

**Modulation von  
calciumabhängigen Kaliumkanälen und Calciumkanälen  
durch Phospholipide  
in Mäusefibroblasten und  
glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jan Alexander Birringer  
aus St. Ingbert

Gießen, 2004

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. Harald Schmidt

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Florian Dreyer

Gutachter: Prof. Dr. Gottfried Nöll

Tag der Disputation: 17.03.2005

Meinen Eltern und meiner Verlobten Cordelia

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Wichtige Teile dieser Arbeit wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:

Repp H., Birringer J., Koschinski A. & Dreyer F. (2001) Activation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  current in mouse fibroblasts by sphingosine-1-phosphate involves the protein tyrosine kinase c-Src. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **363**, 295-301.

# Inhaltsverzeichnis

## Verzeichnis häufig benutzter Abkürzungen

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Lysophosphatidsäure (LPA) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P)	1
1.1.1	Biologische Funktionen von LPA und S1P	1
1.1.2	Struktur und Synthese von LPA und S1P	2
1.1.3	LPA- und S1P-vermittelte Signaltransduktionsprozesse	4
1.1.4	Modulation der zellulären Proliferation durch LPA und S1P	5
1.1.5	Bedeutung von LPA und S1P für das Blutgefäßsystem	6
1.2	Bedeutung von Ionenkanälen für die zelluläre Proliferation	7
1.3	Aufgabenstellung	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1	Zellkultur	10
2.1.1	Kultivierung der Zelllinien	10
2.1.2	Einfrieren und Auftauen der Zelllinien	12
2.1.3	Aufbereiten der Zellen für Patch-Clamp Experimente	12
2.2	Elektrophysiologische Messungen	16
2.2.1	Aufbau des Patch-Clamp Messstandes	16
2.2.2	Herstellung der Glas-Mikropipetten ("Patchpipetten")	18
2.2.3	Messkonfiguration der Patch-Clamp Technik	18
2.2.4	Badperfusion	19
2.2.5	Ionenlösungen	19
2.2.6	Korrekturverfahren für auftretende Liquid-Junction Potentiale	21

2.3	Substanzliste	21
2.3.1	Neonatales Kälberserum und fetales Kälberserum	21
2.3.2	LPA und S1P	22
2.3.3	Substanzen zur Blockade von Ionenkanälen	24
2.3.4	Pertussistoxin	26
2.4	Statistische Auswertung und Darstellung	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1	Experimente an NIH3T3- und an C3H10T1/2-Mäusefibroblasten	27
3.1.1	Aktivierung eines spannungsunabhängigen, $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen $\text{K}^+$ -Stroms durch S1P in NIH3T3-Mäusefibroblasten	27
3.1.2	Pharmakologisches Profil des durch S1P aktivierten $\text{K}^+$ -Stroms	30
3.1.3	$\text{K}^+$ -Stromaktivierung durch S1P in C3H10T1/2-Mäusefibroblasten	31
3.1.4	Bedeutung der Proteintyrosinkinase c-Src für die $\text{K}^+$ -Stromaktivierung durch S1P	32
3.1.5	Effekte von LPA auf C3H10T1/2-Zellen, die verschiedene Formen der Proteintyrosinkinase c-Src exprimieren	33
3.1.6	Effekte einer wiederholten Applikation von S1P und LPA an NIH3T3-Zellen	35
3.2	Experimente an glatten Muskelzellen der A7r5-Zelllinie	38
3.2.1	Elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung von spontanen Aktionspotentialen in A7r5-Zellen	38
3.2.2	Modulation des Aktionspotentials in A7r5-Zellen durch LPA und S1P	42
3.2.3	Elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung des Membranstroms von A7r5-Zellen	44
3.2.4	Blockade von $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen durch LPA	49
3.2.5	Beteiligung eines Pertussistoxin-sensitiven G-Proteins an der LPA-induzierten Blockade von $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in A7r5-Zellen	51
3.2.6	Blockade des von L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen getragenen $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms durch LPA in A7r5-Zellen	52

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>69</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## Verzeichnis häufig benutzter Abkürzungen

A7r5	vom Salk Institute, San Diego, aus glatten Muskelzellen der thorakalen Aorta von fetalen Ratten klonierte Zelllinie
C3H10T1/2	Mäusefibroblastenzelllinie
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
$[Ca^{2+}]_i$	freie intrazelluläre Calcium-Konzentration
ChTX	Charybdotoxin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium, Zellkultur-Nährlösung
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC <sub>50</sub>	halbmaximal aktivierende Konzentration
FAFBSA	fettsäurefreies bovines Serumalbumin
FKS	fetales Kälberserum
I	Amplitude des Whole-Cell Stroms
IbTX	Iberiotoxin
IC <sub>50</sub>	halbmaximal inhibitorische Konzentration
K <sub>D</sub>	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
LPA	Lysophosphatidsäure
MAP-Kinase	mitogen activated protein kinase, an der Wachstumskontrolle beteiligte Proteinkinase
MgTX	Margatoxin
NIH3T3	vom National Institute of Health, Bethesda, klonierte Mäusefibroblastenzelllinie
NKS	neonatales Kälberserum
PBS	phosphate buffered solution, Phosphat-gepufferte Elektrolytlösung
PTX	Pertussistoxin, aus <i>Bordetella pertussis</i> gewonnenes Enzym
Ras	monomeres GTP-bindendes Protein
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
Src	intrazelluläre Tyrosinkinase
TEA	Tetraethylammonium
TTX	Tetrodotoxin

# 1 Einleitung

## 1.1 Lysophosphatidsäure (LPA) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P)

### 1.1.1 Biologische Funktionen von LPA und S1P

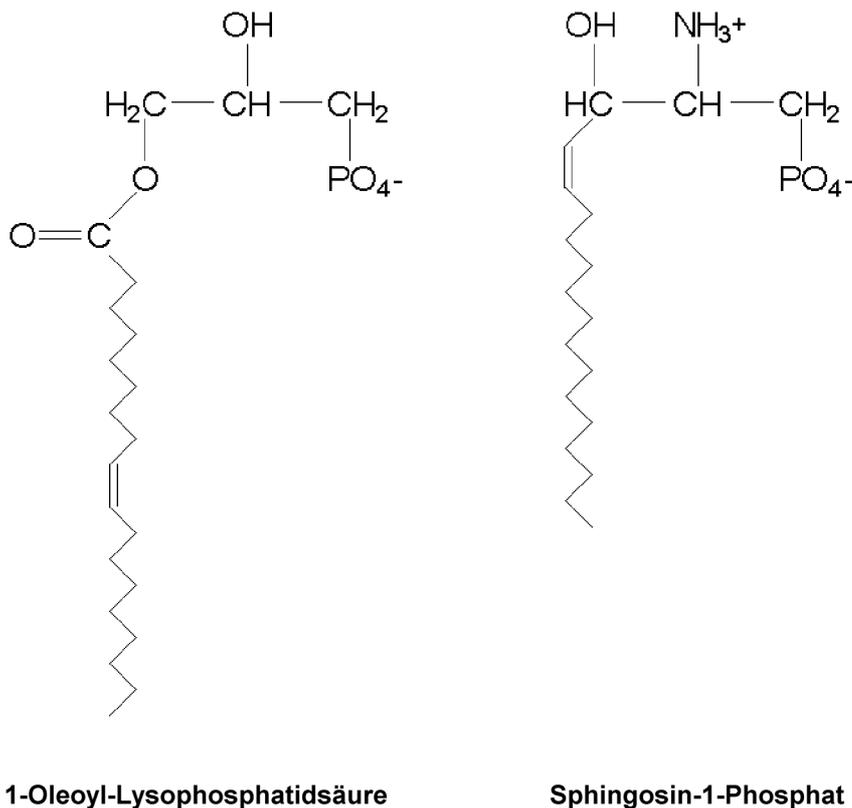
Die zelluläre Proliferation wird durch zahlreiche Substanzen initiiert und reguliert. Hierzu zählen neben den Polypeptid-Wachstumsfaktoren wie epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor = EGF), Plättchen- (platelet-derived growth factor = PDGF) und Fibroblastenwachstumsfaktor (fibroblast growth factor = FGF) auch verschiedene Substanzen aus der Stoffgruppe der Lysophospholipide. Die hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Zellproliferation am besten charakterisierten Vertreter dieser Stoffgruppe sind Lysophosphatidsäure (LPA) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P). LPA und S1P weisen zahlreiche Gemeinsamkeiten in ihren biologischen Eigenschaften und Funktionen auf: Neben ihrem Einfluss auf die zelluläre Proliferation (siehe Kapitel 1.1.4) führen LPA und S1P zu Veränderungen der Zelldifferenzierung, zu verlängertem Überleben und zur Unterdrückung apoptotischer Prozesse. LPA und S1P vermitteln Veränderungen des Zytoskeletts, wie sie bei Kontraktion, Sekretion, Adhäsion, Aggregation, Migration und Chemotaxis zu finden sind (Goetzl & An 1998; Moolenaar 1999; Spiegel & Milstien 2000; Tigyi 2001). Darüber hinaus beeinflussen LPA und S1P die Aktivität von Ionenkanälen: LPA aktiviert Cl<sup>-</sup>-Kanäle in verschiedenen Zelltypen (Durieux *et al.* 1992; Fernhout *et al.* 1992; Watsky 1995; Postma *et al.* 1996a), aktiviert einen spannungsunabhängigen, Ca<sup>2+</sup>-abhängigen K<sup>+</sup>-Kanal in Mäusefibroblasten (Repp *et al.* 1998) und inhibiert den TASK-1 K<sup>+</sup>-Kanal in *Xenopus laevis* Oozyten (Czirjak *et al.* 2001). S1P aktiviert Cl<sup>-</sup>-Kanäle (Durieux *et al.* 1993; Noh *et al.* 1998) und den mit dem Muscarin-Rezeptor gekoppelten K<sup>+</sup>-Kanal in Kardiomyozyten verschiedener Säugerspezies (Bunemann *et al.* 1995; van Koppen *et al.* 1996; Himmel *et al.* 2000), hemmt jedoch den Isoproterenol-induzierten L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Strom in Sinoatrialknotenzellen des Hasen (Guo *et al.* 1999).

Eine Vielzahl von Zelltypen wurde identifiziert, die auf LPA oder S1P reagieren (Moolenaar 1999; Graler & Goetzl 2002). Hierzu gehören Bindegewebszellen, glatte Muskelzellen, Keratinozyten, Endothelzellen, Thrombozyten, Nervenzellen, Gliazellen, Makrophagen, Lymphozyten und verschiedene Tumorzellen. Dieses Spektrum an Zelltypen und die verschiedenen LPA- und S1P-vermittelten zellulären Funktio-

nen zeigen die große Bedeutung von LPA und S1P im Rahmen der Embryonalentwicklung und der Physiologie und Pathophysiologie des Gefäß-, Nerven-, Reproduktions- und Immunsystems.

### 1.1.2 Struktur und Synthese von LPA und S1P

Abbildung 1 zeigt die strukturelle Ähnlichkeit von LPA und S1P. LPA besteht aus einem Glycerin-Rückgrat mit einer Phosphatgruppe an Position sn-3, einer Hydroxylgruppe entweder an sn-2 oder sn-1 und einer Fettsäurekette an Position sn-1 oder sn-2. Diese Fettsäurekette ist ein langkettiges, gesättigtes (C18:0, C16:0) oder



**Abbildung 1:** Chemische Struktur von 1-Oleoyl-Lysophosphatidsäure (1-Oleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphat, L- $\alpha$ -Lysophosphatidsäure) und Sphingosin-1-Phosphat. 1-Oleoyl-Lysophosphatidsäure ist diejenige Lysophosphatidsäure (LPA), die am weitesten häufigsten in Experimenten eingesetzt wurde und mit der auch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente durchgeführt wurden.

ein ungesättigtes (C18:1, C20:4) Fettsäuremolekül, das über eine Acyl- oder Alkylgruppe mit dem Glycerin-Rückgrat verbunden ist (Pages *et al.* 2001). Die meisten biologischen Effekte wurden mit der 1-Oleoyl-LPA untersucht, deshalb wird dieses Molekül häufig auch synonym als LPA bezeichnet. Bei der 1-Oleoyl-LPA ist die einfach ungesättigte Ölsäure mit dem Glycerin-Rückgrat an Position sn-1 verbunden. S1P besteht aus dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin, dessen freie OH-Gruppe mit Phosphorsäure verestert ist. Sphingosin ist ein biochemisch modifiziertes Kondensationsprodukt aus Palmitinsäure und Serin (Spiegel & Milstien 1995).

Zahlreiche Zelltypen können LPA und S1P synthetisieren. So bilden Balb/c 3T3-Fibroblasten LPA nach Stimulation mit dem Plättchenwachstumsfaktor PDGF (Fukami & Takenawa 1992), in Swiss 3T3-Fibroblasten führt die Stimulation mit PDGF oder fetalem Kälberserum zur Synthese von S1P (Olivera & Spiegel 1993). Eine LPA-Produktion wurde auch für neutrophile Granulozyten (Ito *et al.* 1996), ovarielle und zervikale Krebszellen (Shen *et al.* 1998) und für Adipozyten (Valet *et al.* 1998) gezeigt. Die Synthese von S1P wurde in Mastzellen der Ratte (Choi *et al.* 1996), HEK-293-Zellen (Meyer zu Heringdorf *et al.* 1998) und menschlichen Leukämie-Zellen der HL-60-Zelllinie (Alemany *et al.* 1999) nachgewiesen.

Die zelluläre Biosynthese von LPA und S1P ist über jeweils zwei verschiedene Wege möglich. Zum einen entstehen beide Stoffe als Zwischenprodukte während der Neusynthese von Lipiden, zum anderen werden sie in enzymatischen Reaktionen nach entsprechender Stimulation der Zellen aus Vorläufermolekülen freigesetzt. Glycerophospholipide sind Vorläufermoleküle von LPA, Sphingolipide von S1P. Die Freisetzung aus solchen Molekülen gilt dabei als wichtigster Syntheseweg für sezerniertes LPA und S1P (Goetzl & An 1998).

Im Serum werden LPA und S1P in nano- bis mikromolaren Konzentrationen gefunden und sind dort an Trägermoleküle, hauptsächlich an Albumin, gebunden (Thumser *et al.* 1994; Igarashi & Yatomi 1998). Dabei binden drei LPA-Moleküle an ein Albuminmolekül (Thumser *et al.* 1994). Der Serumspiegel dieser Phospholipide wird insbesondere von Thrombozyten beeinflusst. Im Rahmen der Thrombozytenaggregation kommt es nämlich in aktivierten Blutplättchen zur Produktion und Sekretion von LPA und S1P (Mauco *et al.* 1978; Gerrard & Robinson 1989; Igarashi & Yatomi 1998).

### 1.1.3 LPA- und S1P-vermittelte Signaltransduktionsprozesse

LPA und S1P vermitteln ihre biologischen Funktionen über Membranrezeptoren aus der *edg*-Genfamilie (*endothelial differentiation gene*). Edg-Rezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten, transmembranären heptahelikalen Rezeptoren (Lynch & Im 1999). LPA bindet dabei mit hoher Affinität an die Rezeptoren Edg-2, Edg-4 und Edg-7, die nach einer neueren Nomenklatur auch LPA<sub>1</sub> (= Edg-2), LPA<sub>2</sub> (= Edg-4) und LPA<sub>3</sub> (= Edg-7) genannt werden. S1P bindet an die Rezeptoren Edg-1, Edg-3, Edg-5, Edg-6 und Edg-8, seit neuestem auch S1P<sub>1</sub> (= Edg-1), S1P<sub>3</sub> (= Edg-3), S1P<sub>2</sub> (= Edg-5), S1P<sub>4</sub> (= Edg-6) und S1P<sub>5</sub> (= Edg-8) bezeichnet (Lynch & Im 1999; Pyne & Pyne 2000a; Fukushima & Chun 2001; Hla 2001; Chun *et al.* 2002). LPA- oder S1P-aktivierbare Edg-Rezeptoren sind an G-Proteine aus der Familie der G<sub>i/o</sub>-, G<sub>q</sub>- oder G<sub>12/13</sub>-Proteine gekoppelt, denen vielfältige Signalwege nachgeschaltet sind.

Über die  $\alpha$ -Untereinheit von G<sub>i</sub>-Proteinen wird zum Beispiel die LPA- oder S1P-induzierte Hemmung der Adenylatcyclase vermittelt, was zur Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Über die  $\beta\gamma$ -Untereinheit von G<sub>i</sub>-Proteinen wird ein Signalweg aktiviert, der für die proliferationsfördernde Eigenschaft von LPA und S1P bedeutend ist. In diesem Signalweg kommt es zur Aktivitätssteigerung einer Proteintyrosinkinase, der Aktivierung des kleinen monomeren G-Proteins Ras, zur Bindung von Ras an eine Proteinkinase aus der Raf-Familie und schließlich zur Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade. MAP (mitogen activated protein)-Kinasen sind ubiquitäre Serin/Threonin-Kinasen, die die Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung regulieren (Howe & Marshall 1993; Crespo *et al.* 1994; Gaits *et al.* 1996; Spiegel & Merrill 1996; van Koppen *et al.* 1996; Chuprun *et al.* 1997).

Über die Kopplung von LPA- oder S1P-aktivierbaren Edg-Rezeptoren mit G<sub>i</sub>- oder G<sub>q</sub>-Proteinen werden weitere Signalwege beeinflusst, die für die Regulation der Zellproliferation wichtig sind. In diese Signalwege ist eine Phospholipase C (PLC) eingeschaltet. PLC katalysiert die Bildung von Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>). DAG führt über die Aktivierung einer Proteinkinase C zur Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade. IP<sub>3</sub> vermittelt die Mobilisierung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern, was für Prozesse wie Genexpression, Sekretion, Zelldifferenzierung und Muskelzellkontraktion bedeutend ist (Ghosh *et al.* 1997; Goetzl & An 1998; Swarthout & Walling 2000; Berridge *et al.* 2003).

Über G<sub>12/13</sub>-Proteine werden Rho-abhängige Signalwege angestoßen, wozu die Aktivierung der Phospholipase D, der Phosphatidylinositol-3-Kinase und Veränderungen des Zytoskeletts wie Neuritenretraktion, Zellabrundung, Stressfaserbildung oder Zellaggregation gehören (Tigyi & Miledi 1992; Postma *et al.* 1996b; Fromm *et al.* 1997; Gohla *et al.* 1998; Hart *et al.* 1998; Lee *et al.* 1998; van Brocklyn *et al.* 1998). S1P vermittelt seine Wirkung jedoch nicht nur als Ligand von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Der bedeutendste Unterschied zu LPA ist die Funktion von S1P als intrazellulärer Second Messenger. In diesen Signalkaskaden wird S1P nach Aktivierung der Sphingosin-Kinase durch verschiedene Stimuli ATP-abhängig gebildet (Spiegel 1999; Spiegel & Milstien 2003).

#### **1.1.4 Modulation der zellulären Proliferation durch LPA und S1P**

Die proliferationsfördernde Wirkung von LPA und S1P erstreckt sich auf zahlreiche Zelltypen. LPA fördert unter anderem die zelluläre Proliferation von Bindegewebszellen, Keratinozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Blutgefäße (Moolenaar 1995). Verschiedene Befunde lassen vermuten, dass die wachstumsfördernden Eigenschaften von LPA für die Wundheilung und Geweberegeneration bedeutend sind (Tigyi 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass Brust- und Ovarkarzinomen in Anwesenheit von LPA proliferieren und der Malignitätsgrad von Brust- und Ovarkarzinomen mit der LPA-Konzentration im Plasma korreliert. LPA führt zu einer Verstärkung des Tumorzellwachstums und sogar zur Metastasenbildung (Swarthout & Walling 2000; Pages *et al.* 2001). LPA stimuliert das Wachstum von Mäuseembryonen vor der Implantation in den Uterus, was auf eine mögliche Bedeutung dieser Substanz in der Frühentwicklung der Säuger hinweist (Kobayashi *et al.* 1994). Ein wichtiger Schritt für die zelluläre Proliferation ist die Steigerung der DNA-Synthese, die LPA in den meisten Fällen über die Ras- und Raf-abhängige Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade vermittelt (siehe Kapitel 1.1.3).

S1P wirkt mitogen auf Swiss 3T3-Fibroblasten, in denen es zu einem deutlichen Anstieg der DNA-Synthese und der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt (Wu *et al.* 1995). Eine mitogene Wirkung wurde auch auf *edg-3*- und *edg-5*-transfizierte HTC4-Hepatomzellen gezeigt (An *et al.* 2000). In glatten Muskelzellen der Atemwege

entfaltet S1P alleine keine mitogene Wirkung, wohl aber im Zusammenspiel mit dem Plättchenwachstumsfaktor PDGF (Pyne & Pyne 1996; Rakhit *et al.* 1999).

S1P vermittelt seine proliferationsfördernde Wirkung nicht nur über die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren mit anschließender Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade (Wu *et al.* 1995; An *et al.* 2000), sondern auch als intrazellulärer Second Messenger (siehe auch Abschnitt 1.1.3). So geht die Stimulation der Zellproliferation durch PDGF und fetales Kälberserum mit einem Anstieg der intrazellulären S1P-Konzentration einher (Olivera & Spiegel 1993). Die Mikroinjektion von S1P in Swiss 3T3-Zellen führt zu einer gesteigerten DNA-Synthese (van Brocklyn *et al.* 1998). Kompetitive Inhibitoren der Sphingosin-Kinase verhindern die Bildung von intrazellulärem S1P und unterbrechen die PDGF- und Serum-induzierte Proliferation (Olivera & Spiegel 1993). S1P beeinflusst jedoch nicht nur die Zellteilung, sondern auch das zelluläre Überleben. So schützt S1P bestimmte Zelltypen vor dem programmierten Zelltod (Cuvillier *et al.* 1996), was sich im Falle von Tumorzellen verhängnisvoll auswirken kann (Maceyka *et al.* 2002).

### **1.1.5 Bedeutung von LPA und S1P für das Blutgefäßsystem**

Bereits Ende der 70er Jahre wurde die Wirkung von LPA auf das Blutgefäßsystem untersucht. Schon damals wurde die vasoaktive Wirkung von LPA erkannt, wobei die intravenöse Injektion von LPA Bluthochdruck bei Ratten und Meerschweinchen, jedoch Hypotonie bei Katzen und Hasen verursachte (Tokumura *et al.* 1978). Diese Ergebnisse wurden jedoch erst in jüngster Zeit wieder aufgegriffen, als in neueren Untersuchungen *in vivo* gezeigt wurde, dass LPA vasospastisch auf cerebrale Gefäße wirkt (Tigyi *et al.* 1995) und die Endothelin-1-vermittelte Vasokonstriktion verstärkt (Yakubu *et al.* 1997). Da LPA während der Blutgerinnung aus Thrombozyten freigesetzt wird (siehe Kapitel 1.1.2), ist LPA möglicherweise ein Faktor, der an der Entwicklung des posthämorrhagischen Vasospasmus beteiligt ist.

Erst kürzlich wurden die ersten Befunde erhoben, die eine Beeinflussung des vaskulären Tonus durch S1P deutlich machen: S1P führt zur Vasokonstriktion mesenterialer und intrarenaler Mikrogefäße der Ratte *in vitro* (Bischoff *et al.* 2000a) und reduziert *in vivo* den renalen und mesenterialen Blutfluss in Pertussistoxin-sensitiver Weise (Bischoff *et al.* 2000b). Die S1P-induzierte renovaskuläre Kontraktion erfor-

dert sehr wahrscheinlich den Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  über Nifedipin-sensitive L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Bischoff *et al.* 2001).

Es mehren sich die Hinweise, dass LPA und S1P in das pathophysiologische Geschehen der Atherosklerose-Entstehung involviert sind. So akkumuliert LPA in oxidierten low-density Lipoproteinen (LDL, Siess *et al.* 1999). Es ist bekannt, dass Oxidationen in der LDL-Fraktion deren Atherogenität deutlich verstärken (Berliner *et al.* 1995). Oxidiertes LDL führt darüber hinaus zur intrazellulären Synthese von S1P über die Aktivierung der Sphingosin-Kinase und zur Proliferation von glatten Gefäßmuskulzellen (Auge *et al.* 1999). LPA reichert sich in atherosklerotischen Plaques an, wo es als wichtiges Thrombozyten-aktivierendes Lipid wirkt. Die höchste LPA-Konzentration wurde im lipidreichen Kern dieser Plaques gefunden, der besonders thrombogen ist und zur Ruptur neigt (Siess *et al.* 1999).

LPA und S1P induzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selectin und VCAM-1 an der Oberfläche von Gefäßendothelzellen (Xia *et al.* 1998; Rizza *et al.* 1999). Für LPA wurde gezeigt, dass dies eine erhöhte Bindung von Monozyten oder neutrophilen Granulozyten an die Endothelzellen zur Folge hat (Rizza *et al.* 1999). Die LPA- oder S1P-induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen in der Zellmembran von Endothelzellen ist möglicherweise ein erster Schritt in der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion, die schließlich zu atherosklerotischen Läsionen führt.

Das Wachstum von glatten Muskelzellen der Gefäße ist ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese der Atherosklerose (Schwartz *et al.* 1986; Schwartz & Reidy 1987). Hierfür könnte die mitogene Wirkung von LPA und S1P auf glatte Gefäßmuskulzellen verantwortlich sein, die sich in einem Anstieg der DNA-Synthese und der zellulären Proliferation manifestiert (Tokumura *et al.* 1994; Gennero *et al.* 1999; Kluk & Hla 2001).

## **1.2 Bedeutung von Ionenkanälen für die zelluläre Proliferation**

Ionenkanäle sind in ein weites Spektrum zellulärer Prozesse eingebunden und spielen eine wichtige Rolle in der Erregbarkeit von Nerven- und Muskelzellen, in Sekretions- und Kontraktionsprozessen und in der Aufrechterhaltung des intrazellulären Ionenungleichgewichts. Es mehren sich die Hinweise darauf, dass Ionenkanäle wie

$K^+$ -,  $Ca^{2+}$ - oder  $Cl^-$ -Kanäle auch für die Modulation der zellulären Proliferation bedeutend sind: So führt die Hemmung des  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Stroms von T-Zellen durch Charybdotoxin zu einer Halbierung ihrer Proliferationsrate (Rader *et al.* 1996). In Hepatozyten steigern Öffner ATP-abhängiger  $K^+$ -Kanäle ( $K_{ATP}$ ) die zelluläre DNA-Synthese, während  $K_{ATP}$ -Blocker die DNA-Synthese verzögern (Malhi *et al.* 2000). Die Expression von L- oder T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanälen ändert sich in verschiedenen Zelltypen während der Proliferation und ist in glatten Muskelzellen der Rattenaorta abhängig von der Zellzyklusphase (Kuga *et al.* 1996). Durch eine Blockade von Volumen-sensitiven  $Cl^-$ -Kanälen wird die Proliferation von Endothelzellen oder T-Lymphozyten unterdrückt (Schumacher *et al.* 1995; Voets *et al.* 1995).

In unserer Arbeitsgruppe wurde mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik gezeigt, dass das proliferationsfördernde Lipid LPA in NIH3T3-Mäusefibroblasten einen spannungsunabhängigen,  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Kanal transient aktiviert (Repp *et al.* 1998). Einzelkanalmessungen ergaben, dass dieser  $K^+$ -Kanal in die Gruppe der  $K^+$ -Kanäle mittlerer Leitfähigkeit (etwa 20 - 50 pS) einzuordnen ist. Er wird durch die Skorpiontoxine Charybdotoxin, Margatoxin und Iberiotoxin, nicht aber durch das Gift der Honigbiene Apamin blockiert. Ein solches pharmakologisches Profil wurde bisher für keinen anderen  $K^+$ -Kanaltyp in der Literatur beschrieben.

Die Befunde in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Aktivierung dieses spannungsunabhängigen,  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Kanals durch LPA in NIH3T3-Zellen über ein Pertussistoxin-sensitives G-Protein, eine Proteintyrosinkinase und das kleine monomere G-Protein Ras vermittelt wird (Repp *et al.* 1998). Diese Signalkaskade enthält somit Elemente, die auch an der Signalkaskade der MAP-Kinase-Aktivierung durch LPA im Rahmen von zellulären Proliferationsprozessen beteiligt sind (siehe Kapitel 1.1.3).

### **1.3 Aufgabenstellung**

In der vorliegenden Arbeit war zunächst meine Aufgabe zu überprüfen, ob der durch LPA aktivierbare  $K^+$ -Kanaltyp in NIH3T3-Zellen auch durch S1P aktiviert werden kann. In der Tat zeigten die ersten Experimente dieser Arbeit, dass es nach Applikation von S1P in NIH3T3-Zellen zur Aktivierung eines  $K^+$ -Stroms kommt. Im Folgenden sollte der S1P-aktivierte  $K^+$ -Strom deshalb elektrophysiologisch und pharmako-

logisch näher charakterisiert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob S1P und LPA über eine gemeinsame Signalkette zur  $K^+$ -Stromaktivierung führen oder ob sie unabhängig voneinander wirken.

Ein wichtiges Element der Signalkaskade, die zur  $K^+$ -Stromaktivierung durch LPA in NIH3T3-Mäusefibroblasten führte, war eine bisher noch nicht näher identifizierte Proteintyrosinkinase (Repp *et al.* 1998). Die bisher identifizierten Komponenten dieser Signalkaskade sind auch an dem Signalweg der MAP-Kinase-Aktivierung durch LPA in verschiedenen Zellen beteiligt (siehe Kapitel 1.1.3). Da zumindest in COS-7- und in PC12-Zellen die nicht-rezeptorgekoppelte Proteintyrosinkinase c-Src in den Signalweg der MAP-Kinase-Aktivierung eingeschaltet ist (Luttrell *et al.* 1996; Luttrell *et al.* 1997) und da c-Src auch eine wichtige Rolle in bestimmten S1P-induzierten Signalereignissen spielt (Rakhit *et al.* 1999), sollte geklärt werden, ob c-Src in die Signalkaskaden involviert ist, die zu der jeweiligen  $K^+$ -Stromaktivierung durch LPA und S1P führen. Hierzu sollte die  $K^+$ -Stromaktivierung durch LPA und S1P in stabil transfizierten C3H10T1/2-Mäusefibroblasten untersucht werden, die intaktes Wildtyp c-Src (wt c-Src) überexprimieren. Darüber hinaus sollte ermittelt werden, welche Rolle die Proteintyrosinkinaseaktivität von c-Src und seine Lokalisation in der Plasmamembran über den Myristinsäurerest spielen. Dazu standen C3H10T1/2-Zellen zur Verfügung, die entweder Kinase-defektes c-Src (kin-def c-Src) oder eine nicht-myristillierbare Mutante von c-Src (non-myr c-Src) stabil exprimieren (Wilson *et al.* 1989; Wilson & Parsons 1990).

Es ist bekannt, dass LPA und S1P den Tonus von Blutgefäßen beeinflussen und die Proliferation von glatten Muskelzellen stimulieren (siehe Kapitel 1.1.4 und 1.1.5). Bekannt ist ebenfalls die Bedeutung von Ionenkanälen im Rahmen von Kontraktions- und Proliferationsprozessen. Bisher wurde allerdings an Gefäßmuskelzellen noch kein Ionenkanal elektrophysiologisch und pharmakologisch charakterisiert, dessen Aktivität durch LPA oder S1P moduliert wird. Es war nun meine Aufgabe zu überprüfen, ob LPA und S1P in glatten Muskelzellen der A7r5-Zelllinie, die der Aorta der fetalen Ratte entstammen (Kimes & Brandt 1976), zur Modulation solcher Ionenkanäle führen. Im positiven Falle sollte sich eine Charakterisierung der auf LPA und/oder S1P reagierenden Ionenkanäle anschließen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten **NIH3T3-Mäusefibroblastenzelllinie** handelt es sich um einen Subklon der NIH3T3-Zelllinie, die ursprünglich am National Institute of Health (NIH) in Bethesda, USA, durch Drittelung der Kultur mit Trypsin an jedem dritten Tag (3T3) aus einer Primärkultur embryonaler Mäusefibroblasten kloniert wurde (Jainchill *et al.* 1969). Kultiviert wurden die Zellen in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit 5 % neonatalem Kälberserum (NKS), 2 mM L-Glutamin, 64,8 mg/l Penicillin-G und 100 mg/l Streptomycin.

