig eine unspezifische und passive Rolle zugeschrieben. Erst im Laufe der Zeit wurde erkannt, dass Chlorid eine entscheidende Rolle in vielen verschiedenen physiologischen Prozessen spielt. Zellvolumen-, pH-, und Flüssigkeitsregulierung sind nur einige Beispiele. Die Chloridkonzentration unterscheidet sich innerhalb verschiedener Zelltypen und kann sich ebenso während verschiedenen Zellzyklen verändern (Cherubini *et al.*, 1991; Chipperfield and Harper, 2000).

In Mikrogliazellen wurden in den letzten Jahren drei Gruppen von Chloridkanälen experimentell nachgewiesen, spannungsaktivierte, spannungsunabhängige und schwellungsabhängige Chloridströme. Spannungsunabhängige und schwellungsabhängige Kanäle haben ähnliche kinetische und pharmakologische Eigenschaften. Schlichter und Mitarbeiter (1996) schlussfolgerten, dass der gleiche Kanal für die Stromantworten verantwortlich ist. Die Ströme gleichen außerdem denen anderer Zellen des Immunsystems.

Eine große Gruppe von Chloridkanälen sind die spannungsabhängigen Chloridkanäle. Diese konnten bis jetzt nicht in *whole-cell*- aber in *inside-out*-Experimenten nachgewiesen werden. Diese Beobachtung wurde in Versuchen mit Makrophagen aber auch anderen nicht erregbaren Zellen gemacht (Gallin, 1991). Physiologische Eigenschaften sind bestimmt durch die Depolarisation der Zellmembran. Außerdem wurden verschiedene Leitfähigkeitszustände in Mikroglia aus dem Rinderhirn und auch in humanen Makrophagen (Schwarze and Kolb, 1984; Hille, 1984) an spannungsabhängigen Kanälen beobachtet. Sowohl Amplitude als auch Kinetik des Kanals zeigten sich unabhängig vom pH-Wert.

Spannungsunabhängige Kanäle sind ebenfalls in der Membran von Mikroglia verschiedener Spezies beschrieben worden (Schlichter *et al.*, 1996; Visentin *et*

---

*al.*, 1995). In letzter Zeit stark beachtet, sind die schwellungsabhängigen Kanäle, die bei extrazellulärer, hypoosmolarer Flüssigkeit zu einer starken Erhöhung der Chloridströme über der Membran führen (Schlichter *et al.*, 1996). Es wird diskutiert, ob dieselben Kanäle auch auf mechanische Membrandehnung reagieren, da beide Ströme ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften aufweisen. Beide weisen einen auswärtsgerichteten Strom auf und das *gating*-Verhalten ist nicht zeit- oder spannungsabhängig, ATP ist essentiell für Öffnung und die Öffnungswahrscheinlichkeit ist durch Chloridkanalblocker 4,4-Diisothiocyanatostilbene-2,2-Disulfat-Säure (DIDS) und 4-Acetamido-4-Isouthiocyanatostilbene-2,2-Disulfat-Säure (SITS) beeinflussbar (Eder, 1998).

Die Aufgabe von Chloridkanälen in der mikroglialen Zellmembran ist nach neuesten Erkenntnissen stark mit der Regulierung des Zellvolumens assoziiert (Eder, 2005). Außerdem spielen Chloridkanäle eine wichtige Rolle in der Proliferation sowohl in der Entwicklung der Zelle als auch im Aktivierungsprozess. Es wurde in Proliferationsversuchen gezeigt, dass Chloridkanalblocker die von Mikrogliazellen reduzieren (Schlichter *et al.*, 1996).

Eine weitere wichtige Aufgabe der Chloridkanäle besteht in der Regulation von *shaping*-Prozessen. Die Mikrogliazelle wechselt abhängig vom Aktivierungszustand zwischen einer amöboiden und einer ramifizierten Form (siehe Kapitel 1.2.). Besonders Chloridionen sind essentiell für diese Formveränderungen (Eder, 2005).



### 1.5. Ziele

Mikroglia, die Immunzellen des Gehirns, werden während akuter und chronischer ZNS-Erkrankungen aktiviert. Wie die einzelnen Gehirnzellen dabei interagieren und welche Signale zur mikroglialen Aktivierung führen, ist im einzelnen nicht bekannt. Als potente Signalmoleküle werden Chemokine diskutiert.

Besonders die elektrophysiologischen Grundlagen der Zellen sind wenig erforscht. Mit der vorliegenden Arbeit soll eine Kanalpopulation auf Mikroglia elektrophysiologisch auf Einzelkanalebene charakterisiert werden, bei welcher es sich um eine Chloridionen leitende Kanalgruppe handelt, Dieser Chloridkanal wird durch Stimulation mit dem Chemokin CCL21 aktiviert. Weiterhin soll die Rolle des Chemokins CCL21 auf die Ionenhomöostase von Mikrogliazellen untersucht werden.

1) *Welcher Ionenkanal öffnet sich nach Bindung von CCL21 an den CXCR3-Rezeptor auf Mikrogliazellen?* CCL21 löst nach Bindung an Mikrogliazellen in Kultur und im Hirnschnitt eine Leitfähigkeitsänderung aus. Pharmakologische Untersuchungen lassen auf einen Chloridstrom schließen (Rappert *et al.*, 2002). In Patch-clamp-Experimenten soll der einzelne Ionenkanal elektrophysiologisch charakterisiert werden, der für diesen CCL21-stimulierten Chloridstrom verantwortlich ist.

2) *Wie beeinflusst CCL21 die Chloridhomöostase nach Bindung an den CXCR3-Rezeptor in Mikrogliazellen?* Durch die Bindung von CCL21 an den CXCR3-Rezeptor kann die Mikrogliazelle zur Chemotaxis angeregt werden. Chlorid hat dabei eine entscheidende Rolle. Mit Hilfe von Imaging-Experimenten soll die Chloridhomöostase in Mikrogliazellen nach Stimulation mit CCL21 beurteilt werden. Weiterhin sollen die elektrophysiologischen Erkenntnisse über die Rolle von Chlorid mit dieser Methode bestätigt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Präparation der Mikrogliazellkulturen

Neugeborene Mäuse des Stammes NMRI wurden durch Dekapitierung getötet und das Gehirn entnommen (Giulian and Baker, 1986; Frei *et al.*, 1986). Das Gehirn wurde in eine mit *Hank's balanced salt solution* (HBSS, Seromed/Biochrom, Berlin, Deutschland) gefüllte Petrischale überführt. Kleinhirn und Hirnhäute wurden vorsichtig entfernt, um Verunreinigung durch Endothelzellen oder Fibroblasten zu verhindern. Nach zwei bis drei Waschvorgängen wurde das Gehirn in 1 % Trypsin für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, erneut gewaschen, 0,5 mg DNase/1 ml HBSS hinzugegeben und mit einer feuerpolierten Pasteurpipette dissoziiert. Die DNase zersetzt ausgetretene DNA und verhindert somit erneutes Verklumpen der Zellen. Danach wurden die Zellen in ein mit 10 % fötalem Kälber Serum (FCS) in DMEM gefülltem Zentrifugenröhrchen zweimal für 10 Minuten bei 800 U/Minute und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert, die Zellen in mit Poly-L-Lysin (10mg/l) beschichteten 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) in 10 % FCS in DMEM gegeben, bei 37° C inkubiert und am folgenden Tag zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für sieben Tage in DMEM mit 10 % FCS inkubiert, wobei alle 2 Tage das Medium gewechselt wurde. In dieser Zeit bildet sich ein konfluenten Astrozytenrasen. Die Mikroglia wachsen auf und unter diesem Astrozytenrasen.

Durch die Zugabe von 5 ml konditioniertes Medium der Zelllinie L929 pro Kulturflasche wird die Proliferation angeregt. Nach 3 Tagen wurden die locker auf den Astrozyten liegenden Mikroglia durch leichtes Klopfen gegen die Flaschenwand abgetrennt, die Zellsuspension abgesaugt und für 10 Minuten bei 800 U/Minuten und 4 °C zentrifugiert. Zum resuspendierten Pellet wurde 1 ml DMEM hinzugegeben und die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.  $5 \times 10^4$  Zellen wurden pro Poly-L-Lysin-beschichtetes Deckgläschen (16 mm Durchmesser) ausplattiert, eine Stunde zum Anheften inkubiert, 1 ml DMEM hinzu gegeben und am folgenden Tag nochmals durch Wechseln des Mediums gewaschen. Kultivierte Mikroglia wurden 1-4 Tage nach dem Ausplattieren verwendet.

## 2.2. Lösungen

Für die Experimente mit kultivierten Mikrogliazellen wurde eine mit HEPES gepufferte Badlösung verwendet. Die Perfusion der Zellen in der Messkammer erfolgte durch gleichmäßigen Zu- und Ablauf der Badlösung. Die Badkammer wurde mit 2 ml/Minute mit Badlösung perfundiert.

Für die lokale Applikation des rekombinanten Chemokins CCL21 wurde eine zweite Mikropipette verwendet. Diese Stimulationspipette positionierte man in der Nähe der zu untersuchenden kultivierten Zelle. Durch einen angelegten Druck konnte der Inhalt der Stimulationspipette (10  $\mu$ M CCL21 in PBS) in das Bad abgegeben werden. Die Badperfusion (Lösung 1, Tabelle 1) wurde bei der lokalen Applikation nicht gestoppt, so dass die Substanzen nach Beendigung der Applikation schnell ausgewaschen wurden.

Um sicher zu gehen, dass das Chemokin die Zelle erreichte, wurde das Lokalapplikationssystem an jedem Versuchstag mit einem Farbstoff auf Druck und Fließrichtung der Applikation geprüft.

Die Ableitelektrode wurde mit einer Elektrolytlösung (Lösung 2, Tabelle 1) so weit gefüllt, dass der Elektrodendraht im Pipettenhalter gerade in die Flüssigkeit eintauchte. Bei Einzelkanalexperimenten wurde der Pipettenlösung (Lösung 2)  $\text{BaCl}_2$  und CsCl beigefügt, um Kaliumkanal-Ströme unter dem gemessenen Patch so gut wie möglich zu eliminieren (Sacchi *et al.*, 2003). In *Perforated-patch*-Experimenten wurde in DMSO gelöstes Gramacidin mit Pipettenlösung (Lösung 3, Tabelle 1) zu 50  $\mu$ g/ml verdünnt.

Für Imaging-Experimente wurden die Zellen mit Lösung 1 im Bad unter einem Mikroskop perfundiert. Um die Konzentration von Chloridionen im Extrazellulärraum zu verändern wurde Lösung 4 gegen Lösung 1 ausgetauscht. Die niedrig Chlorid enthaltende Badlösung wurde durch Austausch von NaCl gegen äquimolare Mengen Natriumglukonat und weiterhin Austausch von KCl gegen äquimolare Mengen Kaliumglukonat erreicht.

Lösung	1	2	3	4
<b>NaCl</b>	150	135	5	
<b>Na-Glukonat</b>				150
<b>KCl</b>	5,4	5,4	140	
<b>K-Glukonat</b>				5,4
<b>MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O</b>	1	1		1
<b>CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O</b>	2	2	5	2
<b>HEPES</b>	5	5	10	5
<b>D-Glukose</b>	10	10		10
<b>CsCl</b>		5		
<b>BaCl<sub>2</sub></b>		1		

**Tabelle 1:** Dargestellt sind die Konzentrationen in mM der Bestandteile aller Puffer- und Pipettenlösungen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden.

### 2.3. Die Patch-clamp-Technik

Die Entwicklung der Patch-clamp-Technik durch Sakman und Neher in den 70er Jahren ermöglichte es in, für die Neurowissenschaft und Elektrophysiologie revolutionärer Weise, Ionenströme durch einzelne Kanalmoleküle aufzulösen und darzustellen.

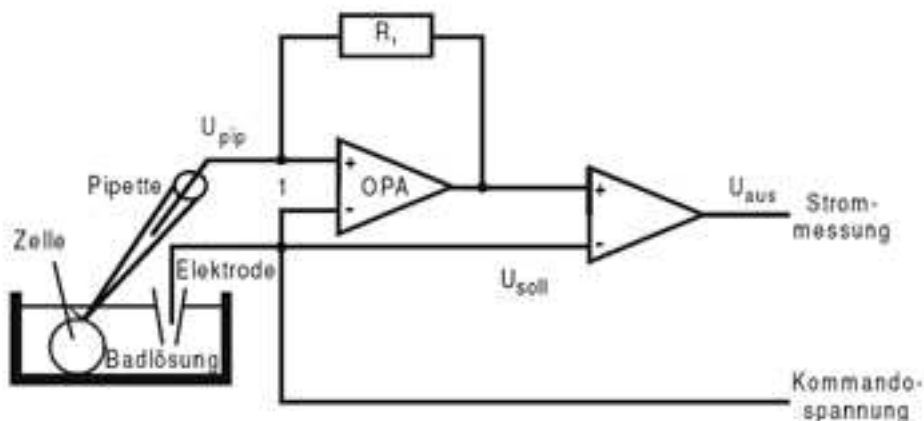
Durch eine Glaspipette, die in der Nähe der Zellmembran platziert wird, saugt man durch leichten Unterdruck Membranmoleküle vorsichtig an die Pipettenöffnung, wodurch es zu einem direkten Kontakt zwischen Glas- und Membranoberfläche kommt. Der Abstand zwischen den Lipiden der Membran und dem Glas beträgt dabei weniger als 1 nm. Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Ca<sup>2+</sup>-Brücken und van-der-Waals-Kräfte sind verantwortlich für die Dichte des *seals*, also dem Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zellmembran (Aldrich *et al.*, 1983). Liegt der Kriechwiderstand zwischen Glas und Membran bei mindestens einem Gigaohm, wird diese Versiegelung als *gigaseal* bezeichnet. So können keine

„Leckströme“ zwischen Pipette und Membran fließen. Durch den hohen Widerstand des *gigaseal* muss ein Strom, der durch einen innerhalb des „Membran-Flecks“ liegenden Ionenkanal fließt, auch durch die Pipette fließen, welcher mit Hilfe eines sehr empfindlichen Verstärkers dargestellt werden kann.

Diese Anordnung erlaubt die Messung von Strömen durch Ionenkanäle mit einer hohen Auflösung. Der gemessene Strom liegt in der Größenordnung einiger Pikoampere. Der physikalische Hintergrund dieses Versuchsprinzips erklärt sich wie folgt: Die Spannung über der Zellmembran wird auf ein durch den Experimentator bestimmtes Niveau gebracht. Nun sollen mit der Patch-clamp-Technik Ionenbewegungen registriert werden, die abhängig sind von der Potentialdifferenz, die über der Zellmembran anliegt, sowie vom Konzentrationsgradienten der entsprechenden Ionen. Der notwendige Strom zur Aufrechterhaltung dieses Potentials wird im besten Fall nur von der durch die geöffneten Kanäle verschobenen ionalen Ladung  $Q$  bestimmt, was der physikalischen Definition  $I = \frac{dQ}{dt}$  entspricht.

Es ist für die Messungen der Patch-clamp-Technik nicht ausschlaggebend, durch welchen Mechanismus sich die Kanäle öffnen, da die Potentialänderung als Auslöser dient. Es können theoretisch spannungs-, dehnungs- sowie Transmitter-aktivierte Ströme gemessen werden.

### 2.3.1. Der Patch-clamp-Arbeitsplatz



**Abbildung 4:** Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers.  $U_{\text{pip}}$  = Pipettenspannung,  $U_{\text{soll}}$  = Sollspannung,  $R_f$  = Rückkopplungswiderstand (Numberger and Draguhn, 1996)

In der oben gezeigten Abbildung ist ein vereinfachtes Schaltbild eines Patch-clamp-Verstärkers dargestellt. Der Operationsverstärker (OPA) wirkt als Strom-Spannungswandler und gleichzeitig als Rückverstärker zur Einstellung der Membranspannung an der Zelle. Letzteres geschieht dadurch, dass der OPA die Spannung am Eingang auf Null regelt und damit die Pipettenspannung gleich Sollspannung einstellt. Der für diese Rückkopplung notwendige Strom ist gleich dem Pipettenstrom (also Strom durch den Patch) und kann als Spannungsabfall am Widerstand  $R_f$  gemessen werden. Da die Spannung an der Zelle nicht auf Null liegt, muss dieser Wert vom Ausgang des OPA im nachfolgenden Verstärker abgezogen werden.

Es gibt auch Patch-clamp-Verstärker, die anstelle des Rückkopplungswiderstands  $R_f$  einen Kondensator verwenden (Numberger and Draguhn, 1996). Die Schaltung arbeitet sehr ähnlich, nur dass sich hier eine Spannung an dem Kondensator aufbaut, der in bestimmten Abständen entladen werden muss (Numberger and Draguhn, 1996). Der wesentliche Vorteil beim integrierenden Patch-Clamp-Verstärker liegt somit im geringeren Rauschen. Nachdem sich ein „*gigaseal*“ gebildet hat, kann der Strom für verschiedene Spannungen über der Membran mit

---

einem Patch-clamp-Verstärker gemessen werden (*voltage clamp*) oder bei einem vorgegebenen Strom die Spannung bestimmt werden.

### 2.3.2. Verschiedene Patch-clamp-Konfigurationen

Man unterscheidet verschiedene Patch-clamp-Konfigurationen:

#### 1) *Cell-attached*-Konfiguration

Nach der Bildung eines *gigaseal* befindet sich die Zelle in der *cell-attached*-Konfiguration. Unter der Membran bleibt die Zellphysiologie und das intrazelluläre Milieu unbeeinflusst. Kanäle können so in ihrer „natürlichen Umgebung“ gemessen werden. Die intrazelluläre Ionenhomöostase bleibt intakt und *second-messenger*-Systeme können physiologisch reagieren. Im Vergleich zu anderen Messkonfigurationen kann mit der *cell-attached*-Konfiguration kein Membranpotential gemessen werden.

#### 2) *Inside-out*-Konfiguration

Zieht man die Pipette in der *cell-attached*-Konfiguration von der Zelle ab, löst sich ein Membranstück von der Pipette, ohne dass der *seal*-Widerstand abnimmt. Das Membranpotential, die Lösungen auf beiden Seiten der Membran und die Eintauchtiefe der Pipette lassen sich genau kontrollieren. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Kanäle nicht mehr in ihrer natürlichen Umgebung vorliegen. Bekannte Kofaktoren der Kanäle (zum Beispiel ATP) müssen in der Badlösung substituiert werden. Ferner können die Kanäle beim „Herausreißen“ aus der Membran durch Scherkräfte aktiviert oder inaktiviert werden.

#### 3) *Outside-out*-Konfiguration

Bei der *outside-out*-Konfiguration ist das Membranpotential gleich dem Pipettenpotential und die Stromrichtungen entsprechen denen der Ganzzelleableitung. Ströme aus der Pipette sind gleich den Strömen aus der Zelle und umgekehrt. Man kann Liganden leicht von außen auf die Zelle applizieren, womit ligandengesteuerte Ionenkanäle untersucht werden können.

#### 4) *Whole-cell-Konfiguration*

Um in die *whole-cell*-Konfiguration zu gelangen, stellt man einen *cell-attached*-Patch her und durchbricht dann den Membranbereich unter der Pipette. Dieses lässt sich durch Anlegen eines Unterdruckes an die Pipette oder durch einen hochfrequenten Spannungsimpuls (600  $\mu$ s/600 mV) erreichen.

