

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Klinik für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Freund

**Der Einfluß von
Tumor-Nekrose-Faktor- α auf
elektrophysiologische Eigenschaften kultivierter
corticaler Astrocyten**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Dierk Oel

2001

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Univ.-Prof. Dr.med. Dieter Häussinger, Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. H. Köller

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Luhmann

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	5
1. Immunreaktionen im Zentralen Nervensystem	5
2. TNF- α und seine Wirkungen an Zellen des ZNS	6
2.1. Wirkungen auf Zellen des ZNS	6
2.2. Biochemie und intrazelluläre Signalwege	8
3. Wirkungsweise der Proteinkinase C	10
3.1. Effekte an Astrocyten	10
3.2. Aktivatoren und Inhibitoren der Proteinkinase C	12
4. Fragestellung	17
II. Material und Methoden.....	18
1. Herstellung der Astrocytenkultur	18
1.1. Material und Lösungen	18
1.2 Präparation	20
1.3. Zelldissoziation.....	20
1.4. Zellkultivierung und -reinigung.....	21
1.5 Passage der Astrocyten	21
2. Patch-Clamp-Technik.....	22
2.1. Medien für die Patch-Clamp-Messungen	22
2.2 Versuchsaufbau.....	23
2.3 Herstellung und Füllen der Patch-Pipetten	26
2.4 Durchführung eines Patch-Clamp-Experimentes	27
3. Funktionsprinzip der Voltage-Clamp-Messung.....	29
3.1. Ersatzschaltbild der Zellmembran	30
3.2. Der Voltage-Clamp-Verstärker.....	31
4. Messung und Auswertung der Daten	34
4.1. Das Programm „Strom-Spannungs-Kennlinie“	34
4.2. Statistische Auswertung.....	35

III. Ergebnisse.....	36
1. Einfluß von TNF- α auf das Membranpotential kultivierter Astrocyten	33
2. Einfluß von Agonisten und Antagonisten der Proteinkinase C auf die TNF- α induzierte Depolarisation von kultivierten Astrocyten	37
3. Einfluß von Ba ²⁺ auf die TNF- α induzierte Depolarisation kultivierter Astrocyten	40
4. Wirkungen von TNF- α auf den glialen K ⁺ -Strom	41
IV. Diskussion.....	49
1. Ergebnisse dieser Arbeit	49
2. Eigenschaften der Astrogliakultur.....	50
2.1 Besonderheiten der Kulturbedingungen	50
2.2. Das Membranpotential von Astrocyten	48
3. Die Rolle der Proteinkinase C bei der TNF- α -induzierten Depolarisation von Astrocyten	54
4. Der Einfluß von Zytokinen auf K ⁺ -Ströme in Oligodendrocyten und Mikrogliazellen	56
5. Der Einfluß von TNF- α auf elektrophysiologische Eigenschaften von Neuronen.....	58
6. Die funktionelle Bedeutung der Veränderung elektrophysiologischer Eigenschaften von Astrocyten durch TNF- α	59
6.1. Die funktionelle Bedeutung des K _{IR}	59
6.2. Mögliche funktionelle Auswirkungen der Veränderung glialer K ⁺ -Ströme durch TNF- α	60
V. Literaturverzeichnis.....	61
VI. Zusammenfassung	67

I. Einleitung

1. Immunreaktionen im Zentralen Nervensystem

Lange Zeit wurde das Gehirn als ein „weißer Fleck“ auf der Landkarte des Immunsystems betrachtet. In Experimenten zeigte sich, daß heterologe Gewebstransplantate im Zentralen Nervensystem (ZNS) oft nur inkomplett oder gar nicht abgestoßen werden. Diese Toleranz wurde unter anderem durch eine fehlende lymphatische Drainage, das Vorhandensein der Blut-Hirn-Schranke, sowie das Fehlen einer konstitutiven Expression von MHC-Molekülen („Major Histocompatibility Complex“) im Gehirn, die Voraussetzung für eine spezifische Immunantwort sind, erklärt.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß es auch im ZNS Immunreaktionen gibt, die denen in anderen Organsystemen ähneln können: Aktivierte T-Lymphocyten können die Blut-Hirn-Schranke passieren, Mikroglia und Astrocyten können Antigene präsentieren (*Hohlfeld et al., 1995*), und auch Neurone können MHC-Antigene exprimieren (*Neumann et al., 1995*).

Eine zentrale Regulatorfunktion bei Immunantworten und Entzündungsreaktionen im Gehirn übernehmen Zytokine, die sowohl von ins Nervensystem eingewanderten Zellen, als auch von Mikroglia und Astrocyten gebildet werden können. Diese Polypeptide besitzen vielfältige Funktionen, und ihr Effekt ergibt sich im Zusammenspiel verschiedener, teilweise antagonistischer Faktoren. Bislang sind 18 Interleukine (IL-1 bis IL-18), mehrere Interferone (IFN- α , - β , - γ , etc.), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF- α , β) und viele andere Faktoren isoliert worden.

Man kann diese Substanzen in zwei Gruppen unterteilen (*Woodrooffe, 1995*):

1. Proinflammatorische Th1-Zytokine, die zellvermittelte Immunreaktionen fördern (z.B. IL-1, IL-6, TNF- α)
2. Antiinflammatorische Th2-Zytokine, die zellvermittelte Immunreaktionen hemmen, aber die Antikörperbildung fördern (z.B. IL-4, IL-10, TGF- β)

Zahlreiche Symptome bei Erkrankungen des ZNS kommen durch Interaktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α) mit dem neuroendokrinen System zustande. Fieber, Schlaf, Schmerzempfinden und Appetit konnten in Tierversuchen durch periphere oder direkt intrathekale Injektion dieser Zytokine beeinflusst werden (*Woodrooffe, 1995*).

Außerdem wurde eine Beteiligung von Zytokinen am Verlauf entzündlicher Erkrankungen des ZNS beschrieben. TNF- α und weitere Zytokine wurden in Makrophagen und Astrocyten in Läsionsherden bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS) und auch in deren Liquor nachgewiesen (*Hofmann et al., 1989; Franciotta et al., 1989*). In Verlaufsstudien konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von TNF- α m-RNA in Blutmonocyten und der Krankheitsaktivität gezeigt werden (*Rieckmann et al., 1994*). Auch an der Symptomatik einer bakteriellen Meningitis und an der Pathogenese der Demenz bei HIV-Enzephalopathie scheinen proinflammatorische Zytokine beteiligt zu sein (*Sharief et al., 1992; Epstein und Gendelman, 1993*).

In einigen Arbeiten richtete sich die Aufmerksamkeit auf die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen TNF- α und Gliazellen. Zahlreiche immunologische und elektrophysiologische Vorgänge in Gliazellen werden durch TNF- α induziert bzw. beeinflusst. TNF- α kann daher eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese von entzündlichen Krankheiten des ZNS, z.B. MS oder Meningitiden zugewiesen werden. Die Mechanismen und intrazellulären Signalwege der elektrophysiologischen Effekte von TNF- α sollen in dieser Arbeit untersucht werden.

2. TNF- α und seine Wirkungen auf Zellen des ZNS

2.1. Wirkungen auf Zellen des ZNS

TNF- α übt viele direkte Effekte auf Oligodendrocyten, Astrocyten und Endothelzellen im Gehirn aus. Große Bedeutung in Bezug auf Erkrankungen des ZNS kommt dem myelinotoxischen Effekt zu. In vitro führte die Inkubation von Oligodendrocyten mit TNF- α zu Myelinschäden und zur Lyse der Zellen (*Raine, 1997*). Dieser Teilaspekt der TNF- α -

Aktivität scheint bei der Myelinschädigung bzw. bei der Demyelinisierung im Rahmen der MS eine Rolle zu spielen.

TNF- α , IL-1 und IL-6 können sowohl in vitro, als auch in vivo eine Astrocytenproliferation induzieren (*Benveniste, 1992*). Als Reaktion auf unterschiedliche Läsionen wie Trauma, Ischämie oder Entzündung kommt es zu solch einer Reaktion, der sogenannten Astroglie. Sie ist gekennzeichnet durch Proliferation, Zellhypertrophie und eine gesteigerte Produktion des Sauren Gliazellproteins („Glial fibrillary acid protein“, GFAP), einem Bestandteil des Zytoskeletts der Astrocyten.

Außerdem ist TNF- α ein sehr starker Induktor für die Zytokinproduktion von Astrocyten. Eine Gruppe dieser Zytokine sind Kolonie-stimulierende-Faktoren (GM-CSF, G-CSF, M-CSF). Diese Moleküle wirken chemotaktisch auf Leukocyten, wodurch sie die Wanderung von Gra- nulocyten und Makrophagen zu Entzündungsherden im ZNS fördern. Zusätzlich verstärkt TNF- α die Expression seines eigenen Gens sowie die Produktion von IL-6 in Astrocyten (*Benveniste und Benos, 1995*).

TNF- α bewirkt eine Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen, z.B. ICAM-1 (*Ballestas und Benveniste, 1995*) oder VCAM-1 (*Winkler u. Benveniste, 1998*) auf der Oberfläche von Astrocyten, Mikroglia und cerebralen Endothelzellen. Dadurch werden Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke verändert und der Eintritt von Entzündungszellen in das Gehirn erleichtert. Dies ist beispielsweise bei der Schädigung der Blut-Hirn-Schranke im Verlauf einer bakteriellen Meningitis der Fall (*Sharief et al., 1992*).

Die Effekte von TNF- α an Astrogliazellen sind aber nicht nur immunologischer Natur. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß TNF- α auch elektrophysiologische Eigenschaften der Astrocyten verändert.

Inkubation von Astrocyten in Liquor von Patienten mit septischer Meningitis führte zu einer Reduktion des Membranpotentials um fast 40 mV im Vergleich zu Astrocyten, die in Liquor von Patienten mit aseptischer Meningitis inkubiert worden waren. Die Depolarisation durch Meningitis-Liquor konnte durch neutralisierende TNF- α -Antikörper unterdrückt werden (*Köller, 1997*). Diese depolarisierende Wirkung von TNF- α auf Astrocyten konnte auch bei direkter Applikation nachgewiesen werden (*Köller et al., 1996b*). Eine weitere Wirkung von TNF- α ist die Erhöhung der intrazellulären Na⁺-Konzentration in Astrocyten, die durch eine

Aktivierung des Na^+/H^+ -Transporters hervorgerufen wird (Benos *et al.*, 1994). Auch die intrazelluläre Konzentration von Calcium steigt nach $\text{TNF-}\alpha$ -Gabe an. Wahrscheinlich liegt dieser Erhöhung ein Einstrom von Ca^{2+} -Ionen zugrunde (Köller *et al.*, 1996b).

Über welche Signalwege $\text{TNF-}\alpha$ diese Veränderungen bewirkt ist noch unklar. Zur biochemischen Struktur und Signalwegen des $\text{TNF-}\alpha$ sind zahlreiche Untersuchungen veröffentlicht worden.

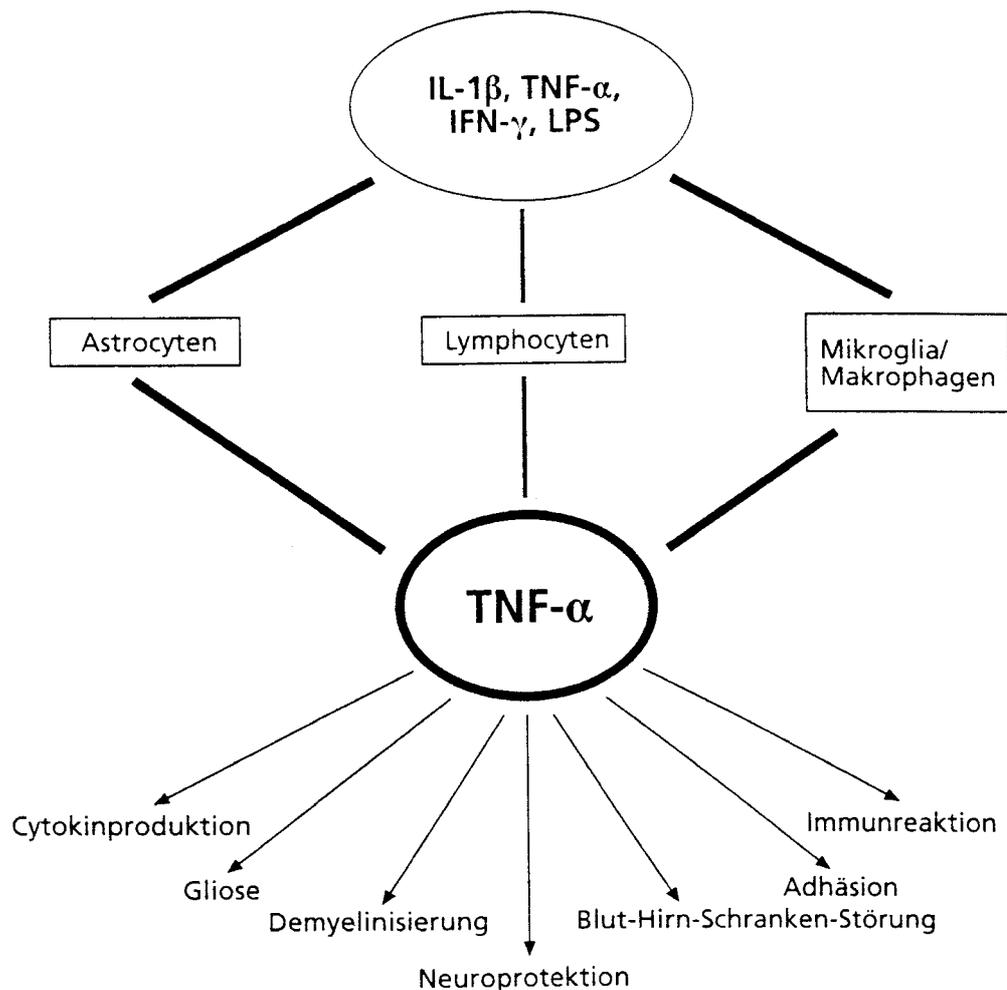


Abbildung 1: $\text{TNF-}\alpha$ als multifunktionales Zytokin im ZNS (aus Rieckmann und Hartung, 1997)

2.2. Biochemie und intrazelluläre Signalwege

Tumor-Nekrose-Faktoren sind Zytokine, die an vielfältigen biochemischen Vorgängen mitwirken. Sie sind z.B. Teil der Akute-Phase-Reaktion auf Infektionen oder Verletzungen und

besitzen außerdem regulative Funktionen bei Zellwachstum und -differenzierung. Es existieren zwei verwandte Tumor-Nekrose-Faktoren: TNF- α (Cachectin) und TNF- β (Lymphotoxin).

TNF- α existiert als lösliches, nicht-glykolisiertes Molekül aus 152 Aminosäuren (17,4 kDa), oder in membrangebundener Form (26 kDa) auf der Oberfläche von Monocyten und anderen Zellen mit zytotoxischer Aktivität. Vorstufe ist ein Propeptid, von dem 76 Aminosäuren abgespalten werden (*Austyn und Wood, 1993*).

Der Name der Substanz rührt von ihren zytostatischen Effekten auf Tumorzellen her, denn TNF- α löst in vivo bei experimentellen Tumoren hämorrhagische Nekrosen aus. Der Beiname Cachectin wurde ursprünglich für ein Molekül verwendet, das bei Tieren Auszehrung oder Kachexie, vor allem während chronischer Infektionen oder maligner Prozesse, auslöste. Später stellte sich heraus, daß dieses Molekül mit TNF- α identisch ist.

TNF- α wird zu einem großen Teil von aktivierten Makrophagen und Lymphocyten gebildet. NK (Natürliche-Killer-)-Zellen, glatte Muskelzellen, aktivierte Keratinocyten und Zellen im Gehirn (Mikroglia, Astrocyten) sind ebenfalls in der Lage TNF- α zu synthetisieren. TNF- α wird als Antwort auf eine Vielzahl von unterschiedlichen infektiösen und entzündlichen Stimuli, z.B. Virus-, Pilz- und Parasiteninfektionen, Endotoxin, Enterotoxin und Komplement- faktoren, gebildet (*Austyn und Wood, 1993*). Auch Zytokine wie IL-1, IL-2, IFN- γ und TNF- α selbst, im Sinne einer positiven Rückkopplung, können seine Produktion anregen (*Chung und Benveniste, 1990*).

Seine Wirkungen entfaltet TNF- α durch Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Strukturanalysen ergaben, daß 2 Rezeptortypen existieren: einer mit einem Molekulargewicht von 55 kDa, der andere mit 75 kDa. Die meisten seiner Effekte, z.B. antivirale Aktivität, Apoptoseinduktion und Zytokinproduktion, entfaltet TNF- α über den TNF-Rezeptor-1 (TNFR-1, 55 kDa), während der TNFR-2 (75 kDa) hauptsächlich mit der Aktivierung und Proliferation von T-Lymphocyten in Zusammenhang gebracht wird (*Benveniste und Benos, 1995*).

Eine Eigenschaft von TNF- α ist die große Bandbreite zellulärer Reaktionen, die in unterschiedlichen Zelltypen ausgelöst werden, mit einer Beeinflussung der Expression zahlreicher verschiedener Gene. Da bis jetzt nur 2 unterschiedliche TNF-Rezeptoren

gefunden worden sind, erklärt man die Heterogenität der zellulären Veränderungen, die TNF- α induziert, durch mehrere verschiedene intrazelluläre Postrezeptor-Signalwege (sogenannte „second-messenger“).

Bei der intrazellulären Signaltransduktion von TNF- α -Effekten lassen sich mehrere unabhängige Signalwege unterscheiden. In zahlreichen Experimenten wurde eine Aktivierung der Phospholipase A₂ nachgewiesen (Schütze *et al.*, 1992a). Phospholipase A₂ katalysiert die Umwandlung von Phospholipiden aus der Zellmembran zu Arachidonsäure, die Ausgangsstoff für die Bildung von Prostaglandinen und Leukotrienen ist, und selbst Funktionen als „second-messenger“ übernimmt.

Andere Signalwege beinhalten die Aktivierung von Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC), Tyrosinkinase (TK) und Phosphatidylcholin-spezifischer Phospholipase C (PC-PLC; Benveniste und Benos, 1995, Schütze *et al.*, 1992a).

Proteinkinasen, die durch TNF- α aktiviert worden sind, vollziehen ihre Wirkungen durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die damit ein entscheidendes Verbindungsstück der Signalkaskade von der Zellmembran bis zum Zellkern darstellen. Als „third-messenger“ von Signalwegen des TNF- α wurde der Transkriptionsfaktor NF κ B nachgewiesen (Schütze *et al.*, 1992a). NF κ B kann durch PKA und PKC aktiviert werden. TNF- α aktiviert über die PC-PLC eine Sphingomyelinase, die die Freisetzung von Ceramid aus der Zellmembran katalysiert. Auch Ceramid beeinflusst die Proteinexpression durch Aktivierung von NF κ B (Schütze *et al.*, 1992b).

Über die Signalwege, die TNF- α in Astrogliazellen aktiviert, ist noch wenig bekannt. In einigen Untersuchungen wurde Proteinkinase C als wichtiger intrazellulärer Botenstoff nachgewiesen.

3. Wirkungsweise der Proteinkinase C

3.1. Effekte an Astrocyten

In Astrocyten nimmt die Proteinkinase C eine zentrale Funktion als „second-messenger“ und in der Regulation der Phosphorylierung von Proteinen ein. Dies wird z.B. deutlich, wenn

kultivierte Astrogliazellen in Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), einem PKC-Aktivator, inkubiert werden. Die Astrocyten verändern ihre Morphologie, indem sie sich von flachen, polygonalen in sternförmige Zellen mit langen Fortsätzen umwandeln. Außerdem zeigte sich in diesem Experiment eine Steigerung der Phosphorylierung verschiedener Proteine, z.B. Vimentin und GFAP (*Harrison u. Mobley, 1990*).

PKC ist auch Botenstoff bei der Signalübertragung von Zytokinen. Beispielsweise konnte die Expression von IL-6 nach Stimulation von Astrocyten durch IL-1 β und TNF- α mit Inhibitoren der PKC verhindert werden (*Norris et al., 1994*). In dieser Arbeit wurde außerdem ein direkter Anstieg der intrazellulären PKC-Aktivität nach Inkubation der Astrocyten in TNF- α gemessen.

TNF- α und Interleukin 1- β stimulieren die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1. Auch dieser Vorgang scheint über eine Aktivierung der PKC zu verlaufen (*Ballestas und Benveniste, 1995*).

In einer anderen Arbeit wurde die Induktion von MHC II- Proteinen in Astrocyten durch Interferon- γ (INF- γ) untersucht. Die Expression von MHC II konnte durch Amilorid und EIPA (Ethylisopropylamilorid), beides Inhibitoren des Na⁺/H⁺ -Austauschers, und durch H7, einen PKC-Inhibitor, unterdrückt werden (*Benveniste et al., 1991*). Die Autoren schlossen daraus, daß die INF- γ -induzierte Expression von MHC II sowohl mit einer Aktivierung der PKC, als auch mit einem Einstrom von Na⁺ verbunden ist.

Große Bedeutung hat PKC als Modulator von spannungsabhängigen Ionenkanälen in Neuronen und anderen Zellen des ZNS. Beschrieben wurden Veränderungen von K⁺ (*Farley und Auerbach, 1986; Higashida und Brown, 1986*), Cl⁻ (*Madison et al., 1986*), Ca²⁺ (*Rane und Dunlap, 1986*) und Na⁺-Leitfähigkeiten (*Lotan et al., 1990*) nach PKC-Aktivierung durch Phorbolster oder Diacylglycerin.

Auch gliale Ionenströme können durch die PKC beeinflußt werden (*MacVicar et al., 1987; Åkerman et al., 1988*). Beispielsweise bewirkt die Aktivierung der PKC in kultivierten Astrocyten aus dem Rückenmark, die eine relativ hohe Na⁺-Leitfähigkeit besitzen, eine Reduktion von Na⁺-Strömen (*Thio u. Sontheimer, 1993*).

