Ionenkanäle in deaktivierter Mikroglia

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
Physiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. Claudia Eder
geboren am 23.9.1965 in Leipzig

Präsident: Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer
Dekan: Prof. Dr. med.Dr. h.c. R. Felix

Eingereicht am: 28.04.2000
Datum der Habilitation: 10.04.2001

Gutachter:
1. Prof. Dr. G. Pfitzer
2. Prof. Dr. D. Swandulla

Inhalt

1.	Einleitung	3
2.	Eigene Untersuchungen	5
2.1	Morphologische und immunologische Eigenschaften ACM-behandelter kultivierter Mikrogliazellen	7
2.2	Einwärtsgleichrichtende K^+-Ströme	9
2.3	Ca^{2+}-aktivierte K^+-Ströme	13
2.4	Auswärtsgleichrichtende K^+-Ströme	17
2.5	Dehnungsaktivierte Cl^--Ströme	23
2.6	Spannungsaktivierte H^+-Ströme	29
3.	Schlußfolgerungen	34
4.	Literatur	35
5.	Eigene Veröffentlichungen im Original	43
6.	Lebenslauf	44
7.	Erklärung	45

1. Einleitung

Als Mikroglia wird eine Population von Makrophagen bezeichnet, die ausschließlich im Gehirn vorkommt. Mikrogliazellen exprimieren die gleichen Oberflächenantigene und können die gleichen Funktionen ausüben wie Makrophagen aus peripherem Gewebe. Sie sind in der Lage zu phagozytieren, Antigen zu präsentieren oder verschiedene Zytokine und zytotoxische Stoffe freizusetzen (Barron, 1995; Benveniste, 1995; Giulian & Corpuz, 1993; Wekerle, 1995). Mikrogliazellen können eine bedeutende Rolle sowohl im gesunden als auch im pathologischen Hirn spielen, wobei sie neurotrophische, aber auch neurotoxische Eigenschaften besitzen können. Bestimmte Zytokine werden von Mikrogliazellen produziert, die das Überleben von Neuronen begünstigen. Dazu gehören zum Beispiel der Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor; NGF), der Hauptfibroblastenwachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor; BFGF) und der transformierende Wachstumsfaktor (transforming growth factor; TGF). Im aktivierten Zustand können Mikrogliazellen aber auch eine Reihe toxischer Substanzen sezernieren, die das Absterben neuronaler Zellen begünstigen. So zum Beispiel können die während des respiratorischen Bursts der Mikrogliazellen entstehenden freien Sauerstoffradikale eine schädigende Wirkung auf Neurone ausüben (Kreutzberg, 1996; Moore & Thanos, 1996; Streit, 1996).

Während der frühen postnatalen Entwicklung des zentralen Nervensystems zeigen Mikrogliazellen eine amöboide Morphologie und sind hauptsächlich verantwortlich, zelluläre Bestandteile zu phagozytieren, die aufgrund spontaner Degeneration und Remodellierung von Nervenfasern entstehen (Ling & Wong, 1993; Moore & Thanos, 1996). Es wird angenommen, daß sich die amöboiden Mikrogliazellen aus Monozyten bzw. anderen Vorläuferzellen mesodermalen Ursprungs entwickeln, welche während der späten pränatalen sowie der frühen postnatalen Entwicklungsphase in das Gehirn einwandern, da zu diesem Zeitpunkt die Blut-Hirn-Schranke noch nicht vollständig ausgeprägt ist. Etwa mit Beginn der dritten postnatalen Woche reifen die Mikrogliazellen vollständig aus und nehmen eine ramifizierte Morphologie an (Ling & Wong, 1993).

Die im adulten Hirn auftretenden ramifizierten Mikrogliazellen befinden sich in einem ruhenden Zustand (Kreutzberg, 1996; Streit, 1996). Diese ruhende Mikroglia kann jedoch während verschiedener pathologischer Ereignisse des Gehirns aktiviert werden. Die Überführung der ramifizierten ruhenden Mikroglia in das aktivierte Stadium ist durch Proliferation und verschiedene immunphänotypische und morphologische Veränderungen der Zellen gekennzeichnet. Charakteristisch für aktivierte Mikroglia ist die Hochregulation von MHC-Molekülen und die verstärkte Expression von verschiedenen Makrophagenoberflächenantigenen. Die aktivierten Mikrogliazellen nehmen eine amöboide Morphologie an, gleichzeitig kommt es zu einer Hypertrophie der Zellen. Außerdem werden aktivierte Mikrogliazellen phagozytotisch aktiv und sezernieren verschiedene zytotoxische Substanzen wie zum Beispiel freie Sauerstoffradikale, Stickoxid, Proteasen, Arachidonsäure-Derivate und Zytokine (Giulian, 1995; Kreutzberg, 1996; Streit, 1996; Zielasek & Hartung, 1996). Die Aktivierung von Mikrogliazellen wurde bei Infektion, Entzündung, Trauma, Ischämie und bei einer Reihe von neurologischen Erkrankungen wie der Alzheimerschen Krankheit, der Parkinsonschen Krankheit, der amyotrophen Lateralsklerose, der Multiplen Sklerose und der Prionenkrankheit (Barron, 1995; Brown & Kretzschmar, 1997; Giulian, 1995; Kreutzberg, 1996; McRae et al., 1997; Moore & Thanos, 1996; Streit, 1996) beobachtet.

Bisher wurden die meisten Untersuchungen an Mikrogliazellen mit Hilfe verschiedener histochemischer Färbetechniken durchgeführt, um die morphologischen und phänotypischen Veränderungen der Zellen während ihrer Entwicklung sowie während verschiedener Erkrankungen des Gehirns zu visualisieren. Erst seit kurzer Zeit wurde begonnen, auch die physiologischen Eigenschaften der Mikrogliazellen zu untersuchen. Seit der ersten Beschreibung von Ionenströmen in Mikrogliazellen im Jahr 1990 (Kettenmann et al., 1990) wurde eine Vielfalt von verschiedenen Ionenkanälen an Mikrogliazellen identifiziert. Die meisten Patch-clamp-Messungen wurden an kultivierten Zellen oder an Zellinien durchgeführt. Erst durch die Etablierung von Zellkulturen wurden Studien an isolierten Mikrogliazellen ermöglicht. Bisher wurde herausgefunden, daß Mikrogliazellen in der Lage sind, Ionenkanäle zu exprimieren, die selektiv K^+, H^+, Na^+, Ca^{2+} oder Cl^- leiten. Der Expressionsgrad

der verschiedenen Ionenkanäle scheint dabei von dem jeweiligen funktionellen Zustand der Mikrogliazellen abhängig zu sein (zur Übersicht, siehe Eder, 1998 (Ref. #9)).

Die Mehrzahl der bisher durchgeführten Arbeiten beschäftigte sich mit der Charakterisierung von Ionenströmen in unstimulierten oder Zytokin- bzw. Lipopolysaccharid-aktivierten Mikrogliazellen. Da unstimulierte kultivierte Mikrogliazellen bereits in einer teilweise aktivierten Form vorliegen, die durch die amöboide Zellmorphologie, die Expression bestimmter Makrophagen-Oberflächenantigene und die phagozytotische Aktivität der Zellen charakterisiert ist, wurde es notwendig, eine Methode zu entwickeln, die es erlaubt, isolierte deaktivierte Mikroglia zu untersuchen.

In den hier dargestellten Arbeiten wird gezeigt, daß die Deaktivierung von Mikrogliazellen durch die Zugabe von Astrozyten-konditioniertem Medium (ACM) ausgelöst werden kann. Die verschiedenen Ionenkanäle der deaktivierten kultivierten Mikrogliazellen wurden detailliert charakterisiert. Es wurde weiterhin untersucht, welche Faktoren den Expressionsgrad bestimmter Ionenkanäle während des Deaktivierungsprozesses der Zellen regulieren. Es wurde außerdem der Frage nachgegangen, welche Funktionen die Ionenkanäle der Mikrogliazellen ausüben können.

2. Eigene Untersuchungen

Die Messungen der Ionenströme der Mikrogliazellen erfolgte mit Hilfe der Patch-clamp-Technik in der Ganzzellkonfiguration (Hamill et al., 1981). Das Ruhemembranpotential der Zellen wurde im Current-clamp-Modus bestimmt, während die Messungen der Ionenströme im Voltage-clamp-Modus durchgeführt wurden.

Alle Messungen erfolgten bei Zimmertemperatur (20-23°C). Ein Teil der Ganzzellmessungen wurde mit Hilfe eines EPC-9 Verstärkers durchgeführt. Der EPC-9 Verstärker wurde über einen ATARI Mega STE oder einen IBM-Computer gesteuert. Die Meßdaten wurden on-line digitalisiert und nachfolgend mit dem Programm REVIEW (Instrutech, Mineola, USA) oder dem Programm Pulse/PulseFit (HEKA, Lambrecht/Pfalz) analysiert. In anderen Experimenten

wurde ein EPC-7 Verstärker verwendet, der mit einem CED 1401 Interface verbunden wurde. Diese Daten wurden mit Hilfe der Software VCLAMP 6.0 (CED, Cambridge, Grossbritanien) aufgezeichnet und auf einem IBM-Computer abgelegt und anschließend mit der Software VCLAMP 6.0 ausgewertet.

In der Mehrheit der Messungen wurden Patchpipetten aus Borosilikatglasröhrchen (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) mit einem Innendurchmesser von 1-2 μm (entspricht 2-4 MegaOhm) verwendet. Die Patchelektroden wurden entweder mit einem vertikalen (Narishige PP-83; Tokio, Japan) oder einem horizontalen Elektrodenziehgerät (Sutter P87; Sutter Instruments Co, USA) angefertigt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Elektroden unmittelbar vor den Messungen feuerpoliert.

Zur genaueren Charakterisierung der Ionenströme der Mikrogliazellen wurde die Wirkung verschiedener Pharmaka untersucht. Diese Pharmaka wurden extrazellulär über eine Superfusionspipette appliziert, die mit Hilfe eines zweiten Mikromanipulators unmittelbar nach der Etablierung der Ganzzellkonfiguration in einer Entfernung von 30-50 μm zur untersuchten Zelle positioniert wurde. Somit wurde ein rascher Lösungswechsel der die Zelle umgebenden Badlösung gewährleistet. Die Fließgeschwindigkeit der über die Superfusionspipette applizierten Lösungen wurde über den hydrostatischen Druck reguliert.

Alle Messungen wurden an kultivierten Mikrogliazellen durchgeführt, die aus dem Kortex postnataler Mäuse stammten. Die Entwicklung einer Methode zur Kultivierung von Mikrogliazellen (Frei et al., 1987) ermöglichte, diese Zellen über einen längeren Zeitraum im isolierten Zustand zu untersuchen. Zunächst wurden primäre Gehirnzellkulturen von neonatalen NMRI Mäusen der Altersstufen P1-P4 nach der von Frei und Mitarbeitern (1987) beschriebenen Methode kultiviert. Als exogener Wachstumsfaktor wurde der Makrophagen-koloniestimulierende Faktor (macrophage colony-stimulating factor; M-CSF) verwendet. Nach etwa 10-14-tägiger Kultivierung wurden die Mikrogliazellen von dem Astrozytenrasen abgelöst und anschließend in Sekundärkultur gebracht. Dazu wurden die aus der Primärkultur gewonnenen Zellen in 48-well-Platten zu jeweils $3x10^4$ Zellen auf Glasplättchen kultiviert.

Astrozytenkulturen wurden nach der von Hertz und Mitarbeitern (1982) beschriebenen Methode hergestellt. Die Kulturüberstände dieser Astrozytenkulturen wurden gesammelt und als Astrozyten-konditioniertes Medium zur Induzierung der Deaktivierung von Mikrogliazellen verwendet.

Die quantitative Analyse des Ramifikationsgrades der Mikrogliazellen sowie die Bestimmungen der Färbeintensitäten der Mikrogliazellen für das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (intercellular adhesion molecule-1; ICAM-1), das leukozytenfunktionsassoziierte Antigen-1 (leukocyte function-associated anigen-1; LFA-1) und Haupthistokompatibilitäts-Moleküle (major histocompatibility complex; MHC) der Klasse II erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit Professor Robert Nitsch im Institut für Anatomie der Charité Berlin. Die Bestimmungen des mRNA Niveaus der verschiedenen spannungsaktivierten K^+ Kanäle wurden im Rahmen einer Kooperation mit Professor Thomas E. DeCoursey und Professor Fred N. Quandt am Department of Molecular Biophysics and Physiology des Rush Medical Center Chicago durchgeführt.