#### 5) *Perforated-patch-Konfiguration*

Wenn man der Pipettenlösung in der *cell-attached*-Konfiguration Porenbildner wie Gramicidin (Kyrozis and Reichling, 1995) oder Nystatin zufügt, spricht man von einem *perforated patch*. Leitfähigkeiten zwischen Pipette und Zellinnerem sind denen der Ganzzelleitung ähnlich. Man kann also Ganzzelleitungen von Kanälen, die eine funktionelle Abhängigkeit von zellulären Substanzen, wie ATP oder *second-messenger*-Systemen haben, durchführen.

Der gesamte Messplatz wurde so angelegt, dass Ströme im Bereich einiger Pikoampere möglichst störungsfrei gemessen werden können und ein *gigaseal* möglichst lange auch bei höheren Haltespannungen gehalten werden kann. Störungen können dabei von elektromagnetischer oder mechanischer Natur sein, weswegen sich der Aufbau in einem Faraday-Käfig befand. Ein Charakteristikum der Patch-clamp-Technik ist die extreme Empfindlichkeit des Strom-Spannungswandlers mit einer hohen Bandbreite (100 kHz), mit dessen Hilfe kleine elektrische Ströme gemessen werden konnten. Diese kleinen Signale wurden leicht vom elektrischen Hintergrundrauschen (bis zu einigen Pikoampere) überlagert. Es wurde versucht, das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren.

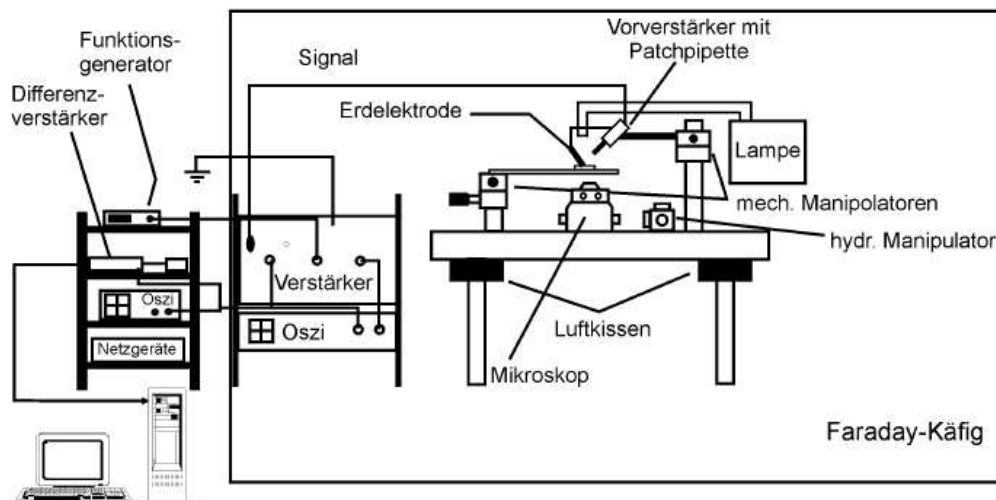
Eine der wesentlichen Störquellen ist die Einstreuung des elektromagnetischen Wechselfeldes (öffentliches Spannungsnetz). Diese Störung wird durch den Faraday-Käfig stark reduziert. Die Netzgeräte dafür standen außerhalb des Käfigs. Jedes einzelne Gerät sowie der gesamte Versuchsaufbau wurden an einer zentralen Stelle geerdet. Alle Leitungen, die eine Verbindung vom Innenraum zum Außenraum des Faraday-Käfigs hatten, wurden abgeschirmt und die



---

dazugehörigen Geräte ebenfalls geerdet. Der Pipettenhalter für die Elektrode wurde direkt auf einem externen Gehäuse befestigt, welches die Vorverstärkerstufe enthielt, um den Weg des Originalsignals bis zur ersten Verstärkerstufe möglichst klein zu halten. Für den Übergang vom Elektrolyt zur Elektronik wurden chlorierte Silberelektroden (Ag/AgCl, im Bad und in der Pipette) verwendet, da diese nicht polarisierbar sind. Der AgCl-Draht wurde zuvor durch Galvanisierung in KCl-Lösung hergestellt. Um den Versuchsaufbau vor mechanischen Erschütterungen von außen abzuschirmen, standen das inverse Mikroskop (Zeiss Axiovert 135, Jena, Deutschland) und der Messaufbau auf einem luftgelagerten Tisch. Sehr niederfrequente Schwingungen wurden zusätzlich durch eine extrem schwere Tischplatte gedämpft. Die Badkammer, in der die Zellen auf Glasplättchen in der Badlösung lagen, befand sich auf einem speziell angefertigten Objektisch. Der Objektisch konnte mit einem mechanischen Manipulator zweidimensional bewegt werden. Der Pipettenhalter mit seinem Vorverstärker war auf einem dreidimensionalen elektrischen Manipulator (Eppendorf, Deutschland) befestigt. Zusätzlich zur Messelektrode wurde eine zweite Pipette, welche an einem U-Rohrsystem angeschlossen war, als Lokalapplikationspipette gegenüber der Patch-Pipette installiert. Für die grobe Positionierung der Lokalapplikation stand ein dreidimensionaler hydraulischer Manipulator zur Verfügung.

Über einen Schlauch an der Pipettenhalterung konnte Druck auf die Flüssigkeit in der Pipette ausgeübt werden. Die Messungen wurden konstant bei 20° C durchgeführt.



**Abbildung 5:** Schematischer Aufbau des Patch-Clamp Messplatzes. (Farokhi, 2002)

### 2.3.3. Spannungsprotokolle

Die Konfiguration der Wahl für die durchgeführten Experimente waren *cell-attached*-Patch-Versuche. Die intrazelluläre Ionenhomöostase, der pH-Wert und *second-messenger*-Systeme bleiben unbeeinflusst.

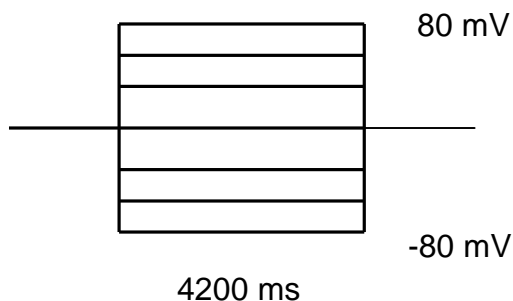
#### Protokoll 1: Einzelkanalmessungen bei kontinuierlicher Spannung

Um die von Rappert *et al.* 2002 in *whole-cell*-Aufnahmen dargestellten Spannungsänderungen auf Einzelkanalebene zu übertragen, wurden die Zellen in den ersten Versuchen bei einem Haltepotential von 0 mV geklemmt und dann die Ströme für 15 Minuten bei einem Potential von 50 mV aufgezeichnet.

#### Protokoll 2: Einzelkanalmessungen bei unterschiedlichen Spannungssprüngen

Um den Chloridkanal genau zu charakterisieren, wurde ein Spannungsprotokoll mit unterschiedlichen Spannungen appliziert. Die Zelle wurde wieder bei 0 mV geklemmt. Von diesem Haltepotential wurde die Membran sprunghaft in jeweils positive und negative Richtung geklemmt (30, 50, 80 mV). Die Dauer dieser Potentialsprünge betrug 4200 ms. Zwischen den einzelnen Sprüngen lagen

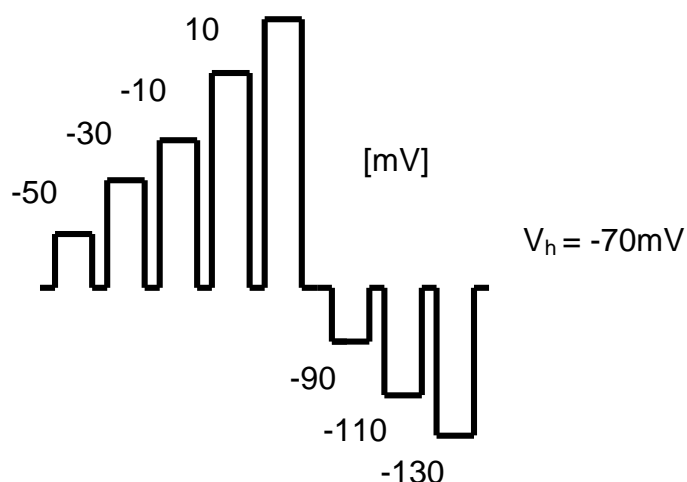
jeweils 5800 ms. Zwischen jedem Sprungzyklus wurde die Zelle bei einem Haltepotential 0 mV für 50 Sekunden geklemmt.



**Abbildung 6:** Schematisierte Darstellung des Sprungprotokolls 2

### **Protokoll 3: *Perforated-patch-clamp*-Aufnahmen, Erfassung liganden-aktivierter Ströme**

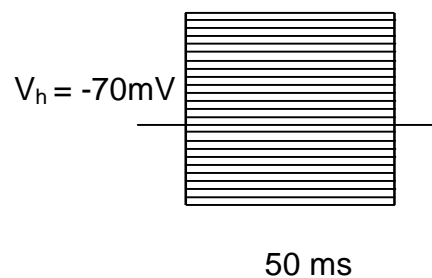
Dieses Protokoll wurde angewandt, um im *perforated patch* langsame Stromänderungen zu untersuchen. Von einem Haltepotential von  $-70$  mV aus wurde die Membran der Mikroglia von  $-130$  mV auf  $30$  mV mit einem Spannungsintervall von  $20$  mV für  $100$  ms geklemmt. Dieses Protokoll wurde alle  $5$  Sekunden wiederholt.



**Abbildung 7:** Schematisierte Darstellung des Sprungprotokolls 3

**Protokoll 4: Spannungsaktivierte Ströme im *perforated patch***

Die Membran wurde von einem Haltepotential von  $-70$  mV nacheinander sprunghaft auf 15 depolarisierende und 10 hyperpolarisierende Potentiale mit einem Spannungsintervall von  $10$  mV pro Sprung geklemmt. Die Dauer dieser Potentialsprünge betrug  $50$  ms, wobei zwischen den Sprüngen jeweils  $600$  ms lagen.



**Abbildung 8:** Schematisierte Darstellung des Sprungprotokolls 4

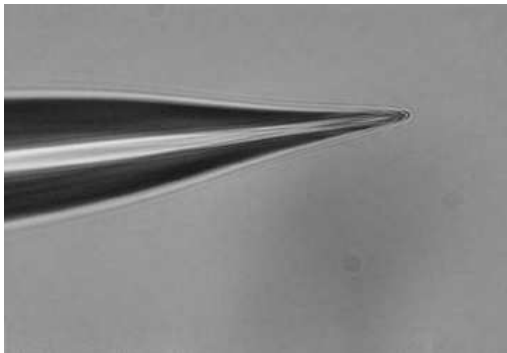
Für die Messung stand eines der Standardgeräte, EPC9 (HEKA, Darmstadt, Deutschland) mit einer Bandbreite von  $100$  kHz und einem Rückkopplungswiderstand  $R_f$  von  $10\text{ G}\Omega$  zur Verfügung. Die Spannung baut sich statt an einem Rückkopplungswiderstand am Kondensator auf, der in gewissen zeitlichen Abständen entladen werden muss. Der Vorteil hierin liegt im geringeren Rauschen. Zur Aufzeichnung und Auswertung der Messdaten wurden die Programme TIDA (Heka, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) und Excel (Microsoft, Redmond, USA) verwendet.

**2.3.4. Reduktion von Störsignalen und elektrischem Rauschen**

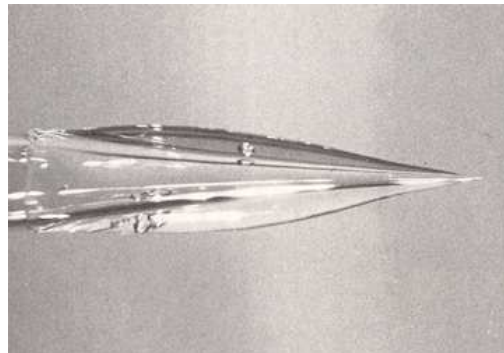
Es gibt unterschiedliche Rauschquellen, die die Auflösung der Messungen verschlechtern. Deshalb wurde versucht, das Rauschen der Messanordnung zu minimieren. Um das Hintergrundrauschen zu reduzieren, muss eine sehr dichte Verbindung zwischen Zellmembran und der Pipettenmündung entstehen. Fremdsignale wurden weitestgehend durch den Aufbau im Faraday-Käfig beseitigt. Die Hauptquelle des Rauschens ist das Pipettenrauschen als Folge des Spannungsrauschens des Vorverstärkers. Am Vorverstärker wird ein

Spannungssollwert angelegt, der aufgrund der *gate-source*-Strecken der beiden Eingangstristoren des Differenzverstärkers rauscht. Die Kapazität der Pipette oder besser des Teils der Pipette, der durch die Badlösung benetzt wird bestimmt, wie stark das Rauschen ist.

**Abbildung. 9a**



**Abbildung. 9b**



**Abbildung 9:**a) Pipettenspitze ohne Sylgardbeschichtung (Farokhi, 2002)

b) Pipette mit Sylgardbeschichtung (Sakmann and Neher, 2002)

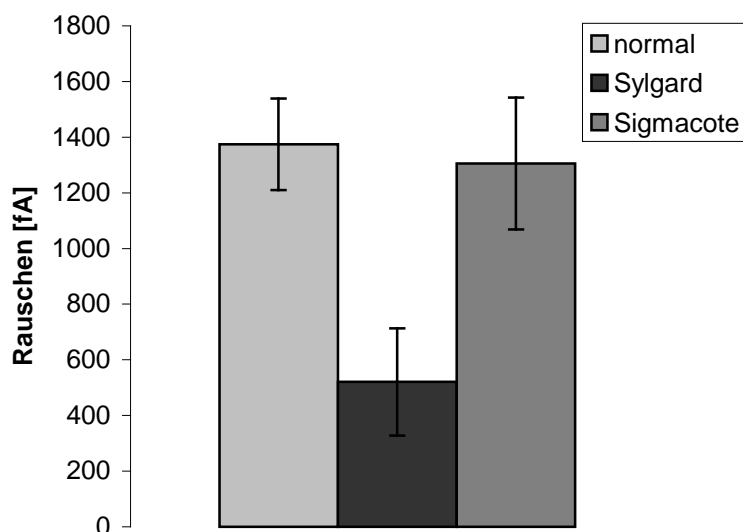
### 2.3.5. Patch-Pipetten zur Einzelkanalmessung

Die Pipetten wurden mit einem Elektrodenpuller (Sutter Instruments, Modell P2000, Novato, USA) direkt vor Benutzung gezogen. Die Pipetten wurden aus Borosilikatglas (Hilgenberg, München, Deutschland;  $\varnothing$  außen 1,5 mm, Wanddicke 0,315 mm) hergestellt. Die Pipetten wurden mit einem zweistufigen Ziehverfahren hergestellt damit der kleine Öffnungsradius (Durchmesser 1  $\mu\text{m}$ ) der Pipettenspitze stumpf wird, um die Membran nicht zu durchstechen. Anschließend wurden die Pipetten poliert, das heißt mit einem Heizdraht an der Spitze geglättet, um mit der Glasoberfläche eine bessere Haftung zwischen Pipette und Membran zu erreichen, was die Lebensdauer des *patch* verlängert.

Um das Rauschen zu reduzieren, wurden die Pipetten mit einem isolierenden Kunstharz, Sylgard 184 (Dow Corning Corp. Michigan, USA) beschichtet (siehe Abbildung. 4). Die Beschichtung trägt zu einer Verminderung der Kapazität der Pipette bei.

Im besten Falle halbiert eine Beschichtung mit Sylgard das Hintergrundrauschen während der Messung. Zur Beschichtung wurden die Pipetten unter ein Mikroskop

mit einem 10x Objektiv gespannt, wo sie dann bis möglichst nahe an die Spitze mit Sylgard beschichtet wurden. Mit einem runden Heizdraht wurde das Sylgard gehärtet. Die Beschichtung der Pipetteninnenseite mit Sigmacote (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) (Keunecke, 1995) reduzierte das Hintergrundrauschen nicht so effektiv wie die Sylgardbeschichtung.



**Abbildung 10:** Einfluss der verschiedenen Pipettenbeschichtungen auf das Pipettenrauschen bei Einzelkanalexperimenten im *cell attached patch*.

### 2.3.6. Auswertung der Ergebnisse

Die Glaspipette wurde auf die Membran aufgesetzt und durch leichtes Ansaugen ein Unterdruck ausgeübt. Der Extrazellularraum der Zelle wurde durch die Pipettenlösung gebildet. Das extrazelluläre Potential an diesem elektrisch von seiner Umgebung isolierten Membranabschnitt wurde durch den Verstärker vorgegeben. Über den Verstärker wurde die Kommandospannung eingestellt. Der Verstärker bestimmt über einen Rückkopplungsmechanismus die Differenz zwischen dem Membran- und dem Kommandopotential.

Durch den Rückkopplungswiderstand im Versuchsaufbau herrschte eine Spannung, die proportional zum fließenden Strom war und welche die Differenz zwischen Membran- und Kommandopotential ausglich. Befand sich ein aktiver

---

Kanal im *patch* unter der Pipette, erkannte man eine Veränderung des Membranpotentials.

Ein Versuch setzte sich aus mehreren Depolarisationsimpulsen zusammen. Eine Filterung der Werte erfolgte nach jeder Messung digital mit einem 60 Hertz-Filter. Nach jedem Versuch wurde eine Basislinie sowie eine Linie durch die Öffnungsamplituden festgelegt. Die Werte der Basislinie repräsentierten den Kanal im geschlossenen Zustand. Die Linie durch die Öffnungsamplituden wurde definiert als das Mittel aller Amplituden, die entweder auf halber Höhe oder oberhalb der höchsten Amplitude liegen mussten.

Die Auswertung der Datenmenge eines Versuches gab die zeitlichen Veränderungen innerhalb des Versuches an und war somit eine Ereignisliste.

In dieser Ereignisliste waren somit zu unterschiedlichen Zeitpunkten Potentialveränderungen bei unterschiedlichen Spannungen definiert. Aus den Amplituden der einzelnen Kanalöffnungen wurde das arithmetische Mittel errechnet und graphisch als Strom-Spannungskennlinie dargestellt. Die Steigung des Graphen ist als *slope conductance* definiert und kann somit Aufschluss über die Einzelleitfähigkeit des Kanals geben. Das Umkehrpotential kann aus einer solchen Strom-Spannungskennlinie entweder direkt als Schnittpunkt mit der Abszisse abgelesen oder durch eine Geradenanpassung ermittelt werden. Die Beurteilung von verschiedenen „Offen“-Zuständen eines Kanals wurde mit Hilfe eines Amplitudenhistogramms digital berechnet und graphisch als Verteilungskurve dargestellt, wobei sich die mittlere Leitfähigkeit eines Versuches zu jedem Leitfähigkeitszustand in einer Gaußschen Verteilungskurve darstellt.

## 2.4. Imaging von Chloridionen

Bewegungen von Chloridionen durch die Zellmembran werden durch mehrere unterschiedliche Prozesse gefördert und haben eine fundamentale Relevanz für Salzhaushalt, Volumen- und pH-Kontrolle in der Zelle.

Es gibt einige Fluoreszenzfarbstoffe, mit deren Hilfe Chloridionen in lebenden Zellen erfasst werden können. Die Bindung von Chloridionen an diese Indikatoren führt zu einer Veränderung ihrer Fluoreszenzeigenschaften, wobei die Fluoreszenzemission zu niedrigeren Wellenlängen verschoben wird.