Für die Planung und Durchführung von Experimenten, in denen eine Beteiligung der Proteinkinase C an intrazellulären Signalkaskaden untersucht wird, ist es notwendig, sich

ein Bild von der Struktur und den verschiedenen Regulationsmöglichkeiten der PKC zu machen.

3.2. Aktivatoren und Inhibitoren der Proteinkinase C

Die Phosphorylierung von Enzymen durch spezifische Proteinkinasen ist ein weitverbreiteter Mechanismus zur Regulation von Enzymaktivitäten. Nahezu alle intrazellulären Signalwege in Eukaryonten bedienen sich der Proteinphosphorylierung, um Signale zu erzeugen und weiter- zuleiten.

Die Phosphorylierung eines Proteins ist eine spezifische enzymatische Reaktion, bei der einem Protein, das als Substrat dient, eine spezifische Proteinkinase zugeordnet ist. Die Proteinkinase sind Phosphotransferasen. Sie katalysieren die Übertragung einer Phosphatgruppe von Adenosin-Triphosphat (ATP) auf eine Akzeptor-Aminosäure im Substratprotein.

Das Produkt der Proteinphosphorylierung ist ein Phosphatester, der bei neutralem pH-Wert zwei negative Ladungen trägt. Diese Änderung des Ladungszustands des Proteins in definierten Strukturbereichen ist der entscheidende Aspekt der Proteinphosphorylierung, durch den die Aktivität eines Proteins verändert und reguliert werden kann. Die Phosphorylierung von Proteinen erfolgt dabei überwiegend an Serin- bzw. Threonin-Resten (Ser- bzw. Thr-Reste) und an Tyrosin-Resten.

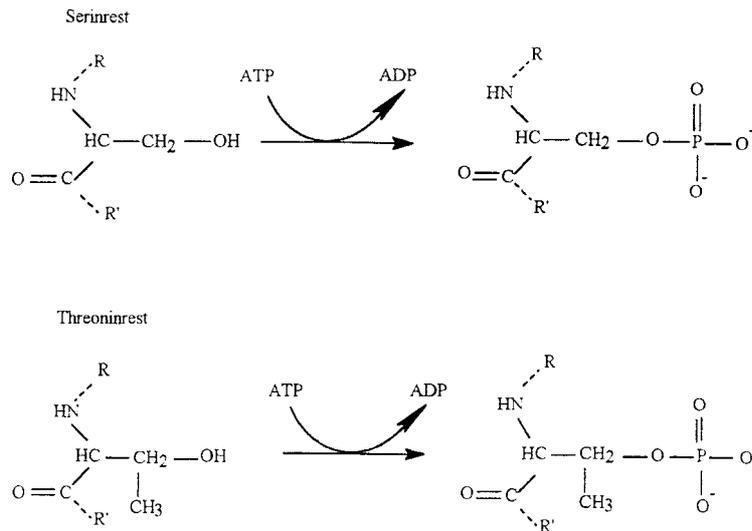


Abbildung 2: Reaktionen Ser/Thr spezifischer Proteinkinasen. R und R' stellen die Proteinreste dar

Die Familie der Proteinkinase C zeigt eine beträchtliche Heterogenität. In Säugetieren sind bis jetzt anhand verschiedener Kriterien wie Aminosäuresequenz, Stimulierbarkeit und Regulation 12 verschiedene Subtypen entdeckt worden. Die Isoenzyme der Proteinkinase C (PKC) sind Ser/Thr- spezifische Proteinkinasen, zu deren Aktivierung die folgenden Kofaktoren nötig sind (*Nishizuka, 1992*):

- Ca^{2+}
- Phospholipid, z.B. Phosphatidylcholin
- Diacylglycerol (DAG)

In der Abwesenheit von DAG sind zur Aktivierung der PKC höhere Ca^{2+} -Konzentrationen notwendig als unter physiologischen Bedingungen erreicht werden. DAG steigert die Affinität der PKC zu Ca^{2+} , so daß das Enzym bereits bei physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert werden kann. Genügend hohe Konzentrationen von DAG können die benötigte Ca^{2+} -Konzentration noch weit unter die normale intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration senken.

Die Proteinkinase C ist somit ein Bestandteil von Signalübertragungswegen, in deren Verlauf Phospholipase C aktiviert wird und die Botenstoffe Inositol-(3,4,5,-)Trisphosphat (IP_3), Ca^{2+} und Diacylglycerol freigesetzt werden. Diese Signalkaskaden können durch die Bindung eines Moleküls an zwei Arten von extrazellulären Rezeptoren in Gang gesetzt werden:

Signalwege, die von Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgehen, leiten eine Stimulation der PKC ein, indem Phospholipase C γ aktiviert wird. Auch von G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren aus kann über Aktivierung der Phospholipase C β ein aktivierendes Signal auf die PKC ausgesandt werden (s. Abbildung 3).

In vielen Fällen wird nach Aktivierung der Signalwege, die PKC enthalten, eine länger andauernde Stimulation der PKC beobachtet, die auch biologische Effekte von langer Dauer nach sich ziehen kann. Diese Langzeitaktivierung läßt sich nicht allein über die Freisetzung von IP $_3$ und DAG nach Aktivierung der Phospholipase C erklären, da die Aktivierung auch dann beobachtet werden kann, wenn die mit dieser Signalkaskade verbundene Ca $^{2+}$ -Welle schon abgeklungen ist. Vor allem Phospholipide der Zellmembran, z.B. Phosphatidylcholin, stellen eine weitere bedeutsame Quelle für die Freisetzung von DAG dar und sind an der Langzeitaktivierung der PKC beteiligt. Eine Freisetzung von DAG aus Phosphatidylcholin kann durch Phospholipasen des Typs C oder D erfolgen (*Nishizuka, 1992*).

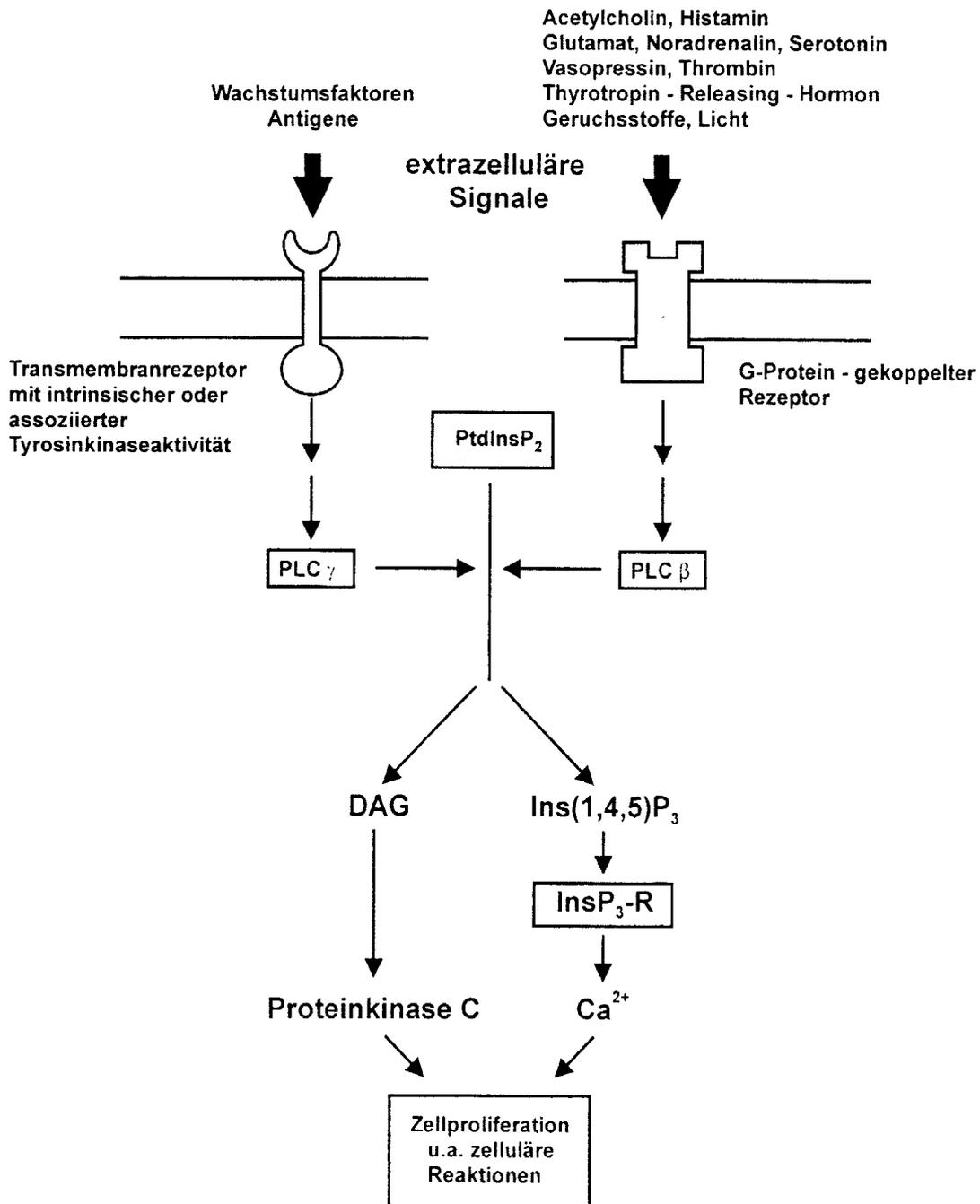


Abbildung 3: Bindung eines Moleküls an einen Membranrezeptor führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Diese katalysiert die Abspaltung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (Ins(1,4,5)P₃) aus Phosphatidyl-Inositolbisphosphat(PtdInsP₂). DAG aktiviert dann die Proteinkinase C, während InsP₃ nach Bindung an einen Rezeptor für die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern sorgt. Aus Gründen der Vereinfachung sind PtdInsP₃, PLC und DAG nicht in die Zellmembran eingezeichnet mit der sie assoziiert sind (aus Krauss, 1997).

Auch freie Fettsäuren aktivieren die PKC. Freie Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure, können durch Einwirkung der Phospholipase A₂ auf Phospholipide freigesetzt werden (*Nishizuka, 1992*)

Die Aktivierung der PKC ist mit einer Umverteilung des Enzyms vom Cytosol zur Zellmembran verbunden. Zwischen cytosolischer und membrangebundener Form der PKC existiert offenbar ein dynamisches Gleichgewicht, von dem angenommen wird, daß es mit Hilfe der hydrophoben Kofaktoren wie Phospholipiden und DAG in Richtung auf die Membranassoziation verschoben wird (*Krauss, 1997*). Es überrascht daher nicht, daß viele der Substratproteine der PKC Membranproteine sind und Ionenkanäle durch die PKC moduliert werden. Dies erklärt auch die Veränderung elektrophysiologischer Eigenschaften von Neuronen und Glia- zellen durch die PKC.

So scheint die Aktivierung der PKC z.B. eine Blockade glialer K⁺-Kanäle bewirken zu können. Die Folge ist eine Depolarisation der Astrocyten (*Åkerman et al., 1988*).

Für die Regulation der Kinaseaktivität sind zwei Abschnitte des Moleküls, die regulatorische und die katalytische Domäne mit dem aktiven Zentrum, von besonderer Bedeutung. In Abwesenheit der aktivierenden Kofaktoren ist die katalytische Domäne einer Autoinhibition durch die regulatorische Domäne unterworfen. In der regulatorischen Domäne findet sich eine Sequenz, die als sogenanntes Pseudosubstrat dient. Es ähnelt der Konsensussequenz für Phosphorylierungsstellen der PKC, besitzt aber keine phosphorylierbaren Ser- oder Thr-Reste. Man nimmt an, daß das aktive Zentrum durch Einlagerung der Pseudosubstratsequenz inhibiert ist. Bei Bindung aktivierender Kofaktoren, z.B. Ca²⁺ oder DAG, wird vermutlich eine Struktur der PKC stabilisiert, in der das aktive Zentrum für das Substrat zugänglich wird (*Krauss, 1997*).

Eine für die Identifizierung und Charakterisierung der Enzymfamilie der Proteinkinase C wert- volle Eigenschaft ist die Aktivierbarkeit durch Tumorpromotoren wie die Phorbolster, z.B. Tetradecanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA). PKC bindet TPA mit hoher Affinität an seine regulatorische Domäne und wird durch diese Bindung aktiviert. Die spezifische Aktivierbarkeit der PKC durch Phorbolster ist ein wichtiges Hilfsmittel, um ihre Beteiligung an Signalübertragungswegen in zellulären Modellsystemen nachzuweisen (*Krauss, 1997*).

Als Inhibitoren der PKC dienen Isoquinolinsulfonamide, z.B. 1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-2-Methylpiperazin (H7). Diese Moleküle entfalten ihre Effekte wahrscheinlich durch direkte Interaktion mit dem aktiven Zentrum der PKC (*Hidaka et al., 1984*).

4. Fragestellung

In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, daß TNF- α neben seiner Beteiligung an immunologischen Vorgängen auch elektrophysiologische Eigenschaften von Astrocyten verändert. Zum Beispiel induziert TNF- α eine Depolarisation von Astrogliazellen (*Köller, 1997; Köller et al., 1996b*).

Ziel dieser Arbeit war es, die elektrophysiologischen Veränderungen der Astrocyten, die zur Depolarisation führen, sowie die dabei beteiligten intrazellulären Signalwege in einem Zellsystem zu untersuchen.

Im Rahmen der Untersuchungen wurde besonders die Funktion der Proteinkinase C als intrazellulärer Botenstoff beleuchtet, da nachgewiesen worden ist, daß TNF- α in Astrocyten eine Aktivierung der PKC bewirkt (*Norris et al., 1994*). Zudem konnte in zahlreichen bisher veröffentlichten Arbeiten gezeigt werden, daß die Aktivierung der PKC zu Veränderungen von Ionenleitfähigkeiten in Astrocyten führt (*Thio und Sontheimer, 1993*).

II. Material und Methoden

1. Herstellung der Astrocytenkultur

Die Herstellung der Zellkulturen erfolgte im Neurochemischen Labor der Neurologischen Klinik in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Müller mit Unterstützung durch eine medizinisch-technische Assistentin.

1.1. Material und Lösungen

- **Wistar-Ratten, postnatal (P), P1-P3**
- **Präparationsbesteck**
 - 1 große Präparationsschere
 - 1 kleine Präparationsschere
 - 1 Pinzette, 12 cm, mit 1x2 Zähnen
 - 2 Mikro-Pinzetten, gebogen, Spitzen 0,4 mm, Nr.7
 - 1 Mikro-Pinzette, abgewinkelt, Spitzen 0,3 mm
 - 1 Mikro-Pinzette, gerade, Spitzen 0,15 mm, Nr.5
 - 1 Mikrospatel, Fa. Martin, Nr. 34-787-13
 - 1 Skalpell
- **sonstiges Präparationszubehör**
 - 1 Stereolupe
 - sterile Mullkompressen
 - 3 Bechergläser
 - 3 sterile PPN-Röhrchen, 50 ml (GREINER)
 - 1 Ständer für PPN-Röhrchen (GREINER)
 - 1 steriles PS-Röhrchen, 10 ml (GREINER)

kleine Petrischalen (35 x 10 mm)

- **Zellkulturmaterial**

sterile 10 ml-Pipetten aus Plastik

lange Pasteur-Pipetten

Zellkulturflaschen, 80 cm²

1 steriles Becherglas, abgedichtet mit Nylon-Gaze (Porengröße 60 µm)

Multischalen mit 48 Vertiefungen

runde Deckgläser (10 mm Durchmesser)

- **Lösungen**

Äther zur Narkose

70% Ethanol

DMEM (Dulbecco's Modified Medium, GIBCO, Eggenstein, Deutschland)

PBS (Phosphate Buffered Saline, GIBCO)

FCS-Medium (10% Foetales Kälberserum in DMEM; SIGMA, Deisenhofen, Deutschland)

N2-Medium: *(nach Bottenstein und Sato, 1979)*

75% DMEM (GIBCO)

25% Ham's F12 (GIBCO)

5,0 µg/ml Insulin (SIGMA)

100,0 µg/ml Transferrin (SIGMA)

5,2 ng/ml Natriumselenit (SIGMA)

16,0 µg/ml Putrescin (SIGMA)

7,0 ng/ml Progesteron (SIGMA)

2,0 mM Glutamin (SIGMA)

Laminin (BRL)

Poly-L-Lysin (SIGMA)

1.2 Präparation

Die neugeborenen Ratten wurden durch Äthernarkose getötet, und für einige Sekunden in 70% Ethanol gelegt, um die Keimzahl auf der Hautoberfläche zu reduzieren. Anschließend wurden sie dekapitiert und der Kopf auf eine sterile Mullkomresse gelegt. Die Haut wurde eingeschnitten und abpräpariert, und der Kopf mit der geraden Mikro-Pinzette fixiert. Das Präparierbesteck befand sich in Plastikbechern mit 70% Ethanol und wurde vor seiner Verwendung zweimal in PBS und einmal in DMEM in PPN-Röhrchen getaucht. Dies hat den Zweck, das Hirngewebe nicht durch Ethanol zu schädigen. Mit einer Schere wurde das Schädeldach durch zwei seitliche Schnitte und einen medianen Schnitt eröffnet und entfernt. Das Gehirn konnte nun mit einem Spatel herausgenommen und in den Deckel einer Petrischale gelegt werden. Danach wurden unter der Stereolupe beide Hemisphären mit dem Spatel durch einen medianen Sagittalschnitt voneinander gelöst und zur Seite geklappt. Die Hirnhäute wurden mit einer gebogenen Mikro-Pinzette entfernt, die Hemisphären mit einem Skalpell abgetrennt, zerkleinert und schließlich in ein PS-Röhrchen mit DMEM überführt.

1.3. Zelldissoziation

Das Hirngewebe wurde 1 min lang bei 1500 rpm (rotations per minute) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und durch 2 ml frisches DMEM ersetzt. Anschließend erfolgte eine Vereinzelung der Zellen durch Trituieren mit verschiedenen Pasteur-Pipetten, die unterschiedliche Öffnungsdurchmesser aufwiesen. Die Spitze der zuerst verwendeten Pipette hatte einen Durchmesser von 1 mm. Der Durchmesser der Spitze der folgenden Pipetten wurde durch Schmelzen über einer Flamme zuvor verkleinert, so daß die Öffnung schmaler wurde.

Nun wurden 8 ml DMEM zugesetzt, die Suspension durch die Nylon-Gaze gefiltert und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in FCS-Medium aufgenommen und auf 5 Zellkulturflaschen mit jeweils 15 ml FCS-Medium verteilt.

1.4. Zellkultivierung und -reinigung

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37⁰C, 10% CO₂ und mindestens 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach den ersten 4 Tagen und danach alle 2 Tage wurde das Medium gewechselt.

Nach ungefähr 10 Tagen waren die Zellen konfluent, d.h. nach mehreren Teilungen liegen die Zellkörper so dicht beisammen, daß sie sich berühren. Nun erfolgte eine Zellreinigung, indem die Kultur auf einem Inkubationsschüttler 12 Stunden lang bei 150 rpm geschüttelt wurde und anschließend der Kulturüberbestand, bestehend aus Neuronen, Mikroglia und Oligodendrocyten sowie der Lösung verworfen wurde. Dadurch wurden weitgehend reine Astrocytenkulturen erhalten.

1.5 Passage der Astrocyten

Nach dem Schütteln der Astrogliakultur, erfolgte ein 3-maliges Waschen mit PBS und eine Inkubation in 10 ml Trypsin / EGTA. Nachdem sich die Zellen von ihrer Unterlage gelöst hatten (mikroskopische Kontrolle), wurden 10 ml FCS-Medium hinzugefügt und die Zellen durch Trituieren resuspendiert. Dann wurden die Astrocyten in einem PS-Röhrchen 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, und das Pellet in 10 ml FCS-Medium gegeben.

Die Suspension wurde nun auf eine Multiwellplatte mit Deckgläschen verteilt. Diese Deckgläschen waren vorher jeweils für 12 Stunden in 0,1 mg Poly-L-Lysin / ml PBS inkubiert worden. Durch diese Behandlung ist gewährleistet, daß sich die Zellen an die Deckgläschen anheften.

Der Reinheitsgrad der Astrogliakultur wurde durch den immunhistochemischen Nachweis von GFAP in einer der Kulturen kontrolliert. GFAP ist ein für Astrocyten spezifisches Protein und wurde in mehr als 95% der Zellen in Kulturen, die im gleichen Labor auf gleiche Art und Weise hergestellt worden waren, nachgewiesen (*Stichel und Müller, 1992*).

Die elektrophysiologischen Untersuchungen dieser Arbeit erfolgten am gleichen oder folgendem Tag (Tag 1-2 in Kultur), wenn die meisten Astrocyten noch isoliert liegen. Danach bilden die Zellen durch Proliferation einen immer dichter werdenden Verbund. Sie stehen dann durch gap-junctions miteinander in Kontakt und bilden ein Synzytium (*Binmöller und Müller, 1992*).

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden nur isolierte Zellen verwendet, deren Membranpotential sich durch intrazelluläre Strominjektionen kontrollieren ließ.

2. Patch-Clamp-Technik

2.1. Medien für die Patch-Clamp-Messungen

2.1.1. Badlösung

150,0 mM NaCl

4,0 mM KCl

2,8 mM CaCl₂

1,0 mM MgCl₂

10,0 mM HEPES

10,0 mM Sucrose

pH 7,4 (mit 1M NaOH eingestellt)

2.1.2. Pipettenlösung

140,0 mM KCl

1,0 mM CaCl₂

2,0 mM MgCl₂

11,0 mM EGTA

10,0 mM HEPES

pH 7,4 (mit 1M KOH eingestellt)

2.1.3. Testsubstanzen und in den Untersuchungen verwendete Badkonzentrationen

Tumor-Nekrose-Faktor- α (150 U / ml)

0,1 μM Phorbol-12-myristat 13-acetat (PMA)

1 μM Staurosporin

25 μM 1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-2-methyl-piperazin (H7)

10 μM BaCl_2

Alle Substanzen wurden erworben bei der Fa. SIGMA, Deisenhofen, Deutschland.

