

Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie der Medizinischen  
Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. med. Michael Gekle)

**Induktion einer ATP-Sekretion über Volumen-sensitive Anionenkanäle  
durch Sphingosin-1-phosphat in RAW-Makrophagen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Philipp Burow

geboren am 14.04.1990 in Jena

Betreuer: Prof. Dr. med. Fritz Markwardt

Gutachter:

Prof. Dr. M. Schaefer, Institut für Pharmakologie und Toxikologie,  
Universität Leipzig

Prof. Dr. T. Zimmer, Institut für Physiologie II, Friedrich-Schiller-Universität  
Jena

05.05.2015

13.01.2016

# Referat

Diese Arbeit untersucht den Einfluss des Lipidmediators Sphingosin-1-phosphat auf RAW-Makrophagen. Elektrophysiologische Ganzzellanalysen zeigten, dass Sphingosin-1-phosphat (S1P) in nanomolaren Konzentrationen eine Ionenleitfähigkeit mit moderater Auswärtsgleichrichtung in RAW-Makrophagen hervorruft. Die Substitution von Anionen, jedoch nicht von Kationen, führte zu deutlichen Verschiebungen des Umkehrpotentials der S1P-abhängigen Ionenströme. Dies legt nahe, dass die beobachteten Ströme durch Anionen getragen werden. Die S1P-induzierten Ströme konnten durch Veränderungen der intra- und extrazellulären Osmolarität deutlich beeinflusst werden. Unter der daraus folgenden Annahme, dass die Ströme durch Volumen-sensitive Anionenkanäle (VSOR-Kanäle) getragen werden, wurde eine umfangreiche pharmakologische Testung durchgeführt. Diese ergab ein für VSOR-Kanäle typisches pharmakologisches Profil. Die S1P-induzierten Ströme konnten durch W123, einen Antagonisten am S1P-Rezeptor 1 (S1PR1), sowie durch GDP $\beta$ -S deutlich gehemmt werden. Daraus wird auf eine Beteiligung des S1PR1 und der abhängigen G-Proteingekoppelten Signalkaskade an den S1P-induzierten Strömen geschlossen. Cytochalasin D, ein Polymerisationshemmer des Aktinzytoskeletts, inhibierte ebenfalls S1P-induzierte Ströme. Dies deutet auf eine Beteiligung des Zytoskeletts bei der Aktivierung S1P-aktivierter Ströme hin. S1P und hypoosmolare Lösung induzierten in RAW-Makrophagen eine ATP-Sekretion. Diese Sekretion konnte durch typische Blockersubstanzen von VSOR-Kanälen gehemmt werden. Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, dass S1P in nanomolaren Konzentrationen in RAW-Makrophagen eine konduktive ATP-Sekretion über VSOR-Kanäle hervorruft.

Burow, Philipp: Induktion einer ATP-Sekretion über Volumen-sensitive Anionenkanäle durch Sphingosin-1-phosphat in RAW-Makrophagen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 64 Seiten, 2015.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einführung in die Theorie</b>	<b>1</b>
1.1 Der Lipidmediator S1P	1
1.1.1 Vorkommen und Stoffwechsel	1
1.1.2 Signalgebung durch S1P	3
1.1.3 Funktionelle Bedeutung von S1P im Allgemeinen	4
1.1.4 Einfluss von S1P auf Makrophagen	5
1.1.5 Therapeutische Bedeutung von S1P	6
1.2 S1P, Purinnukleotide und Entzündungsreaktionen	6
1.2.1 Wirkung von S1P auf das Zytoskelett von Makrophagen	6
1.2.2 Adeninnukleotide als extrazelluläre Botenstoffe	8
1.2.3 Das purinerge System und Makrophagen	8
1.2.4 Freisetzungsmechanismen von ATP	9
1.3 Fragestellungen dieser Arbeit	10
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Reagenzien und Zellen	11
2.1.1 Verwendete Bad- und Pipettenlösungen	11
2.1.2 Die Handhabung von Sphingosin-1-phosphat und seiner Lösungen	12
2.1.3 Die Handhabung weiterer Substanzen und Lösungsmittel	13
2.1.4 Zellkultur	13
2.2 Elektrophysiologische Messungen	14
2.2.1 Methode und Aufbau der Messapparatur	14
2.2.2 Auswertung von Strom-Spannungs-Kurven	16
2.3 Luminometrische ATP-Bestimmung	17
2.4 Quantitative Proteinbestimmung	19
2.5 Berechnung der sezernierten ATP-Stoffmengen	20
2.6 Statistische Auswertung	21

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1	S1P aktiviert einen auswärts-gleichrichtenden Strom in RAW-Makrophagen	22
3.2	Permeationsanalysen	24
3.3	Abhängigkeit des S1P-aktivierten Stromes von extra- und intrazellulärer Osmolarität	26
3.4	Pharmakologie des S1P-aktivierten Stromes	29
3.5	Beteiligung von S1P-Rezeptoren	32
3.6	Beteiligung des Zytoskeletts	36
3.7	ATP-Sekretion	38
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>40</b>
4.1	Identifizierung des S1P-induzierten Anionenstromes	40
4.1.1	Zellvolumenregulation	40
4.1.2	VSOR-Kanäle – eine Übersicht	41
4.1.3	Vergleich der durch Hypoosmolarität und S1P induzierten Ströme	43
4.1.4	Die Abgrenzung zum volumensensitiven „maxi-anion channel“	45
4.2	Untersuchung der zur VSOR-Aktivierung führenden Signalkaskaden	46
4.2.1	S1P-induzierte, G-Protein-gekoppelte Signalwege	46
4.2.2	Die Rolle des Zytoskeletts bei der VSOR-Kanalaktivierung	47
4.2.3	Die Rolle von intrazellulärem Ca <sup>2+</sup> bei der VSOR-Kanalaktivierung	48
4.3	ATP-Sekretion über VSOR-Kanäle	50
4.3.1	Vorbemerkungen	50
4.3.2	Pharmakologische Testung der ATP-Sekretion	50
4.3.3	Kinetik der ATP-Sekretion	51
4.3.4	Analyse der ATP-Bestimmungsmethode	52
4.4	Funktionelle Bedeutung einer S1P-induzierten ATP-Sekretion	53
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>56</b>

# Verzeichnis der Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
BCA-Methode	Proteinbestimmungsmethode mit Bicinchoninsäure
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilben-Disulfonsäure
DMEM-Medium	Dulbecco's modified eagle - Medium
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
G <sub>i</sub>	Familie inhibitorischer $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine
G <sub>s</sub>	Familie stimulierender $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer - G-Proteine
G <sub>12/13</sub>	Familie von Rho-GTPasen und Rho-Kinasen aktivierender $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine
IgE	Immunglobulin E
JTE-013	Antagonist an S1PR, insbesondere S1PR2
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-Benzoessäure
Proteine der bcl-Familie	Proteine der „b-cell-lymphoma“-Familie.
rac-Proteine	Untergruppe der Familie der Rho-GTPasen
Rho	Mitglied der Familie der Rho-GTPasen

Rho-GTPasen	Familie sog. kleiner G-Proteine mit GTPase-Funktion („ras <b>h</b> omologue“)
S1P	Sphingosin-1-phosphat
S1PR	Sphingosin-1-phosphat-Rezeptor
VRAC	volume-regulated anion channels
VSOR	volume-sensitive outwardly rectifying
W123	Antagonist an S1PR, insbesondere S1PR1
ZNS	Zentralnervensystem
7-TM-Rezeptoren	Rezeptoren mit 7 transmembranären Domänen

# 1 Einführung in die Theorie

Eine konzertierte Aktion von angeborenem und adaptivem Immunsystem ist nur dann möglich, wenn Zellen, Extrazellulärmatrix und Mediatoren reguliert miteinander interagieren. Das frühzeitige Erkennen körperfremder Strukturen, die Eingrenzung infektiöser Organismen auf einen möglichst kleinen Raum, die effektive Zerstörung fremder Strukturen sowie das Abschalten des Immunsystems nach erfolgreicher Abwehr erfordern eine optimale Positionierung beteiligter Zellen und die Produktion der „richtigen“ Mediatoren. Fehlregulationen in einem oder mehreren dieser Systeme durch angeborene Defekte, Fehlernährung, erworbene Krankheiten oder iatrogen induziert können einerseits zu Immunschwäche und Tumorerkrankungen, andererseits zu Hypersensitivitäts- und Autoimmunerkrankungen führen. Die Anzahl der an der Immunregulation beteiligten Zellgruppen und Mediatoren ist schier unüberschaubar. Ein Ansatz zum besseren Verständnis der komplexen Mechanismen ist die möglichst exakte Analyse eines einzelnen Mediators bzw. Zytokins auf eine definierte Zellgruppe des Immunsystems. Mehrere solcher Bausteine helfen, die Gesamtantwort besser zu verstehen. In den letzten Jahren ist dabei der Lipidmediator Sphingosin-1-phosphat (S1P) für die Feinsteuerung von Prozessen des angeborenen und adaptiven Immunsystems immer mehr in das Blickfeld der physiologischen und neuroimmunologischen Forschung geraten. Während der Einfluss von S1P auf Zellen des adaptiven Immunsystems schon gut untersucht ist, ist die Bedeutung für das angeborene Immunsystem längst nicht so detailliert beschrieben. In diesem Zusammenhang wird in der vorgelegten Arbeit der Einfluss von S1P auf murine Makrophagen der Linie RAW 264.7 untersucht.

## 1.1 Der Lipidmediator S1P

### 1.1.1 Vorkommen und Stoffwechsel

Der lipophile Aminoalkohol Sphingosin als Vorstufe des biologisch aktiven S1P dient als Grundbaustein in der Biosynthese von Sphingolipiden, einer großen Gruppe ubiquitär vorkommender Membranlipide. Sphingosin ist ein einfach ungesättigter Aminoalkohol, der aus 18 Kohlenstoffatomen, einer Aminogruppe und zwei Hydroxygruppen besteht (Rivera et al.,

2008). Zwei Quellen für intrazelluläres Sphingosin sind bedeutsam: zum Einen die Hydrolyse bestehender Sphingolipide an der Plasmamembran, zum Anderen die de-novo-Synthese aus aktiviertem Palmitat und Serin am glatten endoplasmatischen Retikulum. Die Konvertierung zum Phosphorylierungsprodukt S1P wird durch die Aktivität zweier Isoenzyme ermöglicht, den Sphingosin-Kinasen Typ 1 und 2 (SPHK 1 und 2). Die Regulation dieser Enzyme ist ein entscheidender Punkt zur Kontrolle von intra- und extrazellulären S1P-Konzentrationen. SPHK können durch die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLRs) bei der Mustererkennung, durch einige Zytokine und Wachstumsfaktoren, durch Thrombin und durch Quervernetzung von transmembranärem IgE durch Antigene stimuliert werden (Spiegel und Milstien, 2011),(Chi, 2011). Intrazellulär generiertes S1P kann mithilfe verschiedener Transporter, darunter wohl auch Proteine der ATP-binding-cassette-Familie (ABC-Transporter), nach extrazellulär transportiert werden (Hisano et al., 2012). Mehrere Enzyme, darunter spezifische S1P-Phosphatasen, unspezifische Lipid-Phosphatasen sowie S1P-Lyasen führen zu einem schnellen Abbau von extra- und intrazellulärem S1P. Untersuchungen mit radioaktiv markiertem S1P zeigten in vivo eine Halbwertszeit von etwa 15 min im Blutplasma (Hla et al., 2008). Die Wirkungen von S1P sind dabei nur im Kontext mit seinen Nachbarn im Stoffwechsel zu verstehen, da auch diese – beispielsweise Ceramide oder Sphingosin selbst – wie S1P in entscheidende Prozesse wie die Kontrolle des Zellzyklus oder die Apoptose eingreifen (Gulbins und Li, 2006), (Tani et al., 2007).

Viele biologische Funktionen des S1P (s.u.) sind eng an das Vorhandensein physiologischer S1P-Gradienten gebunden. Im Blutplasma liegt S1P, an Albumin oder HDL gebunden, in hohen nanomolaren bis niedrigen mikromolaren Konzentrationen vor. Die Quellen für dieses konstitutiv produzierte S1P stellen Erythrozyten, in geringerem Maße auch das Gefäßendothel dar. In der Lymphflüssigkeit findet man nanomolare S1P-Konzentrationen, mutmaßlich ebenfalls vom Gefäßendothel produziert. Dagegen ist in der Gewebeflüssigkeit unter physiologischen Bedingungen kaum S1P zu finden. Durch Zellschädigung und Entzündungsvorgänge kann jedoch unter anderem über die Stimulation der SPHK der S1P-Level lokal im Gewebe stark ansteigen, der Blut-Gewebe-Konzentrationsgradient wird geringer (Rivera et al., 2008). Die vielfältigen Auswirkungen dieser Konzentrationsänderungen werden in einem eigenen Abschnitt dargestellt.



### 1.1.2 Signalgebung durch S1P

S1P wird durch die Aktivität der SPHK zunächst intrazellulär synthetisiert. In diesem Kompartiment kann es als second messenger dienen. Im Rahmen von Entzündungsprozessen kann S1P unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führen. Auch eine Beteiligung bei der Regulation epigentischer Prozesse – über die spezifische Bindung an bestimmte Histon-Deacetylasen – ist bekannt (Hisano et al., 2012). Die Identifizierung von S1P-Transportproteinen in der Plasmamembran und die Detektion von extrazellulärem S1P lenkte die Aufmerksamkeit auf extrazelluläre Effekte von S1P. Derzeit sind fünf Subtypen von G-Protein-gekoppelten 7-TM-Rezeptoren bekannt (S1PR1-5), über die S1P Signale vermitteln kann (S1PR1-5). Die Signalweiterleitung erfolgt intrazellulär über unterschiedliche  $\alpha$ -Untereinheiten von G-Proteinen: im Falle des S1PR1 über  $G_i$ , bei S1PR2 und 3 vornehmlich über  $G_{12/13}$ ,  $G_i$  und  $G_q$ , S1PR4 und 5 aktivieren  $G_i$  und  $G_{12/13}$  (Rosen et al., 2013). Daraus folgt, dass die Antwort einer Zelle auf S1P stark von der S1P-Rezeptorbesetzung auf der Zelloberfläche abhängt. Viele Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems exprimieren S1PR1, der hier die meisten bekannten Funktionen des S1P vermittelt. Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zelllinien exprimieren zusätzlich S1PR2, Lymphozyten oft zusätzlich S1PR3 und S1PR5 (Rivera et al., 2008). Murine Makrophagen – zu denen auch die RAW 264.7 gehören – exprimieren vornehmlich S1PR1 und S1PR2 (Weigert et al., 2009) (Kuehnel et al., 2009). Teilweise wirken diese Rezeptoren redundant, teilweise antagonistisch. Die Aktivierung migratorischer Prozesse in Makrophagen über S1PR1,  $G_i$  und *rac* sowie ihre Hemmung via S1PR2,  $G_{12/13}$  und *rho* ist ein klassisches Beispiel für einen solchen Antagonismus (Rivera et al., 2008). Hinzu kommt, dass S1P-Rezeptoren, besonders der S1PR1, zur Internalisierung neigen, wenn sie über längere Zeit einem Rezeptoragonisten ausgesetzt sind. Dies wurde besonders bei Untersuchungen mit Fingolimod (Gilenya®) deutlich, einem S1PR-Agonisten (mit Ausnahme von S1PR2), der zu einer starken Abnahme der Rezeptordichte insbesondere von S1PR1 führte und auf diese Weise eine funktionell antagonistische Bedeutung hat (Krump-Konvalinkova et al., 2008).

### 1.1.3 Funktionelle Bedeutung von S1P im Allgemeinen

S1P als pleiotropes, ubiquitär vorkommendes Molekül beeinflusst viele Organsysteme. Am besten untersucht und charakterisiert ist die Wirkung des S1P auf das Gefäßsystem und das Immunsystem. Knockout-Mäuse ohne Aktivität beider SPHK („double-knockout mice“) weisen in der Embryogenese schwere Missbildungen des Neuralrohrs sowie multiple intra- und extrakranielle Blutungen und Gefäßmissbildungen auf und sind nicht überlebensfähig (Mizugishi et al., 2005) (Mendelson et al., 2014). S1P beeinflusst den Gefäßtonus, die Gefäßpermeabilität, die Gewebedurchblutung und Endothel-Leukozyten-Interaktionen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des S1P-Systems im Gefäßendothel über Rho- und Rac-abhängige Signalkaskaden zytoskelettale Umordnungen und Änderungen bei der Assemblierung von Adhaerenskontakten aus Cadherinen bewirkt (Hla et al., 2008), (Hait et al., 2006). Im adaptiven Immunsystem spielt S1P eine wichtige Rolle als Koordinator von Migrationsprozessen und bei der Positionierung von Lymphozyten. S1P steuert den Austritt naiver T-Lymphozyten aus dem Thymus in das Blut, die Kompartimentierung von B- und T-Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen sowie die Rezirkulationsprozesse von Lymphozyten (Goetzl et al., 2008), (Cyster und Schwab, 2012). Untersuchungen mit Fingolimod (s.o.) zeigten, dass bei Verwendung dieser Substanz die Anzahl der im Blut zirkulierenden T- und B-Lymphozyten und die Infiltration von Nervengewebe durch diese Zellen stark abnahm. Auch bei Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere bei aktivierten dendritischen Zellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, beeinflusst S1P die Zellmigration. Die Rezeptorbesetzung auf der Zelloberfläche entscheidet, ob S1P pro- oder antimigratorisch wirkt (Rivera et al., 2008). Von Bedeutung sind hier vor allem parakrine und autokrine Effekte von S1P. In den letzten Jahren ist darüber hinaus eine entscheidende Rolle des SPHK/S1P-Systems in der Regulation von Zellproliferation und Apoptose bei verschiedenen Zelllinien in und außerhalb des Immunsystems bekannt geworden (Spiegel und Milstien, 2011). Für Makrophagen konnte eine antiapoptotische Wirkung von S1P über eine Stimulation der Synthese antiapoptotischer Proteine der bcl-Familie gezeigt werden (Weigert et al., 2009). Eine direkte kardiale Wirksamkeit von S1P wird klinisch bei der Fingolimod-induzierten Bradykardie bedeutsam, die nach der ersten Gabe des Medikaments auftreten kann (Hersh et al., 2014).

#### 1.1.4 Einfluss von S1P auf Makrophagen

Die Wirkungen von S1P auf Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere Makrophagen, dendritische Zellen und NK-Zellen, sind im Vergleich zu B- oder T-Zellen längst nicht so dezidiert untersucht. Für murine und humane Makrophagen gibt es eine Reihe von Arbeiten, die einen Einfluss von S1P auf Überleben, Zelldifferenzierung, phagozytotische Aktivität, bakterizide Effektivität, Migration und Zytokinproduktion nahelegen (Weigert et al., 2009). Verkomplizierend wirkt der Umstand, dass die Zellpopulationen sowohl von Monozyten als auch von Makrophagen äußerst heterogen sind. Die Steuerung der Differenzierung in die verschiedenen Zelltypen – also beispielsweise Gewebsmakrophagen („Histiozyten“), Mikroglia, Osteoklasten, Kupffer-Zellen und viele andere mehr – ist noch ungenügend untersucht. Eine entscheidende Rolle hierbei scheint das im jeweiligen Gewebe vorherrschende „Mikromilieu“ (microenvironment) zu spielen (Gordon und Taylor, 2005). Die Erkennung körperfremder Strukturen, sogenannter pathogen-associated molecular patterns (PAMPS) durch Mustererkennungsrezeptoren – beispielsweise durch die Toll-like-Rezeptoren (TLR) – ist entscheidend für eine effektive antimikrobielle Aktivität und Zytokinproduktion durch Gewebsmakrophagen. Zusätzlich scheinen auch Marker für Zellschädigung in entzündetem Gewebe, sogenannte damage-associated molecular patterns (DAMPS) – so wie ATP oder Harnsäure – synergistisch die Aktivierung von Makrophagen voranzutreiben (Kantari et al., 2008). Die Bindung von Lipopolysacchariden an einen Proteinkomplex, der unter anderem auch den TLR4 enthält, führt intrazellulär zur Stimulation von SPHK. Exogenes S1P kann nun autokrin und parakrin in Makrophagen die IL-1 $\beta$ -Sekretion über die intrazelluläre Zytokinmaschinerie (sog. „Inflamosom“) steigern und somit als DAMP wirken (Luheshi et al., 2012). Direkte Interaktionen zwischen intrazellulären Signalen nach S1PR-Aktivierung und TLR-induzierter NF- $\kappa$ B-Aktivierung sind bereits bekannt (Spiegel und Milstien, 2011). Zusätzlich dient S1P als potentes Chemokin für monozytäre Zelllinien sowie Makrophagen und festigt Leukozyten-Endothel-Interaktionen durch Hochregulierung spezifischer Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (Weigert et al., 2009). Intrazelluläres S1P fördert in Makrophagen die Fusion von Phagosomen mit Lysosomen und steigert damit die antimikrobielle Aktivität, unter anderem durch Umordnung zytoskelettaler Mikrofilamente. Dabei muss beachtet werden, dass neben den „klassisch aktivierten“, proinflammatorischen Makrophagen auch Makrophagen für die Wundheilung sowie mehrere regulatorische Formen existierten. Wie das S1P-System hier die Differenzierung von Makrophagen steuern kann, wird noch diskutiert (Hughes et al., 2008), (Weigert et al., 2009).

### 1.1.5 Therapeutische Bedeutung von S1P

Die beiden herausragenden Funktionen von S1P, die immunmodulatorische und antiapoptotische Wirkung, führten zu breiten Untersuchungen hinsichtlich der Bedeutung des S1P-Systems bei akut und chronisch entzündlichen Erkrankungen, Immunsuppression sowie Tumorerkrankungen. Ausgehend von den Signalkaskaden, an denen S1P beteiligt ist, kommen verschiedene Targets für die Medikamentenentwicklung in Frage, unter anderem S1P-Rezeptor-Agonisten/Antagonisten, SPHK-Inhibitoren, Hemmer von Sphingosin-Transportern und Antikörper gegen S1P (Kunkel et al., 2013). Das pro-drug Fingolimod, das 2010 in den USA und 2011 in der EU für remittierende Formen der Multiplen Sklerose (MS) zugelassen wurde, führt als S1PR-Agonist durch Downregulation besonders von S1PR1 bei Lymphozyten zu einem Migrationsarrest und damit zu einem Verbleib dieser Zellen in den sekundären lymphatischen Organen. Für die entzündlichen Erkrankungen der Rheumatoiden Arthritis und der Psoriasis werden S1PR1-Agonisten sowie S1P-Lyase-Inhibitoren zurzeit in klinischen Studien geprüft. Hinsichtlich Tumorerkrankungen scheint das S1P eine wichtige Rolle bei Proliferations- und Migrationsprozessen zu spielen. S1P-basierende Therapieprinzipien werden unter anderem für das Mammakarzinom, Pankreaskarzinom, Lymphome und das Glioblastom diskutiert (Bi et al., 2014) (Noack et al., 2014) (Sukocheva und Wadham, 2014). Die wichtige Funktion von S1P zur Aufrechterhaltung der Integrität der vaskulären Barriere lenkte die Aufmerksamkeit auch auf systemische Infektionskrankheiten und Sepsis sowie Anaphylaxie. Antagonisten am S1PR3 konnten prolongierte inflammatorische Reaktionen von dendritischen Zellen bremsen (Niessen et al., 2008). Zum Verständnis der Bedeutung der einzelnen S1P-Rezeptorsubtypen und der komplexen Regulation der Rezeptorexpression an der Zelloberfläche sind allerdings noch weitreichendere Untersuchungen notwendig.

## 1.2 S1P, Purinnukleotide und Entzündungsreaktionen

### 1.2.1 Wirkung von S1P auf das Zytoskelett von Makrophagen

Die Entwicklung neuer, zielgerichteter antientzündlicher Medikamente auf S1P-Basis erfordert die dezidierte Aufschlüsselung der S1P-induzierten molekularen Mechanismen in Zellen des Immunsystems. 2009 berichteten Kuehnelt et al. über die rasche Induktion einer Umordnung von F-Aktin-Molekülen wenige Sekunden nach Zugabe von frischem fetalen Kälberserum und nach Gabe von 10 nM S1P in RAW-Mausmakrophagen. Diese intrazelluläre Reaktion wurde durch die extrazelluläre Zugabe von Apyrase, die die Hydrolyse von Nukleotidtriphosphaten

und Nukleotiddiphosphaten katalysiert, aufgehoben. Die extrazelluläre Detektion von Adeninnukleotiden nach S1P-Gabe untermauerte die Beteiligung des purinergen Systems. Kombinierte elektrophysiologische und molekulargenetische Untersuchungen sprachen für eine Beteiligung des P2X7-Rezeptors (Kuehnel et al., 2009). Die mechanistische Frage, über welche Signalkaskade S1P die Adeninnukleotidsekretion induziert und wie diese Moleküle durch die Zellmembran gelangen, blieb allerdings unbeantwortet. Darüber hinaus wurde zwar ein typischer P2X7-Strom nach ATP-Gabe, aber keine signifikant veränderte P2X7-Leitfähigkeit nach S1P-Gabe bei RAW-Makrophagen beobachtet. Somit stellte sich die Frage, welche Proteine in RAW-Makrophagen durch S1P aktiviert werden und ob ein Zusammenhang mit der Sekretion von Purinnukleotiden hergestellt werden kann. Dazu wird in den nächsten Abschnitten der derzeitige Kenntnisstand purinerner Effekte in Makrophagen und die gängigen Mechanismen der kontrollierten Ausschleusung von Purinnukleotiden von Zellen kurz dargestellt.