Fluoreszenz ist die Emission von Licht nach Absorption eines Photons aus einer externen Lichtquelle (Lampe, Laser). Durch die Aufnahme von Photonen werden Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes angeregt, d.h. sie werden aus ihrem Energiegrundniveau  $s_0$  durch die Aufnahme der Energie  $h\nu_{\text{abs}}$  des Photons auf ein höheres Energieniveau  $s_1$  angehoben. In diesem angeregten Zustand verbleibt das Elektron eine endliche Zeit (ca. 1-10 ns). In dieser Zeit kann das Fluorophor Konformationsänderungen durchlaufen, Energie durch Stöße oder Wärmeabgabe verlieren, oder das Elektron kann durch *internal conversion* oder *quenching* strahlungslos wieder in den Grundzustand zurückgehen. Demgegenüber steht die Fluoreszenz. Sie entsteht, wenn das angeregte Elektron unter Emission von Licht mit der Energie  $h\nu_{\text{em}}$  wieder in den Grundzustand übergeht.

Die meisten Fluoreszenzfarbstoffe für Chloridionen sind 6-Methoxyquinolinium-Derivate. Alle Präparate dieser Stoffgruppe messen Chloridionen durch *collisional quenching* (Jayaraman and Verkman, 2000). Diese Messmethode steht im Gegensatz zum Messprinzip von Fluoreszenzfarbstoffen für  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ . Diese beinhaltet eine transiente Wechselwirkung zwischen dem aktivierten Zustand der Fluorophore und einem Halid-Ion, ein detektierbarer *ground-state*-Komplex ist nicht erforderlich. Da es sich bei der Chloridionen-abhängigen Fluoreszenzabnahme um einen Diffusionsprozess handelt, ist diese Messmethode abhängig von der Viskosität der gemessenen Lösung und deren Volumen. Um intrazelluläre Volumenänderungen in Experimente mit einfließen zu lassen, kann man den Farbstoff 6-Methoxy-N-[3-Sulfopropyl]-Quinolinium (SPQ) verwenden (Srinivas and Bonanno, 1997).



Die Effizienz, mit der ein Farbstoff in der Lage ist Fluoreszenz bei Ionenbindung abzuschwächen, beschreibt die Stern-Volmer-Konstante ( $K_{SV}$ ). Die Stern-Volmer-Konstante ist das Reziproke der Ionenkonzentration bei der 50 % der maximalen Abschwächung der Fluoreszenz durch Bindung des Ions erreicht werden. Für den Farbstoff N-[Ethoxycarbonylmethyl]-6-Methoxy-Quinolinium-Bromid (MQAE) wurde in verschiedenen Zelltypen  $K_{SV}=25-28 \text{ M}^{-1}$  *in situ* bestimmt. In Lösung dagegen erreicht  $K_{SV}$  einen Wert von  $200 \text{ M}^{-1}$  (West and Molloy, 1996). MQAE hat gegenüber Chlorid eine größere Sensitivität (Verkman, 1990) und eine höhere Quantenausbeute als SPQ, weshalb es auch der Farbstoff ist, der am häufigsten für Chloridionen genutzt wird.

Die Zellen wurden wie bei den Patch-clamp-Experimenten isoliert und kultiviert. In Anlehnung an die Arbeit von Koncz *et al.* (1994) wurden die Zellen mit 5 mM MQAE in PBS lichtgeschützt für 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Inkubationszeit hat sowohl Einfluss auf die Stärke der Fluoreszenz als auch auf die Zeit bis der Farbstoff entbleicht ist. Eine von Koncz *et al.* beschriebene Inkubationszeit von 2 Stunden war für Mikrogliazellen nicht geeignet. Das gravierende Problem der hohen Toxizität und der geringen Helligkeit war auch bei Mikrogliazellen erkennbar. Durch die benötigten energiereichen Anregungswellenlängen im UV-Bereich traten außerdem verstärkt phototoxische Effekte auf.

Die Zellen waren bei einer Konzentration von 5 mM MQAE in PBS schon ausreichend mit Farbstoff beladen, um einen Versuch durchzuführen.

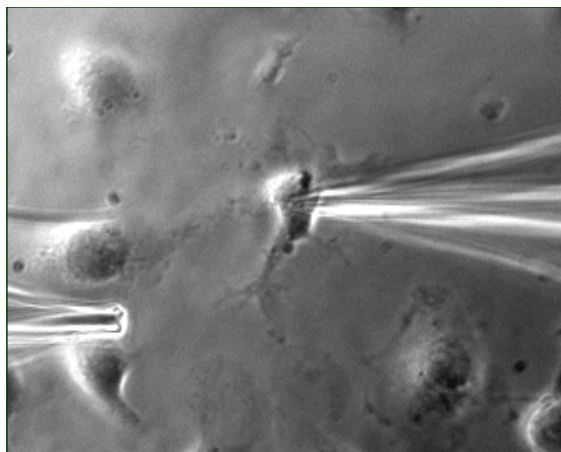
Die Zellen wurden nach Inkubation in die Beobachtungskammer überführt und für mindestens 5 Minuten mit Lösung 1 (Tabelle 1) gespült, bevor mit den Messungen begonnen wurde. Chloridionenänderungen wurden durch veränderte Chloridkonzentration in der Badlösung realisiert (Lösung 4, Tabelle 1). Zur Anregung des MQAE-Farbstoffs wurde das Licht eines auf 350 nm gestellten Monochromators (Polychrome 4, Till Photonics, Planegg, Deutschland) verwendet. Änderungen der Fluoreszenz und der damit verbundenen intrazellulären Chloridkonzentration wurden mit einer gekühlten CCD-Kamera (Till Photonics, Planegg, Deutschland) detektiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Experimente mit einzelnen Ionenkanälen

Zur Einzelkanalcharakterisierung der Chloridionenkanäle, die nach Aktivierung von CXCR3 durch CCL21 öffnen, wurde die *cell-attached*-Methode angewandt. Intrazelluläre Ionenkonzentrationen wie in diesem Falle die Chloridionenkonzentration blieben unverändert. Auch zytoplasmatische *second-messenger*-Systeme, welchen Chemokin-Rezeptor-Bindungen zu Grunde liegen, sollten bei Betrachtung von einzelnen Chloridionenkanälen unangetastet bleiben. Aus 30 gemessenen Zellen konnte bei einer eine Kanalöffnung nachgewiesen werden, was auf eine relativ geringe Verteilung des Kanals auf der Zelloberfläche hindeutet.

In *whole-cell*-Experimenten zeigte CCL21 eine Stromantwort in einem Zeitfenster von fünf Minuten nach CCL21-Applikation (Rappert *et al.*, 2002). Rappert zeigte in vielen Versuchen, dass die Stromantwort nach CCL21-Applikation beeinflussbar durch die Chloridkanalblocker DIDS und SITS und Änderungen der extrazellulären Chloridionenkonzentration ist.



**Abbildung 11:** Messanordnung unter dem Mikroskop. Links befindet sich die Applikationspipette, welche CCL21 enthält. Rechts die Mikrogliazelle während des *patching*.

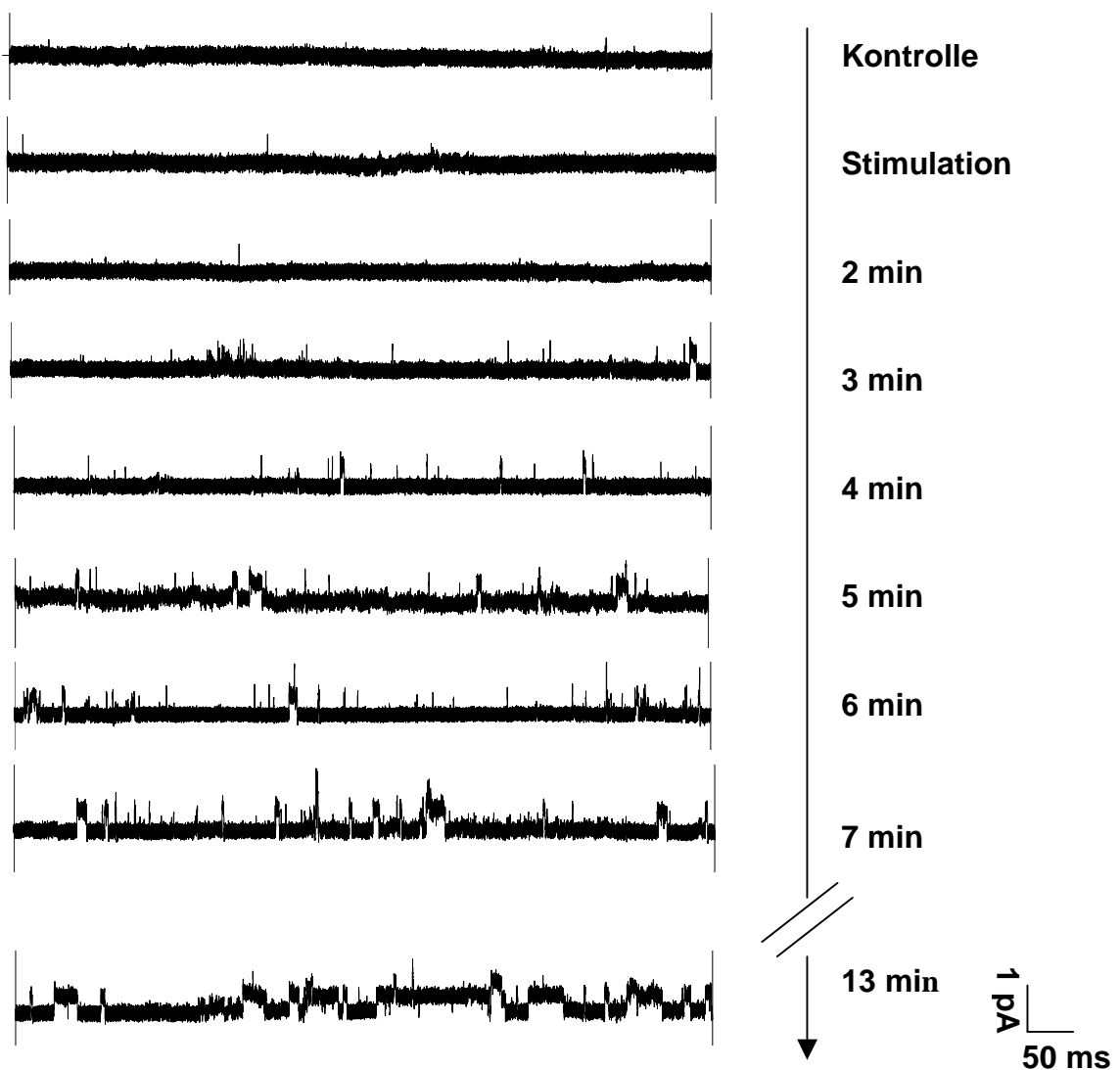
### 3.1.1. Einzelkanalexperimente bei einem Potential von 50 mV

Um diese Beobachtungen auf Einzelkanalebene zu übertragen, wurden im *cell-attached*-Modus CCL21 auf Mikrogliazellen appliziert und über einen Zeitraum von 20 Minuten bei einem Potential von +50 mV Ströme abgeleitet (Abbildung 11). Von Rappert *et al.* (2002) wurde eine langsame Stromänderung beschrieben, die nach Applikation von CCL21 weiter anstieg, obwohl CCL21 durch die Badperfusion schon ausgewaschen war. Die CCL21 induzierte Membranleitfähigkeit erreichte ihr Maximum ungefähr 5 min nach der Applikation.

Die Beobachtung konnte auf Einzelkanalebene bestätigt werden. Ein gelungener Seal wurde am Erreichen eines Abdichtwiderstandes von mindestens 1 G $\Omega$  definiert. Wenn die Zelle im Mikroskop starke morphologische Veränderungen zeigte und sich ebenso der Abdichtwiderstand änderte, wurde der Versuch verworfen. Ein gelungener Versuch wurde definiert, wenn die Morphologie der Zelle und der *gigaseal* für die gesamte Dauer des Experimentes unverändert blieben. In drei Experimenten (Abbildung 12) zeigte sich ungefähr 5 min nach CCL21-Applikation eine Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeiten im Vergleich zur Kontrolle. Von der Grundlinie, an der kein Strom fließt (Abbildung 13), springt der Kanal plötzlich auf ein höheres Niveau, bei welchem der Kanal Ionen leitet. Danach kehrt er nach kurzer „Offen“-Zeit wieder auf die Grundlinie zurück (Kanal geschlossen). Es konnte nicht gezeigt werden, dass die durch CCL21-induzierte Stromantwort reversibel ist.

Bei einem Potential von 50 mV kam es nach ungefähr 5 Minuten zur Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeiten von Chloridkanälen im *cell-attached*-Modus. Mit Barium und Cäsium in der Pipettenlösung (Lösung 2, Tabelle 1) wurden Kalium- und Natriumkanal-Aktivitäten blockiert.

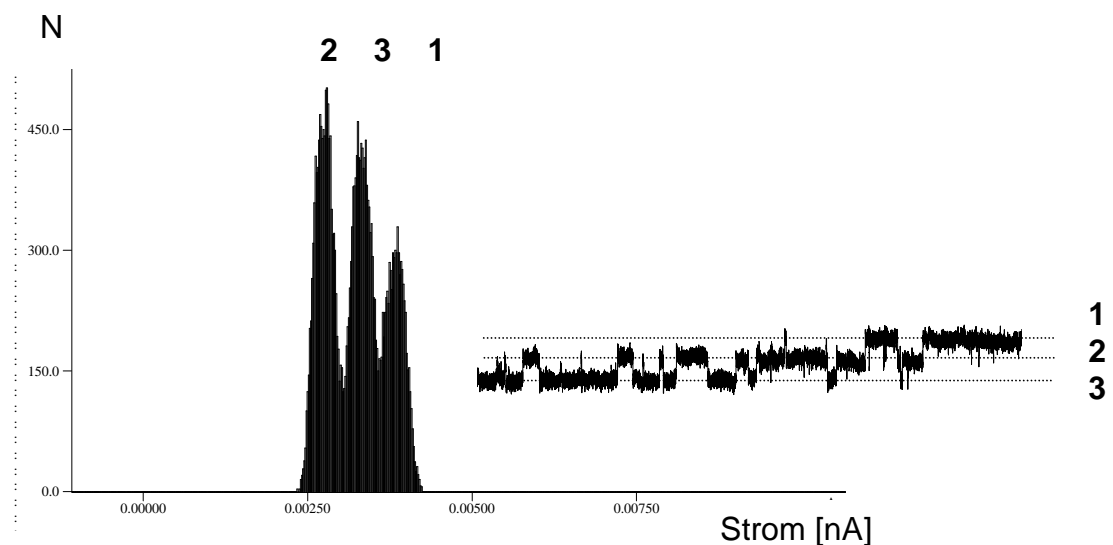
Die Stromkurven (Abbildung 12) zeigen Öffnungen von Chloridkanälen zu verschiedenen Zeiten in der Membran von Mikrogliazellen nach CCL21-Stimulierung. Diese Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeiten konnte bis in die 13. Minute beobachtet werden. Danach kam es in den meisten Fällen zum „Abreißen“ des *patch* und zum „Sterben“ der Zelle.



**Abbildung 12:** Einfluss von CCL21 auf die Leitfähigkeit eines Kanals in der Membran einer Mikrogliazelle. Die Darstellung zeigt eine reale Einzelkanalmessung zu verschiedenen Zeiten nach lokaler Stimulation mit CCL21 im Vergleich zu einer Kontrollmessung über dem gleichen Kanal.

In diesem Versuchsaufbau konnten verschiedene „Offen“-Zustände unterschieden werden. Man kann anhand der Einzelkanaldaten nicht sagen, ob nur ein Kanal aktiv ist, oder ob es sich um verschiedene Leitfähigkeiten bei ein und demselben Kanal handelt. Die zugehörigen Histogramme erlauben die Bestimmung der mittleren Amplitude von allen Öffnungsebenen. Es war nur in diesem Versuchsaufbau möglich, verschiedene Leitfähigkeitszustände beziehungsweise Leitwerte zu sehen.

Der größte Leitfähigkeitszustand mit einer Leitfähigkeit von 8 pS ( $n=3$ ) wurde als der Zustand des geöffneten Chloridkanals bzw. als „Offen“-Zustand definiert. Es ist aus diesem Experiment nicht abzuleiten, ob es sich um die Aktivität mehrerer Kanäle, um unterschiedliche Leitfähigkeitszustände ein und desselben Kanals oder um eine Mischung verschiedener Subtypen eines Ionenkanals handelt.



**Abbildung 13:** Amplitudenhistogramm der Versuche mit  $V_h = 50$  mV. Im Amplitudenhistogramm erhält man die mittlere Leitfähigkeit zu jedem Leitfähigkeitszustand in Form einer Gauß-Funktion. In dem dargestellten Experiment erkennt man Häufungen von Leitfähigkeiten bei mehr als einer Amplitude.

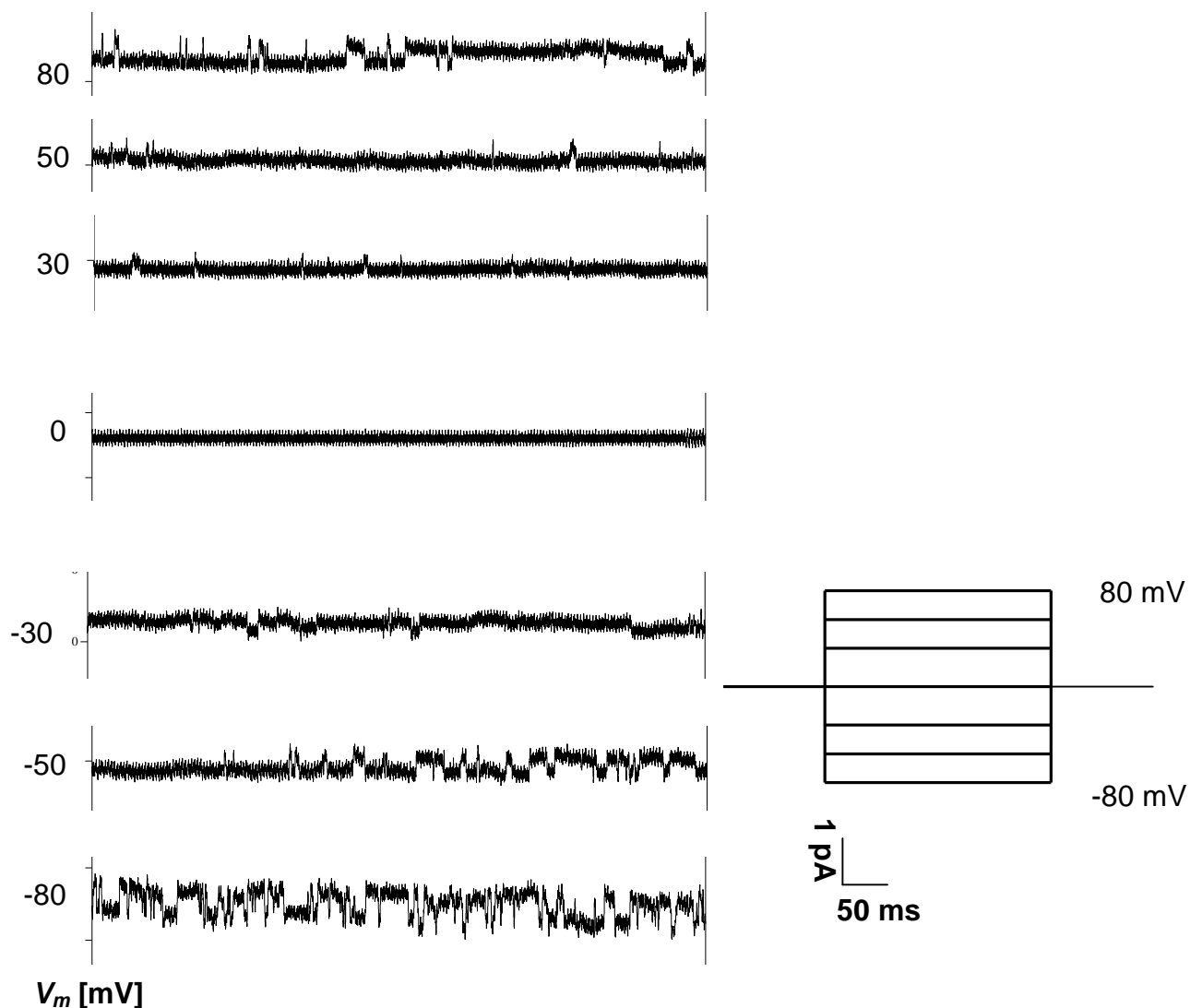
### 3.1.2. Einzelkanalmessungen mit einem Sprungprotokoll

Um die Leitfähigkeit des betrachteten Ionenkanals in die Kanalcharakteristik mit aufzunehmen, wurde eine Strom-Spannungskennlinie ermittelt. Der Kanal öffnet sich nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, was zu kurzen Strompulsen durch die Membran führt. Variiert man das elektrische Potential ( $V_m$ ) über der Membran, ändert sich der Strom durch den Kanal ( $I$ ) proportional. Bei verschiedenen Haltepotentialen wurden also im *cell-attached*-Modus die Amplituden der Einzelkanalströme gemessen.