2.2 Versuchsaufbau

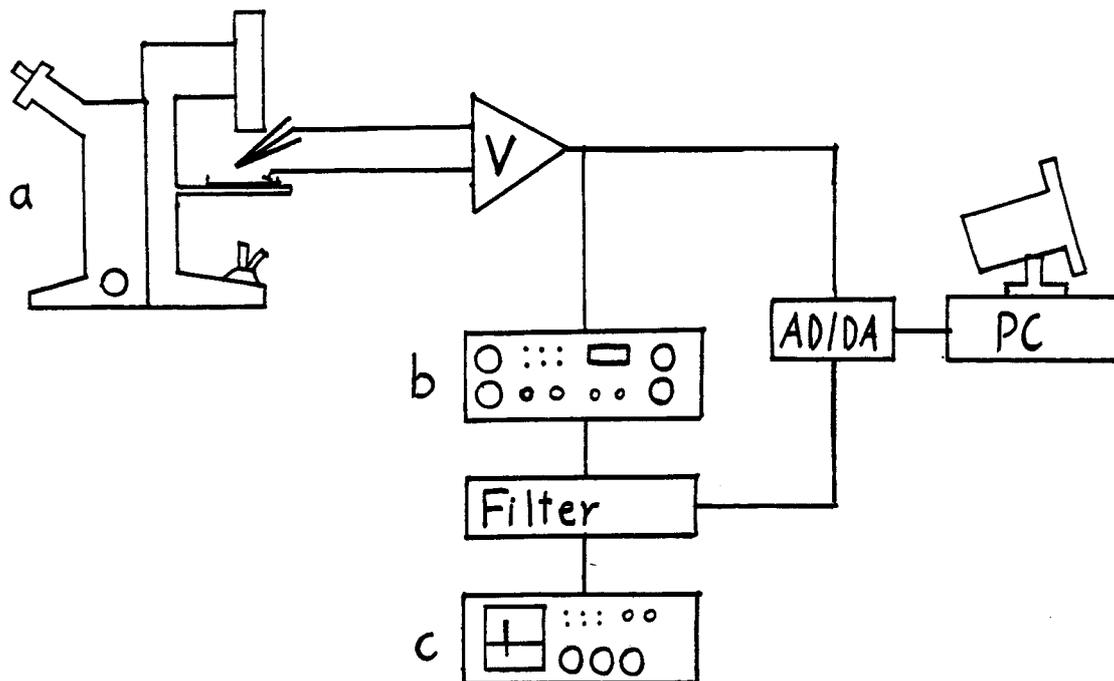


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

- a: inverses Mikroskop
- b: Patch-Clamp-Verstärker
- c: Oszilloskop
- V: Vorverstärker
- AD / DA: AD / DA-Wandler

2.2.1 Mikroskop und mechanische Komponenten

Der Betrachtung der Zellkulturen und der Pipettenspitze beim Heranführen an die Zellmembran dient ein inverses Mikroskop (CK3, Olympus) mit Niedervoltbeleuchtung. Bei einem inversen Mikroskop ist das Objektiv nach oben gerichtet und man blickt von unten auf das Präparat. So bleibt über dem Präparat genug Platz für die notwendigen Aufbauten, z.B. die Meßpipette.

Mikroskop und Mikromanipulator stehen auf einem schwingungsgedämpften Tisch, um Bewegungen zwischen Präparat und Pipette durch mechanische Schwingungen oder Erschütterungen zu reduzieren.

Der gesamte Meßstand ist von einem Faraday-Käfig umgeben. Mit ihm läßt sich niederfrequentes Hintergrundrauschen aus dem öffentlichen Spannungsnetz (sog. Netzbrummen bei 50 Hz) reduzieren, das unter Umständen die elektrischen Signale der Messungen überlagern kann.

Mit Hilfe eines am Objektisch befestigten Mikromanipulators, der sowohl mechanisch, als auch elektrisch zu bedienen ist, läßt sich die Pipettenspitze exakt auf die Zelle aufsetzen. Die Pipette wird in einen Pipettenhalter eingesetzt, der am Vorverstärker befestigt und mit diesem direkt elektrisch verbunden ist. Der Pipettenhalter hat einen seitlichen Eingang, an dem durch einen Schlauch Unter- bzw. Überdruck an das Pipetteninnere angelegt werden kann.

Als Meßkammer für die Badlösung mit den Zellen dient eine Petrischale aus Plexiglas mit 35 mm Außendurchmesser (NUNCLON, Wiesbaden). Das Badvolumen der Petrischale läßt sich durch Einlegen eines Plexiglasringes reduzieren.

2.2.2. Elektronische Komponenten

Ein Patch-Clamp-Verstärker besteht aus zwei Bestandteilen: dem Vorverstärker in Nähe des Pipettenhalters, der das Stromsignal mißt und die Spannung ausliest und dem nachgeschalteten Hauptverstärker (EPC-7, LIST-ELECTRONIC, Darmstadt) mit der Steuerungseinheit. Um das hochfrequente Rauschen der Meßwerte, das zum Teil durch elektronische Einheiten des Verstärkers (Rückkopplungswiderstand, Operationsverstärker) selbst erzeugt wird, weiter abzusenken, werden die in Spannung umgewandelten

Stromsignale zweimal gefiltert: Zunächst durch einen 10 kHz 3-Pol Bessel-Filter und danach durch einen RC-Tiefpaßfilter 1. Ordnung (Grenzfrequenz bei 2 kHz).

Die Strom- und Spannungswerte, die den Verstärker verlassen, können auf einem Oszilloskop (XF-44, NICOLET) beobachtet und aufgezeichnet werden. Mit Hilfe eines AD/DA- Wandlers (DT 2801-A, DATA TRANSLATION INC.) können die analogen Meßdaten in digitale Zeichen umgewandelt und zur Speicherung einem Personal-Computer zugeführt werden. Zur Stimulation der Zelle im Voltage-Clamp-oder Current-Clamp-Modus steht ein modular aufgebauter Stimulator zur Verfügung sowie der PC, der über den DA-Wandler den Verstärker ansteuern kann.

Eine Besonderheit der Patch-Clamp-Technik besteht in der Möglichkeit mit nur einem Elektrodenpaar, nämlich einer Meß- und einer Referenzelektrode, sowohl Strom in die Zelle zu applizieren, als auch zu messen. Als Meßelektrode dient ein chlorierter Silberdraht, als Badelektrode ebenfalls eine Ag/AgCl-Elektrode.

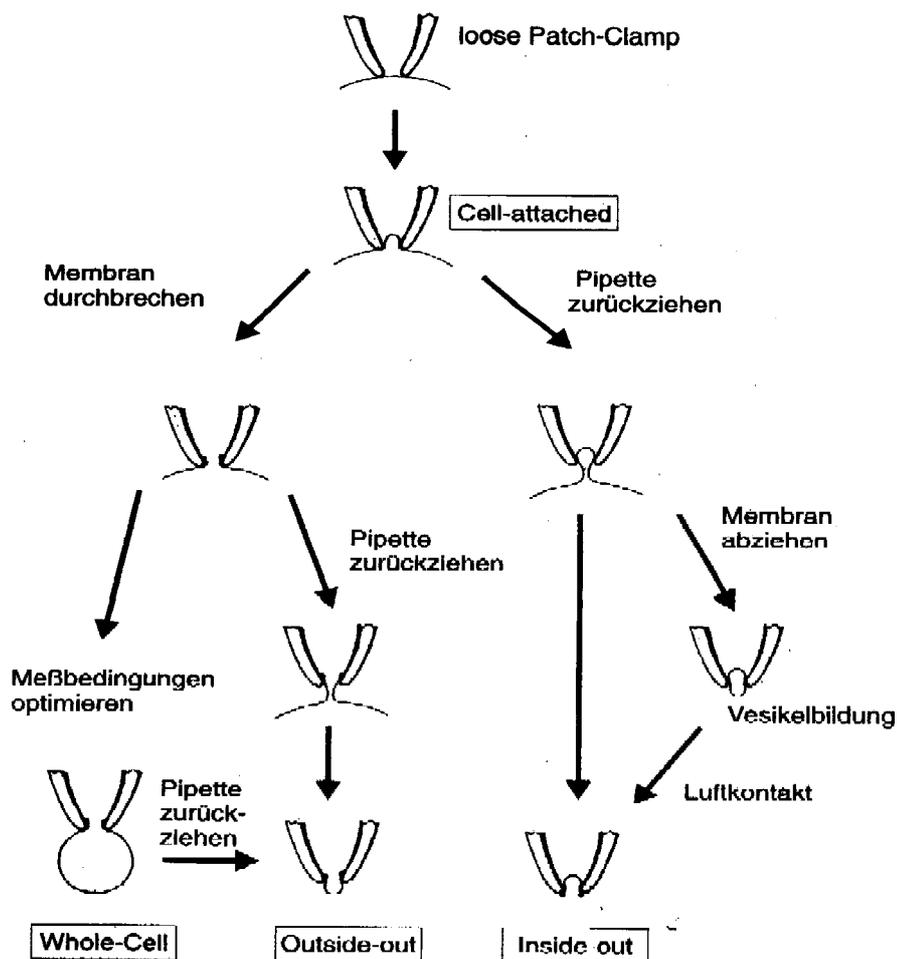


Abbildung 5: Mögliche Konfigurationen einer Patch-Clamp-Messung (nach Hamill et al., 1981)

2.3 Herstellung und Füllen der Patch-Pipetten

Wichtige Merkmale der Pipette in Bezug auf eine Patch-Clamp-Messung sind ihre Wanddicke und ihr elektrischer Widerstand. Der Widerstand hängt sowohl vom Durchmesser der Spitzen-öffnung, als auch von der Geometrie der Flanken ab. Der Widerstand ist um so höher, je länger die Pipettenspitze ist. Außerdem besitzen dünnwandige Pipetten bei gleichem Öffnungsdurchmesser geringere Widerstände als dickwandige (Numberger und Draguhn, 1996).

Bei der Ganzzelleableitung (Whole-Cell-Konfiguration) sind niedrigohmige Pipetten erwünscht, um den Serienwiderstand gering zu halten. Je kleiner der Serienwiderstand ist, desto besser läßt sich das Potential der Zelle kontrollieren. Daher eignen sich für dieses Verfahren dünnwandige Pipetten (Wandstärke ca. 0,15mm). Die in dieser Arbeit verwendeten Pipetten besaßen Widerstände zwischen 2-6 M Ω , bei einem Öffnungsdurchmesser von 0,5-1 μ m.

Die Pipetten wurden vor dem Experiment aus Glaskapillaren hergestellt (Borsilikatglas der Firma CLARK-ELECTROMEDICAL-INSTRUMENTS, Typ GC 150-15). Die Herstellung geschah mit Hilfe eines Pipettenziehgerätes (Puller) von SUTTER INSTRUMENTS, Novato, CA, USA, Typ Brown Flaming P87.

Das Ziehen erfolgt in 3 Arbeitsschritten: Im ersten Schritt wird die Pipette vorgezogen, d.h. erhitzt und um ca. 1 cm langgezogen, wodurch sie in der Mitte dünner wird. In zwei weiteren Schritten wird der Mittelteil der Kapillaren erneut erhitzt und ausgezogen, bis es zum Zerreißen der Kapillare an ihrer dünnsten Stelle kommt. Länge und Form, und damit auch Öffnungsdurchmesser und Widerstand der Pipettenspitze lassen sich durch Veränderung der einzelnen Parameter des Ziehens, wie Hitze, Zugkraft und -geschwindigkeit beeinflussen.

Vor dem Experiment wurde die Pipette mit Elektrolytlösung gefüllt. Zunächst wurde die Pipettenspitze in ein mit Pipettenlösung gefülltes Eppendorf-Gefäß eingetaucht („tip-filling“), so daß sie sich mit der Flüssigkeit füllt. Danach wurde die Pipette von oben durch eine 5 ml Plastikspritze mit Kunststoffkanüle, die Pipettenlösung enthält, zu ca. 1/3 gefüllt. Ein Überfüllen der Pipette kann die Rauscheigenschaften ungünstig beeinflussen, da eventuell Flüssigkeit in den Pipettenhalter hineingedrückt wird und leitende Brücken bilden kann.

Luftblasen, die nach dem Füllen noch vorhanden sind, lassen sich entdecken, indem man die Pipette vor einen dunklen Hintergrund hält oder von der Seite her beleuchtet. Man entfernt sie durch kräftiges Klopfen mit dem Mittelfinger der rechten Hand am oberen Ende der Pipette, die man zwischen Zeigefinger und Daumen der linken Hand festhält.

2.4 Durchführung eines Patch-Clamp-Experimentes

2.4.1 Bildung des „Seal“

Die Pipette wird fest in den Pipettenhalter eingespannt, so daß sie luftdicht verschlossen ist und sich nicht bewegen kann. Anschließend wird ein Überdruck im Inneren der Pipette angelegt. Die ausströmende Flüssigkeit reinigt die Zelloberfläche und verhindert, daß Zelldebris die Öffnung verstopft.

Die Pipette wird in die Badlösung getaucht und in Nähe der zu untersuchenden Zelle gebracht. Nun wird der Nullpunkt für das Potential festgelegt (Offsetkompensation). Dieser Wert ist definiert als das Potential, bei dem zwischen offener Pipette und Badelektrode kein Strom fließt. Man stellt den Verstärker auf den sogenannten „Search-Modus“ ein, in dem der Strom auf Null heruntergeregelt wird, so daß man das Potential ablesen kann. Dieser Wert stellt das sogenannte Offsetpotential dar, das durch Spannungen an den Übergängen von Silberdraht-Pipettenlösung-Badlösung-Erdung entsteht, und nicht von der Zelle oder der Kommandospannung herrührt. Mit einem Korrekturknopf wird das Potential auf Null korrigiert und damit der Nullpunkt des Potentials definiert.

Anschließend erzeugt man einen repetitiven, rechteckförmigen Kommandospannungspuls (1 mV, 10 Hz, 10 ms Dauer) und kann die daraus resultierende Stromantwort am Oszilloskop ablesen. Anhand der Größe der Stromantwort kann nun der Pipettenwiderstand nach dem Ohm'schen Gesetz ($R = U / I$) berechnet werden.

Mit dem Mikromanipulator nähert man unter Sicht die Pipette langsam der Zellmembran an. Sobald die Membran erreicht wird, ist eine geringe Erhöhung des Pipettenwiderstandes, also eine leichte Abnahme der Stromamplitude zu beobachten. Durch vorsichtiges Saugen an der Pipette kommt es zu einem Unterdruck im Pipetteninneren und zu einer Abdichtung des Übergangs zwischen Glas und Zellmembran („Gigaseal“).

Mit der Herstellung des Gigaseals ist die sogenannte Cell-attached-Konfiguration erreicht (siehe Abbildung 5). Zu diesem Zeitpunkt ist die Membran unterhalb der Pipettenöffnung noch intakt und die Ströme durch einzelne Ionenkanäle können zur Beobachtung kommen.

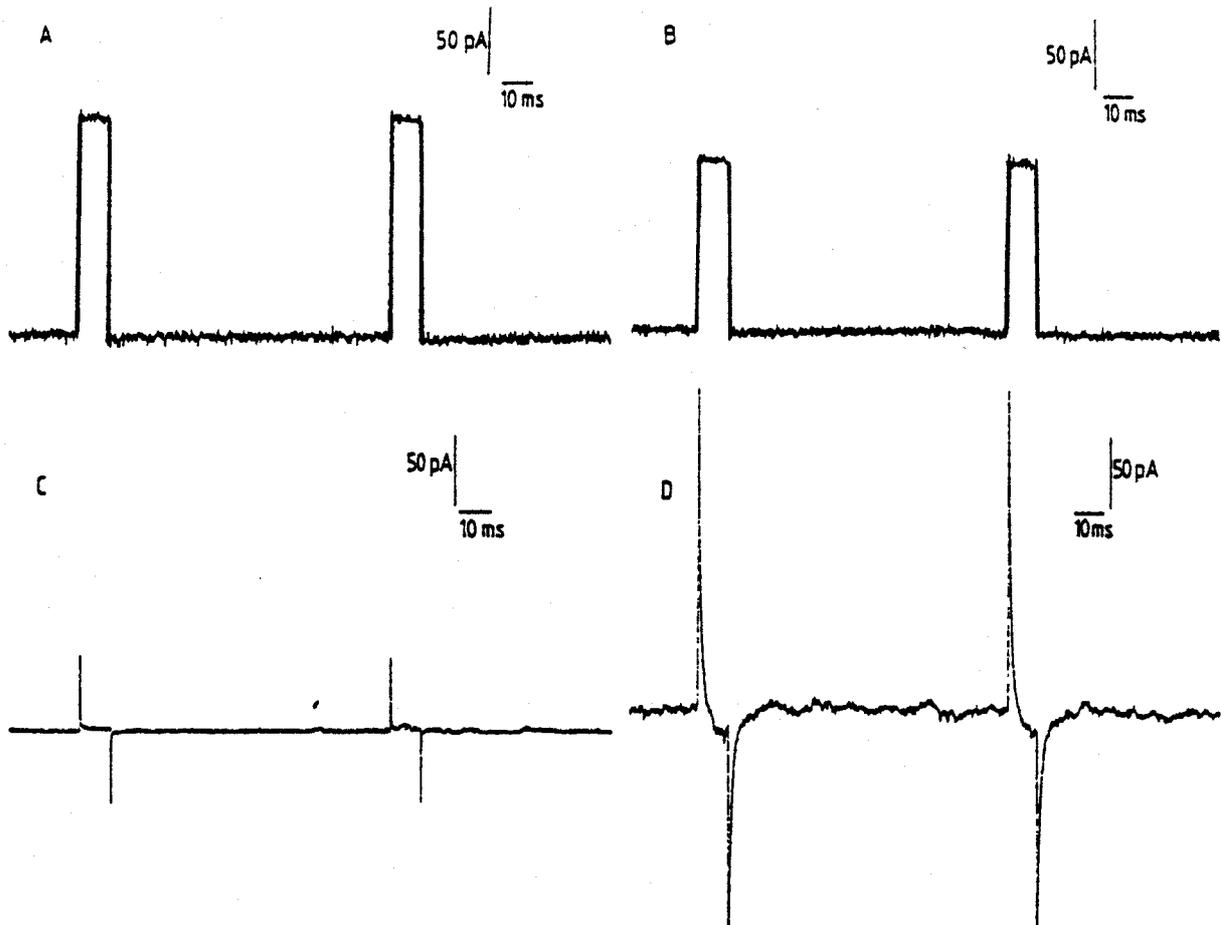


Abbildung 6: Aufzeichnung des Stromsignals auf einem Oszilloskop vor dem Meßvorgang

A: Testsignal 1mV, 10 Hz, Pipette frei in der Badlösung, Search-Mode

B: Testsignal 1mV, 10 Hz, Kontakt zwischen Pipettenöffnung und Zellmembran (sog. Loose-Cell-Attached-Configuration), daher leichter Anstieg des Pipettenwiderstands, Search-Mode

C: Testsignal 1mV, 10 Hz, Cell-Attached-Configuration: hochohmiger Widerstand zwischen Pipette und Zellmembran („Gigaseal“), Voltage-Clamp-Mode (-30 mV)

D: Testsignal 1mV, 10 Hz, Whole-Cell-Configuration, Pipette steht in Verbindung mit dem Cytoplasma, Voltage-Clamp-Mode (-30mV)

2.4.3 Herstellen der Ganzzelleableitung (Whole-cell-Konfiguration)

Nun wird vom „Search-Modus“ in die Voltage-Clamp-Konfiguration gewechselt und ein Potential von -30 mV angelegt.

Man saugt behutsam weiter am Pipettenschlauch, bis es zum Zerreißen der Zellmembran kommt. Das Innere der Pipette steht nun in ungehindertem Austausch mit dem Cytoplasma. Dadurch verändert sich die Stromantwort nochmals. Die kapazitiven Ladeströme nehmen zu, da nun die gesamte Fläche der Zellmembran bei jeder Spannungsänderung umgeladen werden muß. Außerdem nimmt der Strom zur Aufrechterhaltung des Potentials zu. Die gesamte Membranfläche hat einen geringeren Widerstand als der kleine Patch, so daß gemäß $U = I \times R$ der Offsetstrom zunimmt. Auch das Rauschen nimmt durch die nun vergrößerte Zahl an offenen Ionenkanälen zu (s. Abbildung 6).

Man hat jetzt die Whole-Cell-Konfiguration (Abbildung 5) erreicht und kann den über der gesamten Membran fließenden Strom registrieren. Die Pipettenlösung und das Cytoplasma tauschen sich innerhalb weniger Sekunden (Ionen) bzw. weniger Minuten (Makromoleküle) aus (Marty und Neher, 1983). Die Zusammensetzung der Pipettenlösung bleibt dabei nahezu unverändert, da ihr Volumen im Vergleich zum Zellvolumen wesentlich größer ist. Dadurch läßt sich während der Messungen das intrazelluläre Milieu kontrollieren.

3. Funktionsprinzip der Voltage-Clamp-Messung

Bisher sind die Arbeitsschritte beschrieben worden, die notwendig sind um eine Ganzzelleableitung zu ermöglichen. Hat man dieses Stadium erreicht, so können die Experimente an den Zellen durchgeführt werden. Die Patch-Clamp-Technik ermöglicht gleichzeitig Stimulation und Messen mit einem Elektronenpaar (einer Referenz- und einer Meßelektrode). In der Voltage-Clamp-Konfiguration wird die Spannung zwischen Meß- und Referenzelektrode vorgegeben und gleichzeitig der zur Erhaltung der Kommandospannung notwendige Strom gemessen. In der Current-Clamp-Konfiguration wird die Spannung gemessen, wobei der injizierte Strom auf einen vorgegebenen Wert geklemmt wird.

3.1. Ersatzschaltbild der Zellmembran

Das Ruhemembranpotential einer Zelle entsteht durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen im Extra- und Intrazellulärraum und ist abhängig von den Permeabilitäten dieser Ionen durch die Membran. Diese Eigenschaften lassen sich mit einem Schaltbild als Modell der Zellmembran darstellen.

