

# **Inhibition des TRPC3-Kationenkanals durch Lanthanidionen**

Von der Medizinischen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Christian Rudolf Halaszovich

aus

Aachen

Berichter: Herr Universitätsprofessor  
Dr.med. Andreas Lückhoff

Herr Universitätsprofessor  
Dr.med. Günther Schmalzing

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Januar 2004

**Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>3</b>
<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>4</b>
REGULATION VON CALCIUMEINSTROM UND -FREISETZUNG .....	4
DIE TRP-KANALFAMILIE .....	6
PHARMAKOLOGISCHE UND KLINISCHE BEDEUTUNG VON KANALBLOCKERN .....	9
PHARMAKOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES TRPC3-KANALS .....	11
ZIELSETZUNG DER STUDIE .....	12
<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>14</b>
AUFBAU DER STUDIE .....	14
ZELLKULTUR.....	14
PATCH-CLAMP EXPERIMENTE .....	15
<i>Whole-cell Experimente</i> .....	16
<i>Inside-out Experimente</i> .....	17
DATENAUSWERTUNG .....	18
FURA-2-EXPERIMENTE .....	19
<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>21</b>
WHOLE-CELL-EXPERIMENTE .....	21
INSIDE-OUT-EXPERIMENTE .....	24
FURA-2-EXPERIMENTE .....	29
<b>DISKUSSION</b> .....	<b>32</b>
<b>ANHANG A: DIE MITTLERE OFFENZEIT EINES IONENKANALS</b> .....	<b>38</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>41</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ARDS	adult respiratory distress syndrom
BDNF	brain-derived nerve growth factor
BSA	bovines Serumalbumin
CHO	Chinese hamster ovary
DAG	Diacylglycerol
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethyleneglycol- <i>bis</i> ( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic Acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid
IC <sub>50</sub>	Die in einer 50%igen Inhibition resultierende Inhibitorkonzentration.
I <sub>CRAC</sub>	calcium release activated current
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP <sub>3</sub> R	InsP <sub>3</sub> -Rezeptor
LGC	Ligandengesteuerter Kanal / ligand-gated channel
Me <sub>2</sub> SO	Dimethylsulfoxyd
MOT	mittlere Offenzeit / mean open time
NMDG	N-Methyl-D-glucamin
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl- <i>sn</i> -glycerol
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung / phosphate buffered saline
PLC	Phospholipase C
SMOC	second-messenger gesteuerter Kanal / second-messenger operated channel
SOC	speicherabhängiger Kanal / store-operated channel
SOCE	speicherabhängiger Calciumeinstrom / store-operated calcium entry
SR	sarcoplasmatisches Retikulum
TRP	transient receptor potential
TRPC	TRP Kanal
TRPL	TRP like
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ex}$	Exzitationswellenlänge

## **Einleitung**

### ***Regulation von Calciumeinstrom und -freisetzung***

Die kontrollierte Erhöhung der intrazellulären freien Calciumkonzentration spielt eine wichtige Rolle für eine Vielzahl von Zellfunktionen, wie z.B. die Regulation der Genexpression, die Aktivierung von Granulozyten, Steuerung der Kontraktion von Muskelzellen, Freisetzung von Neurotransmittern etc.

In elektrisch erregbaren Zellen, wie z.B. quergestreiften Muskelzellen, ist das wichtigste Signal zur Erhöhung der Calciumkonzentration die Depolarisation der Zellmembran, die zur Öffnung von spannungsabhängigen Ionenkanälen in der Zellmembran führt; im Beispiel der Muskelzelle sind dies im wesentlichen die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Extrazellulärraum in die Zelle strömen können. Eine weitere Quelle für  $\text{Ca}^{2+}$  sind neben dem Extrazellulärraum intrazelluläre Calciumspeicher, wie z.B. das sarcoplasmatische Retikulum (SR). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung hieraus wird durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Membran des SR kontrolliert, die im Falle der Skelettmuskelzelle durch direkte Interaktion mit dem L-Typ Kanal geöffnet werden, im Falle der Herzmuskelzelle durch die erhöhte Calciumkonzentration im Sarcoplasma; im letztgenannten Fall spricht man von calciumabhängiger Calciumfreisetzung.