Von einem Haltepotential  $V_h = 0$  mV wurde jeweils 4200 ms auf 80 mV, -80 mV, 50 mV, -50 mV, 30 mV und -30 mV geklemmt (siehe Abbildung 14). Zwischen jedem Sprung liegen 5800 ms.

Trägt man jetzt die gemessenen Stromstärken in Abhängigkeit vom Potential auf, erhält man die Strom-Spannungskennlinie (siehe Abbildung 15). Mehrere Leitfähigkeitszustände wie in Abbildung 13 konnten in dieser Versuchsanordnung nicht gemessen werden.

Nach einem Durchlauf mit allen Sprüngen (80 mV, -80 mV, 50 mV, -50 mV, 30 mV und -30 mV) wurde die Zelle wieder für 50 s bei einem Haltepotential von  $V_h = 0$  mV geklemmt. In dieser Phase wurden keine Messungen durchgeführt. Während eines Experimentes konnte man nicht mehr als zehn dieser Versuchabläufe durchführen. Wie in den anderen Versuchen mit CCL21-Stimulation erkennt man eine Reaktion erst ungefähr 5 Minuten nach CCL21-Applikation. Es konnte nicht gezeigt werden, dass die CCL21-induzierte Stromantwort reversibel ist.



**Abbildung 14:** Die Einzelkanalmessungen zeigen Öffnungen von Chloridkanälen ungefähr 5 min nach CCL21-Applikation bei verschiedenen Spannungssprüngen. Der Kanal öffnet sich nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, was zu kurzen Strompulsen durch die Membran führt. Variiert man das elektrische Potential ( $V_m$ ) über der Membran, ändert sich der Strom durch den Kanal ( $i$ ) proportional.  $V_m$  wird in Millivolt [mV] und  $i$  in Picoampere [pA] gemessen.

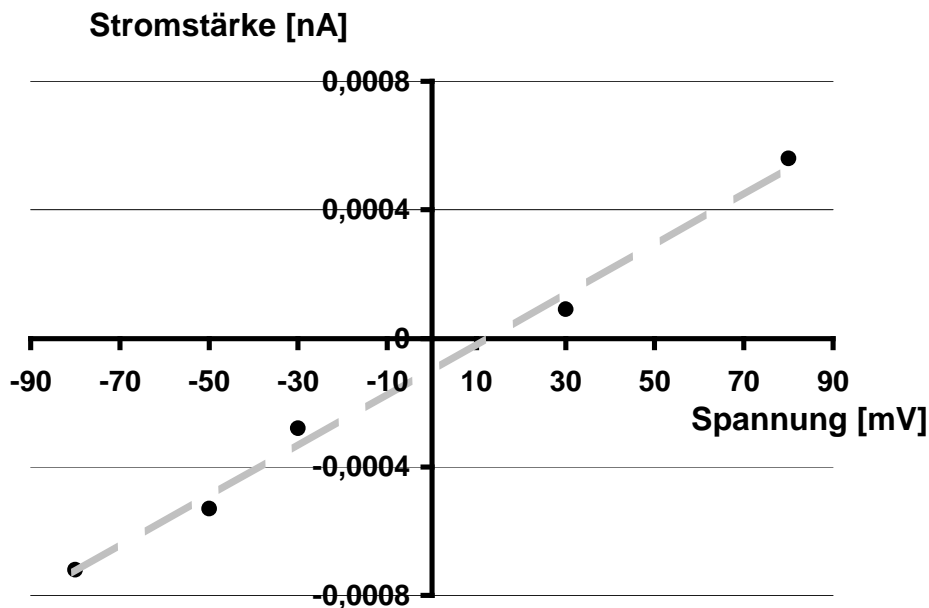
Die Zelle wurde wieder bei 0 mV geklemmt. Von diesem Haltepotential  $V_h = 0$  mV wurde die Membran sprunghaft in jeweils positive und negative Richtung geklemmt (30, 50, 80 mV). Die Dauer dieser Potentialsprünge betrug 4200 ms. Zwischen den einzelnen Sprüngen lagen jeweils 5800 ms.

Eine wichtige Größe zur Bestimmung der Ionenselektivität eines Kanals ist das Umkehrpotential. In den oben genannten Versuchen wurde zu jeder gegebenen Spannung eine Stromstärke ermittelt. Die Strom-Spannungskennlinie aus diesen Daten ist entscheidend für die Charakterisierung des Ionenkanals. Eine graphische Darstellung zeigt, dass der Strom linear von der ihn treibenden Kraft abhängig ist. Anders formuliert verhält sich die Amplitude des Einzelkanalstroms wie ein elektrischer Widerstand, der dem Ohmschen Gesetz gehorcht ( $i = V_m/R$  oder  $i = \gamma \cdot V_m$ ;  $\gamma = \text{conductance}$ ). Dabei ist  $i$  der Strom durch den Einzelkanal,  $V_m$  die Spannung über der Membran und  $R$  der Widerstand des offenen Kanals.

Der Schnittpunkt der Strom-Spannungskennlinie mit der Spannungsachse (Abszisse) ergibt das so genannte Umkehrpotential, also die Spannung, bei der kein Strom fließt. Der Wert des Umkehrpotentials hängt von den ionalen Konzentrationen auf beiden Seiten der Zellmembran und der relativen Leitfähigkeit des Kanals für die verschiedenen vorhandenen Ionen ab. Das kalkulierte Umkehrpotential, also der Schnittpunkt der extrapolierten Geraden mit der Spannungsachse betrug um die  $0 \text{ mV} \pm 8 \text{ mV}$  ( $n=12$ ).

Der Quotient aus Stromamplitude und Spannung entspricht graphisch der Konstruktion einer Sekante von einem Punkt der Kurve zum Koordinatenursprung. Alternativ kann bei gleichgerichteten Kanälen aus der lokalen Steigung der Kurve, also dem Verhältnis von  $i$  zu  $V_m$ , der Widerstand  $R$  für einen einzelnen offenen Kanal berechnet werden. Bei Ionenkanälen ist es jedoch sinnvoller, als reziproken Wert von  $R$  die *slope conductance* beziehungsweise die Steigungs-Leitfähigkeit ( $\gamma = I/R$ ) zu ermitteln, weil diese ein elektrisches Maß für die Permeabilität liefert. In kultivierten Mikrogliazellen bewirkte eine CCL21-Stimulation die Öffnung eines Chloridkanals mit einer *slope conductance* von  $9,3 \text{ pS} \pm 2,1 \text{ pS}$  ( $n=12$ ) (Abbildung 16). Individuelle Werte reichten in allen Experimenten von 5 bis 10 pS.

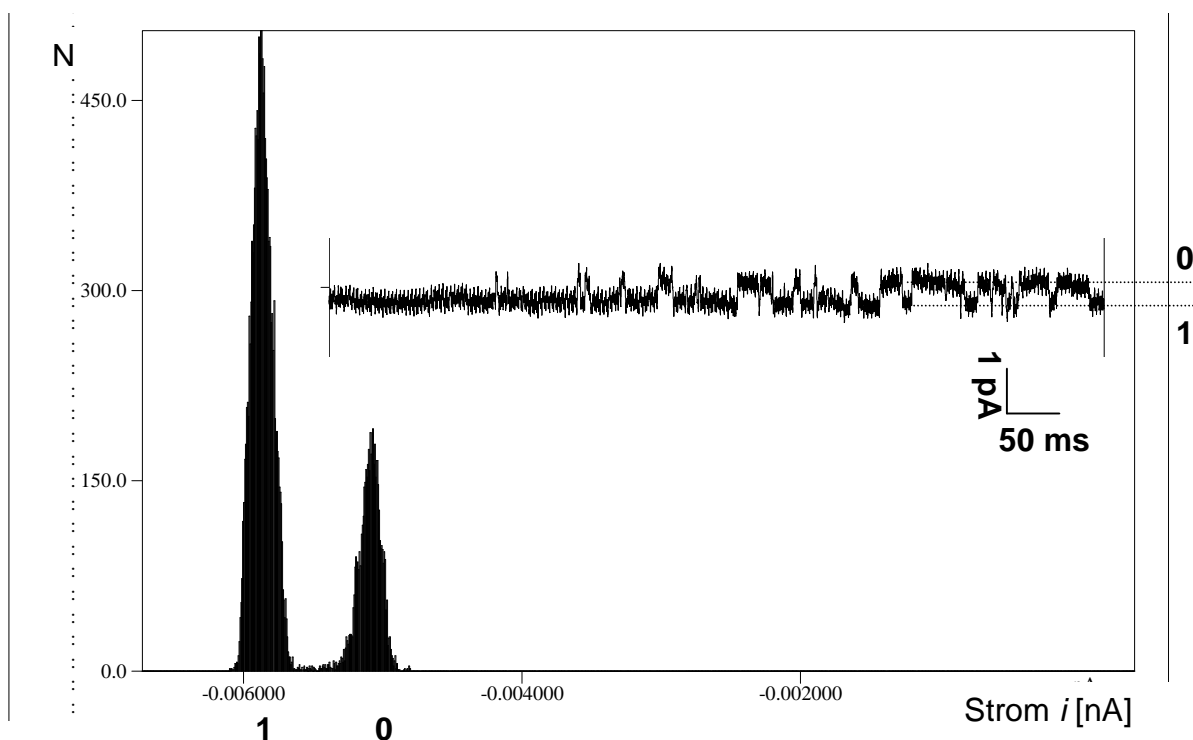




**Abbildung 15:** Von einem Haltepotential  $V_h = 0$  mV wurde im *cell-attached*-Modus die Membran von kultivierten Mikrogliazellen für jeweils 4200 ms auf 80 mV, -80 mV, 50 mV, -50 mV, 30 mV, -30 mV geklemmt. Bei Auftragung der Amplituden der Einzelkanalströme gegen das jeweilige Spannungspotential erhält man die Strom-Spannungskennlinie.

In den Einzelkanalexperimenten stieg nach CCL21-Applikation die Öffnungswahrscheinlichkeit von Chlordionenkanälen nach ungefähr 5 Minuten an. Während in den Versuchen mit einem  $V_h = +50$  mV in einigen Messungen mehr als ein Kanal aktiv war, hatten die Messreihen in den Versuchen mit unterschiedlichen Spannungssprüngen nur eine Öffnungsebene. Das bedeutet, dass der CCL21-aktivierte Ionenkanal einen offenen und einen geschlossenen Leitfähigkeitszustand besitzt.

Im Amplitudenhistogramm wurde die mittlere Leitfähigkeit zu jedem Leitfähigkeitszustand durch eine Gauß-Funktion dargestellt (siehe Abbildung 16).



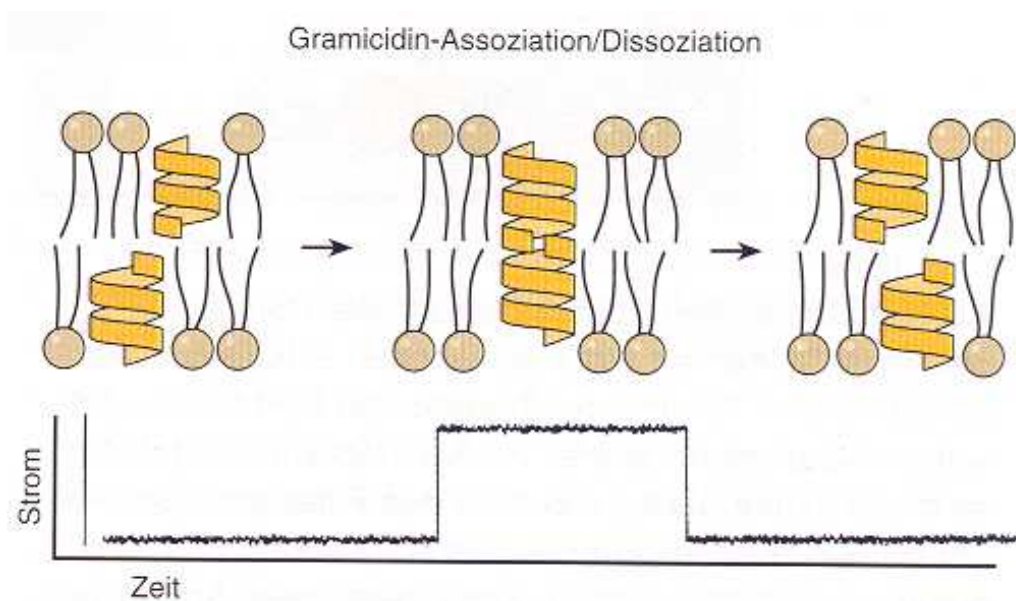
**Abbildung 16:** Dargestellt ist das Amplitudenhistogramm eines CCL21-aktivierten Ionenkanals bei einem Sprungpotential  $V_S = -50$  mV für 4200 ms. Im Amplitudenhistogramm erhält man die mittlere Leitfähigkeit zu jedem Leitfähigkeitszustand einer Messung in Form einer Gauß-Funktion.

Es sind nur zwei Verteilungen im Amplitudenhistogramm zu erkennen, was bedeutet, dass nur ein Ionenkanal unter der ableitenden Pipette aktiv ist. Der Gipfel 0 stellt die Grundlinie dar und beschreibt den Zustand, in dem der Kanal nicht geöffnet ist. Gipfel 1 beschreibt den „Offen“-Zustand des Ionenkanals.

### 3.1.3. Perforierender Patch-clamp-Modus

Um die durch CCL21 ausgelöste elektrophysiologische Antwort mit einem zweiten Versuchsaufbau zu bestätigen, wurden weitere Experimente im *perforated* Patch-clamp-Modus durchgeführt. Beim perforierenden Patchen wird die Zellwand im *whole-cell*-Modus mit Gramicidin perforiert. Das Antibiotikum Gramicidin wird in die Lipidmembran eingebaut und formt Poren, die nur für monovalente Kationen und kleine ungeladene Ionen permeabel sind. Vermutet wird, dass die Struktur des Gramicidin-A-Kanals durch Dimerisierung zweier Gramicidin-Peptide über ihre

Enden gebildet wird (Sawyer *et al.*, 1989). Im Gegensatz zu anderen Ionophoren wie Nystatin und Amphotericin B bleibt die intrazelluläre Chloridkonzentration aufrechterhalten (Kyrozis and Reichling, 1995). Der „Gramicidin-Kanal“ verhält sich wie ein einfacher Widerstand, weil der Strom, der durch einen einzelnen Kanal fließt, proportional zum Membranpotential ist. Die Amplitude des Kanalstromes gehorcht auch dem Ohmschen Gesetz ( $i = V_m/R$ , siehe Kapitel 3.1.2.).



**Abbildung 17:** Mutmaßliche Struktur des Gramicidin-A-Kanals. Dargestellt ist schematisch wie ein funktionierender Kanal durch Dimerisierung der Enden zweier Gramicidin-Peptide gebildet werden. Im unteren *trace* ist die Auftragung eines Einzelkanalstroms über die Zeit bei Porenbildung zu erkennen (Kandel, 1995).

Ich untersuchte im *perforated Patch*-Modus die elektrophysiologische Reaktion von CCL21-Stimulation auf Mikrogliazellen. Nach Erreichen des *gigaseal* dauerte es ungefähr 20 Minuten bis der Serienwiderstand zwischen 200 und 400 M $\Omega$  lag. Jetzt war es möglich, mit den Experimenten zu beginnen.

Um CCL21-induzierte Stromänderungen über einen längeren Zeitraum zu messen, wurde die Membran der Mikrogliazelle wiederholt alle fünf Sekunden von einem Haltepotential von  $-70$  mV für eine Serie von Spannungssprüngen von  $-130$  mV bis  $+30$  mV geklemmt. Die Stimulationspipette wurde in der Nähe der zu

---

messenden Zelle positioniert und CCL21 (10  $\mu$ M, gelöst in PBS) für 30 Sekunden appliziert. CCL21 bewirkte eine Änderung der Membranleitfähigkeit. Die Leitfähigkeit veränderte sich sehr langsam nach Applikation von CCL21 und stieg weiter an obwohl CCL21 durch die anhaltende Badperfusion innerhalb von wenigen Sekunden ausgewaschen war. Um eine Stromantwort der kultivierten Mikroglia vor jedem Experiment im *perforated* Patch-Modus zu erhalten, wurde von einem Haltepotential von  $-70$  mV die Membran in einer Serie von Spannungssprüngen mit einem Spannungsintervall von 10 mV von  $-170$  mV bis 80 mV für jeweils 50 ms geklemmt. Nach jedem Experiment sah der Versuchsablauf vor, in den *whole-cell*-Modus überzugehen. Es war geplant eine weitere *whole-cell*-Ableitung als Kontrolle durchzuführen und diese eventuell mit den schon existierenden Stromprofilen nach CCL21-Applikation zu vergleichen. Durch die lange Dauer der Membran-Perforierung durch Gramacidin an Mikrogliazellen, war es nicht möglich die Zellen bis zur *whole-cell*-Konfiguration am Leben zu erhalten, um eine eventuelle Aussage über das Stromprofil nach CCL21-Applikation machen zu können.

In 51 Experimenten mit Mikrogliazellen war eine störungsfreie Messung nur für höchstens 10 min nach Perforierung der Membran möglich. Die in anderen Publikationen (Kyrozis and Reichling, 1995) beschriebenen Ableitungen, die bis zu 70 min dauerten, konnten mit kultivierten Mikrogliazellen nicht erreicht werden.