### 1.2.2 Adeninnukleotide als extrazelluläre Botenstoffe

Die Einführung des Konzeptes des sogenannten „purinergic signalling“, d.h. die Funktion von ATP als Neurotransmitter und extrazelluläres Signalmolekül in den frühen 1970-er Jahren ebnete den Weg für die extrazelluläre Purinforschung. Heute ist die Beteiligung des purinergen Systems bei der Neurotransmission, der Schmerzentstehung und –weiterleitung, der Kontrolle des Zellvolumens, der Beeinflussung des Gefäßtonus, den tubuloglomerulären Feedbackprozessen in der Niere, und nicht zuletzt im Immunsystem allgemein anerkannt (Burnstock, 2006). Die geringe Halbwertszeit extrazellulärer Nukleotide ergibt sich aus dem Vorhandensein einer Vielzahl von extrazellulär hydrolytisch wirksamen Nukleotidasen. Daher sind autokrine und parakrine Effekte für das purinerge System am bedeutsamsten. Die Ektonukleotidasen an der Zelloberfläche führen zum sequentiellen Abbau von ATP zu Adenosin und damit zu komplexen Reaktionen von Zellen auf Purinnukleotide (Corriden und Insel, 2010). Neben Purinrezeptoren für Adenosin (P1-Rezeptoren mit Subtypen) existiert eine große Gruppe von P2-Rezeptoren, unterteilt in ionotrope P2X- und metabotrope, G-Proteingekoppelte P2Y-Rezeptoren. P2X-Rezeptoruntereinheiten formen Homo- und Heterotrimere und dienen als ligandengesteuerte Ionenkanäle (Di Virgilio, 2007b).

### 1.2.3 Das purinerge System und Makrophagen

Für eine effektive und kontrollierte Zytokinproduktion durch Makrophagen in der Entzündung sind aktivierende Signale nötig. Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen nach erfolgter Mustererkennung ATP sezernieren. Dieses ATP kann in autokriner und parakriner Weise die Zytokinproduktion und antimikrobielle Aktivität der Makrophagen weiter erhöhen (Sakaki et al., 2013). ATP kann auch die Apoptose von Makrophagen, die mit intrazellulär lebenden Bakterien infiziert sind, fördern. Für die oben genannten Prozesse scheinen P2X7-Rezeptoren eine zentrale Rolle zu spielen (Di Virgilio, 2007a). Insgesamt dienen ATP – und zum Teil auch seine Hydrolyseprodukte – im entzündeten Gewebe als proinflammatorisches Signal.

#### 1.2.4 Freisetzungsmechanismen von ATP

Die Funktion von ATP als extrazelluläres Signalmolekül erfordert eine kontrollierte Freisetzung aus dem Zytoplasma. Dort liegt das Purinnukleotid in millimolaren Konzentration vor. Durch Zellnekrosen, beispielsweise in bakteriellen Entzündungsherden, können hohe ATP-Mengen in kurzer Zeit freigesetzt werden und benachbarte immunkompetente Zellen wie Gewebsmakrophagen oder dendritische Zellen aktivieren. ATP fungiert hier als Signal für Gefahr, als DAMP (s.o.). Zellen können aber auch kontrolliert ATP durch Ausschüttung von ATP-haltigen Vesikeln sezernieren (Corriden und Insel, 2010). Im ZNS wurde ATP zunächst als exzitatorischer Kotransmitter beschrieben. Dieses Bild hat sich jedoch massiv erweitert – ATP und seine Hydrolyseprodukte sind Bestandteil eines komplexen neuro-glialen Kommunikationsnetzwerkes (Abbraccio et al., 2009). ATP beeinflusst zentrale Prozesse wie Neuritenwachstum und Migration von Mikrogliazellen (Bork et al., 2013) (Burnstock, 2008). ATP wird von Endothelzellen konstitutiv freigesetzt und beeinflusst den Gefäßtonus. Thrombozyten setzen ATP und ADP nach Aktivierung frei und fördern prokoagulatorische Prozesse (Corriden und Insel, 2010). Clopidogrel, ein wichtiges Sekundärprophylaktikum bei atherosklerotischen Erkrankungen, ist als P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Inhibitor ein Ergebnis dieser Purinforschung. Neben der lytischen und exozytotischen Freisetzung von Nukleotiden ist auch die Sekretion über Ionenkanäle oder Transporter in der Zellmembran möglich (Lazarowski, 2012). Vor allem für Prozesse der Zellvolumenregulation spielt die autokrine ATP-Sekretion eine große Rolle (Corriden und Insel, 2010). In verschiedenen Zelltypen, darunter murine Tumorzellen der Brustdrüse (C127-Zellen), Cardiomyozyten, Hepatozyten, Astrozyten und Neuronen wird über eine nicht-lytische, nicht-exozytotische ATP-Sekretion nach hypoosmolaritätsinduzierter Zellschwellung berichtet (Lazarowski, 2012), (Kimmelberg et al., 2006), (Espelt et al., 2013). Da ATP bei physiologischem pH-Wert als mehrwertiges Anion vorliegt, wurden mehrere Anionenkanäle als konduktive Freisetzungsmechanismen von Purinnukleotiden postuliert. Dazu zählen unter anderem CFTR-Kanäle als Mitglied der ABC-Transporterfamilie, Volumen-regulierte Anionenkanäle (VRAC), Calcium-abhängige Chloridkanäle (CaCC), spannungsabhängige Chloridkanäle (VDCC) und der sogenannte „maxi-anion-channel“ (Lazarowski, 2012), (Dutta et al., 2004). Auch andere Zellstimuli, wie Hypoxie oder mechanische Scherkräfte, können zum konduktiven ATP-Ausstoß führen. In einigen Fällen geht die ATP-Sekretion mit der Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren wie Glutamat einher (Haskew-Layton et al., 2008). Auch für Connexinmoleküle, die sich in die Plasmamembran einlagern, aber nicht zu Zell-Zell-Kontakten beitragen und somit eine konduktive Verbindung zum Extrazellulärraum darstellen können, wird eine Permeabilität für ATP postuliert. Durch die

Abhängigkeit der Connexon-Leitfähigkeit von intra- und extrazellulären Calciumkonzentrationen könnten diese eine Verbindung zwischen purinergem und Calciumion-basierter Signaltransduktion darstellen. Auch transmembranäre Kanäle, geformt aus Pannexinmolekülen, sollen für ATP permeabel sein (Lazarowski, 2012).

### **1.3 Fragestellungen dieser Arbeit**

S1P ist ein wichtiges immunmodulatorisches Molekül, das in Makrophagen proinflammatorische Reaktionen fördern kann. Nach Initiierung einer Entzündungsreaktion müssen diese Reaktionen amplifiziert und verbreitet werden. Von Makrophagen sezernierte Purinnukleotide tragen hierzu bei. Eine Verbindung zwischen den Wirkungen bioaktiver Lipide wie S1P und dem purinergen System könnte ein weiterer wichtiger Baustein sein, um die Pathophysiologie von Entzündungsreaktionen zu verstehen. Die Arbeit von Kuehnel et al. (Kuehnel et al., 2009) erbrachte Hinweise auf eine solche Verbindung. Es stellten sich nun folgende Fragen:

1. Kann durch S1P eine ATP-Sekretion durch RAW-Makrophagen hervorgerufen werden?
2. Gibt es Ionenkanäle, die in RAW-Makrophagen eine S1P-induzierte ATP-Sekretion vermitteln?
3. Über welche Signalkaskade findet eine solche Aktion statt?



## 2 Material und Methoden

Zur Beantwortung der oben genannten Fragen wurden elektrophysiologische Methoden zur Bestimmung und Charakterisierung einer Änderung der Membranleitfähigkeit durch S1P in RAW-Makrophagen verwendet. Diese wurden durch eine luminometrische quantitative Bestimmung von ATP im Extrazellulärraum ergänzt. Zunächst werden die verwendeten Reagenzien und Zelllinien beschrieben, anschließend die oben genannten Methoden vorgestellt.

### 2.1 Reagenzien und Zellen

#### 2.1.1 Verwendete Bad- und Pipettenlösungen

Alle Reagenzien, soweit nicht anders angegeben, wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München geordert.

Die Standard-Badlösung beinhaltete (Konzentrationsangaben in mM): 140 NaCl, 5,4 KCl, 10 Hepes, 10 Glukose, 0,5 MgCl<sub>2</sub> und 1 CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 (eingestellt mit 3 M NaOH), Osmolarität 305 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. Zu Beginn der Strommessungen wurde diese Lösung gegen eine kaliumfreie, isoosmolare Pufferlösung mit gleicher Osmolarität ausgetauscht (140 NaCl, 10 Hepes, 10 Glukose, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 (eingestellt mit 3 M NaOH)). Die höhere Konzentration von Magnesiumionen wurde zur Chelatierung von eventuell extrazellulär auftretendem ATP<sup>4-</sup>, dem Agonisten von P2X7-Rezeptoren, verwendet. Dies verhinderte ATP<sup>4-</sup> vermittelte P2X7R-Ströme. Die Lösung enthielt darüber hinaus keine Kaliumionen, um K<sup>+</sup>-Einwärtsströme während der Messungen zu verhindern. Zur Herstellung hypo- bzw. hyperosmolarer Lösungen wurde die kaliumfreie Lösung als Grundlage genommen und die NaCl-Konzentrationen verändert: Für die hypoosmolare Lösung wurden 100 mM NaCl (230 mOsmol/kg H<sub>2</sub>O), für die hyperosmolare Lösung 180 mM NaCl (390 mOsmol/kg H<sub>2</sub>O) verwendet.

Die Pipettenlösung (Innenlösung) enthielt (in mM): 120 Na-Aspartat, 10 Hepes, 10 Glukose, 2 CaCl<sub>2</sub>, 5 MgCl<sub>2</sub>, 3 EGTA, 3 BAPTA und 5 Na<sub>2</sub>ATP, pH 7.2 (eingestellt mit 3 M NaOH), 300 mOsm/kg H<sub>2</sub>O. Die verbleibende Konzentration an intrazellulärem, freiem Ca<sup>2+</sup> wurde unter oben genannten Bedingungen mit 73 nM berechnet (Schubert, 1996). Zur Herstellung hypo-

bzw. hyperosmolarer Innenlösungen wurden die Konzentrationen von Na-Aspartat verändert: Für die hypoosmolare Lösung wurden 90 mM Na-Aspartat (250 mOsmol/ kg H<sub>2</sub>O), für die hyperosmolare Lösung 160 mM Na-Aspartat (375 mOsmol/kg H<sub>2</sub>O) verwendet. Die Osmolaritäten wurden mittels eines Gefrierpunktsmometers gemessen (OM-815, Vogel GmbH, Gießen).

#### 2.1.2 Die Handhabung von Sphingosin-1-phosphat und seiner Lösungen

S1P ist ein amphiphiles, zwitterionisches Molekül mit einem langen aliphatischen Kohlenstoffrest. Die Löslichkeit dieses Moleküls in wässrigen Lösungen, auch versetzt mit organischen Lösungsvermittlern wie Dimethylsulfoxid (DMSO), ist sehr eingeschränkt. Lediglich in Methanol ist eine maximale Löslichkeit von 1 mg/ml bei Raumtemperatur beschrieben (Produktinformation Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA, Stand November 2014, s. Website-Zitat). Von 1 mg Festsubstanz ausgehend (Cayman Chemicals) wurde zunächst mithilfe eines Ultraschallbads und Vortexen eine klare, farblose S1P-Stammlösung in 99,9 % Methanol mit einer Konzentration von 1 mM S1P hergestellt. Die Stammlösung wurde in kleine Portionen aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Unter diesen Bedingungen wird eine Haltbarkeit von maximal einem Jahr angegeben. Für die elektrophysiologischen Messungen (s.u.) wurde eine Portion Stammlösung aufgetaut und mit 99,9 % Methanollösung zu einer Konzentration von 1 µM (1:1000 der Stammlösung) verdünnt. Die jetzt erhaltene S1P-Stammlösung konnte auf Eis für einen Tag benutzt werden. Für die direkte Applikation zu den Zellen wurden 10 µl dieser 1 µM Stammlösung mit 990 µl kaliumfreier, isoosmolarer Pufferlösung vermischt (s.o). Daraus resultierte eine weitere Verdünnung von 1:100, sodass eine Endkonzentration von 10 nM S1P erreicht wurde. Die Konzentration des Lösungsmittels Methanol betrug dabei 1 %. Dies führte in Kontrolluntersuchungen nicht zu Änderungen der Membranleitfähigkeiten der Makrophagen (s. Abschnitt 3). Jeder Verdünnungsschritt wurde unter Nutzung von Vortexer und Ultraschallbad durchgeführt

### 2.1.3 Verwendung weiterer Substanzen und ihrer Lösungsmittel

Für die in der pharmakologischen Testung des S1P-aktivierten Stromes verwendeten Substanzen wurde ähnlich wie für S1P vorgegangen. Für die in DMSO oder Methanol gelösten Stoffe wurde jeweils eine 1  $\mu$ M Stammlösung hergestellt. Für die Messungen wurde dann eine weitere 1:100-Verdünnung (im Falle von Tamoxifen eine 1:1000-Verdünnung) mit isoosmolarem Puffer wie oben beschrieben hergestellt. Somit war die Konzentration der organischen Lösungsmittel, die die Zellen erreichte, stets 1 % bzw. 0,1 % bei Verwendung von Tamoxifen. Für die S1P-Rezeptorantagonisten W123 und JTE-013 sowie für Cytochalasin D wurden ebenfalls Stammlösungen hergestellt und daraus eine 1:100-Verdünnung mit isoosmolarem Puffer für die Applikationen verwendet. Die eingesetzten Stammlösungen der oben genannten Substanzen wurden für jeden Tag neu hergestellt.

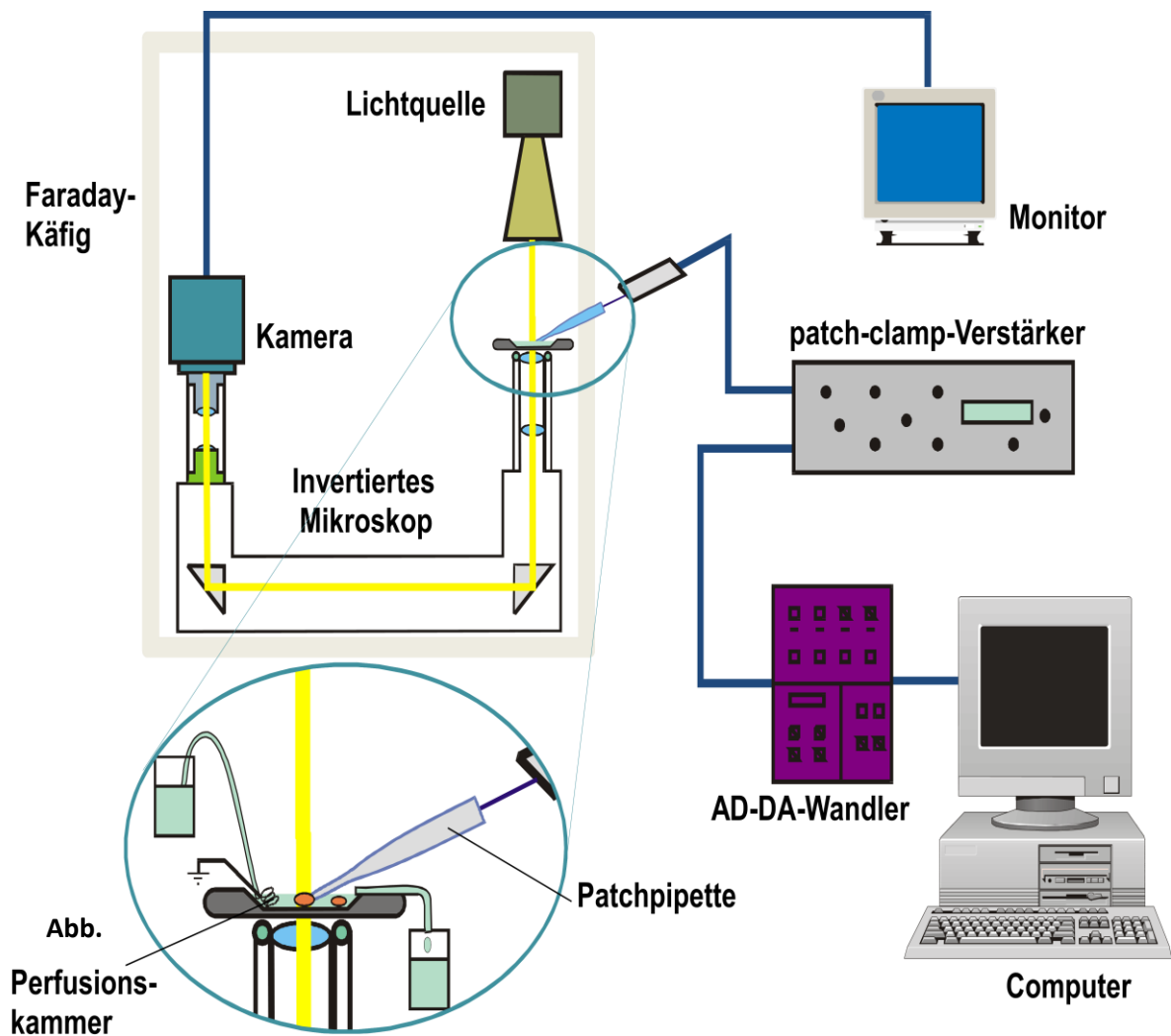
### 2.1.4 Zellkultur

Für die Kultur der RAW-264.7-Mausmakrophagen wurde als Medium DMEM high glucose (Biochrom AG, Berlin) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum, 4mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin genutzt. Nach ausreichender Proliferation bis zu einem Minimum von etwa zwei Millionen Zellen pro Zellkulturflasche (Wachstumsfläche 75 cm<sup>2</sup>) wurden die Zellen in kleine Petrischälchen umgesetzt. Für die elektrophysiologischen Messungen waren diese Schälchen jeweils mit fünf bis sechs Poly-L-Lysin-beschichteten runden Deckgläschen (Durchmesser 5 mm) versehen. Diese Messungen fanden bei einer Konfluenz von ca. 30-70 % statt, bei der genügend einzelne Zellen zur Verfügung standen. Die luminometrischen ATP-Messungen wurden bei einer Konfluenz von 50-75 % durchgeführt. Die RAW-Zellen erreichten die oben genannten Konfluenzraten nach 1-3 Tagen Inkubationszeit der kleinen Petrischälchen nach dem Umsetzen. Die Inkubation fand bei 37 °C und einem Luftgemisch mit 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank statt.

## 2.2 Elektrophysiologische Messungen

### 2.2.1 Methode und Aufbau der Messapparatur

Die Änderungen der Membranleitfähigkeiten der Makrophagen wurden mithilfe der voltage-clamp-Technik ermittelt. Zu den physikalischen Grundlagen dieser Methode wird auf die einschlägige Literatur verwiesen (Hille, B., 01) (Schwarz, W. and Rettinger, J., 04). Abbildung 2.1 zeigt schematisch den Aufbau der verwendeten Messapparatur. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Pipetten wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren gefertigt und hatten Widerstände im Bereich von 4-9 M $\Omega$ . Für Applikationswechsel von Messlösungen wurde die U-Rohr-Technik verwendet, die Rechner-gesteuerte Wechsel der Extrazellulärlösung einzelner Zellen in < 200 ms ermöglicht (Bretschneider und Markwardt, 1999). Für die Messungen wurde jeweils ein Deckgläschen mit den adhären Zellen in die Perfusionskammer befördert. Die Flussrate der Bad- und Messlösungen wurde stets bei 1 ml/min oder darunter gehalten, um die Aktivierung mechanosensitiver Ionenkanäle zu minimieren. Bei einer einzeln stehenden Zelle wurde nun durch vorsichtiges Heranführen der Elektrode und leichten mechanischen Unterdruck (durch Saugen) zunächst die cell-attached-, schließlich durch stärkeres Saugen die Ganzzell-Konfiguration erreicht. Die Membranwiderstände der Makrophagen betragen  $1914 \pm 427$  M $\Omega$ . Auf eine Kompensation des Serienwiderstandes (Access resistance) mit mittleren Werten von  $13,5 \pm 6,2$  M $\Omega$  wurde verzichtet. Bei Serienwiderständen > 20 M $\Omega$  wurde die Zelle verworfen. Zur Bestimmung der Kanalleitfähigkeiten und der Umkehrpotentiale wurden Spannungsrampen von -80 mV bis +40 mV innerhalb von 500 ms alle 1000 ms appliziert (s. Abb. 3.1.). Die Filterung der Daten erfolgte bei 1 kHz, das Sampling bei 2 kHz (Verstärker Axopatch 200A, Axon Instruments Inc., Foster City, USA). Die Datenanalyse erfolgte am PC mithilfe des Programms Superpatch 2000 (T. Böhm, hauseigene Software) und Microsoft Excel. Zur Berechnung S1P- oder Hypoosmolaritäts-induzierter Leitfähigkeiten wurde die Ruheleitfähigkeit vor Applikation von S1P oder Hypoosmolarität subtrahiert (s. Abb. 3.1.). Der Spannungsfehler (Spannungsabfall am Serienwiderstand) aufgrund dieser Subtraktion wurde bei der Berechnung der Umkehrpotentiale korrigiert.



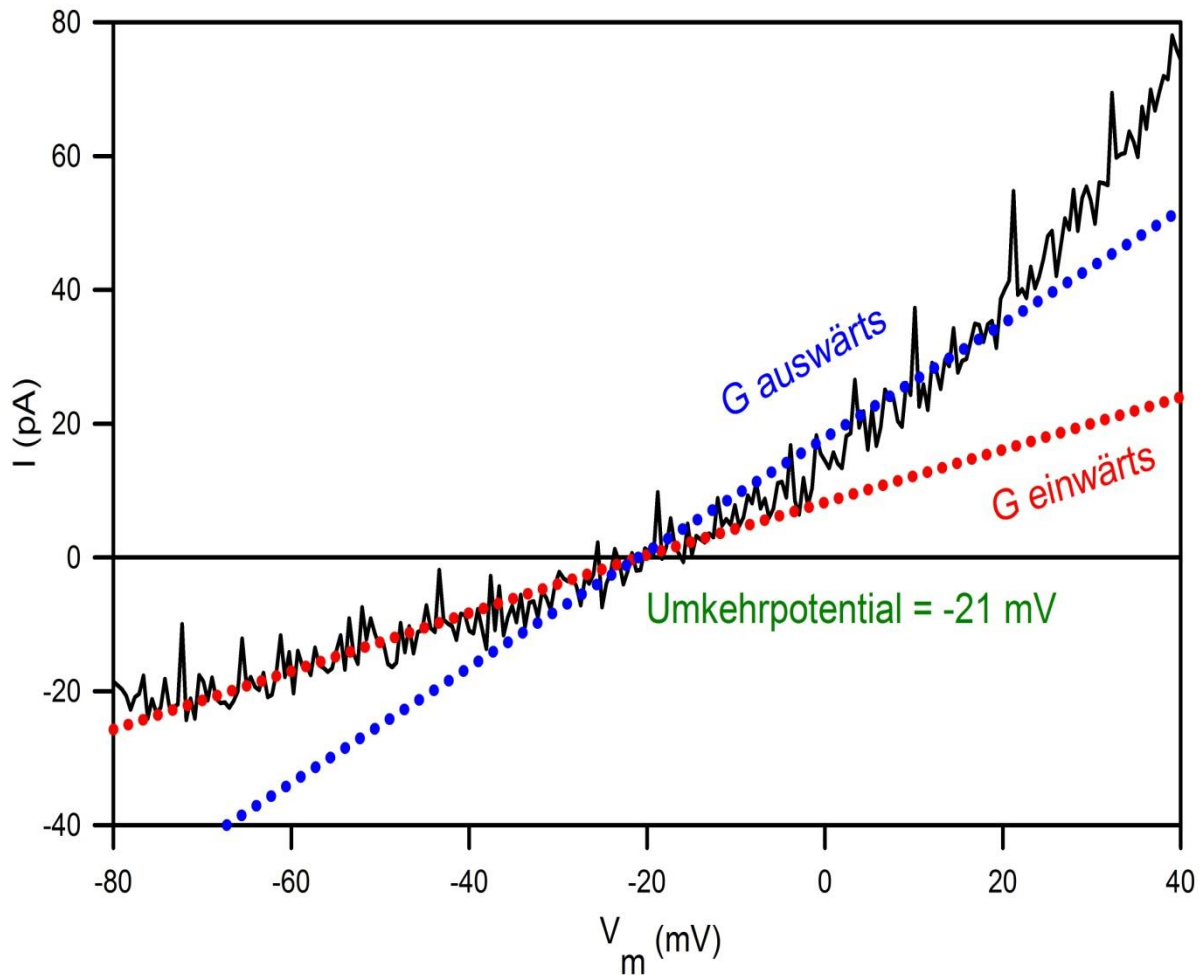
**2.1.: Schematischer Aufbau des patch-clamp Setups.** Die Messungen wurden in einem Faradayschen Käfig durchgeführt. Das Umkehrmikroskop mit der Halterung für die Perfusionskammer und die Elektroden standen auf einem schwingungsgedämpften Tisch, um den Einfluss von äußeren Erschütterungen auf das Seal zu minimieren. Die Lösungswechsel erfolgten mithilfe der U-Rohr-Methode, wobei ein Rechner-gesteuertes Magnetventil zum Einsatz kam. Die Feinsteuerung der Halterung erfolgte mit Wasser-hydraulischen Mikromanipulatoren (MM-3 Mikromanipulator, Narishige Group, Japan).