2.1 Morphologische und immunologische Eigenschaften ACM-behandelter kultivierter Mikrogliazellen

Die Behandlung von kultivierten Mikrogliazellen mit Astrozyten-konditioniertem Medium (ACM) führte zu Veränderungen der morphologischen, immunphänotypischen und elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen (Eder et al., 1997a (Ref. # 1), 1999 (Ref. #2)). In Sekundärkultur wiesen frisch ausplattierte Mikrogliazellen der Maus hauptsächlich eine amöboide Morphologie auf. Diese Zellen hatten runde, ovale oder längliche Zellkörper, wobei einige Zellen kurze unverzweigte Ausläufer oder Lamellopodien besaßen. Die meisten Zellen bildeten jedoch keine Fortläufer aus (Abb. 1A). Wurden die Mikrogliazellen unbehandelt über längere Zeit kultiviert, behielten sie ihre amöboide Morphologie bei. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, daß keine morphologischen Unterschiede zwischen Zellen gefunden wurden, denen entweder M-CSF oder Granulozyten/ Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF) als

Wachstumsfaktor in den primären Gehirnzellkulturen beigefügt worden war (Fischer et al., 1995). Die Analyse der immunologischen Eigenschaften zeigte jedoch, daß sich M-CSF- und GM-CSF-behandelte Mikrogliazellen deutlich hinsichtlich ihres funktionellen Zustandes unterschieden. Wurden die Zellen während ihrer Differenzierung mit GM-CSF behandelt, so entwickelten sich immunologisch voll aktivierte Mikrogliazellen, die in der Lage waren, Antigen an ihrer Oberfläche zu präsentieren. Im Gegensatz dazu waren die mit Hilfe von M-CSF gereiften Mikrogliazellen nicht zur Antigenpräsentation fähig (Fischer et al., 1995). Dennoch kann man nicht davon ausgehen, daß sich die mit Hilfe von M-CSF gereiften Mikrogliazellen in einem immunologischen Ruhezustand befinden, denn diese Zellen exprimierten an ihrer Oberfläche eine Reihe von Makrophagen-Oberflächenantigenen und besaßen eine amöboide Morphologie (Eder et al., 1999 (Ref. #2)).

Kultivierte Mikrogliazellen konnten rasch von der amöboiden in die ramifizierte Morphologie überführt werden, wenn sie ACM ausgesetzt wurden (Eder et al., 1997a (Ref. #1), 1999 (Ref. #2)). Bereits innerhalb von ein bis zwei Stunden nach der Applikation des ACM beginnen Mikrogliazellen, erste Ausläufer mit großen flachen Lamellopodien in verschiedene Richtungen auszubilden. Behandelte man Mikrogliazellen über einen längeren Zeitraum mit ACM, so nahmen die gebildeten Ausläufer an Länge zu und verzweigten sich distal. Einige Ausläufer konnten eine Länge von über 100 μm erreichen (Abb. 1B). Die ramifizierte Morphologie der Mikrogliazellen konnte beobachtet werden, solange das Kulturmedium mehr als 25% ACM enthielt. Wurde das ACM-haltige Kulturmedium durch ACM-freies Medium ersetzt, so bildeten sich die Ausläufer der Mikrogliazellen zurück und die Zellen gingen erneut in den amöboiden Zustand über. Isolierte ramifizierte Mikrogliazellen konnten im ACM-haltigen Medium bis zu vier Wochen kultiviert werden.

Nach der Behandlung mit ACM wurden neben den morphologischen Veränderungen auch Änderungen des Expressionsgrades verschiedener Oberflächenantigene an den Mikrogliazellen beobachtet (Eder et al., 1999 (Ref. #2)). Mit Hilfe immunzytochemischer Methoden wurden Antikörperfärbungen gegen die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-1 sowie gegen MHC-Klasse II - Moleküle durchgeführt. Die unbehandelten amöboiden Mikrogliazellen zeigten

intensive Färbungen für ICAM-1, LFA-1 und MHC-Klasse II - Moleküle. Wurden die Mikrogliazellen in ACM kultiviert, so wurde eine deutliche Verringerung der Färbeintensitäten für alle Makrophagen-Oberflächenantigene beobachtet, d.h. es kam zu einer Deaktivierung der Mikrogliazellen. Am geringsten wurden die Mikrogliazellen gefärbt, die täglich über einen Zeitraum von fünf Tagen mit ACM kultiviert worden waren. Im Vergleich mit den unbehandelten amöboiden Mikrogliazellen wurde in den ACM-behandelten Mikrogliazellen die Expression von ICAM-1 als auch von LFA-1 Molekülen um etwa 50% reduziert. Die quantitative Auswertung der Färbeintensitäten der MHC-Klasse II - Moleküle ergab ebenfalls eine signifikante Herunterregulation dieser Moleküle in ACM-behandelter Mikroglia.

In einigen Arbeiten wurde die Hypothese geäußert, daß bestimmte extrazelluläre Matrixbestandteile von Astrozyten notwendig sind, um Mikrogliazellen von ihrer amöboiden in die ramifizierte Morphologie zu überführen, da Mikrogliazellen, die auf einem Astrozytenrasen kultiviert wurden, die ramifizierte Morphologie nach einigen Tagen annahmen (Liu et al., 1994; Sievers et al., 1994a,b; Tanaka & Maeda, 1996). Die hier dargestellten Untersuchungen beweisen, daß kein direkter Kontakt der Mikrogliazellen mit Astrozytenmembranen für das Auslösen der Deaktivierung von Mikroglia notwendig ist, sondern daß lösliche astrozytäre Faktoren sowohl die Ramifizierung als auch die Herunterregulation von Oberflächenantigenen der Mikrogliazellen induzieren.

Diese Ergebnisse zeigen außerdem, daß eine generelle Korrelation zwischen den morphologischen und immunphänotypischen Veränderungen der Mikrogliazellen nach ACM-Behandlung besteht: Je stärker die Mikrogliazellen ramifizieren, desto geringer ist die Expression der Oberflächenantigene. Es konnte somit ein Modell für isolierte deaktivierte Mikroglia geschaffen werden.

2.2 Einwärtsgleichrichtende K^+-Ströme

Einwärtsgleichrichtende K^+ Ströme in Mikrogliazellen wurden erstmalig im Jahr 1990 von Kettenmann und Mitarbeitern (Kettenmann et al., 1990) nachgewiesen. Die durch Membranhyperpolarisation auslösbaren Ströme wurden in kultivierten

Mikrogliazellen der Ratte, der Maus, des Rindes und des Menschen beschrieben. Sie wurden auch in der Mikrogliazelllinie BV-2 und in Mikroglia während in situ Messungen in Schnittpräparaten des Corpus callosum beobachtet (zur Übersicht siehe Eder, 1998 (Ref. #9)).

Ausgeprägte einwärtsgleichrichtende K^+ Ströme konnten in nahezu allen unstimulierten Mikrogliazellen ausgelöst werden. Die Aktivierung der Mikrogliazellen scheint dagegen mit einer Herunterregulation der einwärtsgleichrichtenden K^+ Kanäle verbunden zu sein. So wurden diese Kanäle nicht in den zur Antigenpräsentation fähigen Mikrogliazellen exprimiert, die entweder mit GM-CSF kultiviert oder mit IFN-γ stimuliert worden waren (Fischer et al., 1995). Eine signifikante Reduktion der Stromdichte der Einwärtsgleichrichter wurde auch nach Aktivierung der Mikroglia mit dem bakteriellen Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) beobachtet (Nörenberg et al., 1994a; Draheim et al., 1999).

Deaktivierte Mikrogliazellen, die entweder mit ACM oder mit dem deaktivierenden Zytokin transformierender Wachstumsfaktor-β (transforming growth factor-β; TGF-β) behandelt worden waren, exprimierten einwärtsgleichrichtende K^+ Kanäle (Eder et al., 1997a (Ref. #1), 1999 (Ref. #2); Schilling et al., 2000 (Ref. #3)). Der prozentuale Anteil der diesen Strom generierenden Mikrogliazellen änderte sich im Verlauf des Deaktivierungsprozesses der Mikroglia nicht, d.h. in nahezu allen Zellen war der Strom nachweisbar. Im Vergleich mit den unbehandelten Zellen blieb nach der Deaktivierung der Mikrogliazellen auch die Stromdichte der einwärtsgleichrichtenden K^+ Ströme unverändert.

Da es dennoch nicht auszuschließen war, daß nach der Behandlung mit ACM oder TGF-β sich die Eigenschaften der einwärtsgleichrichtenden K^+ Ströme ändern oder andere Ionenkanäle in die Membran der Mikrogliazellen eingebaut werden, wurden die einwärtsgleichrichtenden K^+ Ströme der deaktivierten Mikrogliazellen detailliert charakterisiert (Eder et al., 1999 (Ref. #2); Schilling et al., 2000 (Ref. #3)). Die Öffnungswahrscheinlichkeit der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle der deaktivierten Mikrogliazellen erhöhte sich mit zunehmender Membranhyperpolarisation. Im Gegensatz dazu waren die Kanäle bei

Depolarisation geschlossen. Die einwärtsgleichrichtenden K^+ Kanäle waren stark von der jeweiligen extrazellulären Kaliumkonzentration ($[K^+]_o$) abhängig, wobei eine Erhöhung von ($[K^+]_o$) das Umkehrpotential der Ströme zu positiveren Potentialen verschob. In Einzelkanaluntersuchungen wurde eine Einzelkanalleitfähigkeit von 25-30 pS ermittelt. Der einwärtsgleichrichtende K^+ Strom der deaktivierten Mikrogliazellen zeigte kein zeitliches Inaktivierungsverhalten. Der mit normalen Ringer-Lösungen (130 mM Na^+; 5 mM K^+) bei starker Zellhyperpolarisation zu beobachtende zeitliche Stromabfall trat nicht in Messungen mit extrazellulärer Kalium-Ringer-Lösung (0 mM Na^+; 135 mM K^+) oder nach Substitution von extrazellulären Na^+ durch NMG^+ auf und läßt sich somit durch eine zeit- und spannungsabhängige Inhibition der Kanäle durch extrazelluläre Natriumionen erklären.

Die Charakterisierung der einwärtsgleichrichtenden K^+ Kanäle amöboider Mikrogliazellen hatte ergeben, daß diese Kanäle eine hohe Sensitivität gegenüber extrazellulären Bariumionen aufzeigten (Eder et al., 1995a). Die K^+ Einwärtsströme der deaktivierten Mikrogliazellen wurden durch mikromolare Konzentrationen von Ba^{2+} in einer spannungs- und zeitabhängigen Weise inhibiert und waren in der Gegenwart von 1 mM Ba^{2+} vollständig blockiert. Damit unterschieden sie sich nicht in ihrer Bariumsensitivität von den entsprechenden Strömen der amöboiden Mikrogliazellen (Eder et al., 1995a).

Da alle Eigenschaften der einwärtsgleichrichtenden Kaliumströme in deaktivierten Mikrogliazellen der Maus auf die Expression von Kir2.1 Kanälen hinwiesen (Kubo et al., 1993), wurde getestet, ob mRNA der Kir2.1 Kanäle in deaktivierter Mikroglia nachgewiesen werden kann. Die Existenz von Kir2.1 mRNA konnte mit Hilfe der RT-PCR Methode an TGF-β behandelten Mikrogliazellen gezeigt werden (Schilling et al., 2000 (Ref. #3)).

In der Mikrogliazelllinie MLS-9 wurden HERG-ähnliche K^+ Ströme gemessen, die bei Membranhyperpolarisation aktivierten (Zhou et al., 1998). Im Gegensatz zu den einwärtsgleichrichtenden K^+ Kanälen zeigten die HERG-Kanäle ein ausgeprägtes zeitliches Inaktivierungsverhalten in Messungen mit Kalium-Ringer-Lösung. Zusätzlich wiesen die HERG-ähnlichen K^+ Kanäle der MLS-9 Zellen eine viel geringere Bariumsensitivität auf als die einwärtsgleichrichtenden Kir2.1 K^+ Kanäle. Selbst bei einer Konzentration von 10

mM Ba^{2+} konnten die HERG-ähnlichen Ströme der MLS-9 Zellen nicht vollständig inhibiert werden (Zhou et al., 1998). Damit wird unwahrscheinlich, daß in deaktivierter Mikroglia HERG-ähnliche K^+-Kanale exprimiert wurden.

In kultivierten Mikrogliazellen der Ratte wurde ROMK-1 mRNA nachgewiesen (Küst et al., 1999). Deshalb stellte sich die Frage, ob deaktivierte Mikroglia der Maus ROMK-1 Kanäle exprimieren. Da δ-Dendrotoxin, ein spezifischer Inhibitor der ROMK-1 Kanäle (Imredy et al., 1998), keinen Einfluß auf die hier untersuchten Mausmikrogliazellen hatte, ist zu schlußfolgern, daß funktionelle ROMK-1 Kaliumkanäle nicht in der Zellmembran deaktivierter Mikrogliazellen in vorhanden sind.

Aus den vorliegenden Untersuchungen kann zusammenfassend geschlossen werden, daß in deaktivierten Mikrogliazellen einwärtsgleichrichtende K^+ Kanäle nachgewiesen werden können, die durch Kir2.1 mRNA kodiert sind. Die einwärtsgleichrichtenden K^+ Ströme der deaktivierten Mikrogliazellen unterschieden sich in ihrer Stromdichte, Einzelkanalleitfähigkeit, Kinetik und Sensitivität gegenüber extrazellulär applizierten Bariumionen nicht von den in amöboiden Mikrogliazellen der Maus gemessenen Strömen. Damit scheint der Deaktivierungsprozeß der Mikrogliazellen sich weder auf den Expressionsgrad noch auf die Eigenschaften der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle der Mikrogliazellen auszuwirken.