## 3.2. Imaging-Experimente mit kultivierten Mikrogliazellen

### 3.2.1. Experimente mit unterschiedlichen Chloridkonzentrationen

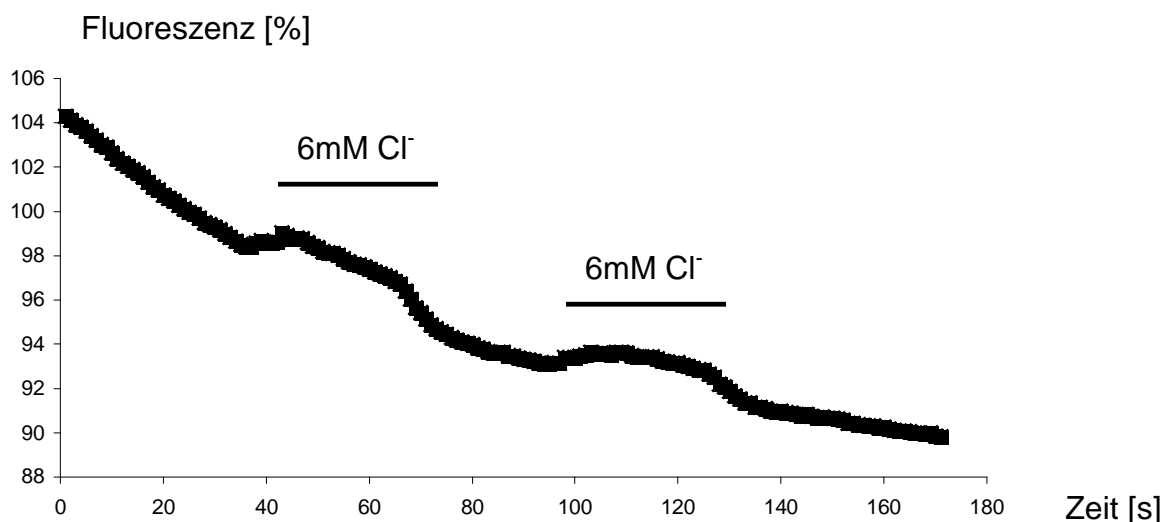
Nach CCL21-Applikation auf Mikrogliazellen öffnet sich ein Chloridkanal und durch Einstrom von Ionen verändert sich die intrazelluläre Ionenhomöostase. Um quantitative Aussagen über die Konzentration von Chloridionen im Intrazellularraum machen zu können, wurden Imaging-Experimente mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes MQAE (5 mg/ ml) durchgeführt.

Die Zellen wurden vor Beginn des Experimentes mit dem Farbstoff MQAE für 30 Minuten geladen. Die Dauer der Beladung ist stark vom Zelltyp abhängig. Es wurden mehrere Vorversuche durchgeführt, um die optimale Dauer für die kultivierten Mikroglia zu ermitteln. In aktuellen Publikationen über MQAE-Imaging (Munkonge *et al.*, 2004; Srinivas *et al.*, 2004; White *et al.*, 1997) werden unterschiedlichste Zelltypen zwischen 5 Minuten bis 60 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen 15 Minuten mit HEPES gepufferter Lösung (Lösung 1, Tabelle 1) gespült und das Experiment gestartet.

Um eine Veränderung der intrazellulären, zytosolischen Chloridionenkonzentration hervorzurufen wurde die extrazelluläre Chloridionenkonzentration verändert. Die Badlösung (Lösung1, Tabelle 1) wurde nach 30 und nach 90 Sekunden für 20 Sekunden gegen eine Badlösung mit wenig Chloridionen (Lösung 4, Tabelle 1) ausgetauscht. Ionenbewegungen als Reaktion auf die Gradientenänderung, veränderten die Ionenhomöostase im Intrazellularraum.

Die Zellen reagierten ohne große Zeitverzögerung auf den Wechsel der Lösungen. Innerhalb weniger Sekunden nach CCL21 war ein Maximum in der Antwort auf die extrazelluläre Ionenänderung erreicht. Die Fluoreszenzreaktion wurde mit Hilfe der Aufnahmetechnik und der  $\gamma$ -Korrektur am PC verstärkt, da in der Mikrogliazelle nur sehr geringe Änderungen zu beobachten waren. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes nahm ab, was einem Ausstrom von Chlorid entspricht. Es wurden mehrere Experimente durchgeführt, wobei bei einer lokalen CL21-Applikation (siehe Kapitel 2.2.) zwischen fünf bis zehn Zellen durch das Chemokin erreicht wurden. Nahezu in allen Zellen (n= 84 von 87) wurde ein Chloridausstrom aus der Zelle induziert.

In Bezug auf die Anfangsintensität wurde das *bleaching* des Farbstoffes prozentual dargestellt (siehe Abbildung 18). Der kontinuierliche Abfall der Fluoreszenz liegt darin begründet, dass der Farbstoff sehr schnell ausbleicht.



**Abbildung 18:** Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentration von kultivierten Mikrogliazellen nach Veränderung der extrazellulären Chloridionenkonzentration (niedrig  $\text{Cl}^-$ ) für 20 Sekunden. Die Badlösung (Lösung 1, Tabelle 1) der Zellen wurde gegen eine Badlösung mit niedriger Chloridionenkonzentration (Lösung 4, Tabelle 1) ausgetauscht.

In einem weiteren Experiment sollte die Fluoreszenzänderung quantitativ mit der Ionenkonzentration korreliert werden. Dazu musste der Farbstoff und die Chloridionenkonzentration der kultivierten Mikroglia geeicht werden. Die Zellen wurden wieder mit Farbstoff beladen und die Fluoreszenz sollte bei unterschiedlichen Konzentrationen von Chloridionen abgelesen werden. Durch das schnelle Ausbleichen des Farbstoffes war es nicht möglich an kultivierten Mikroglia Zelle eine komplette Eichung des Farbstoffes vorzunehmen. Die Fluoreszenzsignale der Reaktion waren zu gering, um sie mit unterschiedlichen Konzentrationen korrelieren zu können. Zusätzlich waren die phototoxischen Effekte auch bei geringster *dye-loading*-Konzentration sehr groß. Viele Zellen waren morphologisch nach weniger als zehn Minuten in einem apoptotischen Zustand. Die Zellen änderten ihre Morphologie, indem sich die Membranen

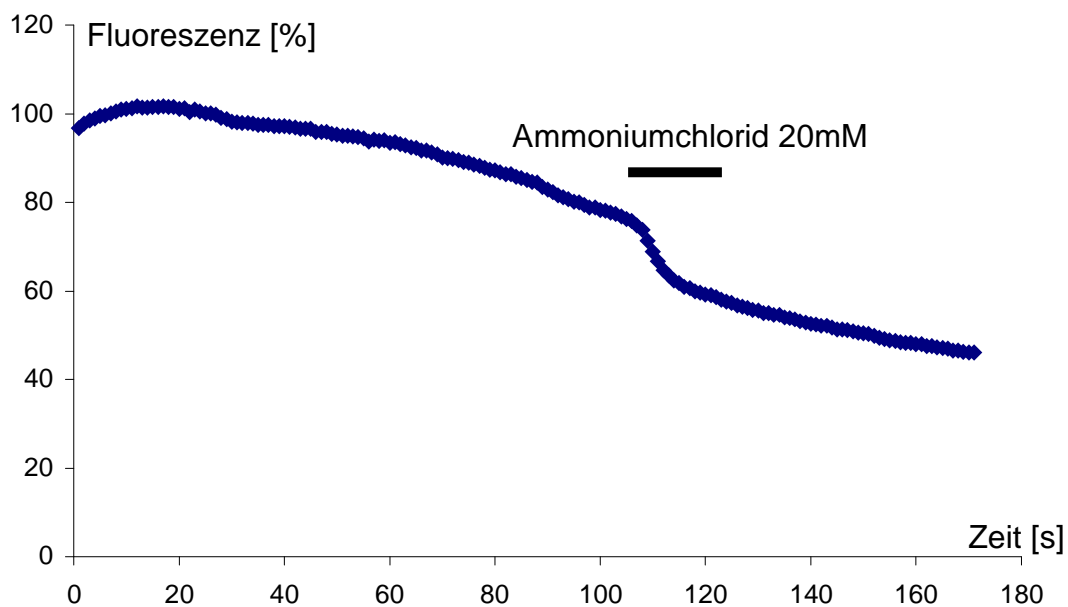
---

abrundeten und sie eine kugelige Gestalt annahmen. Dies deutete daraufhin, dass ein Zelltodmechanismus einsetzte. Die Fluoreszenzreaktionen waren in diesem Zustand nicht mehr für die Analyse geeignet.

### **3.2.2. Experimente mit Ammoniumchlorid-Applikation**

Um eine weitere Reaktion der intrazellulären Chloridionen auf extrazelluläre Änderungen der Ionenkonzentration zu überprüfen, wurden mehrere Versuche mit Ammoniumchlorid durchgeführt.

Das Ruhepotential wird im Grunde durch die  $K^+$ - und  $Na^+$ -Ströme bestimmt und die intrazellulären Konzentrationen werden durch die  $Na^+/K^+$ -Pumpe aufrecht erhalten. Die  $Cl^-$ -Konzentration wird nur durch passive Kräfte (elektrisches Potential und Konzentrationsgradient) beeinflusst. Nach Hemmung der  $K^+$ - und  $Na^+$ -Ströme stellen sich die  $Cl^-$ -Konzentrationen somit entsprechend dem Membranpotential ein. Dieser Umstand wurde verwendet, um mit dem Farbstoff MQAE weitere Änderungen der intrazellulären  $Cl^-$ -Konzentrationen (n=17 von 28) experimentell nachzuweisen. Es wurden verschiedene Glasplättchen mit Zellen gemessen. Mit einer lokalen Applikation aus der Applikationspipette erreichte man bei jedem Experiment zwischen fünf und zehn Zellen.



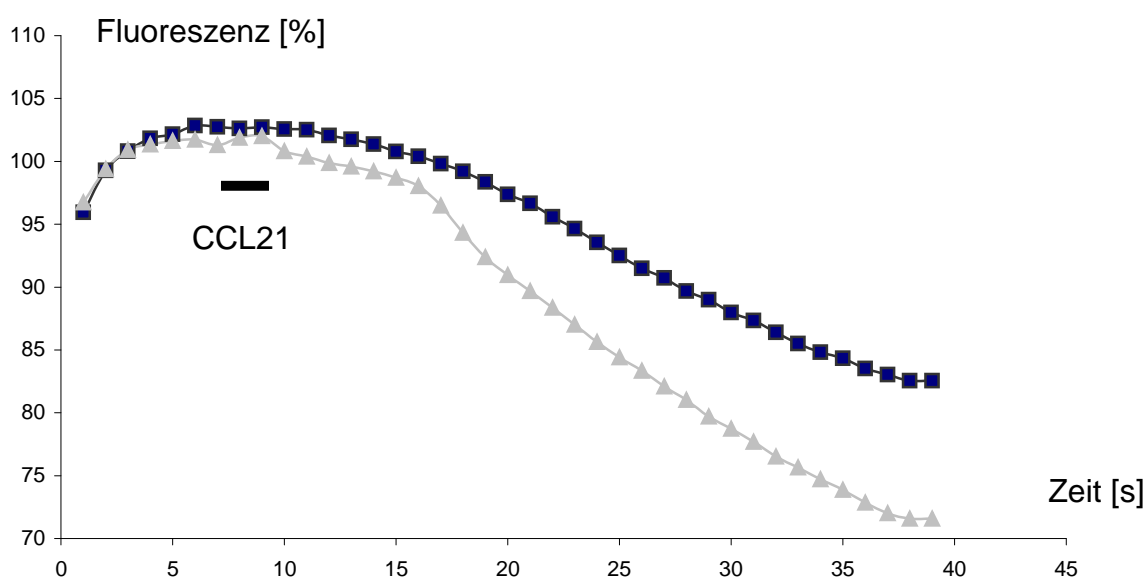
**Abbildung 19:** Ammoniumchlorid und Einfluss der intrazellulären  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen in kultivierten Mikrogliazellen.

Ammoniumchlorid wurde in mehreren Veröffentlichungen als potenter  $\text{K}^+$ -Kanal-Blocker verwendet (Barber *et al.*, 1995; MacDonald *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2001). Ammoniumchlorid wird in der Medizin als Medikament zur Steigerung der Bronchialsekretion eingesetzt und kann als Tetraethylammoniumchlorid (TEA) experimentell eingesetzt werden, um die nicht-ATP-abhängigen Kalium-Kanaltypen und die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe zu hemmen. Man kann davon ausgehen, dass Mikrogliazellen keine aktive Chloridpumpe exprimieren. Das Ruhepotential wird im Grunde durch die  $\text{K}^+$ - und  $\text{Na}^+$ -Ströme bestimmt, weil die intrazellulären Konzentrationen durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe aufrecht erhalten werden. Die  $\text{Cl}^-$ -Konzentration wird nur durch passive Kräfte (elektrisches Potential und Konzentrationsgradient) beeinflusst. Die  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen stellen sich somit entsprechend dem Membranpotential ein. Dieser Einfluss wurde genutzt, um nach Ammoniumchlorid-Stimulation eine Veränderung (in  $n = 17$  von 28) der intrazellulären Konzentration von Chloridionen mit dem Farbstoff MQAE nachzuweisen (siehe Abbildung 19).



### 3.2.3. Experimente mit CCL21-Applikation

Zur Bestätigung der Patch-clamp-Experimente wurden Imaging-Experimente mit CCL21-Applikation durchgeführt. Es wurden also nach Applikation des Chemokins CCL21 Chloridkonzentrationsänderungen in kultivierten MQAE-beladenen Mikrogliazellen gemessen.



**Abbildung 20:** In der unteren Kurve ( ▲ ) erkennt man das Chloridsignal einer Zelle, die ungefähr 5 Minuten nach CCL21-Applikation mit einer Erhöhung der Chloridkonzentration im Zytoplasma reagiert. Als Kontrolle ( ■ ) diente eine Zelle, die unter gleichen Versuchsbedingungen nicht mit CCL21 stimuliert wurde. Der Balken markiert die Dauer der lokalen CCL21-Applikation. Ungefähr fünf Minuten nach Stimulation mit CCL21 kam es zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Diese Abnahme ist gleichbedeutend mit einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Cl}^-$ -Konzentration. In 14 von 30 Zellen kam es zu einem Chloridsignal.

CCL21 (10  $\mu\text{M}$  in PBS) wurde mit einem lokalen Applikationssystem appliziert. Alle 30 Sekunden wurde vom Imagingsystem ein Bild aufgenommen. 3 Minuten nach Applikationsbeginn wurde für 30 Sekunden CCL21 lokal appliziert und durch die andauernde Badperfusion sofort wieder ausgewaschen.

Im Vergleich zum Kontrollversuch erkennt man eine Änderung der Steigung nach CCL21-Applikation. Die CCL21-induzierte Veränderung der intrazellulären Chloridkonzentration erreichte ihr Maximum vergleichbar mit den elektrophysiologischen Experimenten ungefähr 5 Minuten nach Applikation.

In 14 von 30 Zellen kam es zu diesem messbaren Signal. Die Fluoreszenzintensität nahm nach Applikation des Chemokins ab, was einer Konzentrationserhöhung von Cl<sup>-</sup>-Konzentration im Zytoplasma entspricht. Das Fluoreszenzsignal-Signal war in kultivierten Mikroglia zu gering, um eine quantitative Auswertung der Messungen zu machen.

#### 4. Diskussion

Chloridionenkanäle sind essentiell für Bewegungs- und Aktivierungsvorgänge in Mikrogliazellen. Beeinflusst durch verschiedene Signalmoleküle, wie beispielsweise Chemokine oder Zytokine kontrollieren sie Bewegungen von Chloridionen durch Ionenkanäle. Unter pathologischen Umständen werden Chemokine produziert, um Mikrogliazellen, die professionellen Makrophagen des Zentralen Nervensystems, zu aktivieren.

Chemokine, die hauptsächlich unter pathologischen Bedingungen exprimiert werden, führen nicht nur zur Anlockung von Leukozyten in das geschädigte Gewebe (Karpus and Ransohoff, 1998), sondern induzieren nach Bindung an CC-Rezeptoren auch Migrationseffekte von Monozyten, eosinophilen, basophilen und neutrophilen Immunzellen. In den letzten Jahren wurde immer häufiger eine besondere Rolle von Chloridkanälen im Zusammenhang mit diesen Migrationsvorgängen formuliert. Eine genaue molekularbiologische oder elektrophysiologische Charakterisierung dieser Kanäle ist allerdings noch nicht erfolgt.

In kultivierten Zellen und im Hirnschnitt ist eine Bindung von CCL21 an den CXC-Rezeptor-3 und eine darauf folgende migratorische Antwort nachgewiesen. Sowohl die Struktur als auch die elektrischen Eigenschaften des vermittelnden Kanalproteins sind an Mikrogliazellen nicht erforscht.

Mit der elektrophysiologischen Methode des *patch clamping* wurde in dieser Arbeit ein Chloridkanal auf Mikrogliazellen charakterisiert, der nach Stimulation mit dem Chemokin CCL21 aktiviert wird und einen Einfluss auf die intrazelluläre Chloridionenhomöostase hat. Weiterhin wurde mit Imaging-Experimenten der Einfluss von CCL21 auf Chloridströme *in vitro* untersucht. Das hier gefundene Ergebnis zeigt, dass die Bindung von CCL21 nach einer gewissen Latenzzeit eine Stromantwort durch einen Ionenkanals auslöst, die auch nach Auswaschen des Chemokins noch messbar ist.

## 4.1. Das Chemokin CCL21 und ein Ionenkanal auf Mikroglia

### 4.1.1. CCL21 aktiviert einen Chloridkanal auf Mikrogliazellen

Patch-clamp-Experimente an Mikrogliazellen in Gewebeschnitten und an kultivierten Zellen beweisen, dass die Mikroglia eine große Anzahl an Ionenkanälen exprimiert. Die Expression dieser Kanäle hängt vom funktionellen Status der Zellen ab. Das Öffnen beziehungsweise Schließen der Kanäle wird durch Zytokine, Lipopolysaccharide, Chemokine und viele andere Botenstoffe gesteuert. Dabei spielen auch der pH-Wert, die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und die Proteinkinasenaktivierung eine Rolle. In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Charakterisierung von Ionenkanälen auf Zellen gemacht.

Auch Chloridkanäle waren ein Schwerpunkt vieler Arbeiten. In Gliazellen sind mindestens 8 verschiedene Typen von Chlorid- und anderen Anionströmen identifiziert. Aussagen über die Verteilung von Chloridionen innerhalb der Zelle sind für viele Zellen individuell. Chloridionen können aktiv aufgenommen werden, ausgeschieden werden oder passiv verteilt sein. In einigen Fällen sind Kanäle für mehrere Anionen permeabel (Jentsch *et al.*, 2002).

Mit dieser Arbeit wurde ein Ionenkanal charakterisiert, der eine Einzelkanalleitfähigkeit von  $\sim 9$  pS aufweist und ein Umkehrpotential von 0 mV besitzt. Dieser Kanal wird auf der Membran von kultivierten Mikrogliazellen exprimiert und öffnet sich einige Minuten nach Stimulation mit dem Chemokin CCL21.

Bei dem CCL21-aktivierten Ionenkanal handelt es sich sehr wahrscheinlich um einen Liganden-gesteuerten Kanal. In Mikrogliazellen sind bis jetzt nur drei Arten von Chloridkanälen erwähnt, spannungsabhängige, spannungsunabhängige und *stretch*-aktivierte Kanäle (siehe Kapitel 1.4.1). Die spannungsabhängigen Kanäle zeigten eine Einzelkanalleitfähigkeit von 280-325 pS (Schilling, 2001). Bis heute wurden nur sehr wenige Experimente im *cell-attached*-Patch-clamp-Verfahren an Mikrogliazellen durchgeführt.