### 2.2.2 Auswertung von Strom-Spannungs-Kurven

Die Applikation von Spannungsrampen und die Analyse des Gesamtstroms über die Zellmembran in Abhängigkeit von der geklemmten Spannung ermöglichen eine genaue Bestimmung von Umkehrpotentialen und die Bestimmung von Charakteristika wie Auswärts- oder Einwärtsleitfähigkeit oder Gleichrichtung. Die Leitfähigkeit für eine bestimmte Spannung  $V$  ist definiert als der Anstieg der Tangente, die an den Graphen angelegt wird. Das Umkehrpotential ( $I = 0$ ) ist die Spannung am Schnittpunkt des Graphen mit der Abszisse. Die Leitfähigkeiten für Spannungen negativer oder positiver als das Umkehrpotential ( $G_{\text{einwärts}}$  bzw.  $G_{\text{auswärts}}$ ) wurden durch lineare Interpolation ermittelt. Daraus kann die Auswärtsgleichrichtung des Stromes mit Hilfe eines Indexes  $I_G$  quantifiziert werden:

$$(1) \quad I_G = \frac{G_{\text{auswärts}}}{G_{\text{einwärts}}}$$

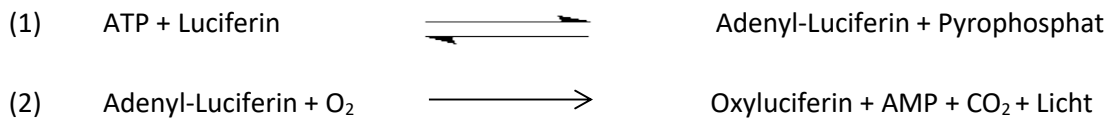
In Abbildung 2.2. findet sich eine exemplarische Auswertung einer Strom-Spannungs-Kurve. Zu beachten ist, dass jede angegebene Leitfähigkeit auf die Gesamtkapazität der Zellmembran bezogen ist, um den Einfluss der Zellgröße auf den gemessenen Strom zu kompensieren.



**Abb. 2.2.: Exemplarische I-V-Kurve aktivierter RAW-Makrophagen.** Die Stimulation erfolgte mit 10 nM S1P. Leitfähigkeiten ( $G_{\text{einwärts}}$  bzw.  $G_{\text{auswärts}}$ ) wurden durch lineare Interpolation approximiert. Der Quotient aus Auswärts- und Einwärtsleitfähigkeit ist ein Maß für die Auswärtsgleichrichtung des aktivierten Kanalproteins.

### 2.3 Luminometrische ATP-Bestimmung

Die Bestimmung von ATP im Kulturüberstand von Makrophagen nach Zugabe der entsprechenden Substanzen (s. Ergebnisse) erfolgte luminometrisch im Röhrenluminometer (Lumat LB 9507, Berthold Technologies, Bad Wildbad) nach Reaktionen von ATP mit Luciferin. Zur Katalyse wird rekombinant hergestellte Luciferase verwendet, ein Enzym, das zuerst in Glühwürmchen nachgewiesen wurde. Folgende Reaktionen laufen nacheinander ab:



Im ersten Schritt wird Luciferin ATP-abhängig aktiviert. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt weit auf der rechten Seite. Im folgenden Schritt findet die irreversible Oxidation des aktivierten Luciferins statt. Wird Luciferin im Überschuss zugegeben, so ist die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion und damit die Menge des emittierten Lichts proportional zur ATP-Konzentration (Wood et al., 1989). Für die Experimente wurde ein ATP-Assay-Kit von Sigma-Aldrich (Produktcode FL-AA, Stand Oktober 2013) benutzt.

Zur Vorbereitung auf die Experimente wurden RAW-Makrophagen auf 35 mm-Petrischälchen umgesetzt und bis zu einer Konfluenz von 50-75 % bebrütet (s. Abschnitt 2.1.4). Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurde das Medium gegen 2 ml frisches Medium ausgetauscht, um die Basiskonzentration an ATP zu reduzieren. Zu Beginn des Versuches wurde aus jedem Schälchen eine 50 µl-Probe des Kulturüberstandes zur Bestimmung der ATP-Ausgangskonzentration vorsichtig entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Weitere 50 µl-Proben wurden aus jedem Schälchen nach Zugabe der entsprechenden Substanzen in bestimmten Zeitintervallen (s. Abschnitt 3.7) entnommen und ebenfalls sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Zugabe dieser Substanzen wurden zunächst 495 µl Überstand entnommen. Dieser Überstand wurde mit 5 µl einer 1 µM S1P-Lösung versetzt, sodass die finale S1P-Konzentration im Schälchen 10 nM betrug und die Methanolkonzentration 1 % nicht überstieg. Anschließend erfolgte für die pharmakologischen Testungen die Zugabe der entsprechenden Substanzen (s. Abschnitt 3.7) in ihrem entsprechendem Lösungsmittel. Auch hier überstieg die Konzentration des jeweiligen Lösungsmittels nicht 1 %. Das in dieser Weise angereicherte Medium wurde dann wieder in das Schälchen zurückgegeben. Für die Negativkontrolle wurde das Medium ohne Änderungen wieder zurückgegeben, um den Einfluss mechanischer Perturbationen der Zellen auf die ATP-Sekretion zu erfassen. Im Falle der hypo- bzw. isoosmolaren Pufferlösungen wurde 500 µl Überstand entnommen und verworfen. Dieses Volumen wurde mit 500 µl einer Pufferlösung mit einer definierten Osmolarität ersetzt, sodass sich im Petrischälchen zusammen mit dem verbliebenen Medium entweder eine isoosmolare (300 mosmol/kg H<sub>2</sub>O) bzw. eine hypoosmolare (240 mosmol/kg H<sub>2</sub>O) befand. Die artifizielle Zunahme von ATP-Konzentrationen auch durch mehrfache Probenentnahme wurde aufgrund der kleinen Probenvolumina im Vergleich zum Gesamtvolumen des Mediums in den Petrischälchen bei den Berechnungen nicht berücksichtigt. Nach Abschluss der Probengewinnung wurden die Zellen mechanisch abgelöst und eine quantitative



Proteinbestimmung durchgeführt (s. Abschnitt 2.4). Zur luminometrischen ATP-Bestimmung wurden die Proben der Zellüberstände nach dem Auftauen für 30 s bei 1000 U/min zentrifugiert. 10 µl des Überstands wurden dann mit 90 µl Assay-Mix vermischt und sofort luminometrisch für 20 s pro Probe gemessen. Die 1:10-Verdünnung reduzierte den hemmenden Einfluss von Kationen auf die Luciferase und steigerte damit die Sensitivität der Messungen. Für jeden Experimentiertag wurde eine ATP-Standardreihe von 1 nM bis 1 µM luminometrisch gemessen. Die in den Experimenten verwendeten Substanzen und Lösungsvermittler wurden einzeln hinsichtlich einer Beeinflussung der Luciferin-Luciferase-Reaktion getestet. Keine Substanz hatte einen maßgeblichen Effekt.

#### **2.4 Quantitative Proteinbestimmung**

Die Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteins in den Petrischälchen erfolgte durch die BCA-Methode, einer Abwandlung der Methode nach LOWRY. Diese beruht auf der Reduktion zweiwertiger Kupferionen zu einwertigen Cupro-Ionen ( $\text{Cu}^+$ ), die konzentrationsabhängig durch Peptide im alkalischen Milieu stattfindet. Die Cupro-Ionen bilden nun mit Bicinchoninsäure einen wasserlöslichen Komplex mit violetter Farbe. Der Komplex zeigt eine starke Absorption monochromatischen Lichts bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die gemessene Extinktion ist nach dem (Lambert-)Beer'schen Gesetz proportional zur Konzentration des Komplexes und damit auch zur Proteinkonzentration (Noble und Bailey, 2009).

Dazu wurden die Zellen vom Boden der Petrischälchen mechanisch entfernt, bei 5000 U/min 10 min zentrifugiert, der Überstand entfernt, mit PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Zellpellet für 30 min in 50 µl Triton-X-100-Lösung lysiert. Die Proteinbestimmung der Lysate wurde dann nach erneuter Zentrifugation nach standardisierten Protokollen durchgeführt (BCA Protein Assay, Life Technologies). Extinktionen wurden mit einem Plattenreader gemessen (Tecan Sunrise™, Tecan Trading AG, Schweiz). Die Standardlösungen enthielten bovines Serumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0 – 700 µg/ml.

## 2.5 Berechnung der sezernierten ATP-Stoffmengen

Ziel war es, die ATP-Sekretion als Stoffmenge pro Proteinmasse zu quantifizieren. Dazu mussten folgende Schritte durchgeführt werden:

1) Standardisierung der ATP-Konzentration auf eine Protein-Massenkonzentration  $\beta$  von 1 mg/ml. Die Konzentrationen wurden aus den Extinktionswerten unter Nutzung der Standard-Regressionsgerade ermittelt. Für die korrigierten ATP-Konzentrationen gilt:

$$(2) \quad [ATP/korr] = \frac{[ATP]}{\beta (Protein)} \text{ [nmol/mg Protein]}$$

2) Die Proteinmasse wurde in einem Probenvolumen von 50  $\mu$ l bestimmt (s. Abschnitt 2.4). Unter der nun standardisierten Protein-Massenkonzentration von 1 mg/ml beträgt die Proteinmasse in einem Petrischälchen daher 50  $\mu$ g (entspricht 1/20 mg).

3) In den Petrischälchen wurde die (korrigierte) ATP-Konzentration (in nM) in einem Volumen von annähernd 2 ml (entspricht 1/500 l) bestimmt. Für die sezernierte ATP Stoffmenge gilt dann nach der Formel  $n = c \cdot V$ :

$$(3) \quad n (ATP)[nmol] = [ATP/korr] \left[ \frac{nmol}{l} \right] * \frac{1}{500} l$$

4) Aus dem Quotienten der ATP-Stoffmenge und der Proteinmasse ergibt sich also:

$$(4) \quad \frac{n (ATP)[nmol]}{m (Protein)} = \frac{[ATP/korr] \left[ \frac{nmol}{l} \right]}{\frac{1}{20} mg} * \frac{1}{500} l$$

Somit ergibt sich:

$$(5) \quad \frac{n (ATP)[nmol]}{m (Protein)[mg]} = [ATP/korr] * \frac{1}{25} \left[ \frac{l}{mg} \right] = 0.04 * \frac{[ATP]}{\beta (Protein)} \text{ [nmol/mg]}$$

Dies erlaubt die einfache Umrechnung von ATP-Konzentrationen in eine ATP-Stoffmenge pro 1 mg Proteinmasse. Aufgrund der höheren Genauigkeit der BCA-Methode wurde diese Methode einer Zellzahlbestimmung vorgezogen.

## **2.6 Statistische Auswertung**

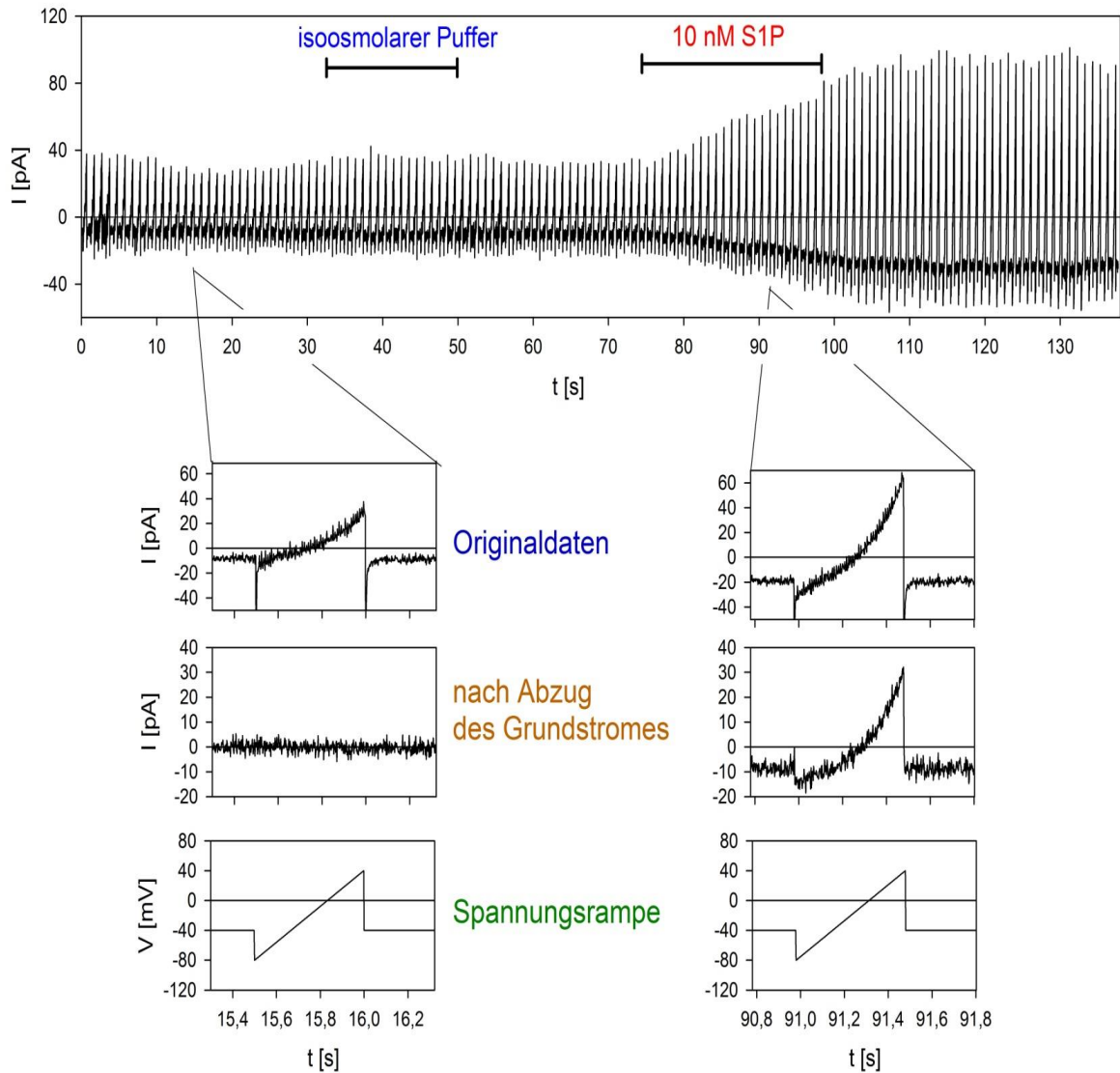
Die Erstellung der Graphen erfolgte mithilfe des Programms Sigmaplot (Systat Software Inc.). Die gemittelten Daten werden im Text und in den Abbildungen stets als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Zur Berechnung der statistischen Parameter wurden die integrierten mathematischen Funktionen von Microsoft Excel genutzt.

## 3 Experimentelle Resultate

Ausgehend von den in Abschnitt 2 skizzierten Methoden werden nun zunächst die elektrophysiologisch, anschließend die luminometrisch gewonnenen Ergebnisse vorgestellt.

### 3.1 S1P aktiviert einen auswärts-gleichrichtenden Strom in RAW-Makrophagen

Zur Beantwortung der Frage, ob S1P Kanalproteine in RAW-Makrophagen aktivieren kann, wurden 10 nM S1P in isoosmolarem Puffer mittels U-Rohr zu den Zellen gegeben. Die niedrige nanomolare Konzentration wurde gewählt, um die physiologischen S1P-Konzentrationen im Gewebe bzw. in der Lymphe zu imitieren. Tatsächlich erhöhte sich die Leitfähigkeit der Zellmembran nach Zugabe von S1P nach einer kurzen Latenzzeit (Abb. 3.1). Diese Antwort war über den Zeitraum aller mit S1P stimulierten Zellen etwa bei der Hälfte der gemessenen Zellen reproduzierbar. Eine solche Reaktion war bei Applikation von isoosmolarem Puffer mittels U-Rohr nicht festzustellen. In einigen Fällen erhöhte sich transient die Leitfähigkeit um 1-2 nS als möglicher Ausdruck der kurzen Aktivierung mechanosensitiver Ionenkanäle. Der vorhandene Grundstrom vor der ersten Applikation war umso höher, je niedriger der Sealwiderstand war. Daher interpretierten wir diesen Strom stets als Leckstrom, den wir von allen nachfolgenden Stromkurven grafisch subtrahierten (Abb. 3.1). Auffällig ist eine deutliche Auswärtsgleichrichtung des S1P-aktivierten Stromes. In allen gemessenen Zellen war die Antwort auf S1P mit einer Latenzzeit verbunden. Ebenfalls war nach Beendigung der S1P-Gabe stets ein weiteres Ansteigen der Ströme zu beachten, in einem Fall bis zu 20 s nach dem Auswaschen des Agonisten. Auch bei hypoosmolaritäts-induzierten Strömen wurden Latenzzeiten bis zum Anstieg der Leitfähigkeiten gefunden. Nach Beendigung der Gabe des hypoosmolaren Puffers wurde allerdings im Gegensatz zu S1P-induzierten Strömen kein weiterer Anstieg der Leitfähigkeiten beobachtet. Bei der statistischen Auswertung wurden die Latenzzeiten stets nicht berücksichtigt, d.h., der Zeitpunkt  $t = 0$  s markiert den ersten signifikanten Anstieg einer Leitfähigkeit und nicht den Zeitpunkt der Zugabe eines Agonisten.

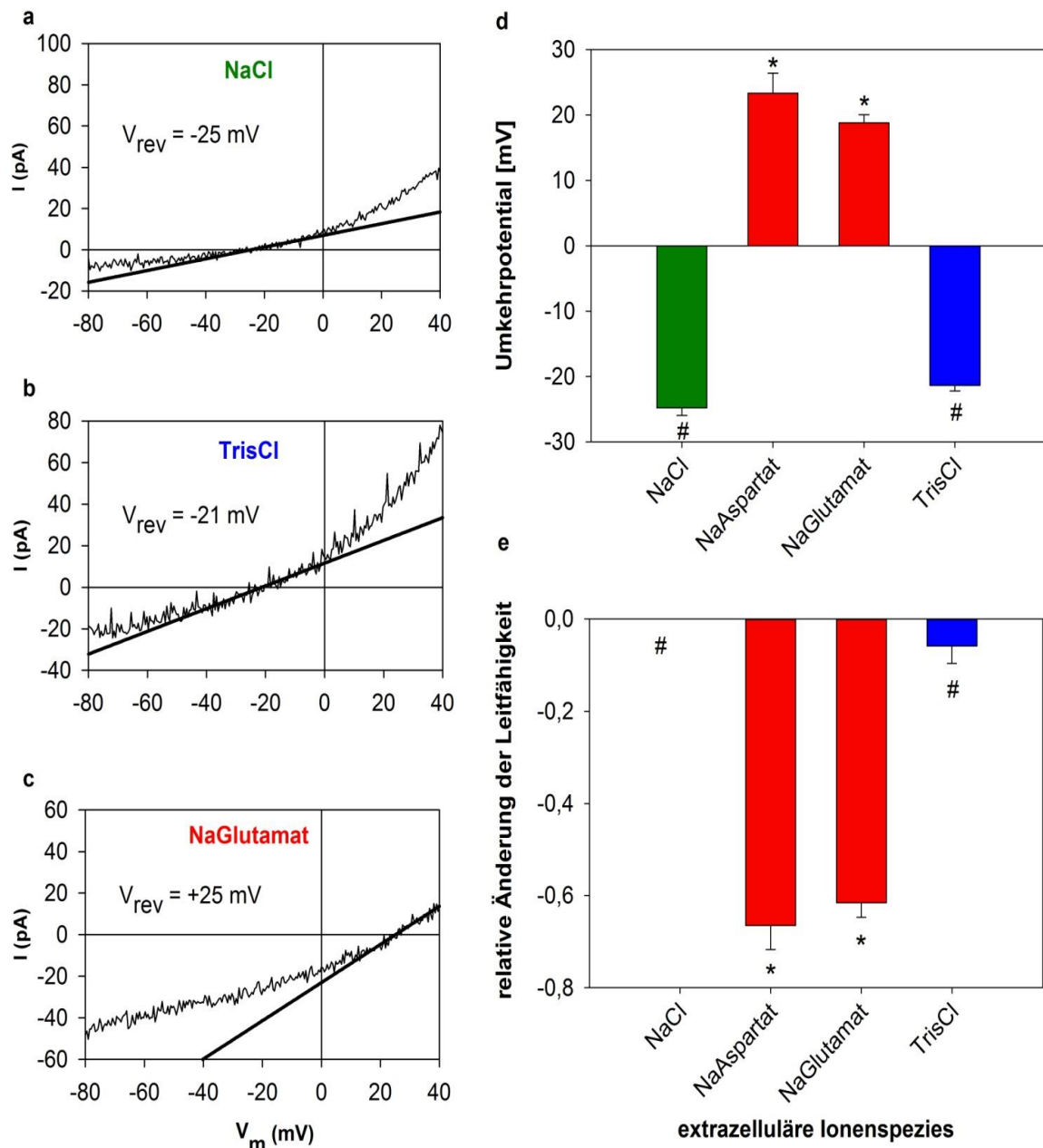


**Abb. 3.1: Darstellung eines S1P-aktivierten Stroms in RAW-Makrophagen.** Die S1P-Konzentration betrug 10 nM. Nach Erreichen der Ganzzell-Konfiguration wurden die Zellen auf ein Ruhepotential von -40 mV geklemmt, unterbrochen durch die unten gezeigten Spannungsrampen. Die darüberliegenden kleinen Graphen zeigen die zugehörigen Ströme zu den gekennzeichneten Zeitpunkten. Nach elektrophysiologischer Konvention bedeutet ein positiver Strom einen Einstrom negativer oder einen Ausstrom positiver Ladungen in die bzw. aus der Zelle. Der gemessene Strom direkt vor der ersten Applikation (hier bei  $t = 15$  s, linker oberer kleiner Graph) wird als Leckstrom bzw. Nullstrom gewertet und von allen nachfolgenden Strömen abgezogen (mittlere kleine Graphen). Zu beachten ist, dass der Anstieg der Membranleitfähigkeit auch nach Beendigung der S1P-Gabe für circa zehn Sekunden fortbesteht.