Die Spannungsquellen (Batterien) des Modells ersetzen die über der Membran vorhandenen Aktivitätsunterschiede der verschiedenen Ionensorten, d.h. sie stehen für das Nernst'sche Gleichgewichtspotential des jeweiligen Ions. Die zu den Batterien seriell geschalteten Widerstände stellen die selektiven Ionenpermeabilitäten der Zellmembran, also die Leitfähigkeiten der einzelnen Ionensorten, dar. Die Spannung über dem gesamten Schaltkreis (zwischen i und e in Abbildung 7) stellt das Membranpotential dar und kann an einem Spannungsmeßgerät abgelesen werden.

Es wurden in diesem Modell drei verschiedene K^+ -Leitfähigkeiten in Form von 3 parallel geschalteten Widerständen und das K^+ -Gleichgewichtspotential berücksichtigt, weil dieser Ionentyp den größten Einfluß auf das Membranpotential von Astrocyten hat (*Walz et al., 1984*). Die anderen am Membranpotential beteiligten Ionensorten, z.B. Na^+ und Cl^- , sind durch den Widerstand R_1 und die Spannungsquelle E_1 dargestellt. Nicht berücksichtigt wurden ligandengesteuerte Leitfähigkeiten.

Am Modell sind wichtige Eigenschaften der Zellmembran erkennbar: Durch Modulation der Widerstände erhält die Gesamtspannung, also das Membranpotential der Zelle einen neuen Wert. Stellt man andererseits das Potential auf einen neuen Wert ein, wie es in der Voltage-Clamp-Konfiguration der Fall ist, so werden die Ströme durch die Membran verändert. Dies vollzieht sich bei spannungsunabhängigen Kanälen gemäß dem Ohm'schen Gesetz (lineare Strom-Spannungs-Kennlinie), bei spannungsabhängigen Kanälen gemäß einer nichtlinearen Kennlinie.

Die kapazitiven Eigenschaften der Zellmembran wurden im Schaltbild nicht berücksichtigt, da sie in dieser Untersuchung nicht gemessen worden sind. Die kapazitiven Umladungsprozesse sind mit einer Dauer von ca. 1ms bereits deutlich vor den ausgewerteten Stromwerten (266-300 ms nach Beginn einer Spannungsänderung) abgeschlossen.

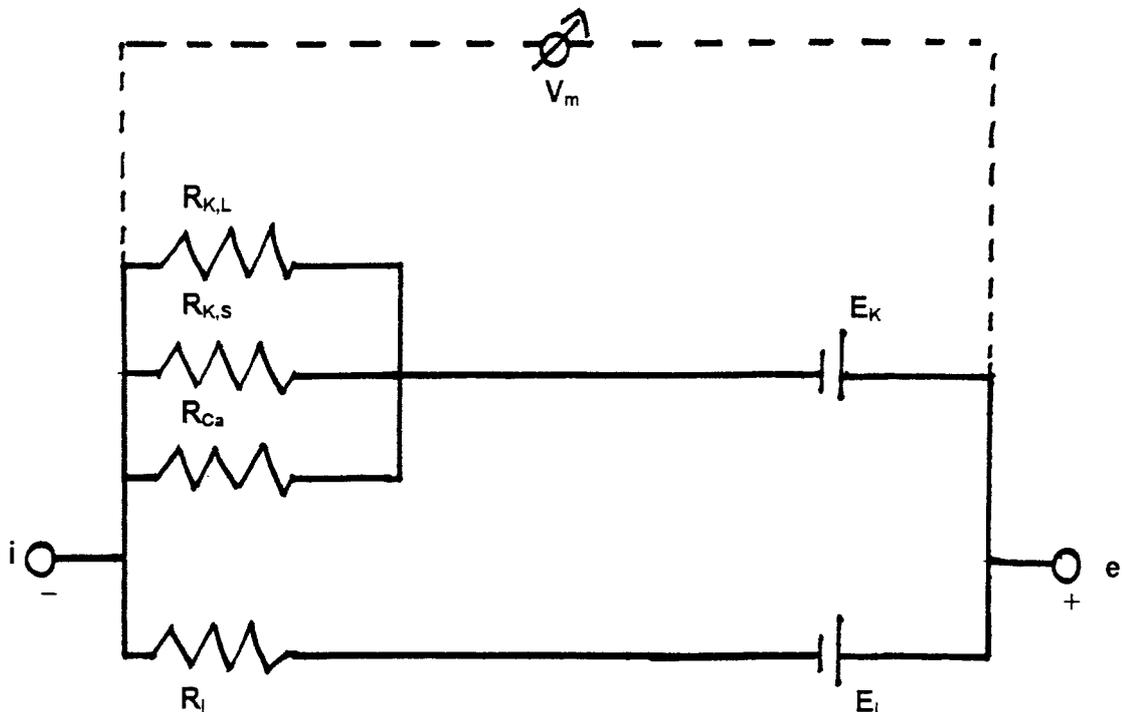


Abbildung 7: Schematisches Ersatzschaltbild der Zellmembran eines Astrocyten

- i: intrazellulär
- e: extrazellulär
- $R_{K,L}$: Widerstand, der Leckleitfähigkeiten für K^+ -Ionen symbolisiert
- $R_{K,D}$: Widerstand, der den verzögerten spannungsabhängigen K^+ -Kanal symbolisiert
- $R_{K,Ca}$: Widerstand, der Ca^{2+} - und spannungsabhängige K^+ -Kanäle symbolisiert
- E_K : Batterie, die das Gleichgewichtspotential für K^+ -Ionen darstellt
- R_i : repräsentiert die parallelen Widerstände aller weiteren am Membranpotential beteiligten Ionensorten
- E_i : Batterie, die die Gleichgewichtspotentiale aller anderen Ionensorten symbolisiert
- V_m : Voltmeter, das das Membranpotential anzeigt

3.2. Der Voltage-Clamp-Verstärker

Die Voltage-Clamp-Methode erlaubt es, das Membranpotential der zu untersuchenden Zelle auf einen beliebigen Wert einzustellen. Grundlage dafür ist ein negativer Rückkopplungsmechanismus, bei dem das Membranpotential gemessen und mit dem gewünschten Wert, der sogenannten Soll- oder Kommandospannung verglichen wird. Unterscheiden sich Sollspannung und Membranpotential, so fließt ein Strom über die Zellmembran. Dadurch wird ein Regler aktiviert, der einen entgegengesetzten Strom in die Zelle injiziert. Diesen

Kompensationsstrom kann man messen und dadurch die Leitfähigkeit der Zellmembran berechnen.

Spannungsmessung und Strominjektion erfolgen bei der Patch-clamp-Technik mit nur einer Elektrode. Das vereinfachte Schaltbild in Abbildung 8 stellt die Funktionsweise des Verstärkers schematisch dar. Dieser Schaltkreis ist im Vorverstärker des Meßplatzes angelegt.

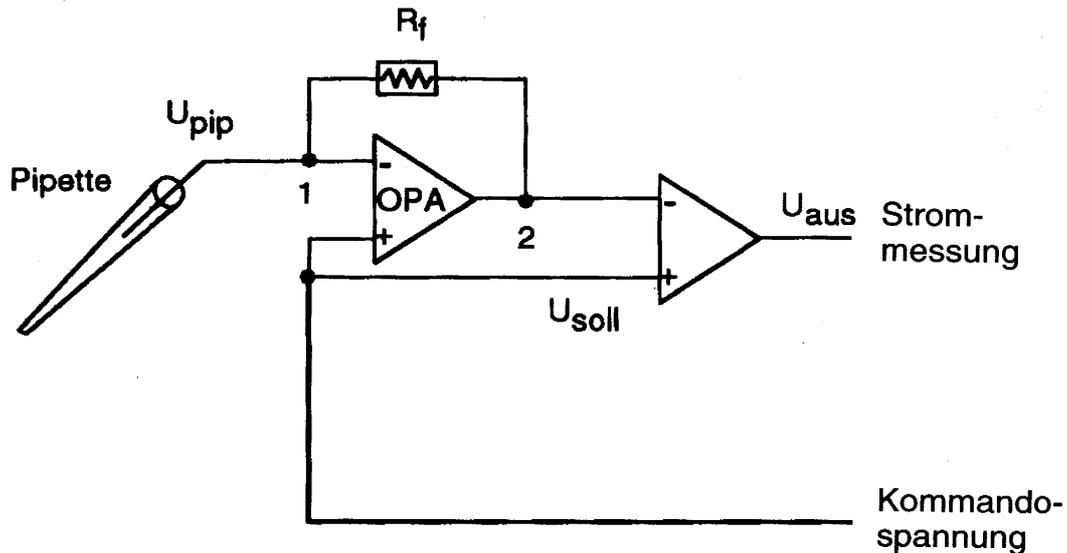


Abbildung 8: Vereinfachtes Schaltbild eines Voltage-Clamp-Verstärkers (aus Numberger und Draguhn, 1996)
Abkürzungen siehe im Text

Wichtige Komponenten des Schaltbildes sind der sogenannte Operationsverstärker (OPA, operation amplifizier) und ein Rückkopplungswiderstand R_f ($f = \text{feedback}$). Der OPA besitzt zwei Eingänge: Am Minus-Eingang (Punkt 1 in Abbildung 8) liegt die Spannung der Pipette (U_{pip}) an. Am anderen Eingang wird über ein Kabel die Sollspannung U_{soll} von der Steuereinheit des Verstärkers eingespeist. Weichen Pipettenpotential und Kontrollspannung voneinander ab, so liefert der OPA am Ausgang eine Spannung, die proportional zur Differenz der beiden Eingangsspannungen, aber verstärkt ist. Daher herrscht zu diesem Zeitpunkt eine unterschiedliche Spannung zwischen Punkt 1 und Punkt 2, so daß ein Strom durch den Rückkopplungswiderstand fließt. An R_f entsteht dadurch eine Spannung, die proportional zum Strom ist. Dies ergibt sich aus dem Ohm'schen Gesetz ($U_f = R_f \times I$).

Der Operationsverstärker besitzt einen sehr hohen Eingangswiderstand (ca. $10^{12} \Omega$), so daß der Strom nicht in den OPA fließen kann, sondern ausschließlich in die Pipette fließt. Der Strom ändert das Potential an Punkt 1, also U_{pip} , und fließt so lange bis kein Unterschied zwischen den beiden Eingängen besteht, d.h. bis sich das Pipettenpotential dem

Kommandopotential angeglichen hat. Somit gleicht die Schaltung Differenzen zwischen Pipettenpotential und Sollspannung aus, wobei an R_f eine Spannung erzeugt wird, die dem in die Zelle applizierten Strom proportional ist. Bei dem Schaltkreis handelt es sich daher um einen Strom-Spannungs-Wandler.

Der Ausgleich zwischen Pipetten- und Kommandopotential erfolgt so schnell, daß beide Werte zu jedem Zeitpunkt identisch sind. Die Ausgangsspannung wird zur Steuereinheit fortgeleitet und kann von dort ausgelesen und in den Strom (abhängig von R_f) umgerechnet werden. Eigentlich addiert sich zur Ausgangsspannung auch noch die Sollspannung, doch diese wird durch einen Differenzverstärker wieder abgezogen.

Die bisherige Darstellung des Rückkopplungswiderstands R_f stellt allerdings eine Idealisierung dar. R_f ist kein reiner Ohm'scher Widerstand, sondern besitzt auch kapazitive Eigenschaften. Bei jedem Spannungssprung fließen zunächst Ladungen auf die Oberfläche des Widerstandes, um ihn umzuladen. Diese Eigenschaft ist bedeutsam für die Messung, weil bei jeder Änderung der Spannung Zeit für das Umladen des Kondensators verloren geht, so daß schnell veränderliche Signale, z.B. senkrecht ansteigende Signale von Einzelkanalströmen, verzögert werden. Der Verstärker enthält Korrekturschaltkreise, die ein dem Kondensator umgekehrtes Frequenzverhalten aufweisen, wodurch die Verluste ausgelöscht und die Antwortzeit auf wenige Mikrosekunden herabgesetzt wird.

Die Voltage-Clamp-Experimente in dieser Arbeit wurden über einen PC durchgeführt. Mit ihm wurde der Verstärker zur Stimulation angesteuert. Über einen A / D-Wandler ließen sich die Meßsignale dem Rechner zuführen und so Stromkurven erstellen. Mit Hilfe eines Programms konnten dann automatisch Strom-Spannungskennlinien (I-U-Kennlinien) errechnet und grafisch dargestellt werden.

4. Messung und Auswertung der Daten

4.1. Das Programm „Strom-Spannungs-Kennlinie“

Das Programm „Strom-Spannungs-Kennlinie“ ist in der Programmiersprache PASCAL geschrieben und mit einem TURBO PASCAL Compiler übersetzt worden.

Vor der Messung wurde die Zelle in der Voltage-Clamp-Konfiguration auf ein beliebiges Haltepotential V_H geklemmt, das dem Programm mitgeteilt wurde. In diesen Experimenten wurde ein Potential von -80 mV gewählt, da sich bei diesem niedrigen Potential ein großer Anteil der spannungsaktivierbaren Kanäle im geschlossenen Zustand befindet.

Bei der Messung wird eine I-U-Kennlinie mit 18 Meßpunkten aufgezeichnet. Der Meßvorgang kann bei Störungen unterbrochen und wiederholt werden. Die Stimulation der Zelle erfolgte über 18 Spannungsrechtecksprünge, die je 300 ms lang sind. Die Periode dauert 3,3 s. Die Amplituden der Rechtecksprünge beginnen bei -120 mV und steigen in 10 mV-Schritten bis auf +50 mV an. Damit werden Kommandospannungen von -120 mV, -110 mV, -100 mV...+50 mV erzielt. In anderen Messungen wurden 20 Testspannungen erzeugt, und zwar beginnend bei einem Potential von -200 mV aufsteigend in 10 mV-Schritten bis zu 0 mV.

Vor jedem Spannungsrechtecksprung wird der Basishaltestrom mit 50 Stromwerten eingelesen. Nach dem Sprung auf die Testspannung werden weitere 450 Meßwerte aufgezeichnet und der Stromverlauf on-line grafisch dargestellt. Die Abtastfrequenz beträgt 1,5 kHz, so daß der Stromverlauf 33ms vor dem Spannungssprung und bis 300 ms danach eingelesen wird.

Am Ende der Messung erstellt das Programm zwei I-U-Kennlinien und stellt sie als Grafik dar. Zur Erstellung der einen Kennlinie wurde der späte Strom I_s verwendet, der als Mittelwert der jeweils 50 zuletzt aufgenommenen Daten berechnet wurde, und damit den mittleren Strom zwischen 266 und 300 ms nach Beginn jedes Rechtecksprunges darstellt. Die zweite Kennlinie stellt den frühen Strom I_f , der als Mittelwert der gemessenen Stromwerte 13-40 ms nach Beginn des Spannungssprunges berechnet wurde, im Verhältnis zur jeweiligen Testspannung dar. Die Differenz zwischen beiden Werten ist damit ein Maß für transiente spannungsabhängige Ströme, d.h. wenn sich I_f und I_s nicht unterscheiden, sind keine

transienten spannungsaktiven Ströme aufgetreten. Ein linearer Verlauf der Kennlinie ist charakteristisch für einen Ohm'schen Widerstand.

Durch Bildung einer Regressionsgeraden für die Stromwerte bei den Potentialen von -120 mV bis -90 mV kann das Programm den differentiellen Membranwiderstand in diesem Bereich berechnen und anzeigen.

Die Bestimmung des Membranpotentials erfolgt durch Berechnung des Schnittpunktes der I-U-Kennlinie mit der Abszisse. Zur Aufrechterhaltung dieser Spannung benötigt der Verstärker keinen Strom, es handelt sich somit um das Membranpotential der Zelle.

Die Grafik kann mit einem Drucker oder einem Plotter ausgedruckt bzw. ausgeplottet werden. Alle Daten wurden anschließend auf Festplatte und auf Diskette gespeichert und konnten später statistisch ausgewertet werden.

4.2. Statistische Auswertung

Aus den erhobenen Daten einer Meßreihe wurde der arithmetische Mittelwert und die zugehörige empirische Standardabweichung des arithmetischen Mittelwertes (S.E.M.) berechnet, die dann als Ergebnis verwendet wurden. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des STUDENT-t-Tests errechnet. Als signifikant wurden Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.001$ angesehen.

III. Ergebnisse

1. Einfluß von TNF- α auf das Membranpotential kultivierter Astrocyten

Die Astrocyten in der zur Messung verwendeten Zellkultur hatten ein Membranpotential von $-72,1 \pm 1,7$ mV (Anzahl der gemessenen Astrocyten $n = 39$).

In weiteren Messungen wurde der Einfluß von TNF- α auf das Membranpotential der Astrocyten untersucht (siehe Tabelle 1).

In einer Meßreihe wurde TNF- α in einer Konzentration von 150 U /ml direkt vor der Messung zur Badlösung gegeben. Dies führte zu keiner signifikanten Änderung des Membranpotentials im Vergleich zur Kontrollmessung ($-72,0 \pm 2,5$ mV, $n = 11$).

Bei weiteren Untersuchungen wurden die Astrocyten vor der Messung 1 Stunde lang in TNF- α - haltiger Badlösung inkubiert. TNF- α depolarisierte die Zellmembran auf $-53,4 \pm 1,5$ mV ($n = 81$), also um fast 20 mV.

Bei Verlängerung der Inkubationsdauer war keine Depolarisation mehr nachweisbar. In den Messungen nach 20-stündiger Inkubation mit TNF- α zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Membranpotentials im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einfluß von TNF- α auf das Membranpotential von Astrocyten

Lösung	Inkubationsdauer	Membranpotential [mV]	Anzahl [n]
Kontrolle		-72,1 \pm 1,7	39
TNF- α (150 U/ml)	direkt appliziert	-72,0 \pm 2,5	11
TNF- α (150 U/ml)	1 Stunde	-53,4 \pm 1,5*	81
TNF- α (150 U/ml)	20 Stunden	-73,7 \pm 2,0	9

* signifikanter Unterschied zum Kontrollwert ($p < 0,001$)

2. Einfluß von Agonisten und Antagonisten der Proteinkinase C auf die TNF- α induzierte Depolarisation von kultivierten Astrocyten

Um die intrazellulären Signalwege zu untersuchen, die an der TNF- α induzierten Depolarisation von Astrocyten beteiligt sind, wurde der Einfluß von Agonisten und Antagonisten der Proteinkinase C untersucht (siehe Tabelle 2). Ein Agonist der PKC ist der Phorbolster PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat). Als Inhibitoren der PKC dienten das Isoquinolinsulfonamid H7 (1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-2-Methylpiperazin) und Staurosporin.

Der PKC-Aktivator PMA wurde der Badlösung 1 Stunde vor Messung in einer Konzentration von 100 nM zugegeben. Dies führte zu einer signifikanten Erniedrigung des Ruhepotentials, das nun in der Nähe der TNF- α induzierten Depolarisierung lag (-57,4 \pm 1,6 mV, n = 11).

In einer weiteren Meßreihe wurde untersucht, ob sich die depolarisierenden Wirkungen von TNF- α und PMA addieren.

Die Astrocyten wurden 2 Stunden vor der Messung mit PMA vorinkubiert, 1 Stunde vor der Messung wurde TNF- α appliziert. Dieses Vorgehen führte zu keiner weiteren signifikanten Depolarisierung gegenüber der alleinigen Verabreichung von PMA (siehe Tabelle 2). Der Mittelwert für das Membranpotential lag bei $-55,4 \pm 1,6$ mV bei 9 gemessenen Astrogliazellen.

Die Inhibitoren der PKC waren in der Lage die Depolarisation der Astrocyten durch TNF- α zu verhindern:

Die Astrogliazellen wurden 1 Stunde vor der Applikation von TNF- α (150 U/ml) mit Staurosporin vorinkubiert. Als Mittelwert des Membranpotentials ergab sich $-68,6 \pm 1,8$ mV bei 16 Messungen. Bei Vorinkubation der Zellen mit H7 betrug das Membranpotential $-70,1 \pm 1,4$ mV (n=22).

Diese beiden Werte liegen in Nähe des Membranpotentials unter Kontrollbedingungen. Sie zeigen aber eine signifikante Abweichung vom Mittelwert des Membranpotentials bei alleiniger Inkubation mit TNF- α , wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist.

Um auszuschließen, daß die PKC-Antagonisten alleine eine Veränderung des Membranpotentials bewirken können, wurden Messungen in TNF- α -freier Badlösung durchgeführt.

Es zeigte sich, daß eine einstündige Inkubation der Astrocyten mit Staurosporin oder mit H7 zu keiner signifikanten Änderung des Membranpotentials führte (siehe Tabelle 2).

Abbildung 9 illustriert diese Ergebnisse und verdeutlicht, daß Inhibitoren der PKC die Depolarisation der Astrocyten durch TNF- α verhindern.