Die funktionelle Bedeutung der einwärtsgleichrichtenden K^+ Kanäle in deaktivierten Mikrogliazellen ist bisher noch wenig untersucht. In Mikroglia und anderen Makrophagen sind die einwärtsgleichrichtenden K^+ Kanäle an der Einstellung eines negativen Ruhemembranpotentials der Zellen beteiligt. Es konnte gezeigt werden, daß eine Inhibition der Kanäle durch extrazelluläre Bariumionen eine Membrandepolarisation auslöst (Gallin & Sheehy, 1985; Visentin et al., 1995; Chung et al., 1999). In den mit GM-CSF oder IFN-γ aktivierten Mikrogliazellen, die keine einwärtsgleichrichtenden K^+ Kanäle exprimierten, wurden signifikant positivere Ruhemembranpotentiale ermittelt als in den unstimulierten Mikrogliazellen, in denen typischerweise große einwärtsgleichrichtende Ströme gemessen wurden (Fischer et al., 1995). Die mit ACM oder TGF-β behandelten deaktivierten Mikrogliazellen wiesen im Vergleich

zu den unstimulierten Mikrogliazellen keine Unterschiede in der mittleren Stromdichte der Einwärtsgleichrichter auf. Dementsprechend wurden auch keine Unterschiede im mittleren Ruhemembranpotential zwischen den unstimulierten und deaktivierten Mikrogliapopulationen festgestellt (Eder et al., 1999 (Ref. #2); Schilling et al., 2000 (Ref. #3)).

Funktionelle einwärtsgleichrichtende K^+ Kanäle sind möglicherweise auch für die Proliferation der Mikrogliazellen von Bedeutung. Eine verminderte Proliferationsrate der mit M-CSF stimulierten Mikrogliazellen wurde in Anwesenheit von extrazellulären Bariumionen beobachtet (Schlichter et al., 1996). Allerdings wurde in diesen Experimenten Ba^{2+} in einer relativ hohen Konzentration appliziert, sodaß ein zusätzlicher unspezifischer Effekt von Bariumionen auf andere Ionenkanäle oder Transporter nicht ausgeschlossen werden kann.

2.3 Ca^{2+}-aktivierte K^+-Ströme

In einer weiteren Studie wurde untersucht, ob und welche Ca^{2+}-aktivierten Kaliumkanäle in deaktivierten Mikrogliazellen der Maus exprimiert werden (Eder et al., 1997b (Ref. #4)). Ein erster Hinweis auf die Existenz von Ca^{2+}-aktivierten K^+ Kanälen ließ sich aus Messungen des Ruhemembranpotentials der Mikrogliazellen ableiten. Wurde die nominal freie Ca^{2+}-Konzentration der intrazellulären Lösung ($[Ca^{2+}]_i$) auf einen Wert von 10 nM gepuffert, so betrug das mittlere Ruhemembranpotential der Mikrogliazellen -58 mV. Für Messungen mit intrazellulären Lösungen, in denen $[Ca^{2+}]_i$ 1 µM betrug, wurde ein mittleres Ruhemembranpotential von -74 mV ermittelt. Da sich das Ruhemembranpotential der Mikrogliazellen aufgrund der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration in Richtung des Kaliumumkehrpotentials verschob, konnte bereits angenommen werden, daß eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ die Aktivierung von Ca^{2+}-aktivierten K^+ Strömen zur Folge hatte.

Im Anschluß an die Bestimmung des Ruhemembranpotentials wurden die Ca^{2+}-aktivierten K^+ Ströme der Zellen im Voltage-clamp-Modus analysiert. Eine Erhöhung der intrazellulären nominal freien Ca^{2+}-Konzentration von 10 nM auf 1 µM bewirkte die Aktivierung eines schnell aktivierenden aber nicht

inaktivierenden Stroms. Dieser Ca^{2+}-aktivierte Strom konnte bei allen Testpotentialen nachgewiesen werden und zeigte keine Spannungsabhängigkeit.

Zur Bestimmung der Selektivität der Ca^{2+}-aktivierten Ströme für Kaliumionen wurde das Umkehrpotential der ausgelösten Ströme bestimmt, während die extrazelluläre Konzentration der Kaliumionen ($[K^+]_o$) auf verschiedende Werte eingestellt wurde. Eine Erhöhung der extrazellulären K^+-Konzentration führte zu einer Verschiebung des Umkehrpotentials der Ca^{2+}-aktivierten Ströme in depolarisierende Richtung. Eine zehnfache Erhöhung von $[K^+]_o$ bewirkte eine Verschiebung des Umkehrpotentials der Ca^{2+}-aktivierten Ströme um 51 mV. Die relativ gute Übereinstimmung dieses Wertes mit dem aus der Nernst-Gleichung errechneten Wert beweist, daß der Ca^{2+}-aktivierte Strom der deaktivierter Mausmikrogliazellen fast ausschließlich von Kaliumionen getragen wurde.

Verschiedene Peptidtoxine erwiesen sich als effektive Blocker von Ca^{2+}-aktivierten K^+ Kanälen in einer Vielzahl von Präparationen (Dreyer, 1990). So konnte gezeigt werden, daß das aus Bienengift gewonnene Apamin bestimmte Ca^{2+}-aktivierte Kaliumkanäle geringer Leitfähigkeit, wie sie zum Beispiel an der Leukämie-T-Zelllinie Jurkat E-6 gefunden wurden, inhibiert (Grissmer et al., 1992). Die Ca^{2+}-aktivierten K^+-Ströme der Mikrogliazellen wurden durch Apamin, welches in Konzentrationen bis zu 1 μM extrazellulär appliziert wurde, nicht beeinflußt. Im Gegensatz dazu waren die Ca^{2+}-aktivierten K^+ Kanäle hoch sensitiv gegenüber extrazellulär appliziertem Charybdotoxin. Die Amplituden der Ströme wurden durch 1 nM Charybdotoxin um etwa 30% reduziert, während Charybdotoxin in einer Konzentration von 30 nM den Strom fast vollständig blockierte. Mit Hilfe der Hill-Gleichung wurde ein Wert für die halb-maximale Inhibition der Ströme (IC_{50} Wert) von 4.3 nM Charybdotoxin errechnet. Der für die Ca^{2+}-aktivierten K^+-Ströme der Mikrogliazellen bestimmte IC_{50} Wert für Charybdotoxin befindet sich im gleichen Konzentrationsbereich wie die entsprechenden Werte, die für Ca^{2+}-aktivierte K^+-Ströme an THP-1 Monozyten (Kim et al., 1996), an B-Lymphozyten (Partiseti et al., 1992; 1993) und an T-Lymphozyten (Grissmer et al., 1993) bestimmt worden waren. Das ebenfalls aus Skorpiongiften isolierte Kaliotoxin hatte dagegen in Konzentrationen bis 50 nM

keine inhibierende Wirkung auf die Ca^{2+} aktivierten K^+ Kanäle der deaktivierten Mikroglia.

In weiteren Experimenten wurde geprüft, inwieweit verschiedene anorganische polyvalente Kationen in der Lage sind, die Ca^{2+}-aktivierten K^+-Ströme der Mikrogliazellen zu beeinflußen. Zunächst wurde die Wirkung von extrazellulär applizierten Bariumionen auf den Ca^{2+}-aktivierten K^+ Strom untersucht. Bereits in Kapitel 2.2 wurde gezeigt, daß Ba^{2+} ein potenter Blocker des spannungsabhängigen einwärtsgleichrichtenden K^+ Stroms der Mikrogliazellen ist, wobei dieser Strom durch die extrazelluläre Applikation von 1 mM Ba^{2+} vollständig blockiert wurde. In der gleichen Konzentration beeinflußten Bariumionen auch den Ca^{2+}-aktivierten K^+ Strom der Mikrogliazellen. Während hyperpolarisierender Spannungen wurde der Ca^{2+}-aktivierte K^+ Strom durch 1 mM Ba^{2+} teilweise reduziert, wobei der Strom nicht im depolarisierenden Spannungsbereich beeinflußt wurde. Bariumionen riefen eine spannungsabhängige Blockade des Ca^{2+}-aktivierten K^+-Stroms hervor, d.h. die prozentuale Abnahme des Ca^{2+}-aktivierten K^+ Stroms nahm mit stärkerer Zellhyperpolarisation zu.

Der Ca^{2+}-aktivierte K^+-Strom der Mikrogliazellen wurde durch Ni^{2+} nicht beeinflußt. Im Gegensatz dazu wurde die Amplitude des Ca^{2+}-aktivierten K^+ Stroms durch 2 mM Cd^{2+} im Mittel um 17% reduziert. Unter den getesteten polyvalenten Kationen erwiesen sich Lanthanionen als potenteste Blocker der Ca^{2+}-aktivierten K^+ Kanäle deaktivierter Mikrogliazellen. In einer Konzentration von 2 mM blockierten extrazellulär applizierte Lanthanionen den Ca^{2+}-aktivierten K^+ Strom reversibel um 73%.

Anorganische polyvalente Kationen können Ca^{2+}-aktivierte K^+ Ströme entweder direkt blockieren oder deren Amplituden indirekt reduzieren aufgrund einer Blockade des Ca^{2+} Einstroms. Da in den Mikrogliazellen der Maus kein spannungsabhängiger Ca^{2+} Strom identifiziert werden konnte, kann daraus geschlossen werden, daß die polyvalenten Kationen den Ca^{2+}-aktivierten K^+ Strom der Mausmikrogliazellen direkt beeinflußen. Eine Blockade Ca^{2+}-aktivierter K^+ Ströme durch La^{3+}, Cd^{2+} oder Ba^{2+} wurde auch in T-Lymphozyten beobachtet (Grissmer et al., 1993).

Tetraethylammonium (TEA) ist ein bekannter Blocker spannungs- und Ca^{2+}-abhängiger K^+-Ströme verschiedener erregbarer und nichterregbarer Zellen (Hille, 1992). Während der extrazellulären Applikation von 1 mM und von 10 mM TEA wurde der Ca^{2+}-aktivierte K^+-Strom der Mikrogliazellen jedoch nur geringfügig blockiert. Bei einem Potential von +30 mV reduzierte 1 mM TEA die Amplituden des Ca^{2+}-aktivierten K^+ Stroms um 8%, während 10 mM TEA eine Blockade des Stroms um 31% hervorrief. Eine ähnlich geringe TEA-Sensitivität wurde bei Ca^{2+}-aktivierten K^+ Strömen verschiedener Leukozyten beobachtet (Grissmer et al., 1993; Kim et al., 1996; Mahaut-Smith & Schlichter, 1989; Partiseti et al., 1992).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß deaktivierte Mikrogliazellen der Maus Ca^{2+}-aktivierte K^+ Ströme exprimieren, die hinsichtlich ihrer kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften viele Gemeinsamkeiten mit den Charybdotoxin-sensitiven spannungsunabhängigen Ca^{2+}-aktivierten K^+ Strömen verschiedener Leukozyten aufweisen (zur Übersicht, siehe Gallin, 1991; Lewis & Cahalan, 1995; DeCoursey & Grinstein, 1999). Ein Vergleich mit bereits klonierten Kanälen läßt vermuten, daß die Ca^{2+} aktivierten K^+ Kanäle der deaktivierten Mikrogliazellen am ehesten durch die Kanalgene SK4 (Joiner et al., 1997) bzw. IK1 (Ishii et al., 1997) kodiert werden.

Ein anderer Typ von Ca^{2+}-aktivierten K^+-Kanälen wurden in Mikrogliazellen des Rindes (McLarnon et al., 1995) und des Menschen (McLarnon et al., 1997) nachgewiesen. Im Gegensatz zu den in Mausmikrogliazellen gefundenen Ca^{2+}-aktivierten K^+-Strömen, aktivierten die Ströme an Mikrogliazellen des Rindes und des Menschen spannungsabhängig bei Potentialen positiv von 0 mV. Die Ströme unterschieden sich ebenfalls in ihrer Pharmakologie: Während die Ca^{2+}-aktivierten K^+ Ströme der Mausmikrogliazellen nur eine geringe Sensitivität gegenüber TEA zeigten, konnten die Ströme an Rindermikrogliazellen durch 2 mM extrazelluläres TEA komplett blockiert werden (McLarnon et al., 1995). Bei diesen Kanälen handelt es sich wahrscheinlich um die sogenannten BK-Kanäle, die durch das Kanal-Gen ‘Slo’ kodiert werden (Adelman et al., 1992; Atkinson et al., 1991).

In Mikrogliazellen und anderen immunkompetenten Zellen gehen zahlreiche physiologische Prozesse mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}

Konzentration einher. Eine mögliche Funktion Ca^{2+}-aktivierter K^+ Ströme in Mikrogliazellen ist die Regulation des Ruhemembranpotentials in Abhängigkeit von der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration der Zellen. Durch die Regulation des Membranpotentials der Zellen sind Ca^{2+}-aktivierte K^+ Kanäle in der Lage, Ca^{2+}-vermittelte Signalkaskaden in Immunzellen zu modulieren. So konnte gezeigt werden, daß Ca^{2+}-aktivierte K^+ Kanäle eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Lymphozyten spielen (Lewis & Cahalan, 1995). In Mikrogliazellen kann die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration durch verschiedene Stimuli erhöht werden: Ein Ca^{2+} Einstrom kann zum Beispiel durch die extrazelluläre Applikation von ATP hervorgerufen werden, welche eine Aktivierung eines unspezifischen Kationenstroms zur Folge hat (Walz et al., 1993; Nörenberg et al., 1994b). Eine Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Speichern, die mit einem raschen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration verbunden ist, kann zum Beispiel durch die Applikation von Karbachol, Noradrenalin (Whittemore et al., 1993) oder Lipopolysaccharid (Bader et al., 1994) ausgelöst werden.