### 3.2 Permeationsanalysen

Die in Abbildung 3.1. erhaltenen Stromkurven erlauben noch keine Aussagen über die Ionen, die die beobachteten Ströme tragen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Ionenspezies mit größeren Moleküldurchmessern im Vergleich zu Natrium- und Chloridionen verwendet. Als großes Anion diente die saure Aminosäure Glutamat, als großes Kation die Puffersubstanz TRIS. In Abbildung 3.2. wird die Abhängigkeit des Umkehrpotentials und der Membranleitfähigkeit von der Zusammensetzung der extrazellulären Lösung dargestellt. In NaCl-Lösung (isoosmolarem Puffer) betrug das Umkehrpotential etwa -25 mV und der Strom zeigte eine deutliche Auswärtsgleichrichtung. Ersetzt man Chloridionen durch Glutamat, so wird das Umkehrpotential deutlich in Richtung positiver Werte verschoben. Ein Kontrollexperiment mit der sauren und bei dem verwendeten pH-Wert von 7,4 ebenfalls einfach negativ geladenen Aminosäure Aspartat hatte den gleichen Effekt. Die Verwendung von TRIS anstelle von Natriumionen hat dagegen nur einen sehr geringen Einfluss auf das Umkehrpotential. Dies spricht für kleine Anionen als Träger des Stroms, unter der Annahme, dass die großen Anionen die mutmaßliche Kanalpore schlechter passieren können als die kleineren Chloridionen. Somit ist mehr elektrische Triebkraft notwendig (durch positivere Potentiale im Zellinneren), um bei Glutamat als Ladungsträger einen gleichgroßen Nettoeinstrom negativer Ladungen in das Zellinnere zu bewirken wie bei Chloridionen (dargestellt durch positive Stromwerte, s. Abb. 3.1. und 3.2.). Untermauert wird die oben genannte Annahme durch die deutliche Abnahme der Membranleitfähigkeit bei extrazellulärer Verwendung großer Anionen. Auch hier hatte TRIS nur einen sehr kleinen Effekt im Vergleich zur Leitfähigkeit in NaCl-Extrazellulärlösung (Abb. 3.2).

Durch eine Beschädigung der Zelle während der Substanzapplikation und der damit verbundenen Verringerung des Sealwiderstandes können Leckströme deutlich an Intensität zunehmen und das gewünschte Signal überlagern. Diese Ströme verhalten sich allerdings streng wie Ströme durch Ohm'sche Kanäle, d.h., sie zeigen keinerlei Auswärtsgleichrichtung. Aus diesem Grund wurden nur Rampen ausgewertet, die einen Index für Auswärtsgleichrichtung von mindestens 2,0 auswiesen (IGI, Gl. 1, s. Abschnitt 2.2.2). Der mittlere Index betrug  $3.0 \pm 1.5$  für S1P-aktivierte Ströme in der NaCl-Extrazellulärlösung.



**Abb. 3.2: Permeationscharakteristika des S1P-aktivierten Stromes.** Die S1P-Konzentration betrug 10 nM. **(a-c)** Exemplarische Darstellung von I-V-Kurven; in **(b)** wurden extrazelluläre Natriumionen durch TRIS, in **(c)** Chloridionen durch Glutamat ersetzt. Die jeweiligen Umkehrpotentiale sind durch den Schnittpunkt der Graphen mit der Abszisse definiert. Die Gesamtleitfähigkeiten werden an den jeweiligen Umkehrpotentialen durch die Anstiege der Tangenten ausgedrückt. **(d-e)** Statistische Auswertung. An den Abszissen sind die verwendeten Anionen bzw. Kationen beschrieben. In **(e)** wurden die S1P-induzierten Änderungen der Membranleitfähigkeit ( $\Delta G$ ) in Beziehung zur Leitfähigkeitsänderung bei Verwendung isoosmolarer Pufferlösung mit NaCl gesetzt ( $(\Delta G - \Delta G_{NaCl}) / \Delta G_{NaCl}$ ). Die statistische Auswertung erfolgte jeweils aus einem Pool von fünf bis acht einzelnen Messungen an unterschiedlichen Zellen. Die Symbole (\* bzw. #) markieren jeweils eine Gruppe von Werten, die sich nicht signifikant unterscheiden.

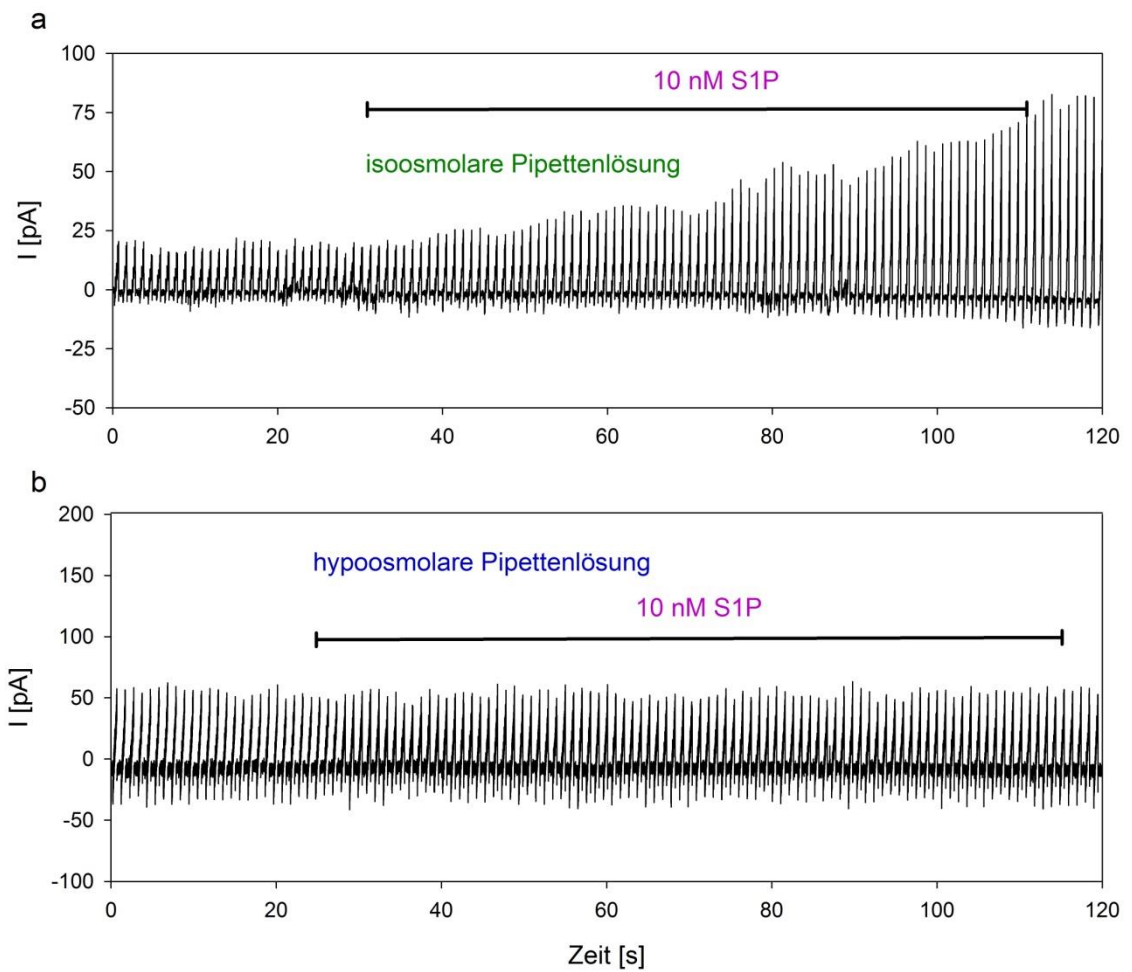
### **3.3 Abhängigkeit des S1P-aktivierten Stromes von extra- und intrazellulärer Osmolarität**

Wie in Abschnitt 3.2. gezeigt, aktiviert S1P auswärtsgleichrichtende Anionenkanäle in RAW-Makrophagen. Auswärtsgleichrichtende Anionenströme werden häufig durch Ionenkanäle getragen, die durch osmotische Zellschwellung aktiviert werden können (z.B. VRAC/VSOR-Kanäle, s. 1.2.4). Die wichtigsten Vertreter dieser Kanäle sind der in vielen Zelltypen vorkommende Volumen-sensitive Anionenkanal (VSOR, „volume-sensitive outward rectifying“) sowie der sogenannte „maxi-anion-channel“ (Sabirov und Okada, 2009) (Okada, 1998). Beide Kanäle reagieren auf Änderungen des Zellvolumens. Durch die Kanalporen werden, ausgelöst durch eine Zellschwellung in hypoosmolarer Lösung, Osmolyte sezerniert. Durch den damit verbundenen Ausstrom von Wassermolekülen kann das intrazelluläre Volumen gesenkt werden (sogenannter „regulatory volume decrease, RVD“) (Hoffmann und Pedersen, 2010). Um zu prüfen, ob auch die S1P-induzierten Ströme durch volumenregulatorische Anionenkanäle getragen werden, wurde der Einfluss von Zellschwellung oder –schrumpfung auf S1P-induzierte Leitfähigkeiten überprüft. Als Vergleich diente die „klassische“ VRAC-Aktivierung durch hypoosmolare extrazelluläre Lösung. Dabei wurden die Osmolaritäten sowohl extra- als auch intrazellulär variiert. Eine Zellschwellung und Kanalaktivierung durch eine hypoosmolare Badlösung kann durch den Einsatz einer ebenfalls hypoosmolaren Innenlösung vermindert bzw. aufgehoben werden. Ist auch der S1P-aktivierte Strom in dieser Weise beeinflussbar, spricht dies für die Aktivierung volumenregulierender Anionenkanäle durch S1P. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Abbildungen 3.3 und 3.4 dargestellt.

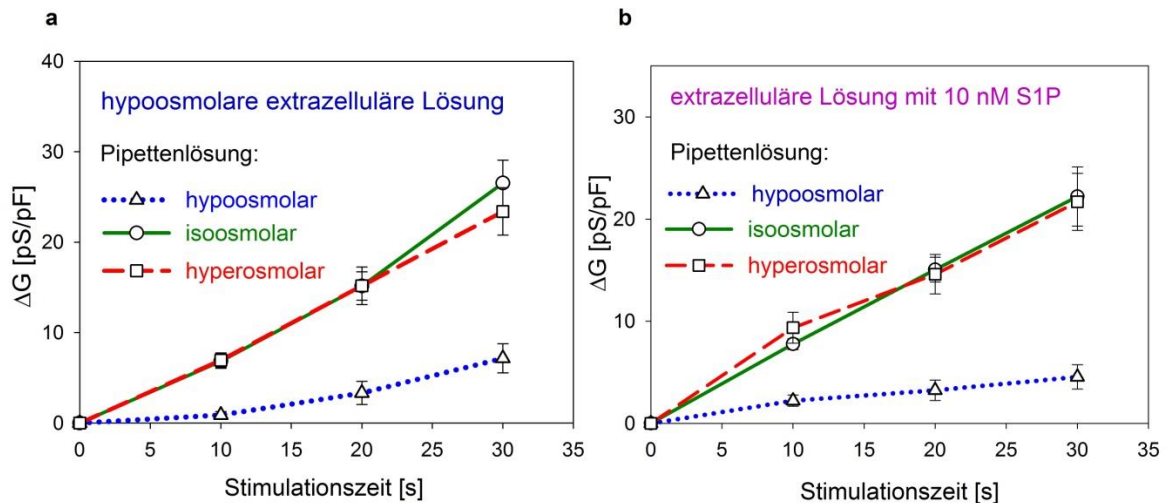
Zunächst war das Vorhandensein volumenregulatorischer Kanäle in RAW-Makrophagen zu zeigen. Dies wurde durch extrazelluläre Gabe hypoosmolarer Pufferlösung erreicht, wobei sich ein Anstieg der Membranleitfähigkeit nach Gabe der Pufferlösung zeigte. Die Leitfähigkeit nahm über die Zeit linear zu (Abb. 3.4a). Die Graphen zeigen entsprechende Leitfähigkeiten bis 30 s nach dem ersten signifikanten Anstieg. Aus noch ungeklärter Ursache nahm nach dieser Zeit bei vielen Messungen die Auswärtsgleichrichtung signifikant ab und unterschritt meist den oben definierten Schwellenwert von 2,0. Eine valide statistische Auswertung für Zeiträume über 30 s war daher für die kinetische Analyse des Stromes nicht möglich. Stabile Zellen zeigten jedoch auch nach zwei Minuten Gabe hypoosmolarer Lösung einen kontinuierlichen, annähernd linearen Anstieg der Leitfähigkeit. Erwartungsgemäß war der Anstieg der Leitfähigkeit (Abb. 3.4a) bei Verwendung hypoosmolarer Innenlösung deutlich gemindert.



Die S1P-induzierte Membranleitfähigkeit stieg nach unterschiedlicher Latenzzeit ebenfalls an (Abb. 3.3 und Abb. 3.4b). Die erreichten Werte der Membranleitfähigkeit ( $22,2 \pm 2,9$  pS/pF nach 30 s) entsprechen denen der durch Hypoosmolarität aktivierten Zellen. Auch bei S1P nahm die Auswärtsgleichrichtung nach 30 s signifikant ab, wobei sich bei den „stabil gebliebenen“ Zellen fast immer nach etwa 30-60 s eine Art Plateau einstellte und die Membranleitfähigkeit trotz weiter bestehender S1P-Gabe nicht zunahm. Bei Verwendung hypoosmolarer Lösung führte die weiter bestehende Gabe dagegen stets zu einem weiteren, annähernd linearen Anstieg der Leitfähigkeit. Die S1P-induzierte Membranleitfähigkeit konnte durch Verwendung hypoosmolarer Innenlösung deutlich vermindert werden (Abb. 3.3b und Abb. 3.4b). Hyperosmolare Innenlösung hatte keinen modifizierenden Effekt auf S1P-induzierte Ströme (Abb. 3.4b). S1P-induzierte Ströme sind also durch intrazelluläre Änderungen der Osmolarität beeinflussbar. Das mittlere Umkehrpotential S1P-aktivierter Ströme betrug  $-30,5 \pm 6,5$  mV, der mittlere Index für die Auswärtsgleichrichtung  $3,0 \pm 1,5$ . Für hypoosmolaritätsaktivierte Ströme betrug das mittlere Umkehrpotential  $-27,0 \pm 5,5$  mV, der mittlere Gleichrichtungsindex  $3,5 \pm 1,0$ . Die Werte für Hypoosmolarität und S1P sind auch hier nicht signifikant verschieden. Die Ergebnisse sprechen deshalb für eine Aktivierung volumenregulierender Kanäle durch S1P in RAW-Makrophagen.



**Abb. 3.3: Einfluss der intrazellulären Osmolarität auf S1P- und hypoosmolaritäts-induzierte Ströme: Beispiele.** In **(a, b)** Beispiele von S1P-induzierten Strömen unter Verwendung isoosmolarer **(a)** oder hypoosmolarer **(b)** Pipettenlösung.



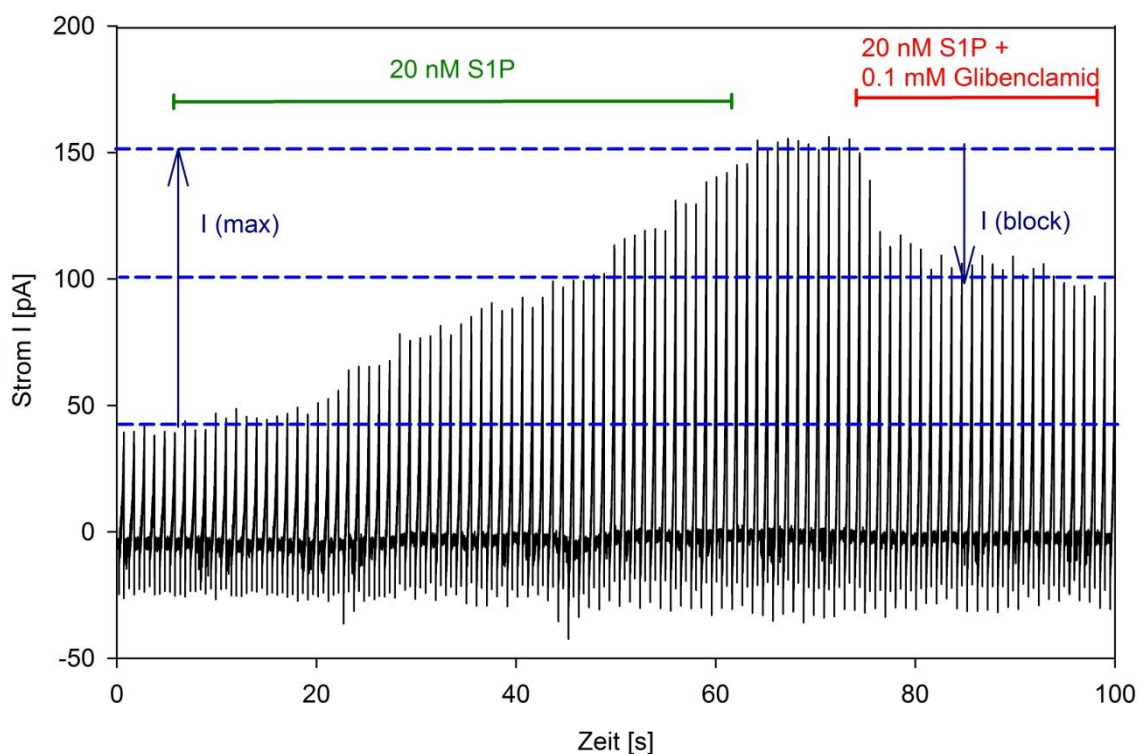
**Abb. 3.4: Einfluss der intrazellulären Osmolarität auf S1P- und hypoosmolaritäts-induzierte Ströme: Statistische Auswertung.** In (a) wurden die Zellen „klassisch“ mit extrazellulärer hypoosmolarer Pufferlösung aktiviert und damit das Vorhandensein volumenregulatorischer Kanäle gezeigt. Ebenso in (b) mit 10 nM S1P als Stimulator. In beiden Fällen war die Leitfähigkeit unter Verwendung hypoosmolarer Innenlösung deutlich vermindert (blaue gepunktete Graphen). Die Zeit  $t = 0$  s gibt den Beginn eines signifikanten Anstieges der Leitfähigkeit an. Ursache dafür sind die deutlich unterschiedlichen Latenzzeiten bis zum Anstieg der Membranleitfähigkeit nach Gabe des jeweiligen Agonisten (s. auch Abschnitt 3.1). Die Mittelwerte wurden jeweils aus acht bis 25 Einzelmessungen ermittelt.

### 3.4 Pharmakologie des S1P-aktivierten Stromes

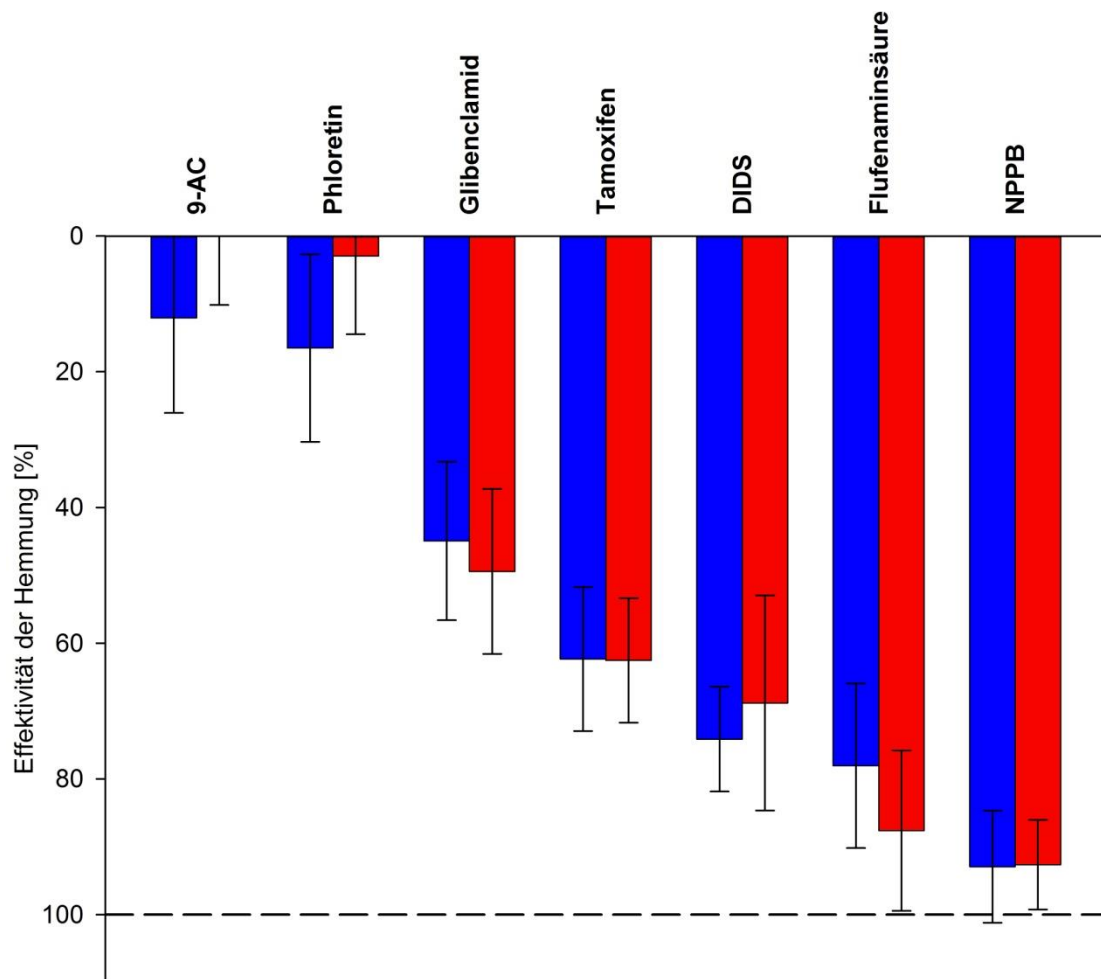
Die pharmakologische Testung volumensensitiver Anionenströme ist seit vielen Jahren ein wichtiges Werkzeug zur Identifizierung volumensensitiver Anionenkanäle. Die Problematik besteht darin, dass es keine spezifischen Blockersubstanzen sowohl für VSOR-Kanäle als auch für maxi-Anionenkanäle gibt. Häufig verwendete Substanzen sind NPPB und DIDS, sogenannte „konventionelle“ Blocker eines breiten Spektrums von Chloridkanälen und Anionentransportern. Carboxylate wie 9-Anthracensäure oder Flufenaminsäure hemmen ebenfalls ein breites Spektrum von Chloridkanälen in verschiedenen Zelltypen. Dagegen wird Tamoxifen, einem Hemmer von p-Glykoprotein, eine gewisse Spezifität für VSOR-Kanäle nachgesagt (Okada, 1997). Ebenso reagieren diese Kanäle sensitiv auf Glibenclamid, ein Sulfonylharnstoff, der bekanntermaßen ATP-abhängige Kaliumkanäle hemmt. Phloretin, ein Inhibitor von Glukosetransportern und Natrium-Glukose-Cotransportern (SGLT1 und 2), wird ebenfalls als relativ spezifischer VSOR-Kanalblocker diskutiert (Kurbannazarova et al., 2011).

Wir testeten die oben genannten Substanzen auf eine Hemmung des volumensensitiven Anionenstromes in RAW-Makrophagen und erstellten die in Abb. 3.6 gezeigten pharmakologischen Profile. Dazu wurden die Zellen zunächst durch hypoosmolaren Puffer

oder 10 nM S1P aktiviert. Die Blockersubstanzen wurden anschließend in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (Ausnahme: Tamoxifen 10  $\mu\text{M}$ ) hinzugefügt und die Hemmeffektivität nach 10 s bestimmt (Abb. 3.5). Die Blocker wurden zusammen mit hypoosmolarer Lösung bzw. S1P appliziert, um Auswascheffekte zu vermeiden. Es zeigte sich eine erwartete starke Hemmung der Hypotonizitäts-induzierten Leitfähigkeit durch NPPB, DIDS und Flufenaminsäure. Auch die S1P-getriggerte Leitfähigkeit war durch diese Substanzen beeinflussbar. Tamoxifen und Glibenclamid, relativ spezifische Blocker für VSOR-Kanäle, reduzierten die Leitfähigkeiten zu etwa 50-60 %. Dagegen hatten 9-Anthracensäure (9-AC) und Phloretin keine signifikanten Blockeffekte. Insgesamt fällt auf, dass sich die pharmakologische Beeinflussbarkeit von S1P- und hypotonizitätsaktivierten Strömen nicht signifikant unterscheidet. Dies unterstützt die Annahme, dass durch beide Stimuli gleichartige Kanäle in RAW-Makrophagen aktiviert werden. Insgesamt spricht das pharmakologische Profil für die Beteiligung von VSOR-Kanälen.



**Abb. 3.5: Beispiel einer partiellen Reduktion eines S1P-induzierten Stromes durch Glibenclamid.** Die Blockersubstanz wurde zusammen mit S1P appliziert (roter Balken). Zur Veranschaulichung kann die Blockeffizienz in diesem Beispiel näherungsweise durch den Quotienten  $[I(\text{block}) / I(\text{max})]$  angegeben werden. Zur exakten Berechnung wurden die Leitfähigkeiten pro Zellkapazität verwendet (s. Abb. 3.6).