In nichterregbaren Zellen existiert eine Vielzahl von Mechanismen, um die cytoplasmatische Calciumkonzentration sowohl durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär als auch durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern zu erhöhen bzw. um den Einstrom und die Freisetzung zu kontrollieren. Ein gut untersuchter Signalweg, der die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern kontrolliert, wird initiiert durch die Stimulation von an eine Phospholipase C (PLC) gekoppelten membranständigen Rezeptoren, woraufhin die Phospholipase

Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat in die *second-messenger* Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP<sub>3</sub>) spaltet. InsP<sub>3</sub> bewirkt durch Bindung an den InsP<sub>3</sub>-Rezeptor (IP<sub>3</sub>R), der ein ligandengesteuerter Ca<sup>2+</sup>-Kanal ist, eine Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), das einen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher darstellt. Dem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem Extrazellulärraum dienen in nichterregbaren Zellen Ca<sup>2+</sup>-permeable Kanäle in der Zellmembran, die sich folgenden Gruppen zuordnen lassen: ligandengesteuerte Kanäle (*ligand-gated channel* / LGC), *second-messenger* gesteuerte Kanäle (SMOC) und speicherabhängige Kanäle (*store-operated channel* / SOC). Ligandengesteuerte Kanäle öffnen nach Bindung eines spezifischen Liganden, bei dem es sich z.B. um einen Botenstoff handeln kann. SMOCs ähneln vorgenannten Kanälen, nur dass der Ligand in diesem Fall ein *second-messenger* ist. Die speicherabhängigen Kanäle werden geöffnet als Folge der Entleerung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher, der folgende Ca<sup>2+</sup>-Einstrom wird als speicherabhängiger Calci-umeinstrom (*store-operated calcium entry* / SOCE) bezeichnet.

Obleich ein SOCE in nahezu allen nichterregbaren Zellen, an denen entsprechende Untersuchungen durchgeführt wurden, nachweisbar war und er in diesen Zellen vermutlich für den wesentlichen Anteil des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms verantwortlich ist (Putney, Jr. und McKay, 1999), sind die molekularen Grundlagen des SOCE bis heute weitgehend ungeklärt, sowohl hinsichtlich der Identität der zugrunde liegenden Ionenkanäle als auch hinsichtlich des Aktivierungsmechanismus dieser Kanäle. Man kann wohl davon ausgehen, dass nicht nur ein einziger, universeller Mechanismus existiert, sondern dass eine Vielzahl von Aktivierungsmechanismen besteht, und dass verschiedene Kanäle eine Rolle spielen.

Ein Beispiel für einen elektrophysiologisch gut charakterisierten speicherabhängigen Strom ist der sogenannte I<sub>CRAC</sub> (*calcium release activated current*), der sowohl in Mastzellen (Hoth und Penner, 1992) als auch in Lymphozyten (Zweifach und Lewis, 1993) nachgewiesen

werden konnte. Nachdem Yue et al. (2001) zeigen konnten, dass CaT1, ein Mitglied der TRP-Kanalfamilie (s.u.), nach heterologer Expression viele Eigenschaften des  $I_{CRAC}$  zeigt, schien die molekulare Identität dieses Stroms zunächst geklärt. Jedoch stellten Voets et al. (2001) beim Vergleich weiterer Kanaleigenschaften essenzielle Unterschiede zwischen  $I_{CRAC}$  und CaT1 fest. Die Identität des  $I_{CRAC}$  muss also nach wie vor als ungeklärt gelten.