Tabelle 2: Einfluß von PKC-Agonisten und -Antagonisten auf das Membranpotential von Astrocyten

Lösung	Membranpotential [mV]	Anzahl [n]
Kontrolle	-72,1 ± 1,7	39
PMA (100 nM)	-57,4 ± 1,6*	11
PMA (100nM) + TNF-α (150 U/ml) ^a	-55,4 ± 1,6*	9
Staurosporin (1 µM)	-70,9 ± 1,3	9
Staurosporin (1 µM) + TNF-α (150 U/ml) ^a	-68,6 ± 1,8**	16
H7 (25 µM)	-71,5 ± 1,0	11
H7 (25 µM) + TNF-α (150 U/ml) ^a	-70,1 ± 1,4**	22

*signifikanter Unterschied zum Kontrollwert ($p < 0,001$), **signifikanter Unterschied zum Membranpotential nach TNF-α-Inkubation

^a bei Zugabe von zwei Substanzen wurde die erste jeweils 1 Stunde vor der zweiten appliziert

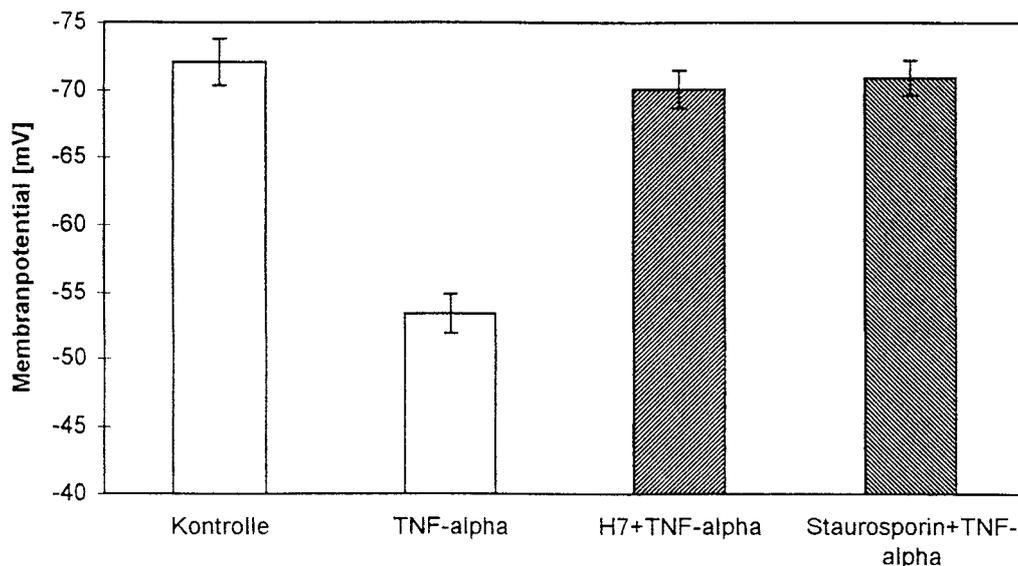


Abbildung 9: Inhibitoren der Proteinkinase C verhindern die TNF-α induzierte Depolarisation

3. Einfluß von Ba²⁺ auf die TNF- α induzierte Depolarisation kultivierter Astrocyten

Das Membranpotential eines Astrocyten wird entscheidend von seiner K⁺-Leitfähigkeit bestimmt (Walz et al., 1983). Ba²⁺ ist in mikro- und millimolaren Konzentrationen in der Lage, verschiedene Typen von K⁺-Kanälen zu blockieren (Hille, 1992). Deshalb wurde der Einfluß von Barium-Ionen auf die TNF- α induzierte Depolarisation untersucht.

Nach Inkubation der Astrogliazellen mit Ba²⁺ (10 μ M) betrug das Membranpotential im Mittel $-55,4 \pm 1,7$ mV (n = 12). Dieser Mittelwert weicht signifikant vom Kontrollwert ab (siehe Tabelle 3) und liegt in Nähe des Membranpotentials nach TNF- α -Inkubation (siehe Tabelle 2).

Nach der Applikation von Ba²⁺ (10 μ M) wurde TNF- α (150 U/ml) 1 Stunde vor Beginn der Messung der Badlösung zugegeben. Dies führte zu einer Depolarisation auf einen Wert von $-54,4 \pm 1,5$ mV (n = 11). Wurden die beiden Substanzen in umgekehrter Reihenfolge gegeben, so zeigte sich keine signifikante Änderung des Membranpotentials ($-56,2 \pm 1,3$ mV, n = 9).

Diese Messungen zeigen, daß sich die Veränderungen des Membranpotentials durch TNF- α bzw. Ba²⁺ nicht addieren.

Tabelle 3: Einfluß von Ba²⁺ auf das Membranpotential von Astrocyten

Lösung	Membranpotential [mV]	Anzahl [n]
Kontrolle	$-72,1 \pm 1,7$	39
Ba ²⁺ (10 μ M)	$-55,4 \pm 1,7^*$	12
Ba ²⁺ (10 μ M) + TNF- α (150 U/ml) ^a	$-54,4 \pm 1,5^*$	11
TNF- α (150 U/ml) + Ba ²⁺ (10 μ M) ^a	$-56,2 \pm 1,3^*$	9

* signifikanter Unterschied zum Kontrollwert (p<0,001)

^a bei Zugabe von zwei Substanzen wurde die erste jeweils 1 Stunde vor der zweiten appliziert
 Abbildung 10 faßt die Ergebnisse der Messungen mit TNF- α , PMA und Ba²⁺ zusammen. Jede dieser 3 Substanzen depolarisiert die Zellmembran um ca. 20 mV, was eine signifikante Änderung des Membranpotentials darstellt.

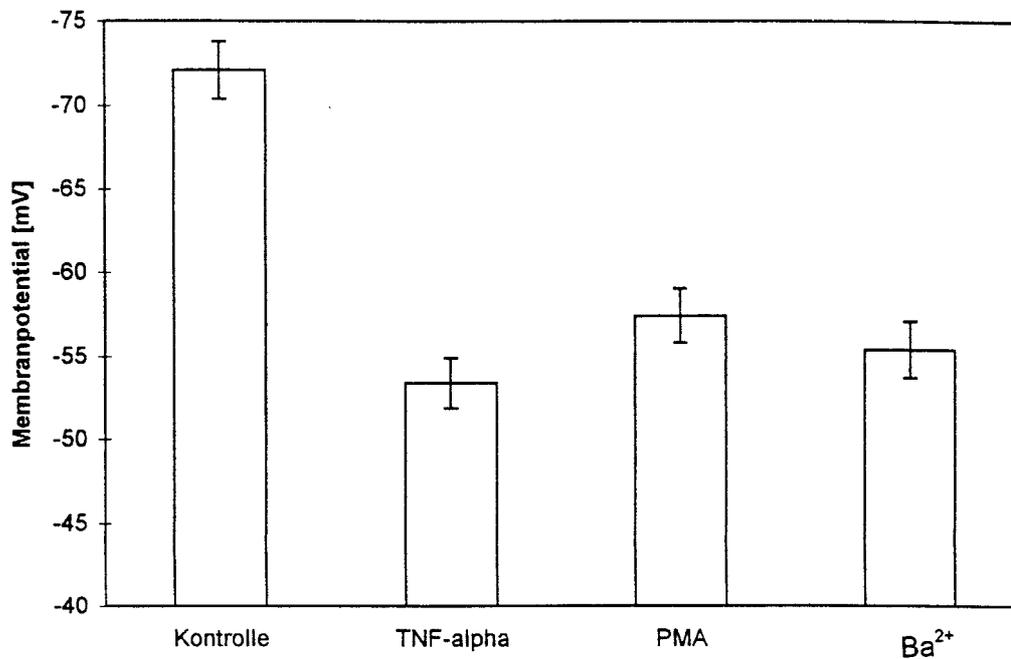


Abbildung 10: Einfluß von TNF- α , PMA und Ba²⁺ auf das Membranpotential von Astrocyten

4. Wirkungen von TNF- α auf den glialen K⁺-Strom

Es stellte sich die Frage, welche Leitfähigkeiten bei der Depolarisation der Astrocyten durch TNF- α verändert werden. Zu diesem Zweck wurde nicht nur das Membranpotential der Zellen bestimmt, sondern auch ihre Stromantworten bei einem Haltepotential von -80 mV und verschiedenen Spannungssprüngen in der Voltage-Clamp-Konfiguration aufgezeichnet.

Die Messungen erfolgten an isolierten Astrocyten, deren Membranpotential in der Voltage-Clamp-Konfiguration kontrolliert werden kann. Solche Zellen lassen sich in jungen Kulturen (1.Tag der Passage) finden.

Im der Abbildung 11 A ist der zeitliche Stromverlauf eines Astrocyten als Antwort auf verschiedene depolarisierende und hyperpolarisierende Spannungssprünge in der „Voltage-Clamp“-Konfiguration dargestellt. Der Astrocyt in dieser Abbildung zeigt beispielhaft die

Stromantworten von Astrocyten aus der Kontrollgruppe, also ohne Zusatz von Testsubstanzen zur Badlösung.

Das Haltepotential betrug -80 mV. Die Messung erfolgte mit 18 Testspannungen, die bei -120 mV begannen und dann in Sprüngen von 10 mV bis auf +50 mV erhöht wurden (-120 mV, -110mV...+40mV,+50 mV).

Nach einem Spannungssprung war zuerst ein ca. 1 ms lang andauernder kapazitiver Strom zu beobachten. Im Anschluß daran traten einwärts und auswärts gerichtete Ströme auf. Die Astrocytenmembran zeigt bei den hier vorgegebenen Potentialen das Verhalten eines Ohm'schen Widerstandes, d.h. es traten keine spannungsaktivierten Ströme auf, und die Potentialänderung und die zugehörige Änderung des Stroms waren zueinander proportional.

Bei stark depolarisierenden Spannungssprüngen bis auf Werte über -10 mV ist ein mit Verzögerung einsetzender Strom zu erkennen. Es handelt sich um den verzögert gleichrichten- den K^+ -Kanal. Bei hyperpolarisierenden Spannungssprüngen ist eine andere, einwärts gerichtete Stromantwort zu sehen.

Astrocyten, die mit $TNF-\alpha$ (150 U/ml) eine Stunde vor der Messung inkubiert worden waren, zeigten ein anderes Verhalten, wie Abbildung 11 B zu erkennen ist. Die auswärts gerichteten K^+ -Ströme bei depolarisierenden Spannungsschritten blieben unverändert. Die einwärts gerichteten K^+ -Ströme bei hyperpolarisierenden Spannungssprüngen hingegen waren stark vermindert oder vollständig blockiert.

Die beiden Astrocyten in Abbildung 11 wiesen unterschiedliche Membranpotentiale auf. Der Astrocyt aus der Kontrollmessung hatte ein Membranpotential von -83 mV, der Astrocyt nach $TNF-\alpha$ -Gabe wies ein Membranpotential von -54 mV auf. Der Strom, den der Verstärker erzeugen muß, um den Astrocyten von -54 mV auf das Haltepotential von -80 mV zu klemmen ist größer als derjenige Haltestrom, um die Zelle von -83 mV auf das Haltepotential zu klemmen. Zu erkennen ist dies zu Beginn der Aufzeichnung an der Differenz der Stromlinie zum Nullpunkt, der auf der linken Seite der Abbildung eingetragen ist.

Gemessen wurde außerdem der Membranwiderstand von Astrocyten der Kontrollgruppe und nach Inkubation mit $TNF-\alpha$ (150 U / ml). In Abbildung 12 sind die Ergebnisse dargestellt.

Der Eingangswiderstand von Astrocyten der Kontrollmessung betrug im Mittel $214 \pm 27 M\Omega$ (n=24). Astrocyten nach Inkubation mit $TNF-\alpha$ zeigten eine signifikante Erhöhung des Membranwiderstands ($p < 0,001$) auf einen Mittelwert von $679 \pm 81 M\Omega$ (n=44).

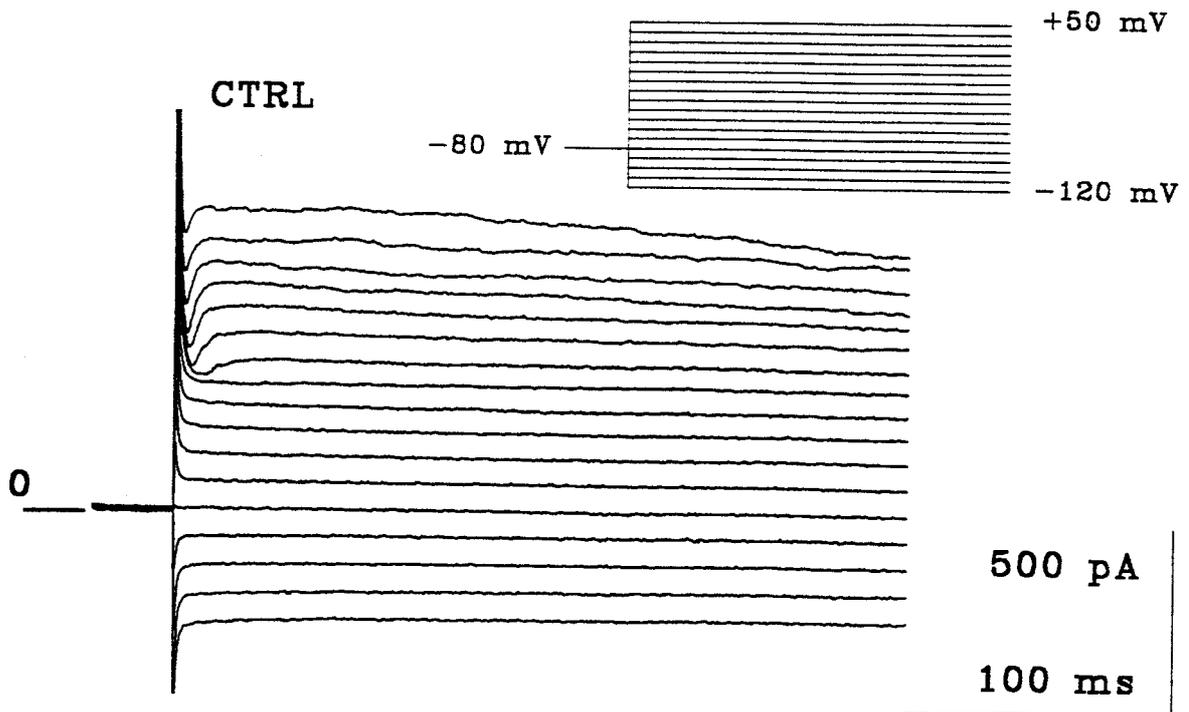


Abbildung 11 A: Astrocyt aus der Kontrollgruppe. Haltepotential -80 mV. 18 Spannungssprünge von -120 bis +50 mV. Bei depolarisierenden Testspannungen über -10 mV erkennt man einen verzögerten, auswärts gerichteten K^+ -Strom. Bei hyperpolarisierenden Spannungssprüngen tritt eine einwärts gerichtete Stromantwort auf.

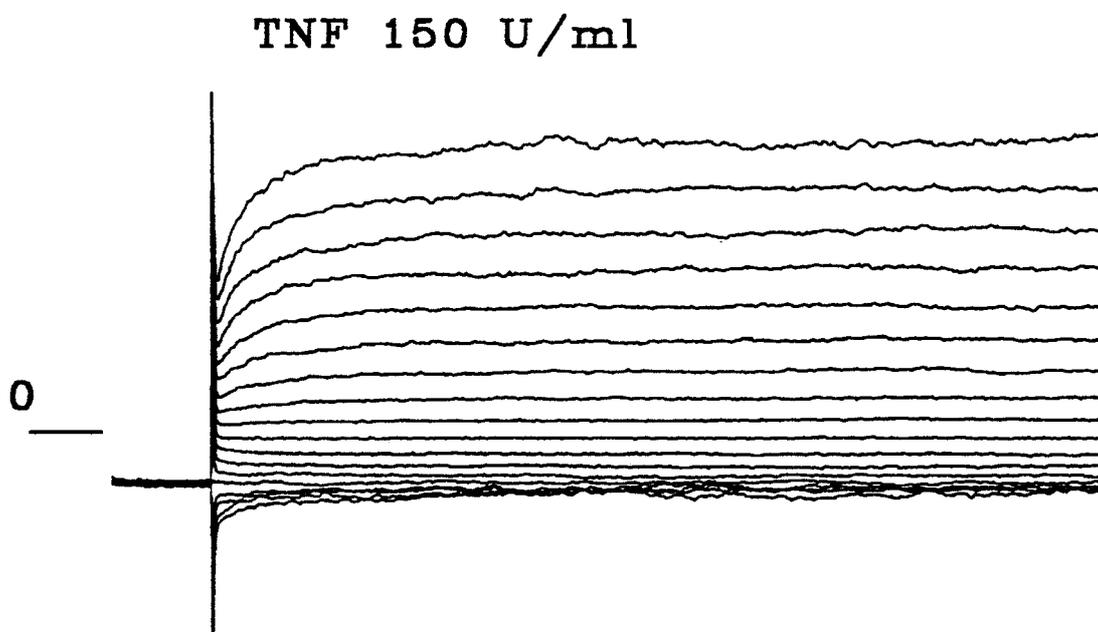


Abbildung 11 B: Astrocyt nach 1-stündiger TNF- α -Inkubation. Spannungsprotokoll und Eichung wie in Abbildung 11 A. Die Auswärtsströme bei depolarisierenden Spannungssprüngen blieben gegenüber Astrocyten aus der Kontrollgruppe unverändert. Einwärts gerichtete K^+ -Ströme bei hyperpolarisierenden Spannungssprüngen sind vermindert oder vollständig blockiert.

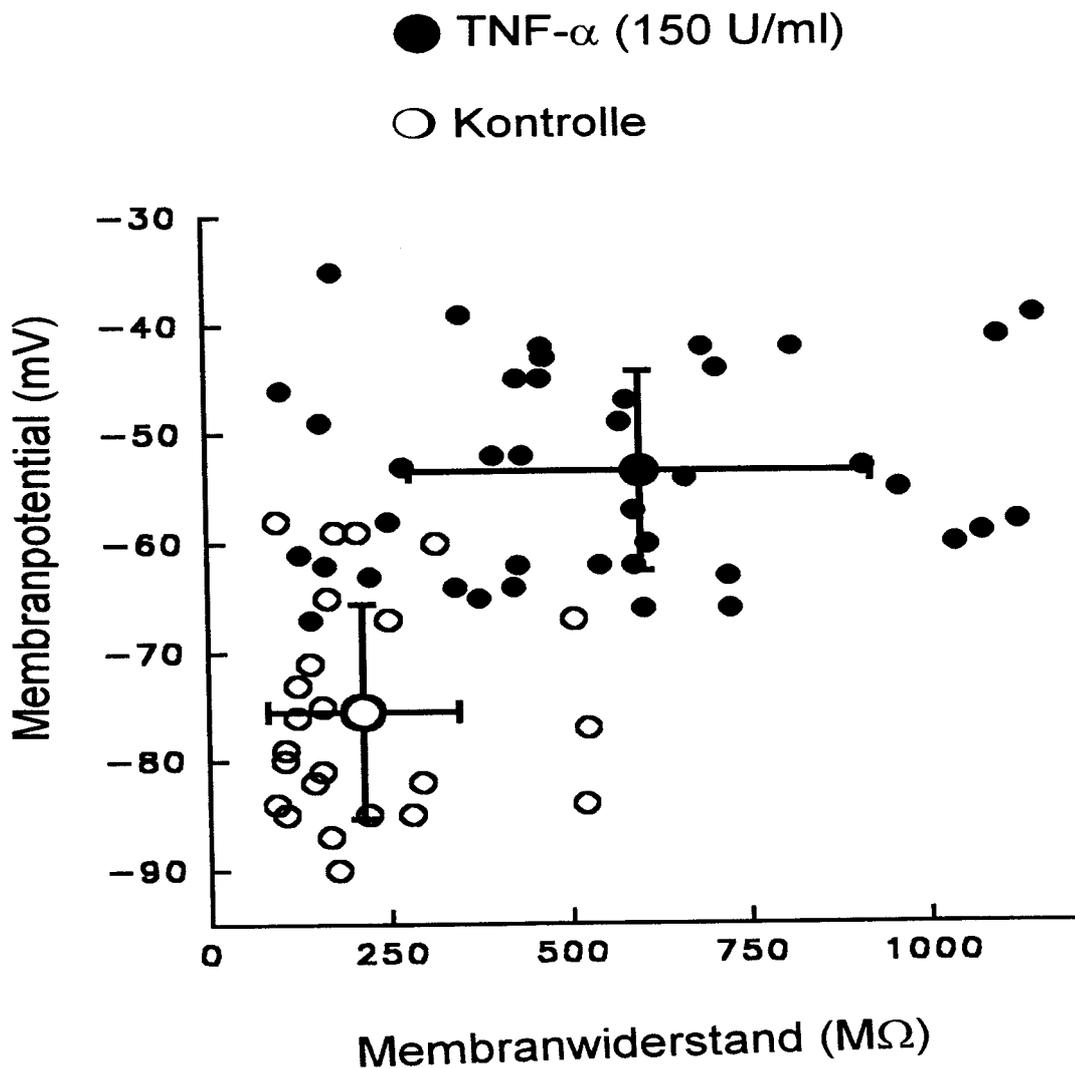


Abbildung 12: Vergleich von Membranwiderstand und Membranpotential von 40 Astrocyten nach Inkubation mit TNF- α (ausgefüllte Kreise) und 24 Astrocyten in Kontrollösung (offene Kreise). Die beiden großen Kreise zeigen den jeweiligen Mittelwert an, die Balken die jeweiligen Standardabweichungen. Zellen, die in TNF- α inkubiert wurden, zeigen eine Erniedrigung des Membranpotentials und eine deutliche Erhöhung des Membranwiderstands.

Um den einwärts gerichteten K⁺-Strom, der durch TNF- α blockiert worden war, zu charakterisieren, wurden weitere Messungen unter veränderten Versuchsbedingungen vorgenommen:

Die K⁺-Konzentration in der Badlösung wurde von 4,0 mM auf 50 mM erhöht. Dafür wurde die extrazelluläre Na⁺-Konzentration um 46 mM erniedrigt.

Außerdem wurde ein verändertes Spannungsprotokoll für die Voltage-Clamp-Messungen verwendet. Das Haltepotential betrug weiterhin -80 mV. Anschließend erfolgte ein Sprung

auf ein Potential von 0 mV. Die Spannungsrechtecksprünge erfolgten in 10 mV-Schritten in einem Bereich zwischen -200 bis auf -10 mV (siehe Abbildung 13 D).

Abbildung 13 A zeigt die Aufzeichnung der Membranströme eines Astrocyten, der in Kontrolllösung inkubiert worden war. Der verzögerte auswärts gleichrichtende Kaliumstrom, der in Abbildung 11 A aufgezeichnet worden war, fehlte bei dieser Messung, da in dem veränderten Spannungsprotokoll keine depolarisierenden Spannungssprünge auf Potentiale von > -10 mV durchgeführt wurden. Durch die Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration ist die Amplitude der Einwärtsströme gegenüber den Messungen in Badlösung mit 4,0 mM Kalium (Abbildung 11 A) erhöht.

Stark hyperpolarisierende Spannungssprünge führten zu einer Inaktivierung des K^+ -Einwärtsstroms. Zu erkennen ist dies am veränderten Verlauf der Strom-Spannungskurve bei Spannungswerten unterhalb von -150 mV (siehe Abbildung 14 A). Zwischen -150 mV und 0 mV zeigt die Kurve einen nahezu linearen Verlauf.