2.4 Auswärtsgleichrichtende K^+-Ströme

Es wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen berichtet, daß spannungsaktivierte K^+ Auswärtsströme in der Mehrheit der unstimulierten Mikrogliazellen nicht nachgewiesen werden konnten (Kettenmann et al., 1990; Eder et al., 1995a; Fischer et al., 1995; Schlichter et al., 1996; Schilling et al., 2000 (Ref. #3)). Erst nach der Aktivierung der Mikroglia, zum Beispiel mit LPS (Nörenberg et al., 1992; 1994a; Draheim et al., 1999), IFN-γ oder GM-CSF (Fischer et al., 1995), generierten Mikrogliazellen auswärtsgleichrichtende K^+ Ströme während depolarisierender Spannungen. Aufgrund der beobachteten Hochregulation dieser spannungsaktivierten K^+ Kanäle in aktivierten Mikrogliazellen wurde das Auftreten von K^+ Auswärtsströmen als elektrophysiologischer Aktivierungsmarker für Mikrogliazellen postuliert (Nörenberg et al., 1992; Fischer et al., 1995; Küst et al.,1999).

In weiteren Untersuchungen wurde herausgefunden, daß ramifizierte Mikrogliazellen nach Kokultivierung mit Astrozyten (Sievers et al., 1994; Schmidtmayer et al., 1994) oder nach Behandlung mit ACM (Eder et al., 1996

(Ref. #5), 1997 (Ref. #1), 1999 (Ref. #3)) ebenfalls in der Lage sind, auswärtsgleichrichtende K^+ Ströme zu generieren. Aufgrund dieser Beobachtung stellten sich die folgenden Fragen: 1) Wird die Hochregulation der K^+ Auswärtskanäle in ramifizierter Mikroglia durch aktivierende oder deaktivierende astrozytäre Faktoren ausgelöst? 2) Handelt es sich um den gleichen oder einen anderen K^+ Kanaltyp, der in ramifizierter Mikroglia und in aktivierter Mikroglia exprimiert wird? 3) Besteht eine Korrelation zwischen dem Auftreten der K^+ Auswärtsströme und dem Ramifizierungsverhalten der Mikroglia, d.h. spielen diese K^+ Kanäle eine Rolle während des Ramifizierungsprozesses der Mikrogliazellen?

Es ist bekannt, daß Astrozyten sowohl aktivierende als auch deaktivierende Zytokine freisetzen können. So wurde gezeigt, daß das aktivierende Zytokin GM-CSF, das von Astrozyten sezerniert wird (Ohno et al., 1990), die Expression von spannungsaktivierten K^+ Auswärtskanälen in Mikrogliazellen induziert (Eder et al., 1995b; Fischer et al., 1995). Nach der Behandlung der Mikrogliazellen mit dem von Astrozyten sezernierten deaktivierenden Zytokin TGF-β wurde ebenfalls eine Hochregulation von K^+ Auswärtskanälen beobachtet (Schilling et al., 2000 (Ref. #3)). Zur Identifikation des löslichen astrozytären Faktors, der für die Hochregulation der K^+ Auswärtskanäle in ACM-behandelten Mikrogliazellen verantwortlich ist, wurden neutralisierende Antikörper gegen verschiedene Zytokine dem ACM hinzugefügt. Die Hochregulation der K^+ Auswärtsströme konnte durch die Behandlung der Zellen mit ACM, welches Anti-GM-CSF enthielt, nicht aufgehalten werden. In der Gegenwart von Anti-pan-TGF-β blieb dagegen das K^+ Kanal-Expressionsmuster der Mikrogliazellen nach ACM-Behandlung unverändert, d.h. es konnten keine K^+ Auswärtsströme in diesen Zellen nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen beweisen, daß das deaktivierende Zytokin TGF-β, jedoch nicht das aktivierende Zytokin GM-CSF, durch Astrozyten in einer Konzentration sezerniert wird, die ausreichend ist, die Expression neuer K^+ Auswärtskanäle in ramifizierten Mikrogliazellen zu induzieren. Aus diesen Befunden läßt sich auch schlußfolgern, daß die Expression von spannungsaktivierten K^+ Auswärtsströmen nicht mit einem immunologisch definierten Funktionszustand der Mikrogliazellen

korreliert werden kann. Die Hochregulation dieser Kanäle scheint eher ein Zeichen dafür zu sein, daß die Mikrogliazellen von ihrem momentan bestehenden in einen anderen funktionellen Zustand überwechseln.

Zur Identifikation der in deaktivierten Mikrogliazellen exprimierten spannungsabhängigen K^+ Auswärtskanäle wurden die kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften der entsprechenden K^+ Ströme detailliert untersucht (Eder et al., 1996 (Ref. #5); Schilling et al., 2000 (Ref. #3)). Die K^+ Auswärtsströme aktivierten bei Membrandepolarisation, wobei die Aktivierungsschwelle bei etwa -40 mV lag. Mit zunehmender Membrandepolarisation nahmen die Amplituden der Ströme zu. Die halb-maximale Aktivierung des Stroms wurde bei einem Potential von -27 mV ermittelt. Zur Beurteilung der Steady-state-Inaktivierung des K^+ Auswärtsstroms wurde den Zellen ausgehend von verschiedenen Haltepotentialen ein definierter Testpuls appliziert. Mit Hilfe der Boltzmann-Funktion wurde die halb-maximale Inaktivierung des Stroms bei -38 mV ermittelt. Die zeitabhängige Aktivierung der K^+ Auswärtsströme zeigte eine Spannungsabhängigkeit, d.h. die Aktivierungszeitkonstante verringerte sich mit zunehmender Membrandepolarisation. Die zeitabhängige Inaktivierung der K^+ Auswärtsströme änderte sich ebenfalls spannungsabhängig bei Potentialen nahe der K^+ Strom-Aktivierungsschwelle, blieb aber weitgehend unverändert bei stärkerer Depolarisation auf Potentiale positiv von 0 mV. Bei +30 mV zeigten die K^+ Auswärtsströme ein moderates Inaktivierungsverhalten, welches durch eine Inaktivierungszeitkonstante von 580 ms beschrieben werden konnte. Eine charakteristische Eigenschaft der K^+ Auswärtsströme deaktivierter Mikrogliazellen ist ihre starke frequenzabhängige Inaktivierung, d.h. die Amplitudenabnahme während der Applikation von Testpulsen mit hoher Frequenz. Einzelkanaluntersuchungen zeigten, daß unter Verwendung von symmetrischen Kalium-Ringer-Lösungen die K^+ Kanäle Leitfähigkeiten im Bereich von 25-30 pS aufwiesen, wohingegen in Messungen mit normalen Ringer-Lösungen eine mittlere Einzelkanalleitfähigkeit von 13 pS ermittelt wurde.

Zur Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften der exprimierten K^+ Auswärtskanäle wurden die deaktivierten Mikrogliazellen mit den Peptidtoxinen Charybdotoxin (CTX), α-Dendrotoxin (α-DTX), Kaliotoxin (KTX)

oder Noxiustoxin (NTX) superfundiert. Das aus Schlangengift gewonnene α-DTX veränderte nur unwesentlich die K^+ Stromamplituden. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Skorpiongifte CTX, KTX oder NTX als sehr effektive Blocker der spannungsabhängigen K^+ Auswärtskanäle. Jedes dieser Toxine war in der Lage, den K^+ Strom bereits in einer Konzentration von 10 nM fast vollständig zu inhibieren. Es wurden Werte von 1.1 nM CTX, 1.2 nM KTX und 0.8 nM NTX für die halb-maximale Inhibition der spannungsaktivierten K^+ Auswärtsströme deaktivierter Mikrogliazellen bestimmt.

Ein Vergleich der Eigenschaften der spannungsabhängigen K^+ Auswärtskanäle der deaktivierten Mikrogliazellen mit denen der entsprechenden Kanäle in aktivierten Mikrogliazellen (zur Übersicht, siehe Eder, 1998 (Ref. #9)), anderen Makrophagen und Leukozyten (DeCoursey & Grinstein, 1999) läßt viele Gemeinsamkeiten erkennen. Es wurde deshalb angenommen, daß die in deaktivierten Mikrogliazellen exprimierten K^+ Auswärtskanäle durch das Kv1.3 Gen kodiert werden. In Untersuchungen an TGF-β-behandelten deaktivierten Mikrogliazellen konnte mRNA für Kv1.3 nachgewiesen werden. Mit Hilfe der kompetetiven RT-PCR wurde nach TGF-β-Behandlung eine fünffache Zunahme des mRNA Levels für Kv1.3 gemessen. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit der ermittelten sechsfachen Zunahme der Stromdichte der spannungsabhängigen K^+ Auswärtsströme nach Behandlung der Mikrogliazellen mit TGFβ (Schilling et al., 2000 (Ref. #3)).

Es wurde weiterhin untersucht, inwieweit die K^+-Auswärtskanäle an der Regulation der morphologischen Veränderungen, d.h. während des Überganges der Mikrogliazellen von dem amöboiden in den ramifizierten Phänotyp, beteiligt sind. Zunächst wurden gemeinsam mit dem ACM die Peptidtoxine CTX oder KTX in Konzentrationen appliziert, die eine komplette Blockade der spannungsaktivierten K^+-Auswärtsströme der Mikrogliazellen auslösten. Das Ramifizierungsverhalten der Mikrogliazellen änderte sich nach der Zugabe von CTX oder KTX zu dem ACM nicht. Die Mikrogliazellen, die in der Gegenwart von KTX oder CTX ramifizierten, zeigten keine morphologischen Unterschiede gegenüber den Mikrogliazellen, die mit ACM ohne K^+ Kanalblocker behandelt worden waren (Eder et al., 1998 (Ref. #6)). Daraus kann man schlußfolgern, daß

spannungsabhängige Kalium-Auswärtskanäle nicht an Prozessen morphologischer Veränderungen der Mikrogliazellen beteiligt sind.

Es wurde deshalb vermutet, daß die durch das Astrozyten-konditionierte Medium induzierten morphologischen Veränderungen der Zellen und die Hochregulation der spannungsabhängigen K^+-Auswärtsströme unabhängig voneinander ablaufen (Eder et al., 1997 (Ref. #1), 1999 (Ref. #2)). Detaillierte Untersuchungen zu dieser Fragestellung zeigten, daß im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollpopulation sich der Anteil der Zellen, in denen der K^+-Auswärtsstrom nachgewiesen wurde, nicht wesentlich nach einstündiger Applikation des ACM änderte. Im Gegensatz dazu konnte der Strom in fast allen Zellen nach sechs- bis achtstündiger Behandlung mit ACM registriert werden. Dieser Befund legt nahe, daß die K^+-Kanäle nach der Zugabe des ACM neu in die Zellmembran eingebaut wurden und nicht posttranslational modifiziert wurden. Einen Tag nach der Applikation des ACM wurde der Auswärtsstrom ebenfalls in nahezu allen ramifizierten Mikrogliazellen gefunden. Wie bereits in Kapitel 2.1 besprochen, wiesen die Mikrogliazellen nach fünftägiger Behandlung mit ACM einen höheren Ramifizierungsgrad auf als nach eintägiger ACM-Behandlung, wobei keine ausgeprägten Unterschiede in der Morphologie zwischen den ramifizierten Mikrogliazellen gefunden wurden, die über einen Zeitraum von fünf Tagen entweder täglich oder nur einmal mit ACM behandelt worden waren. Wurden die ramifizierten Mikrogliazellen nach täglicher Applikation des ACM am fünften Tag analysiert, so konnten die auswärtsgleichrichtenden K^+ Ströme in nahezu allen Mikrogliazellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten keine K^+ Auswärtsströme in den ramifizierten Mikrogliazellen registriert werden, die fünf Tage nach einmaliger Zugabe des ACM analysiert worden waren.

In weiteren Experimenten wurde die Konzentration des ACM soweit verringert, bis eine Ramifizierung der Mikrogliazellen nicht mehr ausgelöst werden konnte (etwa 25% ACM, 75% Kulturmedium). Die einen Tag nach der Applikation des schwach-konzentrierten ACM gemessenen amöboiden Mikrogliazellen exprimierten K^+ Auswärtsströme. Weder die Stromdichte der K^+ Auswärtsströme noch die Anzahl der amöboiden Mikrogliazellen, die diesen Strom exprimierten, unterschieden sich signifikant von den entsprechenden

Daten der ramifizierten Mikrogliazellen, die einen Tag nach der Applikation des hochkonzentrierten ACM (100% ACM) ermittelt wurden.

Aus den hier dargestellten Untersuchungen kann geschlußfolgert werden, daß keine Korrelation zwischen den beobachteten morphologischen und elektrophysiologischen Veränderungen der Mikrogliazellen nach der Applikation des ACM besteht. Da 1) die Ramifizierung der Mikrogliazellen nicht durch spezifische Blocker der K^+-Auswärtsströme inhibiert werden kann, 2) auch amöboide Mikrogliazellen in der Lage sind, den K^+-Auswärtsstrom nach Behandlung mit schwach-konzentriertem ACM zu exprimieren, ohne ihre amöboide Morphologie dabei zu verändern, und 3) die K^+-Ströme der ramifizierten Mikrogliazellen einige Tage nach ACM-Behandlung wieder herunterreguliert werden, ohne daß sich die ramifizierte Morphologie der Mikrogliazellen zurückbildet, kann man davon ausgehen, daß die Ramifikation der Mikrogliazellen und die Hochregulation der spannungsaktivierten K^+ Auswärtskanäle unabhängig voneinander ablaufende Prozesse sind.