**C3H10T1/2-Mäusefibroblasten** und C3H10T1/2-Zellen, die den Wildtyp c-Src (**wt c-Src**) überexprimieren oder eine Kinase-defekte (**kin-def c-Src**) oder nicht-myristilierbare c-Src Mutante (**non-myr c-Src**) exprimieren, erhielt unser Labor von Dr. S. Parsons (University of Virginia, Charlottesville, USA). Zur Herstellung der Zellmutanten wt c-Src, kin-def c-Src und non-myr c-Src wurde das entsprechende c-Src Expressions-Plasmid des Moloney-murine-leukemia-Virus Lipofectin-vermittelt mit dem Vektor pSVneo fusioniert und damit die C3H10T1/2-Mäusefibroblasten transfiziert. Der Vektor pSVneo kodiert unter anderem für eine Antibiotikaresistenz, mit deren Hilfe die transfizierten Fibroblasten selektioniert werden können (Wilson *et al.* 1989; Wilson & Parsons 1990).

Die transfizierten Fibroblasten zeigten gegenüber den nicht-transfizierten Kontrollzellen eine 9- bis 13fach erhöhte relative Expressionsrate für das jeweilige c-Src-Protein. Die Expressionslevel des wt c-Src und der c-Src Mutanten wurden mit Hilfe eines Western-Immunoblot-Verfahrens nach der bei Wilson *et al.* (1989) beschriebenen Methode ermittelt.

C3H10T1/2-Mäusefibroblasten wurden in DMEM mit 5% NKS, 2 mM L-Glutamin, 64,8 mg/l Penicillin-G und 100 mg/l Streptomycin kultiviert. Alle transfizierten Zelltypen wurden mit Hilfe des Aminoglykosidantibiotikums Geneticin (G418; 400 mg/l) selektioniert.

Die **A7r5-Zelllinie** wurde am Salk Institute, Neurobiology Department, in San Diego, USA, aus glatten Muskelzellen der thorakalen Aorta von fetalen Ratten kloniert (Kimes & Brandt 1976). Die A7r5-Zellen weisen zahlreiche Charakteristika glatter Muskelzellen *in situ* und *in vitro* auf, besitzen aber einen unterentwickelten kontraktilen Apparat mit nur wenigen Verdichtungszone(n) (dense bodies) und wenigen dicken Filamenten (Kimes & Brandt 1976). Da sich diese Zellen nicht kontrahieren, sind sie für elektrophysiologische Untersuchungen gut geeignet.

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde eine bereits am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie etablierte A7r5-Zelllinie verwendet. Das Zellkulturmedium enthielt DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 64,8 mg/l Penicillin-G und 100 mg/l Streptomycin.

Alle Zelllinien wurden in einem Zellkultur-Inkubator (CO<sub>2</sub>-Inkubator 6220, Fa. Heraeus, Hanau) bei 37 °C und 95 % Luftfeuchte in einer Atmosphäre aus 94 % Luft und 6 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Wechseln des Zellkulturmediums (10 ml) erfolgte jeden zweiten Tag. Wenn der Boden der Kulturschale (Ø 94 mm, Greiner GmbH, Nürtingen) dicht mit Zellen bewachsen war, wurde zum Passagieren der Zellen der konfluente Zellrasen zunächst einmal mit 5 ml Phosphat-gepufferter Lösung (PBS, [in mM]: 120 NaCl; 3,4 KCl; 10,1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4) gewaschen. Es folgte ein Zwischenspülschritt mit einem Gemisch aus 4 ml PBS und 1 ml Trypsin-haltiger (0,05 % w/v) PBS-Lösung. Anschließend wurde der Zellrasen mit 5 ml Trypsin-haltiger (0,05 % w/v) PBS-Lösung behandelt. Diese wurde so lange auf den Zellen belassen, bis im Lichtmikroskop eine beginnende Ablösung der am Schalenboden haftenden Zellen beobachtet werden konnte. Dann wurde die Trypsin-PBS-Lösung abgesaugt. NIH3T3-Mäusefibroblasten, transfizierte und nicht-transfizierte Zellen der C3H10T1/2-Zelllinie konnten nun durch kräftiges Abspülen mit frischem Zellkulturmedium (10 ml) und wiederholtes Aufziehen in eine 10-ml-Glaspipette vereinzelt werden. Die A7r5-Zellen waren nach der Trypsin-Behandlung immer noch stark adhärent und wurden für 3 - 5 Minuten in den Zellkultur-Inkubator gestellt, wo sie sich bei 37 °C weiter abrundeten. Erst danach konnten die A7r5-Zellen wie für die Fibroblasten beschrieben vereinzelt werden. Zur weiteren Kultivierung der Zellen wurde von der entstandenen Zellsuspension ein bestimmter Teil entnommen und auf neue Petrischalen, in die frisches Zellkulturmedium vorgelegt worden war, in der gewünschten Verdünnung gleichmäßig ausplattiert. Die übliche Verdünnung betrug

hierbei circa 1:5 bis 1:3 für die verschiedenen Mäusefibroblastenlinien und 1:2 für die A7r5-Zellen; das nun in der neuen Petrischale vorliegende Gesamtvolumen der Zellsuspension betrug 10 ml. Durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturschale wurden die Zellen in der Suspension gut verteilt.

### **2.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien**

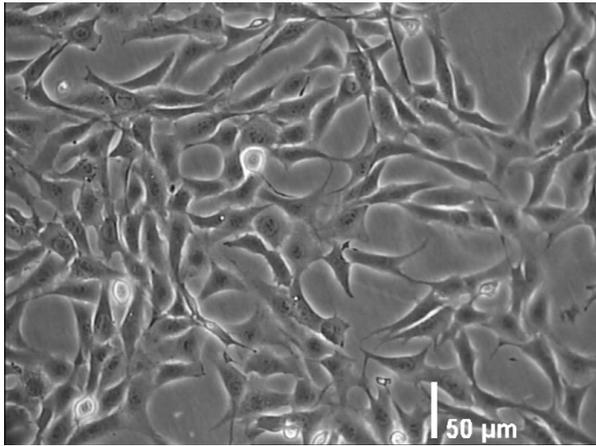
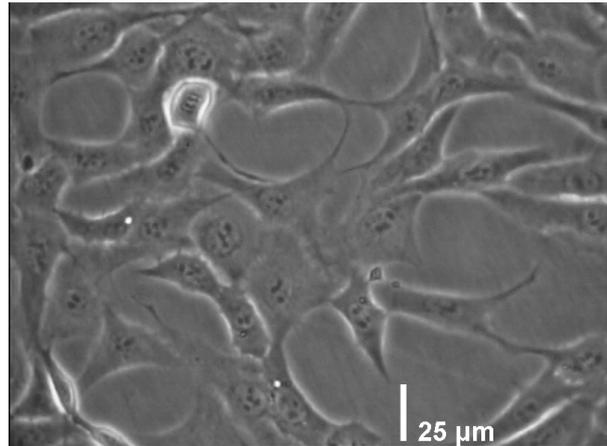
Da sich bei zunehmender Passagezahl die Eigenschaften der Zellen ändern können und um einen Totalverlust der Zellen durch mögliche Kontaminationen zu verhindern, wurden unmittelbar nach Erhalt und Anzucht der Zelllinien mehrere Aliquots eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Einfrieren und Auftauen der Zellen erfolgte nach einem in unserem Labor standardisierten Protokoll (Koschinski 2001). Um durch den Einfrier- und Auftauvorgang bedingte Artefakte auszuschließen, wurden die aufgetauten Zelllinien mindestens zweimal passagiert, bevor sie wieder für elektrophysiologische Experimente verwendet wurden.

### **2.1.3 Aufbereiten der Zellen für Patch-Clamp Experimente**

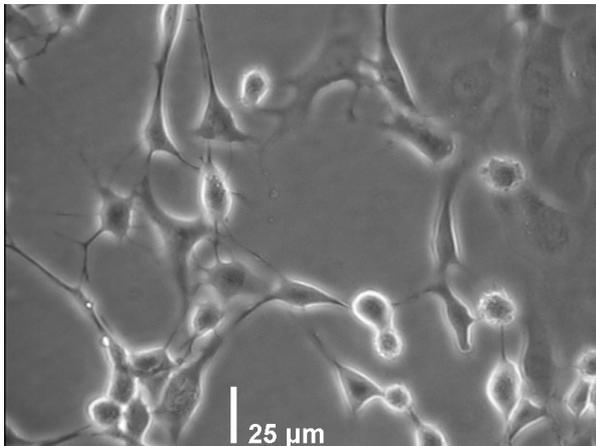
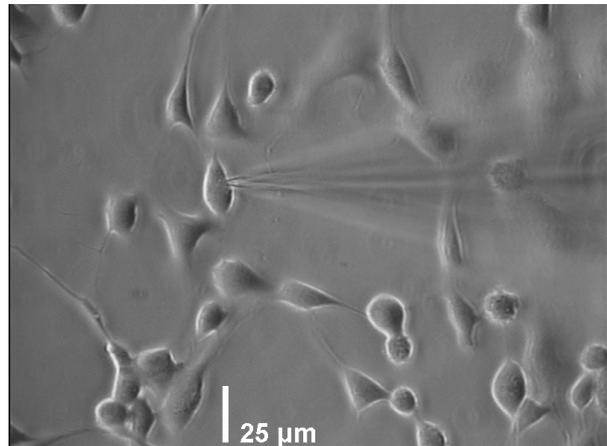
#### **a) NIH3T3-Mäusefibroblasten, nicht-transfizierte und transfizierte Zellen der C3H10T1/2-Zelllinie**

Die Zellen wurden 36 - 48 Stunden vor den elektrophysiologischen Messungen auf Petrischalen ( $\varnothing$  35 mm, Greiner GmbH, Nürtingen) in geringer Dichte von etwa  $2 \times 10^5$  Zellen pro Schale ausplattiert. Dadurch bildete sich zum Versuchszeitpunkt noch kein dichter Zellrasen. Abbildung 2 zeigt Originalaufnahmen von NIH3T3-Zellen in einer Dichte, wie sie zur Messung herangezogen wurden.

Da es schwierig ist, an relativ flach ausgebreiteten adhären Zellen die Patchpipette für eine stabile Ableitung zu positionieren und das Membranpotential der Zellen kontrolliert zu verändern, wurden die Mäusefibroblasten vor dem Versuch in eine abgerundete Form überführt. Dies wurde durch eine Behandlung mit Trypsin-PBS (0,05 % w/v) unter mikroskopischer Kontrolle erreicht. Die Trypsin-PBS-Lösung wurde solange auf den Zellen belassen, bis eine Retraktion der Zellen auftrat, die

**A****B**

**Abbildung 2:** Lichtmikroskopische Bilder von NIH3T3-Zellen, 200fach (**A**) bzw. 400fach (**B**) vergrößert. Die Aufnahmen entstanden direkt vor einem elektrophysiologischen Experiment (vor Trypsinierung) und zeigen die Bewuchsdichte von 35-mm-Petrischalen, wie sie üblicherweise für die Messungen verwendet wurden.

**A****B**

**Abbildung 3: A** Typisches Bild trypsinierter NIH3T3-Zellen (400fache Vergrößerung). In **B** ist zusätzlich die vom rechten Bildrand kommende Patchpipette zu sehen. Die Aufnahmen entstanden direkt vor bzw. während einer Whole-Cell Messung und zeigen beispielhaft Form, Größe und Lage der üblicherweise zu Patch-Clamp Messungen verwendeten NIH3T3-Zellen.

Zellen aber noch ausreichend am Petrischalenboden hafteten. Die weitere Wirkung des Trypsins mit der Gefahr des Ablösens der Zellen vom Schalenboden wurde durch mehrmaliges Waschen mit Extrazellulärlösung (siehe Kapitel 2.2.5) gestoppt.

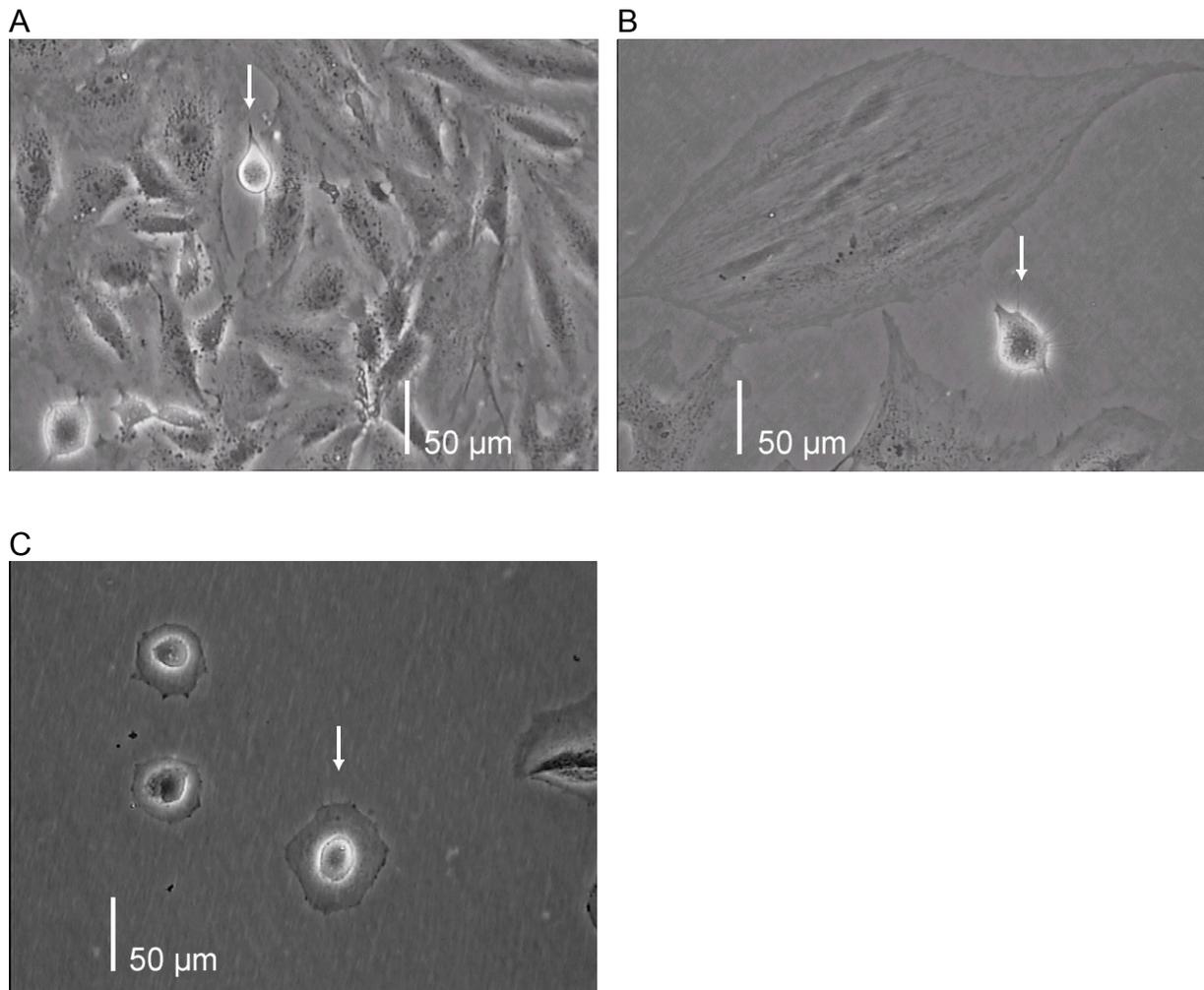
Nach 10 Minuten Wartezeit, in der die Zellen mit Extrazellulärlösung bedeckt waren, hatten die Fibroblasten eine sphärische Gestalt, erschienen transparent und doppeltbrechend. In diesem Zustand waren sie für die elektrophysiologischen Experimente gut geeignet. Die zur Messung herangezogenen Zellen waren typischerweise spindelförmig bis dreieckig-birnenförmig und hatten eine Länge und Breite von jeweils etwa 15 - 20  $\mu\text{m}$  ohne Berücksichtigung von Spikes oder dünnen Filopodien. Des Weiteren hatten die zu messenden Zellen über Filopodien Kontakte zu anderen Zellen, es wurde aber darauf geachtet, dass sich die Membranen der Zellkörper nicht berührten. Abbildung 3 zeigt beispielhaft Originalaufnahmen von trypsinisierten NIH3T3-Zellen direkt vor und während einer Patch-Clamp Messung.

### **b) A7r5-Zellen**

Die im Ergebnisteil unter 3.2.1 - 3.2.2 beschriebenen Experimente wurden an Zellen durchgeführt, die 36 - 72 Stunden vor den Messungen auf Petrischalen ( $\varnothing$  35 mm, Greiner GmbH, Nürtingen) umgesetzt wurden. Dies geschah so, dass die Zellen zum Versuchszeitpunkt in einem konfluenten Zellrasen lagen und ihre Membranen und Zellausläufer miteinander in Verbindung standen (Abb. 4 A). Die meisten Zellen waren jedoch so flach ausgebreitet, dass eine stabile und reproduzierbare Ableitung ihres Membranpotentials nicht möglich war. Eine stabile Ableitung gelang auch nicht, wenn die Zellen, wie für die Mäusefibroblasten bereits beschrieben, mit Trypsin-PBS (0,05 % w/v) vorbehandelt wurden: Durch die Wirkung des Trypsins genügend abgerundete Zellen hatten auch 30 Minuten nach der Behandlung noch eine sehr instabile Zellmembran, so dass es häufig bereits beim Kontakt mit der Patchpipette zur Ruptur kam. Daher wurden für die Messungen Zellen herangezogen, die sich in der Prophase oder Metaphase des Zellzyklus befanden, da diese Zellen bereits ohne jegliche Vorbehandlung abgerundet waren. Sie wurden lediglich vor den Messungen mehrfach mit Extrazellulärlösung gewaschen, um das Zellkulturmedium vollständig zu entfernen. Die Zelldurchmesser der untersuchten Zellen betragen 25 - 45  $\mu\text{m}$  ohne Berücksichtigung von Spikes und Filopodien. Eine typische Zelle ist in Abb. 4 A mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Für die in 3.2.3 - 3.2.5 beschriebenen Experimente wurden die Zellen 36 - 72 Stunden vor den Messungen in geringer Dichte ausgesät. Die Zellen hatten am Versuchstag über Filopodien Kontakte zu 2 - 4 anderen Zellen, die Membranen der Zellkörper berührten sich aber nicht. Zu den Messungen wurden untrypsinisierte, mit

Extrazellulärlösung gewaschene Zellen in der Pro- oder Metaphase der Mitose mit Zelldurchmessern zwischen 25 und 45  $\mu\text{m}$  herangezogen. Eine typische Zelle zeigt Abb. 4 B (Pfeil). Darüber ist zum Vergleich eine maximal ausgebreitete A7r5-Zelle zu sehen.



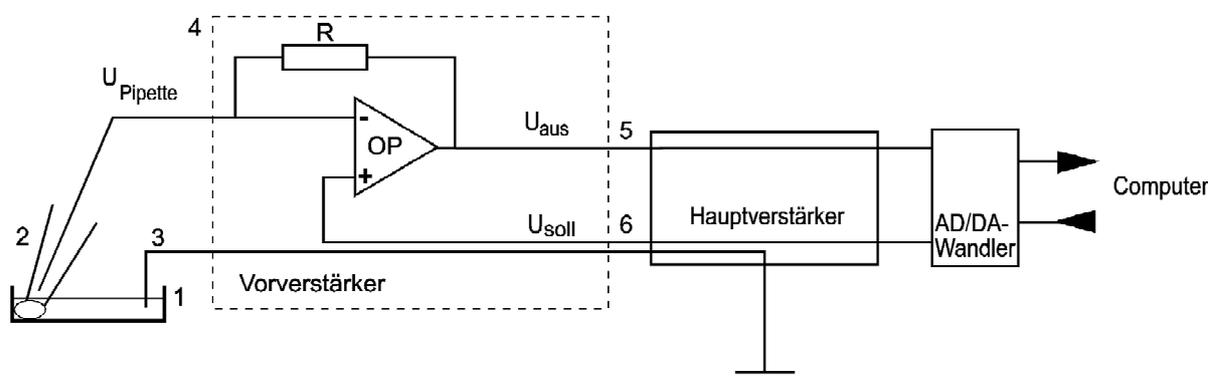
**Abbildung 4:** **A** Typisches lichtmikroskopisches Bild von 48 Stunden zuvor ausplattierten A7r5-Zellen (400fache Vergrößerung) im konfluenten Zellrasen. Die Zellen stehen über Zellausläufer und direkt über ihre Zellmembranen miteinander in Kontakt. **B** Die Zellen in diesem Bild (400fache Vergrößerung) wurden 48 Stunden zuvor ausgesät und haben über dünne Filopodien miteinander Verbindung, es gibt keinen direkten Zellmembrankontakt. Die mit einem Pfeil markierten Zellen in A und B sind abgerundet, befinden sich in der Prophase oder Metaphase des Zellzyklus. Solche Zellen wurden typischerweise für Messungen herangezogen. In **C** sind Zellen zu sehen (400fache Vergrößerung), die 3 Stunden vor Aufnahme des Bildes ausplattiert wurden. Die Zellen liegen isoliert und haben weder über ihre Membranen noch über Filopodien Kontakt miteinander. Die mit dem Pfeil gekennzeichnete Zelle wurde zu einer elektrophysiologischen Messung herangezogen.

Ergebnisse von Versuchen an Zellen, die ohne jeglichen Kontakt zu anderen Zellen waren, sind im Abschnitt 3.2.6 des Ergebnisteils dargestellt. Diese Zellen wurden in geringer Dichte 1 - 12 Stunden vor den Messungen auf Petrischalen ausplattiert. Ein großer Teil des Zellkörpers war noch nicht flach auf dem Schalenboden ausgebreitet, sondern war abgerundet und wölbte sich nach oben. Es wurden nur Zellen für die Messungen ausgewählt, die keine Filopodien ausgebildet hatten (Abb. 4 C). Die Auswahl der Zellen beschränkte sich nicht auf bestimmte Phasen des Zellzyklus. Vor den Messungen wurden die Zellen mehrfach mit Extrazellulärlösung gewaschen.

## 2.2 Elektrophysiologische Messungen

### 2.2.1 Aufbau des Patch-Clamp Messstandes

Der schematische Aufbau der Messanordnung zur Durchführung von Patch-Clamp Experimenten ist in der Abb. 5 dargestellt.



**Abbildung 5:** Schematischer Aufbau eines Patch-Clamp Messstandes. (1) Messkammer mit Badlösung, (2) Patch-Clamp Pipette mit Ableitelektrode und Zelle, (3) Referenzelektrode, (4) Vorverstärker, (5) Ausgangsspannung, die in Abhängigkeit vom hochohmigen Rückkopplungswiderstand R in einen Strom umgerechnet wird, (6) vom Computer vorgegebene Kommandospannung, die in das einzustellende Potential umgerechnet wird.

Als Messkammer wird eine Petrischale ( $\varnothing$  35 mm) verwendet, in der die Zellen, wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, vorbereitet worden sind. Die Petrischale kann direkt

in eine Halterung eines beweglichen Mikroskoptisches gebracht und so im Strahlengang eines Invertmikroskops (Axiovert 35, Carl Zeiss, Oberkochen) fixiert werden. Mit Hilfe von Peltier-Elementen, die sich im Mikroskoptisch befinden, und einem Temperatur-Regelgerät (Temperature Controller, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen) wird die Badlösung (Extrazellulärlösung) auf 21 °C temperiert. In die Messkammer, in der sich die Badlösung befindet, ragen die Referenzelektrode und die Patch-Clamp Pipette hinein. Die Patch-Clamp Pipette besteht aus einer mit Intrazellulärlösung gefüllten Borosilikat-Glaskapillare und der Ableitelektrode. Die Glaskapillare ist über den Pipettenhalter und einen Silikongummischlauch mit einer 50-ml-Kolbenspritze verbunden, was das Erzeugen von Über- und Unterdruck in der Patchpipette ermöglicht. Mit Hilfe eines elektromechanisch getriebenen Mikromanipulators (Märzhäuser, Wetzlar-Steindorf) wird die Glaskapillare unter mikroskopischer Kontrolle an die Zellen am Boden der Messkammer herangeführt. Die Aufnahme der Ionenströme erfolgt über die in den Elektrolytlösungen der Badkammer bzw. der Patchpipette befindlichen chlorierten Silberelektroden (Fa. Heraeus, Hanau). Die hier aufgenommenen, sehr kleinen Ströme (minimal einige  $10^{-15}$  Ampere) werden über den direkt mit den Elektroden in Verbindung stehenden externen Vorverstärker des Patch-Clamp Verstärkers zunächst vorverstärkt und dabei in Spannungssignale umgesetzt. Diese Signale gelangen zu dem Hauptgerät des Patch-Clamp Verstärkers EPC-9 (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht). Nach der Endverstärkung und Aufbereitung durch den EPC-9 werden die Signale mit einem in den EPC-9 integrierten 4pol-Bessel-Tiefpassfilter gefiltert, wobei als Ausschluss-Frequenz jeweils ein Drittel der Frequenz der Aufnahmezeitpunkte (sampling rate) gewählt wurde. Die Darstellung erfolgt dann über einen in den EPC-9 integrierten Analog-Digital-Wandler digitalisiert auf dem Bildschirm eines Macintosh Computers Quadra 840 AV (Apple Computer GmbH, Ismaning). Der Macintosh Computer mit seinem Patch-Clamp Datenaufnahme-Programm Pulse+PulseFit 7.63 (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht) ermöglicht sowohl eine kontinuierliche Datenaufnahme als auch die Aufnahme von Pulssequenzen in Form von Spannungssprüngen. Hierbei fungiert der Computer auch als programmierbarer Pulsgeber, der vorbereitete, abrufbare Befehlssequenzen zur Ausführung an den Patch-Clamp Verstärker EPC-9 sendet. Hier wiederum werden die entsprechenden Spannungen generiert, die dann wieder über den Vorverstärker und die chlorierten Silberelektroden an die Zellmembran gelangen und dort zum gewünschten Potential führen. Die Datenanalyse und -aufbereitung

erfolgt mit dem gleichen Rechner und dem Patch-Clamp Datenaufnahme-Programm Pulse+PulseFit 7.63 sowie dem Auswerteprogramm Igor (Wave Metrics Inc., Lake Oswego, USA).

Invertmikroskop, Messkammerhalterung und Mikromanipulator sind innerhalb eines Faradayschen Käfigs pneumatisch gedämpft gelagert, um elektrische und mechanische Störeffekte weitgehend auszuschließen.

### **2.2.2 Herstellung der Glas-Mikropipetten ("Patchpipetten")**

Die als Patchpipetten bezeichneten Glas-Mikropipetten werden in einem mehrstufigen Prozess mit einem Horizontal-Puller (Flaming-Brown Puller P-97, Sutter Instrument Co., Novato CA, USA) aus Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,87 mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld) gezogen. Danach wird die Spitze der Patchpipette unter mikroskopischer Kontrolle durch Heranführen an ein Glühfilament aus Wolframdraht (CPZ101 Pipette Forge, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen) feuerpoliert.

### **2.2.3 Messkonfigurationen der Patch-Clamp Technik**

Die Durchführung einer Patch-Clamp Messung und die klassischen Messkonfigurationen sind ausführlich bei Hamill *et al.* (1981) beschrieben. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden die Whole-Cell und die Cell-Attached Ableitungskonfiguration verwendet.

Die Whole-Cell Konfiguration ermöglicht im Stromklemmen-Modus die Bestimmung des Membranpotentials und im Spannungsklemmen-Modus die Messung von Ionenströmen über die Membran der gesamten Zelle. In der Whole-Cell Ableitung kann die Zusammensetzung der Intrazellulärlösung festgelegt werden. Allerdings können durch den Austausch des Zytoplasmas gegen die Intrazellulärlösung in der Pipette auch zytoplasmatische Elemente ausgewaschen werden, die die Funktion von Ionenkanälen beeinflussen. Dazu gehören zum Beispiel Second Messenger wie cAMP oder Proteinkinasen, die nicht mit der Zellmembran verbunden sind.

In der Cell-Attached Konfiguration bleibt das intrazelluläre Milieu der Zelle intakt. In dieser Konfiguration kann der Elementarstrom durch einzelne, im Membranfleck unter der Pipette befindliche Ionenkanäle verfolgt werden. Es besteht jedoch keine Möglichkeit, das Membranpotential der Zelle kontrolliert zu verändern.

#### **2.2.4 Badperfusion**

Um unter Patch-Clamp Messbedingungen die Zellen mit verschiedenen Lösungen umspülen zu können oder um Substanzen schnell applizieren und wieder auswaschen zu können, wurde eine Badperfuisionsanlage benutzt, die in unserem Labor von Dr. Koschinski im Rahmen seiner Promotionsarbeit entwickelt wurde (Koschinski 2001).

#### **2.2.5 Ionenlösungen**

Die für die Patch-Clamp Experimente verwendeten Ionenlösungen sind in Tabelle 1 aufgelistet. Bei den Experimenten wurden die Extrazellulärlösungen an der physiologischen Zellmembranaußenseite und die Intrazellulärlösungen üblicherweise an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran eingesetzt (Ausnahme: Cell-Attached Ableitungen). Die als physiologisch bezeichneten Lösungskombinationen sind durch eine hohe  $\text{Na}^+$ -Konzentration in der Extrazellulärlösung ( $E_1$ ,  $E_{1\text{Ba}}$ ) und durch eine ebenso hohe  $\text{K}^+$ -Konzentration in der Intrazellulärlösung ( $I_1$ ,  $\text{IBL}$ ) gekennzeichnet. Die Intrazellulärlösungen enthalten verschiedene freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Die in Bezug auf die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration schwache Pufferung der Intrazellulärlösung erlaubt lokal höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, die durch Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern oder durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die aus der Extrazellulärlösung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle einströmen, zustande kommen können. Im Gegensatz dazu werden bei einer "streng" gepufferten Intrazellulärlösung auch diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen komplexiert.

## Tabelle 1 : Ionenlösungen

Alle Konzentrationen sind - soweit nicht anders bezeichnet - in mM angegeben.

### A: Extrazellulärlösungen:

Name	NaCl	KCl	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	BaCl <sub>2</sub>	Glucose	HEPES
E <sub>1</sub>	140	3	2	2	-	15	10
E <sub>1Ba</sub>	140	3	2	-	2	15	10

Alle E<sub>1</sub>-Lösungen wurden mit einer NaOH-Lösung auf pH 7,35 eingestellt. Dies erhöhte die Na<sup>+</sup>-Konzentration auf 144 mM.

### B: Nominell Ca<sup>2+</sup>-freie Intrazellulärlösung:

Name	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>frei</sub>	K <sup>+</sup> -Glu- tamat	NaCl	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	BAPTA	HEPES
I <sub>1</sub> 10B	0	140	15	2	-	10	10

Diese Lösung wurde mit einer KOH-Lösung auf pH 7,30 eingestellt. Dies erhöhte die K<sup>+</sup>-Konzentration auf 145 mM.

### C: In Bezug auf [Ca<sup>2+</sup>]<sub>frei</sub> schwach gepufferte Intrazellulärlösungen:

Name	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>frei</sub>	K <sup>+</sup> -Glu- tamat	NaCl	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	BAPTA	HEPES
IBL0	0	140	20	2	-	0,1	10
IBL10n	10 nM	140	20	2	4,04µM	0,1	10
IBL100n	100 nM	140	20	2	29,69µM	0,1	10
IBL1µ	1 µM	140	20	2	81,77µM	0,1	10

Alle IBL-Lösungen wurden mit einer KOH-Lösung auf pH 7,30 eingestellt. Dies erhöhte die K<sup>+</sup>-Konzentration auf 144 mM.

E<sub>1</sub>: Extrazellulärlösung für physiologische Lösungskombination mit 2 mM Ca<sup>2+</sup>.

E<sub>1Ba</sub>: Extrazellulärlösung für physiologische Lösungskombination mit 2 mM Ba<sup>2+</sup> anstatt Ca<sup>2+</sup>.

I<sub>1</sub>: Intrazellulärlösung für physiologische Lösungskombination, IBL: Intrazellulärlösung für „physiologische“ Lösungskombination, mit BAPTA, Low buffered; nachgestellte Zahlen-Buchstaben-Kombinationen geben die nominelle freie Ca<sup>2+</sup>-Konzentration der Intrazellulärlösung an, bzw. bei I<sub>1</sub>10B die Konzentration von BAPTA in mM.