#### 4.1.2. CCL21 aktiviert einen Liganden-gesteuerten Ionenkanal

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es nach CCL21-Bindung an CXCR3 zu einer komplexen Reaktion innerhalb des Zytoplasmas kommen muss, da die Änderung der Leitfähigkeit nicht unmittelbar nach CCL21-Applikation sondern erst einige Minuten später auftritt. Der Mechanismus, über welchen CCL21 durch Bindung an den CXCR3-Rezeptor die Öffnung des Ionenkanals steuert, ist bisher nicht bekannt. Es lässt beispielsweise vermuten, dass der Chloridkanal nicht direkt an den CXCR3-Rezeptor gekoppelt ist, sondern sich Mechanismen der Signaltransduktion zwischen der Rezeptoraktivierung und der Kanalöffnung abspielen. Ebenso bleibt offen, ob der CXCR3-Rezeptor lokal in der Nähe des Chloridkanals exprimiert wird oder Kanal und Rezeptor sich nicht in räumlicher Nähe befinden

Auch im Zentralen Nervensystem wurden bisher nur wenige Liganden-gesteuerte Kanäle untersucht. In erster Linie handelt es sich bei bis jetzt erforschten Liganden-gesteuerten Kanälen um GABA- und Glycin-Rezeptoren, welche in der Erregungsleitung eine Rolle spielen (Jentsch *et al.*, 2002). Diese Kanäle führen zu einer starken depolarisierenden Antwort, welche wiederum einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bewirken kann (Owens *et al.*, 1996; Reichling *et al.*, 1994). Auch eine CCL21-Stimulation führt in Mikrogliazellen zu einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Elevation. Soto *et al.* (1998) zeigten, dass die Applikation von Maus-CCL21 in Maus-CXCR3-transfizierten Zellen ein Kalziumsignal bewirkt. Auch in Mikrogliazellen triggert CCL21 eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Elevation. Somit könnte eine Erhöhung des Kalziumspiegels ein Element der Aktivierungskaskade sein.

Es bleibt bis jetzt unklar, ob es Ähnlichkeiten mit den Liganden-gesteuerten Kanälen in neuronalen Membranen gibt.

#### 4.1.3. Ähnlichkeit zu anderen Liganden-gesteuerten Ionenkanälen

GABA-gesteuerte Chloridkanäle (siehe Kapitel 4.2.1.) gehören zu der Liganden-gesteuerten-Kanal-Familie (LGIC = *ligand gated ion channel superfamily*), wobei die bis heute untersuchten Typen alle aus einer Unterfamilie hervorgehen (Betz, 1990). In dieser Familie formen fünf Untereinheiten einen Ionenkanal, wobei

---

jede Untereinheit aus einer 200 Aminosäure-starken extrazellulären, fünf transmembranen Domänen und einer kurzen Carboxy-terminierten intrazellulären Domäne besteht. Diese Struktur haben nikotinische Azetylcholinrezeptoren (Lindstrom *et al.*, 1995), Glycin-Rezeptoren (Vannier and Triller, 1997), ionotropische Serotonin-Rezeptoren und GABA-Rezeptoren (Maricq *et al.*, 1991) gemeinsam. Eine Verwandtschaft der *LIGC* zu Chemokin-aktivierten Ionenkanälen ist nicht nachgewiesen, ist jedoch eine interessante Fragestellung der zukünftigen elektrophysiologischen Forschung.

#### **4.2. Imaging in kultivierten Mikroglia zeigt Veränderung der Chloridhomöostase nach CCL21-Stimulation**

Änderungen der intrazellulären Cl<sup>-</sup>-Konzentration beziehungsweise der intrazellulären Cl<sup>-</sup>-Homöostase wurden in dieser Arbeit mit Imaging-Versuchen qualitativ dargestellt.

Imaging von Chloridionen mit dem Farbstoff MQAE konnte in Mikrogliazellen mit dieser Arbeit das erste Mal durchgeführt werden. Für das Imaging von Chloridionen existieren derzeit drei verschiedene Farbstoffe (MQAE, SPQ, MEQ), welche in vielen Veröffentlichungen Anwendung fanden. Da die Substanz MQAE die geringsten phototoxischen Effekte aufweist, wurde dieser Farbstoff für die hier aufgeführten Experimente genutzt. Im Vergleich zu SPQ besitzt MQAE eine größere Sensitivität gegenüber Chloridionen und hat ein größeres Fluoreszenzspektrum (Verkman *et al.*, 1989).

Experimente mit Veränderung der extrazellulären Chloridionenkonzentration zeigten, dass die Zelle mit einem „Ausstrom“ von Chloridionen reagiert. Qualitativ ist man also in der Lage Reaktionen im intrazellulären Raum der „kleinen“ Mikrogliazelle zu bestimmen. Aussagen über genaue intrazelluläre Konzentrationen von Chloridionen, wie sie an Muskelzellen der Aorta (Koncz and Daugirdas, 1994) oder Sinneszellen des Ohres (Song *et al.*, 2005) gemacht wurden, konnten an kultivierten Mikrogliazellen nicht getroffen werden. Eine quantitative Beurteilung der Chloridkonzentration der Mikrogliazelle kann mit den hier vorliegenden Ergebnissen nicht getroffen werden. Aufgrund der vorhandenen phototoxischen Effekte von MQAE war es in kultivierten Mikrogliazellen nicht

möglich, ein Eichungsexperiment durchzuführen, um den Fluoreszenzänderungen unterschiedliche Ionenkonzentrationen zuzuweisen.

In Kulturversuchen mit Mikrogliazellen konnte gezeigt werden, dass es zu einem Chlorideinstrom nach CCL21-Aktivierung kommt. Damit konnten die Ergebnisse der elektrophysiologischen Experimente mit einem anderen Versuchsaufbau bestätigt werden. Um genaue Aussagen über die Chloridionenbewegungen an bestimmten Zellpolen oder gar an Zellausläufern machen zu können, und damit eine Hypothese über die intrazelluläre Verteilung von Chloridionen zu treffen sind Experimente die eine höhere Auflösung bieten erforderlich. Eventuell könnten dafür konfokal-mikroskopische Techniken in Frage kommen.

#### **4.3. Mikrogliazellen exprimieren CCL21-Rezeptoren *in vitro***

Die Expression von inflammatorischen Chemokinen wie CCL2, CCL3, CCL4, CXCL9 und CXCL10 im ZNS wurde für unterschiedliche pathologische Prozesse des Hirngewebes beschrieben (Glabinski *et al.*, 1995; Lahrtz *et al.*, 1998; Xia and Hyman, 1999). Unser Wissen über die Rolle von Chemokinen in diesem Zusammenhang hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Mikrogliazellen exprimieren den CXCR3-Rezeptor, an welchen das Chemokin CCL21 binden kann. Nach Stimulation mit CCL21 kommt es in kultivierten Mikrogliazellen zur Aktivierung eines Chloridionenkanals.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse beweisen, dass nach lokaler Stimulation mit dem Chemokin CCL21 in Mikrogliazellen eine Stromantwort eines Kanals ausgelöst wird. Dieser Kanal hat eine Leitfähigkeit von  $\sim 9$  pS und ein Umkehrpotential um 0 mV, was auf einen Chloridkanal hindeutet. Die Stimulation führte zu einer lang anhaltenden Änderung der Leitfähigkeit in der Mikroglia. Die hier erarbeiteten Ergebnisse bestätigen Experimente aus Ganzzell-Ableitungen (Biber *et al.*, 2002a). Mit Imaging-Experimenten konnte gezeigt werden, dass es zu einer Änderung der Chloridhomöostase nach CCL21 Stimulation kommt.

Der Aktivitätszustand der Zellen kann nicht beurteilt werden, da man keine Aussage über die physiologische Situation der gesamten Zelle, sondern nur über die Situation eines einzelnen Ionenkanals treffen kann. Eine Aussage über das

Membranpotential oder das Stromprofil der gesamten Zelle und damit über den Aktivitätszustand kann nicht getroffen werden.

Die kultivierte Mikrogliazelle repräsentiert kein geeignetes Modell für die ruhende, i.e. die ramifizierte Mikroglia im Gehirn. Die Zelle ist in diesem Zustand zwar bereit, auf Mediatoren, ähnlich denen von beschädigten Neuronen zu reagieren, aber ist durch den Kultivierungsvorgang sicherlich nicht mit *in vivo* Verhältnissen vergleichbar. Die kultivierte Zelle bleibt trotzdem nur ein Modell und kann Experimente an der ruhenden Zelle *in vivo* nicht ersetzen.

Es ist davon auszugehen, dass der in dieser Arbeit charakterisierte Chloridkanal, welcher im CCL21/CXCR3-System eine Rolle spielt weniger dem Aktivierungsprozess der Zellen, sondern vielmehr einer Migrationsinduktion zuzuordnen ist.

#### **4.4. CCL21 als Bindeglied zwischen Neuronen und Mikroglia**

CCL21 löste in Mikrogliazellen in Kultur einen Anstieg in der Leitfähigkeit aus. Der CCL21-induzierte Strom besaß im Einzelkanalexperiment ein Umkehrpotential von 0 mV, was eine Chloridionenselektivität nahelegt.

Ungefähr 5 Minuten nach Lokal-Applikation des Chemokins kam es zu dieser Leitfähigkeitsänderung die für mehrere Minuten anhielt.

Neuronen exprimieren CCL21 (de Jong *et al.*, 2005; Biber *et al.*, 2001) nach neuronalem Schaden und aktivieren Immunzellen zum Einwandern in das entzündete Areal. Somit könnte die CCL21-induzierte Chloridleitfähigkeit eine Möglichkeit darstellen, um das Verhalten von Mikrogliazellen nach neuronaler Verletzung zu beeinflussen. CCL21 bewirkte eine Leitfähigkeitsänderung für etliche Minuten. Dies spricht dafür, dass CCL21 ein Signal zu einer längerfristigen Reaktion darstellt.

Migration der Mikrogliazellen zu den verletzten Neuronen könnte eine solche Reaktion sein. Es kommt im Experiment nicht zur sofortigen Aktivierung des Chloridkanals sondern erst nach einer Latenzzeit, was für eine weniger akute Funktion von CCL21 spricht.

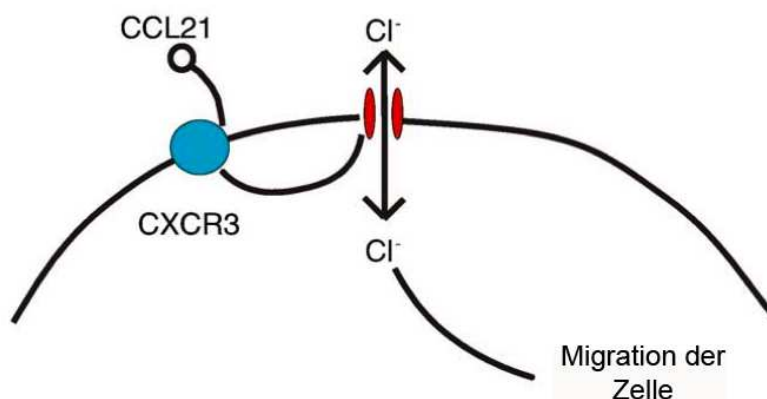
Astrozyten exprimieren ebenfalls CCL21 (Columba-Cabezas *et al.*, 2003). Zu überlegen ist also zusätzlich eine Hypothese ob nur Neuronen und Mikroglia in



Kontakt stehen, oder ob es eine Wechselwirkung zwischen diesen drei Zelltypen gibt.

#### 4.5. Die Rolle von CCL21 bei der Migration von Zellen

Bei infektiösen Vorgängen oder nach Verletzungen des Gehirns migrieren Mikrogliazellen zu den betroffenen Bereichen. Diese Migration wird vermittelt durch TGF- $\beta$ , ATP, Neurotensin, Lysophospholipide und Chemokine, wie zum Beispiel CCL21 (Woodrooffe *et al.*, 1999, Honda *et al.*, 2001; Schilling *et al.*, 2004). Rappert *et al.* (2002) zeigte, dass Migration in Mikrogliazellen durch CCL21 induziert werden kann. Es ist bekannt, dass ein Chloridionenausstrom durch Kanalproteine oder Transporter und zusätzlicher Kaliumionenausstrom durch  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanäle zu einem osmotisch bedingten Wasserausstrom und einer Schrumpfung des Zellkörpers führt. Welche Ionenkanäle für die Migration der Zellen verantwortlich sind ist nicht bekannt. Ebenso kann man nur vermuten, wie sich die Ionenhomöostase während des Migrationsprozesses verhält. Ändert diese sich eventuell nur an dezidierten Stellen der Mikroglia, mit der Folge einer Veränderung der Form an nur einem Pol der Zelle (Schwab, 2001).



**Abbildung 20:** Nach Bindung von CCL21 an den CXCR3-Rezeptor kommt es zur Öffnung eines Chloridkanals auf der Mikrogliazelle. Dieser Kanal hat eine Einzelkanalleitfähigkeit von ca. 9 pS.

Die mit dieser Arbeit dargestellten Experimente festigen die Hypothese, dass eine Interaktion des Chemokins CCL21 mit dem CXCR3-Rezeptor eine fundamentale Rolle in der Aktivierung von Migrationsprozessen in der Zelle spielt.

Außerdem kann man aus oben vermuteten Ergebnissen schließen, dass ein Liganden-gesteuerter Chloridkanal mit  $\sim 9$  pS Einzelkanalleitfähigkeit eine entscheidende Rolle im Migrationsprozess der Zelle spielt.

Unterstützt wird diese Hypothese durch Imaging Experimente mit MQAE, bei denen nach CCL21-Applikation ein Chlorid-Einstrom in die Zelle nachweisbar war. Ferner steuert CCL21 Migrationsprozesse in zahlreichen anderen Zelltypen. Beispielsweise ist die Wanderung von dendritischen Zellen in Lymphknoten CCL21-abhängig. Dabei wird die Expression des Chemokins von Endothelzellen des betroffenen Gewebes gesteuert (Sugaya, M., 2006). Ein weiteres Beispiel stellt das sogenannte *homing* von T-Lymphozyten im sekundären Lymphgewebe unter physiologischen Bedingungen dar. Unter pathologischen Umständen, wie zum Beispiel bei chronischen Entzündungen des zentralen Nervensystems hingegen, ist CCL21 an der Infiltration des betroffenen Gewebes durch inflammatorische T-Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Engelhardt, 2006).

Damit kann man postulieren, dass CCL21 eine weitreichende Funktion in der Aktivierung von Migrationsprozessen in unterschiedlichen Zelltypen inne hat.

#### **4.6. Die klinische Bedeutung von CCL21 und Chloridkanälen**

Chloridkanäle spielen eine wichtige Rolle bei Krankheiten aller medizinischen Disziplinen. Die wichtigsten physiologischen Aufgaben jener Kanäle sind, die Regulation des Zellvolumens, des transepithelialen Transports von Salzen und Wasser sowie die Modulation von elektrischer Erregbarkeit. Ferner spielen sie in der pH- und Volumenregulation eine Rolle. In allen diesen Gebieten kann die Physiologie gestört sein und zu schwerwiegenden Krankheitsbildern führen. Der Einfluss des CCL21-aktivierten Chloridkanals gilt bis heute als nicht geklärt.

#### **4.6.1. Der Einfluss von Chloridkanälen auf die Migration von intrazerebralen Tumorzellen**

Neben der unkontrollierten Proliferation von Tumorzellen ist deren invasive Mobilität zentraler Gegenstand der Hirntumorforschung (Merzak and Pilkington, 1997). Gliomzellen bewegen sich durch enge extrazelluläre Lücken und infiltrieren das gesunde Hirnparenchym indem sie ihr Volumen ändern. Diese Invasion ist durch Chloridkanal-Blocker inhibierbar, wobei man noch keine genauen Aussagen treffen kann, welcher Kanaltyp dafür verantwortlich ist. Bis jetzt ist über den Einfluss des CCL21-aktivierten Chloridkanals auf die Migration in Gliomzellen noch keine detaillierte Hypothese formuliert.

Ein weiterer Kandidat für die Regulation von Migrationsprozessen sind spannungsaktivierte Chloridkanäle vom ClC (Olsen *et al.*, 2003). Es gibt aber auch fundierte Meinungen, dass ClC-Kanälen der Einfluss auf die Volumenregulation und somit auf intrazerebrale Migration fehlt (Jentsch *et al.*, 2005)

Welche Kanäle nun aber für die Migration von Tumorzellen verantwortlich sind, bleibt noch ungeklärt. Ein durch Liganden-gesteuerter Chloridkanal ist neben den Volumen-regulierten Chloridkanälen ein interessanter Diskussionsansatz.

#### **4.6.2. Der Einfluss von CCL21 auf die Migration von Progenitorzellen**

In der Literatur gibt es vereinzelt Hinweise darauf, dass Vorläuferzellen (oder Progenitorzellen) in der Lage sind, das Wachstum von Gliomen zu unterdrücken, indem sie zum Tumorgewebe wandern und dort mit den Tumorzellen interagieren (Glass *et al.*, 2005). Über die einzelnen Wirkungsmechanismen ist allerdings noch nichts genaues bekannt. Maligne Hirntumore exprimieren Chemokine und Chemokinrezeptoren (Ehtesham *et al.*, 2006) und können ebenso wie nicht transformierte Zellen chemokinabhängig reagieren.

Honeth *et al.* (2006) wiesen eine Expression von CXCR3-Rezeptoren in Progenitorzelllinien nach. Die Steuerung eines Chloridkanals durch Chemokinbindung an den CXCR3-Rezeptor, wie es in Mikrogliazellen der Fall ist, könnte eine Möglichkeit darstellen, wie Progenitorzellen den Weg zu sich ausbreitenden Glioblastomzellen finden.

---

Eine genauere Charakterisierung des Systems, welches der Regulierung des CXCR3-abhängigen Chloridkanals zugrunde liegt, könnte somit von großem medizinischen Nutzen sein. Einsicht in die Mechanismen, mit denen Progenitorzellen zu Gliomen migrieren, bringt die Forschung einer möglichen Stammzelltherapie einen Schritt näher.

#### **4.6.3. Die Wirkung von CCL21 auf Zellen des Immunsystems**

Im gesunden Hirngewebe ist die Einwanderung von Lymphozyten sehr gering. Die Blut-Hirn-Schranke (BBB) stellt eine hoch spezialisierte Schranke für den Verkehr von Immunzellen dar.

Bei inflammatorischen Prozessen wie der Multiplen Sklerose (MS) oder der tierexperimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE) überschreiten Zellen des peripheren Immunsystems die Blut-Hirn-Schranke und führen intrazerebral zu Ödemen, Entzündung und Demyelinisierung. Eine besondere Rolle in diesem Prozess spielt dabei die Interaktion zwischen Endothel- und Immunzellen.

CCL21 ist in der letzten Zeit als migrationsinduzierender Mediator in verschiedenen Zelltypen bekannt geworden. Die funktionelle Expression der Chemokine CCL19 und CCL21 in entzündetem Gewebe, wie sie von Engelhardt beschrieben wurde, führt *in vivo* zum Einwandern von Lymphozyten sogar über die Blut-Hirn-Schranke (Engelhardt, 2006). Das heutige Paradigma, über die Rekrutierung von T-Lymphozyten bei zentralnervösen Entzündungsprozessen beinhaltet somit auch Aspekte der Chemokin-induzierten Migration.

Über die Kanalexpression auf peripheren Immunzellen ist bis jetzt sehr wenig bekannt. Neben molekularbiologischen bedarf es noch weiterer elektrophysiologischer Untersuchungen, um einen kompletten Mechanismus dieser Zellbewegungen zu charakterisieren. Eine Beteiligung von Chloridionen beziehungsweise Chloridkanälen ist zu vermuten, und eine Ähnlichkeit mit den in dieser Arbeit charakterisierten Kanälen ist nicht ausgeschlossen. Elektrophysiologische Untersuchungen an T-Lymphozyten oder anderen peripheren Immunzellen könnten zeigen, ob CCL21 auch hier einen Einfluss auf die Stromantwort hat .

#### 4.6.4. CCL21 als Mediator nach traumatischen Läsionen im ZNS

Mikrogliazellen bewegen sich nach Verletzung im ZNS direkt zum Ort der Verletzung. Mit *in vivo* Versuchen am Zwei-Photon-Laser-Mikroskop konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen einem Gradienten von ATP folgen (Davalos *et al.*, 2005). Die direkte Ausrichtung der Mikrogliaausläufer auf die traumatisch geschädigte Region lässt einen oder mehrere Stoffgradienten vermuten, die für Beginn der Bewegung und die Bewegungsrichtung verantwortlich sind. Davalos *et al.* (2005) zeigten, dass mindestens 30 Minuten nach dem traumatischen Ereignis Mikrogliazellen zum Ort der Läsion wandern und diese Migration vom ATP-Gradienten im verletzten Gewebe abhängig ist.