Nur wenig ist bisher bekannt über die funktionelle Bedeutung der spannungsaktivierten K^+ Auswärtskanäle in Mikrogliazellen. Im Gegensatz dazu wurden bereits intensive Untersuchungen zur Aufklärung der Funktion der Kv1.3 Kanäle an Lymphozyten durchgeführt. Es wurde gezeigt, daß verschiedene Lymphozytenfunktionen durch die Anwesenheit bestimmter K^+ Kanalinhibitoren moduliert bzw. unterdrückt werden konnten. Eine Blockade der spannungsabhängigen K^+ Kanäle verursachte die Inhibition der T-Zell Proliferation sowie die Inhibition verschiedener Ereignisse während der T-Zell Aktivierung (Chandy et al., 1993; Lewis & Cahalan, 1995). Eine mögliche Beteiligung der spannungsaktivierten K^+ Auswärtskanäle an Aktivierungsprozessen der Mikrogliazellen wurde von Caggiano und Kraig (1998) diskutiert. Diese Hypothese basiert auf der Beobachtung, daß die durch LPS-Stimulation ausgelöste Freisetzung von Interleukin-1β durch den K^+ Kanalblocker 4-Aminopyridin inhibiert werden konnte.

Im Gegensatz zu den K^+ Kanälen der T-Lymphozyten (Chandy et al., 1993) scheinen die spannungsaktivierten K^+ Auswärtskanäle der Mikrogliazellen keine bedeutende Rolle während der Proliferation der Zellen zu spielen. So konnte die Proliferation von Rattenmikroglia durch die Peptidtoxine

Charybdotoxin oder Margatoxin nicht inhibiert werden (Schlichter et al., 1996). Die Beobachtung, daß nur ein geringer Anteil von proliferierenden bzw. M-CSF-behandelten Mikrogliazellen K^+ Auswärtsströme generierte, spricht außerdem gegen eine notwendige Beteiligung der Kv1.3 Kanäle an Proliferationsvorgängen der Mikroglia (Nörenberg et al., 1994a; Fischer et al., 1995).

Generell sind spannungsaktivierte K^+ Auswärtskanäle in der Lage, die Mikrogliazellen nach depolarisierenden Ereignissen schnell wieder auf ein negatives Membranpotential zurückzuführen. Ein relativ negatives Membranpotential ist notwendig, um eine große treibende Kraft für den Ca^{2+} Einstrom in die Zellen durch die Ca^{2+} freisetzungsaktivierten Ca^{2+} Kanäle (CRAC Kanäle) zu gewährleisten (Lewis & Cahalan, 1989). In Untersuchungen an T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, daß entweder langanhaltende $[Ca^{2+}]_i$ Anstiege oder $[Ca^{2+}]_i$ Oszillationen, die durch die Aktivierung der CRAC Kanäle ermöglicht werden, eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche T-Zell-Aktivierung und einer damit verbundenen Expression bestimmter Gene sind (Lewis & Cahalan, 1995). Oszillationen des Membranpotentials, die möglicherweise an $[Ca^{2+}]_i$ Oszillationen gekoppelt sind, wurden an LPS-stimulierten Mikrogliazellen beobachtet. Da in diesen Zellen das Membranpotential bevorzugt zwischen -70 mV und -30 mV oszillierte, ist eine Beteiligung der spannungsaktivierten K^+ Auswärtskanäle an der Membranrepolarisation wahrscheinlich (Nörenberg et al., 1994a). Ob ähnliche Oszillationen des Ruhemembranpotentials auch an deaktivierten Mikrogliazellen auftreten, und welche funktionelle Bedeutung diese Oszillationen besitzen, muß in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden.

2.5 Dehnungsaktivierte Cl^--Ströme

Da die spannungsaktivierten Kaliumauswärtskanäle offensichtlich keine wesentliche Rolle zu der Gewährleistung der Ramifikation der Mikroglia spielen, wurde vermutet, daß dehnungsaktivierte Ionenkanäle an der Regulation der Morphologie der Mikrogliazellen beteiligt sein könnten. In einer weiteren Studie wurde deshalb untersucht, ob Mikrogliazellen der Maus dehnungsaktivierte Ionenkanäle exprimieren (Eder et al., 1998 (Ref. #6)). In den Mikrogliazellen

konnte nach erfolgter Membrandehnung, die durch eine Bewegung der Patch-Pipette um einige Mikrometer erreicht wurde, die Aktivierung eines auswärtsgleichrichtenden Ionenstroms beobachtet werden. Diese dehnungsaktivierten Ströme wiesen keinerlei zeitliches Aktivierungs- oder Inaktivierungsverhalten auf. Es zeigte sich, daß es sich bei den dehnungsaktivierten Ionenkanälen der Mikrogliazellen nicht um die gleichen dehnungsaktivierten Kaliumkanäle handelte, die an Monozyten-gereiften Makrophagen beschrieben worden waren (Martin et al., 1995). Die dehnungsaktivierten Ströme der Mikrogliazellen konnten auch unter Verwendung von K^+-freier intrazellulärer Lösungen nachgewiesen werden. Experimente zur Bestimmung der Selektivität der dehnungsaktivierten Ionenströme für Chloridionen zeigten, daß sich nach einer Reduktion der extrazellulären Cl^--Konzentration (bei equimolarer Substitution der Chloridionen durch Glukonat) die Amplitude des dehnungsaktivierten Stroms verringerte und sich das Umkehrpotential des Stroms in positive Richtung verschob. Dieser Befund beweist, daß die dehnungsaktivierten Ströme der Mikrogliazellen hauptsächlich von Chloridionen getragen wurden.

Die Cl^--Ströme der Mikrogliazellen aktivierten langsam nach der initial erfolgten Zelldehnung und erreichten erst nach einigen Minuten ihre maximale Amplitude. Ein ähnlich langsamer Aktivierungszeitverlauf wurde bereits für schwellungsaktivierte Cl^--Ströme in verschiedenen Zellarten beschrieben (Lewis et al., 1993; Stoddard et al., 1993; Verdon et al., 1995). Da die maximalen Stromamplituden erst mehrere Minuten nach der Membrandehnung erreicht wurden, war die Membrandehnung wahrscheinlich nicht der alleinige Stimulus zur Aktivierung der Cl^--Ströme in den Mikrogliazellen. Es ist eher anzunehmen, daß eine mechanische Verformung der Zellmembran intrazelluläre Signale triggert, die eine Öffnung der Cl^--Kanäle zur Folge hatte.

Befand sich kein ATP in der intrazellulären Lösung, so erreichten die Cl^- Ströme ihre maximalen Amplitudenwerte etwa drei bis acht Minuten nach der Dehnung der Zellmembran, verringerten sich aber anschliessend wieder in ihren Amplituden und waren nach 10-15 Minuten nicht mehr meßbar. Die dehnungsaktivierten Cl^- Ströme konnten nach ihrem Verschwinden durch eine zweite Dehnung erneut induziert werden. Diese Ströme besaßen allerdings

geringere Amplituden als die Ströme, die nach der ersten Membrandehnung aktiviert wurden. Nur selten konnten die Ströme noch ein drittes Mal ausgelöst werden. Es wurden keine Unterschiede zwischen amöboiden und ramifizierten Mikrogliazellen hinsichtlich des Zeitverlaufs der Strominduktion und des Rundown-Verhaltens der dehnungsaktivierten Cl^- Ströme gefunden.

An verschiedenen Zellpräparationen ist gezeigt worden, daß das Aktivierungsverhalten von Cl^--Strömen durch intrazelluläres ATP beeinflußt werden kann (zur Übersicht, siehe Strange et al., 1996). In der Gegenwart von 4 mM intrazellulärem ATP wurden keine Veränderungen im Aktivierungszeitverlauf oder im kinetischen Verhalten der dehnungsaktivierten Cl^--Ströme der Mikrogliazellen beobachtet. Die zeitabhängige Amplitudenverminderung (Rundown) der Ströme konnte jedoch durch ATP aufgehalten werden. In der Anwesenheit von intrazellulärem ATP vergrößerten sich die Amplituden der Cl^- Ströme nach Membrandehnung innerhalb der ersten vier bis acht Minuten und erreichten anschliessend ein Plateau. Nach dem Erreichen der maximalen Amplituden veränderten sich die Cl^- Ströme über einen Zeitraum von mehr als einer Stunde nicht weiter. In den Mikrogliazellen wurde das ATP nicht zur initialen Öffnung der Cl^--Kanäle benötigt, wie es an Endothelzellen oder NIH/3T3 Fibroblasten (Gill et al., 1992; Strange et al., 1996) beobachtet worden war.

Verschiedene Blocker von Chloridkanälen wurden auf ihre Fähigkeit getestet, die dehnungsaktivierten Cl^--Ströme der Mikrogliazellen zu blockieren. Nach der Applikation von 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) in nanomolaren Konzentrationen wurden die Cl^- Ströme der Mikrogliazellen in ihrer Amplitude reduziert. DIDS verursachte in geringeren Konzentrationen eine zeit- und spannungsabhängige Blockade der Ströme. In einer Konzentration von 1 mM DIDS wurden die Cl^- Ströme vollständig blockiert. Die Blockade der dehnungsaktivierten Cl^- Ströme der Mikrogliazellen war bei hyperpolarisierenden Potentialen schwächer ausgeprägt als bei depolarisierenden Potentialen. Die stärkste Inhibition der Ströme wurde im Potentialbereich zwischen +30 mV und +50 mV beobachtet. Zur Ermittlung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für DIDS, wurde DIDS in verschiedenen Konzentrationen extrazellulär appliziert. Die Amplituden der Cl^--Ströme wurden bei einem Testpotential von +40 mV ermittelt, wobei diese am Ende des Testpulses gemessen wurden. Die gemessenen

Stromamplituden wurden auf den maximalen Strom normalisiert, der vor Applikation von DIDS bestimmt wurde. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve wurde mit der Hill-Funktion gefittet. Es wurde eine halbmaximale Blockade von 16 μM DIDS für den dehnungsaktivierten Cl^- Strom der Mikrogliazellen bestimmt.

Die Inhibition der Cl^- Ströme der Mikrogliazellen durch 4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (SITS) war ebenso zeit- und spannungsabhängig. Es wurde eine halb-maximale Blockade der Ströme durch 71 μM SITS ermittelt, wobei die Amplituden der Cl^- Ströme ebenfalls bei einem Testpuls auf +40 mV bestimmt wurden. Die ermittelten Werte für die halb-maximale Blockade des Cl^- Stroms durch DIDS und SITS stimmen gut mit den entsprechenden Messungen der Cl^- Ströme an T-Lymphozyten (Lewis et al., 1993) und Osteoklasten (Steinert & Grissmer, 1997) überein.

Wie für den schwellungsaktivierten Cl^--Strom an Mikrogliazellen der Ratte (Schlichter et al., 1996) gezeigt wurde, konnte der dehnungsaktivierte Cl^--Strom der Mausmikrogliazellen auch durch die extrazelluläre Applikation von 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB) oder Flufenaminsäure blockiert werden. Im Gegensatz zu DIDS und SITS bewirkten die Cl^- Kanalblocker NPPB und Flufenaminsäure eine zeit- und spannungsunabhängige Blockade der dehnungsaktivierten Cl^- Ströme.

In früheren Untersuchungen wurden Cl^--Ströme in Mikrogliazellen des Rindes (McLarnon et al., 1995) und der Ratte (Visentin et al., 1995; Schlichter et al., 1996) nachgewiesen. Ein Vergleich der Eigenschaften der Cl^--Ströme der Mausmikrogliazellen mit denen der Rindermikroglia ist schwierig, da in Mikrogliazellen des Rindes die Cl^--Kanäle ausschliesslich in "Patches" analysiert wurden, während entsprechende Ganzzellströme nicht registriert werden konnten (McLarnon et al., 1995). Die hier beschriebenen dehnungsaktivierten Cl^--Ströme weisen viele Gemeinsamkeiten mit den schwellungsaktivierten Cl^--Strömen von Rattenmikrogliazellen (Schlichter et al., 1996) auf. In beiden Präparationen zeigten die auswärtsgleichrichtenden Cl^--Ströme kein zeitlich abhängiges Gating-Verhalten. Außerdem waren die Ströme beider Mikrogliapräparationen in gleichem Maße hoch sensitiv gegenüber den Cl^--Kanalblockern Flufenaminsäure und NPPB. Es ist anzunehmen, daß in Mikrogliazellen der gleiche Typ von Cl^--Kanälen sowohl durch osmotische als auch durch mechanische Stimuli aktiviert

werden kann. Für T-Lymphozyten wurde gezeigt, daß die Aktivierung der "mini" Chloridkanäle, die in der Gegenwart von hypoosmotischen extrazellulären oder hyperosmotischen intrazellulären Lösungen gesehen wurde, auch durch das Anlegen eines positiven Druckes über die Patchpipette ausgelöst werden kann (Lewis et al., 1993).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß hinsichtlich ihrer kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften die an den Mikrogliazellen der Maus gemessenen dehnungsaktivierten Cl^--Ströme die meisten Übereinstimmungen mit den spontan oder osmotisch-aktivierten Cl^--Strömen anderer Immunzellen (zur Übersicht, siehe DeCoursey and Grinstein, 1999), d.h. der Monozyten (Kim et al., 1996), Monozyten-gereiften Makrophagen (Nelson et al., 1990), Neutrophilen (Stoddard et al., 1993) und Lymphozyten (Lewis et al., 1993), zeigen. Eine Identifikation der dehnungsaktivierten Cl^- Kanäle der Mikrogliazellen auf molekularer Ebene gelang bisher nicht.