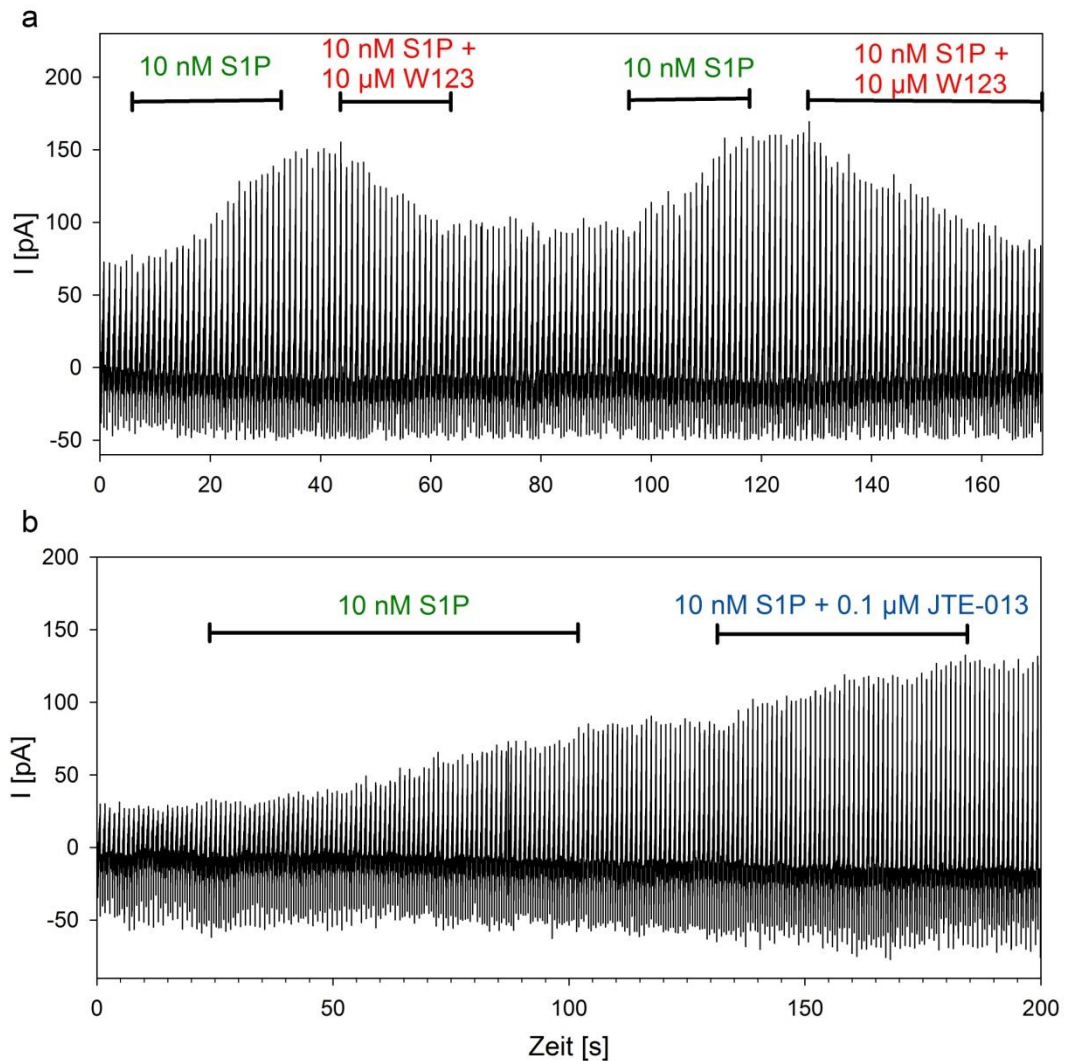
**Abb. 3.6: Vergleich der pharmakologischen Profile von S1P- und hypoosmolaritätsaktivierten Strömen.** Statistische Auswertung. Zunächst erfolgte eine Stimulation der RAW-Makrophagen mit S1P oder hypoosmolarer Lösung. Nach Erreichen einer ausreichenden Leitfähigkeit  $G_0$  (mindestens 10 pS/pF) wurde jeweils eine der oben genannten Substanzen zugegeben. Die Effektivität der Hemmung wurde 10 s nach Applikation des Blockers aus der verbliebenen Leitfähigkeit  $G_{\text{block}}$  und des Ausgangswertes  $G_0$  berechnet:  $\text{Effektivität} = [(G_0 - G_{\text{block}}) / G_0] * 100\%$ . Die Blockersubstanzen sind nach steigender Effektivität geordnet. Gemittelte Werte aus jeweils sechs bis zwölf Einzelmessungen. 9-AC entspricht 9-Anthracensäure.

Die in den bisherigen Abschnitten durchgeführten Versuche hatten das Ziel, ein Zielprotein für die beobachteten S1P-Effekte auf die Makrophagen zu definieren. Im Folgenden wird die Signalkaskade analysiert, die zur Aktivierung dieses Proteins durch S1P führt.

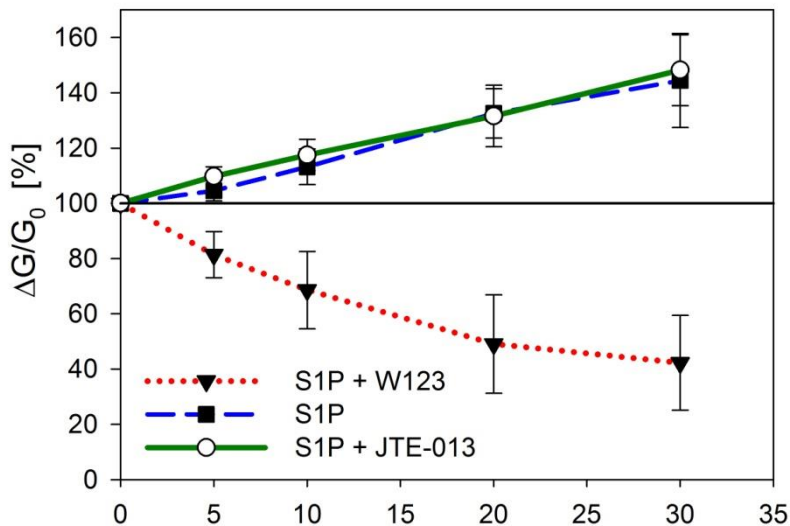
### 3.5 Die Beteiligung von S1P-Rezeptoren

Murine Makrophagen exprimieren vornehmlich S1PR1 und 2 (s. Abschnitt 1). Zur Beantwortung der Frage, welcher S1PR für die beobachteten Effekte verantwortlich ist, wurden S1P-Rezeptorantagonisten genutzt. Die Substanz W123 als Fingolimod-Analogen ist ein kompetitiver Antagonist am S1PR1 mit einem  $K_i$ -Wert von 0,69  $\mu\text{mol/l}$ , wobei die Hemmung anderer S1PR in höheren Konzentrationen nicht ausgeschlossen ist (Produktinformation Cayman Chemicals, s. Website-Zitat). JTE-013 ist ein hochselektiver S1PR2-Antagonist mit einem  $K_i$ -Wert von etwa 20  $\text{nmol/l}$ ; andere S1PR werden erst ab Konzentrationen im hohem mikromolaren Bereich relevant besetzt (Produktinformation Cayman Chemicals, s. Website-Zitat).

Die oben genannten S1PR-Antagonisten wurden zusammen mit S1P erst nach einer signifikanten Induktion eines auswärtsgleichrichtenden Stromes in Makrophagen durch S1P appliziert. Dies zeigte zunächst die Aktivierbarkeit der Zellen durch S1P, da dies nur bei etwa Hälfte der Zellen überhaupt möglich war (s. Abschnitt 3.1). Applizierte man S1P erneut allein, nahm die Leitfähigkeit ohne weitere Latenzzeit weiter linear zu (Abb. 3.8). Unter Verwendung von W123 jedoch war keine weitere Aktivierung mehr feststellbar, im Gegenteil, die Substanz führte zu einer langsamen Erniedrigung der Leitfähigkeit. Dieser Effekt war vollständig reversibel, denn die Zellen waren erneut durch S1P allein aktivierbar sowie auch durch W123 wiederholt hemmbar (Beispiel in Abb. 3.7a). Im Vergleich zu den in Abschnitt 3.4 untersuchten VSOR-Blockersubstanzen war die Abnahme der Leitfähigkeit durch W123 nur langsam, sodass dieser Effekt nicht als direkter Kanalblock zu werten ist. W123 konkurriert mit S1P um die S1PR und wurde in 1000-facher Konzentration im Vergleich zu S1P verwendet. Die Abnahme der kanalabhängigen Leitfähigkeit wird daher am ehesten durch die Verdrängung des Agonisten am Rezeptor hervorgerufen. Appliziert man S1P allein ohne Rezeptorantagonist und pausiert dann die Applikation, ist eine Abnahme des Stromes nach Auswaschen von S1P, wenn überhaupt feststellbar, sehr gering (zum Vergleich siehe Abb. 3.1). Im Falle von JTE-013 ist kein Effekt hinsichtlich einer Hemmung des S1P-induzierten Anstieges der Membranleitfähigkeit festzustellen (Abb. 3.7b). In der statistischen Auswertung ist im Vergleich zur Antwort auf die alleinige Applikation von S1P ist kein Unterschied festzustellen (Abb. 3.8). Diese Daten sprechen für eine Beteiligung des S1PR1, aber nicht des S1PR2 an der S1P-induzierten Anionenleitfähigkeit.



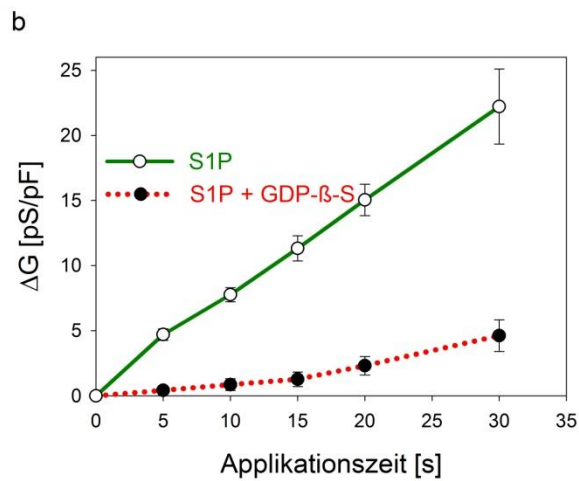
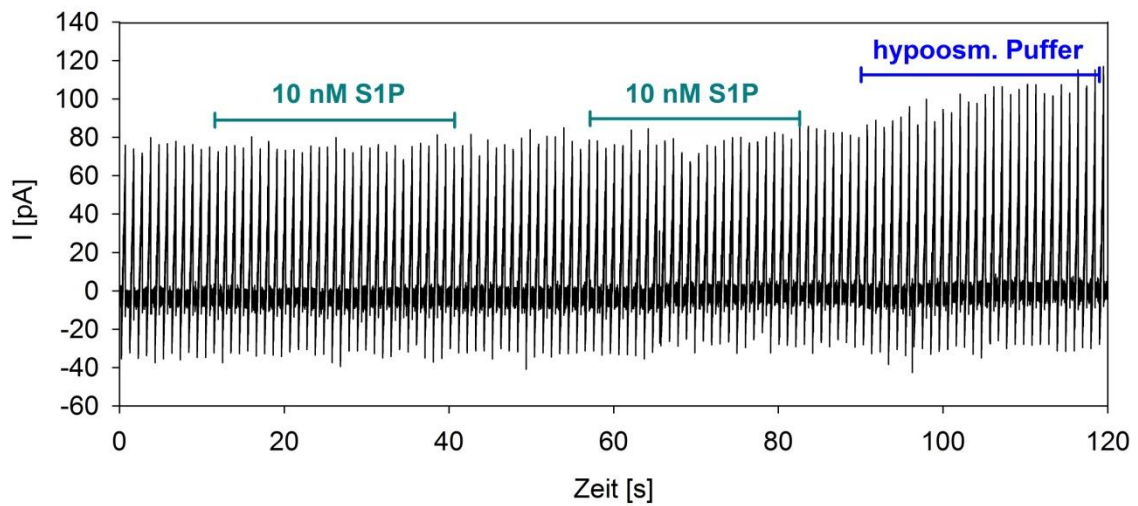
**Abb. 3.7: Beteiligung von S1P-Rezeptoren an S1P-induzierten Strömen.** Repräsentative Stromverläufe unter Verwendung der S1P-Rezeptorantagonisten W123 und JTE-013 (Einzelheiten siehe Text). Nach Auswaschen von W123 ist die Stimulation der Zellen mittels S1P erneut möglich **(a)**. Dagegen hat JTE-013 keinen modifizierenden Effekt auf die S1P-Wirkung **(b)**.



**Abb. 3.8: Beteiligung von S1P-Rezeptoren an S1P-induzierten Strömen: Statistische Auswertung.** Die Zellen wurden bis zu einer Ausgangsleitfähigkeit  $G_0$ , die minimal 20 pS/pF betrug, mit 10 nM S1P aktiviert. Anschließend wurden W123 oder JTE-013 zusammen mit 10 nM S1P hinzugegeben und die zu den angegebenen Zeitpunkten erreichten Leitfähigkeiten prozentual auf  $G_0$  bezogen. Die Negativkontrollen (S1P im Graph c) wurden mit einer wiederholten alleinigen Gabe von 10 nM S1P durchgeführt.

S1P-Rezeptoren auf der Zelloberfläche sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Zur Untersuchung einer solchen Signalweiterleitung ist der Einsatz von GTP- oder GDP-Analoga möglich (Eckstein et al., 1979). In dieser Arbeit wird GDP- $\beta$ -S (Guanosin- 5'-O-(2-thiodiphosphat)) verwendet, ein hydrolyseresistentes GDP-Analogon, das durch Nucleosiddiphosphat-Kinasen kaum phosphoryliert wird. Es unterbindet als kompetitiver Inhibitor die Aktivierung eines G-Proteins durch GTP. Bisherige bekannte Inhibitionskonstanten befinden sich im kleinen mikromolaren Bereich mit einer gewissen Variationsbreite. Über die Patchpipette kann GDP- $\beta$ -S von der Pipettenlösung in das Zellinnere diffundieren. Es zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 0,7  $\mu$ M GDP- $\beta$ -S eine Erhöhung der Membranleitfähigkeit auch nach mehrfacher Gabe von 10 nM S1P ausblieb (Abb. 3.9). Zum Ausschluss eines unspezifischen Blockeffektes von GDP- $\beta$ -S auf VSOR-Kanäle oder einer fehlenden Stimulierbarkeit von VSOR-Kanälen applizierten wir am Ende der Messung stets hypoosmolare Lösung. Bei allen Zellen zeigte sich – sofern der Seal stabil blieb – eine Erhöhung der Membranleitfähigkeit (als Beispiel s. Abb. 3.9a). Die Aktivierung volumenregulierender Anionenkanäle durch S1P ist also abhängig von aktivierten G-Proteinen, nicht jedoch die Stimulierbarkeit durch Änderungen der extrazellulären Osmolarität.



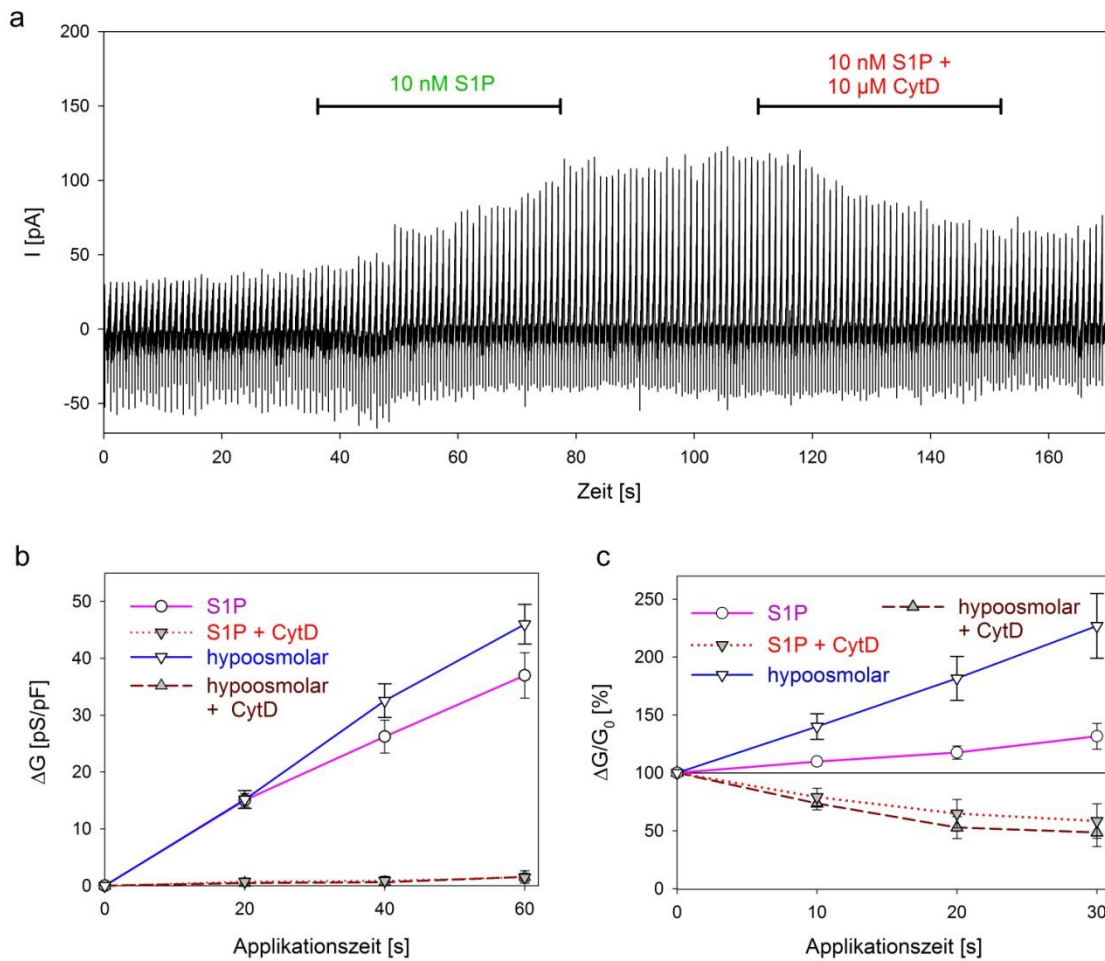


**Abb. 3.9.: Der Effekt von GDP-β-S auf S1P-induzierte Ströme in RAW-Makrophagen.**  
**(a)** Charakteristische Stromkurve unter Verwendung einer Pipettenlösung mit 0,7 mM GDP-β-S. Es ist auch durch wiederholte Gabe von 10 nM S1P keine Stromantwort auslösbar, allerdings am Ende durch hypoosmolare Lösung mit einem typisch linearen Anstieg der Membranleitfähigkeit. Statistische Auswertung in **(b)** unter Verwendung von zwölf Einzelmessungen (GDP-β-S), Vergleich mit den in Abb. 3.3.d gezeigten S1P-stimulierten Zellen ohne GDP-β-S.

### 3.6 Beteiligung des Zytoskeletts

Der Prozess der osmotischen Zellschwellung wird begleitet von Umbauprozessen zytoskelettaler Mikrofilamente. Unter anderem führt eine Zellschwellung zu einer Zerstörung des kortikalen Aktinzytoskeletts (Klausen et al., 2006). Physiologische Prozesse, die mit lokalen Änderungen des Zellvolumens einhergehen – beispielsweise die Zellmigration – sind ebenfalls von Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts abhängig (Cramer, 2010). Der Auf- und Abbau von Aktinpolymeren wird unter anderem über Phosphoinositid-Signalwege sowie durch Mitglieder der Rho-GTPasen-Familie gesteuert (Ridley, 2001). Das Rho/Rho-Kinase-System ist auch bei der Modulation von VSOR-Kanälen von Bedeutung (Okada et al., 2009). Modulatoren des Aktinzytoskeletts – beispielsweise Cytochalasine, Phalloidin und Latrunculin B – beeinflussen Aktivierbarkeit und Stromamplitude von VSOR-Kanälen unter hypoosmolarer Stimulation, auch wenn die bisher beobachteten Effekte nicht konsistent sind (Wei et al., 2003) (Levitan et al., 1995) (Okada, 1997). S1P ist ein wichtiger Modulator des Zytoskeletts und steuert unter anderem darüber auch Prozesse der Chemotaxis, Zellmigration und Diapedese (s. Abschnitt 1). Eine Verbindung zwischen S1P, dem Zytoskelett und der Aktivierung volumenregulierender Kanäle erscheint daher nicht nur in Makrophagen-Zelllinien plausibel.

Zur Überprüfung, ob die S1P- und Hypoosmolaritäts-induzierte Membranleitfähigkeit von Umbauprozessen der Mikrofilamente abhängig ist, wurde Cytochalasin D zusammen mit S1P bzw. hypoosmolarer Lösung appliziert (Abb. 3.10). Cytochalasine binden an die schnell naszierenden Plusenden von F-Aktinmolekülen und verhindern dort die weitere Polymerisation. Insgesamt führt dies zu einer Reduktion des F-Aktin-Gehaltes, da die Depolymerisation am Minusende erhalten bleibt (Mills et al., 2000). Es zeigte sich eine stark verminderte Aktivierbarkeit sowohl des hypoosmolaritäts-induzierten als auch des S1P-induzierten Stromes, wenn Cytochalasin D zusammen mit dem jeweiligen Stimulus appliziert wird (Abb. 3.10b). Falls die Zellen schon vorher stimuliert wurden, reduziert Cytochalasin D die Membranleitfähigkeiten in beiden Fällen (Abb. 3.10.c). Die Abnahme der Leitfähigkeiten ist vergleichbar der bei den S1PR-Antagonisten beobachteten Abnahme (Abb. 3.7). Ein direkter Blockeffekt von Cytochalasin D auf VSOR-Kanäle ist daher unwahrscheinlich. Der Effekt von Cytochalasin D sowohl auf die „klassisch“ osmotische Stimulation als auch auf die S1P-induzierte Aktivierung von VSOR-Kanälen weist auf eine allgemeine Bedeutung des Zytoskeletts für die Öffnung von VSOR-Kanälen unabhängig vom aktivierenden Stimulus hin.