HEPES: 4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure.

BAPTA: 1,2-bis(2-amino-phenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetra-acetylsäure.

Die Osmolalität aller verwendeten Lösungen wurde mit einem Halbmikro-Osmometer (Knauer, Berlin) gemessen. Die Osmolalität der Extrazellulärlösungen lag zwischen 295 und 305 mosmol/kg, die der Intrazellulärlösungen zwischen 305 und 342 mosmol/kg. Um osmotische Zellschwellungen und dadurch ausgelöste Membranstromaktivierungen ("Stretch-activated-channels", (Ordway *et al.* 1995; Petrou *et al.* 1995)) weitestgehend zu vermeiden, wurde der Extrazellulärlösung gegebenenfalls Sorbitol zugesetzt, um sie auf Isoosmolalität zur Intrazellulärlösung zu bringen. Kontrollexperimente zeigten, dass die Anwesenheit von Sorbitol die Ergebnisse nicht beeinflusst.

### **2.2.6 Korrekturverfahren für auftretende Liquid-Junction-Potentiale**

Werden verschiedene Ionen in den Intra- und Extrazellulärlösungen verwendet, bildet sich durch die unterschiedlichen Ionenbeweglichkeiten an der Spitze der Patchpipette im Sinne eines Donnan-Potentials ein sogenanntes Liquid-Junction- oder Tip-Potential aus (Barry & Lynch 1991; Neher 1992). Das Liquid-Junction-Potential für die in dieser Arbeit verwendeten physiologischen Lösungskombinationen beträgt +10 mV. Alle in dieser Arbeit aufgeführten Messwerte sind hinsichtlich dieses Potentials korrigiert.

## **2.3 Substanzliste**

### **2.3.1 Neonatales Kälberserum und fetales Kälberserum**

Das verwendete neonatale Kälberserum (NKS) wurde von den Firmen PAN-Systems GmbH, Aidenbach (Charge F82/173) und PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich ("Viralex" Newborn Calf Serum, Lot No A03325-409), das fetale Kälberserum (FKS) von PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich ("Viralex" Fetal Calf Serum, Lot No A01428-291) bezogen. Die Seren wurden sofort nach Erhalt bei -20 °C gelagert und vor ihrer Verwendung bei 56 °C komplementinaktiviert.

### 2.3.2 LPA und S1P

1-Oleoyl-Lysophosphatidsäure-Natriumsalz (LPA) wurde von Sigma (Deisenhofen), D-erythro-Sphingosin-1-Phosphat (S1P) von Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden) bezogen. LPA und S1P sind nur sehr gering wasserlöslich und konnten daher nicht in Extrazellulärlösung alleine gelöst werden. Da diese Substanzen im Serum an Albumin gebunden sind (Thumser *et al.* 1994; Igarashi & Yatomi 1998), wurde versucht, LPA und S1P an fettsäurefreies bovines Serumalbumin (FAFBSA) zu koppeln, um sie so zumindest kolloidal in Lösung zu halten. Dies gelang für LPA ohne Zusatz organischer Lösungsvermittler, für das schlechter lösliche S1P waren dazu geringe Konzentrationen Dimethylsulfoxid (DMSO) notwendig. Solche LPA- und S1P-Lösungen besitzen den Vorteil, dass Verdünnungen eine definierte Zusammensetzung haben und die Substanzen zuverlässig an die Zellen herangebracht werden können. Nach folgenden Vorschriften wurden die Substanzen in Lösung gebracht:

#### a) LPA

In einem silikonisierten 1,5-ml-Eppendorfgefäß wurde eine 400  $\mu\text{M}$  LPA-Suspension als Stammlösung hergestellt. Dazu wurde jeweils so viel Festsubstanz eingewogen, dass nach Lösungsmittelzusatz das Gesamtvolumen des Eppendorfgefäßes nicht überschritten wurde. Als Lösungsmittel diente 37 °C warme Extrazellulärlösung ( $E_1$  oder  $E_{1Ba}$ , siehe Kapitel 2.2.5) mit 0,5 % (w/v) FAFBSA. Dabei wurde jeweils diejenige Extrazellulärlösung gewählt, die in späteren Experimenten als Badlösung dienen sollte. Nach Zugabe des Lösungsmittels zur LPA-Festsubstanz wurden „Substanzbrocken“ mit der Pipettenspitze zunächst mechanisch zerdrückt und durch wiederholtes Aufziehen mit der Pipette zu nicht mehr mit dem Auge erkennbarer Größe zerkleinert. Diese Suspension wurde für 20 - 30 Minuten bei 37 °C im Thermoschüttler geschüttelt, anschließend 5 Minuten bei ca. 37 °C in einem Ultraschallbad beschallt. Es ergab sich eine leicht trübe, homogene Suspension. Diese 400  $\mu\text{M}$  LPA-Lösung führt im Experiment bei der standardisierten Applikationsmenge von 50  $\mu\text{l}$  zu einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  LPA + 0,0125 % FAFBSA in der Badlösung (Badvolumen = 1950  $\mu\text{l}$ ).

Verdünnungen dieser LPA-Stammlösung wurden jeweils in einem 1+9-Verdünnungsschritt durchgeführt, bei dem 1 Volumenanteil LPA-Lösung (37 °C) in 9 Volumenanteile 0,5 % FAFBSA-haltiger Extrazellulärlösung (37 °C) einpipettiert wurde.

Dies bedeutet, dass bei den Experimenten nach Applikation einer LPA-Lösung unabhängig von der eingesetzten LPA-Konzentration immer eine Endkonzentration von 0,0125 % FAFBSA in der Badlösung vorhanden ist.

Es wurde immer in silikonisierten Eppendorfgläsern gearbeitet und vor jedem Pipettierschritt wurden die LPA-Lösungen mit der Pipette immer wieder gut durchgemischt.

## **b) S1P**

Zur Herstellung einer 40  $\mu\text{M}$  S1P-Stammlösung wurde zunächst S1P-Festsubstanz in ein nicht-silikonisiertes 1,5-ml-Eppendorfglas eingewogen. S1P wurde dann mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml in Methanol gelöst und im Thermoschüttler bei 65 °C geschüttelt, bis eine homogene S1P-Lösung erhalten wurde. Hierzu wurde der Deckel des Eppendorfglases mit einer Klammer verschlossen, um ein Öffnen und damit verbunden ein Verdampfen des Methanols zu verhindern. Nachdem sich S1P in Methanol vollständig gelöst hatte, wurden Aliquots dieser Lösung, die jeweils 100  $\mu\text{g}$  S1P enthielten, in nicht-silikonisierte Eppendorfgläser gegeben. Dort wurde Methanol durch vorsichtige Begasung mit Stickstoff eingedampft. Das zurückbleibende S1P wurde in 263,5  $\mu\text{l}$  Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. An der Wand des Eppendorfglases festhaftendes S1P wurde dazu mit DMSO mehrfach abgespült. Die Lösung wurde 15 Minuten bei 37 °C im Thermoschüttler geschüttelt und anschließend 5 Minuten bei ca. 37 °C im Ultraschallbad beschallt. In der Zwischenzeit wurden in einem Glasröhrchen 6324,5  $\mu\text{l}$  Extrazellulärlösung ( $E_1$ , siehe Kapitel 2.2.5) mit 0,5 % (w/v) FAFBSA auf 40 °C erwärmt. In diese Lösung wurde das in DMSO vollständig gelöste S1P rasch einpipettiert und gut durchgemischt. Es entstand eine fast wasserklare Lösung. Diese 40  $\mu\text{M}$  S1P-Lösung führt im Experiment bei der standardisierten Applikationsmenge von 50  $\mu\text{l}$  zu einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  S1P + 0,0125 % (w/v) FAFBSA + 0,1 % (v/v) DMSO in der Badlösung (Badvolumen = 1950  $\mu\text{l}$ ).

Verdünnungen dieser S1P-Stammlösung wurden jeweils in einem 1+9-Verdünnungsschritt durchgeführt, bei dem 1 Volumenanteil S1P-Lösung (37 °C) in 9 Volumenanteile 0,5 % FAFBSA-haltiger Extrazellulärlösung (37 °C) einpipettiert wurde. Dies bedeutet, dass bei den Experimenten nach Applikation einer S1P-Lösung unabhängig von der eingesetzten S1P-Konzentration immer eine Endkonzentration von 0,0125 % FAFBSA in der Badlösung vorhanden ist. Die Konzentration an DMSO nimmt entsprechend der Verdünnung ab.

Für wenige Experimente wurde eine 400 µM S1P-Stammlösung benötigt. Das beschriebene Protokoll wurde mit seinen Mengen und Volumina so angepasst, dass S1P in 0,5 % FAFBSA-haltiger Extrazellulärlösung mit 4 % (v/v) DMSO angesetzt wurde. Diese Stammlösung wurde nicht weiter verdünnt und ergab bei standardisierter Applikation von 50 µl eine Endkonzentration von 10 µM S1P + 0,0125 % (w/v) FAFBSA + 0,1 % (v/v) DMSO in der Badlösung (Badvolumen = 1950 µl).

Die LPA- oder S1P-Stammlösungen wurden in silikonisierte Eppendorfgläser aliquotiert (jeweils 500 µl), mit Stickstoff überschichtet, mit Parafilm versiegelt und bei -20 °C aufbewahrt. Bei dieser Aufbewahrung zeigte sich auch nach mehr als einem Jahr keine Reduktion der biologischen Wirksamkeit. Mehrfaches Auftauen und Einfrieren (bis 3 Zyklen) hatte darauf ebenfalls keinen Einfluss. Für die Messungen wurden die Aliquots im Thermoschüttler aufgetaut, bei 37 °C für 10 - 15 Minuten geschüttelt und anschließend kurz beschallt (5 Minuten). Die Lösungen wurden nur am jeweiligen Messtag benutzt, wobei vor der endgültigen Applikation noch mehrmals mit der Pipette resuspendiert wurde.

Kontrollversuche mit entsprechenden Konzentrationen von FAFBSA (0,0125 % w/v) bzw. FAFBSA + DMSO (0,1 % v/v) zeigten an den Mäusefibroblasten keine biologische Aktivität. Für die glatten Muskelzellen der A7r5-Zelllinie sind Versuche mit FAFBSA und DMSO im Ergebnisteil beschrieben (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.2.4).

### **2.3.3 Substanzen zur Blockade von Ionenkanälen**

Zur pharmakologischen Charakterisierung von Membranströmen und der Identifikation einzelner Ionenkanaltypen wurden folgende Substanzen eingesetzt:

#### **a) Peptidtoxine**

**Charybdotoxin** (ChTX) ist ein stark basisches Peptid von 37 Aminosäuren (Molekulargewicht (MG): 4296 Dalton, Gimenez-Gallego *et al.* 1988) aus dem Gift des Skorpions *Leiurus quinquestriatus hebraeus* und blockiert sowohl Ca<sup>2+</sup>-abhängige K<sup>+</sup>-Kanäle großer und mittlerer Leitfähigkeit als auch Subtypen spannungsabhängiger K<sup>+</sup>-Kanäle (Garcia *et al.* 1998; Repp *et al.* 1998).

**Margatoxin** (MgTX) ist ein aus 39 Aminosäuren bestehendes Peptid (MG: 4179 Dalton), das aus dem Gift des Skorpions *Centruroides margaritatus* isoliert wurde. Es blockiert verschiedene spannungsabhängige  $K^+$ -Kanäle und  $Ca^{2+}$ -abhängige  $K^+$ -Kanäle (Garcia-Calvo *et al.* 1993; Knaus *et al.* 1995; Repp *et al.* 1998)

**Iberiotoxin** (IbTX) besteht aus 37 Aminosäuren (MG: 4231 Dalton) und ist strukturell sehr eng verwandt mit ChTX und MgTX. Es wurde aus dem Gift des Skorpions *Buthus tamulus* isoliert und blockiert verschiedene  $Ca^{2+}$ -abhängige  $K^+$ -Kanäle (Garcia *et al.* 1998; Repp *et al.* 1998).

**Apamin**, das kleinste bekannte Peptidtoxin (18 Aminosäuren, MG: 2027 Dalton), stammt aus dem Gift der Honigbiene und blockiert selektiv  $Ca^{2+}$ -abhängige  $K^+$ -Kanäle kleiner Leitfähigkeit (Dreyer 1990).

**Calciseptin** besteht aus 60 Aminosäuren (MG: 7044 Dalton) und stammt aus dem Gift der schwarzen Mamba *Dendroaspis polylepis polylepis*. Es gilt als einziges natürlich vorkommendes Peptidtoxin, das spezifisch spannungsabhängige L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle in glatten Muskelzellen, Herzmuskelzellen und neuronalen Zellen blockiert (de Weille *et al.* 1991).

## **b) organische Ionenkanalblocker**

**Tetraethylammonium** (TEA), eine quaternäre Ammoniumverbindung, blockiert in mikro- bis millimolaren Konzentrationen eine Reihe verschiedener  $K^+$ -Kanaltypen (Hille 2001).

**Tetrodotoxin** (TTX), ein Alkaloid (MG: 319 Dalton) aus der Leber und den Gonaden des Kugelfisches, blockiert in Zellen verschiedener erregbarer Gewebe mit hoher Spezifität spannungsabhängige  $Na^+$ -Kanäle (Grant 2000).

**Nifedipin** blockiert bevorzugt L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle, kann aber auch in mikromolaren Konzentrationen den T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal blockieren (Adachi-Akahane & Nagao 2000).

**Verapamil** blockiert ebenfalls bevorzugt L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle, blockiert aber auch in mikromolaren Konzentrationen den T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal (Akaike *et al.* 1989; Adachi-Akahane & Nagao 2000) und  $Na^+$ -Kanäle (Pidoplichko & Verkhratskii 1989).

## **c) anorganische Ionenkanalblocker**

**Cadmiumionen** ( $Cd^{2+}$ ) blockieren - wie fast alle Schwermetallionen - in unterschiedlichen Konzentrationen verschiedene Ionenkanaltypen, vor allem aber  $Ca^{2+}$ -Kanäle

(Hagiwara & Takahashi 1967) und nichtselektive Kationenkanäle (van Driessche *et al.* 1993).

**Nickelionen** ( $\text{Ni}^{2+}$ ) blockieren in unterschiedlichen Konzentrationen verschiedene Ionenkanaltypen, insbesondere  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Zamponi *et al.* 1996), aber auch  $\text{K}^{+}$ -Kanäle (Song *et al.* 1999) und nichtselektive Kationenkanäle (Lotshaw & Sheehan 1999).

#### **2.3.4 Pertussistoxin**

Pertussistoxin (PTX, Sigma, Deisenhofen) ist ein ursprünglich aus *Bordetella pertussis* gewonnenes Enzym, das die ADP-Ribosylierung der  $\alpha$ -Untereinheiten von  $\text{G}_i$ -,  $\text{G}_o$ - und  $\text{G}_T$ -Proteinen katalysiert und diese damit außer Funktion setzt (Bokoch *et al.* 1983). Es wird zur Charakterisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und deren Signalwege eingesetzt.

### **2.4 Statistische Auswertung und Darstellung**

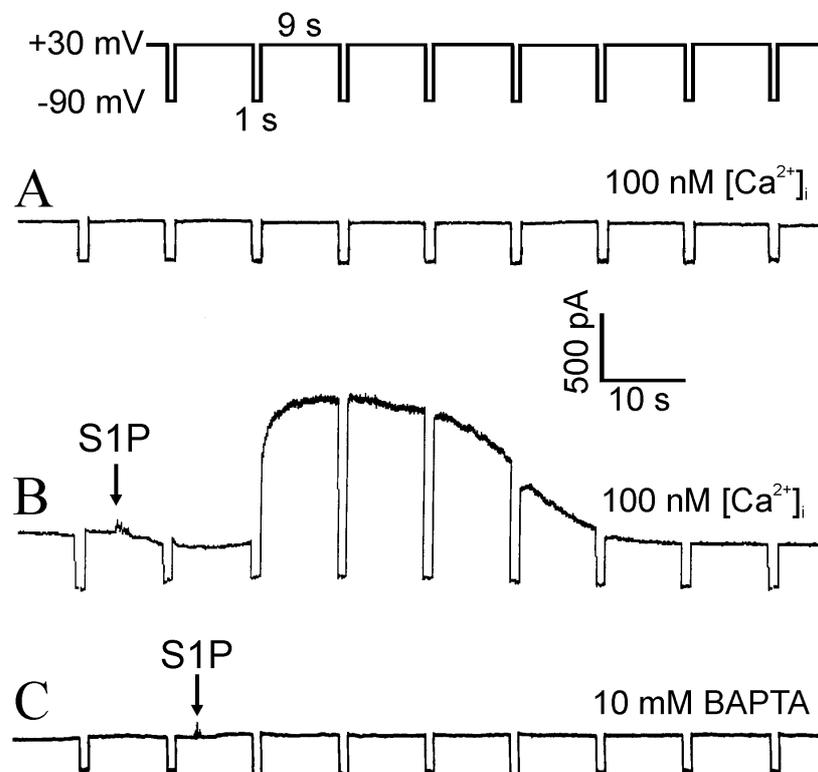
Die statistischen Auswertungen und die Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) und Microsoft Excel für Windows (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Sofern nicht anders gekennzeichnet, werden die Messwerte als Mittelwerte  $\pm$  SEM (standard error of the mean) angegeben. Für die jeweiligen statistischen Analysen wurde der Student's *t*-Test benutzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Experimente an NIH3T3- und an C3H10T1/2-Mäusefibroblasten

##### 3.1.1 Aktivierung eines spannungsunabhängigen, $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen $\text{K}^+$ -Stroms durch S1P in NIH3T3-Mäusefibroblasten

NIH3T3-Mäusefibroblasten haben ein Ruhemembranpotential von  $-24 \pm 1$  mV ( $n = 28$ ). Bei einem angelegten Haltepotential von +30 mV fließt in der Whole-Cell Ableitung ein konstanter Membranstrom mit einer Amplitude von  $267 \pm 19$  pA



**Abbildung 6:** **A** Typische Aufzeichnung des Membranstroms einer NIH3T3-Zelle, aufgenommen im Whole-Cell Ableitungsmodus. **B** Zeitverlauf des Membranstroms einer NIH3T3-Zelle nach der Applikation von S1P (1  $\mu\text{M}$ ) in die Badlösung zu dem mit dem Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkt. Die freie  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  betrug 100 nM, als Extrazellulärlösung wurde  $\text{E}_1$  (siehe Tabelle 1) verwendet. **C** Aufnahme wie in B, es wurde jedoch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Intrazellulärlösung benutzt, die 10 mM des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators BAPTA enthielt. Die Pulssequenz, mit der die Registrierungen A - C durchgeführt wurden, ist im oberen Teil des Bildes dargestellt. Das Membranpotential wurde abwechselnd jeweils für 9 s auf +30 mV und anschließend für 1 s auf -90 mV gehalten.

(n = 122). Ein Beispiel ist in der Abb. 6 A gezeigt. Dieser Strom ist spannungsunabhängig, d.h. es ist ein ohmscher Strom, dessen Amplitude linear vom Membranpotential abhängt (Abb. 7). Er ist unabhängig von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und nicht blockierbar durch die  $\text{K}^+$ -Kanalblocker Tetraethylammonium (10 mM) und Charybdotoxin (300 nM), was bereits in früheren Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde (Draheim *et al.* 1995).

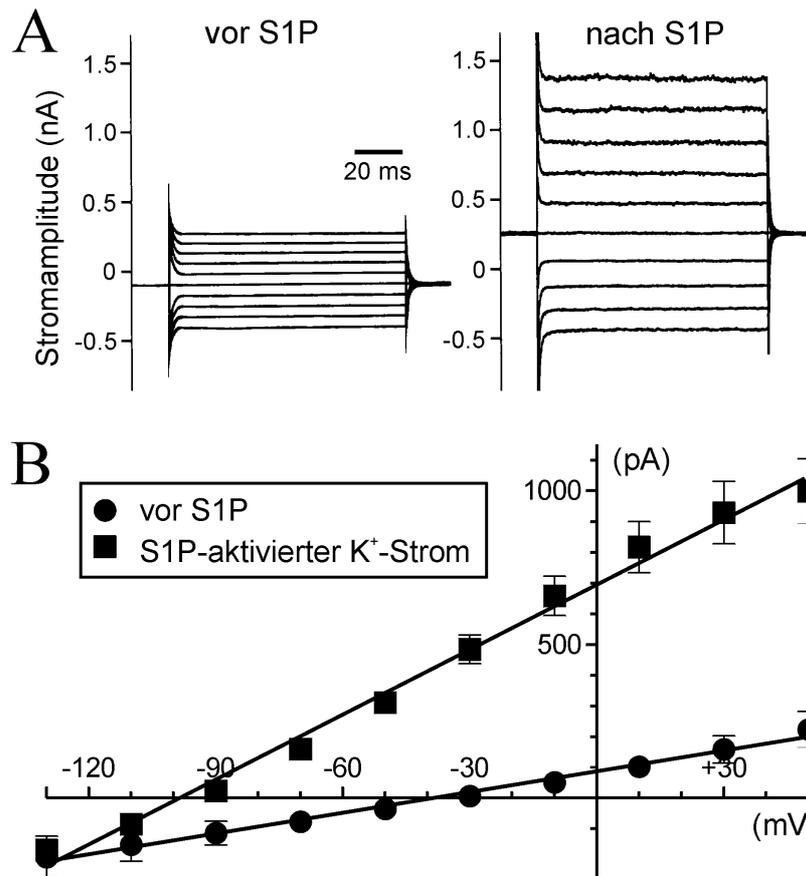
Wurde nun S1P (1  $\mu\text{M}$ ) in die Badlösung appliziert, so kam es bei 68 von 93 untersuchten Zellen innerhalb von 15 - 60 s zur Aktivierung eines zusätzlichen Membranstroms (Abb. 6 B), der eine maximale Amplitude von  $875 \pm 64$  pA bei einem angelegten Membran-Haltepotential von +30 mV erreichte; 25 Zellen antworteten jedoch nicht mit der Aktivierung eines Membranstroms. Innerhalb von 1 - 2 Minuten, nachdem der S1P-aktivierte Membranstrom sein Maximum erreicht hatte, inaktivierte er vollständig.

Wurde die freie intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 100 nM auf nominell 0 reduziert, kam es bei keiner Zelle (n = 5) nach der Applikation von S1P (1  $\mu\text{M}$ ) zur Aktivierung eines zusätzlichen Membranstroms (Abb. 6 C). Dies zeigt, dass der durch S1P aktivierte Membranstrom in NIH3T3-Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ist. Eine halbmaximale Amplitude des S1P-aktivierten Membranstroms wurde bei einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 11 nM beobachtet.

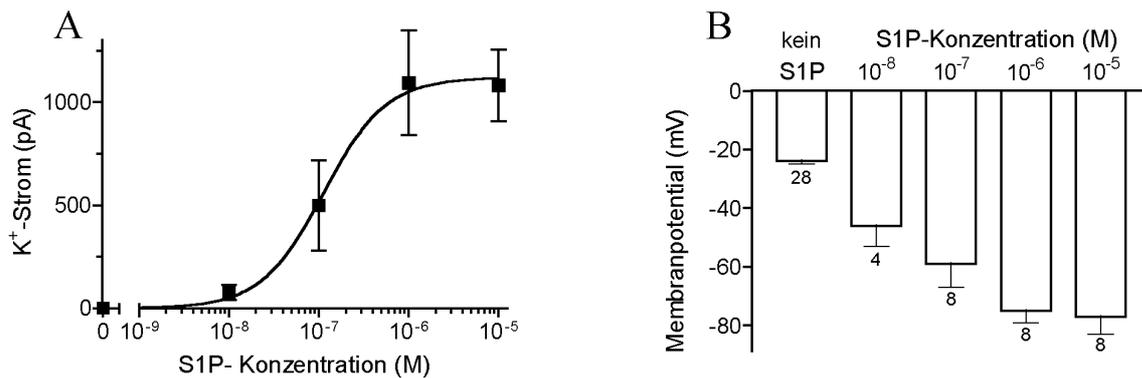
Abbildung 7 A zeigt Originalregistrierungen der Membranströme bei verschiedenen Potentialen vor und während des S1P-induzierten maximalen Membranstroms. Dieser durch S1P aktivierte Membranstrom zeigt ein ohmsches Verhalten, was sich in der linearen Strom-Spannungsbeziehung ausdrückt (Abb. 7 B). Das Umkehrpotential dieses Stroms beträgt  $-94 \pm 3$  mV (n = 8). Dieser Wert liegt sehr nahe am  $\text{K}^+$ -Umkehrpotential, das für die verwendete Lösungskombination -98 mV beträgt, und ist wesentlich negativer als das Umkehrpotential für Chlorid, das bei -46 mV liegt. Dies deutet darauf hin, dass S1P in NIH3T3-Zellen einen spannungsunabhängigen  $\text{K}^+$ -Strom aktiviert.

Abbildung 8 A zeigt, dass die Amplitude des aktivierten  $\text{K}^+$ -Stroms von der eingesetzten S1P-Konzentration abhängt. Ein halbmaximaler Effekt ( $\text{EC}_{50}$ -Wert) wurde bei einer S1P-Konzentration von  $113 \pm 20$  nM erreicht.

Die Aktivierung des  $K^+$ -Stroms bewirkt eine starke Hyperpolarisation des Membranpotentials, die ebenfalls abhängig ist von der eingesetzten S1P-Konzentration (Abb. 8 B). Bei einer S1P-Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  wird die Zellmembran auf  $-74 \pm 4 \text{ mV}$  ( $n = 8$ ) hyperpolarisiert. Eine solch starke Hyperpolarisation kann unter physiologischen Bedingungen nur durch einen  $K^+$ -Auswärtsstrom erreicht werden.



**Abbildung 7:** **A** Whole-Cell Membranstromregistrierungen einer NIH3T3-Zelle vor der Applikation von S1P ( $1 \mu\text{M}$ ) und während des S1P-induzierten maximalen Membranstroms. Ausgehend von einem Haltepotential von  $-50 \text{ mV}$  wurde das Membranpotential in  $20\text{-mV}$ -Schritten von  $-130$  bis  $+50 \text{ mV}$  verändert. Vor und nach den verschiedenen Spannungspulsen, die jeweils für  $100 \text{ ms}$  anlagen, wurde für jeweils  $20 \text{ ms}$  auf das Haltepotential zurückgeschaltet. **B** Strom-Spannungsbeziehungen des Membranstroms vor S1P-Applikation und während des S1P-induzierten maximalen  $K^+$ -Stroms. Die Membranstromamplituden wurden am Ende der  $100 \text{ ms}$  dauernden Spannungspulse, die in A beschrieben wurden, gemessen. Die  $K^+$ -Stromamplituden wurden durch Subtraktion der Membranstromamplituden vor der S1P-Applikation von den Membranstromamplituden während des S1P-induzierten maximalen Membranstroms erhalten. Die Datenpunkte mit den Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwerte  $\pm \text{SEM}$  ( $n = 8$ ). Die Ausgleichsgerade durch die Datenpunkte wurde durch Linearregression erhalten.



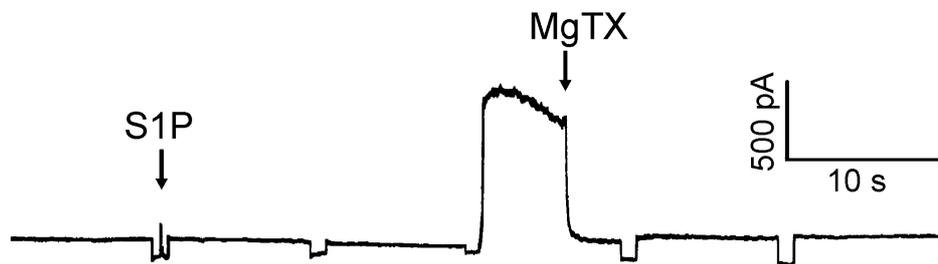
**Abbildung 8:** Abhängigkeit der K<sup>+</sup>-Stromamplitude (**A**) und des Membranpotentials (**B**) von der S1P-Konzentration. **A** Die K<sup>+</sup>-Stromamplituden wurden bestimmt, indem die gemessenen Membranstromamplituden vor der S1P-Applikation von den Membranstromamplituden während der maximalen Aktivierung nach S1P-Applikation subtrahiert wurden. Das Haltepotential betrug +30 mV. Die Zahl der untersuchten Zellen für die verschiedenen Konzentrationen ist in B angegeben. Jeder Datenpunkt mit den Fehlerbalken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM aus den Messungen mit den jeweiligen S1P-Konzentrationen. Die Kurve wurde den Daten angepasst mit Hilfe der Gleichung  $I = I_{\max} / [1 + (EC_{50}/c)^n]$ , wobei I die Amplitude des durch S1P aktivierten K<sup>+</sup>-Stroms ist,  $I_{\max}$  die maximale Amplitude des durch S1P aktivierten K<sup>+</sup>-Stroms und c die S1P-Konzentration. Es wurden ein Hill-Koeffizient von  $n = 1,2$  und ein  $EC_{50}$ -Wert von 113 nM ermittelt. **B** Die Säulen repräsentieren das mittlere Membranpotential  $\pm$  SEM, gemessen im Stromklemmen-Modus der Whole-Cell Ableitung vor (*kein S1P*) und nach S1P-Applikation zum Zeitpunkt der maximalen K<sup>+</sup>-Stromaktivierung. Die Zahl der untersuchten Zellen steht unter den Fehlerbalken. Die freie  $[Ca^{2+}]_i$  betrug 100 nM, Extrazellulärlösung war  $E_1$  (siehe Tabelle 1).

Insgesamt zeigen die bisher vorgestellten Daten, dass S1P konzentrationsabhängig in NIH3T3-Zellen einen spannungsunabhängigen,  $Ca^{2+}$ -abhängigen K<sup>+</sup>-Strom transient aktiviert.

### 3.1.2 Pharmakologisches Profil des durch S1P aktivierten K<sup>+</sup>-Stroms

Zur pharmakologischen Charakterisierung des durch S1P aktivierten K<sup>+</sup>-Stroms wurden der klassische K<sup>+</sup>-Kanalblocker Tetraethylammonium (TEA) und verschiedene Peptidtoxine eingesetzt. TEA hat bis zu einer Konzentration von 20 mM keinen Effekt auf den S1P-aktivierten K<sup>+</sup>-Strom. Dahingegen blockieren die Skorpiontoxine Margatoxin (300 nM, Abb. 9), Charybdotoxin (300 nM) und Iberiotoxin (1  $\mu$ M) den

K<sup>+</sup>-Strom vollständig. Apamin (1 μM), das Gift der Honigbiene, hatte keinen Effekt (n = 3 für jedes Toxin).



**Abbildung 9:** Blockade des S1P-aktivierten K<sup>+</sup>-Stroms durch 300 nM Margatoxin (MgTX). Die Applikationen von S1P und MgTX sind jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das Haltepotential betrug abwechselnd +30 mV für 9 s und -90 mV für 1 s (siehe Darstellung der Pulssequenz in Abb. 6). Die freie [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> betrug 100 nM, Extrazellulärlösung war E<sub>1</sub> (siehe Tabelle 1).

### 3.1.3 K<sup>+</sup>-Stromaktivierung durch S1P in C3H10T1/2-Mäusefibroblasten

Ein auffallender Befund war, dass 27 % der untersuchten NIH3T3-Mäusefibroblasten nicht mit einer K<sup>+</sup>-Stromaktivierung auf die Applikation von S1P (1 μM) antworteten. Um zu klären, ob dies eine spezifische Eigenschaft nur dieser Zelllinie sei, wurde der Effekt von S1P auf den Membranstrom einer weiteren Mäusefibroblastenlinie untersucht. In C3H10T1/2-Zellen führte S1P (1 μM) bei 2 von 15 Zellen ebenfalls nicht zu einer K<sup>+</sup>-Stromaktivierung. Dies zeigt, dass das partielle Ausbleiben einer K<sup>+</sup>-Stromaktivierung nach der Applikation von S1P nicht auf den Zelltyp NIH3T3 beschränkt ist. Bei einem Haltepotential von +30 mV betrug die mittlere Amplitude des S1P-aktivierten K<sup>+</sup>-Stroms in C3H10T1/2-Zellen  $554 \pm 82$  pA (n = 13, Abb. 10) im Vergleich zu  $875 \pm 64$  pA (n = 68), die in NIH3T3-Zellen gefunden wurden. Die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des S1P-aktivierten K<sup>+</sup>-Stroms in C3H10T1/2-Zellen sind identisch mit den Eigenschaften, die für den S1P-aktivierten K<sup>+</sup>-Strom in NIH3T3-Zellen beschrieben wurden.