Es wurde der Frage nachgegangen, ob die Ramifizierung der Mikrogliazellen durch Blocker der dehnungsaktivierten Cl^- Ströme beeinflußt werden kann (Eder et al., 1998 (Ref. #6)). In diesen Experimenten wurden die Mikrogliazellen mit ACM behandelt, welches DIDS, SITS, NPPB oder Flufenaminsäure enthielt. In der Gegenwart von 1 mM DIDS oder 1 mM SITS konnte die Ramifizierung der Mikrogliazellen nicht ausgelöst werden. Die Mikrogliazellen behielten ihre amöboide Morphologie 24 Stunden nach Zugabe des DIDS- oder SITS-haltigen ACM bei. Nachdem die Mikrogliazellen sich 24 Stunden in dem DIDS- oder SITS-haltigem ACM befanden, wurden sie mehrmals mit Kulturmedium gewaschen und für weitere 24 Stunden mit ACM behandelt, welches keinerlei Blocker enthielt. Unter diesen Bedingungen konnte die Ramifizierung der Mikrogliazellen ausgelöst werden. Diese ramifizierten Mikrogliazellen unterschieden sich nicht in ihrer Morphologie von den Zellen, die ausschließlich für 24 oder 48 Stunden mit ACM behandelt worden waren.

NPPB oder Flufenaminsäure konnten ebenfalls die Ramifizierung der Mikrogliazellen aufhalten, wenn diese Pharmaka jeweils in einer Konzentration von 200 μM im ACM anwesend waren. Die für 24 Stunden mit NPPB oder Flufenaminsäure behandelten Mikrogliazellen besaßen die gleiche amöboide Morphologie wie unbehandelte Mikrogliazellen. Die inhibierende Wirkung dieser

Cl^- Kanalblocker auf das Ramifizierungsverhalten der Mikrogliazellen war ebenfalls reversibel.

Wurden bereits ramifizierte Mikrogliazellen mit den Chloridkanalblockern DIDS, SITS, NPPB oder Flufenaminsäure für 24 Stunden behandelt, konnten keine Veränderungen der Zellen beobachtet werden, d.h. die Zellen behielten ihre ramifizierte Morphologie bei.

Aus diesen Experimenten läßt sich schlußfolgern, daß funktionelle dehnungsaktivierte Cl^--Kanäle an der Auslösung der Ramifizierungsprozesse der Mikrogliazellen beteiligt sind, jedoch keine Rolle für das Aufrechterhalten der ramifizierten Morphologie der Zellen spielen.

Eine mögliche Funktion der Cl^--Ströme an Mikrogliazellen könnte die Regulation des Membranpotentials der Zellen beinhalten. Eine Verschiebung des Ruhemembranpotentials zu positiveren Werten in die Nähe des Cl^--Umkehrpotentials könnte eine mögliche Voraussetzung für das Auslösen der Ramifizierung der Mikrogliazellen sein. Es ist auch möglich, daß die Aktivierung der Cl^--Ströme in Mikrogliazellen benötigt wird, um Signalwege der Tyrosinkinasenphosphorylierung zu triggern, wie es für proliferierende T Lymphozyten nachgewiesen werden konnte (Phipps et al., 1996). Die Phosphorylierung durch Tyrosinkinasen scheint ebenfalls während des Ramifikationsprozesses der Mikroglia stattzufinden. Es wurde berichtet, daß die Induktion der Ramifizierung durch den Tyrosinkinaseninhibitor Herbimycin A inhibiert werden konnte (Liu et al., 1994) und daß eine Verringerung des Ramifikationsgrades, d.h. eine Verkürzung der Fortsätze, ramifizierter Mikrogliazellen durch Genistein ausgelöst wurde (Tanaka & Maeda, 1996).

Schlichter und Mitarbeiter konnten zeigen, daß die Proliferation von M-CSF-behandelten Mikrogliazellen in Anwesenheit der Chloridkanalblocker Flufenaminsäure, NPPB und IAA-94 inhibiert wurde. Dabei lagen die Werte für die halb-maximale Inhibition der Proliferation der Mikrogliazellen im mikromolaren Konzentrationsbereich und entsprachen im wesentlichen den Konzentrationen, die für die halb-maximale Strominhibition ermittelt worden waren (Schlichter et al., 1996). Die Chloridkanäle der Mikrogliazellen werden wahrscheinlich auch bei der Volumenregulation der Zellen eine wichtige Rolle spielen, ebenso wie es für andere Immunzellen beschrieben wurde (Garber & Cahalan, 1997).

Ein neuer Aktivierungsmechanismus dehnungsaktivierter Cl^- Kanäle wurde an T-Lymphozyten und Osteoklasten aufgeklärt (Steinert & Grissmer, 1997). In der Arbeit von Steinert und Grissmer wurde nachgewiesen, daß die Öffnung der Cl^- Kanäle durch eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration ausgelöst werden konnte. Dieser Befund ist von besonderem Interesse, da bekannt ist, daß sich die Konzentration der Kaliumionen im Extrazellulärraum ($[K^+]_o$) bei neuronaler Aktivität erhöht. Besonders starke Anstiege von $[K^+]_o$ werden unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen, wie zum Beispiel bei Entzündungen, Anoxie, Epilepsie oder Spreading Depression beobachtet (Heinemann et al., 1986; Somjen et al., 1992; White et al., 1992). In Mikrogliazellen, die keine K^+ Auswärtskanäle exprimieren, würden Erhöhungen von $[K^+]_o$ zu langanhaltender Membrandepolarisation führen. Eine solche Depolarisation könnte durch die gleichzeitige Aktivierung der Cl^- Kanäle verhindert werden.

2.6 Spannungsaktivierte H^+-Ströme

Spannungsaktivierte Protonenströme wurden in Mikrogliazellen der Maus (Eder et al., 1995a), der Ratte (Visentin et al., 1995) und des Menschen (McLarnon et al., 1997) nachgewiesen. Detaillierte Untersuchungen an unbehandelten Mikrogliazellen der Maus hatten gezeigt, daß die Aktivierung der auswärtsgerichteten H^+ Ströme von dem Membranpotential sowie von dem intrazellulären und dem extrazellulären pH Wert abhängt. Eine Verringerung des intrazellulären pH Wertes verursachte eine Verschiebung der Aktivierungsschwelle der Ströme zu negativeren Potentialen. Eine solche Verschiebung der Aktivierungsschwelle und der Leitfähigkeits-Spannungs-Kurve (g-V-Kurve) der H^+ Ströme zu hyperpolarisierenden Potentialen sowie eine Amplitudenvergrößerung der H^+ Ströme wurde ebenso nach einer Erhöhung des extrazellulären pH Wertes beobachtet (Eder et al., 1995a).

Bei einem pH Gradienten von 1.5 (pH_i=6.0; pH_o=7.5) aktivierten die H^+ Ströme der deaktivierten ACM-behandelten Mikrogliazellen erstmalig bei einem Potential von -40 mV (Klee et al., 1999 (Ref. #7)). Die Aktivierungsschwelle von H^+-Strömen wird durch den pH-Gradienten der intra- und der extrazellulären

Lösungen bestimmt (Cherny et al., 1995). Die an den Mikrogliazellen gefundene Aktivierungsschwelle der H^+-Ströme von -40 mV wurde auch für die H^+-Ströme an peritonealen Makrophagen (Kapus et al., 1993) und an THP-1 Makrophagen (DeCoursey & Cherny, 1996) für einen pH-Unterschied von 1.5 ermittelt. Weder die Aktivierungsschwelle noch das Steady-state-Aktivierungsverhalten der H^+ Ströme deaktivierter Mikrogliazellen unterschieden sich von denen der unbehandelten Mikrogliazellen.

Ebenso wurden keine veränderten pharmakologischen Eigenschaften der H^+ Ströme nach der Deaktivierung der Mikroglia gefunden. Als sehr effektive Blocker der H^+ Ströme erwiesen sich anorganische polyvalente Kationen, wie zum Beispiel Zn^{2+} oder La^{3+}. Dieser Befund ist in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen an anderen Makrophagenpräparationen (Kapus et al., 1993; Eder et al., 1995a; DeCoursey & Cherny, 1996). Eine gleiche Sensitivität gegenüber polyvalenten Kationen wurde aber auch an H^+-Strömen erregbarer und anderer nicht-erregbarer Zellen beschrieben (zur Übersicht, siehe DeCoursey & Cherny, 1994a). Wurden die deaktivierten Mikrogliazellen mit Zn^{2+} oder La^{3+} in mikromolaren Konzentrationen superfundiert, so führte dies zu einer Reduktion der H^+ Stromamplituden. Gleichzeitig wurde eine starke Verschiebung der g-V-Kurve der H^+ Ströme zu positiveren Potentialen während der Applikation der polyvalenten Kationen beobachtet.

Obwohl das Steady-state-Aktivierungsverhalten der H^+ Ströme in unstimulierten und ACM-behandelten deaktivierten Mikrogliazellen keine signifikanten Unterschiede aufwies, wurde eine bedeutend geringere H^+ Stromdichte in den ACM-behandelten Mikrogliazellen ermittelt als in den unbehandelten Mikrogliazellen. Unterschiede zwischen den H^+ Strömen der unbehandelten und ACM-behandelten Mikrogliazellen wurden ebenfalls im zeitlichen Aktivierungsverhalten festgestellt. Die H^+ Ströme der ACM-behandelten Mikrogliazellen aktivierten deutlich langsamer als die unbehandelten Zellen. In beiden Zellpopulationen konnte die zeitliche Aktivierung der H^+ Ströme monoexponentiell gefittet werden.

Obwohl die Mikrogliazellen durch die Behandlung entweder mit ACM oder mit LPS in verschiedene Aktivierungsstadien überführt wurden, wiesen die H^+-Ströme interessanterweise in LPS-aktivierten Mikrogliazellen die gleichen

Veränderungen in der Stromdichte und in der zeitlichen Aktivierung auf, wie sie nach ACM-Behandlung der Zellen auftraten: Im Vergleich mit den H^+ Strömen der unstimulierten Mikrogliazellen, hatten die H^+-Ströme der LPS-aktivierten Mikrogliazellen eine geringere Stromdichte und zeigten ein langsameres Aktivierungsverhalten (Klee et al., 1999 (Ref. #7)).

Zusätzlich zu den Veränderungen in der zeitlichen Aktivierung und der Stromdichte der H^+ Ströme, wurde durch die Behandlung der Mikrogliazellen mit LPS oder ACM eine Zunahme der Zellkapazität, d.h. der Membranoberfläche der Zellen, ausgelöst. In Übereinstimmung mit den hier dargestellten Daten, wurde auch eine Verringerung der Stromdichte und eine Verlangsamung der zeitlichen Aktivierung der H^+-Ströme, verbunden mit einer Zunahme der Zellkapazität an THP-1-Makrophagen beobachtet, nachdem diese Zellen sich aus Monozyten differenziert hatten (DeCoursey & Cherny, 1996).

Auf der Suche nach einer möglichen Erklärung für die beobachteten Veränderungen der H^+ Ströme wurde zunächst untersucht, ob nach der Behandlung der Mikrogliazellen mit ACM oder LPS die Aktivität des Na^+/H^+-Austauschers der Mikrogliazellen verändert wurde. DeCoursey und Cherny (1994b) hatten gezeigt, daß man durch H^+-Strommessungen in Na^+-haltigen und Na^+-freien extrazellulären Lösungen auf die Aktivität des Na^+/H^+ Austauschers rückschließen kann. Sie beschrieben eine Reduktion der H^+-Ströme durch extrazelluläre Natriumionen, die durch die Aktivierung des Na^+/H^+-Austauschers ausgelöst wurde. In Mikrogliazellen resultierte die Substitution von TMA^+ durch Na^+ innerhalb der extrazellulären Lösung in einer Amplitudenreduktion der H^+-Ströme. Es wurden allerdings keine Unterschiede in der prozentualen Abnahme der H^+-Strom-Amplituden zwischen den einzelnen Mikrogliazellpopulationen gefunden. Im Vergleich zu den an Epithelzellen und Neutrophilen beschriebenen Effekten (DeCoursey & Cherny, 1994b) wurden die H^+-Ströme der Mikrogliazellen wesentlich geringer durch Na^+ reduziert. Daraus kann man schließen, daß der Na^+/H^+-Austauscher in Mikrogliazellen weniger stark ausgebildet ist und sich offensichtlich nicht durch die Behandlung der Zellen mit ACM oder LPS verändert. Dieser Befund ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Fluoreszenzuntersuchungen an Alveolarmakrophagen, die zeigen, daß der Na^+/H^+-Austauscher nur eine geringe Rolle während der Regulierung des

intrazellulären pH-Wertes der Makrophagen spielt (Murphy & Forman, 1993; Bidani et al., 1994).