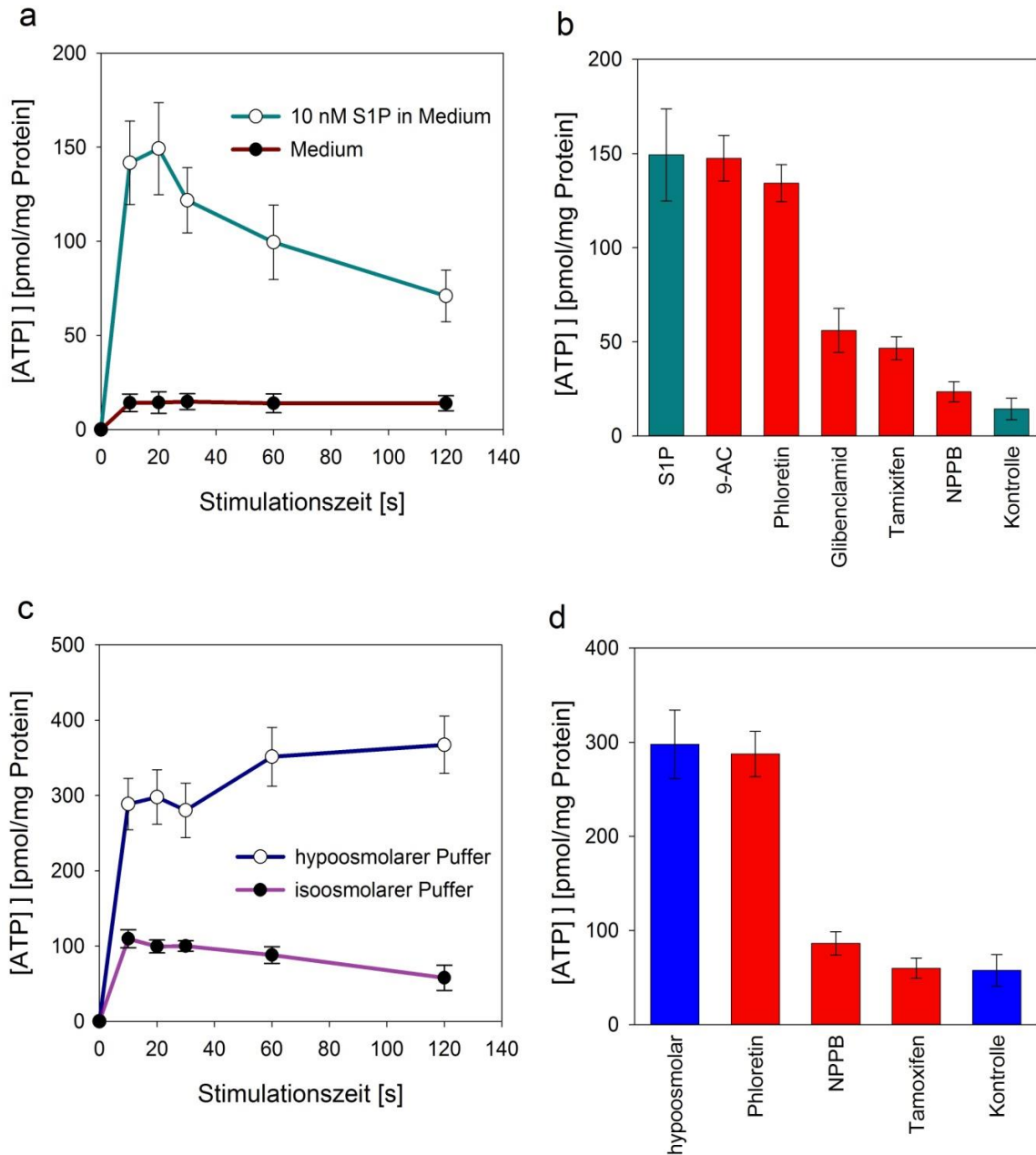


**Abb. 3.10.: Effekt von Cytochalasin D auf hypoosmolarität- und S1P-aktivierte Ströme. (a)** Beispiel des Effektes von Cytochalasin D (Cyt D) auf eine Zelle, die mit S1P stimuliert wurde. **(b)** Statistische Auswertung. Hier wurde CytD von Beginn an zusammen mit dem jeweiligen Agonisten zugegeben (gestrichelte bzw. gepunktete Graphen). Es zeigt sich eine fehlende Stimulierbarkeit des Stromes durch die Hypoosmolarität als auch durch S1P. In **(c)** wurden die Zellen zunächst wie schon in Abb. 3.5 vorher durch 10 nM S1P oder hypoosmolare Extrazellulärlösung aktiviert und Cyt D anschließend koappliziert. Auch hier zeigt sich bei beiden Stimulationsarten ein Effekt, der zu einer langsamen Abnahme der Gesamtleitfähigkeit führt.

### 3.7. ATP-Sekretion

Werden Zellen verschiedenster Zelllinien hypoosmotischem Stress ausgesetzt, können sie bioaktive Nukleotide oder Aminosäuren über nicht-lytische sowie nicht-vesikuläre Mechanismen freisetzen. Als konduktive Freisetzungsmechanismen werden dazu unter anderem auch volumensensitive Anionenkanäle diskutiert (Dutta et al., 2004) (Schlichter et al., 2011). Abbildung 3.11 zeigt eine ATP-Sekretion durch RAW-Makrophagen induziert durch hypoosmolare Lösung sowie durch S1P. Auch die Verwendung isoosmolarer Lösung erhöhte die extrazelluläre ATP-Konzentration, allerdings signifikant geringer als bei der hypoosmolaren Lösung. Wird anstelle der isoomolaren Lösung Medium verwendet, ist der ATP-Konzentrationsanstieg noch geringer (Abb. 3.11d). S1P, das im Versuch in einer Konzentration von 10 nM gelöst in Medium vorlag, induziert im Vergleich zu reinem Medium eine stärkere ATP-Sekretion (Abb. 3.11b). Im Vergleich zur hypoosmolaren Lösung ist der ATP-Konzentrationsanstieg bei Verwendung von S1P numerisch geringer (nach 20 s etwa 150 pmol/mg bei Hypoosmolarität gegenüber 300 pmol/mg bei 10 nM S1P) und zeigt einen transienten Verlauf, während die ATP-Konzentration bei hypoosmolarer Lösung auch nach 2 min Stimulation noch konstant hoch ist bzw. sogar weiter ansteigt. Sowohl bei S1P als auch bei hypoosmolarer Stimulation ist die ATP-Sekretion durch die bereits elektrophysiologisch getesteten Substanzen (s. Abschnitt 3.4.) gleichartig beeinflussbar (Abb. 3.11 a und c). Auch hier spricht das pharmakologische Profil für die Beteiligung von VSOR-Kanälen an der beobachteten ATP-Sekretion.

Bei den ATP-Experimenten fiel auf, dass die Durchführung der Experimente entweder mit isoosmolarer Pufferlösung oder mit Medium nicht zu vergleichbaren ATP-Konzentrationen führte (vergleiche die Kontrollgraphen in Abb. 3.11b und d). Somit ist ein rein durch mechanische Perturbation der Zellen erklärbarer ATP-Konzentrationsanstieg nicht die einzige Ursache für die beobachtete ATP-Grundkonzentration. Die durch S1P bzw. durch Hypoosmolarität induzierte ATP-Sekretion kann daher nur mit der jeweilig passenden Kontrolle korrekt verglichen werden.



**Abb. 3.11.:** ATP-Sekretion durch RAW-Makrophagen. **(a, c)** Zeitlicher Verlauf der extrazellulären ATP-Konzentration bis maximal 2 min nach Stimulation zum Zeitpunkt  $t = 0$  s. Die Kontrollen wurden mit Medium **(a)** bzw. mit isoosmolarer Pufferlösung **(c)** durchgeführt. **(b, d)** Pharmakologische Profile der ATP-Sekretion durch 10 nM S1P **(b)** bzw. hypoosmolare Lösung **(d)**. Die Substanzen wurden in den gleichen Konzentrationen wie in Abb. 3.4. verwendet. Die Kontrollen erfolgten mit Medium **(b)** bzw. mit isoosmolarer Pufferlösung **(d)**. Die ATP-Konzentrationswerte der Säulen entsprechen stets der extrazellulären ATP-Konzentration nach 20 s Stimulationszeit. Gemittelte Werte aus 6 bis 14 Einzelmessungen.

## 4 Diskussion

RAW-Makrophagen zeigten bei Stimulation durch hypoosmolare Lösung einerseits und durch 10 nM S1P andererseits eine Erhöhung der Membranleitfähigkeit. Die durch Anionen getragenen Ströme sind durch eine moderate Auswärtsgleichrichtung sowie durch die Beeinflussbarkeit durch Änderungen der extra- und intrazellulären Osmolarität gekennzeichnet. Die pharmakologische Analyse der Ströme brachte keine signifikanten Unterschiede zwischen S1P- und hypoosmolaritätsaktivierten Strömen. Aus diesen Ergebnissen schlossen wir auf eine Aktivierung volumen-sensitiver, auswärtsgleichrichtender Anionenkanäle (VSOR-Kanäle) durch S1P in RAW-Makrophagen. Die Untersuchung der zur VSOR-Kanalaktivierung führenden Signalkaskade erbrachte eine Beteiligung des S1PR1 und des Aktinzytoskeletts. Die Stimulation der Zellen mit hypoosmolarer Lösung und mit S1P erhöhte die ATP-Konzentration im Zellüberstand signifikant gegenüber den Negativkontrollen. Dieser Konzentrationsanstieg konnte bei beiden Stimulationsarten pharmakologisch in ähnlicher Weise wie schon bei den elektrophysiologischen Messungen beeinflusst werden. Wir schlossen aus diesen Ergebnissen auf eine konduktive ATP-Sekretion über VSOR-Kanäle in RAW-Makrophagen. In diesem Kapitel wird zunächst die Plausibilität dieser Ergebnisse erörtert. Anschließend wird auf der Grundlage dieser Analyse ein kurzer Ausblick mit weiteren Experimentiervorschlägen gegeben.

### 4.1 Identifizierung des S1P-induzierten Anionenstromes

#### 4.1.1 Zellvolumenregulation

Zur Überprüfung der Annahme, dass der S1P-induzierte Strom in Makrophagen durch VSOR-Kanäle getragen wird, wurde zunächst die Abhängigkeit des Stromes von Änderungen des Zellvolumens geprüft (s. Abschnitt 3.3). Perturbationen von Zellen durch Änderungen der extrazellulären und intrazellulären Osmolarität kommen häufig vor. Dies beinhaltet physiologische Prozesse wie die Verdauung hypo- oder hyperosmolarer Nahrung im Gastrointestinaltrakt, die Harnkonzentrierung in der Niere oder den programmierten Zelltod. Pathophysiologisch können beispielsweise Entzündungsreaktionen und Ischämie durch Zellnekrosen und Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren zu erheblichen, lokalen Osmolaritätsänderungen und Aktivierung volumenregulatorischer Systeme führen. Klinisch

bedeutsam sind auch Osmolaritätsänderungen bei Hypo- und Hypernatriämie und bei deren therapeutischem Ausgleich. Es ist nicht verwunderlich, dass eine große Anzahl von Kanälen und Transportern identifiziert wurden, die zur Zellvolumenregulation beitragen (Hoffmann et al., 2009). Im steady-state-Modus wird das intrazelluläre Volumen über die energieverbrauchende Tätigkeit der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase aufrechterhalten. Bei Osmolaritäts- und Volumenverschiebungen besteht ein generelles Prinzip der zellulären Volumenregulation darin, Osmolyte über die Plasmamembran zu sezernieren oder zu resorbieren. Wasser folgt dem osmotischen Druck anschließend über Aquaporine. Im Falle einer osmotisch ausgelösten Zellschwellung erhöht sich typischerweise transient die Membranleitfähigkeit für  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen, vermittelt durch  $\text{Cl}^-$ -Kanäle (sogenannter regulatory volume decrease, RVD). Elektrophysiologische Messungen wiesen in verschiedenen Zelltypen als Antwort auf eine Zellschwellung verschiedene durch  $\text{Cl}^-$ -Ionen getragene Ströme nach (Okada, 1997). Als wichtigster Vertreter volumen-sensitiver Anionenkanäle, weil in so vielen Zelltypen vorkommend, wird dabei der volumen-sensitive, auswärtsgerichtete Anionenkanal (VSOR-Kanal) benannt. Die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -, cAMP- sowie spannungsabhängigen Chloridkanälen der  $\text{ClC}$ -Familie sowie Bestrophinen für die Volumenregulation ist noch nicht befriedigend geklärt.  $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$ -Cotransporter (KCC) sind u.a. ebenfalls an der Volumenhomöostase beteiligt (Hoffmann et al., 2009).

#### 4.1.2 VSOR-Kanäle – eine Übersicht

Bei Ganzzellanalysen an Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts Ende der 1980iger Jahre wurden moderat auswärtsgerichtete Anionenströme bei Induktion einer Zellschwellung gemessen (Hazama und Okada, 1988). Die Gesamtleitfähigkeit stieg proportional zum simultan näherungsweise bestimmten Zellvolumen an. Ionenströme wurden nur dann nachgewiesen, wenn zytosolisches ATP vorhanden war. Eine Depolarisation der Zellmembran über +50 mV führte zu einer Abnahme des Stromes. Pharmakologisch konnten die Ströme durch konventionelle Chloridkanalblocker wie NPPB oder DIDS, aber auch durch p-Glykoprotein-Inhibitoren wie Tamoxifen und Verapamil sowie durch Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid effektiv gehemmt werden (Okada, 2006). Inzwischen sind Volumen-sensitive Anionenströme mit vielen der oben genannten elektrophysiologischen und pharmakologischen Charakteristika in vielen Zelltypen bekannt, u.a. in Epithelzellen, Endothelzellen, Hepatozyten, Fibroblasten, Osteoblasten, Astrozyten, Lymphozyten und Oozyten (Okada, 1997). Gemeinsame Charakteristika sind v.a. der lineare Anstieg der Membranleitfähigkeit während einer

ausgelösten Zellschwellung, die moderate Auswärtsgleichrichtung sowie die Abhängigkeit von intrazellulärem ATP. Unterschiede ergaben sich bei der Inaktivierung durch hohe positive Membranpotentiale – in T-Lymphozyten beispielsweise nicht nachweisbar – sowie z.T. in der pharmakologischen Blockade (Okada, 2006). Die lange Suche nach der molekularen Struktur von VSOR-Kanälen hat durch die Identifikation von LRRC8A als wichtige Komponente von VSOR-Kanälen neuen Auftrieb erfahren. Dies wurde unabhängig von zwei Arbeitsgruppen etwa zur selben Zeit vorgestellt (Voss et al., 2014) (Qiu et al., 2014). Die Ergebnisse dieser Arbeiten deuten darauf hin, dass Proteine der LRRC8-Familie (LRRC8A-E, *leucine-rich repeat-containing 8A-E*) Heteromere bilden, wobei LRRC8A als Bestandteil eines möglichen Kanalproteins obligat ist (Pedersen et al., 2015). Es wurde außerdem gezeigt, dass die Freisetzung von Glutamat und Taurin nach hypotonem Stress, eine als typisch angenommene Funktion von VSOR-Kanälen (s.o.), von der Expression von LRRC8A abhängig ist (Pedersen et al., 2015). Weitere Untersuchungen zur präziseren Darstellung einer VSOR-Kanalpore und der Aktivierungsmechanismen sowie der Bedeutung der LRRC8-Untereinheiten sind nun notwendig.

Die intrazellulären Mechanismen, die zur Aktivierung von VSOR-Kanälen führen können, sind nach den derzeitigen Erkenntnissen vielfältig. Es sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige und  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Signalkaskaden involviert, unter anderem der Rho-Rho-Kinase-pathway, Ras-Raf-abhängige Kaskaden, die Aktivierung der Phospholipase C mit nachfolgender intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung sowie Kaskaden, die über eine Stimulation von NADPH-Oxidasen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erzeugen (Nilius et al., 1999) (Okada, 2006). Wie die Expansion des Zellvolumens und diese Signalkaskaden mechanistisch miteinander verknüpft sind, ist noch unzureichend bekannt. Die klassische VSOR-Aktivierung durch Zellschwellung kann darüber hinaus durch verschiedene Mediatoren beeinflusst werden: Thrombin und Veränderungen des Membran-Cholesteringehaltes veränderten die VSOR-Antwort auf Änderungen des Zellvolumens in Endothelzellen bzw. Ehrlich-Asziteszellen (Manolopoulos et al., 1997) (Klausen et al., 2006). Liu et al. fanden sogar eine Aktivierung von typischen VSOR-Kanal-vermittelten Strömen durch Bradykinin, einem Mediator von Entzündungsreaktionen, gänzlich ohne eine Änderung des Zellvolumens (Liu et al., 2009). Die Identifizierung weiterer chemischer Modulatoren und Aktivatoren des nahezu ubiquitär exprimierten VSOR-Kanals sowie der abhängigen Signalkaskaden ermöglicht die weitere Aufklärung der physiologischen und pathophysiologische Bedeutung dieser Kanäle.



#### 4.1.3 Vergleich der durch Hypoosmolarität und S1P induzierten Ströme

In Kapitel 3 wurde gezeigt, dass Hypoosmolaritäts- und S1P-aktivierte Ströme in RAW-Makrophagen durch Anionen getragen werden und eine moderate Auswärtsgleichrichtung aufweisen. Hypoosmolare Lösung führte zu einem Anstieg der Membranleitfähigkeit nach einer mittleren Latenz von 16,5 s, bei S1P-aktivierten Strömen betrug die mittlere Latenz etwa 30 s. Volumenregulierende Systeme werden erst ab einem bestimmten Grad einer Zellschwellung aktiv (sog. volume set point, (Hoffmann et al., 2009) (Okada et al., 2009)). Latenzzeiten volumen-aktivierter Anionenströme können bis zu mehreren Minuten reichen (z.B. (Kimmelberg et al., 2006)). Dies ist abhängig vom jeweilig untersuchten Zelltyp sowie von der Osmolarität der verwendeten hypotonen Extrazellulärlösung. Bei S1P-induzierten Strömen ist die Aktivierungszeit der ausgelösten Signalkaskade, die zur Aktivierung des volumen-sensitiven Anionenkanals führt, zu berücksichtigen. Dies könnte die längere Latenzzeit im Vergleich zur hypoosmolaren Lösung erklären. Auffällig ist dabei, dass nur etwa 50 % der untersuchten Zellen auf S1P überhaupt mit einem Anstieg der Leitfähigkeit reagieren, aber mehr als 90 % der Zellen auf hypoosmolare Lösung. Für die Kanalaktivierung durch S1P ist, wie in Abschnitt 3.5 gezeigt wurde, eine intakte G-Protein-gekoppelte Signalkaskade notwendig. Dies erfordert u.a. die intrazelluläre Bereitstellung energiereicher Nukleotide sowie eine suffiziente Synthese, Transport und Positionierung der an der Kaskade beteiligten Proteine. Es ist nicht zu erwarten, dass diese Prozesse auch in mikroskopisch gesund erscheinenden Zellen stets in gleichem Umfang stattfinden. Dazu kommt, dass sich S1P durch seine große lipophile aliphatische Kohlenstoffkette in wässrigem Milieu nicht molekular löst und gleichmäßig verteilt. Die Löslichkeit kann durch den Einsatz von Ultraschallbädern –verbessert werden, indem möglicherweise größere Konglomerate an S1P-Molekülen aufgebrochen werden. Insgesamt ist aber auch dann eine homogene S1P-haltige Lösung mit einer in jedem Milliliter gleichen und definierten S1P-Konzentration nicht zu erwarten. Es ist somit möglich, dass während einer Applikation S1P-Moleküle die Zielzelle verzögert bzw. nur in geringem Ausmaß erreichen. Daher wurden bei der Erstellung der Abbildungen zur Aktivierung der Anionenkanäle (Abb. 3.2) die Latenzzeiten nicht berücksichtigt. Ebenfalls wurden die Zellen, die nicht auf S1P reagierten, nicht in die Auswertung mit einbezogen, um die S1P-induzierten Stromamplituden mit denen, die durch hypoosmolare Stimulation erreicht wurden, vergleichbar zu machen. Auf die Erstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve von S1P wurde verzichtet. Der Einsatz eines Rotationsverdampfers zur Entfernung des Lösungsmittels Methanol und die nachfolgende Lösung des S1P-Lipidfilms in einer wässrigen Lösung mit bovinem Serumalbumin (BSA) könnte sicherere und homogenere Konzentrationen von S1P

erzeugen. Da S1P im Blut zu etwa 55 % an HDL gebunden ist (Prüfer et al., 2014), ist die Verwendung dieses Lipoproteins zur besseren Darstellung physiologischer Konditionen möglich.

Ein Charakteristikum der Aktivierung von VSOR-Kanälen ist ein oft zeitlich gleichbleibender Anstieg der Membranleitfähigkeit nach initialer Kanalaktivierung. Dies wurde in verschiedenen Zelllinien beobachtet, sowohl in Abhängigkeit von der Stimulationszeit (Okada, 1997) als auch vom mikroskopisch bestimmten Zellvolumen (Okada et al., 2009). Diese Eigenschaft war auch in den in Abschnitt 3 vorgestellten Messungen sowohl beim hypoosmolaritätsaktivierten als auch beim S1P-induzierten Strom reproduzierbar (s. Abb. 3.3). Der Index für die Auswärtsgleichrichtung und das Umkehrpotential waren bei beiden Stimulationsarten nicht signifikant verschieden (s. Abschnitt 3.3). Bei S1P-induzierten Strömen wurde im Gegensatz zu hypoosmolaritätsaktivierten Strömen in vielen Fällen trotz weiterer Gabe des Agonisten nach etwa 30 s ein Plateau der Leitfähigkeiten erreicht. Möglicherweise findet eine schnelle Desensitivierung von S1PR1 durch S1P statt, sodass die abhängige G-Protein-gekoppelte Signalkaskade den Kanal nicht weiter aktivieren kann.

Volumensensitive Anionenkanäle können auch durch Modulation der intrazellulären Osmolarität, die bei Ganzzellanalysen durch die Osmolarität der Pipettenlösung näherungsweise charakterisiert ist, beeinflusst werden (Okada, 1997). Erwartungsgemäß konnte der Stromanstieg durch hypoosmolare extrazelluläre Stimulation durch Verwendung ebenfalls hypoosmolarer Pipettenlösung deutlich gemindert werden (Abb. 3.4a). Die Verwendung hyperosmolarer Pipettenlösung konnte aber weder eine Akzeleration der Kanalaktivierung bei hypoosmolarer extrazellulärer Stimulation (Abb. 3.4a) noch eine spontane Kanalaktivierung bei extrazellulärer isoosmolarer Pufferlösung auslösen (nicht dargestellt). Dies wurde in einigen Zelllinien bereits beobachtet (Okada, 1997). Der S1P-induzierte Strom verhielt sich bei Änderungen der intrazellulären Osmolarität in gleicher Weise wie der hypoosmolaritätsaktivierte Strom (Abb. 3.3b und 3.4b). Auch hier war keine signifikante Modulation des Stromes durch hyperosmolare Pipettenlösung zu verzeichnen. Es kann spekuliert werden, dass der Anstieg der Leitfähigkeiten allein durch die Verwendung hypoosmolarer Pufferlösung bzw. S1P schon maximal ist und nicht mehr zusätzlich durch hyperosmolare Pipettenlösung gesteigert werden kann. Möglicherweise benötigt die Verwendung hyperosmolarer Pipettenlösung aber auch deutlich mehr Zeit (mindestens im Minutenbereich), um einen messbaren, signifikanten Effekt hervorzurufen.

#### 4.1.4 Die Abgrenzung zum volumensensitiven „maxi-anion channel“

Neben der Vielzahl an volumenregulierenden Kanälen und Transportern (s. 4.1.1) wird über einen Anionenstrom berichtet, der wie die Ströme durch VSOR-Kanäle auf Änderungen der intra- und extrazellulären Osmolarität reagiert und in vielen Zelltypen beobachtet wurde (Sabirov und Okada, 2009). Auch in Lymphozyten und Makrophagen wurden derartige Ströme gemessen. Aufgrund einer Einzelkanalleitfähigkeit von mehreren hundert pS (variierend je nach Zelltyp) und einer geschätzten Porengröße von 0,6-1,3 nm je nach verwendeter Methode wurde die Existenz eines vom VSOR-Kanal verschiedenen Kanalproteins, des sogenannten „maxi-Anionenkanals“, postuliert. Der klassische Stimulus für diese Kanalentität ist wie für den VSOR-Kanal die osmotisch ausgelöste Zellschwellung mit einer variablen Latenzzeit. Weitere Stimuli sind unter anderem Hypoxie, Ischämie sowie weitere chemische Stimuli, unter anderem Agonisten an Adenosin- und Endothelinrezeptoren sowie Bradykinin, das schon als Stimulator von VSOR-Strömen gesehen wurde (s. 4.1.2.). Es ist insgesamt davon auszugehen, dass in vielen Zelltypen bei osmotischer Zellschwellung verschiedene Kanäle und Transporter aktiviert werden und sich somit ein Mischsignal aus verschiedenen Kanalentitäten ergibt. Unterschiede zwischen Strömen vermittelt durch VSOR-Kanäle und maxi-Anionenkanäle ergeben sich zum Einen durch unterschiedliche elektrophysiologische Charakteristika: Der maxi-Anionenkanal zeigt typischerweise keine oder nur eine sehr geringe Auswärtsgleichrichtung und zeigt eine hohe Einzelkanalleitfähigkeit. Zum Anderen werden maxi-Anionenströme durch Glibenclamid nicht gehemmt und durch Östrogenrezeptormodulatoren wie Tamoxifen oder Toremifen typischerweise sogar stimuliert (Sabirov und Okada, 2009) (Kurbannazarova et al., 2011). Dies zeigte sich in den in Abschnitt 3 vorgestellten Experimenten mit RAW-Makrophagen nicht. Dies macht den Einfluss von maxi-Anionenkanälen auf die gesehenen volumenaktivierten Ströme unwahrscheinlich. Einzelkanalmessungen wurden nicht durchgeführt. Eine definitive Abgrenzung kann nach derzeitigem Stand aufgrund des Mangels an kanalspezifischen Antagonisten nur molekulargenetisch durch gezielte Ausschaltung von Kanalproteinen erfolgen. Die derzeitigen Fortschritte in der molekulargenetischen Analyse volumensensitiver Proteine (s.o.) lassen baldige neue Erkenntnisse in dieser Richtung erhoffen.