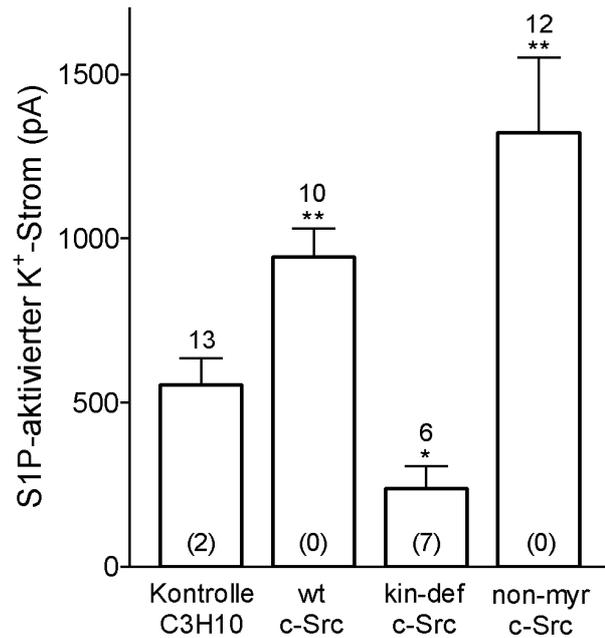
### 3.1.4 Bedeutung der Proteintyrosinkinase c-Src für die K<sup>+</sup>-Stromaktivierung durch S1P

Es ist bekannt, dass die nicht-rezeptorgekoppelte Proteintyrosinkinase c-Src in bestimmte S1P-aktivierbare Signalkaskaden eingeschaltet ist (Rakhit *et al.* 1999). Daher sollte die Frage beantwortet werden, welche Rolle c-Src bei der S1P-induzierten K<sup>+</sup>-Stromaktivierung spielt. Für diese Experimente standen uns mehrere, durch Mutationen veränderte C3H10T1/2-Mäusefibroblastenzelllinien zur Verfügung (siehe Kapitel 2.1.1).

Abbildung 10 zeigt, dass in C3H10T1/2-Zellen, die die normale (Wildtyp = wt) Form von c-Src überexprimieren, bei jeder der 10 untersuchten Zellen eine K<sup>+</sup>-Stromaktivierung nach Applikation von S1P (1 µM) gefunden wurde. Die Amplitude des K<sup>+</sup>-Stroms war fast doppelt so hoch wie die der Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu war die Amplitude des S1P-aktivierten K<sup>+</sup>-Stroms in Zellen, die eine Kinase-defekte (kin-def) c-Src Mutante exprimieren, auf 43 % des Wertes der Kontrollzellen reduziert. Darüber hinaus zeigten 6 von 13 Zellen keine K<sup>+</sup>-Stromaktivierung nach Applikation von S1P (Abb. 10). Die größte K<sup>+</sup>-Stromaktivierung auf S1P (1 µM) wurde in C3H10T1/2-Zellen gefunden, die eine nicht-myristilierbare (non-myr) c-Src Mutante exprimieren (Abb. 10). Diese Mutante kann nicht hochaffin an die Plasmamembran binden und ist daher fast ausschließlich im Zytosol lokalisiert.

Die unterschiedliche Größe der K<sup>+</sup>-Stromamplituden ist nicht auf eine unterschiedliche Sensitivität der c-Src exprimierenden Zelllinien auf S1P zurückzuführen, da eine Erhöhung der S1P-Konzentration auf 10 µM nicht zu höheren K<sup>+</sup>-Stromamplituden führte. Des Weiteren sind die Unterschiede nicht auf verschiedene Protein-Expressionsniveaus von wt c-Src oder der c-Src Mutanten zurückzuführen. In unserer Arbeitsgruppe wurde durch ein Immunblotting-Verfahren mit einem c-Src spezifischen monoklonalen Antikörper nachgewiesen, dass wt c-Src und die c-Src Mutanten in den angeführten Zelllinien in ähnlichen Konzentrationen exprimiert werden. Sie liegen in einem Bereich des 9- bis 13fachen endogenen c-Src Expressionsniveaus der Kontrollzellen.

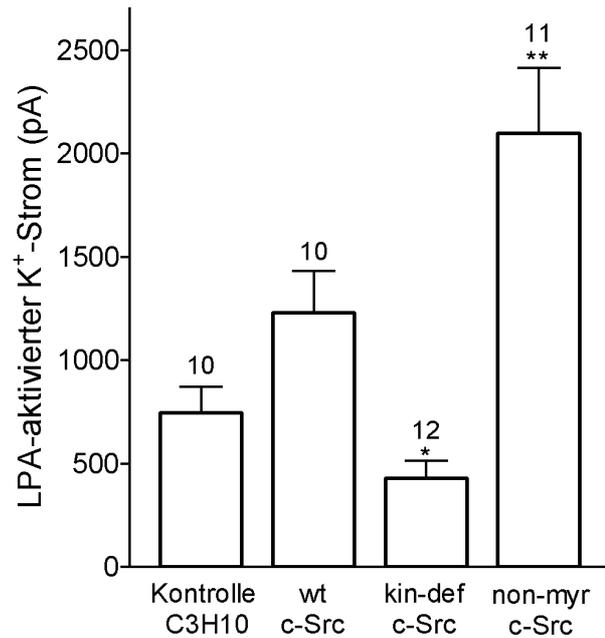
Die Daten zeigen, dass für den intrazellulären Signalweg, der nach S1P-Applikation zur Aktivierung eines K<sup>+</sup>-Stroms führt, die nicht-rezeptorgekoppelte Proteintyrosinkinase c-Src eine wichtige Rolle spielt.



**Abbildung 10:** Amplituden des S1P-aktivierten K<sup>+</sup>-Stroms in normalen C3H10T1/2-Zellen (*Kontrolle*) und in C3H10T1/2-Zellen, die den Wildtyp (*wt*) c-Src überexprimieren, die eine Kinase-defekte (*kin-def*) oder eine nicht-myristilierbare (*non-myr*) c-Src Mutante exprimieren. Die Stromamplituden wurden während der maximalen K<sup>+</sup>-Stromaktivierung bei einem Haltepotential von +30 mV bestimmt. Die S1P-Konzentration betrug 1  $\mu$ M. Die Anzahl der Zellen, die eine K<sup>+</sup>-Stromaktivierung nach Applikation von S1P zeigten, steht *über den Fehlerbalken*, während die Anzahl der Zellen, die keine K<sup>+</sup>-Stromantwort auf S1P zeigten, *in Klammern* in den Säulen steht. Zu beachten ist, dass die Mittelwerte nur aus den K<sup>+</sup>-Stromamplituden derjenigen Zellen berechnet wurden, die auch eine Antwort auf S1P zeigten (13 von 15 *Kontrollzellen*, 6 von 13 *kin-def* Zellen). Signifikante Unterschiede von der K<sup>+</sup>-Stromamplitude der Kontrollzellen sind wie folgt angegeben: \* P < 0,05; \*\* P < 0,01.

### 3.1.5 Effekte von LPA auf C3H10T1/2-Zellen, die verschiedene Formen der Proteintyrosinkinase c-Src exprimieren

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass das Serumlipid LPA in NIH3T3-Zellen einen spannungsunabhängigen, Ca<sup>2+</sup>-abhängigen K<sup>+</sup>-Strom aktiviert, der dieselben elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften besitzt wie der in den vorangehenden Abschnitten beschriebene, durch S1P aktivierte K<sup>+</sup>-Strom. In die Signalkaskade des LPA-aktivierten K<sup>+</sup>-Stroms ist eine Proteintyrosinkinase ein-



**Abbildung 11:** Amplituden des LPA-aktivierten K<sup>+</sup>-Stroms in normalen C3H10T1/2-Zellen (*Kontrolle*) und in C3H10T1/2-Zellen, die den Wildtyp (*wt*) c-Src überexprimieren, die eine Kinase-defekte (*kin-def*) oder eine nicht-myristilierbare (*non-myr*) c-Src Mutante exprimieren. Die K<sup>+</sup>-Stromamplituden wurden während der maximalen K<sup>+</sup>-Stromaktivierung bei einem Haltepotential von +30 mV bestimmt. Die LPA-Konzentration betrug 1  $\mu$ M. Die Säulen repräsentieren die mittleren K<sup>+</sup>-Stromamplituden  $\pm$  SEM (n: 10 - 12). Signifikante Unterschiede von der K<sup>+</sup>-Stromamplitude der Kontrollzellen sind wie folgt angegeben: \* P < 0,05; \*\* P < 0,01.

geschaltet (Repp *et al.* 1998). Aufgrund der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse lag es nahe zu überprüfen, ob c-Src möglicherweise diese Proteintyrosinkinase darstellen könnte. Dazu wurden die verschiedenen Zelllinien untersucht, die in Abschnitt 3.1.4 beschrieben wurden.

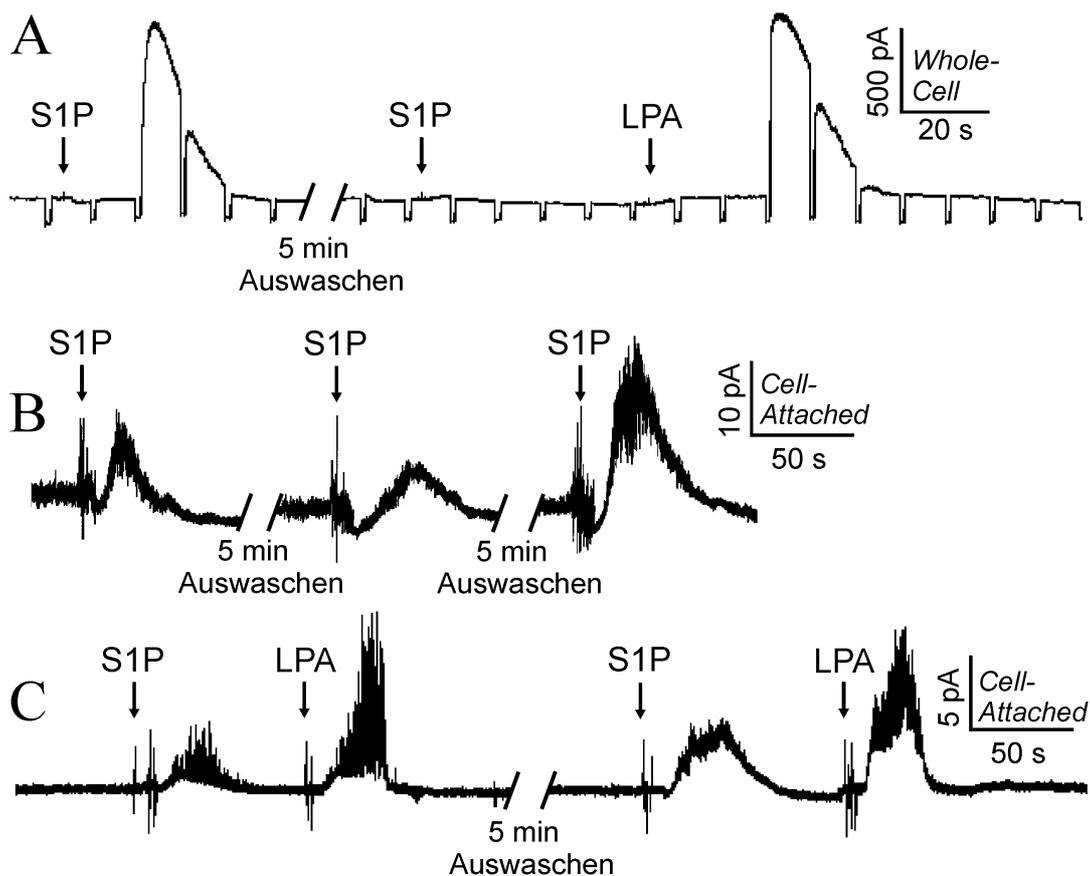
In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass LPA in normalen C3H10T1/2-Zellen einen K<sup>+</sup>-Strom induziert mit denselben Eigenschaften wie der LPA-aktivierte Strom in NIH3T3-Zellen (Jutta Schewe, Dissertation in Vorbereitung). In eigenen Experimenten konnte nun gezeigt werden, dass LPA (1  $\mu$ M) in jeder der untersuchten C3H10T1/2-Zellen (Kontrolle) einen K<sup>+</sup>-Strom aktiviert (Abb. 11), dessen Amplitude  $747 \pm 124$  pA (n = 10) beträgt. Auch in Zellen, die den Wildtyp (*wt*) c-Src überexprimieren, und in Zellen, die entweder eine Kinase-defekte (*kin-def*) oder eine nicht-myristilierbare (*non-myr*) c-Src Mutante exprimieren, führte die Applikation von LPA

(1  $\mu\text{M}$ ) in jeder Zelle zu einer  $\text{K}^+$ -Stromantwort. Die Amplitude des  $\text{K}^+$ -Stroms war dabei in den Wildtyp (wt) c-Src überexprimierenden Zellen um 65 % höher als in den Kontrollzellen. In Zellen, die eine Kinase-defekte (kin-def) c-Src Mutante exprimieren, war die  $\text{K}^+$ -Stromamplitude auf 57 % des Wertes der Kontrollzellen reduziert (Abb. 11). Die größte  $\text{K}^+$ -Stromantwort auf LPA (1  $\mu\text{M}$ ) wurde in Zellen gefunden, die eine nicht-myristilierbare (non-myr) c-Src Mutante exprimieren. Dort war die Amplitude des LPA-aktivierten  $\text{K}^+$ -Stroms fast dreifach so hoch wie in den Kontrollzellen (Abb. 11). Eine Erhöhung der LPA-Konzentration auf 10  $\mu\text{M}$  führte nicht zu höheren  $\text{K}^+$ -Stromamplituden, d.h. maximale  $\text{K}^+$ -Stromamplituden wurden bereits durch 1  $\mu\text{M}$  LPA sowohl in den Kontrollzellen als auch in den verschiedenen Formen von c-Src exprimierenden Zellen erreicht.

### **3.1.6 Effekte einer wiederholten Applikation von S1P und LPA an NIH3T3-Zellen**

Eine charakteristische Eigenschaft des S1P-aktivierten  $\text{K}^+$ -Stroms in Mäusefibroblasten ist seine Inaktivierung innerhalb von 1 - 2 Minuten nach Erreichen der maximalen Stromamplitude (siehe Kapitel 3.1.1). Es sollte nun die Frage geklärt werden, ob dies auf eine Inaktivierung der durch S1P aktivierten  $\text{K}^+$ -Kanäle zurückzuführen sei. Dazu wurde an NIH3T3-Zellen überprüft, ob wiederholte Applikationen von S1P wiederholte  $\text{K}^+$ -Stromantworten induzieren würden. In der Whole-Cell Ableitungskonfiguration wurden die NIH3T3-Zellen nach erfolgter Erstapplikation von S1P, die zu einer transienten Aktivierung eines  $\text{K}^+$ -Stroms geführt hatte (Abb. 12 A), mittels einer Badperfusionseinrichtung für 5 Minuten mit S1P-freier Extrazellulärlösung gespült, die 0,5 % FAFBSA enthielt. Eine zweite S1P-Applikation in Konzentrationen bis zu 10  $\mu\text{M}$  nach der Auswaschphase führte zu keiner zweiten  $\text{K}^+$ -Stromaktivierung (Abb. 12 A). Wurde allerdings LPA (1  $\mu\text{M}$ ) nach der zweiten, ineffektiven S1P-Gabe in die Badlösung appliziert, kam es zu einer weiteren transienten  $\text{K}^+$ -Stromaktivierung (Abb. 12 A).

Die Amplitude dieses LPA-aktivierten  $\text{K}^+$ -Stroms war mit  $1010 \pm 94$  pA ( $n = 21$ ) nicht signifikant unterschiedlich zu der  $\text{K}^+$ -Stromamplitude, die nach der Erstapplikation von S1P gemessen wurde. Umgekehrt induzierte S1P (1  $\mu\text{M}$ ) eine  $\text{K}^+$ -Stromantwort



**Abbildung 12: A - C** Wirkungen der Applikation von S1P (1  $\mu\text{M}$ ) und LPA (1  $\mu\text{M}$ ) auf den  $\text{K}^+$ -Strom in der Whole-Cell Ableitung und auf einzelne  $\text{K}^+$ -Kanäle im Cell-Attached Ableitungsmodus.

**A** Typische Whole-Cell Registrierung einer NIH3T3-Zelle, zu der zweimal S1P appliziert wurde und anschließend einmal LPA. Die Applikationen sind jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. Für die Aufnahmebedingungen siehe Legende zu Abb. 6 **B** Aktivierung von  $\text{K}^+$ -Kanälen durch sequentielle Applikationen von S1P, aufgenommen im Cell-Attached Ableitungsmodus. Das Pipettenpotential betrug -30 mV. **C** Aktivierung von  $\text{K}^+$ -Kanälen durch sequentielle Applikationen von S1P und LPA, aufgenommen im Cell-Attached Ableitungsmodus. In diesem Ableitungsmodus erscheinen Einwärts- $\text{K}^+$ -Ströme "nach oben" und Auswärts- $\text{K}^+$ -Ströme "nach unten".

Bei diesen Experimenten wurde die Badkammer kontinuierlich mit E1-Lösung, die 0,5 % FAFBSA enthielt, perfundiert. Für die jeweiligen Applikationen von S1P oder LPA wurde die Badperfusion gestoppt und die Phospholipide wurden direkt in die Badlösung appliziert. Nach erfolgter  $\text{K}^+$ -Stromaktivierung wurde die Badperfusion wieder gestartet.

( $855 \pm 229$  pA,  $n = 7$ ), wenn den Zellen zuerst LPA (1  $\mu\text{M}$ ) appliziert wurde. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in der Whole-Cell Ableitung der transiente Stromverlauf und das Ausbleiben einer zweiten  $\text{K}^+$ -Stromantwort nach einer zweiten S1P-Applikation nicht auf einer Inaktivierung der  $\text{K}^+$ -Kanäle beruhen, sondern auf

einem Inaktivierungsprozess in der Signalkette zwischen den S1P-Rezeptoren und den  $K^+$ -Kanälen.

Denkbar wäre, dass im Whole-Cell Ableitungsmodus durch den Austausch des Zytoplasmas mit der Pipettenlösung das intrazelluläre Milieu gestört wird und so eine Komponente verloren gehen könnte, die für die Rekonstitution der Signaltransduktion zwischen S1P-Rezeptoren und  $K^+$ -Kanälen notwendig ist. Deshalb wurden Experimente in der Cell-Attached Ableitung durchgeführt. Bei dieser Ableitungskonfiguration bleibt das intrazelluläre Milieu intakt (siehe Kapitel 2.2.3). Tatsächlich konnte im Cell-Attached Ableitungsmodus die  $K^+$ -Kanalaktivierung durch S1P ( $1 \mu\text{M}$ ) mindestens dreimal wiederholt werden, wenn S1P nach jeder Aktivierung ausgewaschen wurde (Abb. 12 B). Nachdem S1P eine  $K^+$ -Kanalaktivierung induziert hatte, kam es auch im Cell-Attached Modus nach Applikation von LPA ( $1 \mu\text{M}$ ) zu einer weiteren  $K^+$ -Kanalaktivierung (Abb. 12 C). Nach dem Auswaschen beider Substanzen nach der LPA-induzierten  $K^+$ -Kanalaktivierung führte eine weitere sequentielle Gabe von S1P und LPA jedes Mal zu einer erneuten sequentiellen  $K^+$ -Kanalaktivierung (Abb. 12 C). Auch im Cell-Attached Modus wurden Zellen gefunden, die nach der Applikation von S1P keine  $K^+$ -Kanalaktivierung zeigten (siehe Kapitel 3.1.1). Die fehlende Reaktion einzelner Zellen ist also unabhängig vom Ableitungsmodus.

Um die dem S1P-aktivierten  $K^+$ -Strom zugrunde liegenden Kanäle bezüglich ihrer Leitfähigkeit zu charakterisieren, wurden im Cell-Attached Modus Einzelkanalmessungen durchgeführt. Die Auswertung ergab eine Einzelkanalleitfähigkeit von  $34,3 \pm 1,0 \text{ pS}$  für einwärts und  $13,6 \pm 1,1 \text{ pS}$  für auswärts gerichtete  $K^+$ -Einzelkanalströme ( $n = 4$ ). Diese Werte sind identisch mit den Leitfähigkeiten des  $K^+$ -Kanaltyps, der durch LPA in NIH3T3-Zellen aktiviert wird (Repp *et al.* 1998).

## 3.2 Experimente an glatten Muskelzellen der A7r5-Zelllinie

### 3.2.1 Elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung von spontanen Aktionspotentialen in A7r5-Zellen

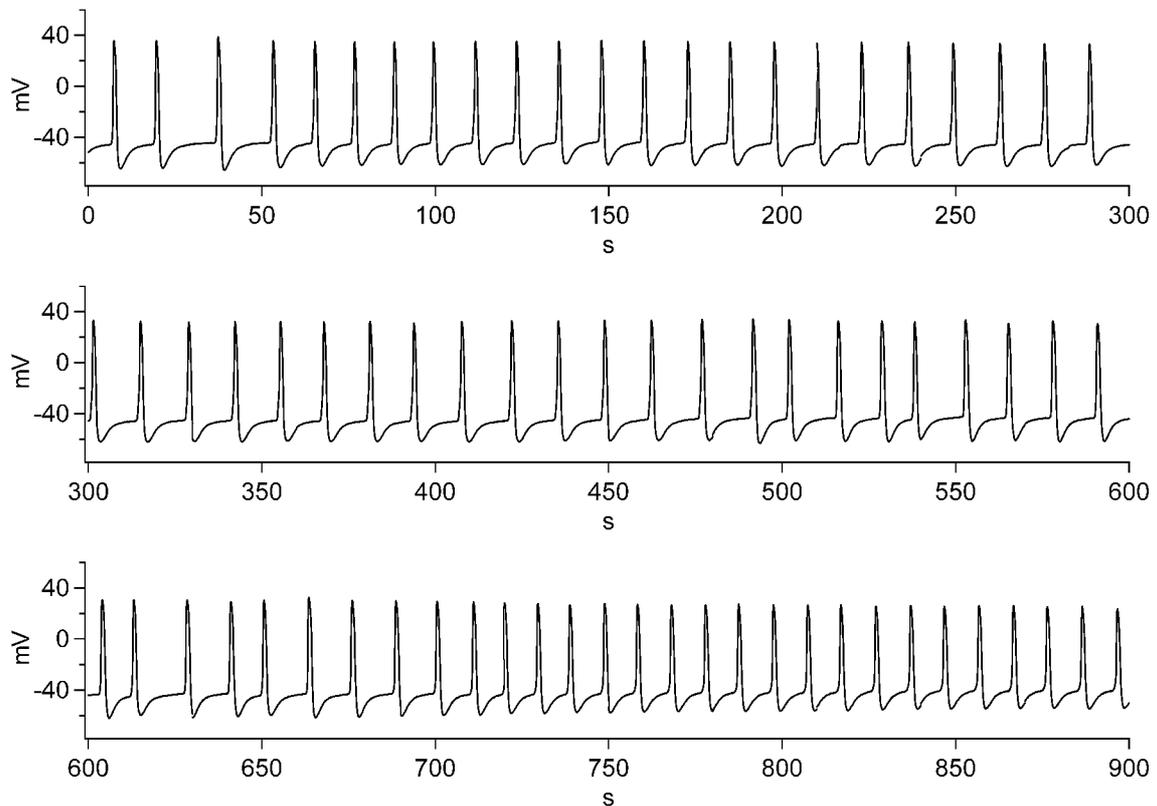
Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Phospholipide S1P (siehe Kapitel 3.1) und LPA (Repp *et al.* 1998) in Mäusefibroblasten, d.h. Bindegewebszellen, einen spannungsunabhängigen,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanal aktivieren, sollte im folgenden Teil der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob diese Substanzen auch in glatten Gefäßmuskelzellen die Aktivität von Ionenkanälen beeinflussen können. Hierzu wurden glatte Muskelzellen der A7r5-Zelllinie gewählt. A7r5-Zellen sind aus glatten Muskelzellen der thorakalen Aorta von fetalen Ratten kloniert worden (Kimes & Brandt 1976). Da diese Zellen einen unterentwickelten kontraktilem Apparat aufweisen, sind sie für elektrophysiologische Untersuchungen gut geeignet. Bisher wurde die Modulation verschiedener Ionenkanäle in diesen Muskelzellen durch Phorbol ester, Vasopressin oder Prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$  beschrieben. Hierzu gehören unter anderem L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle,  $\text{Cl}^-$ -Kanäle und  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{K}^+$ -Kanäle (Fish *et al.* 1988; van Renterghem *et al.* 1988; van Renterghem & Lazdunski 1992; Jiang *et al.* 2003).

Zunächst wurde das elektrophysiologische Verhalten von A7r5-Zellen untersucht, die in einem konfluenten Zellrasen lagen (siehe Abb. 4 A). Benutzt wurde dabei eine physiologische Extrazellulärlösung mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 2 mM. Im Stromklemmen-Ableitungsmodus waren 51 von 63 untersuchten A7r5-Zellen elektrisch spontan aktiv. Abbildung 13 zeigt typische glattmuskuläre Aktionspotentiale, die über eine Zeitspanne von 15 Minuten stabil ableitbar waren. Pro Minute wurden 3 - 12 Aktionspotentiale gebildet. Bei allen spontan aktiven Zellen traten während der Ableitungszeit Frequenzwechsel auf, was auch bei der in Abb. 13 gezeigten Registrierung deutlich zu sehen ist.

Das Schwellenpotential für die Bildung eines Aktionspotentials in A7r5-Zellen lag bei  $-43 \pm 2$  mV ( $n = 18$ ). Innerhalb von  $0,7 \pm 0,1$  s ( $n = 18$ ) kam es zu einer schnellen Depolarisation auf Werte von  $+31 \pm 2$  mV ( $n = 18$ ). Anschließend re- und hyperpolarisierten die Zellen in  $1,7 \pm 0,1$  s ( $n = 18$ ) auf  $-59 \pm 2$  mV ( $n = 18$ ) und erreichten somit ein Potential, das deutlich unterhalb des Schwellenpotentials lag. Darauf folgte eine langsame Depolarisationsphase, bis die Schwelle zur Auslösung eines neuen

Aktionspotentials erreicht wurde. Diese langsame Depolarisation dauerte 2,6 - 18,1 s und war der frequenzbestimmende Schritt der Aktionspotentialbildung.

12 von 63 A7r5-Zellen zeigten keine spontane Änderung des Membranpotentials. Es blieb konstant bei  $-40 \pm 2$  mV ( $n = 12$ ) über eine Messdauer von 15 Minuten.



**Abbildung 13:** Typisches Beispiel der spontanen Aktionspotentiale einer A7r5-Zelle im Stromklemmen-Ableitungsmodus während eines Zeitraums von 15 Minuten. Der Strom wurde auf 0 geklemmt. Die Zelle lag in einem konfluenten Zellrasen. Die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration betrug 2 mM (Extrazellulärlösung:  $E_1$ ), die freie intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration betrug 10 nM in einer schwach BAPTA-gepufferten Lösung (Intrazellulärlösung: IBL10n, siehe Tabelle 1).

In den meisten glatten Muskelzelltypen ist die schnelle Depolarisation vor allem durch eine Zunahme der Membranleitfähigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$  bedingt, während für manche glatten Muskelzelltypen zusätzlich auch eine Zunahme der  $\text{Na}^+$ -Membranleitfähigkeit nachgewiesen wurde. Die Re- und Hyperpolarisation erfolgt durch die Abnahme der Leitfähigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$  und gegebenenfalls für  $\text{Na}^+$  sowie durch die Zunahme der  $\text{K}^+$ -Membranleitfähigkeit (Tomita & Iino 1994; Kuriyama *et al.* 1995; Kuriyama *et al.* 1998). Um zu klären, welche Ionenkanäle an den Phasen des glattmuskulären

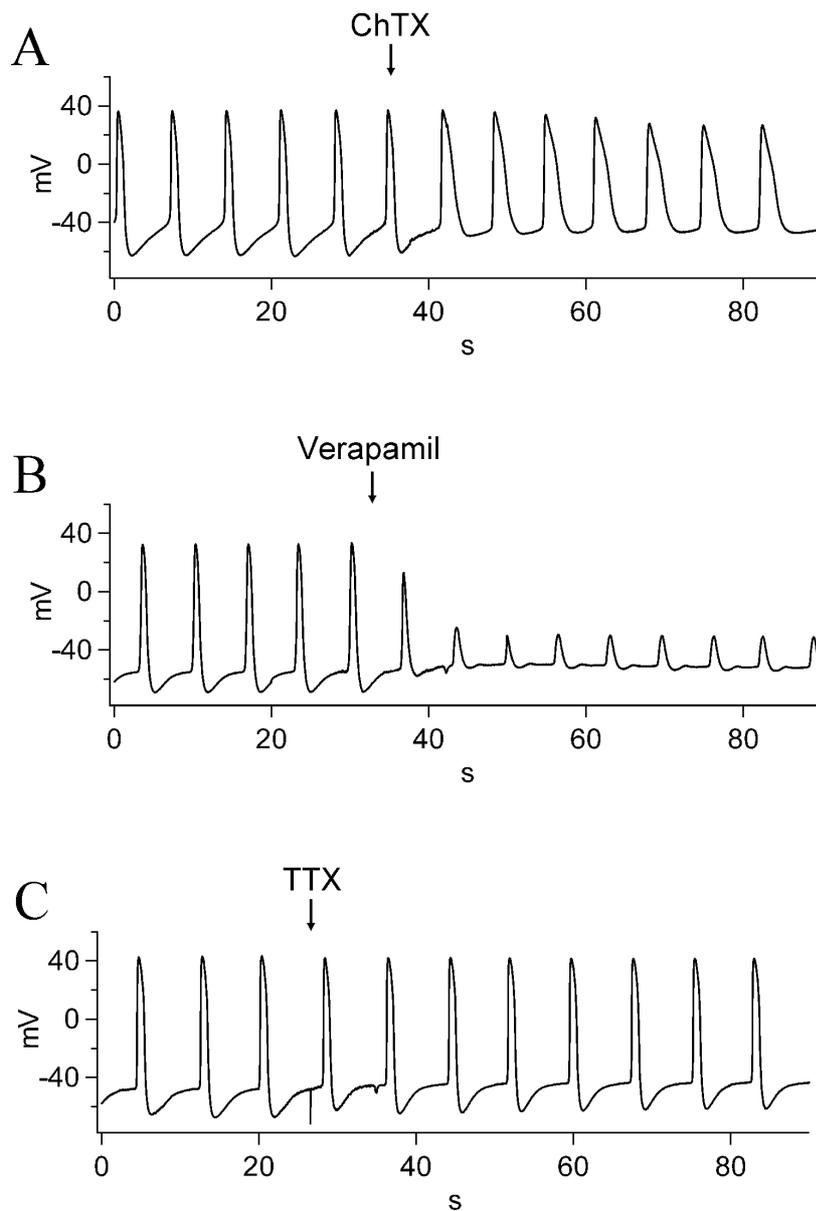
Aktionspotentials von A7r5-Zellen beteiligt sind, wurde im Stromklemmen-Ableitungsmodus bei elektrisch spontan aktiven Zellen die Wirkung verschiedener Ionenkanalblocker geprüft. Zur statistischen Auswertung wurde von jeder gemessenen Zelle jeweils ein charakteristisches Aktionspotential vor Applikation und eines nach Applikation des entsprechenden Blockers ausgewählt.