Die Effekte von Zerstörern und Stabilisatoren des Zytoskeletts wurden in Mikrogliazellen in der Annahme untersucht, daß zytoskeletäre Reorganisationsprozesse für die beobachteten Veränderungen der H^+-Ströme nach Behandlung der Zellen mit LPS oder ACM verantwortlich sein könnten (Klee et al., 1998 (Ref. #8)). Sowohl die Prozesse der Ramifizierung (Ilschner & Brandt, 1996) als auch die LPS-induzierten morphologischen Veränderungen sind mit dramatischen Veränderungen des Zytoskeletts verbunden (Shinji et al., 1991; Abd-El-Basset & Fedoroff, 1995). Eine Reihe von Ionenkanälen konnte durch Stoffe verändert werden, die Mikrofilamente oder Mikrotubuli beeinflussen (z. B., Johnson & Byerly, 1993; Wang et al., 1994). Die Untersuchungen an Mikrogliazellen zeigten, daß nach der Applikation von Zerstörern des Zytoskeletts, d.h. Zytochalasin D oder Kolchizin, die gleichen Veränderungen der Stromdichte und der zeitlichen Aktivierung der H^+-Ströme hervorgerufen wurden, wie sie nach der Behandlung der Zellen mit LPS oder ACM beobachtet wurden. Es kann daher geschlußfolgert werden, daß die aufgrund der Behandlung mit ACM oder LPS ausgelöste zytoskeletäre Reorganisation der Mikrogliazellen für die Veränderungen der H^+-Ströme verantwortlich ist. Die nach der Behandlung der Zellen mit LPS, ACM oder Zerstörern des Zytoskeletts gefundenen Veränderungen der H^+-Ströme können durch eine direkte Modulation oder Inhibition der Kanäle verursacht werden. Es ist außerdem möglich, daß der Einbau neuer Kanäle in die Zellmembran der Mikrogliazellen aufgrund der Reorganisation bzw. der Zerstörung des Zytoskeletts inhibiert wurde, was eine reduzierte Anzahl der H^+-Kanäle zur Folge hätte. Diese Erklärung scheint eher zuzutreffen, da 1) nach jeder Behandlung der Mikrogliazellen die Steady-state-Aktivierung der H^+-Ströme unverändert blieb und 2) keine signifikanten Unterschiede in der Amplitude und der Aktivierungszeitkonstante der H^+-Ströme während einer direkten intrazellulären Perfusion oder der Kurzzeitbehandlung der Zellen mit den Zerstörern des Zytoskeletts gefunden wurden.

Die bisher beschriebenen H^+ Ströme verschiedener Präparationen können aufgrund bestehender Gemeinsamkeiten und Unterschiede klassifiziert werden, wobei bisher eine Unterteilung in vier verschiedene H^+ Strom-Typen sinnvoll

erschien (DeCoursey, 1998). Die H^+ Ströme der deaktivierten Mikrogliazellen besitzen die meisten Gemeinsamkeiten mit den H^+ Strömen anderer Phagozyten. Die in Phagozyten exprimierten H^+ Kanäle unterscheiden sich in ihrer Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik deutlich von den H^+ Kanälen der Neurone, Oozyten und Epithelzellen. Erst kürzlich gelang die erstmalige Klonierung und heterologe Expression eines spannungsaktivierten H^+ Kanals (Bánfi et al., 2000). Ob das NOH-1 Gen für den spannungsaktivierten H^+ Kanal der Mikrogliazellen kodiert, werden zukünftige Untersuchungen zeigen.

Bisher wurde die funktionelle Rolle der H^+ Kanäle in Mikrogliazellen nicht experimentell untersucht. Intensive Studien zur Aufklärung der funktionellen Bedeutung der H^+ Kanäle wurden an anderen Phagozyten, d.h. Makrophagen und Neutrophilen, durchgeführt (zur Übersicht, siehe DeCoursey & Cherny, 1994a; DeCoursey & Grinstein, 1999). Es kann daher angenommen werden, daß H^+ Kanäle an der Extrusion von Protonen während phagozytotischer Aktivität der Mikrogliazellen beteiligt sind. Während zellulärer Aktivität sind Phagozyten in der Lage, einen respiratorischen Burst zu generieren. Die H^+ Kanäle scheinen dabei einen wichtigen Beitrag zu leisten, die aufgrund der Aktivität der NADPH-Oxidase freigesetzten Protonen aus den Zellen zu befördern. Damit helfen die H^+ Kanäle, sowohl das Membranpotential als auch den intrazellulären pH Wert während des respiratorischen Bursts konstant zu halten. Aufgrund des Protonenausstroms aus den Zellen wird damit gleichzeitig die Superoxid-Produktion während des respiratorischen Bursts aufrecht erhalten. An Neutrophilen wurde gezeigt, daß nach einer Inhibition der H^+ Kanäle durch Zn^{2+} oder Cd^{2+} die Superoxid-Produktion nicht stattfinden konnte (Hendersen et al., 1988). Aufgrund der nur geringen Aktivität des Na^+/H^+ Austauschers in Mikrogliazellen ist es auch möglich, daß die H^+ Kanäle in verschiedenen Prozessen der pH-Regulation involviert sind. Eine Beteiligung der H^+ Kanäle an Repolarisationsvorgängen der Mikrogliazellen kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

3. Schlußfolgerungen

Die Etablierung eines geeigneten Modells der ruhenden Mikroglia ermöglichte erstmalig, die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Zellen in ihrem deaktivierten Zustand sowie während des Deaktivierungsprozesses detailliert zu studieren. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß deaktivierte Mikrogliazellen in der Lage sind, eine Vielfalt von Ionenkanälen zu exprimieren. Sie ermöglichen außerdem, erste Einblicke über die funktionelle Bedeutung dieser Ionenkanäle in deaktivierter Mikroglia zu erlangen. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, inwieweit sich die an kultivierter Mikroglia gewonnenen Erkenntnisse über die Expression und Funktion der Ionenkanäle auf in situ Modelle übertragen lassen.

Die Ionenströme der deaktivierten Mikrogliazellen weisen keine wesentlichen Unterschiede in ihren Charakteristika zu den Eigenschaften der an unstimulierten bzw. aktivierten Mikrogliazellen beschriebenen entsprechenden Ströme auf. Ebenso wurden viele Übereinstimmungen der kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften der Ionenströme deaktivierter Mikroglia mit denen anderer Makrophagen gefunden.

Wir stehen erst am Beginn des Verständnisses der funktionellen Rolle der verschiedenen Ionenkanäle in deaktivierter Mikroglia. Erwiesen ist die Beteiligung der dehnungsaktivierten Chloridkanäle an Deaktivierungsprozessen der Mikroglia, d.h. an der Transformation der amöboiden in die ramifizierte Morphologie der Zellen. Die funktionelle Bedeutung der in deaktivierten Mikrogliazellen exprimierten H^+ und K^+ Kanäle konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Die in früheren Untersuchungen erhobene Hypothese, daß das K^+ Kanal-Expressionsmuster der Mikroglia mit einem entsprechenden funktionellen Zustand der Zellen korreliert, muß revidiert werden, da deaktivierte Mikrogliazellen ebenso wie aktivierte Mikrogliazellen in der Lage sind, spannungsaktivierte K^+ Auswärtsströme zu generieren.

4. Literatur

Abd-El-Basset E. & Fedoroff S. Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures. J. Neurosci. Res. 41: 222-237, 1995.

Adelman J.P., Shen K.Z., Kavanaugh M.P., Warren R.A., Wu Y.N., Lagrutta A., Bond C.T. & North R.A. Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. Neuron 9: 209-216, 1992.

Atkinson N.S., Robertson G.A. & Ganetzky B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the Drosophila slo locus. Science 253: 551-555, 1991.

Bader M.F, Taupenot L., Ulrich G., Aunis D & Ciesielski-Treska J. Bacterial endotoxin induces $[Ca^{2+}]_i$ transients and changes the organization of actin in microglia. Glia 11: 336-344, 1994.

Bánfi B., Maturana A., Jaconi S., Arnaudeau S., Laforge T., Sinha B., Ligeti E., Demaurex N. & Krause K.H. A mammalian H^+ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. Science 287: 138-142, 2000.

Barron K.D. The microglial cell. A historical review. J. Neurol. Sci. 134: 57-68, 1995.

Benveniste E.N. Cytokine production. In: Neuroglia (Eds.: H. Kettenmann, B.R. Ransom), New York, Oxford: Oxford University Press, pp. 700-713, 1995.

Bidani A., Brown S.E. & Heming T.A. pHi regulation in alveolar macrophages: relative roles of Na+-H+ antiport and H+-ATPase. Am. J. Physiol. 266: L681-L688, 1994.

Brown D.R. & Kretzschmar H.A. Microglia and prion disease: a review. Histology and Histopathology 12: 883-892, 1997.

Caggiano A.O. & Kraig R.P. Prostaglandin E2 and 4-aminopyridine prevent the lipopolysaccharide-induced outwardly rectifying potassium current and interleukin-1β production in cultured rat microglia. J. Neurochem. 70: 2357-2368, 1998.

Chandy K.G., Gutman G.A. & Grissmer S. Physiological role, molecular structure and evolutionary relationships of voltage-gated potassium channels in T lymphocytes. Sem. Neurosci. 5: 125-134, 1993.

Cherny V.V., Markin V.S. & DeCoursey T.E. The voltage-activated hydrogen ion conductance in rat alveolar epithelial cells is determined by the pH gradient. J. Gen. Physiol. 105: 861-896, 1995.

Chung S., Jung W. & Lee M.Y. Inward and outward rectifying potassium currents set membrane potentials in activated rat microglia. Neurosci. Lett. 262: 121-124, 1999.

DeCoursey T.E. Four varieties of voltage-gated proton channels. Frontiers in Bioscience 3: d477-d482, 1998.

DeCoursey T.E. & Cherny V.V. Voltage-activated hydrogen ion currents. J. Membr. Biol. 141: 203-223, 1994.

DeCoursey T.E. & Cherny V.V. Na^+-H^+ antiport detected through hydrogen ion currents in rat alveolar epithelial cells and human neutrophils. J. Gen. Physiol. 103: 755-785, 1994.

DeCoursey T.E. & Cherny V.V. II. Voltage-activated proton currents in human THP-1 monocytes. J. Membr. Biol. 152: 131-140, 1996.

DeCoursey T.E. & Grinstein S. Ion Channels and Carriers in Leukocytes.In: Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. 3rd ed. J.I. Gallin and R. Snyderman, editors. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. pp. 639-659, 1999.

Draheim H.J., Prinz M., Weber J.R., Weiser T., Kettenmann H. & Hanisch U.K. Induction of potassium channels in mouse brain microglia: cells acquire responsiveness to pneumococcal cell wall components during late development. Neuroscience 89: 1379-1390, 1999.

Dreyer F. Peptide toxins and potassium channels. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 115: 94-136, 1990.

Eder C. Ion channels in microglia (brain macrophages). Am. J. Physiol. 275: C327-C342, 1998.

Eder C., Fischer H.G., Hadding U. & Heinemann U. Properties of voltage-gated currents of microglia developed with macrophage colony-stimulating factor. Pflügers Arch. 430: 526-533, 1995a.

Eder C., Fischer H.G., Hadding U. & Heinemann U. Properties of voltage-gated potassium currents of microglia differentiated with granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor. J. Membr. Biol. 147: 137-146, 1995b.

Eder C., Klee R. & Heinemann U. Blockade of voltage-gated outward K^+ currents of ramified murine microglia by scorpion peptide toxins. Neurosci. Lett. 219: 29-32, 1996.

Eder C., Klee R. & Heinemann U. Distinct soluble astrocytic factors induce expression of outward K^+ currents and ramification of brain macrophages. Neurosci. Lett. 226: 147-150, 1997a.

Eder C., Klee R. & Heinemann U. Pharmacological properties of Ca^{2+}-activated K^+ currents of ramified murine brain macrophages. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 356: 233-239, 1997b.

Eder C., Klee R. & Heinemann U. Involvement of stretch-activated Cl^- channels in ramification of murine microglia. J. Neurosci. 18: 7127-7137, 1998.

Eder C., Schilling T., Heinemann U., Haas D., Hailer N. & Nitsch R. Morphological, immunophenotypical and electrophysiological properties of resting microglia in vitro. Eur. J. Neurosci. 11: 4251-4261, 1999.

Fischer H.G., Eder C., Hadding U. & Heinemann U. Cytokine-dependent K^+ channel profile of microglia at immunologically defined functional states. Neurosci. 64: 183-191, 1995.

Frei K., Siepl C., Groscurth P., Bodmer S., Schwerdel C. & Fontana A. Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-g-treated microglial cells. Eur. J. Immunol. 17: 1271-1278, 1987.

Gallin E.K. Ion channels in leukocytes. Physiol. Rev. 71: 775-811, 1991.

Gallin E.K. & Sheehy P.A. Differential expression of inward and outward potassium currents in the macrophage-like cell line J774.1. J. Physiol. 369: 475-499, 1985.

Garber S.S. & Cahalan M.D. Volume-regulated anion channels and the control of a simple cell behavior. Cell. Physiol. Biochem. 7: 229-241, 1997.

Gill D.R., Hyde S.C., Higgins C.F., Valverde M.A., Mintenig G.M. & Sepulveda F.V. Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance p-glycoprotein. Cell 71: 23-32, 1992.

Giulian D. Microglia and neuronal dysfunction. In: Neuroglia (Eds.: H. Kettenmann, B.R. Ransom), New York, Oxford: Oxford University Press, pp. 671-684, 1995.

Giulian D. & Corpuz M. Microglial secretion products and their impact on the nervous system. Adv. Neurol. 59: 315-320, 1993.

Grissmer S., Lewis R.S. & Cahalan M.D. Ca^{2+}-activated K^+ channels in human leukemic T cells. J. Gen. Physiol. 99: 63-84, 1992.

Grissmer S., Nguyen A.N. & Cahalan M.D. Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectively, and pharmacology. J. Gen. Physiol. 102: 601-630, 1993.

Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B. & Sigworth F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers Arch. 391: 85-100, 1981.

Heinemann U., Konnerth A., Pumain R. & Wadman W.J. Extracellular calcium and potassium concentration changes in chronic epileptic brain tissue. In: Advances in Neurology/Basic mechanism of the epilepsies (Eds.: Delgado-Escueta AV, Ward AA, Woodbury DM, Porter RJ), pp. 641-661, Raven Press, New York, 1986.

Henderson L.M., Chappell J.B. & Jones O.T.G. Internal pH changes associated with the activity of NADPH oxidase of human neutrophils: further evidence for the presence of an H^+ conducting channel. Biochem. J. 251: 563-567, 1988.