## 4.2 Untersuchung der zur VSOR-Aktivierung führenden Signalkaskaden

### 4.2.1 S1P-induzierte, G-Protein-gekoppelte Signalwege

Die Identifikation der intrazellulären Mechanismen, die zur Öffnung und Schließung von VSOR-Kanälen führen, ist ein wichtiger Schritt zur Aufklärung ihrer physiologischen und pathophysiologischen Funktionen. Extrazelluläres S1P aktiviert über die Bindung an fünf verschiedene 7-TM-Rezeptoren G-Protein-vermittelte Signalwege. In RAW-Makrophagen werden S1PR1 und 2 exprimiert, deren Signale über  $G_i$  bzw. über  $G_{12/13}$  weitergeleitet werden (Rosen et al., 2013). Die Modulation volumenaktivierter Anionenströme durch chemische Beeinflussung G-Protein-gekoppelter Signalwege mittels schwer hydrolysierbarer GDP- bzw. GTP-Analoga wurde schon in den 90er Jahren untersucht: Die intrazelluläre Applikation von GDP $\beta$ S über die Patchpipette führte zu einer partiellen Reduktion volumenaktivierter Ströme in bovinen Endothelzellen (Voets et al., 1998), während GTP $\gamma$ S bei den gleichen Zellen in isotoner Lösung typische VSOR-Ströme hervorrufen konnte (Nilius et al., 1999). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung von VSOR-Kanälen durch S1P (s. Kapitel 3) durch die intrazelluläre Coapplikation von GDP $\beta$ S um mehr als 75% vermindert (Abb. 3.9b). Dagegen waren hypoosmolaritätsaktivierte Ströme trotz GDP $\beta$ S weiterhin auslösbar (s. Beispiel in Abb. 3.9a). Mit zunehmendem Datenmaterial zur Aktivierung von VSOR-Strömen wurde deutlich, dass die Beeinflussung von VSOR-Strömen in verschiedenen Zelllinien durch unterschiedliche Signalkaskaden stattfinden kann und die (pharmakologische) Inhibition eines einzelnen Weges bzw. Moleküls nur zu einer partiellen Reduktion von VSOR-Strömen führt (Okada et al., 2009). Es zeigte sich darüber hinaus, dass sich die Modulation von VSOR-Strömen in verschiedenen Zelltypen unterscheidet. Außerdem konnte für keinen Signalweg, auch nicht für den G-Protein-gekoppelten, nachgewiesen werden, dass dieser für die Aktivierung von VSOR-Kanälen zwingend benötigt wird. Die Aktivierung von VSOR durch Volumen- bzw. Osmolaritätsänderungen in RAW-Makrophagen scheint auch nach den Ergebnissen dieser Arbeit unabhängig von G-Protein-gekoppelten Signalwegen zu funktionieren. Die Aktivierung durch S1P ist allerdings zu einem großen Prozentsatz von solchen Signalwegen abhängig.

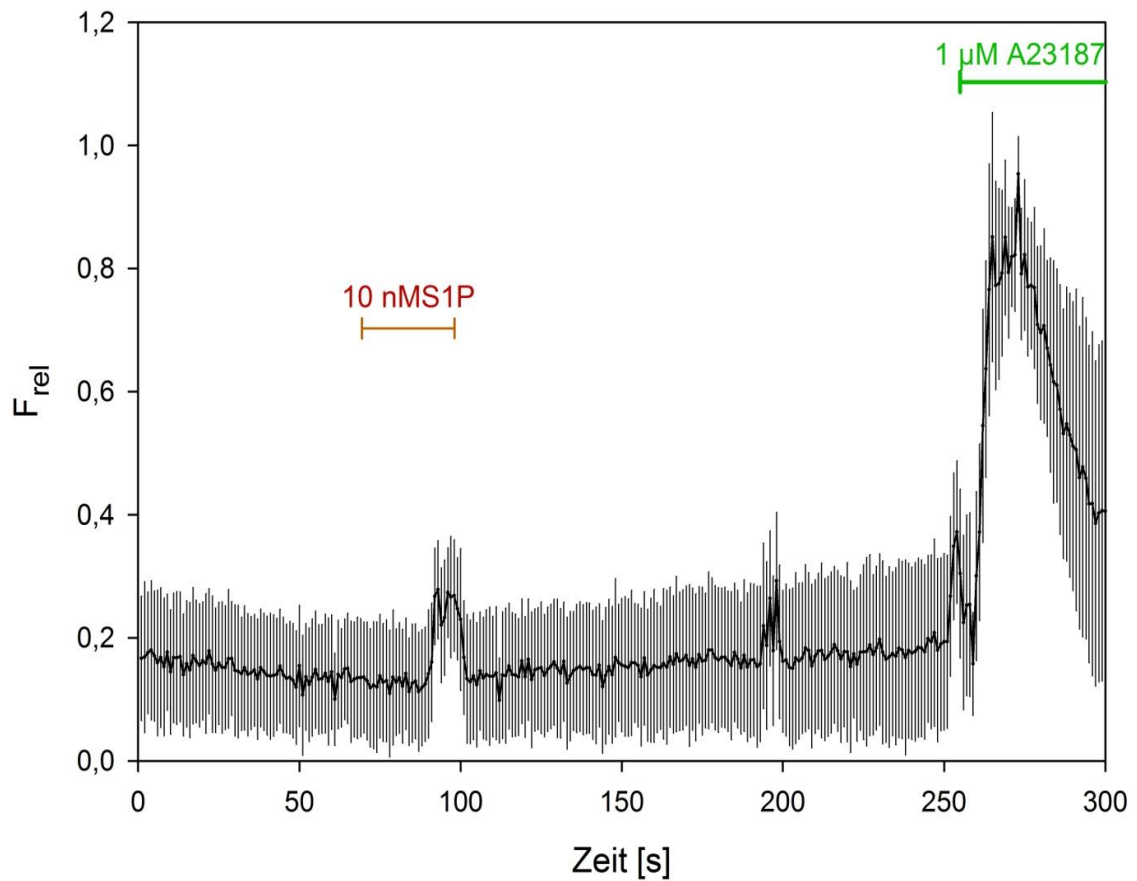
#### 4.2.2 Die Rolle des Zytoskeletts bei der VSOR-Kanalaktivierung

Zytoskelettale Elemente in epithelialen und nicht-epithelialen Zellen tragen viel zur mechanischen Stabilität der Zelle bei, sind aber durch ihre enge Verknüpfung mit transmembranären und zytosolischen Proteinen zusätzlich stark an der Koordination komplexer Prozesse wie Zellmigration, Zellwachstum, Endozytose und der Volumenregulation beteiligt. Für letzteren Prozess konnte für viele Zelltypen im Allgemeinen gezeigt werden, dass sich bei Volumenänderungen die Menge an F-Aktin, besonders im kortikalen Bereich, verändert. Oftmals geht eine Zellschwellung mit einer Abnahme und eine Zellschrumpfung mit einer Zunahme des kortikalen F-Aktingehaltes einher (Hoffmann et al., 2009). In Verbindung mit dieser Beobachtung konnte beispielsweise in B-Lymphozyten gezeigt werden, dass volumenaktivierte Ströme, aktiviert durch milde Hypotonizität, durch eine Verminderung von F-Aktinmolekülen durch Cytochalasin B, verstärkt werden. Die Stabilisierung von F-Aktin durch Phalloidin führte dagegen zu einer Verminderung der Stromamplituden (Levitan et al., 1995). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Zerstörung (kortikalen) F-Aktins einen positiven modulatorischen Effekt auf volumenaktivierte Ströme ausübt (Okada, 1997). Dies konnte in einigen Arbeiten bestätigt werden, teilweise war aber auch kein oder sogar der gegenteilige Effekt zu beobachten (zusammengefasst in (Hoffmann et al., 2009)). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein Hemmeffekt sowohl des S1P- als auch des hypoosmolaritätsaktivierten Stromes durch die Koapplikation von 10  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D (s. Abb. 3.10). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Integrität des F-Aktingehaltes in RAW-Makrophagen für VSOR-Kanal-vermittelten Ströme wichtig ist, unabhängig von der Art der Kanalaktivierung. Dabei muss beachtet werden, dass Effekte von Cytochalasinen von der Art des verwendeten Cytochalasins und der Substanzkonzentration abhängig sein können (Mills et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde daher auch mit 1  $\mu\text{M}$  und 0,1  $\mu\text{M}$  Cytochalasin D experimentiert, wobei sich allerdings kein signifikant verschiedener Effekt im Vergleich zu den dargestellten Ergebnissen mit 10  $\mu\text{M}$  ergab (1 und 0,1  $\mu\text{M}$  nicht dargestellt). Für weitere Untersuchungen des zytoskelettalen Einflusses auf VSOR-Ströme können weitere Parameter, wie der Gesamt-F-Aktingehalt, die kortikale Aktinskelettstruktur sowie die Zellmorphologie in Abhängigkeit von Hypoosmolarität und S1P analysiert werden. Die genauen mechanistischen Prinzipien des Gatings von VSOR-Kanälen, an dem möglicherweise auch das mikrofilamentäre Zytoskelett beteiligt ist, sind noch weitestgehend unbekannt. Es wurde vermutet, dass bei osmotisch ausgelöster Zellschwellung durch die Entfaltung der Plasmamembran mechanisch VSOR-Kanäle aktiviert werden. Dabei sollen Einstülpungen der Plasmamembran aufgebrochen werden, die durch das Aktinzytoskelett bzw. durch Stressfasern aktiv und passiv festgehalten werden (Okada, 1997).

Eine Unterbrechung dieser Mikrofilamente durch o.g. Reagenzien könnte somit die VSOR-Kanalaktivierung erleichtern. Die Divergenz der experimentellen Ergebnisse in letztgenannter Richtung lässt aber auf weitere Mechanismen und/oder eine differente Regulation von VSOR-Kanälen in verschiedenen Zelltypen schließen. Es stellt sich auch die Frage, inwieweit die anderen Komponenten des Zytoskeletts – also Intermediärfilamente und Mikrotubuli – an der Funktion des VSOR-Kanals und an der Zellvolumenregulation überhaupt beteiligt sind. Hinweise auf letztes gibt es vereinzelt, zusammengefasst in (Hoffmann et al., 2009). Dies ist, jedenfalls im Falle der Intermediärfilamente, anzunehmen, zumal sie einen großen Anteil an der intrazytoplasmatischen Signalweiterleitung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten innehaben. Zur Klärung dieser Vermutung sind noch eine Reihe von Untersuchungen notwendig.

#### 4.2.3 Die Rolle von intrazellulärem $\text{Ca}^{2+}$ bei der VSOR-Kanalaktivierung

Bei den elektrophysiologischen Messungen in dieser Arbeit wurde intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  chelatiert, sodass freies, intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  nur in nanomolaren Konzentration vorlag (s. Material und Methoden). Zur Überprüfung, ob bei der Signalgebung von S1P über S1PR1 und S1PR2 in RAW-Makrophagen das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  ansteigt, wurde nach Gabe von S1P intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  fluorimetrisch gemessen (Abb. 4.1.). Es zeigte sich kein signifikanter Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  durch extrazelluläre S1P-Gabe. Dies stimmt mit zahlreichen Untersuchungen überein, dass für eine VSOR-Kanalaktivierung höchstens eine permissive, geringe  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung im nanomolaren Bereich notwendig sein könnte (Szücs et al., 1996) (Hoffmann et al., 2009). Diese Ergebnisse sind auch zur Abgrenzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen wichtig, die wie VSOR-Kanäle ebenfalls durch eine osmotisch ausgelöste Zellschwellung aktiviert werden können (Okada, 1997). S1P führt daher in RAW-Makrophagen nicht zur Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Chloridkanälen.



**Abb. 4.1.: Intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsverlauf nach S1P-Gabe.** Zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsmessung wurde der Fluoreszenzfarbstoff *fluo-4* genutzt. Die Fluoreszenzen sind relativ in Bezug auf die maximal erreichte Fluoreszenz bei Zugabe des Ionophors A23187 (als Positivkontrolle) angegeben. Nach Beendigung der S1P-Gabe sowie zu Beginn der Gabe des Ionophors kam es transienten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegen, die am ehesten durch eine mechanische Perturbation der Zellen bei Austausch der Substanzen zu erklären sind. Mittelwerte aus 15 Einzelmessungen  $\pm$  SD. Mit freundlicher Genehmigung durch Dr. M. Klapperstück, MLU Halle-Wittenberg.

### 4.3 ATP-Sekretion über VSOR-Kanäle

#### 4.3.1 Vorbemerkungen

Eine Vielzahl von Anionenkanälen kann in epithelialen und nicht-epithelialen Zellen eine kontrollierte ATP-Sekretion vermitteln (s. Abschnitt 1.2.4.). Unter den Chloridkanälen sind dabei Kanäle der ABC-Transporterfamilie, VSOR-Kanäle und maxi-Anionenkanäle am besten untersucht (Sabirow und Okada, 2005). Eine ATP-Sekretion ist über die Kanalpore nur dann möglich, wenn das jeweilige Ion – beispielsweise  $\text{ATP}^{4-}$ ,  $\text{HATP}^{3-}$  oder  $\text{MgATP}^{2-}$  - durch die jeweilige Kanalpore passt. Die effektiven Radien der o.g. Ionen bewegen sich in einem Bereich von ca. 0,55 – 0,70 nm (Sabirow und Okada, 2005). Für VSOR-Kanäle und maxi-Anionenkanäle konnten die Radien der Kanalporen bisher nur approximiert werden. Für VSOR-Kanäle sind unter Verwendung unterschiedlicher Methoden Werte zwischen 0,6 und 0,7 nm ermittelt worden (Sabirow und Okada, 2005), für maxi-Anionenkanäle Werte um 1,3 nm (Sabirow und Okada, 2004). Somit ist eine Permeation von Purinnukleotid-Ionen durch diese Kanäle rechnerisch möglich. Bei diesen theoretischen Kalkulationen muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass Kanalporen weitere und engere Stellen besitzen, also nicht symmetrisch aufgebaut sein müssen. Dazu kommen komplexe Regulationsmechanismen, beispielsweise durch Konformationsänderungen des Kanalproteins durch reversible Modifikation oder allosterische Beeinflussung. Der Einfluss dieser dynamischen Veränderungen auf die Permeation organischer Anionen ist bei diesen Kanälen noch nicht untersucht.

#### 4.3.2. Pharmakologische Testung der ATP-Sekretion

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten zeigte sich sowohl nach Gabe hypoosmolarer Lösung als auch nach S1P-Gabe eine Erhöhung der extrazellulären ATP-Konzentration nach wenigen Sekunden Stimulationszeit (s. Abb. 3.11a, c). Dieser Konzentrationsanstieg war im Vergleich zu den jeweiligen Negativkontrollen signifikant höher, sodass dieser Anstieg nicht allein durch mechanische oder chemische Perturbation der Zellen durch die Lösungswechsel erklärt werden kann. Somit kann angenommen werden, dass ein großer Teil der ATP-Konzentrationserhöhung durch eine ATP-Sekretion der Zellen zustande kommt, die kontrolliert als Antwort der Zellen auf die Zugabe der jeweiligen Stimulanzien geschieht. Die pharmakologische Testung dieser ATP-Sekretion erfolgte dabei mit einer Auswahl derjenigen Substanzen, die schon für die elektrophysiologischen Messungen benutzt wurden. Es zeigte sich, dass sich das pharmakologische Profil der ATP-Sekretion von S1P und



hypoosmolarer Lösung nicht signifikant unterscheidet (s. Abb. 3.11b, d). Im Vergleich mit den elektrophysiologischen Messungen ergeben sich ebenfalls nur geringe Unterschiede (s. Abb. 3.4.). Dies spricht pharmakologisch gegen die Beteiligung von maxi-Anionenkanälen (s. Abschnitt 4.2.2.). CFTR-Kanäle können zwar durch konventionelle Chloridkanalblocker wie NPPB und durch Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid geblockt werden, jedoch gibt es Hinweise auf einen Hemmeffekt von Carboxylaten wie 9-Anthracensäure (9-AC) (Hwang und Sheppard, 1999). 9-AC zeigte allerdings keinen inhibitorischen Effekt auf die ATP-Sekretion von RAW-Makrophagen (Abb. 3.11b, d). Auch Connexin-basierte Kanäle können eine ATP-Sekretion vermitteln (s. Abschnitt 1.2.4). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Stilbenderivate wie DIDS sowie der Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen auf bestimmte Connexinuntereinheiten inhibitorische Wirkungen besitzen (Eskandari et al., 2002). Der starke Hemmeffekt von Flufenaminsäure spricht gegen die Beteiligung von Pannexin-1 an der ATP-Sekretion (Ma et al., 2009). Ein Beweis für eine VSOR-vermittelte ATP-Sekretion kann jedoch erst dann erbracht werden, wenn entweder spezifische Proteinantagonisten zur Verfügung stehen oder das Kanalprotein genetisch, z.B. mittels siRNA gegen LRRC8-Untereinheiten, ausgeschaltet wird. Ob die ATP-Sekretion bei den RAW-Makrophagen auch über vesikuläre Mechanismen vermittelt werden kann, wurde in der vorgelegten Arbeit nicht untersucht.

#### 4.3.3 Kinetik der ATP-Sekretion

Bei einem Vergleich der ATP-Konzentrationsverläufe nach Stimulation mit hypoosmolarer Lösung bzw. S1P fallen deutliche Unterschiede auf: Bei der S1P-induzierten Stimulation zeigt sich ein ATP-Konzentrationsmaximum nach 20 s Stimulationszeit gefolgt von einem näherungsweise exponentiellen Konzentrationsabfall (Abb. 3.11a). Ein ähnlicher Konzentrationsverlauf nach Gabe von 10 nM S1P bis 20 s Stimulationszeit bei RAW-Makrophagen wurde schon beobachtet (Kuehnel et al., 2009). Dagegen fällt die ATP-Konzentration bei hypoosmolarer Stimulation nach einem schnellen Anstieg bis 10 s nicht ab, sondern steigt sogar leicht an (Abb. 3.11c). Die in der extrazellulären Lösung bestimmte ATP-Konzentration ist, wenn die basale ATP-Konzentration nicht berücksichtigt wird, das Ergebnis einer ATP-Sekretion durch die Zellen und eines gleichzeitig stattfindenden ATP-Abbaus durch membrangebundene Ectonukleotidasen (Espelt et al., 2013). Dies kann als Erklärung für den phasischen Verlauf von extrazellulären ATP-Konzentrationsmessungen herangezogen werden (Leal Denis et al., 2013) (Espelt et al., 2013). Wird die Aktivität der Ectonukleotidasen bei S1P- und hypoosmolaritäts-basierten Messungen als gleich angenommen, so ist für die o.g.

Unterschiede in den Graphen eine unterschiedliche ATP-Sekretion verantwortlich. Möglicherweise nimmt durch eine Desensitivierung von S1PR1 (Arnon et al., 2011) die ATP-Sekretion im Verlauf ab. Die elektrophysiologischen Messungen, wobei sich bei S1P-stimulierten, aber nicht bei hypoosmolaritätsaktivierten Zellen oft nach etwa 30-60 s ein Stromplateau einstellte, sprechen für diese Hypothese (s. Abschnitte 3.3. und 4.1.3.). Weiterführende Messungen könnten die Rolle von Ectonukleotidasen, für die es kommerziell erhältliche Hemmstoffe gibt, für den ATP-Konzentrationsverlauf klären. Außerdem ist in diesem Zusammenhang, wie bei Kuehnel et al. (Kuehnel et al., 2009), die Bestimmung der Hydrolyseprodukte von ATP sinnvoll.

#### 4.3.4 Analyse der ATP-Bestimmungsmethode

Für die extrazelluläre ATP-Bestimmung wurde die Luciferin-Luciferase-Reaktion genutzt (s. Abschnitt 2.3.). Diese Methode erlaubt die zuverlässige Detektion auch sehr kleiner Mengen von ATP (bis in den femtomolaren Bereich) unter Beachtung konstanter experimenteller Bedingungen (Wood et al., 1989). Das extrazelluläre Volumen, das in den o.g. Experimenten genutzt wurde, betrug 2 ml. Die in dieses Volumen sezernierte und experimentell bestimmte ATP ist daher einem starkem Verdünnungsprozess unterworfen. Die tatsächlich an der äußeren Seite der Plasmamembran vorliegende Konzentration dürfte um einige Faktoren höher liegen. Untersuchungen mit plasmamembran-gebundener Luciferase zeigten mehr als 1000-fach höhere Konzentrationen (Praetorius und Leipziger, 2009). Eine Verringerung des Analysevolumens auf 200 µl in 24-Well-Platten unter genereller Beibehaltung der ATP-Bestimmungsmethode zeigte keine signifikante Änderung der ATP-Konzentrationen (nicht dargestellt). Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen daher eine generelle ATP-Sekretion durch RAW-Makrophagen, lassen aber keine Schlüsse auf die tatsächlich an der Plasmamembran wirksamen Konzentrationen zu. Es stehen mehrere Methoden zur hochauflösenden Echtzeitdarstellung von freigesetztem ATP zur Verfügung (Praetorius und Leipziger, 2009) (Ledderose et al., 2015). Der Einsatz solcher Methoden könnte die Aussagekraft gemessener ATP-Konzentrationen erheblich verbessern, zumal für die Bindung an Rezeptoren auf der Plasmamembran die membranernahe Konzentration maßgeblich ist.

#### **4.4. Funktionelle Bedeutung einer S1P-induzierten ATP-Sekretion**

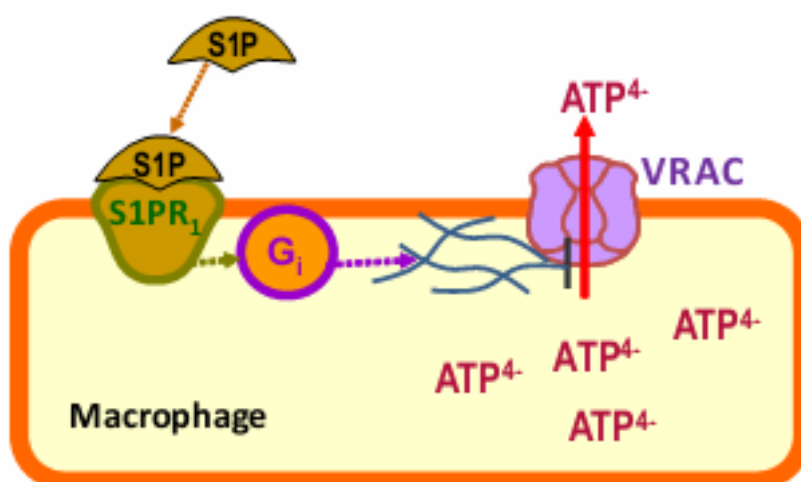
Die Vermutung, dass es zahlreiche Verbindungen zwischen dem purinergem System und bioaktiven Lipiden wie Arachidonsäure oder auch S1P gibt, ist nicht neu (Costa-Junior et al., 2011). Im Immunsystem sind ATP und seine Hydrolyseprodukte Bestandteil eines komplexen regulatorischen Netzwerks (Di Virgilio, 2007b). ATP kann u.a. durch die Zerstörung von Zellen, aber auch durch hypoxische und inflammatorische Signale freigesetzt werden (Di Virgilio, 2007a). Die Stimulation von SPHK und die Freisetzung von S1P erfolgt durch ganz ähnliche Signale (Weigert et al., 2009) (Spiegel und Milstien, 2011). Freigesetztes ATP kann als DAMP wirken und zur auto- und parakrinen Amplifikation proinflammatorischer Signale dienen. Auch über eine Stimulation von SPHK durch extrazelluläres ATP wird berichtet (Klawitter et al., 2007). Für komplexe Prozesse wie Chemotaxis und Zellmigration, Phagozytose und intrazelluläre bakterizide Aktivität gibt es zahlreiche Hinweise auf eine Beteiligung sowohl des purinergen als auch des S1P-Systems (Weigert et al., 2009) (Takai et al., 2012) (Kronlage et al., 2010) (Fairbairn et al., 2001). Die Zellmigration erfordert dabei die koordinierte und lokalisierte Aktivität von Kanalproteinen, u.a. auch von volumenaktivierten Kanälen (Schwab et al., 2012). Die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, eine der zentralen Aufgaben von Makrophagen in der Inflammation, kann sowohl über die Aktivierung von P2X7R als auch durch S1P gesteigert werden (Nayak et al., 2010) (Hughes et al., 2007). Interessanterweise gibt es sowohl für ATP- als auch S1P-induzierte Signale Hinweise auf antiinflammatorische Effekte, die z.T. durch unterschiedliche Mediatorkonzentrationen zustande kommt (Weigert et al., 2009) (Di Virgilio, 2007a). Inwieweit S1P- und ATP-induzierte Signale zeitlich und räumlich kommunizieren, muss noch genauer untersucht werden. Die erreichten therapeutischen Fortschritte in der S1P-basierten Pharmakologie (s. Abschnitt 1.1.5.) nicht nur bei immunvermittelten Enzephalomyelopathien wie der MS lassen auch weiterhin einen direkten Nutzen dieser Forschung für die klinische Medizin erhoffen.