Abbildung 14 A zeigt eine typische Originalregistrierung einer A7r5-Zelle vor und nach Applikation des K<sup>+</sup>-Kanalblockers Charybdotoxin (ChTX). Nach Gabe von ChTX (300 nM) in die Badlösung dauerte die Re- und Hyperpolarisationsphase des Aktionspotentials  $4,5 \pm 0,4$  s (n = 5) und war damit signifikant länger (P < 0,001) als vor der ChTX-Applikation, wo sie  $1,7 \pm 0,1$  s (n = 5) betrug. Zusätzlich verringerte ChTX die Hyperpolarisation der Zellmembran auf Werte von  $2 \pm 1$  mV (n = 5) unter das vorherige Schwellenpotential. Diese Hyperpolarisation ist damit signifikant geringer (P < 0,001) als die Hyperpolarisation vor der ChTX-Gabe, die  $21 \pm 2$  mV (n = 5) unter dem Schwellenpotential lag. ChTX hatte jedoch keinen Einfluss auf die Lage des Schwellenpotentials, die Höhe der maximalen Depolarisation und die Geschwindigkeit der schnellen Depolarisation.

Eine Verlängerung der Re- und Hyperpolarisationsphase des Aktionspotentials von A7r5-Zellen und eine Abnahme der Hyperpolarisationstiefe unter das Schwellenpotential wurden auch nach Applikation der K<sup>+</sup>-Kanalblocker Margatoxin (MgTX, n = 2) und Iberiotoxin (IbTX, n = 3) in einer Konzentration von jeweils 300 nM erhalten. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein wesentlicher Faktor für die Ausbildung der Re- und Hyperpolarisationsphase von Aktionspotentialen in A7r5-Zellen die Aktivierung von ChTX-, MgTX- und IbTX-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanälen ist.

Nach Applikation des Ca<sup>2+</sup>-Kanalblockers Verapamil (10 µM) depolarisierten die Zellen lediglich auf Werte von  $-29 \pm 4$  mV (n = 5). Dies ist ein ebenso signifikanter (P < 0,001) Befund wie die nach Verapamil-Applikation verminderte Hyperpolarisation von nur  $3 \pm 1$  mV (n = 5) unter das Schwellenpotential (Abb. 14 B).

Neben der Blockade von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen kann Verapamil aber auch in höheren mikromolaren Konzentrationen Na<sup>+</sup>-Kanäle blockieren (Pidoplichko & Verkhratskii 1989). Um zu überprüfen, ob die gefundene Abnahme der Depolarisationsamplitude nach Gabe von Verapamil neben der wahrscheinlichen Blockade von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen auch möglicherweise auf eine Blockade von Na<sup>+</sup>-Kanälen zurückzuführen sein könnte, wurde die Wirkung des Na<sup>+</sup>-Kanalblockers Tetrodotoxin (TTX) an A7r5-Zellen ge-



**Abbildung 14: A - C** Einfluss verschiedener Ionenkanalblocker auf das glattmuskuläre Aktionspotential von A7r5-Zellen. **A** Effekt des  $K^+$ -Kanalkblockers Charybdotoxin (ChTX, 300 nM), **B** des  $Ca^{2+}$ -Kanalkblockers Verapamil (10  $\mu$ M) und **C** des  $Na^+$ -Kanalkblockers Tetrodotoxin (TTX, 2  $\mu$ M). Die Applikation ist durch den Pfeil gekennzeichnet. Ionenlösungen:  $E_1$  und IBL10n (siehe Tabelle 1).

prüft. Die meisten  $Na^+$ -Kanal-Subtypen in glatten Muskelzellen lassen sich durch TTX in nanomolaren Konzentrationen vollständig blockieren (Tomita & Iino 1994). Abbildung 14 C zeigt, dass nach Gabe von TTX (2  $\mu$ M) keine Veränderung des Aktionspotentials festzustellen war ( $n = 3$ ). Dies lässt darauf schließen, dass an der Bildung des glattmuskulären Aktionspotentials der A7r5-Zellen zumindest keine TTX-

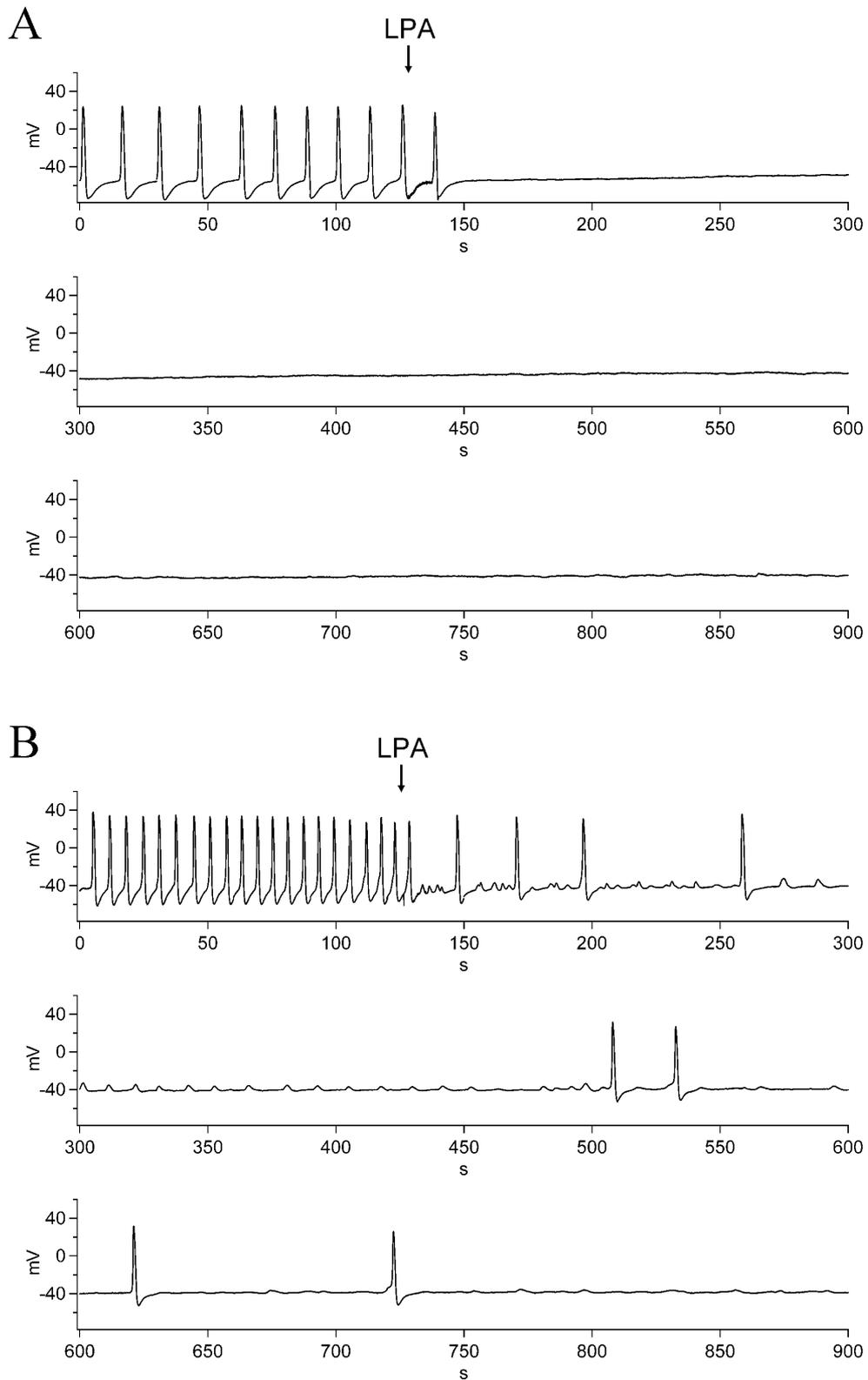
sensitiven Na<sup>+</sup>-Kanäle beteiligt sind. Für die Depolarisation ist also sehr wahrscheinlich die Öffnung von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen verantwortlich.

### **3.2.2 Modulation des Aktionspotentials in A7r5-Zellen durch LPA und S1P**

Nach der Charakterisierung des Aktionspotentials in A7r5-Zellen sollte nun überprüft werden, ob LPA und S1P die Aktivität von Ionenkanälen modulieren, die an dem Verlauf des Aktionspotentials beteiligt sind. Dabei zeigte sich, dass die Zellen auf die Applikation von LPA mit unterschiedlichen Veränderungen der Aktionspotentialbildung reagierten. Bei 5 von 11 Zellen, die glattmuskuläre Aktionspotentiale generierten, führte die Applikation von LPA (10 µM) innerhalb von 10 - 20 s zu einem vollständigen Stopp der Aktionspotentialbildung (Abb. 15 A). Nach der LPA-Applikation zeigten die Zellen ein Membranpotential in Höhe des vorherigen Schwellenpotentials. Bei 2 von 11 Zellen hörte die Aktionspotentialbildung ebenfalls vollständig auf, allerdings erst 4 - 7 Minuten nach der LPA-Gabe. Bei 3 von 11 Zellen kam es zwar zu einer drastischen Reduzierung der Frequenz, jedoch nicht zu einem vollständigen Verschwinden der Aktionspotentiale. Abbildung 15 B zeigt den typischen Verlauf der Aktionspotential-Registrierungen einer dieser Zellen. Man sieht, dass nur noch vereinzelt ein vollständiges Aktionspotential ausgelöst wurde. Ansonsten kam es wiederholt zu einer Depolarisation geringer Amplitude und einer jeweils daran anschließenden Repolarisation mit schwacher Hyperpolarisation. Eine Zelle reagierte nicht auf LPA und bildete weiterhin die typischen Aktionspotentiale.

Der Befund, dass LPA einen vollständigen Stopp der Aktionspotentialbildung bewirkte oder zu solch geringen Depolarisationen führte, wie sie auch nach Applikation von Verapamil zu beobachten waren, ließ vermuten, dass LPA in A7r5-Zellen möglicherweise Ca<sup>2+</sup>-Kanäle inhibiert.

Zwar führte die Applikation einer S1P-Lösung (1 µM S1P + 0,0125 % (w/v) FAFBSA + 0,1 % (v/v) DMSO, S1P-Lösungsvorschrift siehe Kapitel 2.3.2) zu Veränderungen der Aktionspotentiale in A7r5-Zellen, Kontrollexperimente zeigten jedoch Eigeneffekte von DMSO auf diese Zelllinie. Aus diesem Grund wurde keine weitere Charakterisierung des S1P-Effektes vorgenommen.

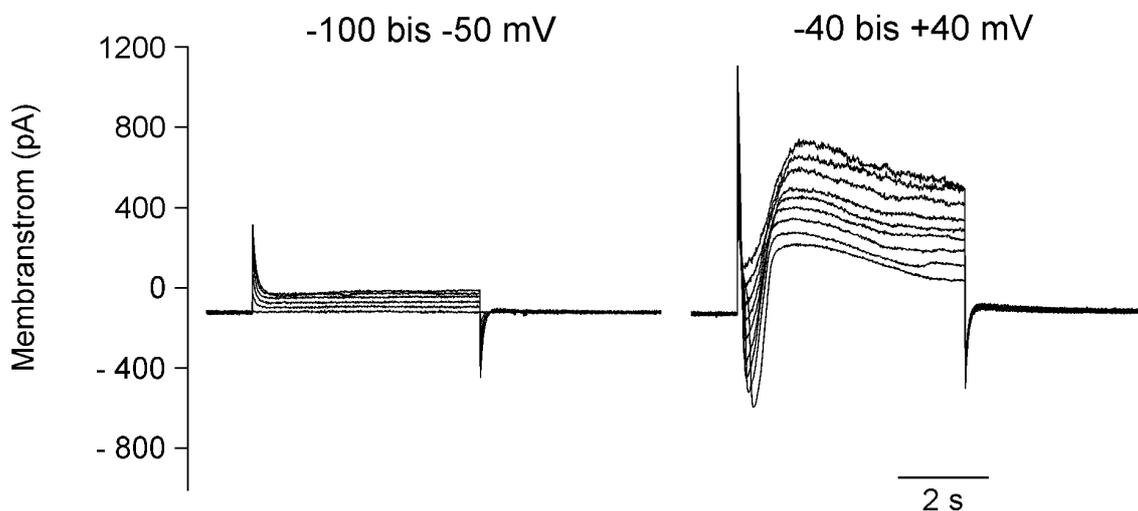


**Abbildung 15: A und B** Typische Originalregistrierungen von A7r5-Zellen vor und nach Applikation von LPA (10  $\mu$ M). LPA wurde zu dem mit dem Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkt in die Badlösung appliziert. Ionenlösungen: E<sub>1</sub> und IBL10n (siehe Tabelle 1).

### 3.2.3 Elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung des Membranstroms von A7r5-Zellen

Aufgrund der im vorigen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse vermuteten wir, dass LPA die Aktivität von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in A7r5-Zellen hemmt. Zur Klärung dieser Frage sollte zunächst der Membranstrom der A7r5-Zellen elektrophysiologisch und pharmakologisch näher charakterisiert werden. Dazu wurden die Zellen in einer Dichte ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Messungen nicht in einem konfluenten Zellrasen lagen und sich die Membranen der Zellkörper nicht berührten. Die untersuchten Zellen hatten jedoch über Filopodien Kontakt zu 2 - 4 benachbarten Zellen (Abb. 4 B).

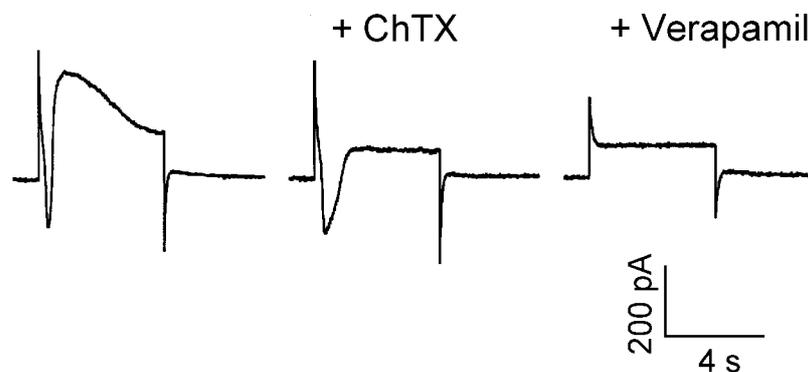
Eine typische Registrierung der Membranströme einer A7r5-Zelle in der Spannungs-klemme der Whole-Cell Ableitung ist in Abb. 16 dargestellt. Ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV wurde das Membranpotential in 10-mV-Schritten von -100 mV auf +40 mV verändert. Im Bereich zwischen -100 mV und -60 bzw. -50 mV zeigte die Zelle ein lineares Strom-Spannungsverhalten. Bei Depolarisation auf



**Abbildung 16:** Originalregistrierung der Membranströme einer A7r5-Zelle bei verschiedenen Membranpotentialen. Zur besseren Übersicht ist die Membranstromregistrierung in 2 Abbildungen aufgeteilt. Ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV wurde das Membranpotential in 10-mV-Schritten von -100 mV auf +40 mV verändert. Zwischen den verschiedenen Spannungspulsen, die jeweils für 5 s anlagen, wurde für 15 s auf das Haltepotential zurückgeschaltet. Ionenlösungen:  $\text{E}_1$  und IBL0 (siehe Tabelle 1).

-50 mV kam es zu einer geringen, bei Depolarisation auf Werte zwischen -40 und +40 mV zu einer deutlichen Aktivierung eines spannungsabhängigen Einwärtsstroms. Zwischen -40 und +40 mV folgte der Aktivierung des spannungsabhängigen Einwärtsstroms die Aktivierung eines Auswärtsstroms, der seine maximale Amplitude mehrere hundert Millisekunden nach der maximalen Amplitude des Einwärtsstroms erreichte.

Der in A7r5-Zellen gefundene Auswärtsstrom konnte durch die  $K^+$ -Kanalblocker MgTX (300 nM, n = 5) und ChTX (300 nM, n = 5) vollständig blockiert werden. Die Blockade des Auswärtsstroms durch ChTX ist in Abb. 17 für die Depolarisation auf -30 mV dargestellt. Wurde den Zellen nach der Blockade des Auswärtsstroms der  $Ca^{2+}$ -Kanalblocker Verapamil (10  $\mu$ M, n = 10) appliziert, so kam es auch zu einer vollständigen Blockade des spannungsabhängigen Einwärtsstroms (Abb. 17). Insgesamt lassen diese Ergebnisse vermuten, dass es sich bei dem ChTX- und MgTX-blockierbaren Auswärtsstrom um einen  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Strom und bei dem Verapamil-blockierbaren Einwärtsstrom um einen  $Ca^{2+}$ -Strom handelt.



**Abbildung 17:** Blockade des  $K^+$ -Auswärtsstroms einer A7r5-Zelle durch ChTX (300 nM) und anschließende Blockade des spannungsabhängigen Einwärtsstroms durch Verapamil (10  $\mu$ M). Gezeigt ist die Stromantwort einer A7r5-Zelle bei Depolarisation von -100 mV auf -30 mV. Ionenlösungen:  $E_1$  und IBL0 (siehe Tabelle 1).

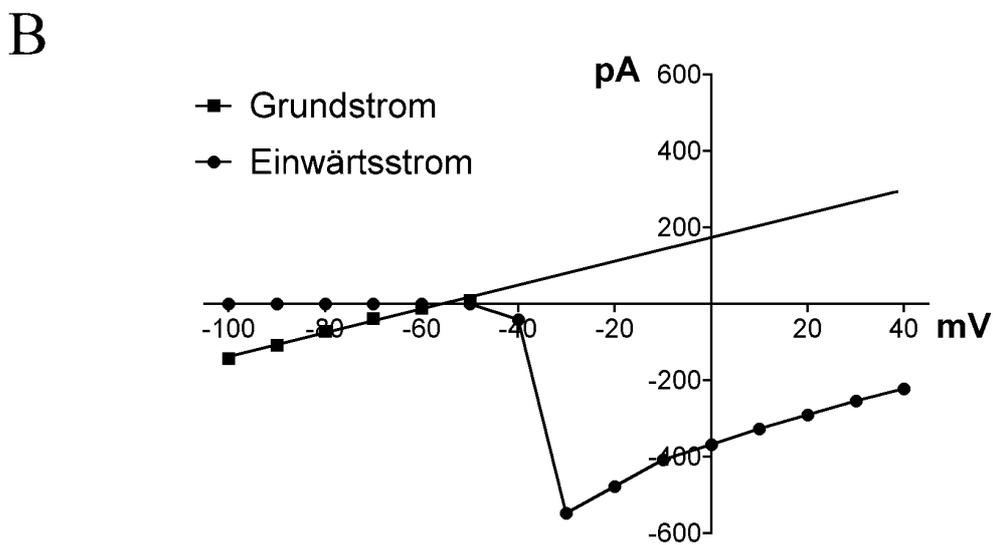
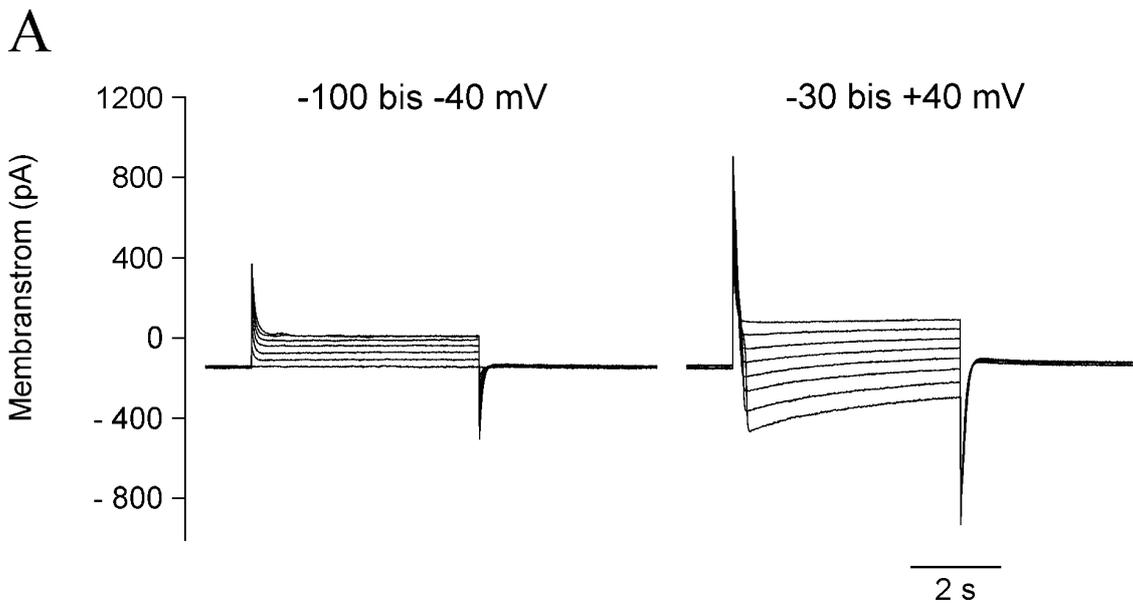
Um zu zeigen, dass es sich bei dem spannungsabhängigen, Verapamil-blockierbaren Einwärtsstrom in A7r5-Zellen tatsächlich um einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom handelt, wurde zur weiteren Charakterisierung eine Extrazellulärlösung benutzt, bei der  $\text{Ca}^{2+}$  durch  $\text{Ba}^{2+}$  (2 mM) ersetzt wurde.  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sind für  $\text{Ba}^{2+}$  ebenfalls permeabel, die störende Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Stroms sollte jedoch verhindert werden.

In Abb. 18 ist eine für diese Messbedingung typische Originalregistrierung einer A7r5-Zelle und die zugehörige Strom-Spannungsbeziehung zu sehen. Man sieht, dass es auch hier zur Aktivierung eines spannungsabhängigen Einwärtsstroms kommt, nicht mehr jedoch zu einer Aktivierung des  $\text{K}^+$ -Auswärtsstroms. Insgesamt zeigten die Zellen ( $n = 7$ ) im Bereich zwischen -100 mV und dem Schwellenpotential zur Aktivierung des spannungsabhängigen Einwärtsstroms eine lineare Strom-Spannungsbeziehung. Dieses Schwellenpotential lag bei  $-43 \pm 2$  mV ( $n = 7$ ). Die jeweils größte Amplitude des Einwärtsstroms wurde bei einem Potential von  $-34 \pm 2$  mV ( $n = 7$ ) gefunden und betrug zwischen 260 pA und 920 pA.

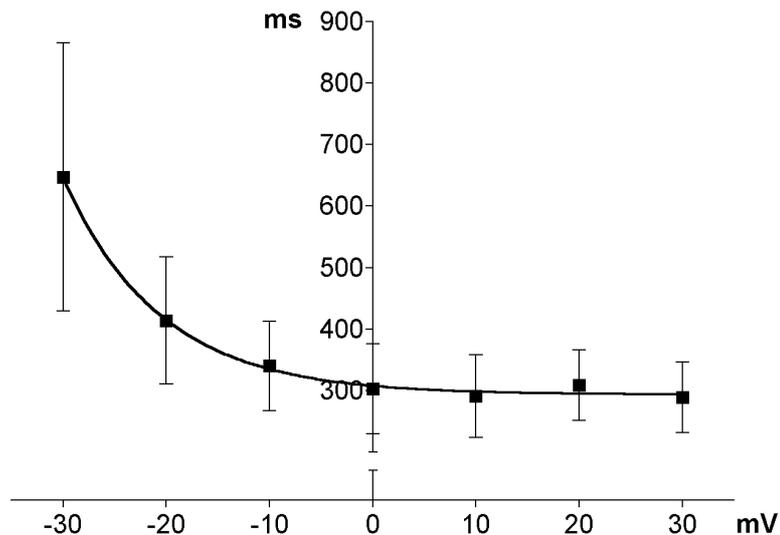
Der spannungsabhängige Einwärtsstrom zeigte ein langsames Aktivierungsverhalten. Abbildung 19 zeigt für Depolarisationen auf Werte zwischen -30 mV und +30 mV die Dauer bis zur maximalen Aktivierung des Einwärtsstroms. Diese betrug  $647 \pm 218$  ms für die Depolarisation auf -30 mV und  $289 \pm 57$  ms (jeweils  $n = 7$ ) für die Depolarisation auf +30 mV.

Die Inaktivierungskinetik des Einwärtsstroms wurde bei einem Potential von -30 mV bestimmt. Die Zeit bis zur halbmaximalen Inaktivierung des Einwärtsstroms betrug  $5,5 \pm 0,2$  s, die Inaktivierungskonstante  $\tau$  lag bei  $8,0 \pm 0,3$  s (jeweils  $n = 7$ ).

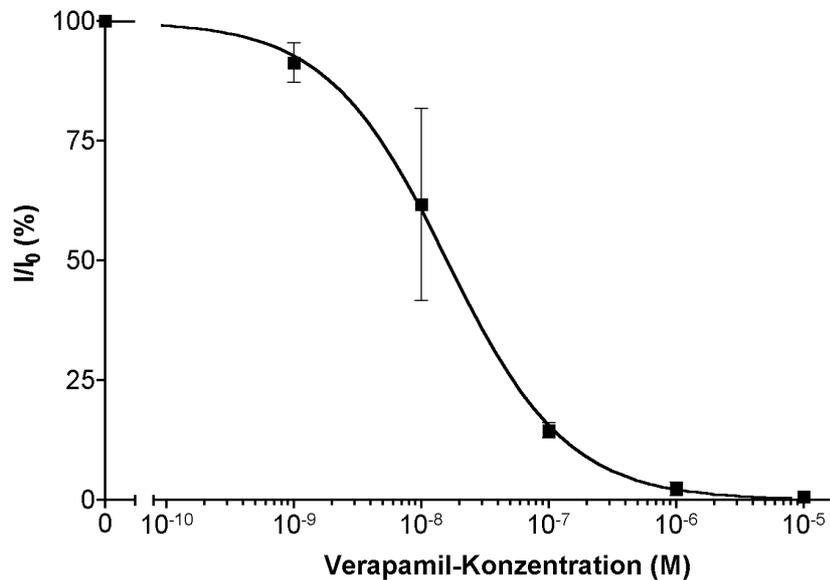
Zur pharmakologischen Charakterisierung des spannungsabhängigen Einwärtsstroms wurden verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker benutzt. Der Einwärtsstrom war durch Verapamil blockierbar. Die halbmaximal inhibitorisch wirksame Verapamil-Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ -Wert) betrug 16 nM (Abb. 20). Des Weiteren wurde der Einwärtsstrom vollständig durch Nifedipin (100 nM),  $\text{Cd}^{2+}$  (100  $\mu\text{M}$ ),  $\text{Ni}^{2+}$  (100  $\mu\text{M}$ ) und durch den spezifischen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker Calciseptin (1  $\mu\text{M}$ ) blockiert (jeweils  $n = 3$ ). Dieses pharmakologische Profil lässt vermuten, dass der spannungsabhängige Einwärtsstrom von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen getragen wird.



**Abbildung 18:** Originalregistrierung und Strom-Spannungsbeziehung der Membranströme einer A7r5-Zelle unter Verwendung einer Extrazellulärlösung, bei der  $\text{Ca}^{2+}$  durch  $2 \text{ mM Ba}^{2+}$  ersetzt wurde. **A** Membranstromregistrierung. Ausgehend von einem Haltepotential von  $-100 \text{ mV}$  wurde das Membranpotential in  $10\text{-mV}$ -Schritten von  $-100 \text{ mV}$  auf  $+40 \text{ mV}$  verändert. Zur besseren Übersicht ist die Membranstromregistrierung in 2 Abbildungen aufgeteilt. Zwischen den verschiedenen Spannungspulsen, die jeweils für  $5 \text{ s}$  anlagen, wurde für jeweils  $15 \text{ s}$  auf das Haltepotential zurückgeschaltet. Ionenlösungen:  $E_{\text{Ba}}$  und IBL0 (siehe Tabelle 1). **B** Strom-Spannungsbeziehung der Membranströme aus Abb. A. Die Amplituden des im Bereich zwischen  $-100 \text{ mV}$  und  $-50 \text{ mV}$  linearen, unspezifischen Membranstroms (= Grundstrom) wurden in der letzten Hälfte der  $5 \text{ s}$  dauernden Spannungspulse gemessen. Die Amplitude des Einwärtsstroms ist die Differenz aus der Amplitude des maximalen Gesamt-Einwärtsstroms und der Amplitude des für das jeweils anliegende Potential per Linearregression ermittelten Grundstroms.



**Abbildung 19:** Aktivierungszeit des Einwärtsstroms in A7r5-Zellen. Ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV wurden die Zellen auf die angegebenen Potentiale depolarisiert und die Zeit von Beginn der Depolarisation bis zur maximalen Amplitude des Einwärtsstroms bestimmt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM von 7 verschiedenen Messungen. Die Kurve wurde mit Hilfe einer Exponentialfunktion an die Daten angepasst.

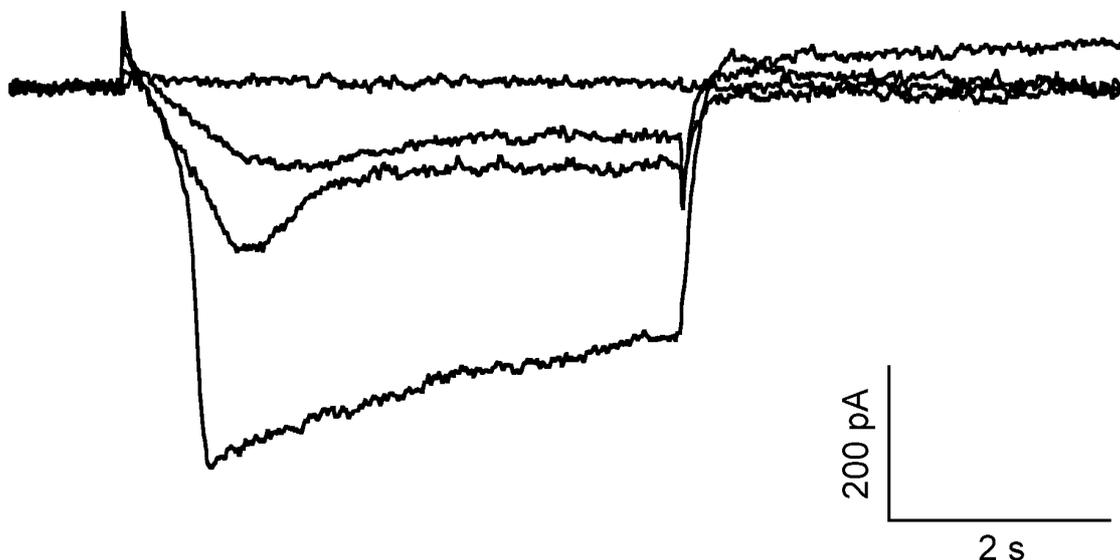


**Abbildung 20:** Konzentrations-Wirkungskurve für die Blockade des Einwärtsstroms in A7r5-Zellen durch Verapamil. Jeder Datenpunkt repräsentiert den gemittelten Quotienten  $I/I_0 \pm$  SEM (in %) aus der Amplitude des Einwärtsstroms bei einem Potential von -30 mV vor ( $I_0$ ) und nach ( $I$ ) der Stromblockade durch Verapamil, bestimmt an 3 - 4 Zellen. Die Aktivierungsfrequenz betrug 0,1 Hz. Die Kurve wurde mit Hilfe der Gleichung  $I/I_0 = 1 - 1/[1 + (IC_{50}/c)^n]$  nach dem Least-Squares-Verfahren an die Daten angepasst. Es ergab sich ein Hill-Koeffizient von  $n = 0,9$  und eine halbmaximal inhibierende Verapamil-Konzentration von  $IC_{50} = 16$  nM.  $c$  = eingesetzte Verapamil-Konzentration.

### 3.2.4 Blockade von $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen durch LPA

Im Folgenden sollte nun überprüft werden, ob die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in A7r5-Zellen durch LPA blockiert werden. Abbildung 21 zeigt eine Originalregistrierung einer A7r5-Zelle vor Applikation und zu verschiedenen Zeiten nach Applikation von LPA ( $1 \mu\text{M}$ ). Der spannungsabhängige  $\text{Ba}^{2+}$ -Strom wurde durch LPA ( $1 \mu\text{M}$ ) innerhalb von 175 s vollständig blockiert.