Eventuell ist in diesem Ablauf neben ATP auch CCL21 von Bedeutung. Ebenso kann man einen Einfluss von Chloridkanälen vermuten. Der ATP-vermittelten Migration konnte bis jetzt noch kein Kanal elektrophysiologisch zugeordnet werden. Es bleibt also die Frage offen, ob Charakteristiken bezüglich der Leitfähigkeit und der Öffnungskinetik des in dieser Arbeit untersuchten Kanals Gemeinsamkeiten zu anderen Liganden-gesteuerten Kanälen aufweisen, die möglicherweise medizinische Bedeutung bekommen.

#### 4.6.5. Die Rolle von CXCR3 in der Pathologie der Multiplen Sklerose

Die multiple Sklerose ist eine immunologisch bedingte Entmarkungserkrankung des ZNS mit multilokulärer klinischer und neurophysiologischer Befundkonstellation, oft schubförmigem Verlauf sowie charakteristischen Liquor- und MRT-Befunden. Neben der Entmarkung beziehungsweise der axonalen Degeneration ist eine entzündliche Reaktion des ZNS ein gravierendes pathologisches Merkmal der Erkrankung. Besonders Chemokine und Chemokinrezeptoren von residenten und infiltrierenden Zellen wurden in vielen Studien untersucht. Der CXCR3-Rezeptor scheint eine Rolle in der Pathologie der Erkrankung zu spielen. Auf peripheren CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten wird beispielsweise CXCR3 gemeinsam mit der Ausprägung eines MS-Schubes hochreguliert (Mahad *et al.*, 2003) Worauf diese Expression Einfluss hat, ist noch unklar. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass auf Mikrogliazellen, als ZNS-residente Immunzellen ebenfalls eine Expression von CXCR3 stattfindet.

Columba-Cabezas *et al.* zeigten mit Hilfe der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE), dem tierexperimentellen Modell für Multiple Sklerose, dass CCL21 auf das *homing* von Antigen-präsentierenden-Zellen und Lymphozyten einen entscheidenden Einfluss hat (Columba-Cabezas *et al.*, 2003). Elektrophysiologische Untersuchungen an T-Lymphozyten nach CCL21-Stimulierung wurden bis jetzt noch nicht durchgeführt. Es ist aber zu vermuten, dass Chloridionen in diesen *homing*-Prozessen eine entscheidende Rolle spielen. Durch weitere Untersuchungen, welche Rolle Ionenkanäle in der Pathophysiologie der MS spielen, könnte ein pharmakologischer Therapieansatz entwickelt werden.

---

## 5. Literaturverzeichnis

1. **Aldrich,R.W.**, Corey,D.P., and Stevens,C.F. (1983). A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature* 306, 436-441.
2. **Altman,J.** (1994). Microglia emerge from the fog. *Trends Neurosci.* 17, 47-49.
3. **Asensio,V.C. and Campbell,I.L.** (1999). Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci.* 22, 504-512.
4. **Ashwell,K.** (1991). The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 58, 1-12.
5. **Baggiolini,M.** (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-568.
6. **Bajetto,A.**, Bonavia,R., Barbero,S., Florio,T., and Schettini,G. (2001). Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol.* 22, 147-184.
7. **Bajetto,A.**, Bonavia,R., Barbero,S., Piccioli,P., Costa,A., Florio,T., and Schettini,G. (1999). Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *J. Neurochem.* 73, 2348-2357.
8. **Barber,R.D.**, Woolf,A.S., and Henderson,R.M. (1995). A characterization of the chloride conductance in mesangial cells from the H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Biochim. Biophys. Acta* 1269, 267-274.
9. **Benveniste,E.N.** (1997). Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J. Mol. Med.* 75, 165-173.
10. **Betz,H.** (1990). Ligand-gated ion channels in the brain: the amino acid receptor superfamily. *Neuron* 5, 383-392.
11. **Bezzi,P.** and Volterra,A. (2001). A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 387-394.

12. **Biber,K.**, Rappert,A., Kettenmann,H., Brouwer,N., Copray,S.C., and Boddeke,H.W. (2002a). Neuronal SLC (CCL21) expression: implications for the neuron-microglial signaling system. Ernst. Schering. Res. Found. Workshop 45-60.
13. **Biber,K.**, Sauter,A., Brouwer,N., Copray,S.C., and Boddeke,H.W. (2001). Ischemia-induced neuronal expression of the microglia attracting chemokine Secondary Lymphoid-tissue Chemokine (SLC). *Glia* 34, 121-133.
14. **Biber,K.**, Zuurman,M.W., Dijkstra,I.M., and Boddeke,H.W. (2002b). Chemokines in the brain: neuroimmunology and beyond. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2, 63-68.
15. **Blinzinger,K. and Kreutzberg,G.** (1968). Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 85, 145-157.
16. **Bolin,L.M.**, Murray,R., Lukacs,N.W., Strieter,R.M., Kunkel,S.L., Schall,T.J., and Bacon,K.B. (1998). Primary sensory neurons migrate in response to the chemokine RANTES. *J. Neuroimmunol.* 81, 49-57.
17. **Boucsein,C.**, Kettenmann,H., and Nolte,C. (2000). Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2049-2058.
18. **Chen,S.C.**, Leach,M.W., Chen,Y., Cai,X.Y., Sullivan,L., Wiekowski,M., Dovey-Hartman,B.J., Zlotnik,A., and Lira,S.A. (2002). Central nervous system inflammation and neurological disease in transgenic mice expressing the CC chemokine CCL21 in oligodendrocytes. *J. Immunol.* 168, 1009-1017.
19. **Cherubini,E.**, Gaiarsa,J.L., and Ben Ari,Y. (1991). GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.* 14, 515-519.
20. **Chipperfield,A.R. and Harper,A.A.** (2000). Chloride in smooth muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74, 175-221.



- 
21. **Columba-Cabezas,S.**, Serafini,B., Ambrosini,E., and Aloisi,F. (2003). Lymphoid chemokines CCL19 and CCL21 are expressed in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the maintenance of chronic neuroinflammation. *Brain Pathol.* 13, 38-51.
  22. **Cuadros,M.A. and Navascues,J.** (1998). The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog. Neurobiol.* 56, 173-189.
  23. **Damaj,B.B.**, McColl,S.R., Neote,K., Hebert,C.A., and Naccache,P.H. (1996). Diverging signal transduction pathways activated by interleukin 8 (IL-8) and related chemokines in human neutrophils. IL-8 and Gro-alpha differentially stimulate calcium influx through IL-8 receptors A and B. *J. Biol. Chem.* 271, 20540-20544.
  24. **Davalos,D.**, Grutzendler,J., Yang,G., Kim,J.V., Zuo,Y., Jung,S., Littman,D.R., Dustin,M.L., and Gan,W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752-758.
  25. **de Jong,E.K.**, Dijkstra,I.M., Hensens,M., Brouwer,N., van Amerongen,M., Liem,R.S., Boddeke,H.W., and Biber,K. (2005). Vesicle-mediated transport and release of CCL21 in endangered neurons: a possible explanation for microglia activation remote from a primary lesion. *J. Neurosci.* 25, 7548-7557.
  26. **Dean,M.**, Carrington,M., Winkler,C., Huttley,G.A., Smith,M.W., Allikmets,R., Goedert,J.J., Buchbinder,S.P., Vittinghoff,E., Gomperts,E., Donfield,S., Vlahov,D., Kaslow,R., Saah,A., Rinaldo,C., Detels,R., and O'Brien,S.J. (1996). Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273, 1856-1862.
  27. **del Rio Hortega P. and Penfield W.** (1932). Microglia. In *Cytology and Cellular Pathology*, Penfield W., ed. (New York: Hoeber), pp. 481-534.
  28. **Devalaraja,M.N. and Richmond,A.** (1999). Multiple chemotactic factors: fine control or redundancy? *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 151-156.

- 
29. **Dohlman,H.G.**, Thorner,J., Caron,M.G., and Lefkowitz,R.J. (1991). Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 653-688.
  30. **Draheim,H.J.**, Prinz,M., Weber,J.R., Weiser,T., Kettenmann,H., and Hanisch,U.K. (1999). Induction of potassium channels in mouse brain microglia: cells acquire responsiveness to pneumococcal cell wall components during late development. *Neuroscience* 89, 1379-1390.
  31. **Eder,C.** (1998). Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am. J. Physiol* 275, C327-C342.
  32. **Eder,C.** (2005). Regulation of microglial behavior by ion channel activity. *J. Neurosci. Res.* 81, 314-321.
  33. **Eder,C. and Heinemann,U.** (1996). Proton modulation of outward K<sup>+</sup> currents in interferon-gamma-activated microglia. *Neurosci. Lett.* 206, 101-104.
  34. **Ehtesham,M.**, Winston,J.A., Kabos,P., and Thompson,R.C. (2006). CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness. *Oncogene* 25, 2801-2806.
  35. **Engelhardt,B.** (2006). Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J. Neural Transm.* 113, 477-485.
  36. **Farokhi, Ashfin.** Nachweis und Modellierung des Gatingmechanismus beim anomalen TI<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Molfraktionseffekt im Vergleich zu spontanen Stromänderungen in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Lösung. 2002. Dissertation
  37. **Felzien,L.K.**, McDonald,J.T., Gleason,S.M., Berman,N.E., and Klein,R.M. (2001). Increased chemokine gene expression during aging in the murine brain. *Brain Res.* 890, 137-146.
  38. **Fife,B.T.**, Huffnagle,G.B., Kuziel,W.A., and Karpus,W.J. (2000). CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 192, 899-905.
  39. **Flugel,A.**, Labeur,M.S., Grasbon-Frodl,E.M., Kreutzberg,G.W., and Graeber,M.B. (1999). Microglia only weakly present glioma antigen to cytotoxic T cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17, 547-556.

- 
40. **Frei,K.**, Bodmer,S., Schwerdel,C., and Fontana,A. (1986). Astrocyte-derived interleukin 3 as a growth factor for microglia cells and peritoneal macrophages. *J. Immunol.* *137*, 3521-3527.
  41. **Gallin,E.K.** (1991). Ion channels in leukocytes. *Physiol Rev.* *71*, 775-811.
  42. **Gehrmann,J.**, Mies,G., Bonnekoh,P., Banati,R., Iijima,T., Kreutzberg,G.W., and Hossmann,K.A. (1993). Microglial reaction in the rat cerebral cortex induced by cortical spreading depression. *Brain Pathol.* *3*, 11-17.
  43. **Giulian,D. and Baker,T.J.** (1986). Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J. Neurosci.* *6*, 2163-2178.
  44. **Glabinski,A.R.**, Tani,M., Aras,S., Stoler,M.H., Tuohy,V.K., and Ransohoff,R.M. (1995). Regulation and function of central nervous system chemokines. *Int. J. Dev. Neurosci.* *13*, 153-165.
  45. **Glass,R.**, Synowitz,M., Kronenberg,G., Walzlein,J.H., Markovic,D.S., Wang,L.P., Gast,D., Kiwit,J., Kempermann,G., and Kettenmann,H. (2005). Glioblastoma-induced attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival. *J. Neurosci.* *25*, 2637-2646.
  46. **Glees P.** (1955). *Neuroglia.*, C.C.Thomas, ed. (Springfield, IL.).
  47. **Han,Y.**, Wang,J., He,T., and Ransohoff,R.M. (2001). TNF-alpha down-regulates CXCR4 expression in primary murine astrocytes. *Brain Res.* *888*, 1-10.
  48. **Harrison,J.K.**, Jiang,Y., Chen,S., Xia,Y., Maciejewski,D., McNamara,R.K., Streit,W.J., Salafranca,M.N., Adhikari,S., Thompson,D.A., Botti,P., Bacon,K.B., and Feng,L. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 10896-10901.
  49. **Hart,M.N. and Fabry,Z.** (1995). CNS antigen presentation. *Trends Neurosci.* *18*, 475-481.
  50. **Heese,K.**, Hock,C., and Otten,U. (1998). Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *J. Neurochem.* *70*, 699-707.
  51. **Hickey,W.F.**, Hsu,B.L., and Kimura,H. (1991). T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* *28*, 254-260.

- 
52. **Hille,B.** (1984). *Ionic Channels of Excitable Membranes.* Macmillan Education Australia).
  53. **Honda,S.,** Sasaki,Y., Ohsawa,K., Imai,Y., Nakamura,Y., Inoue,K., and Kohsaka,S. (2001). Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J. Neurosci.* *21*, 1975-1982.
  54. **Honeth,G.,** Staffin,K., Kalliomaki,S., Lindvall,M., and Kjellman,C. (2006). Chemokine-directed migration of tumor-inhibitory neural progenitor cells towards an intracranially growing glioma. *Exp. Cell Res.* *312*, 1265-1276.
  55. **Huang,D.R.,** Wang,J., Kivisakk,P., Rollins,B.J., and Ransohoff,R.M. (2001). Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* *193*, 713-726.
  56. **Ilschner,S.,** Ohlemeyer,C., Gimpl,G., and Kettenmann,H. (1995). Modulation of potassium currents in cultured murine microglial cells by receptor activation and intracellular pathways. *Neuroscience* *66*, 983-1000.
  57. **Izikson,L.,** Klein,R.S., Charo,I.F., Weiner,H.L., and Luster,A.D. (2000). Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J. Exp. Med.* *192*, 1075-1080.
  58. **Jayaraman,S. and Verkman,A.S.** (2000). Quenching mechanism of quinolinium-type chloride-sensitive fluorescent indicators. *Biophys. Chem.* *85*, 49-57.
  59. **Jenh,C.H.,** Cox,M.A., Kaminski,H., Zhang,M., Byrnes,H., Fine,J., Lundell,D., Chou,C.C., Narula,S.K., and Zavodny,P.J. (1999). Cutting edge: species specificity of the CC chemokine 6Ckine signaling through the CXC chemokine receptor CXCR3: human 6Ckine is not a ligand for the human or mouse CXCR3 receptors. *J. Immunol.* *162*, 3765-3769.
  60. **Jentsch,T.J.,** Poet,M., Fuhrmann,J.C., and Zdebik,A.A. (2005). Physiological functions of CLC Cl<sup>-</sup> channels gleaned from human genetic disease and mouse models. *Annu. Rev. Physiol* *67*, 779-807.

- 
61. **Jentsch,T.J.**, Stein,V., Weinreich,F., and Zdebik,A.A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev.* 82, 503-568.
  62. **Kandel,E.** (1995). Neurowissenschaften. In Neurowissenschaften, R.Kandel, ed. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg), p. 126.
  63. **Karpus,W.J. and Ransohoff,R.M.** (1998). Chemokine regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: temporal and spatial expression patterns govern disease pathogenesis. *J. Immunol.* 161, 2667-2671.
  64. **Kaur,C.**, Hao,A.J., Wu,C.H., and Ling,E.A. (2001). Origin of microglia. *Microsc. Res. Tech.* 54, 2-9.
  65. **Kaur,C.**, Ling,E.A., and Wong,W.C. (1984). Cytochemical localisation of 5'-nucleotidase in amoeboid microglial cells in postnatal rats. *J. Anat.* 139 ( Pt 1), 1-7.
  66. **Kaur,C.**, Ling,E.A., and Wong,W.C. (1987). Localisation of thiamine pyrophosphatase in the amoeboid microglial cells in the brain of postnatal rats. *J. Anat.* 152, 13-22.
  67. **Kershman J.** (1939). Genesis of microglia in the human brain. *Arch Neurol Psychiatry* 41, 24-50.
  68. **Kettenmann,H.**, Hoppe,D., Gottmann,K., Banati,R., and Kreutzberg,G. (1990). Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. *J. Neurosci. Res.* 26, 278-287.
  69. **Kettenmann,H. and Ilschner,S.** (1993). Physiological properties of microglia. *Clin. Neuropathol.* 12, 306-307.
  70. **Keunecke, M.** Untersuchung des anomalen Molfraktionseffektes an der Grünalge *Chara corallina*. 1995. Universität, Kiel. Ref Type: Thesis/Dissertation
  71. **Kiefer,R.**, Lindholm,D., and Kreutzberg,G.W. (1993). Interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 mRNAs are induced in rat facial nucleus following motoneuron axotomy. *Eur. J. Neurosci.* 5, 775-781.

- 
72. **Kim,S.U. and de Vellis,J.** (2005). Microglia in health and disease. *J. Neurosci. Res.* *81*, 302-313.
  73. **Klee,R.**, Heinemann,U., and Eder,C. (1999). Voltage-gated proton currents in microglia of distinct morphology and functional state. *Neuroscience* *91*, 1415-1424.
  74. **Koncz,C. and Daugirdas,J.T.** (1994). Use of MQAE for measurement of intracellular [Cl<sup>-</sup>] in cultured aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol* *267*, H2114-H2123.
  75. **Kyrozis,A. and Reichling,D.B.** (1995). Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *J. Neurosci. Methods* *57*, 27-35.
  76. **Lahrtz,F.**, Piali,L., Spanaus,K.S., Seebach,J., and Fontana,A. (1998). Chemokines and chemotaxis of leukocytes in infectious meningitis. *J. Neuroimmunol.* *85*, 33-43.
  77. **Lassmann,H.** (1997). Basic mechanisms of brain inflammation. *J. Neural Transm. Suppl* *50*, 183-190.
  78. **Lawson,L.J.**, Perry,V.H., and Gordon,S. (1992). Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* *48*, 405-415.
  79. **Leong,S.K. and Ling,E.A.** (1992). Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* *6*, 39-47.
  80. **Lindstrom,J.**, Anand,R., Peng,X., Gerzanich,V., Wang,F., and Li,Y. (1995). Neuronal nicotinic receptor subtypes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *757*, 100-116.
  81. **Ling,E.A.** (1979). Transformation of monocytes into amoeboid microglia in the corpus callosum of postnatal rats, as shown by labelling monocytes by carbon particles. *J. Anat.* *128*, 847-858.
  82. **Ling,E.A.**, Kaur,C., and Wong,W.C. (1982). Light and electron microscopic demonstration of non-specific esterase in amoeboid microglial cells in the corpus callosum in postnatal rats: a cytochemical link to monocytes. *J. Anat.* *135 (Pt 2)*, 385-394.
  83. **Luster,A.D.** (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* *338*, 436-445.

- 
84. **Ma,Q.**, Jones,D., Borghesani,P.R., Segal,R.A., Nagasawa,T., Kishimoto,T., Bronson,R.T., and Springer,T.A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in C. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95, 9448-9453.
  85. **MacDonald,P.E.**, Salapatek,A.M., and Wheeler,M.B. (2003). Temperature and redox state dependence of native Kv2.1 currents in rat pancreatic beta-cells. J. Physiol 546, 647-653.
  86. **Mahad,D.J.**, Lawry,J., Howell,S.J., and Woodroofe,M.N. (2003). Longitudinal study of chemokine receptor expression on peripheral lymphocytes in multiple sclerosis: CXCR3 upregulation is associated with relapse. Mult. Scler. 9, 189-198.
  87. **Mantovani,A.** (1999a). The chemokine system: redundancy for robust outputs. Immunol. Today 20, 254-257.
  88. **Mantovani,A.** (1999b). The chemokine system: redundancy for robust outputs. Immunol. Today 20, 254-257.
  89. **Maricq,A.V.**, Peterson,A.S., Brake,A.J., Myers,R.M., and Julius,D. (1991). Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. Science 254, 432-437.
  90. **McManus,C.**, Berman,J.W., Brett,F.M., Staunton,H., Farrell,M., and Brosnan,C.F. (1998). MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. J. Neuroimmunol. 86, 20-29.
  91. **Meng,S.Z.**, Oka,A., and Takashima,S. (1999). Developmental expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the human cerebellum and brainstem. Brain Dev. 21, 30-35.
  92. **Merzak,A. and Pilkington,G.J.** (1997). Molecular and cellular pathology of intrinsic brain tumours. Cancer Metastasis Rev. 16, 155-177.
  93. **Miller,R.J. and Meucci,O.** (1999). AIDS and the brain: is there a chemokine connection? Trends Neurosci. 22, 471-479.
  94. **Minghetti,L. and Levi,G.** (1998). Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. Prog. Neurobiol. 54, 99-125.