Insbesondere die Frage, wie der Füllungsstatus der intrazellulären Speicher zu den SOCs kommuniziert wird, bleibt vorerst unbeantwortet. Diskutierte Mechanismen sind die direkte Protein-Protein-Interaktion, die Bildung eines „*calcium-influx-factor*“ sowie die Insertion von Kanälen in die Plasmamembran, vergleichbar der Regulation des Glucosetransports durch Modifikation der Anzahl von Glut 4 Glucosetransportern in der Zellmembran durch Exo- bzw. Endocytoseprozesse (Löffler und Petrides, 1997). Eine ausführliche Betrachtung hierzu ist in der Übersichtsarbeit von Zitt et al. (2002) zu finden. Neue Möglichkeiten zur Untersuchung dieses Phänomens ergaben sich aus der Entdeckung der Familie der TRP-homologen Ionenkanäle.

### ***Die TRP-Kanalfamilie***

Die Bezeichnung „TRP“ (*transient receptor potential*) leitet sich von einer Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* her, die im Elektretinogramm nach Lichtexposition im Gegensatz zum Wildtyp nur eine transiente Depolarisation zeigt (Pak et al., 1970). Da die langandauernde Depolarisation des Wildtyps durch  $Ca^{2+}$ -Einstrom verursacht wird (Hardie und Minke, 1992; Suss-Toby et al., 1991), wurde angenommen, dass das TRP-Genprodukt – sowie das Produkt des nahe verwandten TRPL-Gens (TRPL: *TRP like*) – einen  $Ca^{2+}$ -Kanal darstellt. Weiterführende Experimente konnten zeigen, dass die Expression von TRPL zu verstärktem  $Ca^{2+}$ -Einstrom nach Stimulation der PLC führt (Harteneck et al., 1995; Hu und Schilling, 1995). Die Expression von TRP schien hingegen zu einem verstärktem

Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nach Entleerung der intrazellulären Speicher durch Thapsigargin<sup>1</sup> zu führen (Petersen et al., 1995; Vaca et al., 1994), was TRP ebenfalls als einen potentiellen SOC erscheinen ließ. Dies erwies sich jedoch später als Irrtum (Acharya et al., 1997).

Die Entdeckung einer ganzen Familie TRP-homologer Gene im Genom von Säugern (Funayama et al., 1996; Philipp et al., 1996; Wes et al., 1995; Zhu et al., 1995; Zhu et al., 1996; Zitt et al., 1996) weckte die Hoffnung, endlich der molekularen Grundlage des speicherabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Einstroms näher gekommen zu sein. Für einige dieser TRP-Homologen konnte gezeigt werden, dass ihr Genprodukt Ca<sup>2+</sup>-Kanäle darstellt. Einige dieser Kanäle scheinen tatsächlich speicheroperiert zu sein, andere nicht oder der Mechanismus ihrer Aktivierung ist fraglich. Bezüglich weiterer Details zur TRP-Kanalfamilie sei auf einschlägige Übersichtsarbeiten verwiesen, z.B. (Zitt et al., 2002).