Zugabe von Ba^{2+} (10 μ M) in die Badlösung führte zu einer deutlichen Verminderung der K^+ -Einwärtsströme, was man in Abbildung 13 C sehen kann. Dies zeigt sich auch im flacheren Verlauf der I-U-Kurve nach Ba^{2+} -Zugabe verglichen mit der I-U-Kennlinie der Kontrollmessung (siehe Abbildung 14 A). Im Gegensatz zur Kontrollmessung wurden keine einwärts gerichteten Ströme mit einer Amplitude von mehr als 1 nA aufgezeichnet.

Mit Hilfe dieser beiden Eigenschaften läßt sich zeigen, daß es sich beim untersuchten K^+ -Einwärtsstrom um den einwärts gleichrichtenden K^+ -Strom („Inwardly rectifying K^+ -current“, K_{IR}) handelt.

Die Abbildungen 13 B und 13 D zeigen den Effekt von $TNF-\alpha$ auf den einwärts gleichrichtenden K^+ -Strom.

In Astrocyten, die eine Stunde vor der Messung mit $TNF-\alpha$ (150 U/ml) inkubiert worden waren, zeigte sich eine Verminderung des K_{IR} -Stroms (Abbildung 13 B) gegenüber der Messung in Kontrolllösung (Abbildung 13 A).

Zusätzliche Inkubation mit 10 μ M Ba^{2+} hatte keinen ausgeprägten Effekt auf den K_{IR} -Strom mehr, im Gegensatz zur Kontrollmessung (Abbildung 13 C). Die weitere Blockierung des K_{IR} -Stroms durch Ba^{2+} fiel gering aus. Dennoch lassen sich Unterschiede in den beiden I-U-Kennlinien erkennen (Abbildung 14 B). Die Kurve für $TNF-\alpha$ ändert ihre Verlaufsrichtung

bei hyperpolarisierenden Spannungssprüngen unterhalb von -130 mV. Die Kennlinie unter Einfluß von Ba^{2+} zeigt dagegen einen nahezu linearen Verlauf.

Die geringfügige weitere Reduktion des K_{IR} durch Ba^{2+} nach Vorinkubation mit TNF- α im Vergleich zur Kontrollmessung läßt sich auch berechnen: Während die Applikation von Ba^{2+} zur Kontrollösung zu einer Reduktion der maximalen Amplitude des K_{IR} -Stroms um $67 \pm 8 \%$ ($n = 3$) führte, betrug diese in den Messungen mit TNF- α nur $28 \pm 7\%$ ($n = 6$).

Die Reduktion der Amplitude des K_{IR} durch Ba^{2+} ist damit nach TNF- α -Inkubation geringer als bei den Messungen in der Kontrollösung. Dies ist ein Hinweis darauf, daß Ba^{2+} und TNF- α am gleichen Wirkort angreifen.

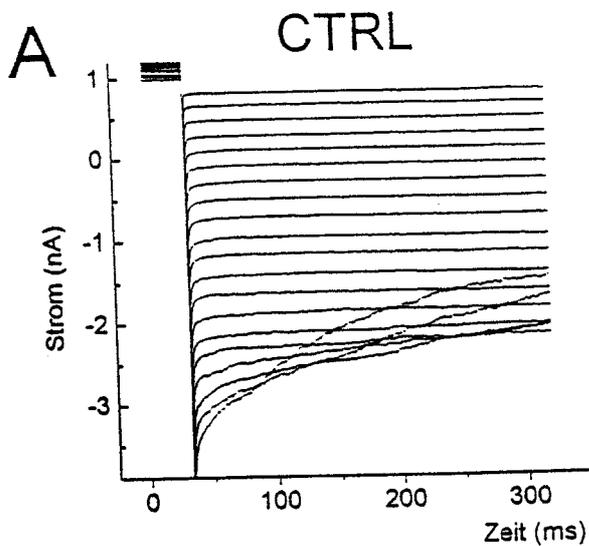


Abbildung 13 A: Astrocyt aus der Kontrollgruppe nach Erhöhung der K^+ -Konzentration in der Badlösung. Spannungsprotokoll s. Abbildung 13 D. Es traten keine verzögert gleichrichtenden K^+ -Auswärtsströme auf. Inaktivierung der Einwärtsströme bei stark hyperpolarisierenden Potentialen.

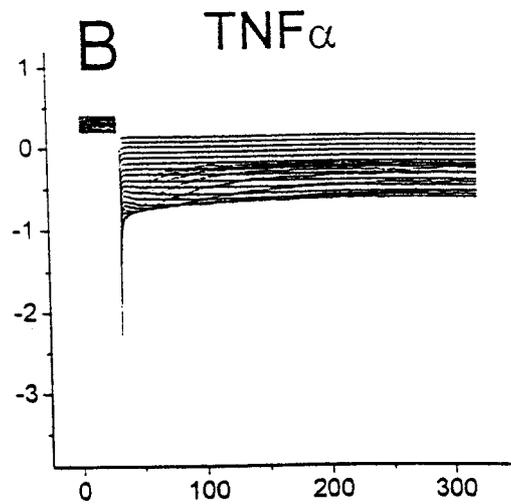


Abbildung 13 B: Astrocyt nach $TNF-\alpha$ -Inkubation. Gleiches Spannungsprotokoll wie in Abbildung 13 D. Deutliche Verminderung des K^+ -Einwärtsstroms gegenüber der Messung am Kontroll-Astrocyten.

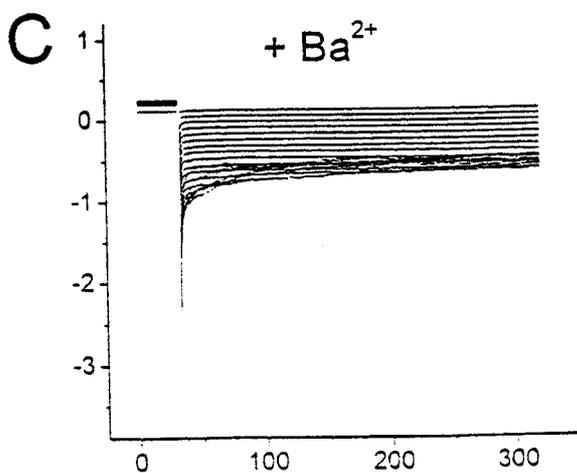


Abbildung 13 C: Applikation von Ba^{2+} führt zu einer Verringerung der einwärts gerichteten K^+ -Ströme. Spannungsprotokoll s. Abbildung 13 D.

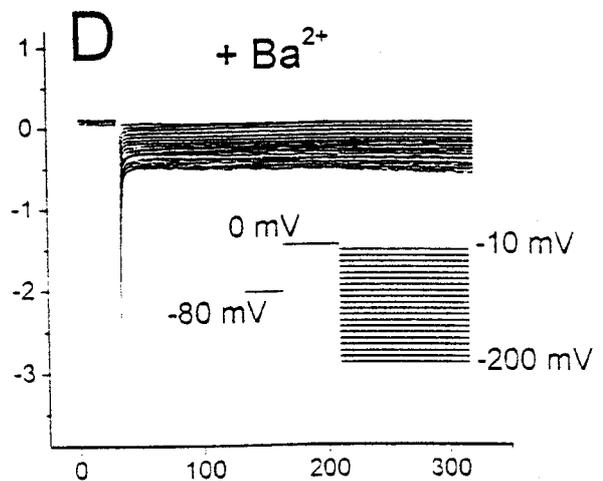


Abbildung 13 D: Zugabe von Ba^{2+} nach $TNF-\alpha$ -Inkubation führt zu einer weiteren Reduzierung der K^+ -Einwärtsströme, die aber geringer ausfällt als in der Kontrollgruppe.

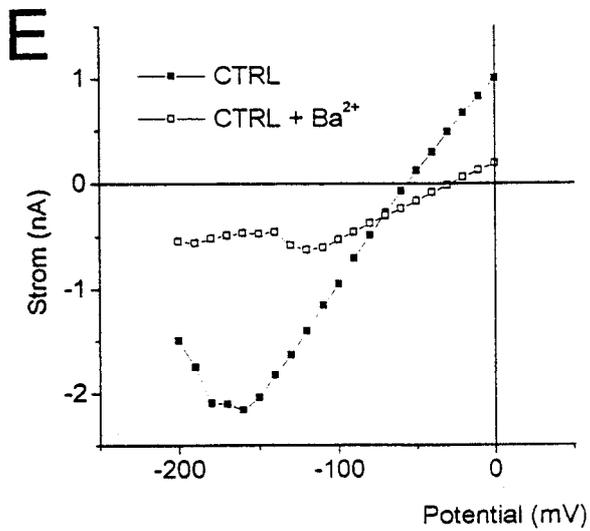


Abbildung 13 E: Strom-Spannungs-Kurven nach Messungen bei Astrocyten in Kontrollösung und nach Zugabe von Ba²⁺ (vgl. Abbildung 13A und 13C). Die Verminderung der K⁺-Einwärtsströme nach Ba²⁺-Applikation wird am flacheren Verlauf der Kurve gegenüber der Kurve der Kontrollmessung deutlich.

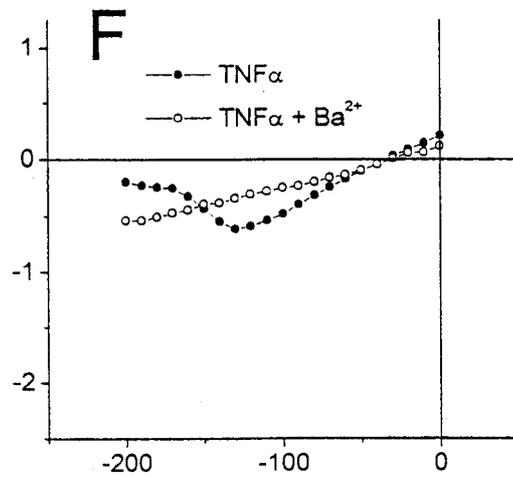


Abbildung 13 F: Strom-Spannungs-Kurven nach TNF- α -Inkubation und nach zusätzlicher Gabe von Ba²⁺ (vgl. Abbildung 13B und 13D). Nur geringe Reduktion der K⁺-Einwärtsströme durch Ba²⁺. Daher ähnlicher Verlauf der beiden Kurven.

IV. Diskussion

1. Ergebnisse dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurde zuerst gezeigt, daß TNF- α eine Depolarisation von Astrocyten induziert (siehe Tabelle 1). Der Proteinkinase C-Aktivator PMA depolarisierte die Astrocyten auf einen Wert in Nähe des Membranpotentials nach TNF- α -Inkubation (s. Tabelle 2). Bei gemeinsamer Gabe von TNF- α und PMA summierten sich diese Wirkungen nicht, was darauf hindeutet, daß beide Substanzen über den gleichen Mechanismus wirken.

Durch die PKC-Inhibitoren Staurosporin und H7 konnte die TNF- α induzierte Depolarisation unterdrückt werden (s. Abbildung 9). Damit wurde gezeigt, daß die Depolarisation der Astrocyten durch TNF- α abhängig von einer Aktivierung der PKC ist.

Ba²⁺ depolarisiert die Astrocytenmembran durch die Blockade von K⁺-Kanälen auf einen ähnlich hohen Wert wie TNF- α (s. Tabelle 3). Die zusätzliche Gabe von Ba²⁺ zur Inkubation der Astrogliazellen mit TNF- α führte zu keiner weiteren Depolarisation. Dies ist ein Hinweis darauf, daß TNF- α die Astrocyten durch eine Verminderung von K⁺-Strömen depolarisiert.

In Voltage-Clamp-Messungen wurde dieser K⁺-Einwärtsstrom als einwärts gleichrichtender K⁺-Kanal (K_{IR}) identifiziert. Dies geschah aufgrund von mehreren charakteristischen Eigenschaften des K_{IR} (*Sontheimer, 1994*):

1. Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration führte zu einer größeren Amplitude der einwärts gerichteten Ströme.
2. Der K_{IR} konnte durch Ba²⁺-Ionen in mikromolarer Konzentration blockiert werden.
3. In der Strom-Spannungskennlinie zeigte sich eine Inaktivierung des K_{IR} bei stark hyperpolarisierenden Spannungssprüngen.

Mit der Verminderung der K⁺-Leitfähigkeit durch TNF- α war auch eine signifikante Erhöhung des Membranwiderstandes verbunden (s. Abbildung 12). Da die einwärts gleichrichtenden K⁺-Kanäle beim Ruhepotential des Astrocyten geöffnet sind, bestimmen sie den Membranwiderstand des Astrocyten (*Walz et al., 1984*). Dieser Zusammenhang läßt sich durch das Ohm'sche Gesetz beschreiben:

$$\mathbf{R} = \mathbf{U} / \mathbf{I}$$

Die Gleichung zeigt eine umgekehrte Proportionalität zwischen dem Membranstrom \mathbf{I} und dem Membranwiderstand \mathbf{R} . Der Proportionalitätsfaktor ist die Membranspannung \mathbf{U} . Es zeigt sich, daß eine Verminderung der Ströme über die Zellmembran zu einer Erhöhung des Membranwiderstandes führt.

Damit konnte gezeigt werden daß TNF- α Astrocyten durch eine Verminderung des einwärts gerichteten K^+ -Stroms depolarisiert, und daß diese Depolarisierung abhängig von einer Aktivierung der Proteinkinase C ist.

2. Eigenschaften der Astrogliakultur

2.1 Besonderheiten der Kulturbedingungen

Das für die Untersuchungen dieser Arbeit verwendete biologische Modell bietet gegenüber anderen Modellen einige Vorteile.

Durch die Passage der angereicherten Astrogliakultur wird eine Reinigung und Isolierung der Zellen erreicht. Dadurch lassen sich Wechselwirkungen mit anderen Zellarten minimieren. Außerdem können die Astrocyten bei lichtmikroskopischer Betrachtung aufgrund ihrer Morphologie identifiziert werden. Sie lassen sich am Tag der Passage als isoliert liegende, flache Zellen mit kurzen Ausläufern erkennen.

Ein weiterer Vorteil der Isolierung besteht in der Möglichkeit, das Membranpotential einzelner Astrocyten im Rahmen einer Voltage-Clamp-Messung zu kontrollieren. Dies ist nach 1 oder 2-tägiger Kultivierung der Zellen möglich.

Im FCS-Medium zeigen die Astrocyten eine starke Teilungsaktivität, bis sie nach mehreren Tagen eine dichte Kultur gebildet haben. Die Zellen sind dann durch gap-junctions aneinander gekoppelt (*Binmöller und Müller, 1992*) und elektrophysiologische Messungen werden an einem Synzytium vorgenommen. Über diese gap-junctions kommt es zu Kopplungsströmen, so daß sich das Haltepotential in der Voltage-Clamp-Konfiguration schlecht kontrollieren läßt. Diese Astrocyten haben einen niedrigen Membranwiderstand und

große Stromwerte sind notwendig, um die Zellen so weit zu depolarisieren, daß spannungsabhängige Ströme gemessen werden können.

Problematisch bei Verwendung einer Zellkultur bleibt die Frage, inwiefern sich Ergebnisse auf die Verhältnisse in vivo übertragen lassen. Die Eigenschaften einer Astrocytenkultur werden durch die Kulturbedingungen beeinflusst. Beispielsweise weicht die Zusammensetzung glialer Ionenkanäle in Co-Kultur mit Neuronen von der in reinen Astrocytenkulturen ab (*Barres et al., 1990*).

Außerdem ist es denkbar, daß beim Vorgang der Dissoziation zarte Zellfortsätze abgesichert werden, die Ionenkanäle aufweisen, die nur in diesem Abschnitt der Zelle zu finden sind (*Barres et al., 1990*). Es ist unklar, ob solche Kanäle bei der Regeneration der Zelle erneut exprimiert werden.

Inzwischen konnten verschiedene spannungsabhängige Ionenkanäle bei Astrocyten nachgewiesen werden. Der einwärts gleichrichtende K^+ -Kanal, der Gegenstand dieser Arbeit war, wurde sowohl in differenzierten Astrocytenkulturen, in akut-dissoziierten Astroglia-kulturen, als auch in Gewebeschnitten, die ein Modell für reifere Astrocyten darstellen, gefunden (*Bevan, 1990; Barres et al., 1990*).

2.2. Das Membranpotential von Astrocyten

Die Veränderung des Membranpotentials von Astrocyten unter verschiedenen Versuchsbedingungen, läßt sich durch die Beeinflussung von Ionenleitfähigkeiten über der Zellmembran erklären.

Die Beschreibung des Membranpotentials einer Zelle, deren Membran für Kalium-, Chlorid- und für Natrium-Ionen durchlässig ist, erfolgte zuerst durch Goldman, später durch Hodgkin und Katz (*Goldman 1943; Hodgkin und Katz, 1949*). Die Gleichung für das Membranpotential wird daher auch GHK-Gleichung oder constant-field-equation genannt, da sie von einem konstanten Spannungsgradienten („Feld“) über der Membran ausgeht (s.u.).

Hinter dieser Gleichung steht die Vorstellung, daß sich bei konstantem Membranpotential die Ladung der Membran trotz vorhandener Leckströme nicht ändern darf. Daher müssen sich alle Leckströme zu Null addieren. Ansonsten käme es zu einer ständigen Akkumulation bzw. einem Verlust von Ladungen und das Membranpotential würde schwanken. Da die Größe der

Ionenströme davon abhängt, wie leicht Ionen die Membran passieren können, gehen die Membranpermeabilität (p) für jedes Ion und die Ionenkonzentrationen ($a =$ außen; $i =$ innen) in die Gleichung ein.

$$V_m = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_K \cdot [K^+]_a + P_{Na} \cdot [Na^+]_a + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_i}{P_K \cdot [K^+]_i + P_{Na} \cdot [Na^+]_i + P_{Cl} \cdot [Cl^-]_a}$$

- V_m : Membranpotential (Einheit: Volt)
- R : Gaskonstante
- T : absolute Temperatur
- F : Faraday-Konstante
- \ln : natürlicher Logarithmus
- P_K : Permeabilität der Zellmembran für K^+ -Ionen
- P_{Na} : Permeabilität der Zellmembran für Na^+ -Ionen
- P_{Cl} : Permeabilität der Zellmembran für Cl^- -Ionen
- $[K^+]$: Kaliumkonzentration
- $[Na^+]$: Natriumkonzentration
- $[Cl^-]$: Chloridkonzentration
- a : außen (extrazellulär)
- i : innen (intrazellulär)

Aus der Gleichung geht hervor, daß das Membranpotential in der Nähe des Gleichgewichtspotentials derjenigen Ionen liegt, deren Leitfähigkeit am größten ist. Anders ausgedrückt: Die Ionensorte, deren Strom durch geöffnete Ionenkanäle am größten ist, wird das Membranpotential in Richtung auf ihr Gleichgewichtspotential „ziehen“.

In ausdifferenzierten Astrocyten liefern die K^+ -Ionen einen entscheidenden Beitrag zum Membranpotential (*Walz et al., 1984*), das sehr negative Werte annimmt (-75 bis -90 mV).

Die hohe K^+ -Leitfähigkeit der Astrocyten im Bereich des Ruhepotentials kommt durch Ströme über den einwärts gleichrichtenden K^+ -Kanal (K_{IR}) zustande (*Sontheimer, 1994*). Eine Blockade des K_{IR} führt daher zu einer deutlichen Verringerung der Permeabilität für K^+ -Ionen. Der relative Einfluß der Leitfähigkeiten der anderen Ionensorten wird größer, und es kommt zu einer Depolarisation der Zellmembran.

Für die Messungen in dieser Arbeit läßt sich nach der Nernst'schen Gleichung der Wert berechnen, den das Membrannpotential annimmt, wenn es ausschließlich durch die K⁺-Leitfähigkeit bestimmt wird:

$$E_K = 25\text{mV} \cdot \ln \frac{[\text{K}^+]_a}{[\text{K}^+]_i}$$

E_K : Gleichgewichtspotential

$[\text{K}^+]_a$: extrazelluläre K⁺-Konzentration (Badlösung)

$[\text{K}^+]_i$: intrazelluläre K⁺-Konzentration (Pipettenlösung)

Die K⁺-Konzentration der Badlösung betrug bei den Kontrollmessungen 4,0 mM, die Konzentration der Pipettenlösung 140,0 mM. Daraus ergibt sich nach Berechnung der Gleichung für das Gleichgewichtspotential ein Wert von ca. -89 mV (bei Raumtemperatur 20⁰ C).

Der Mittelwert der Astrocyten, die in Kontrollösung gemessen wurden, betrug aber nur ca. -72 mV (siehe Tabelle 1). Dies zeigt, daß das Ruhemembranpotential als Mischpotential auch von anderen Ionen und Leitfähigkeiten, z.B. der Na⁺-Leitfähigkeit, beeinflußt wird. Je nach Kulturbedingungen ist die Exprimierung von Ionenkanälen unterschiedlich, und damit das Membranpotential auch verschieden stark von der K⁺-Leitfähigkeit abhängig.

Beispielsweise verändern sich die Leitfähigkeiten auch mit dem Alter einer Astrocytenkultur Astrocyten beginnen nach ca. 24 Stunden in Kultur zunehmend gap-junctions untereinander auszubilden. Bei solchen gekoppelten Astrocyten ließen sich keine Na⁺-Leitfähigkeiten messen. Bei ungekoppelten Astrocyten hingegen ließen sich Na⁺-Leitfähigkeiten nachweisen (*Sontheimer et al., 1991*).

3. Die Rolle der Proteinkinase C bei der TNF- α -induzierten Depolarisation von Astrocyten

Die Funktion der Proteinkinase C bei der Regulation von K^+ -Leitfähigkeiten ist schon von mehreren Arbeitsgruppen untersucht worden.

Zum Beispiel führte die Aktivierung der PKC zu einer Depolarisierung von Zellen aus einer Gliom-Neuroblastom-Hybridzelllinie (NG 108-15). Für diese Beobachtung wurde die Blockade eines spannungsabhängigen K^+ -Stroms, des „M-Stroms“, verantwortlich gemacht (*Higashida und Brown, 1986*).

In einer anderen Arbeit zeigte sich, daß einwärts gleichrichtende K^+ -Ströme durch Ionenkanäle, die aus Skelettmuskeln der Maus kloniert und in Oocyten exprimiert worden sind, durch Aktivierung der PKC vermindert werden (*Fakler et al., 1994*).