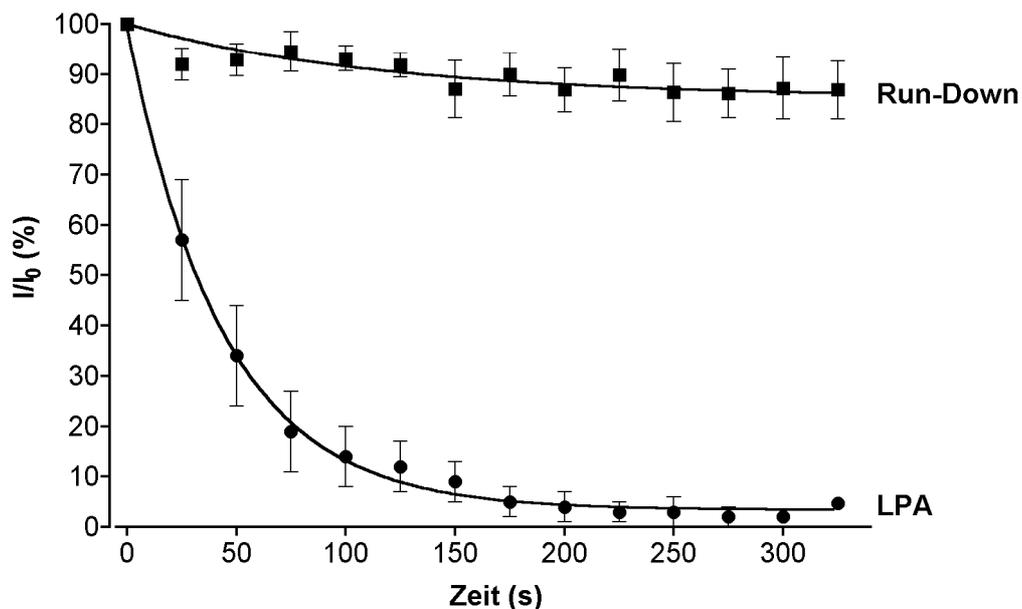
Auch bei Depolarisation auf Potentiale von bis zu  $+40 \text{ mV}$  war die Hemmung des  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms durch LPA vollständig.



**Abbildung 21:** Blockade des spannungsabhängigen  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms durch LPA ( $1 \mu\text{M}$ ) in A7r5-Zellen. Gezeigt ist die Originalregistrierung des  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms in der Whole-Cell Ableitung vor und 25, 50 und 175 s nach LPA-Applikation. Der  $\text{Ba}^{2+}$ -Strom wurde durch Depolarisation von  $-100 \text{ mV}$  auf  $-30 \text{ mV}$  aktiviert. Die Registrierungen sind bezüglich der kapazitiven Ströme und des unspezifischen Membranstroms korrigiert. Ionenlösungen:  $E_{\text{Ba}}$  und IBL0 (siehe Tabelle 1).

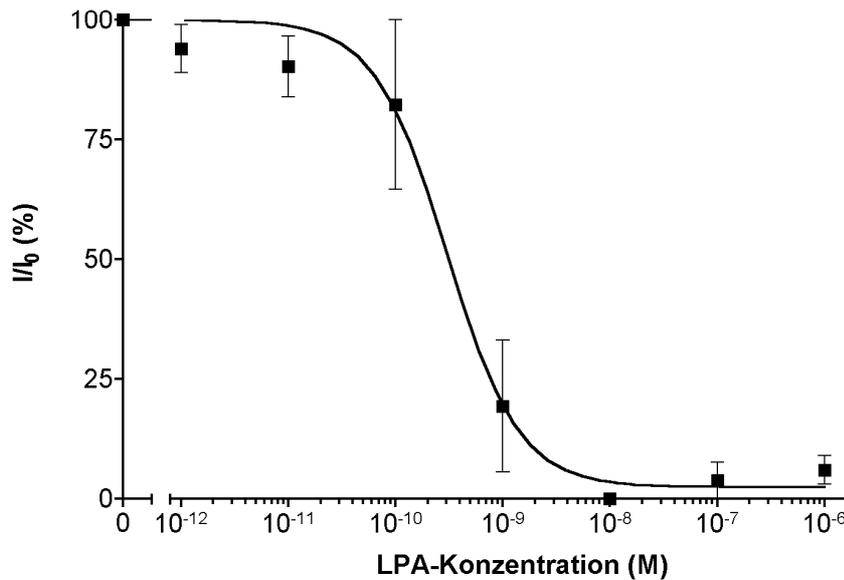
Abbildung 22 zeigt die Blockade des  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms durch LPA ( $1 \mu\text{M}$ ) im Zeitverlauf und zum Vergleich den natürlichen Run-Down dieses  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms in  $0,0125 \%$  FAFBSA-haltiger Extrazellulärlösung. Die Blockade des  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms war  $30,4 \pm 0,4 \text{ s}$  ( $n = 7$ ) nach Applikation von LPA ( $1 \mu\text{M}$ ) halbmaximal, nach etwa 3 Minuten maximal. Am Ende der Messreihe, also 325 s nach LPA-Applikation, war der  $\text{Ba}^{2+}$ -Strom

auf  $5 \pm 1 \%$  ( $n = 7$ ) im Vergleich zum Strom vor Applikation zurückgegangen. Die aufgrund des natürlichen Run-Downs noch verbleibende Stromamplitude war zu dem entsprechenden Zeitpunkt signifikant höher und betrug  $87 \pm 6 \%$  ( $n = 6$ ) der Amplitude zu Beginn der Messung.



**Abbildung 22:** Hemmung des  $Ba^{2+}$ -Stroms in A7r5-Zellen durch LPA ( $1 \mu M$ ) im Zeitverlauf (runde Symbole). Zum Vergleich wurde auch der natürliche Run-Down des  $Ba^{2+}$ -Stroms der Zellen in  $0,0125 \%$  FAFBSA-haltiger Lösung dargestellt (quadratische Symbole). Die Applikation von LPA erfolgte zum Zeitpunkt 0. Die Aktivierung des Einwärtsstroms erfolgte mit einer Frequenz von  $0,04$  Hz. Jeder Datenpunkt repräsentiert den gemittelten Quotienten  $I/I_0 \pm SEM$  (in %) aus der Amplitude des  $Ba^{2+}$ -Stroms bei einem Potential von  $-30$  mV zu Beginn der Messung ( $I_0$ ) und zu dem jeweils angegebenen Zeitpunkt ( $I$ ). Zur Bestimmung des LPA-Effektes wurden 7 Messungen, zur Bestimmung des Run-Down 6 Messungen an jeweils verschiedenen Zellen durchgeführt. Die Kurven wurden mit Hilfe einer Exponentialfunktion an die Daten angepasst.

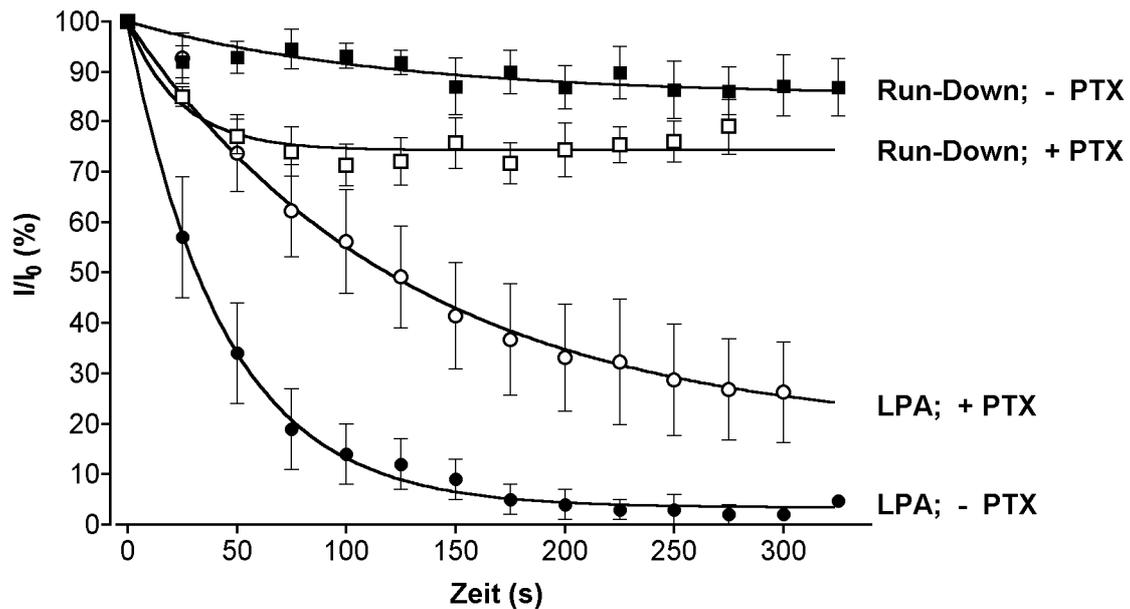
Die Blockade des  $Ba^{2+}$ -Stroms durch LPA ist konzentrationsabhängig. Die Konzentrations-Wirkungskurve ist in Abb. 23 dargestellt. Die halbmaximale blockierende Wirkung ( $IC_{50}$ ) wurde für eine LPA-Konzentration von  $0,31$  nM gefunden.



**Abbildung 23:** Konzentrationsabhängigkeit der Blockade des spannungsabhängigen  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms in A7r5-Zellen durch LPA. Jeder Datenpunkt repräsentiert den gemittelten Quotienten  $I/I_0 \pm \text{SEM}$  (in %) aus der Amplitude des  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms bei einem Potential von  $-30 \text{ mV}$  vor ( $I_0$ ) und  $175 \text{ s}$  nach ( $I$ ) der Applikation von LPA an jeweils 3 bis 7 Zellen. Der natürliche Run-Down des  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms wurde in die Quotienten eingerechnet. Die Aktivierungsfrequenz betrug  $0,04 \text{ Hz}$ . Die Kurve wurde mit Hilfe der Gleichung  $I/I_0 = 1 - 1/[1 + (\text{IC}_{50}/c)^n]$  nach dem Least-Squares-Verfahren an die Daten angepasst. Die optimale Anpassung wurde mit einem Hill-Koeffizienten von  $n = 1,3$  und einer halbmaximal inhibierenden LPA-Konzentration von  $\text{IC}_{50} = 0,31 \text{ nM}$  erzielt.  $c$  = eingesetzte LPA-Konzentration.

### 3.2.5 Beteiligung eines Pertussistoxin-sensitiven G-Proteins an der LPA-induzierten Blockade von $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in A7r5-Zellen

Es ist bekannt, dass LPA seine Wirkungen über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt (siehe Kapitel 1.1.3). Um die mögliche Beteiligung eines Pertussistoxin (PTX)-sensitiven G-Proteins an der Blockade des spannungsabhängigen  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms durch LPA zu überprüfen, wurden die Zellen mit  $100 \text{ ng/ml}$  PTX für  $24 \text{ Stunden}$  vorinkubiert. Abbildung 24 zeigt die Amplitude des  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms im Zeitverlauf nach LPA-Applikation ( $1 \mu\text{M}$ ) an PTX-vorinkubierten Zellen und an nicht behandelten Zellen. Zum Vergleich ist der natürliche Run-Down an PTX-vorinkubierten und an unbehandelten Zellen dargestellt. Die Vorinkubation der Zellen mit PTX führte für alle Messpunkte zu einer signifikanten Abnahme in der Blockade des  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms durch LPA.



**Abbildung 24:** Hemmende Wirkung von PTX auf die LPA-induzierte Blockade des spannungsabhängigen  $Ba^{2+}$ -Stroms. Gezeigt ist der Verlauf für PTX-vorinkubierte Zellen (*LPA; + PTX*) im Vergleich zu Kontrollzellen (*LPA; - PTX*). Die Applikation von LPA erfolgte zum Zeitpunkt 0. Es wurde auch der natürliche Run-Down des  $Ba^{2+}$ -Stroms in PTX-vorinkubierten (*Run-Down; + PTX*) und in Kontrollzellen (*Run-Down; - PTX*) dargestellt. Die Aktivierung des  $Ba^{2+}$ -Stroms erfolgte mit einer Frequenz von 0,04 Hz. Jeder Datenpunkt repräsentiert den gemittelten Quotienten  $I/I_0 \pm SEM$  (in %) aus der Amplitude des  $Ba^{2+}$ -Stroms bei einem Potential von -30 mV zu Beginn der Messung ( $I_0$ ) und zu dem jeweils angegebenen Zeitpunkt ( $I$ ). Es wurden an verschiedenen Zellen jeweils 7 Messungen (*LPA; + PTX* und *LPA; - PTX*), 3 Messungen (*Run-Down; + PTX*) bzw. 6 Messungen (*Run-Down; - PTX*) durchgeführt. Die Kurven wurden mit Hilfe einer Exponentialfunktion an die Daten angepasst.

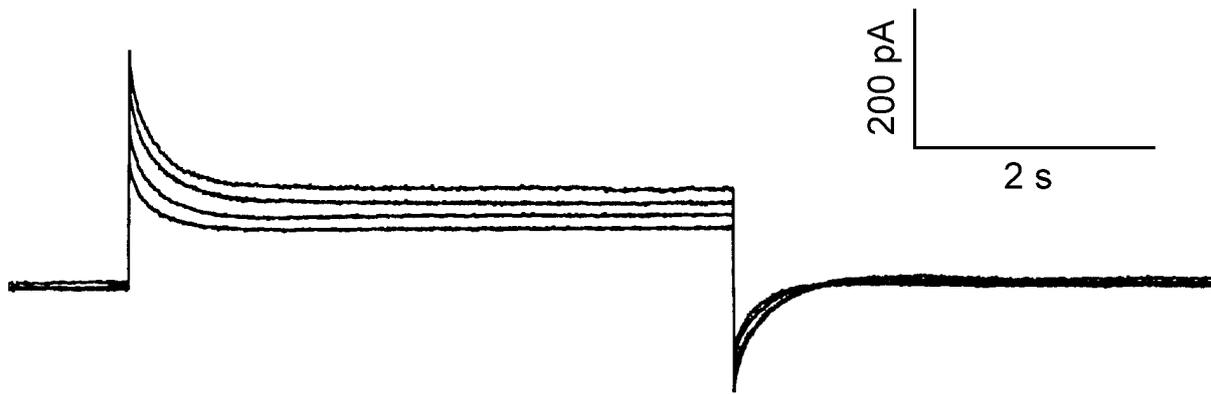
### 3.2.6 Blockade des von L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanälen getragenen $Ba^{2+}$ -Stroms durch LPA in A7r5-Zellen

Die bisher vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass LPA in A7r5-Zellen einen spannungsabhängigen  $Ba^{2+}$ -Strom hemmt, der sehr wahrscheinlich von L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanälen getragen wird. Für den Signalweg, der zur LPA-vermittelten Hemmung dieser  $Ca^{2+}$ -Kanäle führt, spielt ein PTX-sensitives G-Protein eine wesentliche Rolle.

In A7r5-Zellen wurden L-Typ und gelegentlich auch T-Typ  $Ca^{2+}$ -Ströme beschrieben (van Renterghem *et al.* 1988; Kuga *et al.* 1990; Marks *et al.* 1990; de Weille *et al.* 1991). Die pharmakologische Charakterisierung des in dieser Arbeit gemessenen, durch LPA-blockierbaren  $Ba^{2+}$ -Stroms (siehe Kapitel 3.2.3) stimmt mit den für L-Typ

Ca<sup>2+</sup>-Strömen typischen pharmakologischen Eigenschaften überein (Akaike *et al.* 1989; Kuga *et al.* 1990; de Weille *et al.* 1991; Catterall *et al.* 2003), was vermuten lässt, dass es sich bei diesem Strom um einen von L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanälen getragenen Strom handelt. Die elektrophysiologische Charakterisierung (siehe Kapitel 3.2.3) zeigte jedoch Unterschiede zum üblichen Verhalten von L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Strömen, wie sie in der Literatur beschrieben wurden (Akaike *et al.* 1989; Kuga *et al.* 1990; de Weille *et al.* 1991; Adachi-Akahane & Nagao 2000). Je nach Zusammensetzung der Extra- und Intrazellulärlösungen bezüglich Ca<sup>2+</sup> bzw. Ba<sup>2+</sup> liegt die Aktivierungsschwelle des L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Stroms zwischen -40 mV und -10 mV, die größte Stromamplitude wird bei Potentialen zwischen -10 mV und +20 mV gefunden. Normalerweise erreichen L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Ströme innerhalb weniger Millisekunden (< 50 ms) nach Depolarisation ihre maximale Stromamplitude, während in dieser Arbeit Aktivierungszeiten von 289 - 647 ms gefunden wurden.

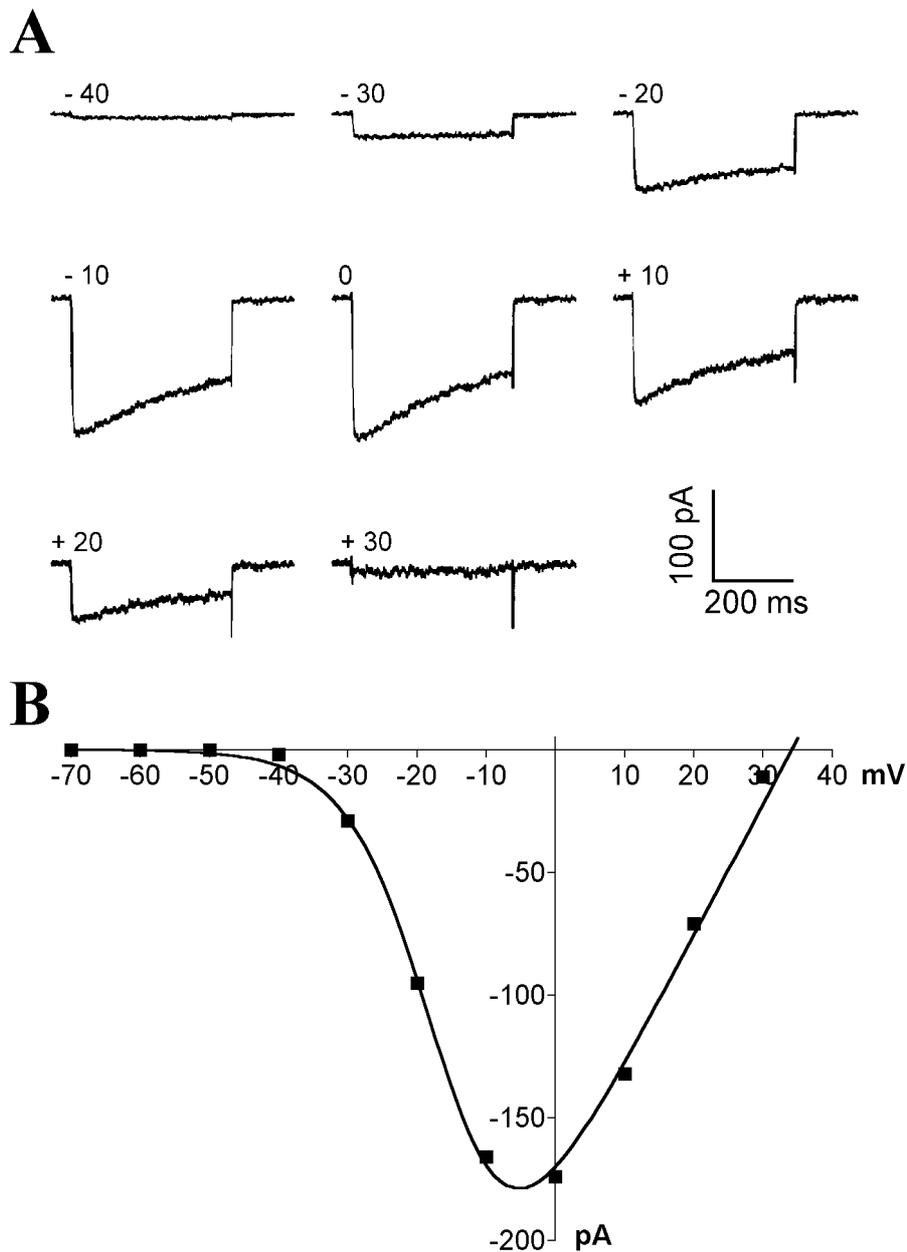
Es sollte deshalb überprüft werden, ob eine mögliche Ursache für diese Unterschiede in der Zelldichte der A7r5-Zellen bei den bisherigen elektrophysiologischen Messungen liegen könnte. Einen Hinweis darauf gaben die hohen und lang andauernden kapazitiven Ströme, die bei den Messungen an A7r5-Zellen beobachtet wurden (Abb. 25). Kapazitive Ströme entstehen bei Umladungsvorgängen der Zelle aufgrund der Kondensatoreigenschaft der Zellmembran und nehmen mit der Höhe eines Spannungssprungs und mit der Zellmembranoberfläche zu (Hille 2001). Tatsächlich lag bei den bisher beschriebenen Messungen eine verhältnismäßig große Membranoberfläche der Zellen vor, denn die untersuchten Zellen besaßen zahlreiche Zellausläufer. Zudem waren die Zellen über ihre Filopodien mit 2 - 4 Nachbarzellen verbunden (siehe Abb. 4 B). Dies lässt daher vermuten, dass die typischen elektrophysiologischen Charakteristika von L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Strömen in den untersuchten A7r5-Zellen deshalb nicht gefunden worden waren, weil eine zu lang andauernde Umladung der Zellmembran und/oder eine Beeinflussung dieser Ströme durch unmittelbar benachbarte Zellen vorlag. Die Eigenschaften des spannungsabhängigen Ba<sup>2+</sup>-Stroms wurden daher im Folgenden an A7r5-Zellen gemessen, die vollkommen einzeln lagen und die keine Filopodien zu benachbarten Zellen ausgebildet hatten (siehe Abb. 4 C).



**Abbildung 25:** Typische Originalregistrierung des Membranstroms einer A7r5-Zelle bei verschiedenen Potentialen nach Applikation von ChTX (300 nM) und Verapamil (10  $\mu$ M). Auffällig sind die lang andauernden kapazitiven Ströme, die nach den jeweils induzierten Spannungssprüngen auftraten. Ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV wurde das Membranpotential in 20-mV-Schritten von -30 mV auf +30 mV verändert. Zwischen den verschiedenen Spannungspulsen, die jeweils für 5 s anlagen, wurde für jeweils 15 s auf das Haltepotential zurückgeschaltet. Ionenlösungen:  $E_{Ba}$  und IBL0 (siehe Tabelle 1).

In Abb. 26 ist der für diese isoliert liegenden A7r5-Zellen typische spannungsabhängige  $Ba^{2+}$ -Strom bei verschiedenen Potentialen und die zugehörige Strom-Spannungsbeziehung zu sehen. Der  $Ba^{2+}$ -Strom wurde durch Depolarisationssprünge, ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV, aktiviert. Da das elektrophysiologische Profil dieses spannungsabhängigen  $Ba^{2+}$ -Stroms nun sehr gut mit dem typischen Profil von L-Typ  $Ca^{2+}$ -Strömen übereinstimmt, handelt es sich bei diesem Strom um einen von L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanälen getragenen Strom, dessen Ladungsträger  $Ba^{2+}$  ist. Deshalb wird der spannungsabhängige  $Ba^{2+}$ -Strom im Folgenden als L-Typ  $Ca^{2+}$ -Strom bezeichnet.

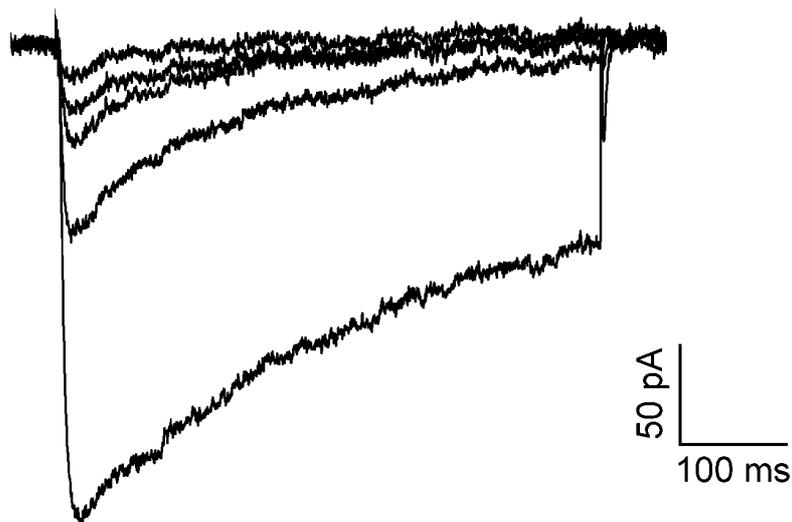
Das Schwellenpotential des untersuchten L-Typ  $Ca^{2+}$ -Stroms lag bei  $-38 \pm 1$  mV ( $n = 15$ ). Der größte Einwärtsstrom wurde bei  $-5 \pm 1$  mV ( $n = 15$ ) gefunden und erreichte Amplituden zwischen 60 und 300 pA. Der L-Typ  $Ca^{2+}$ -Strom zeigte ein rasches Aktivierungsverhalten und eine langsame Inaktivierung. Die Zeiten bis zur jeweils maximalen Aktivierung nach einem Depolarisationssprung lagen zwischen  $43 \pm 5$  ms ( $n = 14$ ; gemessen bei -20 mV) und  $25 \pm 4$  ms ( $n = 14$ , gemessen bei +30 mV). Das Inaktivierungsverhalten des Stroms wurde bei dem Potential seiner größten Amplitude bestimmt. Die Inaktivierungskonstante  $\tau$  betrug  $659 \pm 2$  ms, die Zeit bis zur halbmaximalen Inaktivierung  $457 \pm 1$  ms.



**Abbildung 26:** Originalregistrierung und Strom-Spannungsbeziehung des von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen getragenen  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms in einer einzeln liegenden A7r5-Zelle. **A** Membranstromregistrierung des  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms. Ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV wurde die Zelle auf die in der Abb. angegebenen Potentiale depolarisiert. Die Registrierungen sind bezüglich der kapazitiven Ströme und des unspezifischen Membranstroms korrigiert. Die Potentiale lagen für eine Zeitdauer von 400 ms an, anschließend wurde für 2 s auf das Haltepotential zurückgeschaltet. Ionenlösungen:  $\text{E}_{1\text{Ba}}$  und IBL0 (siehe Tabelle 1). **B** Strom-Spannungsbeziehung des  $\text{Ba}^{2+}$ -Stroms aus A. Die Kurve wurde mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung  $I(E) = g_0 / (1 + \exp((E_{50} - E)/k)) * (E - E_{\text{rev}})$  an die Daten angepasst, wobei das Potential der halbmaximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalaktivierung  $E_{50} = -15,6$  mV und das Umkehrpotential  $E_{\text{rev}} = 34,2$  mV war.  $g_0 =$  maximale Leitfähigkeit = 5,3 nS, Steigungsfaktor  $k = 6$  mV,  $I(E) =$  Stromamplitude bei dem Potential E.

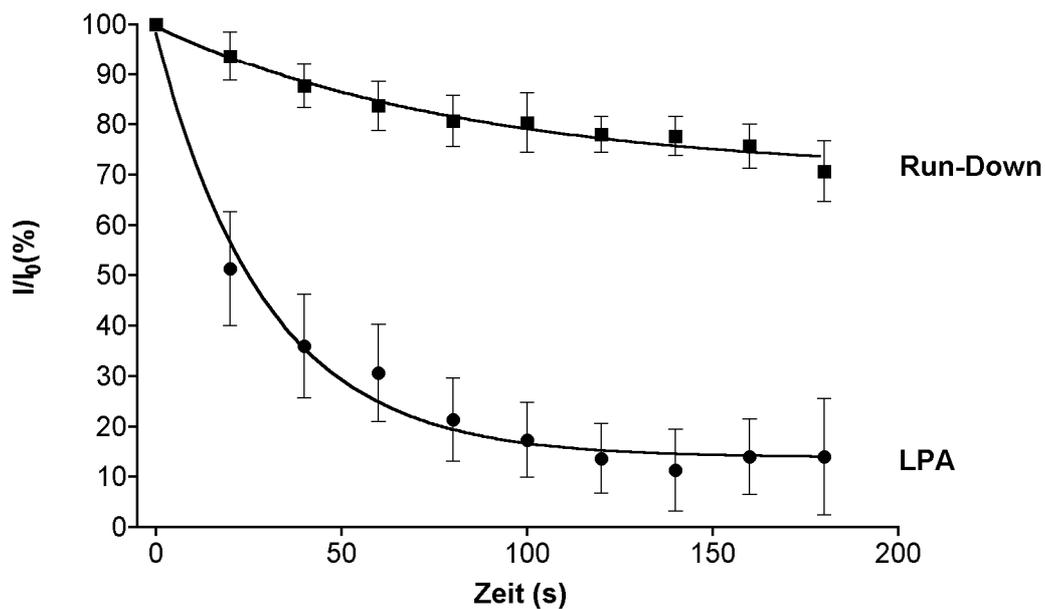
Die anschließende pharmakologische Charakterisierung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms an einzeln liegenden A7r5-Zellen zeigte ebenfalls ein für L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme typisches Bild. Der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom wurde durch Verapamil ( $10 \mu\text{M}$ ) zu  $96 \pm 1 \%$ , durch Nifedipin ( $100 \text{ nM}$ ) zu  $91 \pm 4 \%$  und durch Calciseptin ( $1 \mu\text{M}$ ) zu  $81 \pm 2 \%$  (jeweils  $n = 3$  für jede Substanz) blockiert.

Es sollte nun überprüft werden, ob LPA auch in den vollkommen einzeln liegenden A7r5-Zellen den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom zu blockieren vermag. Abbildung 27 zeigt eine Originalregistrierung der Blockade des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms einer einzeln liegenden A7r5-Zelle durch LPA ( $1 \mu\text{M}$ ). Eine Blockade des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms durch LPA war nicht nur nach Depolarisation der Zelle auf  $-10 \text{ mV}$  (Abb. 27), sondern bei jeder Depolarisation auf Werte zwischen dem Schwellenpotential und  $+40 \text{ mV}$  zu sehen.



**Abbildung 27:** Hemmung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms durch LPA ( $1 \mu\text{M}$ ) in einer einzeln liegenden A7r5-Zelle. Gezeigt ist die Originalregistrierung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms in der Whole-Cell Ableitung vor und 25, 50, 125 und 150 s nach LPA-Applikation. Der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom wurde durch Depolarisation von  $-70 \text{ mV}$  auf  $-10 \text{ mV}$  aktiviert. Die Registrierung ist bezüglich der kapazitiven Ströme und des unspezifischen Membranstroms korrigiert. Ionenlösungen:  $E_{1\text{Ba}}$  und IBL0 (siehe Tabelle 1).

Die Blockade des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms war  $20 \pm 1$  s ( $n = 3$ ) nach LPA-Applikation halbmaximal. Innerhalb von 160 s nach LPA-Applikation kam es zu einer Abnahme der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromamplitude auf  $14 \pm 8$  % ( $n = 3$ , Abb. 28). Zum Vergleich führte der natürliche Run-Down lediglich zu einer Abnahme der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromamplitude auf  $76 \pm 4$  % ( $n = 3$ ). Diese Daten zeigen, dass LPA auch in einzeln liegenden A7r5-Zellen den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom signifikant hemmt ( $P < 0,01$ ).



**Abbildung 28:** Hemmung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms durch LPA ( $1 \mu\text{M}$ ) in einzeln liegenden A7r5-Zellen im Zeitverlauf (runde Symbole). Zum Vergleich ist auch der natürliche Run-Down dieser Zellen dargestellt (quadratische Symbole). Die Applikation von LPA erfolgte zum Zeitpunkt 0. Jeder Datenpunkt repräsentiert den gemittelten Quotienten  $I/I_0 \pm \text{SEM}$  (in %) aus der Amplitude des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms bei einem Potential von  $-10$  mV zu Beginn der Messung ( $I_0$ ) und zum jeweils angegebenen Zeitpunkt ( $I$ , jeweils  $n = 3$ ). Die Kurven wurden mit Hilfe einer Exponentialfunktion an die Daten angepasst.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Phospholipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) in NIH3T3- und C3H10T1/2-Mäusefibroblasten einen spannungsunabhängigen,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Strom transient aktiviert. Eine halbmaximale Aktivierung dieses  $\text{K}^+$ -Stroms ( $\text{EC}_{50}$ -Wert) wurde bei einer S1P-Konzentration von 113 nM beobachtet. Die Aktivierung dieses  $\text{K}^+$ -Stroms führt zu einer starken Hyperpolarisation der Fibroblasten. Der S1P-aktivierte  $\text{K}^+$ -Strom kann vollständig durch die  $\text{K}^+$ -Kanalblocker Charybdotoxin (ChTX), Margatoxin (MgTX) und Iberiotoxin (IbTX), nicht aber durch Apamin blockiert werden. Die diesen Strom tragenden  $\text{K}^+$ -Kanäle zeigen eine leichte Einwärtsgleichrichtung mit Einzelkanalleitfähigkeiten von 34,3 pS für einwärts und 13,6 pS für auswärts gerichtete Ströme. Das elektrophysiologische und pharmakologische Profil des S1P-induzierten  $\text{K}^+$ -Stroms passt zu keinem bisher klonierten  $\text{K}^+$ -Kanaltyp (Vergara *et al.* 1998; Kaczorowski & Garcia 1999; Ford *et al.* 2002).