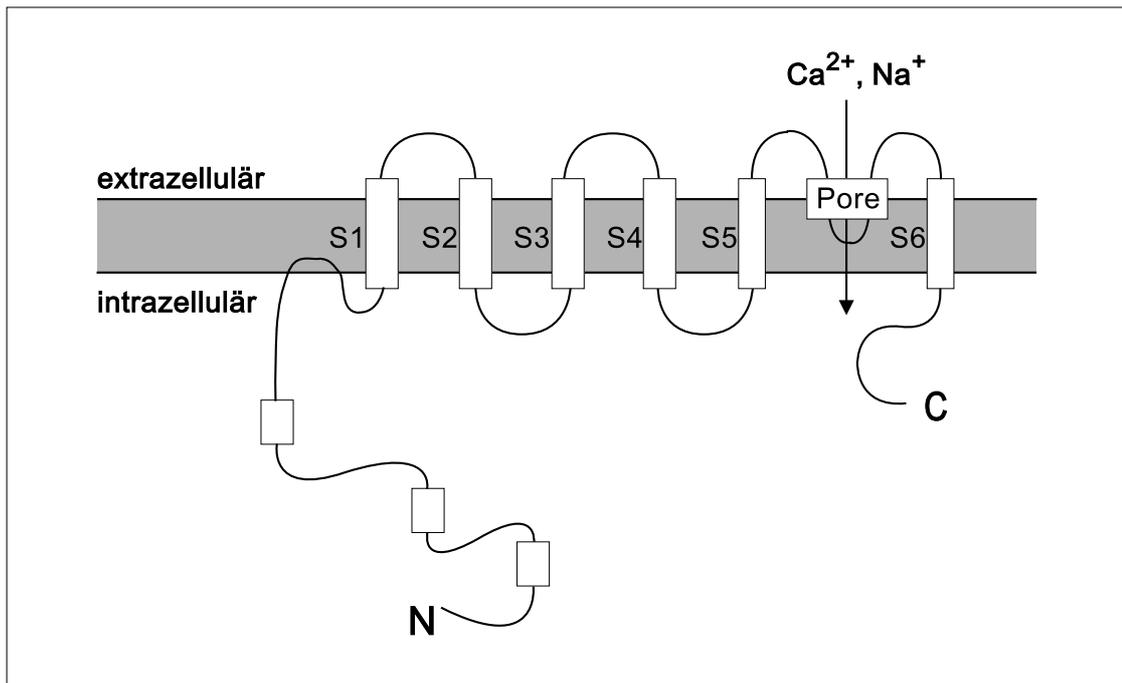
Erste Hinweise auf die physiologische Rolle der TRP-Kanäle finden sich z.B. in der Arbeit von Li et al. (1999), die eine Aktivierung des TRPC3-Kanals<sup>2</sup> in neuronalem Gewebe durch Stimulation des Neurotrophinrezeptors TrkB durch *BDNF* (*brain-derived nerve growth factor*) postulieren.

Ergebnisse von Experimenten mit TRPC4-defizienten Mäusen lassen diesen Kanal auch aus klinischer Sicht interessant erscheinen: So fanden Freichel et al. (2001) in diesen Tieren eine gestörte Vasorelaxation, die vermutlich auf einen durch das Fehlen des TRPC4-Kanals verminderten speicherabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in Endothelzellen zurückzuführen ist. Dieser Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ist notwendig für die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), das einen wesentlichen Faktor für die Relaxation der Gefäßmuskulatur darstellt. Die Arbeit von

---

<sup>1</sup> Thapsigargin führt über eine Hemmung der Ca<sup>2+</sup>-Pumpen des ER zu einer Speicherentleerung.

<sup>2</sup> Auch als TRP3 oder hTrp3 bezeichnet. Zur aktuellen Nomenklatur der TRP-Kanäle sei auf (Montell et al., 2002) verwiesen.



**Abbildung 1: TRPC3-Strukturmodell.** Das TRPC3-Kanalprotein weist sechs Transmembransegmente auf (S1–S6), die porenbildende Domäne ist zwischen den Segmenten S5 und S6 lokalisiert. Der N- sowie der C-Terminus des Proteins liegen intrazellulär.

Tirupathi et al. (2002) konnte eine verminderte thrombininduzierte Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität in der Lunge der TRPC4-defizienten Mäuse zeigen. Eine solche Permeabilitätszunahme mit Ausbildung eines interstitiellen Lungenödems ist für eine Reihe von pathologischen Zuständen von Bedeutung, als Beispiel sei das *Adult Respiratory Distress Syndrom (ARDS)* genannt (Moss und Roland Jr., 2001).

Für die Funktion von Granulocyten scheinen Kanäle der TRP-Familie eine wichtige Rolle zu spielen (Heiner et al., 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Mutation des TRPM6-Kanals für eine hereditäre Form der Hypomagnesiämie verantwortlich ist (Schlingmann et al., 2002).