Die Blockade von K^+ -Kanälen durch PKC ist auch an Astrocyten untersucht worden. Åkerman et al. beschrieben, daß die PKC Astrocyten depolarisiert, indem sie die K^+ -Leitfähigkeit beeinflußt. Sie verglichen die Depolarisierung nach Aktivierung der PKC durch Phorbol ester und nach Gabe von Ba^{2+} und schlossen daraus, daß beide Substanzen den gleichen K^+ -Strom verändern (*Åkerman et al., 1988*).

Die PKC-induzierte Depolarisation von Astrocyten wurde in einer anderen Untersuchung ebenfalls festgestellt (*Enkvist et al., 1989*). In dieser Arbeit wurde die PKC sowohl direkt über Phorbol ester, als auch indirekt über Liganden an α_1 -Adreno- und muskarinischen Rezeptoren, die zur Bildung von Inositoltrisphosphat führen, aktiviert. Die indirekte Aktivierung war mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verbunden.

Eine andere Arbeitsgruppe beobachtete, daß der Phorbol ester TPA zu Oszillationen (0,1-3,0 Hz) des Membranpotentials in 60% der Zellen einer Astrogliakultur führte. Während der Depolarisierungsphase kam es zu einer Erhöhung des Membranwiderstands um das 8-fache (*MacVicar et al., 1987*).

Die Depolarisation von Astrocyten durch TNF- α konnte bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen werden (*Köller, 1997*). Es zeigte sich, daß die TNF- α induzierte Depolarisation von

Astrocyten mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verbunden war. Dieser Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration konnte durch Zugabe von Co^{2+} , Verapamil, oder über eine Entfernung des extrazellulären Kalziums blockiert werden. Dies deutet auf einen Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran hin. Der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} fand mit einer zeitlichen Verzögerung von ca. 20 Minuten statt. Als Ursache kommen die Neubildung, der Einbau in die Zellmembran oder die Demaskierung von Ca^{2+} -Kanälen in Betracht (*Köller et al., 1996b*).

Astrocyten sind in der Lage Ca^{2+} -Kanäle zu bilden und nach Stimulation in die Zellmembran einzubauen: Eine vermehrte Expression von Ca^{2+} -Kanälen konnte nach 15-minütiger Inkubation mit cAMP beobachtet werden (*Barres et al., 1989*).

Unklar bleiben die Signalvorgänge, über die sich die TNF- α -induzierte Depolarisation vollzieht, z.B. ob dieser Prozeß über die Bindung an einen der beiden Rezeptoren, TNFR-1 oder TNFR-2, eingeleitet wird. Eine Aktivierung der Proteinkinase C durch TNF- α konnten bereits Norris et al. nachweisen. Der Mechanismus, über den dieser Vorgang verläuft, ist bisher nicht geklärt worden. Wahrscheinlich ist eine Aktivierung über die Ca^{2+} -Mobilisierung, eine andere Möglichkeit stellt der Phospholipasen-Weg dar (*Norris et al., 1994*). Denkbar ist allerdings auch, daß TNF- α den Ca^{2+} -Einstrom erst über eine Aktivierung der PKC hervorruft. Dieser Vorgang ist aber unwahrscheinlich, da eine Blockade der Ca^{2+} -Kanäle die TNF- α -induzierte Depolarisation verhindert (*Köller et al., 1996b*).

Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Astrocyten durch Aktivierung der PKC ist bisher auch noch nicht beschrieben worden. Es gibt nur Untersuchungen über die Modulation von Ca^{2+} -Kanälen durch PKC in anderen Zellarten.

Ein Ca^{2+} -Einwärtsstrom wurde nach Aktivierung von Maus-Oocyten mit Phorbolestern festgestellt (*Cuthbertson und Cobbold, 1985*). Es handelte sich um einen transienten Ca^{2+} -Einstrom, der zu Oszillationen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führte. Eine andere Arbeitsgruppe beobachtete hingegen die Blockade eines spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanals in sensorischen Neuronen nach Aktivierung der PKC (*Rane und Dunlap, 1986*).

4. Der Einfluß von Zytokinen auf K^+ -Ströme in Oligodendrocyten und Mikrogliazellen

Eine Reduktion von K^+ -Einwärtsströmen durch $TNF-\alpha$ konnte nicht nur in Astrogliazellen nachgewiesen werden, sondern ist auch schon in Arbeiten mit Oligodendrocytenkulturen beschrieben worden.

In Einzelkanalableitungen von einwärts gleichrichtenden K^+ -Strömen in humanen kultivierten Oligodendrocyten wurden signifikant verminderte Öffnungszeiten des K_{IR} nach 24-48-stündiger Inkubation mit $TNF-\alpha$ beobachtet (*McLarnon et al., 1993*).

In einer anderen Arbeit zeigte sich nach Inkubation von Oligodendrocyten mit $TNF-\alpha$ über einen Zeitraum von 24-72 Stunden eine Depolarisierung der Zellmembran, die sich auf eine Reduktion der Expression von K^+ -Kanälen zurückführen ließ. Diese Änderung des Membranpotentials war auch nach 3-tägiger Kultivierung in $TNF-\alpha$ -freiem Medium nicht reversibel. Bei kurzzeitiger Inkubation der Zellen mit $TNF-\alpha$ (15 Minuten) zeigte sich keine signifikante Änderung des Ruhepotentials (*Soliven et al., 1991*).

Die Verminderung der Expression von K^+ -Kanälen in Oligodendrocyten könnte zu einer Störung der Ionen-Homöostase im periaxonalen Raum führen und am Anfang der Reaktionen stehen, die zur Schädigung des Myelins führen. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, daß die Depolarisation der Oligodendrocyten die Phosphorylierung von Proteinen wie dem Myelin-basischen Protein (MBP) und der 2'3'-Cyclo-Nucleotid-Phosphohydrolase (CNPase) vermindert, was ebenfalls die Myelinerhaltung beeinflussen könnte (*Soliven et al., 1994*).

Auch Mikrogliazellen reagieren mit Veränderungen ihrer K^+ -Leitfähigkeit auf die Applikation bestimmter Zytokine.

Kultivierte Mikrogliazellen zeigen eine relativ hohe Expression des K_{IR} im Verhältnis zu K^+ -Auswärtsströmen. (*Kettenmann et al., 1993*). Inkubation von Mikrogliazellen in $TNF-\alpha$ führte schon nach wenigen Sekunden zu einem Anstieg der K^+ -Auswärtsströme. Nach Auswaschen des $TNF-\alpha$ waren die Auswärtsströme innerhalb einer Minute wieder inaktiviert (*Ilschner et al., 1995*).

Nach mehrstündiger Inkubation von Mikrogliazellen mit Interferon- γ zeigte sich ebenfalls eine bevorzugte Expression von K^+ -Auswärtsströmen (*Visentin et al., 1995; Fischer et al., 1995*).

Es wurden allerdings Unterschiede in der Modulation der einwärts gleichrichtenden K^+ -Ströme durch INF- γ unter verschiedenen Kulturbedingungen deutlich:

Visentin et al. fanden in einer Mikrogliakultur der Ratte in allen untersuchten Zellen einen signifikanten Anstieg der Leitfähigkeit des K_{IR} nach Gabe von IFN- γ . In einer Mikrogliakultur der Maus (*Fischer et al., 1995*) dagegen konnte bei 42% der Zellen nach IFN- γ -Inkubation keine K_{IR} -Ströme gemessen werden, während der K_{IR} nur in 2% der Ratten-Mikrogliazellen fehlte.

Außerdem ist der Einfluß der Zytokine Makrophagen-stimulierender-Faktor (M-CSF) und Granulocyten / Makrophagen-stimulierender Faktor (GM-CSF) auf K^+ -Kanäle von Mikroglia- zellen untersucht worden (*Fischer et al., 1995*). Entwicklung der Zellen unter dem Einfluß von M-CSF führte zu einer deutlichen Expression von K_{IR} -Strömen, während sich unter GM-CSF eine bevorzugte Expression von auswärts gerichteten K^+ -Strömen zeigte. Die Entwicklung der Mikrogliazellen unter GM-CSF führte zu einer Aktivierung der Zellen, die nun in der Lage waren, Antigene zu präsentieren. Bei Mikrogliazellen, die unter M-CSF heranwuchsen, fehlte diese Eigenschaft. K^+ -Auswärtsströme scheinen daher einen aktivierten Zustand von Mikro- gliazellen anzuzeigen.

Francke und Mitarbeiter verglichen die Membraneigenschaften von Müller-Stützzellen aus der Retina von Organspendern mit solchen aus E nukleationspräparaten nach Operationen bei unterschiedlichen Augenerkrankungen (*Francke et al., 1997*). Ein hoher Anteil Müller-Zellen der Patienten-Retinae zeigten einen signifikant erhöhten Membranwiderstand gegenüber der Spendergruppe, verbunden mit einem Verlust des einwärts rektifizierenden K^+ -Stroms. Diese Zellen besaßen auch ein positiveres Membranpotential.

Die Ursache für diese Modulation der K^+ -Leitfähigkeit ist noch nicht bekannt. Es könnten aber auch in diesem Fall Zytokine eine Rolle spielen, die bei Augenerkrankungen freigesetzt werden, und elektrophysiologische Eigenschaften der retinalen Gliazellen beeinflussen.

5. Der Einfluß von TNF- α auf elektrophysiologische Eigenschaften von Neuronen

Während Astrocyten von TNF- α durch die Blockade von K⁺-Leitfähigkeiten depolarisiert werden können, scheint diese Eigenschaft bei Neuronen zu fehlen.

Inkubation (90 Minuten) kultivierter Neurone von Ratten mit TNF- α führte weder zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, noch zu einer Depolarisation der Zellen (Köller *et al.*, 1996a). Auch IL-1 oder IL-6 führten zu keiner Veränderung des Membranpotentials der Neurone und ließen die Na⁺- und K⁺-Ströme unbeeinflusst.

Bei einer Inkubation der Neurone mit Liquor von MS-Patienten zeigte sich eine Inaktivierung des neuronalen Na⁺-Einstroms. Dieser Effekt kann aber nicht über eine Wechselwirkung der Neurone mit TNF- α , IL-1 oder IL-6 erklärt werden (Köller *et al.*, 1996a).

Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte ebenfalls eine Neuronenkultur der Ratte. Nach 12-48-stündiger Inkubation der Neurone mit TNF- α kam es zu einem Anstieg des transienten auswärts-gerichteten K⁺-Stroms („A-Strom“), ohne dessen kinetische Eigenschaften, wie Aktivierung oder Inaktivierung zu beeinflussen. Noch längere Inkubation führte zum Verschwinden des Effektes. Die Applikation von Anti-TNF- α -Rezeptor-Antikörpern und von Inhibitoren der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase (PC-PLC) und der PKC unterdrückten die TNF- α -Wirkung (Houzen *et al.*, 1997).

Bei Neuronen anderer Spezies, und zwar von Molluskenarten, konnte eine Beeinflussung neuronaler K⁺- und Na⁺-Ströme durch TNF- α beobachtet werden. Eine Arbeitsgruppe untersuchte die Effekte von TNF- α , das lokal auf das Soma von Neuronen aus dem abdominellen Ganglion von *Aplysia kurodai* appliziert wurde. Es konnte eine Verminderung der K⁺-Leitfähigkeit gemessen werden (Sawada *et al.*, 1990).

In Neuronen von *Onchidium*, einer weiteren Molluskenart, bewirkte TNF- α eine Hyperpolarisation, die durch eine Reduktion der Na⁺-Leitfähigkeit und eine Aktivierung der Na⁺-Pumpe erklärt werden konnte (Mimura *et al.*, 1994).

6. Die funktionelle Bedeutung der Veränderung elektrophysiologischer Eigenschaften der Astrocyten durch TNF- α

6.1. Die funktionelle Bedeutung des K_{IR}

Das Ruhemembranpotential von Astrocyten wird entscheidend durch die Aktivität des einwärts gleichrichtenden K^+ -stroms (K_{IR}) mitbestimmt (Sontheimer, 1994). Diese Ionenkanäle weisen, im Gegensatz zu anderen Leitfähigkeiten, eine hohe Öffnungswahrscheinlichkeit in Nähe des Ruhepotentials und bei negativeren Werten auf. Bei stärker depolarisierten Potentialen ist die Öffnungswahrscheinlichkeit nahe Null. Der Ausdruck „einwärts gleichrichtend“ beschreibt die Eigenschaft des Kanals, K^+ -Ionen den Einstrom in die Zelle leicht zu ermöglichen, während ein Ausstrom erschwert ist (Bevan, 1990).

Die Expression von K^+ -Kanälen verändert sich im Laufe der Entwicklung eines Astrocyten. In jungen Astrogliakulturen der Ratte, bis zum 5. postnatalen Tag (P5), ist der auswärts gleich- richtende K^+ -Strom (K_D) die vorherrschende Leitfähigkeit. Nur bei 40% der Zellen ließ sich ein K_{IR} -Strom nachweisen. Innerhalb der nächsten Tage steigt der Anteil an Astrocyten, die den K_{IR} exprimieren, an, während die Leitfähigkeit des K_D -Stroms abnimmt. Am 20. postnatalen Tag (P20) wurde bei 90% der Zellen der K_{IR} gemessen, der bei den ausdifferenzierten Astro- cyten den größten Ionenstrom darstellte (Bordey und Sontheimer, 1997).

Die elektrophysiologischen Eigenschaften proliferierender Astrocyten wurden in dem in vitro-Modell einer reaktiven Gliose untersucht (MacFarlane und Sontheimer, 1997). In nicht-prolierierenden Astrocyten hatte der K_{IR} -Strom die größte Leitfähigkeit. Proliferierende Zellen dagegen zeigten eine Abnahme der K_{IR} -Leitfähigkeit um das 3-fache und einen Anstieg der K^+ -Auswärtsströme auf das Doppelte im Vergleich zu nicht-prolierierenden Zellen. Das Mem- branpotential der proliferierenden Zellen war signifikant erniedrigt.

Diese Untersuchungen zeigen, daß die Inaktivierung des K_{IR} eine Eigenschaft aktivierter, proliferierender Astrocyten, sowohl im Rahmen ihrer Entwicklung, als auch unter den pathologischen Bedingungen einer Gliose ist.

Eine reaktive Gliose bei einem Verlust von Neuronen ist ein Kennzeichen von histologischen Präparaten epileptogener Foci (*deLanerolle et al., 1994*). In humanen Astrocyten aus epileptogenen Foci des Hippocampus wurde ein erniedrigtes Membranpotential im Vergleich zu Astrocyten anderer Kortexregionen gemessen. Ein Verlust der K_{IR} -Kanäle könnte die Ursache für diese Beobachtung sein (*O'Connor et al., 1998*).

In einer anderen Arbeit wurde die Induktion epileptiformer Aktivität im Hippocampus von Ratten durch Caesium untersucht. Die Veränderungen der hippocampalen Erregbarkeit durch Caesium wurden u.a. durch eine Blockade des glialen K_{IR} erklärt (*Janigro et al., 1997*).

6.2. Mögliche funktionelle Auswirkungen der Veränderung glialer K^+ -

Ströme durch $TNF-\alpha$

$TNF-\alpha$ induziert bei Astrocyten eine Blockade der K_{IR} -Ströme, verbunden mit einer Depolarisation der Zellmembran. Spannungsabhängige Funktionen der Astrocyten, z.B. Ionenhomöostase oder Glutamat-Aufnahme werden durch diese Depolarisation wahrscheinlich gestört, was funktionelle Konsequenzen, auch für Neurone, nach sich ziehen kann.

Eine wichtige Funktion von Astrocyten ist die sogenannte „Kaliumpufferung“. Akkumulation von extrazellulärem Kalium kann die Bildung von Aktionspotentialen im Neuron verhindern und die synaptische Übertragung beeinträchtigen.

Die enge anatomische Beziehung zwischen Nervenaxonen und Astrocytenfortsätzen führt dazu, daß sich K^+ -Ionen, die bei der Depolarisation von Neuronen austreten, in den schmalen Interzellularspalten ansammeln. Viele Untersuchungen weisen darauf hin, daß Gliazellen die extrazelluläre K^+ -Konzentration regulieren können (*Bevan, 1990*).

Dafür kommen mehrere Regulationsmöglichkeiten in Betracht: Bei lokal erhöhter extrazellulärer K^+ -Konzentration dringt K^+ durch offene Ionenkanäle in den Astrocyten ein und depolarisiert diesen Bereich der Zellmembran. Die K^+ -Ionen können an einer anderen Stelle der Membran oder in einer anderen Gliazelle, da sie durch gap-junctions miteinander verbunden sind, wieder austreten. Dadurch entsteht ein lokaler Kreislauf, der die K^+ -Aufnahme und Freisetzung aufrecht erhält (*Orkand et al., 1966*).

Eine weitere Möglichkeit ist die gemeinsame Aufnahme von K^+ - und Cl^- -Ionen durch den Astrocyten und eine Speicherung der Ionen vor Ort (*Ballanyi et al., 1987*). Als Ionenkanal für die K^+ -Aufnahme kommt der K_{IR} -Kanal in Frage, da er beim Ruhepotential der Astrogliazelle geöffnet ist. Änderungen des Membranpotentials und Blockierung des K_{IR} beeinträchtigen damit die Kaliumpufferung durch Astrocyten (*Bevan, 1990*).

Eine Schlüsselrolle spielen Astrocyten auch im Stoffwechsel des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat. Erhöhte Konzentration von Glutamat können neurotoxisch wirken und beeinflussen die Übertragung an neuronalen Synapsen (*Choi, 1988*). Astrocyten sind in der Lage Glutamat aufzunehmen und mit Hilfe der Glutaminsynthetase zu Glutamin umzusetzen (*Chao und Hu, 1994*).

Die Aufnahme von Glutamat in die Astrogliazelle kann über verschiedene Transportsysteme, die Na^+ -, Cl^- - oder Ca^{2+} -abhängig sind, erfolgen (Flott u. Seifert, 1991). Ein Mechanismus besteht aus einem Co-Transport von Glutamat mit 3 Na^+ -Ionen (oder 2 Na^+ und 1 H^+) im Austausch gegen 1 K^+ - und 1 OH^- -Ion (*Bouvier et al., 1992*). Die Glutamat-Aufnahme ist damit abhängig vom Membranpotential, vom pH-Wert und von den Konzentrationen der genannten Ionen (*Ye und Sontheimer, 1996*).

Die Inkubation kultivierter Astrocyten mit $TNF-\alpha$ über einen längeren Zeitraum (24 Stunden) führte zu einer Reduzierung der Glutamat-Aufnahme (*Ye und Sontheimer, 1996; Fine et al. 1996*). Die verminderte Glutamat-Aufnahme der Astrocyten könnte durch eine $TNF-\alpha$ -induzierte Erniedrigung des Membranpotentials und eine Störung des spannungsabhängigen Glutamat-Aufnahmesystems erklärt werden.

In einer früheren Studie (*Piani et al., 1993*) hatte $TNF-\alpha$ zu keiner Reduktion der glialen Aufnahme von Glutamat geführt. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse ist in den verschiedenen Kulturbedingungen zu finden: Piani et al. führten ihre Messungen an sekundären Zellkulturen nach mehr als 4 Wochen in Kultur durch, während die anderen Arbeitsgruppen mit Primärkulturen arbeiteten, die bei Ye und Sontheimer nicht länger als 10 Tage kultiviert worden waren.

Die Aufnahme von extrazellulärem Glutamat, das an synaptischen Spalten freigesetzt wird, durch die Astrocyten, ist eng mit dem Energiemetabolismus verbunden. Der Co-Transport von Glutamat mit Na^+ führt zu einem Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration im Astrocyten, wodurch der ATP-abhängige Na^+/K^+ -Austausch aktiviert wird. Durch die

Hydrolyse des ATP wird die Glykolyse stimuliert, die Glukose-Aufnahme in den Astrocyten wird gesteigert und das Endprodukt der Glykolyse, Lactat, wird an Neurone abgegeben, wo es als Energiesubstrat dient (*Tsacopoulos und Magistretti, 1996*). Somit sorgen Gliazellen für die Verknüpfung von neuronaler Aktivität und der Bereitstellung von Energiemetaboliten im ZNS.

Ein Merkmal der TNF- α -induzierten Depolarisation von Astrocyten ist ein Ca^{2+} -Einstrom, der zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt (*Köller et al., 1996b*). Der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} könnte einen Schritt bei der immunologischen Aktivierung von Astrocyten darstellen.

Die Stimulation der Interleukin-6-Produktion von Astrocyten durch TNF- α und Interleukin-1 β konnte durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nachgeahmt werden. Die intrazelluläre Signalübertragung scheint eine Aktivierung der Proteinkinase C durch Ca^{2+} zu beinhalten (*Norris et al., 1994*). Auch die Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen in Astrocyten kann durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration induziert werden (*Hartung und Toyka, 1987a; Hartung und Toyka, 1987b*).

Einen weiteren Ca^{2+} -abhängigen Effekt scheint die TNF- α -induzierte Expression von Calbindin in Astrocyten darzustellen (*Mattson et al., 1995*): In PC 12- Phäochromozytom-Zellen führte eine leichte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer Steigerung der Calbindin-Expression (*Vyas et al., 1994*). In ähnlicher Weise könnte in Astrocyten die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} durch TNF- α an der Induktion von Calbindin beteiligt sein.

Calbindin ist ein Ca^{2+} -bindendes Protein, das wahrscheinlich bei der Regulation des Ca^{2+} -Haushalts der Zelle eine wichtige Rolle spielt. In hohen Konzentrationen ist Ca^{2+} zytotoxisch, da es Enzyme wie Proteasen, Topoisomerasen und Endonukleasen aktiviert. Astrocyten, die nach Inkubation mit TNF- α eine Calbindin-Expression aufwiesen, zeigten gegenüber Azidose und Ca^{2+} -Toxizität eine höhere Resistenz, was auf eine zytoprotektive Funktion des Calbindin hinweist (*Mattson et al., 1995*).