Allerdings hat der S1P-aktivierte  $\text{K}^+$ -Strom dieselben Eigenschaften wie der Lysophosphatidsäure-aktivierte  $\text{K}^+$ -Strom in NIH3T3-Zellen, der in unserer Arbeitsgruppe im Whole-Cell Modus und auf Einzelkanalebene charakterisiert wurde (Repp *et al.* 1998).  $\text{K}^+$ -Ströme mit gleichen Eigenschaften wurden auch in NIH3T3-Zellen gefunden, die mit den onkogenen Proteintyrosinkinasen v-Src (Draheim *et al.* 1995) und v-Fms (Decker *et al.* 1998) oder mit dem onkogenen G-Protein v-Ras (Huang & Rane 1994; Draheim *et al.* 1995) transfiziert wurden.

Vor kurzer Zeit wurde ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanal mittlerer Leitfähigkeit kloniert, der synonym als hSK4, hIK1, hIK<sub>Ca</sub> oder "Gardos"-Kanal bezeichnet wird (Ishii *et al.* 1997; Joiner *et al.* 1997; Logsdon *et al.* 1997). Dieser hSK4-Kanal (humane SK4-Kanal) wurde in verschiedenen Zelltypen wie *Xenopus* Oozyten (Ishii *et al.* 1997), CHO (chinese hamster ovary)-Zellen (Joiner *et al.* 1997; Khanna *et al.* 1999) und HEK-293 (human embryonic kidney)-Zellen (Jensen *et al.* 1998) exprimiert. Er besitzt eine ähnliche Einzelkanalleitfähigkeit wie der S1P-aktivierte  $\text{K}^+$ -Kanal in NIH3T3-Zellen. Das pharmakologische Profil des hSK4-Kanals zeigt Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu dem pharmakologischen Profil des S1P-aktivierten  $\text{K}^+$ -Stroms. Es wurde gezeigt, dass der hSK4-Kanal durch ChTX und Clotrimazol vollständig blockiert wird (Ishii *et al.* 1997; Joiner *et al.* 1997; Jensen *et al.* 1998; Khanna *et al.* 1999). MgTX blockiert diesen Kanal nur in sehr hohen Konzentrationen

( $IC_{50} = 459 \text{ nM}$ , Jensen *et al.* 1998), während IbTX gar keinen Effekt hat (Ishii *et al.* 1997; Joiner *et al.* 1997; Jensen *et al.* 1998; Khanna *et al.* 1999). In unserer Arbeitsgruppe wurde jedoch ein von diesen Ergebnissen abweichendes pharmakologisches Profil für den hSK4-Kanal gefunden. In HEK-293-Zellen, die mit dem Gen für den hSK4-Kanal stabil transfiziert worden waren, zeigte sich nämlich, dass dieser  $K^+$ -Kanal durch ChTX (300 nM), Clotrimazol (1  $\mu\text{M}$ ), aber auch durch MgTX (300 nM) und IbTX (300 nM) vollständig blockiert wird, während Apamin keine Wirkung zeigte (Decker 1999). Insofern lässt das in der vorliegenden Arbeit an NIH3T3- und C3H10T1/2-Mäusefibroblasten gefundene pharmakologische Profil des S1P-aktivierten  $K^+$ -Stroms vermuten, dass es sich bei dem S1P-aktivierten  $K^+$ -Kanal in diesen Bindegewebszellen um das murine Homolog des humanen SK4-Kanals handelt.

Eine typische Eigenschaft des S1P-induzierten  $K^+$ -Stroms ist seine Inaktivierung innerhalb von 1 - 2 Minuten nach Erreichen der maximalen  $K^+$ -Stromamplitude. Die Inaktivierung ist nicht nur in der Whole-Cell Ableitung, sondern auch im Cell-Attached Modus nachweisbar. Da bei Cell-Attached Experimenten die Zellmembran intakt bleibt und das intrazelluläre Milieu der Zelle nicht verändert wird, ist davon auszugehen, dass die Inaktivierung nicht durch den Verlust intrazellulärer Signalwegskomponenten verursacht wird, die für die  $K^+$ -Stromaktivierung durch S1P von wesentlicher Bedeutung sind. Des Weiteren ist diese Inaktivierung auch keine spezifische Eigenschaft der den Strom tragenden  $K^+$ -Kanäle. Es konnte nämlich in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in der Whole-Cell Ableitung nach Inaktivierung eines S1P-induzierten  $K^+$ -Stroms die Applikation von Lysophosphatidsäure (LPA) zu einer erneuten  $K^+$ -Stromaktivierung von gleicher Amplitude und gleichem Zeitverlauf führt. Es kann vermutet werden, dass diese Inaktivierung auf einen veränderten Aktivitätszustand des G-Protein-gekoppelten Rezeptors, über den S1P die  $K^+$ -Stromaktivierung induziert, zurückzuführen ist. Die meisten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zeigen in der Tat in dauernder Anwesenheit eines Agonisten einen raschen Verlust ihres Antwortverhaltens. Dieser Prozess der Desensibilisierung ist eine Folge der Ligand-induzierten Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten des G-Protein-gekoppelten Rezeptors (Willets *et al.* 2003).

Nicht alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten NIH3T3- und C3H10T1/2-Mäusefibroblasten reagierten auf die Applikation von S1P mit einer  $K^+$ -Stromaktivierung. Das Ausbleiben der  $K^+$ -Stromaktivierung in manchen Zellen wurde sowohl in der Whole-Cell als auch in der Cell-Attached Ableitung gefunden, was eine Abhängigkeit

dieses Phänomens vom Ableitungsmodus ausschließt. Die für die jeweiligen Experimente verwendeten Mäusefibroblasten wurden unter Standard-Zellkulturbedingungen gezüchtet (siehe auch Abschnitte 2.1.1 und 2.1.3) und vor der S1P-Applikation in ihrem Zellzyklus nicht synchronisiert, was zum Beispiel durch Serumentzug geschehen könnte. Bezüglich der Sensitivität der Zellen auf S1P könnten Zellzyklusbedingte Unterschiede existieren, was dann die fehlende  $K^+$ -Stromaktivierung in manchen Zellen erklären könnte.

In der Whole-Cell Ableitung konnte S1P nur einmal einen  $K^+$ -Strom transient induzieren, eine zweite Applikation dieser Substanz führte zu keiner zweiten transienten  $K^+$ -Stromantwort der Zellen. Im Cell-Attached Modus jedoch war eine wiederholte S1P-induzierte Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen möglich. Entsprechende Ergebnisse wurden in unserer Arbeitsgruppe auch für die LPA-induzierte Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen gefunden (Repp *et al.* 1998). Insgesamt deutet dies darauf hin, dass die jeweiligen Signalkaskaden, die zur Öffnung der  $K^+$ -Kanäle führen, bereits nach einmaliger Aktivierung rekonstituiert werden müssen. Diese Rekonstitution ist nur in intakten Zellen möglich und erfordert eine bisher noch nicht identifizierte Komponente, die im Whole-Cell Modus durch die Pipettenlösung dem Zytosol verlorengeht. Hierbei handelt es sich um ein Signalmolekül, das nicht für die Aktivierung, sondern für die erneute Aktivierbarkeit der Signaltransduktionskaskade von Bedeutung ist. Dies kann aus dem Befund unserer Arbeitsgruppe geschlossen werden, dass eine LPA-Applikation auch 30 Minuten nach Erstellen der Whole-Cell Konfiguration zur Aktivierung eines  $K^+$ -Stroms führt, dessen Amplitude nicht signifikant vom Normalwert abweicht (Repp *et al.* 1998). Bei der durch die Pipettenlösung verlorengegangenen Komponente könnte es sich jedoch um ein Signalmolekül handeln, das die Desensibilisierung des G-Protein-gekoppelten S1P- bzw. LPA-Rezeptors wieder aufhebt.

Es ist bekannt, dass S1P mit hoher Affinität an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren Edg-1, -3, -5, -6 und -8 bindet, LPA an die Rezeptoren Edg-2, -4 und -7 (Lynch & Im 1999; Pyne & Pyne 2000a; Fukushima & Chun 2001; Hla 2001; Chun *et al.* 2002). Trotz der unterschiedlichen Rezeptorselektivität wurde eine Cross-Desensibilisierung zwischen S1P und LPA für verschiedene biologische Effekte gezeigt. Dazu gehören die Aktivierung eines  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $Cl^-$ -Stroms in *Xenopus* Oozyten (Durieux *et al.* 1993), die Bildung von Wasserstoffperoxid in Schilddrüsenzellen (Okajima *et al.* 1997) und die Induktion der Blutplättchenaggregation (Gueguen *et al.* 1999). Für die  $K^+$ -Stromaktivierung in NIH3T3-Mäusefibroblasten wurde keine Cross-

Desensibilisierung zwischen S1P und LPA gefunden. Wurde nämlich LPA im Whole-Cell Modus nach einer S1P-induzierten  $K^+$ -Stromaktivierung appliziert, so führte dies zu einer erneuten, transienten  $K^+$ -Stromaktivierung von gleicher Amplitude und gleichem Zeitverlauf. Jeweils identische  $K^+$ -Stromantworten waren auch in umgekehrter Applikationsfolge nachweisbar, wenn S1P nach LPA appliziert wurde. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und/oder weitere Signalkomponenten, die die Aktivierung eines  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Stroms in Mäusefibroblasten vermitteln, für S1P und LPA verschieden sind.

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die LPA-induzierte  $K^+$ -Stromaktivierung in NIH3T3-Zellen über einen Signalweg vermittelt wird, in den ein Pertussis-toxin-sensitives G-Protein, eine Proteintyrosinkinase und das monomere G-Protein Ras eingeschaltet sind. Die Beteiligung einer Proteintyrosinkinase an diesem Signalweg wurde mit Hilfe des Tyrosinkinaseinhibitors Genistein nachgewiesen. Genistein-vorinkubierte Mäusefibroblasten zeigten eine signifikante Reduktion der durch LPA induzierbaren  $K^+$ -Stromamplitude um etwa 50 % im Vergleich zu den Kontrollzellen, was auf die Beteiligung einer Proteintyrosinkinase an diesem Signalweg schließen ließ (Repp *et al.* 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte nun nachgewiesen werden, dass es sich bei der bisher nicht bekannten Proteintyrosinkinase um die nicht-rezeptorgekoppelte Proteintyrosinkinase c-Src handelt, die sowohl an der LPA- als auch an der S1P-induzierten  $K^+$ -Stromaktivierung beteiligt ist.

In C3H10T1/2-Zellen, die den Wildtyp von c-Src überexprimieren, antwortete jede Zelle auf S1P mit der Aktivierung eines  $K^+$ -Stroms, dessen Amplitude fast doppelt so hoch war wie in den Kontrollzellen. Dahingegen blieb bei 2 von 15 Kontrollzellen eine  $K^+$ -Stromaktivierung nach S1P-Applikation aus. Die Applikation von LPA führte in den Wildtyp c-Src überexprimierenden Zellen zu einer 65 % höheren  $K^+$ -Stromamplitude gegenüber den Kontrollzellen.

Die Kinaseaktivität von c-Src ist für die  $K^+$ -Stromaktivierung nach S1P- oder LPA-Applikation notwendig. Mehr als 50 % der Zellen, die eine Kinase-defekte c-Src Mutante exprimieren, zeigten keinen S1P-induzierbaren  $K^+$ -Strom. In den verbleibenden Zellen, die auf S1P mit einer  $K^+$ -Stromaktivierung antworteten, war die Amplitude des  $K^+$ -Stroms auf 43 % des Kontrollwertes reduziert. Dies ist ein ebenso signifikanter Befund wie die in diesen Zellen feststellbare Reduktion des LPA-induzierten  $K^+$ -Stroms auf 57 % des Kontrollwertes. Die geringere  $K^+$ -Stromamplitude in den Zellen, die eine Kinase-defekte c-Src Mutante exprimieren, scheint zunächst erstaunlich, da

in diesen Zellen neben dem transfizierten Kinase-defekten c-Src auch das endogene intakte c-Src vorhanden ist. Eine Erklärung für die geringere  $K^+$ -Stromamplitude könnte sein, dass Kinase-defektes c-Src mit dem intakten endogenen c-Src um Bindungsstellen an Signalproteinen konkurriert und sie besetzt. Es könnte sich also "dominant-negativ" gegenüber dem endogenen c-Src verhalten. Dadurch wäre die Weiterleitung von Signalen, für die die Proteintyrosinkinaseaktivität von c-Src erforderlich ist, unterbrochen oder verzögert.

Die größte  $K^+$ -Stromaktivierung nach S1P- oder LPA-Applikation wurde in C3H10T1/2-Zellen beobachtet, die eine nicht-myristilierbare c-Src Mutante exprimieren. Die nicht-myristilierbare c-Src Mutante kann aufgrund der fehlenden N-terminalen Myristilierung nicht an die Plasmamembran binden (Wilson *et al.* 1989; Resh 1990). In diesen Zellen waren die Amplituden des S1P- und des LPA-aktivierten  $K^+$ -Stroms signifikant größer als in den Kontrollzellen. Die Fähigkeit von c-Src zur Bindung an die Plasmamembran ist also für die Signalweiterleitung, die nach S1P- bzw. LPA-Applikation zur  $K^+$ -Stromaktivierung führt, nicht notwendig.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass c-Src ein wichtiges Signalmolekül der Kaskade ist, die nach S1P- bzw. LPA-Applikation zur  $K^+$ -Stromaktivierung führt.

Neben einem Pertussistoxin (PTX)-sensitiven G-Protein und dem kleinen monomeren G-Protein Ras wurde mit c-Src also nun eine weitere Komponente des Signalwegs identifiziert, der nach LPA-Applikation zur  $K^+$ -Stromaktivierung führt. Dieser Signalweg weist eine große Ähnlichkeit mit dem Signalweg auf, über den LPA die Aktivierung von MAP-Kinasen vermittelt (Swarthout & Walling 2000). Ähnliche Signalwege wurden auch für S1P beschrieben (Pyne & Pyne 2000b). Zwar wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die zur  $K^+$ -Stromaktivierung führenden Signalkaskaden für S1P und LPA nicht identisch sind, doch deuten mehrere Befunde darauf hin, dass sich diese Signalketten in ihrem Aufbau zumindest sehr ähnlich sind. So ist die Dauer der Signaltransduktion von der Applikation des jeweiligen Phospholipids bis zum Beginn der  $K^+$ -Stromaktivierung und bis zum Zeitpunkt der maximalen  $K^+$ -Stromamplitude für S1P und LPA gleich. Beide Signalketten müssen nach einmaliger Aktivierung durch eine noch unbekannte Komponente rekonstituiert werden. Und in beide Signalketten ist die nicht-rezeptorgekoppelte Proteintyrosinkinase c-Src eingeschaltet.

Zu den klassischen Funktionen von  $K^+$ -Kanälen zählen die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials, die Modulation der elektrischen Erregbarkeit und die Re-

gulation des zellulären Ionengleichgewichts (Breitwieser 1996; Ackerman & Clapham 1997). In der letzten Zeit mehren sich die Hinweise, dass  $K^+$ -Kanäle darüber hinaus auch am Proliferationsprozess (Wonderlin & Strobl 1996), an der Zellmigration (Schwab *et al.* 1994; Schwab & Oberleithner 1996), der Zelldifferenzierung (Jones & Ribera 1994; Patil *et al.* 1995) und am programmierten Zelltod (Yu *et al.* 1997) beteiligt sind. Induktion der Zellproliferation, Modulation der Migration, Regulation der zellulären Differenzierung und Inhibition der Apoptose sind auch wichtige biologische Funktionen von S1P und LPA (Goetzl & An 1998; Moolenaar 1999; Spiegel & Milstien 2000; Tigyi 2001). Dies lässt vermuten, dass die S1P- oder LPA-induzierte Aktivierung  $Ca^{2+}$ -abhängiger  $K^+$ -Kanäle ein wichtiger funktioneller Bestandteil dieser S1P- und LPA-vermittelten zellulären Funktionen sein könnte. Besonders interessant scheint hier die Frage, inwieweit die S1P- oder LPA-vermittelte Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Kanälen für die zelluläre Proliferation von Bedeutung sind. Insbesondere für LPA wurde gezeigt, dass über Signalkaskaden, in die ein PTX-sensitives G-Protein, eine Proteintyrosinkinase wie c-Src und das monomere G-Protein Ras eingeschaltet sind, sowohl LPA-induzierte Proliferationsprozesse (Tigyi 2001) als auch die LPA-vermittelte Aktivierung des spannungsunabhängigen  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Kanals in Mäusefibroblasten (Repp *et al.* 1998) vermittelt werden.

Man kennt folgende 5 Typen spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle, die sich hinsichtlich ihrer physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden: L-, T-, N-, P/Q- und R-Typ. L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle gehören zur Familie der  $Ca_v1$ -, P/Q-, N- und R-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle zur Familie der  $Ca_v2$ - und der T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal gehört zur Familie der  $Ca_v3$ -Kanäle. Der L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanal ist der vorherrschende spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanal in glatten Gefäßmuskelzellen. Er ist bedeutend für die Kopplung von Zellerregung und Kontraktion und spielt eine wesentliche Rolle in der „Übersetzung“ der Membrandepolarisation in intrazelluläre Signalvorgänge (van Renterghem *et al.* 1988; Tomita & Iino 1994; Kuriyama *et al.* 1995; Bergsman *et al.* 2000; Catterall *et al.* 2003). In A7r5-Zellen sind L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle für die Bildung von glattemuskulären Aktionspotentialen wichtig.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Phospholipid LPA in glatten Gefäßmuskelzellen der A7r5-Zelllinie einen L-Typ  $Ca^{2+}$ -Strom konzentrationsabhängig mit einem  $IC_{50}$ -Wert von nur 0,31 nM hemmt. Als in-

trazelluläres Signalmolekül ist ein PTX-sensitives G-Protein in die Hemmung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms eingeschaltet.

Dass es sich bei dem LPA-inhibierbaren spannungsabhängigen Einwärtsstrom in A7r5-Zellen in der Tat um einen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom handelt, konnte durch die pharmakologische Charakterisierung gezeigt werden. Der in dieser Arbeit in A7r5-Zellen untersuchte spannungsabhängige Einwärtsstrom wird vollständig durch Nifedipin (100 nM) und das Schlangentoxin Calciseptin (1  $\mu\text{M}$ ) inhibiert, das als selektiver Blocker für L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle gilt (de Weille *et al.* 1991). Eine halbmaximale Blockade dieses Stroms wurde bei einer Verapamil-Konzentration von 16 nM gefunden. Die hohe Sensitivität dieses Einwärtsstroms auf diese Substanzen spricht für einen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom (Akaike *et al.* 1989; Kuga *et al.* 1990; de Weille *et al.* 1991; Catterall *et al.* 2003).

Zur typischen elektrophysiologischen Charakteristik eines L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms gehören eine Aktivierungsschwelle zwischen -40 mV und -10 mV, maximale Stromamplituden bei Potentialen zwischen -10 mV und +20 mV (Fish *et al.* 1988; Akaike *et al.* 1989; Kuga *et al.* 1990; Marks *et al.* 1990; de Weille *et al.* 1991), eine rasche Aktivierung mit Erreichen der maximalen Stromamplitude innerhalb weniger Millisekunden (< 50 ms) nach Depolarisation (Tomita & Iino 1994; Kuriyama *et al.* 1995) und eine langsame Inaktivierung (Akaike *et al.* 1989; Kuga *et al.* 1990). Dieses typische elektrophysiologische Profil eines L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms konnte jedoch nur in solchen A7r5-Zellen korrekt gemessen werden, die vollkommen einzeln lagen und weder über direkten Membrankontakt noch über Filopodien Kontakt zu benachbarten Zellen hatten.

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die LPA-vermittelte Inhibierung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms nach Vorinkubation der Zellen mit PTX signifikant reduziert wurde. Dies zeigt, dass LPA sehr wahrscheinlich über PTX-sensitive  $G_{i/o}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom in A7r5-Zellen hemmt. Es ist bekannt, dass es nach Bindung von LPA an den Rezeptor zunächst zu einer Dimerisierung des  $G_{i/o}$ -Proteins in seine  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheit kommt (Swarthout & Walling 2000). Es ist jedoch unklar, ob die in dieser Arbeit gefundene Inhibierung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms durch LPA über eine direkte Bindung einer dieser Untereinheiten an das Kanalprotein zustande kommt oder ob weitere Signalmoleküle für die Inhibierung wichtig sind.

Die Vorinkubation mit PTX führte jedoch nicht zu einem vollständigen Ausbleiben der LPA-induzierten Hemmung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms. Dies könnte daran liegen, dass selbst nach 24stündiger Vorinkubation der Zellen mit PTX in einer Konzentration von 100 ng/ml nicht alle  $G_{i/o}$ -Proteine durch PTX inaktiviert sind, so dass kein vollständiges Ausbleiben der LPA-vermittelten Inhibierung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms erreicht werden kann. Es wäre aber auch denkbar, dass neben dem  $G_{i/o}$ -Protein-vermittelten Signalweg zumindest noch ein weiterer Signalweg existiert, der den LPA-Effekt an A7r5-Zellen erklären könnte. Möglich wären intrazelluläre Signalprozesse, die über eine Bindung von LPA an  $G_{q-}$  oder  $G_{12/13}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren ausgelöst werden, da  $G_{q-}$  oder  $G_{12/13}$ -Proteine nicht PTX-sensitiv sind (Neer 1995).

Ein möglicher Mechanismus für die Hemmung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms in A7r5-Zellen durch LPA ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung dieses Stroms. Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung wird über die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an das C-terminale Ende der  $\alpha_1$ -Subunit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals vermittelt. Prinzipiell beitragen kann hierzu direkt durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal einströmendes  $\text{Ca}^{2+}$ , aus benachbarten Kanälen einströmendes  $\text{Ca}^{2+}$  und aus intrazellulären Speichern freigesetztes  $\text{Ca}^{2+}$  (Jones 1998; Hofman & Klugbauer 2000). Für verschiedene Zelltypen konnte bereits gezeigt werden, dass LPA zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern führt. So kommt es auch in glatten Muskelzellen der Rattenaorta über einen PTX-sensitiven Signalweg in Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  nach LPA-Applikation zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Seewald *et al.* 1997). Daher ist denkbar, dass LPA auch in A7r5-Zellen zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und dadurch zu einer Inaktivierung der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle führt.

Eine wichtige Frage ist, in welches physiologische oder pathophysiologische Geschehen die an diesen Zellen beobachtete  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromblockade einzuordnen ist. So führt LPA in glatten Muskelzellen der Rattenaorta über einen PTX-sensitiven Signalweg zur Aktivierung der MAP-Kinase, zum Anstieg des Thymidineinbaus in die Zell-DNA und zur Zunahme der Zellzahl (Seewald *et al.* 1997). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, ist die Hemmung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms in A7r5-Zellen durch LPA ebenfalls PTX-sensitiv. Es bleibt also zu klären, ob die LPA-induzierte Blockade von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen sich auf zelluläre Proliferationsprozesse auswirkt oder ob sie ein davon unabhängiges Ereignis darstellt.

Physiologisch relevant ist auch die Frage, ob die LPA-vermittelte Hemmung von glattemuskulären Aktionspotentialen und die Hemmung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals in

Gefäßmuskelzellen zu einer Vasodilatation oder -konstriktion führen. Für die Regulation des glattmuskulären Tonus spielen Änderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine wesentliche Rolle, wobei eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Muskelkontraktion führt (Bolton *et al.* 1999). Einerseits scheint LPA nun in die wichtige Erregungs-Kontraktions-Kopplung einzugreifen, indem es den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal inhibiert, was einen verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle zur Folge hat. Daher wären eine Muskelrelaxation und eine Vasodilatation zu erwarten. Andererseits wurde für LPA bereits eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern gezeigt (Seewald *et al.* 1997). Über den Mechanismus der pharmakomechanischen Kopplung könnte diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung zur Muskelkontraktion führen.

Die Beeinflussung des lokalen Gefäßtonus durch LPA spielt sicher eine bedeutende Rolle für Prozesse, an denen eine Thrombozytenaggregation beteiligt ist. Der Serumspiegel von LPA wird nämlich vornehmlich von Thrombozyten beeinflusst, aus denen LPA im Rahmen der Plättchenaggregation freigesetzt wird (siehe Kapitel 1.1.2). Es ist gut vorstellbar, dass während der Thrombozytenaggregation freigesetzte LPA-Moleküle die glatten Gefäßmuskelzellen erreichen und deren Kontraktionszustand regulieren. Zur Klärung der Frage, ob LPA über diese Mechanismen den Gefäßtonus beeinflusst, sind nun Experimente an Organpräparaten, d.h. an isolierten Gefäßpräparaten, erforderlich. Die experimentelle Ausstattung zur Überprüfung dieser These an isolierten Gefäßpräparaten der Ratte ist am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie vorhanden.

Die Modulation von Ionenkanälen durch S1P und LPA in Bindegewebszellen und glatten Gefäßmuskelzellen sind wichtige Befunde im Rahmen der Untersuchungen zur Wirkung dieser Moleküle auf den Aktivitätszustand von Zellen. In weiteren Untersuchungen muss nun geklärt werden, welche physiologische oder pathophysiologische Bedeutung die Modulation dieser Ionenkanäle durch Phospholipide für verschiedene biologische Prozesse wie Proliferation, Migration, Apoptose oder Kontraktion hat.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Sphingosin-1-Phosphat (S1P) in NIH3T3- und C3H10T1/2-Mäusefibroblasten einen spannungsunabhängigen,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Strom transient aktiviert, der durch Charybdotoxin, Margatoxin und Iberiotoxin vollständig blockiert werden kann. Die  $\text{K}^+$ -Stromaktivierung führt zu einer starken Hyperpolarisation der Zellen. Der S1P-aktivierte  $\text{K}^+$ -Strom hat identische elektrophysiologische und pharmakologische Eigenschaften wie der durch Lysophosphatidsäure (LPA) aktivierte  $\text{K}^+$ -Strom in NIH3T3-Zellen. In der Whole-Cell Ableitung führt nur die erste Applikation von S1P zu einer transienten  $\text{K}^+$ -Stromaktivierung, wohingegen in der Cell-Attached Ableitung mehrfache transiente  $\text{K}^+$ -Stromaktivierungen möglich sind. Der transiente Stromverlauf und das Ausbleiben einer zweiten  $\text{K}^+$ -Stromaktivierung im Whole-Cell Modus sind nicht auf eine Inaktivierung der  $\text{K}^+$ -Kanäle zurückzuführen. Jeweils identische, transiente  $\text{K}^+$ -Stromaktivierungen treten auf, wenn S1P und LPA bzw. LPA und S1P nacheinander appliziert werden. Dieser Befund weist darauf hin, dass S1P und LPA bezüglich der  $\text{K}^+$ -Stromaktivierung keine Cross-Desensibilisierung zeigen.

In C3H10T1/2-Mäusefibroblasten, die die nicht-rezeptorgekoppelte Proteintyrosinkinase c-Src überexprimieren, ist die Amplitude des S1P-induzierten  $\text{K}^+$ -Stroms fast doppelt so hoch wie in den Kontrollzellen. Die Expression einer nicht-myristilierbaren c-Src Mutante führt zu einer weiteren Erhöhung der  $\text{K}^+$ -Stromantwort, während die Expression einer Kinase-defekten c-Src Mutante die Stromantwort auf 43 % des Kontrollwertes reduziert. Diese Daten zeigen, dass S1P in Mäusefibroblasten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle über eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, in die c-Src eingeschaltet ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass c-Src auch für die  $\text{K}^+$ -Kanalaktivierung durch LPA eine entscheidende Rolle spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass LPA in glatten Gefäßmuskelzellen (A7r5) einen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom inhibiert. Pertussistoxin (PTX) vermindert signifikant die LPA-induzierte Blockade dieses Stroms, was auf die Beteiligung eines PTX-sensitiven G-Proteins schließen lässt. Das für L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme typische elektrophysiologische Profil wurde nur an solchen A7r5-Zellen gefunden, die vollkommen isoliert lagen und keinen Membrankontakt zu Nachbarzellen hatten. In weiteren Experimenten muss nun untersucht werden, in welche biologischen Prozesse die S1P- und LPA-modulierten Ionenkanäle eingebunden sind.

## 6 Summary

The present study shows for the first time that in NIH3T3 and C3H10T1/2 mouse fibroblasts sphingosine-1-phosphate (S1P) transiently activates a voltage-independent,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  current that can be completely blocked by charybdotoxin, margatoxin, and iberiotoxin. The  $\text{K}^+$  current activation leads to a large membrane hyperpolarization. The S1P-activated  $\text{K}^+$  current has identical electrophysiological and pharmacological properties compared to the lysophosphatidic acid (LPA)-activated  $\text{K}^+$  current in NIH3T3 cells. In the whole-cell recording mode, only the first application of S1P leads to a transient  $\text{K}^+$  current activation, whereas in the cell-attached recording mode several transient  $\text{K}^+$  current activations are possible. The transient current response and the failure of S1P to evoke a second  $\text{K}^+$  current response in the whole-cell recording mode are not due to an inactivation of  $\text{K}^+$  channels. Identical transient  $\text{K}^+$  current activations are evoked when S1P and LPA or LPA and S1P are applied consecutively. These findings indicate that in the case of  $\text{K}^+$  current activation no cross-desensitization occurs by S1P and LPA.

In C3H10T1/2 mouse fibroblasts that overexpress the non-receptor protein tyrosine kinase c-Src, the amplitude of the S1P-induced  $\text{K}^+$  current is almost doubled compared to the one found in control cells. Expression of a non-myristylated c-Src mutant leads to a further increase in the  $\text{K}^+$  current response, whereas expression of a kinase-defective c-Src mutant reduces it to 43 % compared to the control value. These data show that S1P activates  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels in mouse fibroblasts via an intracellular signalling pathway that involves c-Src. Furthermore, it was demonstrated that c-Src plays also an crucial role for the  $\text{K}^+$  channel activation by LPA.

A further finding of the present study is that in vascular smooth muscle cells (A7r5) LPA inhibits an L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current. Pertussis toxin (PTX) significantly reduces the LPA-induced block of this current, which indicates the involvement of a PTX-sensitive G protein. The typical electrophysiological profile of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels was only found in A7r5 cells lying completely isolated without any contacts to neighbouring cells.

In further experiments it should be investigated in which biological activities the S1P- and LPA-modulated ion channels are involved.