## 5 Zusammenfassung

In Abschnitt 1 wurden Fragestellungen formuliert, die diese Arbeit zu beantworten versucht. Auf der Grundlage der experimentellen Resultate und Analysen kann geschlussfolgert werden:

1. Extrazellulär appliziertes S1P induziert in nanomolaren Konzentrationen in RAW-Makrophagen eine ATP-Sekretion.
2. Bei gleichen S1P-Konzentrationen wird in RAW-Makrophagen ein auswärtsgerichteter Anionenstrom aktiviert, dessen elektrophysiologische und pharmakologische Charakteristika auf VSOR-Kanal-vermittelte Ströme hinweisen.
3. Für die Aktivierung dieses Anionenstromes ist eine Signalkaskade verantwortlich, die den S1PR1, G-Proteine sowie das Aktinzytoskelett einschließt.
4. Die S1P- sowie die hypoosmolaritäts-induzierte ATP-Sekretion sind pharmakologisch in gleicher Weise beeinflussbar. Dieses pharmakologische Profil deckt sich mit der pharmakologischen Beeinflussbarkeit von S1P- und hypoosmolaritäts-aktivierten Strömen. Das pharmakologische Profil ist typisch für VSOR-Kanäle. Daraus wird geschlussfolgert, dass die S1P-induzierte ATP-Sekretion durch VSOR-Kanäle vermittelt wird.

Abbildung 4.2. zeigt eine bildliche Veranschaulichung der oben getroffenen Aussagen.



**Abbildung 4.2: S1P-induzierte ATP-Sekretion über VSOR-Kanäle in RAW-Makrophagen.** Die blauen Linien repräsentieren das intrazelluläre Aktinzytoskelett. VRAC –volume-regulated anion channel, eine häufig verwendete Bezeichnung für VSOR-Kanäle in der englischsprachigen Literatur.

Ausgehend von den bisherigen Erkenntnissen und Analysen ergeben sich dabei auch weitere Vertiefungsmöglichkeiten für Experimente:

1. Die jüngst gewonnenen, neuen molekulargenetischen Erkenntnisse über volumenabhängige Anionenkanäle eröffnen neue molekularbiologische Ansätze zur besseren Identifizierung und Abgrenzung volumenabhängiger Ströme in Ergänzung zu bisherigen unspezifischen pharmakologischen Hemmstoffen.
2. Eine tiefere Analyse der zur Kanalaktivierung führenden Signalkaskade, z.B. Rho- und Phosphoinositid-abhängige Wege, ist zum besseren Verständnis der Kanalregulation notwendig.
3. Die genaue Aufklärung der mechanistischen Prinzipien der Kanalaktivierung in Verbindung mit dem Zytoskelett ist wünschenswert. Daraus können sich auch neue Erkenntnisse in Bezug auf die Volumenregulation von Säugetierzellen ergeben.
4. Eine membrannahe ATP-Konzentrationsbestimmung und die Untersuchung, ob und welche Purinorezeptoren auf der Oberfläche durch ATP bzw. seine Abbauprodukte nach einer ATP-Sekretion aktiviert werden, ermöglicht die Untersuchung der physiologischen Funktion der ATP-Sekretion.
5. Eine Analyse typischer physiologischer Tätigkeiten von Makrophagen wie Zellmigration, Phagozytose oder Zytokinproduktion in Verbindung mit den bisherigen Ergebnissen kann physiologisch relevante Funktionen der S1P-induzierten ATP-Sekretion klären.
6. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Zelltypen, auch humane Zelllinien, erfordert die Durchführung der Experimente an weiteren Zelllinien.
7. Die Untersuchung der Bedeutung der S1P-abhängigen ATP-Sekretion unter pathophysiologischen Bedingungen (Hypoxie, Entzündung, Sepsis) ist für die klinische Forschung bedeutsam.

# Literaturverzeichnis

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32:19-29.

Arnon TI, Xu Y, Lo C, Pham T, An J, Coughlin S, Dorn GW, Cyster JG (2011) GRK2-dependent S1PR1 desensitization is required for lymphocytes to overcome their attraction to blood. *Science* 333:1898-1903.

Bi Y, Li J, Ji B, Kang N, Yang L, Simonetto DA, Kwon JH, Kamath M, Cao S, Shah V (2014) Sphingosine-1-phosphate mediates a reciprocal signaling pathway between stellate cells and cancer cells that promotes pancreatic cancer growth. *Am J Pathol* 184:2791-2802.

Bork K, Hoffmann M, Horstkorte R (2013) ATP interferes with neural cell adhesion molecule-induced neurite outgrowth. *NeuroReport* 24:616-619.

Bretschneider F, Markwardt F (1999) Drug-dependent ion channel gating by application of concentration jumps using U-tube technique. *Methods Enzymol* 294:180-189.

Burnstock G (2006) Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 147:S172-S181.

Burnstock G (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7:575-590.

Chi H (2011) Sphingosine-1-phosphate and immune regulation: trafficking and beyond. *Trends Pharmacol Sci* 32:16-24.

Corriden R, Insel PA (2010) Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci Signal* 3:re1.

Costa-Junior HM, Marques-da-Silva C, Vieira FS, Moncao-Ribeiro LC, Coutinho-Silva R (2011) Lipid metabolism modulation by the P2X7 receptor in the immune system and during the course of infection: new insights into the old view. *Purinergic Signal* 7:381-392.

Cramer LP (2010) Forming the cell rear first: breaking cell symmetry to trigger directed cell migration. *Nat Cell Biol* 12:628-632.

Cyster JG, Schwab SR (2012) Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 30:69-94.

Di Virgilio F (2007a) Liaisons dangereuses: P2X<sub>7</sub> and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* 28:465-472.

Di Virgilio F (2007b) Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signal* 3:1-3.

Dutta AK, Sabirov RZ, Uramoto H, Okada Y (2004) Role of ATP-conductive anion channel in ATP release from neonatal rat cardiomyocytes in ischaemic or hypoxic conditions. *J Physiol (Lond)* 559:799-812.

- Eckstein F, Cassel D, Levkovitz H, Lowe M, Selinger Z (1979) Guanosine 5'-O-(2-thiodiphosphate). An inhibitor of adenylate cyclase stimulation by guanine nucleotides and fluoride ions. *J Biol Chem* 254:9829-9834.
- Eskandari S, Zampighi GA, Leung DW, Wright EM, Loo DDF (2002) Inhibition of gap junction hemichannels by chloride channel blockers. *J Membr Biol* 185:93-102.
- Espelt MV, de Tezanos PF, Alvarez CL, Alberti GS, Incicco J, Denis MF, Davio C, Schwarzbaum PJ (2013) On the role of ATP release, ectoATPase activity, and extracellular ADP in the regulatory volume decrease of Huh-7 human hepatoma cells. *Am J Physiol* 304:C1013-C1026.
- Fairbairn IP, Stober CB, Kumararatne DS, Lammas DA (2001) ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X<sub>7</sub>-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *J Immunol* 167:3300-3307.
- Goetzl EJ, Liao JJ, Huang MC (2008) Regulation of the roles of sphingosine 1-phosphate and its type 1 G protein-coupled receptor in T cell immunity and autoimmunity. *Biochim Biophys Acta* 1781:503-507.
- Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5:953-964.
- Gulbins E, Li PL (2006) Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am J Physiol* 290:R11-R26.
- Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S (2006) Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1758:2016-2026.
- Haskew-Layton RE, Rudkouskaya A, Jin Y, Feustel PJ, Kimelberg HK, Mongin AA (2008) Two distinct modes of hypoosmotic medium-induced release of excitatory amino acids and taurine in the rat brain in vivo. *PLoS ONE* 3:e3543.
- Hazama A, Okada Y (1988) Ca<sup>2+</sup> sensitivity of volume-regulatory K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in cultured human epithelial cells. *J Physiol (Lond)* 402:687-702.
- Hersh CM, Hara-Cleaver C, Rudick RA, Cohen JA, Bermel RA, Ontaneda D (2014) Experience with fingolimod in clinical practice. *Int J Neurosci*
- Hille, B. (2001) *Ion channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Inc.: Sunderland, MA.
- Hisano Y, Nishi T, Kawahara A (2012) The functional roles of S1P in immunity. *J Biochem* 152:305-311.
- Hla T, Venkataraman K, Michaud J (2008) The vascular S1P gradient-Cellular sources and biological significance. *Biochim Biophys Acta* 1781:47-482.
- Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF (2009) Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 89:193-277.
- Hoffmann EK, Pedersen SF (2010) Cell volume homeostatic mechanisms: effectors and signaling pathways. *Acta Physiol (Oxf)* 202:465-485.

- Hughes J, Hatcher J, Chessell I (2007) The role of P2X<sub>7</sub> in pain and inflammation. *Purinergic Signal* 3:163-169.
- Hughes JE, Srinivasan S, Lynch KR, Proia RL, Ferdek P, Hedrick CC (2008) Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. *Circ Res* 102:950-958.
- Hwang TC, Sheppard DN (1999) Molecular pharmacology of the CFTR Cl<sup>-</sup> channel. *Trends Pharmacol Sci* 20:448-453.
- Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Witko-Sarsat V (2008) The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib Microbiol* 15:118-146.
- Kimelberg HK, MacVicar BA, Sontheimer H (2006) Anion channels in astrocytes: biophysics, pharmacology, and function. *Glia* 54:747-757.
- Klausen TK, Hougaard C, Hoffmann EK, Pedersen SF (2006) Cholesterol modulates the volume-regulated anion current in Ehrlich-Lettre ascites cells via effects on Rho and F-actin. *Am J Physiol* 291:C757-C771.
- Klawitter S, Hofmann LP, Pfeilschifter J, Huwiler A (2007) Extracellular nucleotides induce migration of renal mesangial cells by upregulating sphingosine kinase-1 expression and activity. *Br J Pharmacol* 150:271-280.
- Kronlage M, Song J, Sorokin L, Isfort K, Schwerdtle T, Leipziger J, Robaye B, Conley PB, Kim HC, Sargin S, Schon P, Schwab A, Hanley PJ (2010) Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci Signal* 3:ra55.
- Krump-Konvalinkova V, Chwalla I, Siess W (2008) FTY720 inhibits S1P-mediated endothelial healing: Relationship to S1P<sub>1</sub>-receptor surface expression. *Biochem Biophys Res Commun* 370:603-608.
- Kuehnelt MP, Reiss M, Anand PK, Treede I, Holzer D, Hoffmann E, Klapperstueck M, Steinberg TH, Markwardt F, Griffiths G (2009) Sphingosine-1-phosphate receptors stimulate macrophage plasma-membrane actin assembly via ADP release, ATP synthesis and P2X<sub>7</sub>R activation. *J Cell Sci* 122:505-512.
- Kunkel GT, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S (2013) Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 12:688-702.
- Kurbannazarova RS, Bessonova SV, Okada Y, Sabirov RZ (2011) Swelling-activated anion channels are essential for volume regulation of mouse thymocytes. *Int J Mol Sci* 12:9125-9137.
- Lazarowski ER (2012) Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal* 8:359-373.
- Leal Denis MF, Incicco JJ, Espelt MV, Verstraeten SV, Pignataro OP, Lazarowski ER, Schwarzbaum PJ (2013) Kinetics of extracellular ATP in mastoparan 7-activated human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1830:4692-4707.
- Ledderose C, Bao Y, Zhang J, Junger WG (2015) Novel method for real-time monitoring of ATP release reveals multiple phases of autocrine purinergic signalling during immune cell activation. *Acta Physiol (Oxf)* 213:334-345.



- Levitan I, Almonte C, Mollard P, Garber SS (1995) Modulation of a volume-regulated chloride current by F-actin. *J Membr Biol* 147:283-294.
- Liu HT, Akita T, Shimizu T, Sabirov RZ, Okada Y (2009) Bradykinin-induced astrocyte-neuron signalling: glutamate release is mediated by ROS-activated volume-sensitive outwardly rectifying anion channels. *J Physiol (Lond)* 587:2197-2209.
- Luheshi NM, Giles JA, Lopez-Castejon G, Brough D (2012) Sphingosine regulates the NLRP3-inflammasome and IL-1 $\beta$  release from macrophages. *Eur J Immunol* 42:716-725.
- Ma W, Hui H, Pelegrin P, Surprenant A (2009) Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian cells. *J Pharmacol Exp Ther* 328:409-418.
- Manolopoulos GV, Prenen J, Droogmans G, Nilius B (1997) Thrombin potentiates volume-activated chloride currents in pulmonary artery endothelial cells. *Pflügers Arch* 433:845-847.
- Mendelson K, Evans T, Hla T (2014) Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development* 141:5-9.
- Mills JW, Falsig PS, Walmod PS, Hoffmann EK (2000) Effect of cytochalasins on F-actin and morphology of Ehrlich ascites tumor cells. *Exp Cell Res* 261:209-219.
- Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL (2005) Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol* 25:11113-11121.
- Nayak D, Huo Y, Kwang WX, Pushparaj PN, Kumar SD, Ling EA, Dheen ST (2010) Sphingosine kinase 1 regulates the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide in activated microglia. *Neuroscience* 166:132-144.
- Niessen F, Schaffner F, Furlan-Freguia C, Pawlinski R, Bhattacharjee G, Chun J, Derian CK, Andrade-Gordon P, Rosen H, Ruf W (2008) Dendritic cell PAR1-S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. *Nature* 452:654-658.
- Nilius B, Voets T, Prenen J, Barth H, Aktories K, Kaibuchi K, Droogmans G, Eggermont J (1999) Role of rho and rho kinase in the activation of volume-regulated anion channels in bovine endothelial cells. *J Physiol (Lond)* 516:67-74.
- Noack J, Choi J, Richter K, Kopp-Schneider A, Regnier-Vigouroux A (2014) A sphingosine kinase inhibitor combined with temozolomide induces glioblastoma cell death through accumulation of dihydrosphingosine and dihydroceramide, endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Cell Death Dis* 5:e1425.
- Noble JE, Bailey MJ (2009) Quantitation of protein. *Methods Enzymol* 463:73-95.
- Okada Y (1997) Volume expansion-sensing outward rectifier Cl<sup>-</sup> channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol* 273:C755-C789.
- Okada Y (1998) Cell volume-sensitive chloride channels. *Contrib Nephrol* 123:21-33.
- Okada, Y. (2006) *Cell volume-sensitive chloride channels: Phenotypic properties and molecular identity*. Karger: Basel.
- Okada Y, Sato K, Numata T (2009) Pathophysiology and puzzles of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel. *J Physiol (Lond)* 587:2141-2149.

- Pedersen SF, Klausen TK, Nilius B (2015) The identification of VRAC (Volume Regulated Anion Channel): An amazing Odyssey. *Acta Physiol (Oxf)*
- Praetorius HA, Leipziger J (2009) ATP release from non-excitabile cells. *Purinergic Signal* 5:433-446.
- Prüfer N, Kleuser B, Giet MV (2014) The role of serum amyloid A and sphingosine-1-phosphate on HDL functionality. *Biol Chem*
- Qiu Z, Dubin AE, Mathur J, Tu B, Reddy K, Miraglia LJ, Reinhardt J, Orth AP, Patapoutian A (2014) SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell* 157:447-458.
- Ridley AJ (2001) Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114:2713-2722.
- Rivera J, Proia RL, Olivera A (2008) The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol* 8:753-763.
- Rosen H, Stevens RC, Hanson M, Roberts E, Oldstone MB (2013) Sphingosine-1-phosphate and its receptors: structure, signaling, and influence. *Annu Rev Biochem* 82:637-662.
- Sabirov RZ, Okada Y (2004) Wide nanoscopic pore of maxi-anion channel suits its function as an ATP-conductive pathway. *Biophys J* 87:1672-1685.
- Sabirov RZ, Okada Y (2005) ATP release via anion channels. *Purinergic Signal* 1:311-328.
- Sabirov RZ, Okada Y (2009) The maxi-anion channel: a classical channel playing novel roles through an unidentified molecular entity. *J Physiol Sci* 59:3-21.
- Sakaki H, Tsukimoto M, Harada H, Moriyama Y, Kojima S (2013) Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y11 receptor. *PLoS ONE* 8:e59778.
- Schlichter LC, Mertens T, Liu B (2011) Swelling activated Cl<sup>-</sup> channels in microglia: Biophysics, pharmacology and role in glutamate release. *Channels (Austin)* 5:
- Schubert R (1996) Multiple ligand-ion solutions: A guide for solution preparation and computer program understanding. *J Vasc Res* 33:86-98.
- Schwab A, Fabian A, Hanley PJ, Stock C (2012) Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiol Rev* 92:1865-1913.
- Schwarz, W. and Rettinger, J. (2004) *Foundations of electrophysiology*. Shaker Verlag: Aachen.
- Spiegel S, Milstien S (2011) The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol* 11:403-415.
- Sukocheva O, Wadham C (2014) Role of sphingolipids in oestrogen signalling in breast cancer cells: an update. *J Endocrinol* 220:R25-R35.
- Szücs G, Heinke S, Droogmans G, Nilius B (1996) Activation of the volume-sensitive chloride current in vascular endothelial cells requires a permissive intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. *Pflügers Arch* 431:467-469.

Takai E, Tsukimoto M, Harada H, Sawada K, Moriyama Y, Kojima S (2012) Autocrine regulation of TGF- $\beta$ 1-induced cell migration by exocytosis of ATP and activation of P2 receptors in human lung cancer cells. *J Cell Sci* 125:5051-5060.

Tani M, Ito M, Igarashi Y (2007) Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. *Cell Signal* 19:229-237.

Voets T, Manolopoulos V, Eggermont J, Ellory C, Droogmans G, Nilius B (1998) Regulation of a swelling-activated chloride current in bovine endothelium by protein tyrosine phosphorylation and G proteins. *J Physiol (Lond)* 506 ( Pt 2):341-352.

Voss FK, Ullrich F, Munch J, Lazarow K, Lutter D, Mah N, Andrade-Navarro MA, von Kries JP, Stauber T, Jentsch TJ (2014) Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science* 344:634-638.

Wei H, Mei YA, Sun JT, Zhou HQ, Zhang ZH (2003) Regulation of swelling-activated chloride channels in embryonic chick heart cells. *Cell Res* 13:21-28.

Weigert A, Weis N, Brüne B (2009) Regulation of macrophage function by sphingosine-1-phosphate. *Immunobiol* 214:748-760.

Wood KV, Lam YA, McElroy WD (1989) Introduction to beetle luciferases and their applications. *J Biolumin Chemilumin* 4:289-301.

<https://www.caymanchem.com/pdfs/62570.pdf> am 29.11.2014  
Product Information Sphingosine-1-phosphate

<https://www.caymanchem.com/pdfs/10010992.pdf> am 29.11.2014  
Product Information W123

<https://www.caymanchem.com/pdfs/10009458.pdf> am 29.11.2014:  
Product information JTE-013

Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie der Medizinischen  
Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. med. Michael Gekle)

**Thesen der Dissertation**

Induktion einer ATP-Sekretion über Volumen-sensitive Anionenkanäle  
durch Sphingosin-1-phosphat in RAW-Makrophagen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)  
für das Fachgebiet  
Medizin

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Philipp Burow

geboren am 14.04.1990 in Jena

1. Sphingosin-1-phosphat steuert die Funktion und Positionierung von Zellen des adaptiven und des angeborenen Immunsystems. In Makrophagen steuert es Zellüberleben, Migration und Zytokinproduktion.
  
2. Zur Untersuchung des Effektes von Sphingosin-1-phosphat auf Makrophagen ist die elektrophysiologische Ganzzellanalyse geeignet. Diese Methode wird durch die quantitative ATP-Bestimmung in der Extrazellulärflüssigkeit ergänzt.
  
3. Sphingosin-1-phosphat (S1P) und hypoosmolare Lösung führen in Maus-Makrophagen (RAW-Makrophagen) zu einer kontinuierlich ansteigenden Erhöhung der Membranleitfähigkeit mit moderater Auswärtsgleichrichtung.
  
4. Die durch hypoosmolare Lösung und S1P getriggerten Ströme werden durch Anionen getragen.
  
5. Die durch hypoomolare Lösung und S1P getriggerten Ströme reagieren in gleicher Weise auf Änderungen der intrazellulären Osmolarität.
  
6. Die durch hypoosmolare Lösung und S1P getriggerten Ströme sind pharmakologisch gleichartig beeinflussbar. Die beobachteten Ströme werden durch VSOR-Kanäle (Volumen-sensitive, auswärtsgleichrichtende Kanäle) getragen.
  
7. Die Aktivierung volumensensitiver Anionenströme durch S1P erfordert die Aktivierung des S1PR1 und der abhängigen G-Protein-gekoppelten Signalkaskade.

8. Die Aktivierung volumensensitiver Anionenströme durch S1P erfordert einen Umbau des Aktinzytoskeletts.
  
9. Hypoosmolare Lösung und S1P induzieren in Mausmakrophagen eine ATP-Sekretion.
  
10. Die durch hypoosmolare Lösung und durch S1P hervorgerufene ATP-Sekretion ist eine konduktive Sekretion über VSOR-Kanäle.
  
11. Die gewonnene Erkenntnisse zeigen eine Verbindung zwischen den Signalwegen bioaktiver Lipide und Purinnukleotiden. Dies erweitert den Wissensstand insbesondere im Gebiet akut und chronischer Entzündungsreaktionen.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Philipp Burow  
Anschrift: Bergstraße 4  
07774 Dornburg-Camburg  
Geburtsdatum und -ort: 14.04.1990 in Jena  
Familienstand: ledig

## Ausbildung

[1996 – 2000] Grundschule Rodatalschule Jena-Lobeda  
[2000 – 2004] Christliches Gymnasium Jena  
[2004 – 2008] Landesschule Pforta (Schulpforte)  
Abschluss: Abitur, Note 1,0  
[seit 2008] Studium der Humanmedizin an der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## Studium

[10/2008 – 09/2010] Vorklinischer Studienabschnitt  
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 1,5  
[10/2010 – 04/2014] Klinischer Studienabschnitt  
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 2  
[05/2014 – 04/2015] Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Halle (Saale)  
sowie an den Berufsgenossenschaftlichen Kliniken  
Bergmannstrost Halle (Saale)

## Veröffentlichungen

Burow P., Klapperstück M., Markwardt F.: „*Activation of ATP secretion via volume-regulated anion channels by sphingosine-1-phosphate in RAW macrophages.*“ Pflugers Arch 2014.

Burow P., Markwardt F.: „*When S1P meets ATP.*“ Channels (Austin) 2014; 8: 385-6.

## Besondere Tätigkeiten und Kenntnisse

[2010 – 2011]	Studentischer Tutor für den Neuroanatomischen Kurs am Institut für Anatomie und Zellbiologie Halle (Saale)
[2011 – 2013]	Studentischer Tutor für Biochemie am Institut für Physikalische Chemie Halle (Saale): Eigenständige Konzeption 90-minütiger, öffentlicher biochemischer Übungen
Sprachen	Englisch: Verhandlungssicher in Wort und Schrift; TOEFL-ibt [12/2012]: 106 von 120 Punkten  Spanisch: Grundkenntnisse in Wort und Schrift
Führerschein	Klasse B
Hobbys	Musik (Klavier)



# **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die hier vorliegende Arbeit von mir eigenständig konzipiert und verfasst wurde. Aus der Literatur übernommene Fakten und Schlussfolgerungen sind vollständig durch entsprechende Zitathinweise gekennzeichnet.

# Danksagung

Ich danke allen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben, sei es durch fachliche Hilfen oder ganz einfach durch die persönliche Unterstützung und Zusprache.

Dabei möchte ich ganz besonders danken

meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Markwardt, der mir dieses schöne und ergiebige Thema zur Verfügung gestellt hat, mich mit sehr viel Geduld in die Elektrophysiologie eingeführt hat und immer ansprechbar und erreichbar war, selbst am Wochenende,

Dr. Manuela Klapperstück für die großzügige Hilfe bei den Versuchsprotokollen, bei der Korrektur dieser Arbeit und ganz besonders für die schönen entspannenden Klavierabende,

Monika Schmidt für die unermüdliche Arbeit und aufbauende Unterstützung im Zelllabor,

PD Dr. Uwe Rückschloss für die freundliche Bereitstellung und Einführung in das Luminometer,

der AG Prof. Gekle für die nette Einführung in die Proteinbestimmung und die Bereitstellung des Plattenreaders,

Anja für den Schwarztee mit viel Zucker, wenn die Apparatur wieder einmal streikte,

meiner lieben Mutti für die seelische Unterstützung, für das leckere Essen und die Aufmunterungen, wenn es nicht weiter ging,

und nicht zuletzt meinen Großeltern für die geduldige und exakte Korrektur dieser Arbeit und das feste Vertrauen, dass diese Arbeit zu einem Abschluss kommt.