Die Ergebnisse deuten daraufhin, daß Astrocyten eine wesentliche Rolle bei den pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen einer Entzündung des ZNS spielen könnten. Störungen der neuronalen Aktivität, die zu klinischen Symptomen führen, könnten als eine Folge der Beeinflussung von Astrocyteneigenschaften, z.B. durch TNF- α und andere Zytokine, angese-

hen werden. Diese Arbeit bietet weitere Hinweise darauf, welche Rolle TNF- α bei der Modulation elektrophysiologischer Eigenschaften von Astrocyten spielt.

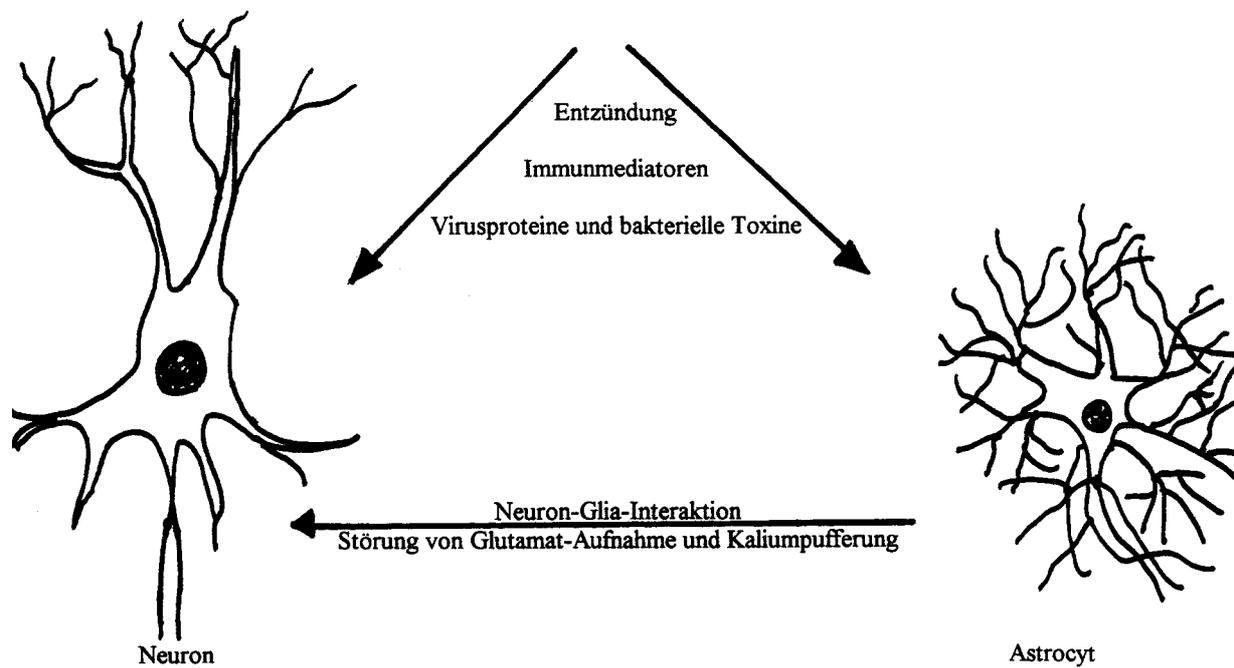


Abbildung 14: Immunmediatoren, die bei entzündlichen Erkrankungen des ZNS freigesetzt werden, können direkt elektrophysiologische Eigenschaften von Neuronen beeinflussen und damit zu Dysfunktionen führen. Neurone können aber auch indirekt über eine Störung der Astrocyten beeinträchtigt werden (nach Köller *et al.*, 1997).

V. Literaturverzeichnis

- Åkerman, K.E.O., Enkvist, K., Holopainen, I.:
Activators of protein kinase C and phenylephrine depolarize the astrocyte membrane by reducing the K⁺ permeability. *Neurosc. Lett.* **92**: 265-269, 1988
- Austyn, J.M., Wood, K.J.:
Tumor necrosis factor and their receptor in: Austyn, J.M., Wood, K.J.: Principles of molecular immunology. *Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1993, S.567-572*
- Ballanyi, K., Grafe, P., ten Bruggencate, G.:
Ion activities and potassium uptake mechanisms of glial cells in guinea-pig olfactory cortex slices. *J. Physiol.* **382**:159-174, 1987
- Ballestas, M.E., Benveniste, E.N.:
Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α -mediated regulation of ICAM-1 gene expression in astrocytes requires protein kinase C activity. *Glia* **14**: 267-278, 1995
- Barres, B.A., Chun, L.L.Y., Corey, D.P.:
Calcium current in cortical astrocytes: Induction by cAMP and neurotransmitters and permissive effect of serum factors. *J. Neurosci.* **9**:3169-3175, 1989
- Barres, B.A., Koroshetz, W.J., Chun, L.L.Y., Corey, D.P.:
Ion channel expression by white matter glia: the type-1 astrocyte. *Neuron* **5**:527-544, 1990
- Benos, D.J., McPherson, S., Hahn, B.H., Chaikin, M.A., Benveniste, E.N.:
Cytokines and HIV envelope glykoprotein gp120 stimulate Na⁺ / H⁺ exchange in astrocytes. *J. Biol. Chem.* **269**: 13811-13816, 1994
- Benveniste, E.N.:
Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, functions and mechanisms of action. *Am. J. Physiol.* **263**: C1-C16, 1992
- Benveniste, E.N., Benos, D.J.:
TNF- α and IFN- γ mediated signal transduction pathways: effects on glial cell gene expression and function. *FASEB J.* **9**: 1577-1584, 1995
- Benveniste, E.N., Vidovic, M., Panek, R.B., Norris, J.G., Reddy, A.T., Benos, D.J.:
Interferon- γ -induced astrocyte class II major histocompatibility complex gene expression is associated with both protein kinase C activation and Na⁺ entry. *J. Biol. Chem.* **266**: 18119-18126, 1991
- Bevan, S.:
Ion channels and neurotransmitter receptors in glia. *Sem. Neurosc.* **2**: 467-481, 1990
- Binmöller, F.J., Müller, C.M.:

- Postnatal development of dye coupling among astrocytes in rat visual cortex. *Glia* **6**: 126-137, 1992
- Bordey, A., Sontheimer, H.:
Postnatal development of ionic currents in rat hippocampal astrocytes in situ. *J. Neurophysiol.* **78**: 461-477, 1997
- Bottenstein, J.E., Sato, G.H.:
Growth of rat neuroblastoma cell-line in serum -free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 514-517, 1979
- Bouvier, M., Szatkowski, M., Amato, A., Attwell, D.:
The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* **360**: 471-474, 1992
- Chao, C.C., Hu, S.:
Tumor necrosis factor-alpha potentiates glutamate neurotoxicity in humal fetal brain cell cultures. *Dev. Neurosc.* **16**: 172-179, 1994
- Choi, D.W.:
Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**: 623-634, 1988
- Chung, J.Y., Benveniste, E.N.:
Tumor necrosis factor- α production by astrocytes: Induction by lipopolysaccharide, IFN- γ and IL-1 β . *J. Immunol.* **144**: 2999-3007, 1990
- Cuthbertson, K.S.R., Cobbold, P.H.:
Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by sustained oscillations in cell Ca²⁺. *Nature* **316**: 541-542, 1985
- Enkvist, M.O.K., Holopainen, I., Åkerman, K.E.O.:
 α -receptor and cholinergic receptor-linked changes in cytosolic Ca²⁺ and membrane potential in primary rat astrocytes. *Brain Res.* **500**: 46-54, 1989
- Epstein, L.G., Gendelman, H.E.:
Human immunodeficiency virus type I infection of the nervous system: pathogenetic mechanisms. *Ann. Neurol.* **33**: 429-436, 1993
- Fakler, B., Brandle, U., Glowatzki, E., Zenner, H.P., Ruppertsberg J.P.:
K_{IR} 2.1 inward rectifier K⁺-channels are regulated independently by protein kinases and ATP hydrolysis. *Neuron* **13**: 1413-1420, 1994
- Farley, J., Auerbach, S.:
Protein kinase C activation induces conductance changes in Hermisenda photoreceptors like those seen in associative learning. *Nature* **319**: 220-223, 1986
- Fine, S.M., Angel, R.A., Perry, S.W., Epstein, L.G., Rothstein, J.D., Dewhurst, S. Gelbard, H.A.:
Tumor necrosis factor α inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. *J. Biol. Chem.* **271**: 15303-15306, 1996
- Fischer, H.G., Eder, C., Hadding, U., Heinemann, U.:
Cytokine-dependent K⁺ channel profile of microglia at immunologically defined functional states. *Neuroscience* **64**: 183-191, 1995
- Flott, B., Seifert, W.:
Characterization of glutamate uptake systems in astrocyte primary cultures from rat brain. *Glia* **4**: 293-304, 1991

- Franciotta, D.M., Grimaldi, L.M.E., Martino, G.V., Piccolo, G., Bergamaschi, R., Citterio, A., Melzi d'Eril, G.V.:
Tumor necrosis factor in serum and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **26**: 787-789, 1989
- Francke, M., Pannicke, T., Biedermann, B., Faude, F., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Reichelt, W.:
Loss of inwardly rectifying potassium currents by human retinal glial cells in diseases of the eye. *Glia* **20**: 210-218, 1997
- Goldman, D.E.:
Potential, impedance and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* **27**: 37-60, 1943
- 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
- Harrison, B.C., Mobley, P.L.:
Phorbol ester-induced change in astrocyte morphology: Correlation with protein kinase C activation and protein phosphorylation. *J. Neurosc. Res.* **25**: 71-80, 1990
- Hartung, H.P., Toyka, K.V.:
Leukotriene production by cultured astroglial cells. *Brain Res.* **435**: 367-370, 1987a
- Hartung, H.P., Toyka, K.V.:
Phorbol diester TPA elicits prostaglandin E release from cultured rat astrocytes. *Brain Res.* **417**: 347-349, 1987b
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., Susaki, Y.:
Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotid dependent protein kinases and protein kinase C. *Biochem.* **23**: 5036-5041, 1984
- Higashida, H., Brown, D.A.:
Two phosphatidylinositide metabolites control two K⁺-currents in a neuronal cell. *Nature* **323**: 333-335, 1986
- Hille, B.:
Ionic channels of excitable membranes, 2nd Edition. *Sinauer, Sunderland, MA*, 1992
- Hodgkin, A.L., Katz, B.:
The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* **108**: 37-77, 1949
- Hofman, F.M., Hinton, D.R., Johnson, K., Merrill, J.E.:
Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J. Expl. Med.* **170**: 607-612, 1989
- Hohlfeld, R., Meinl, E., Weber, F., Zipp, F., Schmidt, S., Sotgiu, S., Goebels, N., Voltz, R., Spuler, S., Iglesias, A., Wekerle, H.:
The role of autoimmune T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurology* **45**(suppl6): S33-S38, 1995
- Houzen, H., Kikuchi, S., Kanno, M., Shinpo, K., Tashiro, K.:
Tumor Necrosis Factor enhancement of transient outward potassium currents in cultured rat cortical neurons. *J. Neurosc. Res.* **50**: 990-999, 1997

- Ilschner, S., Ohlemeyer, C., Gimpl, G., Kettenmann, H.:
Modulation of potassium currents in cultured murine microglial cells by receptor activation and intracellular pathways. *Neuroscience* **66**: 983-1000, 1995
- Janigro, D., Gasparini, S., D'Ambrosio, R., McKhann, G., DiFrancesco, D. :
Reduction of K⁺ uptake in glia prevents long-term depression maintenance and causes epileptiform activity. *J. Neurosci.* **17**: 2813-2824, 1997
- Kettenmann, H., Banati, B., Walz, W.:
Electrophysiological behavior of microglia. *Glia* **7**: 93-101, 1993
- Köller, H.:
TNF α in cerebrospinal fluid of meningitis patients reduces astrocytes membrane potential. *J. Neuroimmunol.* **76**: 185-188, 1997
- Köller, H., Buchholz, J., Siebler, M.:
Cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients inactivates neuronal Na⁺-current *Brain* **119**: 457-463, 1996a
- Köller, H., Thiem, K., Siebler, M.:
Tumor necrosis factor α increases intracellular Ca²⁺ and induces depolarization in cultured astroglial cells. *Brain* **119**: 2021-2017, 1996b
- Köller, H., Siebler, M., Hartung, H.-P.:
Immunologically induced electrophysiological dysfunction: implications for inflammatory diseases of the CNS and PNS. *Prog. Neurobiol.* **52**: 1-26, 1997
- Krauss, G.:
Die Proteinkinase C in: Krauss, G.: Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. *Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto*, 1997, S.263-272
- deLanerolle, N.C., Kim, J.H., Brines, M.L.:
Cellular and molecular alterations in partial epilepsy. *Cli. Neurosci.* **2**: 64-81, 1994
- Latzkovits, L., Kátay, L., Torday, C., Labourdette, G., Pettmann, B., Sensenbrenner, M.:
Sodium and potassium uptake in primary cultures of rat astroglial cells induced by long-term exposure to the basic astroglial growth factor (AGF2). *Neurochem. Res.* **14(10)**: 1025-1030, 1989
- Lotan, I., Dascal, N., Naor, Z., Boton, R.:
Modulation of vertebrate brain Na⁺ and K⁺ channels by subtypes of protein kinase C. *FEBS Lett.* **267**: 25-28, 1990
- MacFarlane, S.N., Sontheimer, H.:
Electrophysiological changes that accompany reactive gliosis in vitro. *J. Neurosci.* **17(19)**: 7316-7329, 1997
- MacVicar, B.A., Crichton, S.A., Barnard, D.M., Tse, F.W.Y.:
Membrane conduction oscillations in astrocytes induced by phorbol ester. *Nature* **329**: 242-243, 1987
- Madison, D.V., Malenka, R.C., Nicoll, R.A.:
Phorbol esters block a voltage-sensitive chloride current in hippocampal pyramidal cells. *Nature* **321**: 695-697, 1986
- Marty A., Neher, E:
Tight-seal whole-cell recording. in: Single Channel Recording. Ed. Sakmann, B., Neher, E., *Plenum Press, New York, London*, 1983, S.107-122

- Mattson, M.P., Cheng, B., Baldwin, S.A., Smith-Swintosky, V.L., Keller, J., Geddes, J.W., Scheff, S.W., Christakos, S.:
Brain injury and tumor necrosis factors induce calbindin D-28k in astrocytes: Evidence for a cytoprotective response. *J. Neurosc. Res.* **42**: 357-370, 1995
- McLarnon, J.G., Michikawa, M., Kim, S.U.:
Effects of tumor necrosis factor on inward potassium current and cell morphology in cultured human oligodendrocytes. *Glia* **9**: 120-126, 1993
- Mimura, Y., Gotow, T., Nishi, T., Osame, M.:
Mechanisms of hyperpolarization induced by two cytokines, hTNF- α and hIL-1 α in neurons of the mollusc, *Onchidium*. *Brain Res.* **653**: 112-118, 1994
- Neumann, H., Cavalié, A., Jenne, D.E., Wekerle, H.:
Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* **269**: 549-551, 1995
- Nishizuka, Y.:
Intracellular signaling by hyperpolarisation of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**: 607-613, 1992
- Norris, J.G., Tang, L., Sparacio, S.M., Benveniste, E.N.:
Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 β and tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* **152**: 841-849, 1994
- Numberger, M., Draguhn, A.:
Patch-Clamp-Technik (Labor im Fokus). *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996*
- O'Connor, E.R., Sontheimer, H., Spencer D.D., deLanerolle, N.C.:
Astrocytes from human hippocampal epileptogenic foci exhibit action potential-like responses. *Epilepsia* **39** (4):347-354, 1998
- Orkand, R.K., Nicholls, J.G., Kuffler, S.W.:
Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* **29**: 788-806, 1966
- Piani, D., Frei, K., Pfister, H.-W., Fontana, A.:
Glutamate uptake by astrocytes is inhibited by reactive oxygen intermediates but not by other macrophage-derived molecules including cytokines, leukotrienes or platelet-activating factor. *J. Neuroimmun.* **48**: 99-104, 1993
- Raine, C.S.:
The Norton lecture: a review of the oligodendrocyte in the multiple sclerosis lesion. *J. Neuroimmunol.* **77**: 135-152, 1997
- Rane, S.G., Dunlap, K.:
Kinase C activator 1,2-oleoylactylglycerol attenuates voltage-dependent calcium current in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 184-188, 1986
- Rieckmann, P., Hartung, H.-P.:
Neuroimmunologie in: Herdegen, T., Tölle, T.R., Bähr, M. [Hrsg.]: *Klinische Neurobiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1997, S.149-187*
- Rieckmann, P., Albrecht, M., Kitze, B., Weber, T., Tumani, H., Brooks, A., Lürer W., Helwig, A., Poser, S.:

- Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology* **44**: 1523-1526, 1994
- Sawada, M., Hara, N., Maeno, T.:
Extracellular tumor necrosis factor induces a decreased K⁺ conductance in an identified neuron of *aplysia kurodai*. *Neurosc. Lett.* **115**: 219-225, 1990
- Schütze, S., Machleidt, T., Krönke, M.:
Mechanisms of tumor necrosis factor action. *Sem. Oncol.* **19** (suppl.4): 16-24, 1992a
- Schütze, S., Potthoff, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K., Krönke, M.:
TNF activates NFκB by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced „acidic“ sphingomyelin breakdown. *Cell* **71**(5):765-776, 1992b
- Sharief, M.K., Ciardi, M., Thompson, E.J.:
Blood-brain barrier damage in patients with bacterial meningitis: Association with tumor necrosis factor-α but not interleukin-1β. *J. Infect. Dis.* **166**: 350-358, 1992
- Soliven, B., Szuchet, S., Nelson, D.J.:
Tumor necrosis factor inhibits K⁺ current expression in cultured oligodendrocytes. *J. Membr. Biol.* **124**: 127-137, 1991
- Soliven, B., Takeda, M., Szuchet, S.:
Depolarizing agents and tumor necrosis factor-α modulate protein phosphorylation in oligodendrocytes. *J. Neurosc. Res.* **38**: 91-100, 1994
- Sontheimer, H. :
Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia* **11**: 156-172, 1994
- Sontheimer, H., Waxman, S.G., Ransom, B.R.:
Relationship between Na⁺ current expression and cell-cell coupling in astrocytes cultured from rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* **65**: 989-1002, 1991
- Stichel, C.C., Müller, H.W.:
Expression of inherent neuronal shape characteristics after transient sensitivity to epigenetic factors. *Dev. Brain Res.* **68**: 149-162, 1992
- Thio, C.L., Sontheimer, H.:
Differential modulation of TTX-sensitive and TTX-resistant Na⁺-channels in spinal cord astrocytes following activation of protein kinase C. *J. Neurosc. Res.* **13**: 4889-4897, 1993
- Tsacopoulos, M., Magistretti, P.J.:
Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosc.* **16**: 877-885, 1996
- 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
- Vyas, S., Michel, P.P., Copin, M.C., Biguet, N.F., Thomasset, M., Agid, Y.:
Induction of calbindin-D 28K gene and protein expression by physiological stimuli but not in calcium-mediated degeneration in rat PC12 pheochromocytoma cells. *FEBS Lett.* **351**: 53-57, 1994
- Walz, W., Wuttke, W., Hertz, L.:
Astrocytes in primary cultures: Membrane potential characteristics reveal exclusive potassium conductance and potassium accumulator properties. *Brain Res.* **292**: 367-374, 1984

Woodrooffe, N.:

Cytokine production in the central nervous system. *Neurology* 45(supp6): S6-S10, 1995

Ye, Z.C., Sontheimer, H.:

Cytokine modulation of glial glutamate uptake: a possible involvement of nitric oxide. *NeuroReport* 7: 2181-2185, 1996

VI. Zusammenfassung

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) ist ein pleiotropes Zytokin, das eine bedeutsame Rolle bei Immunreaktionen des Zentralen Nervensystems (ZNS) einnimmt. Es ist bekannt, daß TNF- α Astrogliazellen im Rahmen solcher Prozesse aktivieren und eine Depolarisation der Astrocytenmembran bewirken kann. Ziel dieser Arbeit war es, die elektrophysiologischen Vorgänge, die zur Depolarisation der Astrocyten führen, zu beschreiben und zu untersuchen, ob die Proteinkinase C (PKC) an der intrazellulären Signalkette dieses Vorganges beteiligt ist. Als Modell dienten dissoziierte Astrogliakulturen aus dem Cortex neugeborener Wistar-Ratten. Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, daß vorherige Inkubation der Astrocyten mit den PKC-Antagonisten Staurosporin und H7 zu einer Reduktion der TNF- α induzierten Depolarisation führte. Daraus läßt sich schließen, daß dieser Vorgang unter einer Beteiligung der PKC abläuft. In weiteren Untersuchungen wurden Widerstands- und Strommessungen in der Voltage-Clamp-Konfiguration durchgeführt. Hier zeigte sich, daß TNF- α eine deutliche Reduktion der einwärts gerichteten K^+ -Ströme bewirkt, wobei die K^+ -Auswärtsströme unbeeinflusst blieben. Damit verbunden war ein signifikanter Anstieg des Membranwiderstandes der Astrocyten.

Die Veränderung der K^+ -Leitfähigkeit und des Membranpotentials der Astrocyten durch TNF- α kann zur Beeinflussung glialer Funktionen führen. Diese Prozesse können indirekt zur Störung der neuronalen Aktivität, z.B. im Rahmen von Entzündungskrankheiten des ZNS, beitragen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Dierk Michael Oel
geboren am 9. März 1973
in Düsseldorf
ledig

Schulbildung

1979-1983	Suitbertus-Grundschule, Ratingen
1983-1992	Theodor-Heuss-Gymnasium, Ratingen

Zivildienst

1992 / 93	Pflegedienst im St. Marien-Krankenhaus, Ratingen (Chirurgie)
-----------	---

Ärztliche Aus- und Weiterbildung

1993-2000	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
1999/2000	Praktisches Jahr im Marienhospital, Düsseldorf Wahlfach: Neurologie
Seit August 2000	Tätigkeit als Arzt im Praktikum im St.-Augustinus- Krankenhaus, Düren in der Neurologischen Abteilung

Düsseldorf, 15.03.2001

Dierk Oel