Im Hinblick auf eine pharmakologische Beeinflussung der TRP-Kanäle sind genaue Kenntnisse über deren Regulation von großer Wichtigkeit. Auch wenn auf diesem Gebiet

beachtliche Fortschritte erzielt wurden, bleiben noch viele, z.T. irritierende Fragen offen. So sind im Falle des TRPC3-Kanals (Strukturmodell: s. Abb. 1) bezüglich der Regulation sehr widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht worden: Dieser ist zunächst als ein konstitutiv aktiver, speicherunabhängiger,  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierter Kanal beschrieben worden (Zitt et al., 1997), später jedoch auch als durch DAG reguliert (Hofmann et al., 1999), womit er zu den *second-messenger* regulierten Kanälen zählen würde. Andere Studien lassen ihn als speicherabhängig aktiviert erscheinen (Groschner et al., 1998; Preuss et al., 1997; Zhu et al., 1996). Zudem spielt die direkte Interaktion zwischen TRPC3 und  $\text{IP}_3\text{R}$ , vergleichbar der Kopplung von L-Typ Kanälen und Ryanodinrezeptoren in Skelettmuskelzellen, eine Rolle bei der Regulation des Kanals (Kiselyov et al., 1998; Kiselyov et al., 1999). Die Interaktionsstelle konnte im C-terminalen, ins Cytoplasma ragenden Teil des Kanalproteins lokalisiert werden (Boulay et al., 1999). Diese Interaktion scheint jedoch nicht als ein Hinweis auf eine speicherabhängige Aktivierung des TRPC3 verstanden werden zu können, da überexprimierte TRPC3-Kanäle nicht allein durch Speicherentleerung aktiviert werden können (Ma et al., 2000).

Diese Divergenzen könnten vermuten lassen, dass die exprimierten Kanäle in den jeweiligen Studien nicht identisch waren. Eine Möglichkeit, zu zeigen, dass tatsächlich die gleichen Kanäle untersucht wurden, wäre die Blockade der Kanäle im Experiment durch spezifische Kanalblocker. Eine erfolgreiche Kanalblockade durch diese Blocker wäre ein überzeugendes Argument dafür, dass die untersuchten Kanäle identisch sind.

### ***Pharmakologische und klinische Bedeutung von Kanalblockern***

Die Bedeutung von Kanalblockern lässt sich gut am Beispiel der sogenannten Calciumantagonisten abhandeln, bei denen es sich um spezifische Blocker des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals handelt. L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle gehören zur Gruppe der spannungsabhängigen Ionenkanäle und dienen in Muskelzellen hauptsächlich der Auslösung einer Muskelkontraktion als Antwort auf

die Depolarisation der Zellmembran. Wird ein Membranpotential von ca. -40 mV überschritten, öffnet der Kanal und  $\text{Ca}^{2+}$  kann aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmen. Dieser Calciumeinstrom ist insbesondere in Herzmuskelzellen und in glatten Muskelzellen entscheidend für die Auslösung der Kontraktion. In Herzmuskelzellen trägt der Calciumeinstrom durch L-Typ Kanäle zudem wesentlich zur Ausbildung und Weiterleitung des Aktionspotentials bei.

Die Calciumantagonisten lassen sich in drei Gruppen einteilen: 1. Dihydropyridine oder auch Nifedipin-Typ, 2. Benzothiazepine / Diltiazem-Typ und 3. Phenylalkylamine / Verapamil-Typ. Die Calciumantagonisten vom Nifedipin-Typ wirken vor allem auf die glatte Gefäßmuskulatur und werden therapeutisch hauptsächlich als Nachlastsenker eingesetzt (Förstermann, 1998). Calciumantagonisten vom Verapamil-Typ beeinflussen insbesondere die kardialen L-Typ Kanäle und haben dadurch eine negativ chronotrope, dromotrope und inotrope Wirkung, an der Gefäßmuskulatur dagegen ist ihre Wirkung relativ gering. Indikationen für den Einsatz dieser Calciumantagonisten sind vor allem supraventrikuläre Tachyarrhythmien (Schütz, 1998).<sup>3</sup> Die Calciumantagonisten vom Diltiazem-Typ lassen sich zwischen den beiden anderen Gruppen einordnen, da die Stärke ihrer Wirkung am Herzen und an der Gefäßmuskulatur vergleichbar ist.