- 
95. **Moran,L.B. and Graeber,M.B.** (2004). The facial nerve axotomy model. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 44, 154-178.
  96. **Morihata,H.**, Nakamura,F., Tsutada,T., and Kuno,M. (2000). Potentiation of a voltage-gated proton current in acidosis-induced swelling of rat microglia. *J. Neurosci.* 20, 7220-7227.
  97. **Munkonge,F.**, Alton,E.W., Andersson,C., Davidson,H., Dragomir,A., Edelman,A., Farley,R., Hjelte,L., McLachlan,G., Stern,M., and Roomans,G.M. (2004). Measurement of halide efflux from cultured and primary airway epithelial cells using fluorescence indicators. *J. Cyst. Fibros.* 3 Suppl 2, 171-176.
  98. **Murabe,Y. and Sano,Y.** (1983). Morphological studies on neuroglia. VII. Distribution of "brain macrophages" in brains of neonatal and adult rats, as determined by means of immunohistochemistry. *Cell Tissue Res.* 229, 85-95.
  99. **Murphy,P.M.**, Baggiolini,M., Charo,I.F., Hebert,C.A., Horuk,R., Matsushima,K., Miller,L.H., Oppenheim,J.J., and Power,C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 145-176.
  100. **Nimmerjahn,A.**, Kirchhoff,F., and Helmchen,F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-1318.
  101. **Norenberg,W.**, Appel,K., Bauer,J., Gebicke-Haerter,P.J., and Illes,P. (1993). Expression of an outwardly rectifying K<sup>+</sup> channel in rat microglia cultivated on teflon. *Neurosci. Lett.* 160, 69-72.
  102. **Numberger,M. and Draguhn,A.** (1996). Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag)
  103. **Olsen,M.L.**, Schade,S., Lyons,S.A., Amaral,M.D., and Sontheimer,H. (2003). Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells. *J. Neurosci.* 23, 5572-5582.



- 
104. **Owens,D.F.**, Boyce,L.H., Davis,M.B., and Kriegstein,A.R. (1996). Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J. Neurosci.* 16, 6414-6423.
  105. **Pal,R.**, Garzino-Demo,A., Markham,P.D., Burns,J., Brown,M., Gallo,R.C., and DeVico,A.L. (1997). Inhibition of HIV-1 infection by the beta-chemokine MDC. *Science* 278, 695-698.
  106. **Pannasch,U.**, Farber,K., Nolte,C., Blonski,M., Yan,C.S., Messing,A., and Kettenmann,H. (2006). The potassium channels Kv1.5 and Kv1.3 modulate distinct functions of microglia. *Mol. Cell Neurosci.* 33, 401-411.
  107. **Penfield W.** (1932). *Cytology and Cellular Pathology.*, Penfield W., ed. (New York: Hafner).
  108. **Perry,V.H. and Gordon,S.** (1987). Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain. *J. Exp. Med.* 166, 1138-1143.
  109. **Perry,V.H.**, Hume,D.A., and Gordon,S. (1985). Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15, 313-326.
  110. **Petito,C.K.**, Roberts,B., Cantando,J.D., Rabinstein,A., and Duncan,R. (2001). Hippocampal injury and alterations in neuronal chemokine co-receptor expression in patients with AIDS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 377-385.
  111. **Preininger,A.M. and Hamm,H.E.** (2004). G protein signaling: insights from new structures. *Sci. STKE.* 2004, re3.
  112. **Rappert,A.**, Biber,K., Nolte,C., Lipp,M., Schubel,A., Lu,B., Gerard,N.P., Gerard,C., Boddeke,H.W., and Kettenmann,H. (2002). Secondary lymphoid tissue chemokine (CCL21) activates CXCR3 to trigger a Cl<sup>-</sup> current and chemotaxis in murine microglia. *J. Immunol.* 168, 3221-3226.
  113. **Reichling,D.B.**, Kyrozis,A., Wang,J., and MacDermott,A.B. (1994). Mechanisms of GABA and glycine depolarization-induced calcium transients in rat dorsal horn neurons. *J. Physiol* 476, 411-421.

- 
114. **Rempel,S.A.**, Dudas,S., Ge,S., and Gutierrez,J.A. (2000). Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 6, 102-111.
  115. **Richardson,A.**, Hao,C., and Fedoroff,S. (1993). Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia* 7, 25-33.
  116. **Rio-Hortega PD** (1932). Microglia. In *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, (New York: Hafner Publishing Company), pp. 483-553.
  117. **Rollins,B.J.** (1997). Chemokines. *Blood* 90, 909-928.
  118. **Sacchi,O.**, Rossi,M.L., Canella,R., and Fesce,R. (2003). Voltage- and activity-dependent chloride conductance controls the resting status of the intact rat sympathetic neuron. *J. Neurophysiol.* 90, 712-722.
  119. **Sakmann,B.** and Neher,E. (2002). *Single-Channel Recording.*, Springer US, ed., pp. 1-728.
  120. **Sawyer,D.B.**, Koeppe,R.E., and Andersen,O.S. (1989). Induction of conductance heterogeneity in gramicidin channels. *Biochemistry* 28, 6571-6583.
  121. **Schilling, T.** Morphologische, immunphänotypische und elektrophysiologische Eigenschaften deaktivierter muriner Mikroglia in vitro. 21. 2001. Charite Universitätsmedizin Berlin. Dissertation
  122. **Schilling,T.**, Lehmann,F., Ruckert,B., and Eder,C. (2004). Physiological mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced de-ramification of murine microglia. *J. Physiol* 557, 105-120.
  123. **Schilling,T.**, Quandt,F.N., Cherny,V.V., Zhou,W., Heinemann,U., Decoursey,T.E., and Eder,C. (2000). Upregulation of Kv1.3 K(+) channels in microglia deactivated by TGF-beta. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 279, C1123-C1134.
  124. **Schlichter,L.C.**, Sakellaropoulos,G., Ballyk,B., Pennefather,P.S., and Phipps,D.J. (1996). Properties of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels and their involvement in proliferation of rat microglial cells. *Glia* 17, 225-236.

- 
125. **Schmidtmayer, J.**, Jacobsen, C., Miksch, G., and Sievers, J. (1994). Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents. *Glia* 12, 259-267.
  126. **Schwab, A.** (2001). Ion channels and transporters on the move. *News Physiol Sci.* 16, 29-33.
  127. **Schwarze, W. and Kolb, H.A.** (1984). Voltage-dependent kinetics of an anionic channel of large unit conductance in macrophages and myotube membranes. *Pflugers Arch.* 402, 281-291.
  128. **Song, L.**, Seeger, A., and Santos-Sacchi, J. (2005). On membrane motor activity and chloride flux in the outer hair cell: lessons learned from the environmental toxin tributyltin. *Biophys. J.* 88, 2350-2362.
  129. **Soto, H.**, Wang, W., Strieter, R.M., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Hedrick, J., and Zlotnik, A. (1998). The CC chemokine 6Ckine binds the CXC chemokine receptor CXCR3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 8205-8210.
  130. **Srinivas, S.P. and Bonanno, J.A.** (1997). Measurement of changes in cell volume based on fluorescence quenching. *Am. J. Physiol* 272, C1405-C1414.
  131. **Srinivas, S.P.**, Maertens, C., Goon, L.H., Goon, L., Satpathy, M., Yue, B.Y., Droogmans, G., and Nilius, B. (2004). Cell volume response to hyposmotic shock and elevated cAMP in bovine trabecular meshwork cells. *Exp. Eye Res.* 78, 15-26.
  132. **Steiniger, B. and van der Meide, P.H.** (1988). Rat ependyma and microglia cells express class II MHC antigens after intravenous infusion of recombinant gamma interferon. *J. Neuroimmunol.* 19, 111-118.
  133. **Streit, W.J.** (1996). The role of microglia in brain injury. *Neurotoxicology* 17, 671-678.
  134. **Streit, W.J.** (2001). Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology* 22, 619-624.
  135. **Streit, W.J.** (2002). Microglia and the response to brain injury. *Ernst. Schering. Res. Found. Workshop* 11-24.
  136. **Streit, W.J.**, Graeber, M.B., and Kreutzberg, G.W. (1988). Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1, 301-307.

- 
137. **Su,J., Yu,H.,** Lenka,N., Hescheler,J., and Ullrich,S. (2001). The expression and regulation of depolarization-activated K<sup>+</sup> channels in the insulin-secreting cell line INS-1. *Pflugers Arch.* 442, 49-56.
  138. **Tachibana,K.,** Hirota,S., Iizasa,H., Yoshida,H., Kawabata,K., Kataoka,Y., Kitamura,Y., Matsushima,K., Yoshida,N., Nishikawa,S., Kishimoto,T., and Nagasawa,T. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393, 591-594.
  139. **Van Der,M.P.,** Goldberg,S.H., Fung,K.M., Sharer,L.R., Gonzalez-Scarano,F., and Lavi,E. (2001). Expression pattern of CXCR3, CXCR4, and CCR3 chemokine receptors in the developing human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 25-32.
  140. **Vannier,C. and Triller,A.** (1997). Biology of the postsynaptic glycine receptor. *Int. Rev. Cytol.* 176, 201-244.
  141. **Verkman,A.S.** (1990). Development and biological applications of chloride-sensitive fluorescent indicators. *Am. J. Physiol* 259, C375-C388.
  142. **Verkman,A.S.,** Sellers,M.C., Chao,A.C., Leung,T., and Ketcham,R. (1989). Synthesis and characterization of improved chloride-sensitive fluorescent indicators for biological applications. *Anal. Biochem.* 178, 355-361.
  143. **Visentin,S.,** Agresti,C., Patrizio,M., and Levi,G. (1995). Ion channels in rat microglia and their different sensitivity to lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J. Neurosci. Res.* 42, 439-451.
  144. **Waehe,T.,** Damas,J.K., Pedersen,T.M., Gullestad,L., Yndestad,A., Andreassen,A.K., Froland,S.S., Semb,A.G., Hansteen,V., Gjertsen,E., Ueland,T., Brosstad,F., Solum,N.O., and Aukrust,P. (2006). Clopidogrel increases expression of chemokines in peripheral blood mononuclear cells in patients with coronary artery disease: results of a double-blind placebo-controlled study. *J. Thromb. Haemost.* 4, 2140-2147.
  145. **West,M.R. and Molloy,C.R.** (1996). A microplate assay measuring chloride ion channel activity. *Anal. Biochem.* 241, 51-58.

- 
146. **White,H.S.**, Brown,S.D., Woodhead,J.H., Skeen,G.A., and Wolf,H.H. (1997). Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold. *Epilepsy Res.* 28, 167-179.
  147. **Woodroffe,N.**, Cross,A.K., Harkness,K., and Simpson,J.E. (1999). The role of chemokines in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 468, 135-150.
  148. **Wu,C.H.**, Wen,C.Y., Shieh,J.Y., and Ling,E.A. (1994). Down-regulation of membrane glycoprotein in amoeboid microglia transforming into ramified microglia in postnatal rat brain. *J. Neurocytol.* 23, 258-269.
  149. **Xia,M.Q. and Hyman,B.T.** (1999). Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease. *J. Neurovirol.* 5, 32-41.
  150. **Xia,Z.**, Dickens,M., Raingeaud,J., Davis,R.J., and Greenberg,M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.
  151. **Yoshida,R.**, Nagira,M., Kitaura,M., Imagawa,N., Imai,T., and Yoshie,O. (1998). Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J. Biol. Chem.* 273, 7118-7122.
  152. **Zimmermann,N.**, Hershey,G.K., Foster,P.S., and Rothenberg,M.E. (2003). Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 227-242.
  153. **Zou,Y.R.**, Kottmann,A.H., Kuroda,M., Taniuchi,I., and Littman,D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.

## 6. Zusammenfassung

Die Mikrogliazelle stellt eine im Zentralen Nervensystem (ZNS) angesiedelte immunkompetente Zelle dar, welche die Fähigkeit zur Phagozytose und zur Präsentation von Antigenen besitzt. Signalmoleküle, welche zur Aktivierung der Mikroglia führen und deren Auswirkung auf die Zelle sind bis jetzt wenig erforscht. Der CC-Chemokin-Ligand CCL21 scheint als wichtiger Mediator bei dieser Aktivierung zu dienen.

Lokale Stimulation von kultivierten Mikrogliazellen mit CCL21 führte auf Einzelkanalebene zu einer Änderung der Leitfähigkeit, welche für ungefähr 30 Minuten anhielt, auch nachdem CCL21 aus der Badlösung entfernt wurde.

In Einzelkanalmessungen wurden mit Hilfe von Patch-clamp-Experimenten im *cell-attached*-Modus einzelne Ionenkanäle nach CCL21-Stimulation untersucht. Der so charakterisierte Kanal besaß eine Leitfähigkeit von  $9,3 \pm 2,1$  pS und ein kalkuliertes Umkehrpotential von ungefähr 0 mV. In den durchgeführten Experimenten hatte der Kanal fast ausschließlich ein Leitwertniveau im Amplitudenhistogramm.

Zur Bestätigung der elektrophysiologischen Ergebnisse konnte mit Imaging-Experimenten gezeigt werden, dass lokale CCL21-Stimulation zur Änderung der intrazellulären Konzentration von Chloridionen in kultivierten Zellen führt. Diese Änderung konnte mit dem Chlorid-sensitiven Farbstoff *N-[ethoxycarbonylmethyl]-6-methoxy-quinoliniumbromide* (MQAE) dargestellt werden. Weiterhin zeigten Imaging-Experimente an kultivierten Mikrogliazellen erstmals, dass die Änderung der extrazellulären Chloridionenkonzentration einen Einfluss auf die intrazelluläre Chloridionenhomöostase besitzt.

Abschließend kann man zusammenfassen, dass CCL21 die Öffnung eines Chloridkanals in kultivierten Mikrogliazellen auslöst und sich damit die intrazelluläre Chloridionenkonzentration ändert. Man kann davon ausgehen, dass der durch CCL21 ausgelöste Chloridstrom eine Rolle in der Migration der Mikroglia im verletzten Hirn spielt und damit in der Neuron-Mikroglia-Interaktion eine entscheidende Funktion hat.

---

Microglia, one of the glial cell types in the central nervous system (CNS) play an important role as resident immunocompetent and phagocytic cells in case of injury and disease. A candidate for signalling neuronal injury to microglial cells is the CC chemokine ligand CCL21, which is released by damaged neurons. Local application of CCL21 for 30 seconds to cultured microglia triggered a chloride conductance which lasted for 30 minutes even after CCL21 was washed out. Using cell attached patch clamp experiments, the single channel conductance was calculated to be  $9.3 \pm 2.1$  pS and the reversal potential was around 0 mV, which is typical for chloride channel activity. The channel normally showed one conductance level in the amplitude histogram.

To confirm the electrophysiological data, imaging experiments were established, which revealed that local CCL21 stimulation results in chloride influx into the cytoplasm of cultured microglia. These changes were detected by the fluorescent chloride sensitive dye N-[ethoxycarbonylmethyl]-6-methoxy-quinoliniumbromide (MQAE). Furthermore, it was demonstrated for the first time that intracellular chloride concentration can be changed by varying the extracellular chloride concentration.

In conclusion, CCL21 evokes opening of a chloride channel in cultured microglia and leads to altered intracellular chloride concentrations. This mechanism may be involved in microglial migration towards sites of injury in the brain and seems to be crucial for the neuron-microglial signalling system.

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungen

ACM	Astrozyten-konditioniertes Medium
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropion-Säure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Kälberserum
ca	circa
C3a	Komplement 3a
C5a	Komplement 5a
CCL	CC Chemokin Ligand
CCR	CC Chemokin Rezeptor
CXCL	CXC Chemokin Ligand
CXCR	CXC Chemokin Rezeptor
DIDS	4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Autoimmun-Encephalomyelitis
ECL	Entorhinale Kortexläsion
FKS	Fötales Kälberserum
GABA	Gamma Amino Buttersäure
GDP	Guanodindiphosphat
G-Protein	GTP- bindendes Protein
GTP	Guanosin-triphosphat
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
i.e.	<i>id est</i>
IL	Interleukin
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex



---

MQAE	N-[ethoxycarbonylmethyl]-6-methoxy-quinolinium bromide
mRNS	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub>	Nitrit
pH	<i>potentia hydrogenium</i>
POD	Peroxidase
SPQ	[6-methoxy-N-(3-sulfopropyl)quinolinium
SITS	4-acetamido-4'-isothiocyantostilbene-2,2'-disulfonic acid"
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
X	beliebige Aminosäure in der Chemokinsequenz
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7.2. Symbole und Einheiten\*

I	Strom [Ampere]
I	Strom durch einen einzelnen Ionenkanal [Ampere]
R	Widerstand [ $\Omega$ ]
1/R	Reziproker Wert von $i/V_m$ entspricht der Leitfähigkeit oder <i>conductance</i> [Siemens]
$V_m$	Elektrisches Potential über der Membran [Volt]
$V_h$	Haltepotential (Haltespannung) [Volt]
$V_s$	Sprungpotential (Sprungspannung) [Volt]
Q	Ladung [Coulomb]

\*Wenn nicht anders angegeben handelt es sich um SI-Einheiten

### **7.3. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Helmut Kettenmann dafür, dass ich am Max-Delbrück-Zentrum in der Arbeitsgruppe „Zelluläre Neurowissenschaften“ eine Arbeit unter professionellen und hervorragenden Arbeitsbedingungen durchführen konnte. Das Wissen, die Erfahrungen und die Eindrücke, die ich in dieser Zeit gesammelt habe, werden mich mein Leben lang begleiten.

Für die technische Unterstützung danke ich besonders Irene Haupt und Christiane Gras für die Hilfe bei Arbeiten in der Zellkultur und Horst Kagelmaker bei der Lösung von Problemen mechanischer, technischer oder elektrophysikalischer Natur.

Weiterhin möchte ich meinen lieben Kollegen und Freunden Dr. Katrin Färber, Dr. Daniel Reyes-Haro, Dr. Carola Schipke, Dr. Ulrike Pannasch, Giselle Cheung, Dr. Antje Heidemann, Dr. Darko Markovic, Jochen Müller, Dr. Liping Wang, Dr. Brigitte Haas, Yves Bayer, Johannes Fritsch, David Strehober, Gunther Knauthe, Britta Pieper und Phillip Wegehaupt für die Aufmunterung und Hilfe bei wissenschaftlichen aber auch weniger wissenschaftlichen Problemen danken. Dem Graduiertenkolleg 238 danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Die wichtigste Stütze und Motivation aber waren mir Joo-Hee Wälzlein und meine Eltern Beate und Reinhard Kiesewetter, ohne Eure Ermutigungen, Aufmunterungen und Tröstungen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

#### **7.4. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

### **7.5. Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Hannes Kieseewetter, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Einzelkanalmessungen zur Charakterisierung eines CCL21-abhängigen Chloridkanals auf Mikrogliazellen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den

---

Hannes Kieseewetter