Hertz L., Juurlink B.H.J., Fosmark H. & Schousboe A. Astrocytes in primary cultures. In: Neuroscience approached through cell culture, Vol. 1, S.E. Pfeiffer, ed. CRC Press, Boca Ranton, FL, pp. 175-186, 1982.

Hille B. Ionic channels of excitable membranes. Sunderland, MA: Sinauer, 1992.

Ilschner S. & Brandt R. The transition of microglia to a ramified phenotype is associated with the formation of stable acetylated and detyrosynated microtubules. Glia 18: 129-140, 1996.

Imredy J.P., Chen C. & MacKinnon R. A snake toxin inhibitor of inward rectifier potassium channel ROMK1. Biochemistry 37: 14867-14874, 1998.

Ishii T.M., Silvia C., Hirschberg B., Bond C.T., Adelman J.P. & Maylie J. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11651-11656, 1997.

Johnson B.D. & Byerly L. A cytoskeletal mechanism for Ca^{2+} channel metabolic dependence and inactivation by intracellular Ca^{2+}. Neuron 10: 797-804, 1993.

Joiner W.J., Wang L.Y., Tang M.D. & Kaczmarek L.K. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11013-11018, 1997.

Kapus A., Romanek R., Qu A.Y., Rotstein O.D. & Grinstein S.. A pH-sensitive and voltage-dependent proton conductance in the plasma membrane of macrophages. J. Gen. Physiol. 102: 729-760, 1993.

Kettenmann H., Hoppe D., Gottmann K., Banati R. & Kreutzberg G.W. Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. J. Neurosci. Res. 26: 278-287, 1990.

Kim S.Y., Silver M.R. & DeCoursey T.E. Ion channels in human THP-1 monocytes. J. Membr. Biol. 152: 117-130, 1996.

Klee R., Heinemann U. & Eder C. Changes in proton currents in murine microglia induced by cytoskeletal disruptive agents. Neurosci. Lett. 247: 191-194, 1998.

Klee R., Heinemann U. & Eder C. Voltage-gated proton currents in microglia of distinct morphology and functional state. Neuroscience 91: 1415-1424, 1999.

Kreutzberg G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. TINS 19: 312-318, 1996.

Kubo Y., Baldwin T.J., Jan Y.N. & Jan L.Y. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. Nature 362: 127-133, 1993.

Küst B.M., Biber K., van Calker D. & Gebicke-Haerter P.J. Regulation of K^+ channel mRNA expression by stimulation of adenosine A_{2a}-receptors in cultured rat microglia. Glia 25: 120-130, 1999.

Lewis R.S. & Cahalan M.D. Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca^{2+} and transmembrane Ca^{2+} current in human leukemic T cells. Cell Regulation. 1: 99-112, 1989.

Lewis R.S. & Cahalan M.D. Potassium and calcium channels in lymphocytes. Annu. Rev. Immunol. 13: 623-653, 1995.

Lewis R.S., Ross P.E. & Cahalan M.D. Chloride channels activated by osmotic stress in T lymphocytes. J. Gen. Physiol. 101: 801-826, 1993.

Ling E.A. & Wong W.C. The origin and nature of ramified and ameboid microglia: A historical review and current concepts. Glia 7: 9-18, 1993.

Liu W., Brosnan C.F., Dickson D.W. & Lee S.C. Macrophage colony-stimulating factor mediates astrocyte-induced microglial ramification in human fetal central nervous system culture. Am. J. Pathol., 145, 48-53, 1994.

Mahaut-Smith M.P. & Schlichter L.C. Ca^{2+}-activated K^+ channels in human B lymphocytes and rat thymocytes. J. Physiol. 415: 69-83, 1989.

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

McLarnon J.G., Sawyer D. & Kim S.U. Cation and anion unitary ion channel currents in cultured bovine microglia. Brain Res. 693: 8-20, 1995.

McLarnon J.G., Xu R., Lee Y.B. & Kim S.U. Ion channels of human microglia in culture. Neurosci. 78: 1217-1228, 1997.

McRae A., Dahlström A. & Ling E.A. Microglial in neurodegenerative disorders: emphasis on Alzheimer's disease. Gerontology 43: 95-108, 1997.

Moore S. & Thanos S. The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. Progr. Neurobiol. 48: 441-460, 1996.

Murphy J.K. & Forman H.J. Effects of sodium and proton pump activity on respiratory burst and pH regulation of rat alveolar macrophages. Am. J. Physiol. 264, L523-L532, 1993.

Nelson D.J., Jow B. & Jow F. Whole-cell currents in macrophages. I. Human monocyte-derived macrophages. J. Membr. Biol. 117: 29-44, 1990.

Nörenberg W., Gebicke-Haerter P.J. & Illes P. Inflammatory stimuli induce a new K^+ outward current in cultured rat microglia. Neurosci. Lett. 147: 171-174, 1992.

Nörenberg W., Gebicke-Haerter P.J. & Illes P. Voltage-dependent potassium channels in activated rat microglia. J. Physiol. 475: 15-32, 1994a.

Nörenberg W., Illes P. & Gebicke-Haerter P.J. Sodium channel in isolated human brain macrophages (microglia). Glia 10: 165-172, 1994b.

Ohno K., Suzumura A., Sawada M. & Marunouchi T. Production of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor by cultured astrocytes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 169: 719-724, 1990.

Partiseti M., Choquet D., Diu A. & Korn H. Differential regulation of voltage-and calcium-activated potassium channels in human B lymphocytes. J. Immunol. 148: 3361-3368, 1992.

Partiseti M., Korn H. & Choquet D. Pattern of potassium channel expression in proliferating B lymphocytes depends upon the mode of activation. J. Immunol. 151: 2462-2470, 1993.

Phipps D.J., Branch D.R. & Schlichter L.C. Chloride-channel block inhibits T lymphocyte activation and signalling. Cell Signal 8: 141-149, 1996.

Schlichter L.C., Sakellaropoulos G., Ballyk B., Pennefather P.S. & Phipps D.J. Properties of K^+ and Cl^- channels and their involvement in proliferation of rat microglial cells. Glia 17: 225-236, 1996.

Schilling T., Quandt F.N., Cherny V.V., Zhou W., Heinemann U., DeCoursey T.E. & Eder C. Upregulation of Kv1.3 channels in microglia deactivated by TGF-β. - submitted, 2000.

Schmidtmayer J., Jacobsen C., Miksch G. & Sievers J. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: Membrane currents. Glia 12: 259-267, 1994.

Shinji H., Kaiho S., Nakano T. & Yoshida T. Reorganization of microfilaments in macrophages after LPS stimulation. Exp. Cell. Res. 193, 127-133, 1991.

Sievers J., Parwaresch R. & Wottge H.U. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. Glia, 12, 245-258, 1994a.

Sievers J., Schmidtmayer J. & Parwaresch R. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells when cultured on astrocytes. Anat. Anz. 176: 45-51, 1994b.

Somjen G.G., Aitken P.G., Czeh G.L., Herreras O., Jing J. & Young J.N. Mechanism of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. Can. J. Physiol. and Pharmacol. 70: S248-254, 1992.

Steinert M. & Grissmer S. Novel activation stimulus of chloride channels by potassium in human osteoblasts and human leukaemic T lymphocytes. J. Physiol. 500: 653-660, 1997.

Stoddard J.S., Steinbach J.H. & Simchowitz L. Whole cell Cl^- currents in human neutrophils induced by cell swelling. Am. J. Physiol. 265: C156-C165, 1993.

Strange K., Emma F. & Jackson P.S. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. Am. J. Physiol. 270: C711-C730, 1996.

Streit W. The role of microglia in brain injury. Neurotoxicol. 17: 671-678, 1996.

Tanaka J. & Maeda N. Microglial ramification requires nondiffusible factors derived from astrocytes. Exp. Neurol. 137: 367-375, 1996.

Verdon B., Winpenny J.P., Whitfield K.J., Argent B.E. & Gray M.A. Volume-activated chloride currents in pancreatic duct cells. J. Membr. Biol. 147: 173-183, 1995.

Visentin S., Agresti C., Patrizio M. & Levi G. Ion channels in rat microglia and their different sensitivity to lipopolysaccharide and interferon-γ. J. Neurosci. Res. 42: 439-451, 1995.

Walz W., Ilschner S., Ohlemeyer C., Banati R. & Kettenmann H. Extracellular ATP activates a cation conductance and a K^+ conductance in cultured microglial cells from mouse brain. J. Neurosci. 13: 4403-4411, 1993.

Wang W.H., Cassola A. & Giebisch G. Involvement of actin cytoskeleton in modulation of apical K channel activity in rat collecting duct. Am. J. Physiol. 267: F592-F598, 1994.

Wekerle H. Antigen presentation. In: Neuroglia (Eds.: Kettenmann H, Ransom BR), New York, Oxford: Oxford University Press, pp. 685-699, 1995.

White H.S., Chow S.Y., Yen-Chow Y.C. & Woodbury D.M. Effect of elevated potassium on the ion content of mouse astrocytes and neurons. Can. J. Physiol. Pharmacol. 70: S263-268, 1992.

Zhou W., Cayabyab F.S., Pennefather P.S., Schlichter L.C. & DeCoursey T.E. HERG-like K^+ channels in microglia. J. Gen. Physiol. 111: 781-794, 1998.

Zielasek J. & Hartung H.P. Molecular mechanisms of microglial activation. Adv. Neuroimmunol. 6: 191-222, 1996.

5. Eigene Veröffentlichungen im Original

Ref. #1: Eder C., Klee R. & Heinemann U. Distinct soluble astrocytic factors induce expression of outward K^+ currents and ramification of brain macrophages. Neurosci. Lett. 226: 147-150, 1997a.

Ref. #2: Eder C., Schilling T., Heinemann U., Haas D., Hailer N. & Nitsch R. Morphological, immunophenotypical and electrophysiological properties of resting microglia in vitro. Eur. J. Neurosci. 11: 4251-4261, 1999.

Ref. #3: Schilling T., Quandt F.N., Cherny V.V., Zhou W., Heinemann U., DeCoursey T.E. & Eder C. Upregulation of Kv1.3 channels in microglia deactivated by TGF-β. Am. J. Physiol. (Cell Physiol.) 279: C1123-C1134, 2000.

Ref. #4: Eder C., Klee R. & Heinemann U. Pharmacological properties of Ca^{2+}-activated K^+ currents of ramified murine brain macrophages. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 356: 233-239, 1997b.

Ref. #5: Eder, C., R. Klee, and U. Heinemann. Blockade of voltage-gated outward K^+ currents of ramified murine microglia by scorpion peptide toxins. Neurosci. Lett. 219: 29-32, 1996.

Ref. #6: Eder C, Klee R. & Heinemann U. Involvement of stretch-activated Cl^- channels in ramification of murine microglia. J. Neurosci. 18: 7127-7137, 1998.

Ref. #7: Klee R, Heinemann U. & Eder C. Voltage-gated proton currents in microglia of distinct morphology and functional state. Neuroscience 91: 1415-1424, 1999.

Ref. #8: Klee R, Heinemann U. & Eder C. Changes in proton currents in murine microglia induced by cytoskeletal disruptive agents. Neurosci. Lett. 247: 191-194, 1998.

Ref. #9: Eder C. Ion channels in microglia (brain macrophages). Am. J. Physiol. 275: C327-C342, 1998.

6. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Dr. rer. nat. Claudia Eder

Geburtsdatum, -ort: 23. September 1965, Leipzig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

9/72 - 8/80	Polytechnische Oberschule, Leipzig
9/80 - 8/84	Erweiterte Oberschule, Leipzig
8/84	Abitur

Studium:

9/84 - 8/89	Biologie-Studium - Fachrichtung Physiologie - an der Staatlichen Universität Kasan in Russland
8/89	Diplom

Berufstätigkeit:

9/89 - 9/91	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Neurobiologie in Magdeburg
10/91 - 12/94	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln
12/94	Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
seit 1/95	wissenschaftliche Assistentin am Institut für Physiologie der Charité an der Humboldt-Universität zu Berlin
6/97 - 5/98	Forschungsaufenthalt am Department of Physiology and Biophysics, University of California at Irvine, USA

7. Erklärung

Die vorliegende Schrift wurde selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt. Es werden die Daten von insgesamt acht eigenen Publikationen zusammengefaßt und diskutiert. Alle vorliegenden Arbeiten wurden von mir selbständig konzipiert und publiziert. Die elektrophysiologischen Experimente der von mir als Erstautorin publizierten Artikel wurden praktisch vollständig von mir durchgeführt und analysiert. Bei diesen Arbeiten war Rolf Klee an der Vorbereitung einiger Experimente sowie an der Erstellung der Abbildungen beteiligt. Die Arbeit Eder et al., 1999 entstand in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Nitsch, die die morphologischen und immunologischen Parameter der Mikrogliazellen bestimmte. Die experimentellen Arbeiten zu den von mir als Letztautorin publizierten Manuskripte wurden unter meiner Anleitung von Rolf Klee bzw. Tom Schilling durchgeführt. Einige experimentelle Daten der Arbeit Schilling et al., 2000 wurden im Rahmen einer Kooperation mit Prof. DeCoursey in Chicago gewonnen. Bis auf die erwähnten Kooperationen wurden alle Experimente im Labor von Prof. Heinemann durchgeführt, wobei Prof. Heinemann das Vorankommen der Arbeit durch viele hilfreiche Diskussionen unterstützte.