## 7 Literatur

- Ackerman M. J. & Clapham D. E. (1997) Ion channels - basic science and clinical disease. *N Engl J Med*, **336**, 1575-1586.
- Adachi-Akahane S. & Nagao T. (2000) Ca<sup>2+</sup> channel antagonists. In: *Pharmacology of ionic channel function: activators and inhibitors*. (Endo M., Kurachi Y. & Mishina M., ed.), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 119-154.
- Akaike N., Kanaide H., Kuga T., Nakamura M., Sadoshima J. & Tomoike H. (1989) Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *J Physiol*, **416**, 141-160.
- Alemanly R., Meyer zu Heringdorf D., van Koppen C. J. & Jakobs K. H. (1999) Formyl peptide receptor signaling in HL-60 cells through sphingosine kinase. *J Biol Chem*, **274**, 3994-3999.
- An S., Zheng Y. & Bleu T. (2000) Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. *J Biol Chem*, **275**, 288-296.
- Auge N., Nikolova-Karakashian M., Carpentier S., Parthasarathy S., Negre-Salvayre A., Salvayre R., Merrill A. H., Jr. & Levade T. (1999) Role of sphingosine 1-phosphate in the mitogenesis induced by oxidized low density lipoprotein in smooth muscle cells via activation of sphingomyelinase, ceramidase, and sphingosine kinase. *J Biol Chem*, **274**, 21533-21538.
- Barry P. H. & Lynch J. W. (1991) Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol*, **121**, 101-117.
- Bergsman J. B., Wheeler D. B. & Tsien R. W. (2000) Classification and function of voltage-gated calcium channels. In: *Pharmacology of ionic channel function: activators and inhibitors*. (Endo M., Kurachi Y. & Mishina M., ed.), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 55-85.
- Berliner J. A., Navab M., Fogelman A. M., Frank J. S., Demer L. L., Edwards P. A., Watson A. D. & Lusis A. J. (1995) Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*, **91**, 2488-2496.
- Berridge M. J., Bootman M. D. & Roderick H. L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 517-529.
- Bischoff A., Czyborra P., Fetscher C., Meyer zu Heringdorf D., Jakobs K. H. & Michel M. C. (2000a) Sphingosine-1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine constrict renal and mesenteric microvessels *in vitro*. *Br J Pharmacol*, **130**, 1871-1877.
- Bischoff A., Czyborra P., Meyer zu Heringdorf D., Jakobs K. H. & Michel M. C. (2000b) Sphingosine-1-phosphate reduces rat renal and mesenteric blood flow *in vivo* in a pertussis toxin-sensitive manner. *Br J Pharmacol*, **130**, 1878-1883.

- Bischoff A., Finger J. & Michel M. C. (2001) Nifedipine inhibits sphingosine-1-phosphate-induced renovascular contraction *in vitro* and *in vivo*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **364**, 179-182.
- Bokoch G. M., Katada T., Northup J. K., Hewlett E. L. & Gilman A. G. (1983) Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J Biol Chem*, **258**, 2072-2075.
- Bolton T. B., Prestwich S. A., Zholos A. V. & Gordienko D. V. (1999) Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu Rev Physiol*, **61**, 85-115.
- Breitwieser G. E. (1996) Mechanisms of K<sup>+</sup> channel regulation. *J Membr Biol*, **152**, 1-11.
- Bunemann M., Brandts B., Meyer zu Heringdorf D., van Koppen C. J., Jakobs K. H. & Pott L. (1995) Activation of muscarinic K<sup>+</sup> current in guinea-pig atrial myocytes by sphingosine-1-phosphate. *J Physiol*, **489 (Pt 3)**, 701-777.
- Catterall W. A., Striessnig J., Snutch T. P. & Perez-Reyes E. (2003) International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev*, **55**, 579-581.
- Choi O. H., Kim J. H. & Kinet J. P. (1996) Calcium mobilization via sphingosine kinase in signalling by the FcεRI antigen receptor. *Nature*, **380**, 634-636.
- Chun J., Goetzl E. J., Hla T., Igarashi Y., Lynch K. R., Moolenaar W., Pyne S. & Tigyi G. (2002) International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*, **54**, 265-269.
- Chuprun J. K., Raymond J. R. & Blackshear P. J. (1997) The heterotrimeric G protein Gα<sub>i2</sub> mediates lysophosphatidic acid-stimulated induction of the *c-fos* gene in mouse fibroblasts. *J Biol Chem*, **272**, 773-781.
- Crespo P., Xu N., Simonds W. F. & Gutkind J. S. (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein βγ subunits. *Nature*, **369**, 418-420.
- Cuvillier O., Pirianov G., Kleuser B., Vanek P. G., Coso O. A., Gutkind S. & Spiegel S. (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, **381**, 800-803.
- Czirjak G., Petheo G. L., Spat A. & Enyedi P. (2001) Inhibition of TASK-1 potassium channel by phospholipase C. *Am J Physiol Cell Physiol*, **281**, C700-708.
- de Weille J. R., Schweitz H., Maes P., Tartar A. & Lazdunski M. (1991) Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 2437-2440.
- Decker K. (1999) Aktivierung eines Ca<sup>2+</sup>-abhängigen, spannungsunabhängigen K<sup>+</sup>-Kanals in Mäusefibroblasten durch die onkogene Rezeptortyrosinkinase des

Katzensarkomvirus. *Dissertationsarbeit am Fachbereich Physik der Justus-Liebig-Universität Gießen.*

- Decker K., Koschinski A., Trouliaris S., Tamura T., Dreyer F. & Repp H. (1998) Activation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  current by the oncogenic receptor protein tyrosine kinase v-Fms in mouse fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **357**, 378-384.
- Draheim H. J., Repp H. & Dreyer F. (1995) Src-transformation of mouse fibroblasts induces a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  current without changing the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  current. *Biochim Biophys Acta*, **1269**, 57-63.
- Dreyer F. (1990) Peptide toxins and potassium channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **115**, 93-136.
- Durieux M. E., Carlisle S. J., Salafranca M. N. & Lynch K. R. (1993) Responses to sphingosine-1-phosphate in *X. laevis* oocytes: similarities with lysophosphatidic acid signaling. *Am J Physiol*, **264**, C1360-1364.
- Durieux M. E., Salafranca M. N., Lynch K. R. & Moorman J. R. (1992) Lysophosphatidic acid induces a pertussis toxin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  current in *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol*, **263**, C896-900.
- Fernhout B. J., Dijcks F. A., Moolenaar W. H. & Ruigt G. S. (1992) Lysophosphatidic acid induces inward currents in *Xenopus laevis* oocytes; evidence for an extracellular site of action. *Eur J Pharmacol*, **213**, 313-315.
- Fish R. D., Sperti G., Colucci W. S. & Clapham D. E. (1988) Phorbol ester increases the dihydropyridine-sensitive calcium conductance in a vascular smooth muscle cell line. *Circ Res*, **62**, 1049-1054.
- Ford J. W., Stevens E. B., Treherne J. M., Packer J. & Bushfield M. (2002) Potassium channels: gene family, therapeutic relevance, high-throughput screening technologies and drug discovery. *Prog Drug Res*, **58**, 133-168.
- Fromm C., Coso O. A., Montaner S., Xu N. & Gutkind J. S. (1997) The small GTP-binding protein Rho links G protein-coupled receptors and  $\text{G}\alpha_{12}$  to the serum response element and to cellular transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10098-10103.
- Fukami K. & Takenawa T. (1992) Phosphatidic acid that accumulates in platelet-derived growth factor-stimulated Balb/c 3T3 cells is a potential mitogenic signal. *J Biol Chem*, **267**, 10988-10993.
- Fukushima N. & Chun J. (2001) The LPA receptors. *Prostaglandins*, **64**, 21-32.
- Gaits F., Li R. Y., Bigay J., Ragab A., Ragab-Thomas M. F. & Chap H. (1996) G-protein  $\beta\gamma$  subunits mediate specific phosphorylation of the protein-tyrosine phosphatase SH-PTP1 induced by lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, **271**, 20151-20155.

- Garcia M. L., Hanner M. & Kaczorowski G. J. (1998) Scorpion toxins: tools for studying K<sup>+</sup> channels. *Toxicon*, **36**, 1641-1650.
- Garcia-Calvo M., Leonard R. J., Novick J., Stevens S. P., Schmalhofer W., Kaczorowski G. J. & Garcia M. L. (1993) Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem*, **268**, 18866-18874.
- Gennero I., Xuereb J. M., Simon M. F., Girolami J. P., Bascands J. L., Chap H., Boneu B. & Sie P. (1999) Effects of lysophosphatidic acid on proliferation and cytosolic Ca<sup>2+</sup> of human adult vascular smooth muscle cells in culture. *Thromb Res*, **94**, 317-326.
- Gerrard J. M. & Robinson P. (1989) Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim Biophys Acta*, **1001**, 282-285.
- Ghosh S., Strum J. C. & Bell R. M. (1997) Lipid biochemistry: functions of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling. *Faseb J*, **11**, 45-50.
- Gimenez-Gallego G., Navia M. A., Reuben J. P., Katz G. M., Kaczorowski G. J. & Garcia M. L. (1988) Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 3329-3333.
- Goetzl E. J. & An S. (1998) Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *Faseb J*, **12**, 1589-1598.
- Gohla A., Harhammer R. & Schultz G. (1998) The G-protein G<sub>13</sub> but not G<sub>12</sub> mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J Biol Chem*, **273**, 4653-4659.
- Graler M. H. & Goetzl E. J. (2002) Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity. *Biochim Biophys Acta*, **1582**, 168-174.
- Grant A. O. (2000) Sodium channel blockers and activators. In: *Pharmacology of ionic channel function: activators and inhibitors*. (Endo M., Kurachi Y. & Mishina M., ed.), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 27-51.
- Gueguen G., Gaige B., Grevy J. M., Rogalle P., Bellan J., Wilson M., Klæbe A., Pont F., Simon M. F. & Chap H. (1999) Structure-activity analysis of the effects of lysophosphatidic acid on platelet aggregation. *Biochemistry*, **38**, 8440-8450.
- Guo J., MacDonell K. L. & Giles W. R. (1999) Effects of sphingosine 1-phosphate on pacemaker activity in rabbit sino-atrial node cells. *Pflugers Arch*, **438**, 642-648.
- Hagiwara S. & Takahashi K. (1967) Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane. *J Gen Physiol*, **50**, 583-601.

- Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B. & Sigworth F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, **391**, 85-100.
- Hart M. J., Jiang X., Kozasa T., Roscoe W., Singer W. D., Gilman A. G., Sternweis P. C. & Bollag G. (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by  $G\alpha_{13}$ . *Science*, **280**, 2112-2114.
- Hille B. (2001). Ion channels of excitable membranes. 3<sup>rd</sup> edition, *Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts*.
- Himmel H. M., Meyer zu Heringdorf D., Graf E., Dobrev D., Kortner A., Schuler S., Jakobs K. H. & Ravens U. (2000) Evidence for Edg-3 receptor-mediated activation of  $I_{K,ACH}$  by sphingosine-1-phosphate in human atrial cardiomyocytes. *Mol Pharmacol*, **58**, 449-454.
- Hla T. (2001) Sphingosine 1-phosphate receptors. *Prostaglandins*, **64**, 135-142.
- Hofman F. & Klugbauer N. (2000) Structure of the voltage-dependent L-type calcium channel. In: *Pharmacology of ionic channel function: activators and inhibitors*. (Endo M., Kurachi Y. & Mishina M., ed.) Berlin, Heidelberg, New York, 87 - 117.
- Howe L. R. & Marshall C. J. (1993) Lysophosphatidic acid stimulates mitogen-activated protein kinase activation via a G-protein-coupled pathway requiring  $p21^{ras}$  and  $p74^{raf-1}$ . *J Biol Chem*, **268**, 20717-20720.
- Huang Y. & Rane S. G. (1994) Potassium channel induction by the Ras/Raf signal transduction cascade. *J Biol Chem*, **269**, 31183-31189.
- Igarashi Y. & Yatomi Y. (1998) Sphingosine 1-phosphate is a blood constituent released from activated platelets, possibly playing a variety of physiological and pathophysiological roles. *Acta Biochim Pol*, **45**, 299-309.
- Ishii T. M., Silvia C., Hirschberg B., Bond C. T., Adelman J. P. & Maylie J. (1997) A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11651-11656.
- Ito Y., Ponnappan U. & Lipschitz D. A. (1996) Excess formation of lysophosphatidic acid with age inhibits myristic acid-induced superoxide anion generation in intact human neutrophils. *FEBS Lett*, **394**, 149-152.
- Jainchill J. L., Aaronson S. A. & Todaro G. J. (1969) Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol*, **4**, 549-553.
- Jensen B. S., Strobaek D., Christophersen P., Jorgensen T. D., Hansen C., Silahatoglu A., Olesen S. P. & Ahring P. K. (1998) Characterization of the cloned human intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel. *Am J Physiol*, **275**, C848-856.

- Jiang J., Backx P. H., Teoh H. & Ward M. E. (2003) Role of Cl<sup>-</sup> currents in rat aortic smooth muscle activation by prostaglandin F<sub>2α</sub>. *Eur J Pharmacol*, **481**, 133-140.
- Joiner W. J., Wang L. Y., Tang M. D. & Kaczmarek L. K. (1997) hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11013-11018.
- Jones S. M. & Ribera A. B. (1994) Overexpression of a potassium channel gene perturbs neural differentiation. *J Neurosci*, **14**, 2789-2799.
- Jones S. W. (1998) Overview of voltage-dependent calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*, **30**, 299-312.
- Kaczorowski G. J. & Garcia M. L. (1999) Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Chem Biol*, **3**, 448-458.
- Khanna R., Chang M. C., Joiner W. J., Kaczmarek L. K. & Schlichter L. C. (1999) hSK4/hIK1, a calmodulin-binding K<sub>Ca</sub> channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J Biol Chem*, **274**, 14838-14849.
- Kimes B. W. & Brandt B. L. (1976) Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp Cell Res*, **98**, 349-366.
- Kluk M. J. & Hla T. (2001) Role of the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res*, **89**, 496-502.
- Knaus H. G., Koch R. O., Eberhart A., Kaczorowski G. J., Garcia M. L. & Slaughter R. S. (1995) [<sup>125</sup>I]margatoxin, an extraordinarily high affinity ligand for voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *Biochemistry*, **34**, 13627-13634.
- Kobayashi T., Yamano S., Murayama S., Ishikawa H., Tokumura A. & Aono T. (1994) Effect of lysophosphatidic acid on the preimplantation development of mouse embryos. *FEBS Lett*, **351**, 38-40.
- Koschinski A. (2001) Eigenschaften, Regulation und physiologische Bedeutung eines durch Lysophosphatidsäure aktivierbaren calciumabhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumkanals in murinen und humanen Zellen. *Dissertationsarbeit am Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen*.
- Kuga T., Kobayashi S., Hirakawa Y., Kanaide H. & Takeshita A. (1996) Cell cycle-dependent expression of L- and T-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res*, **79**, 14-19.
- Kuga T., Sadoshima J., Tomoike H., Kanaide H., Akaike N. & Nakamura M. (1990) Actions of Ca<sup>2+</sup> antagonists on two types of Ca<sup>2+</sup> channels in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res*, **67**, 469-480.

- Kuriyama H., Kitamura K., Itoh T. & Inoue R. (1998) Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. *Physiol Rev*, **78**, 811-920.
- Kuriyama H., Kitamura K. & Nabata H. (1995) Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol Rev*, **47**, 387-573.
- Lee M. J., van Brocklyn J. R., Thangada S., Liu C. H., Hand A. R., Menzeleev R., Spiegel S. & Hla T. (1998) Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science*, **279**, 1552-1555.
- Logsdon N. J., Kang J., Togo J. A., Christian E. P. & Aiyar J. (1997) A novel gene, *hKCa4*, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem*, **272**, 32723-32726.
- Lotshaw D. P. & Sheehan K. A. (1999) Divalent cation permeability and blockade of  $\text{Ca}^{2+}$ -permeant non-selective cation channels in rat adrenal zona glomerulosa cells. *J Physiol*, **514 (Pt 2)**, 397-411.
- Luttrell L. M., Della Rocca G. J., van Biesen T., Luttrell D. K. & Lefkowitz R. J. (1997)  $\text{G}\beta\gamma$  subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem*, **272**, 4637-4644.
- Luttrell L. M., Hawes B. E., van Biesen T., Luttrell D. K., Lansing T. J. & Lefkowitz R. J. (1996) Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and  $\text{G}\beta\gamma$  subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, **271**, 19443-19450.
- Lynch K. R. & Im D. S. (1999) Life on the edge. *Trends Pharmacol Sci*, **20**, 473-475.
- Maceyka M., Payne S. G., Milstien S. & Spiegel S. (2002) Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, **1585**, 193-201.
- Malhi H., Irani A. N., Rajvanshi P., Suadican S. O., Spray D. C., McDonald T. V. & Gupta S. (2000)  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting. *J Biol Chem*, **275**, 26050-26057.
- Marks T. N., Dubyak G. R. & Jones S. W. (1990) Calcium currents in the A7r5 smooth muscle-derived cell line. *Pflugers Arch*, **417**, 433-439.
- Mauco G., Chap H., Simon M. F. & Douste-Blazy L. (1978) Phosphatidic and lysophosphatidic acid production in phospholipase C- and thrombin-treated platelets. Possible involvement of a platelet lipase. *Biochimie*, **60**, 653-661.
- Meyer zu Heringdorf D., Lass H., Alemany R., Laser K. T., Neumann E., Zhang C., Schmidt M., Rauen U., Jakobs K. H. & van Koppen C. J. (1998) Sphingosine kinase-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signalling by G-protein-coupled receptors. *Embo J*, **17**, 2830-2837.

- Moolenaar W. H. (1995) Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem*, **270**, 12949-12952.
- Moolenaar W. H. (1999) Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res*, **253**, 230-238.
- Neer E. J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, **80**, 249-257.
- Neher E. (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol*, **207**, 123-131.
- Noh S. J., Kim M. J., Shim S. & Han J. K. (1998) Different signaling pathway between sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid in *Xenopus* oocytes: functional coupling of the sphingosine-1-phosphate receptor to PLC- $\alpha$  in *Xenopus* oocytes. *J Cell Physiol*, **176**, 412-423.
- Okajima F., Tomura H., Sho K., Kimura T., Sato K., Im D. S., Akbar M. & Kondo Y. (1997) Sphingosine 1-phosphate stimulates hydrogen peroxide generation through activation of phospholipase C-Ca<sup>2+</sup> system in FRTL-5 thyroid cells: possible involvement of guanosine triphosphate-binding proteins in the lipid signaling. *Endocrinology*, **138**, 220-229.
- Olivera A. & Spiegel S. (1993) Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*, **365**, 557-560.
- Ordway R. W., Petrou S., Kirber M. T., Walsh J. V. J. & Singer J. J. (1995) Stretch activation of a toad smooth muscle K<sup>+</sup> channel may be mediated by fatty acids. *J Physiol*, **484 (Pt 2)**, 331-337.
- Pages C., Simon M. F., Valet P. & Saulnier-Blache J. S. (2001) Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **64**, 1-10.
- Patil N., Cox D. R., Bhat D., Faham M., Myers R. M. & Peterson A. S. (1995) A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nat Genet*, **11**, 126-129.
- Petrou S., Ordway R. W., Kirber M. T., Dopico A. M., Hamilton J. A., Walsh J. V. J. & Singer J. J. (1995) Direct effects of fatty acids and other charged lipids on ion channel activity in smooth muscle cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **52**, 173-178.
- Pidoplichko V. I. & Verkhatskii A. N. (1989) [Frequency-related blocking of sodium channels in the membrane of isolated rat cardiomyocytes by the calcium antagonist verapamil]. *Fiziol Zh*, **35**, 87-89.
- Postma F. R., Jalink K., Hengeveld T., Bot A. G., Alblas J., de Jonge H. R. & Moolenaar W. H. (1996a) Serum-induced membrane depolarization in quiescent fibroblasts: activation of a chloride conductance through the G protein-coupled LPA receptor. *Embo J*, **15**, 63-72.

- Postma F. R., Jalink K., Hengeveld T. & Moolenaar W. H. (1996b) Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor. *Embo J*, **15**, 2388-2392.
- Pyne S. & Pyne N. (2000a) Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, **88**, 115-131.
- Pyne S. & Pyne N. J. (1996) The differential regulation of cyclic AMP by sphingomyelin-derived lipids and the modulation of sphingolipid-stimulated extracellular signal regulated kinase-2 in airway smooth muscle. *Biochem J*, **315 (Pt 3)**, 917-923.
- Pyne S. & Pyne N. J. (2000b) Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J*, **349**, 385-402.
- Rader R. K., Kahn L. E., Anderson G. D., Martin C. L., Chinn K. S. & Gregory S. A. (1996) T cell activation is regulated by voltage-dependent and calcium-activated potassium channels. *J Immunol*, **156**, 1425-1430.
- Rakhit S., Conway A. M., Tate R., Bower T., Pyne N. J. & Pyne S. (1999) Sphingosine 1-phosphate stimulation of the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway in airway smooth muscle. Role of endothelial differentiation gene 1, c-Src tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J*, **338 (Pt 3)**, 643-649.
- Repp H., Koschinski A., Decker K. & Dreyer F. (1998) Activation of a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> current in mouse fibroblasts by lysophosphatidic acid requires a pertussis toxin-sensitive G protein and Ras. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **358**, 509-517.
- Resh M. D. (1990) Membrane interactions of pp60<sup>v-src</sup>: a model for myristylated tyrosine protein kinases. *Oncogene*, **5**, 1437-1444.
- Rizza C., Leitinger N., Yue J., Fischer D. J., Wang D. A., Shih P. T., Lee H., Tigyi G. & Berliner J. A. (1999) Lysophosphatidic acid as a regulator of endothelial/leukocyte interaction. *Lab Invest*, **79**, 1227-1235.
- Schumacher P. A., Sakellaropoulos G., Phipps D. J. & Schlichter L. C. (1995) Small-conductance chloride channels in human peripheral T lymphocytes. *J Membr Biol*, **145**, 217-232.
- Schwab A. & Oberleithner H. (1996) Plasticity of renal epithelial cells: the way a potassium channel supports migration. *Pflugers Arch*, **432**, R87-93.
- Schwab A., Wojnowski L., Gabriel K. & Oberleithner H. (1994) Oscillating activity of a Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel. A prerequisite for migration of transformed Madin-Darby canine kidney focus cells. *J Clin Invest*, **93**, 1631-1636.
- Schwartz S. M., Campbell G. R. & Campbell J. H. (1986) Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res*, **58**, 427-444.

- Schwartz S. M. & Reidy M. A. (1987) Common mechanisms of proliferation of smooth muscle in atherosclerosis and hypertension. *Hum Pathol*, **18**, 240-247.
- Seewald S., Sachinidis A., Dusing R., Ko Y., Seul C., Epping P. & Vetter H. (1997) Lysophosphatidic acid and intracellular signalling in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **130**, 121-131.
- Shen Z., Belinson J., Morton R. E. & Xu Y. (1998) Phorbol 12-myristate 13-acetate stimulates lysophosphatidic acid secretion from ovarian and cervical cancer cells but not from breast or leukemia cells. *Gynecol Oncol*, **71**, 364-368.
- Siess W., Zangl K. J., Essler M., Bauer M., Brandl R., Corrinth C., Bittman R., Tigyi G. & Aepfelbacher M. (1999) Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6931-6936.
- Song D. K., Earm Y. E. & Ho W. K. (1999) Blockade of the delayed rectifier K<sup>+</sup> currents,  $I_{Kr}$ , in rabbit sinoatrial node cells by external divalent cations. *Pflugers Arch*, **438**, 147-153.
- Spiegel S. (1999) Sphingosine 1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers. *J Leukoc Biol*, **65**, 341-344.
- Spiegel S. & Merrill A. H., Jr. (1996) Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *Faseb J*, **10**, 1388-1397.
- Spiegel S. & Milstien S. (1995) Sphingolipid metabolites: members of a new class of lipid second messengers. *J Membr Biol*, **146**, 225-237.
- Spiegel S. & Milstien S. (2000) Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett*, **476**, 55-57.
- Spiegel S. & Milstien S. (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 397-407.
- Swarthout J. T. & Walling H. W. (2000) Lysophosphatidic acid: receptors, signaling and survival. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 1978-1985.
- Thumser A. E., Voysey J. E. & Wilton D. C. (1994) The binding of lysophospholipids to rat liver fatty acid-binding protein and albumin. *Biochem J*, **301 (Pt 3)**, 801-806.
- Tigyi G. (2001) Physiological responses to lysophosphatidic acid and related glycerophospholipids. *Prostaglandins*, **64**, 47-62.
- Tigyi G., Hong L., Yakubu M., Parfenova H., Shibata M. & Leffler C. W. (1995) Lysophosphatidic acid alters cerebrovascular reactivity in piglets. *Am J Physiol*, **268**, H2048-2055.

- Tigyi G. & Miledi R. (1992) Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*, **267**, 21360-21367.
- Tokumura A., Fukuzawa K. & Tsukatani H. (1978) Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acids on the arterial blood pressure of different animal species. *Lipids*, **13**, 572-574.
- Tokumura A., Iimori M., Nishioka Y., Kitahara M., Sakashita M. & Tanaka S. (1994) Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Am J Physiol*, **267**, C204-210.
- Tomita T. & Iino S. (1994) Ionic channels in smooth muscle. In: *Pharmacology of smooth muscle*. (Szekeres L. & Papp J. G., ed.), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 35-56.
- Valet P., Pages C., Jeanneton O., Daviaud D., Barbe P., Record M., Saulnier-Blache J. S. & Lafontan M. (1998) Alpha<sub>2</sub>-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *J Clin Invest*, **101**, 1431-1438.
- van Brocklyn J. R., Lee M. J., Menzeleev R., Olivera A., Edsall L., Cuvillier O., Thomas D. M., Coopman P. J., Thangada S., Liu C. H., Hla T. & Spiegel S. (1998) Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the G<sub>i</sub>-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol*, **142**, 229-240.
- van Driessche W., Desmedt L., Desmedt P. & Simaels J. (1993) Poorly selective cation channels in apical membranes of epithelia. In: *Nonselective cation channels*. (Siemen D. & Hescheler J., ed.), Birkhäuser Verlag Berlin, 225-246.
- van Koppen C., Meyer zu Heringdorf M., Laser K. T., Zhang C., Jakobs K. H., Bunemann M. & Pott L. (1996) Activation of a high affinity G<sub>i</sub> protein-coupled plasma membrane receptor by sphingosine-1-phosphate. *J Biol Chem*, **271**, 2082-2087.
- van Renterghem C. & Lazdunski M. (1992) A small-conductance charybdotoxin-sensitive, apamin-resistant Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in aortic smooth muscle cells (A7r5 line and primary culture). *Pflugers Arch*, **420**, 417-423.
- van Renterghem C., Romey G. & Lazdunski M. (1988) Vasopressin modulates the spontaneous electrical activity in aortic cells (line A7r5) by acting on three different types of ionic channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9365-9369.
- Vergara C., Latorre R., Marrion N. V. & Adelman J. P. (1998) Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol*, **8**, 321-329.
- Voets T., Szucs G., Droogmans G. & Nilius B. (1995) Blockers of volume-activated Cl<sup>-</sup> currents inhibit endothelial cell proliferation. *Pflugers Arch*, **431**, 132-134.
- Watsky M. A. (1995) Lysophosphatidic acid, serum, and hyposmolarity activate Cl<sup>-</sup> currents in corneal keratocytes. *Am J Physiol*, **269**, C1385-1393.

- Willets J. M., Challiss R. A. & Nahorski S. R. (2003) Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? *Trends Pharmacol Sci*, **24**, 626-633.
- Wilson L. K., Luttrell D. K., Parsons J. T. & Parsons S. J. (1989) pp60<sup>c-src</sup> tyrosine kinase, myristylation, and modulatory domains are required for enhanced mitogenic responsiveness to epidermal growth factor seen in cells over-expressing *c-src*. *Mol Cell Biol*, **9**, 1536-1544.
- Wilson L. K. & Parsons S. J. (1990) Enhanced EGF mitogenic response is associated with enhanced tyrosine phosphorylation of specific cellular proteins in fibroblasts overexpressing *c-src*. *Oncogene*, **5**, 1471-1480.
- Wonderlin W. F. & Strobl J. S. (1996) Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol*, **154**, 91-107.
- Wu J., Spiegel S. & Sturgill T. W. (1995) Sphingosine 1-phosphate rapidly activates the mitogen-activated protein kinase pathway by a G protein-dependent mechanism. *J Biol Chem*, **270**, 11484-11488.
- Xia P., Gamble J. R., Rye K. A., Wang L., Hii C. S., Cockerill P., Khew-Goodall Y., Bert A. G., Barter P. J. & Vadas M. A. (1998) Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14196-14201.
- Yakubu M. A., Liliom K., Tigyi G. J. & Leffler C. W. (1997) Role of lysophosphatidic acid in endothelin-1- and hematoma-induced alteration of cerebral micro-circulation. *Am J Physiol*, **273**, R703-709.
- Yu S. P., Yeh C. H., Sensi S. L., Gwag B. J., Canzoniero L. M., Farhangrazi Z. S., Ying H. S., Tian M., Dugan L. L. & Choi D. W. (1997) Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science*, **278**, 114-117.
- Zamponi G. W., Bourinet E. & Snutch T. P. (1996) Nickel block of a family of neuronal calcium channels: subtype- and subunit-dependent action at multiple sites. *J Membr Biol*, **151**, 77-90.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Florian Dreyer für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und seine wertvolle, unermüdliche Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Er ist mir ein echter Doktor-Vater, der mich wissenschaftlich und menschlich hervorragend betreut hat. Ich danke ihm für seine immer konstruktive Kritik und die Schulung meiner Vortragstechnik.

Ich danke Herrn Dr. Holger Repp für seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Er war mir jedoch nicht nur für meine wissenschaftlichen Fragen ein aufmerksamer Ratgeber, sondern sorgte als „Sprachgenie“ des Labors mit seinem Wortwitz für so manch erheiternden Moment. Durch unsere Gespräche wurde „Saarländisch“ zu seiner liebsten Fremdsprache.

Danke sage ich Herrn Dr. Andreas Koschinski, der mir die „ersten Schritte“ des elektrophysiologischen Messens und der Zellkultivierung beibrachte. An ihn herangetragene Probleme wurden nie abgewiesen, sondern stets gleich gelöst. Seine frohgestimmte Laune hat wesentlich zur positiven Stimmung in unserem Labor beigetragen.

Danke möchte ich Frau Christiane Zibuschka sagen, die mir in besonders arbeitsintensiven Zeiten die Zellkultivierung und das Ansetzen von Puffern und Lösungen abgenommen hat.

Allen meinen Mitdotorandinnen und Mitdotoranden danke ich für die schöne gemeinsame Zeit, die wir im Labor miteinander verbracht haben. Wir haben viel gearbeitet und viel gelacht.

Ich danke meiner Schwester Sara dafür, dass sie die vorliegende Arbeit von so manchem Rechtschreibfehler befreit hat.

Meiner lieben Cordelia danke ich für ihr Verständnis. Geduldig hat sie mir für meine Arbeit den Rücken freigegeben und so mein Vorankommen unterstützt.

Ich danke meinen Eltern, die mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht haben. So ist die Anfertigung dieser Arbeit erst möglich geworden. Sie haben mich auf meinem Weg stets liebevoll begleitet.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Jan Alexander Birringer  
Anschrift: Karl-Keller-Str. 1  
35396 Gießen  
Geburtsdatum: 21.12.1973  
Geburtsort: St. Ingbert (Saarland)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

18.08.80 - 20.07.84 Grundschule St. Michael, Lebach  
03.09.84 - 22.06.93 Willi-Graf-Gymnasium, Saarbrücken  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### **Hochschulbildung**

01.04.95 - 04.11.03 Studium der Humanmedizin an der  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
27.03.97 Ärztliche Vorprüfung  
24.03.98 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
12.09.02 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04.11.03 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Berufsausbildung**

seit 01.05.04 Arzt im Praktikum in der Abteilung für Neurologie des  
Kreiskrankenhauses Siegen

## Promotionsarbeit

seit Mai 98                      Promotionsarbeit am Rudolf-Buchheim-Institut für  
Pharmakologie

## Stipendien und Auszeichnungen

22.06.93                      Buchpreis des Fonds der Chemischen Industrie  
(bestes Abitur im Fach Chemie)

09.02.96                      Teilnahme am Auswahlverfahren für Studienanfänger der  
Studienstiftung des Deutschen Volkes

Okt.99 – Aug.02              Stipendiat des Graduiertenkollegs "Molekulare Biologie und  
Pharmakologie" der Justus-Liebig-Universität Gießen

30.06.03 – 04.07.03        ausgewählter Teilnehmer an der 53. Nobelpreisträgertagung  
in Lindau

## Veröffentlichungen

Repp H., Birringer J., Koschinski A. & Dreyer F. (2001) Activation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  current in mouse fibroblasts by sphingosine-1-phosphate involves the protein tyrosine kinase c-Src. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **363**, 295-301

Repp H., Pamukci Z., Koschinski A., Domann E., Darji A., Birringer J., Brockmeier D., Chakraborty T., Dreyer F. (2002) Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable pores leading to intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *Cell Microbiol.* **4**, 483-491

Birringer J. (2002) Progerie-Syndrome. In: *Warum Lebewesen altern - Theorien und Modelle aus Biologie und Medizin.* Logos Verlag Berlin, ISBN 3-89722-817-3, 113-131