Substanzen mit derart gut definierter Wirkung auf einen Ionenkanal sind selbstverständlich auch für die experimentelle Arbeit sehr interessant, da sich mit ihrer Hilfe Kanäle identifizieren lassen und entschieden werden kann, ob an im Experiment beobachteten Effekten L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle einen entscheidenden Anteil haben. Falls die fraglichen Effekte in

---

<sup>3</sup> Eine weniger bekannte Indikation für den Einsatz von Verapamil ist die Langzeittherapie des Clusterkopfschmerzes (Poeck und Hacke, 2001). Die extrakardiale Wirkung dieses Calciumantagonisten ist also nicht grundsätzlich vernachlässigbar.

Gegenwart von Calciumantagonisten aufgehoben sind, ist eine Beteiligung des L-Typ Kanals an diesen anzunehmen. So lassen sich viele Informationen über die physiologische Rolle der L-Typ Kanäle gewinnen.

Offensichtlich wären auch für die Erforschung der TRP-Kanäle spezifische Blocker wünschenswert, jedoch sind bisher keine bekannt. Aus diesem Grund muss in der TRP-Forschung auf unspezifische Kanalblocker ausgewichen werden, wie z.B. Lanthanidionen, insbesondere Lanthan- ( $\text{La}^{3+}$ ) und Gadolinium- ( $\text{Gd}^{3+}$ ) Ionen.  $\text{Gd}^{3+}$  wurde ursprünglich als spezifisch für dehnungsaktivierte Kationenkanäle angesehen, was jedoch widerlegt ist (Caldwell et al., 1998). Lanthanidionen können den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch verschiedene Kanäle blockieren; eine mögliche Identifizierung bestimmter Kanäle könnte auf Unterschieden in der Sensitivität dieser Kanäle gegenüber dem Kanalblocker beruhen. Die Untersuchung der physiologischen Rolle der TRP-Kanäle wird durch das Fehlen spezifischer Blocker verständlicherweise sehr erschwert.

### ***Pharmakologische Charakterisierung des TRPC3-Kanals***

In Ermangelung eines spezifischen Inhibitors wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen versucht, unspezifische Inhibitoren zur Charakterisierung bzw. Identifizierung des TRPC3 zu verwenden. Vielfach wurden hierzu als unspezifische anorganische  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker die Ionen der Lanthanide Gadolinium ( $\text{Gd}^{3+}$ ) und Lanthan ( $\text{La}^{3+}$ ) eingesetzt. Überraschenderweise sind bezüglich der Inhibition des TRPC3 durch Lanthanidionen deutlich unterschiedliche effektive Konzentrationen veröffentlicht worden: So benötigten Zhu et al. (1996)  $250 \mu\text{M La}^{3+}$ , um eine 30–40%ige Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch in COS-M6-Zellen exprimierte TRPC3 zu erreichen, für einen kompletten Block wurde eine Konzentration von 1 mM benötigt. Bei Expression in HEK293-Zellen benötigten dieselben Autoren nur

eine Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  für eine vollständige Blockade (Zhu et al., 1998). In *porcine-aortic-endothelial-cells* reichten hierzu 50  $\mu\text{M}$   $\text{La}^{3+}$  aus (Balzer et al., 1999).

Diese Unterschiede in den effektiven Konzentrationen können auf den ersten Blick Zweifel an der Identität der von den einzelnen Arbeitsgruppen untersuchten Kanäle aufkommen lassen. Bei weiteren Überlegungen zu den Diskrepanzen erscheint eine Kanalblockade von der intrazellulären Membranseite her denkbar. Die Überwindung der Zellmembran durch die Lanthanidionen wäre dann ein für den Wirkungseintritt entscheidender Schritt. Für Lokalanästhetika wird ein ähnlicher Mechanismus postuliert: Es wird angenommen, dass das Anästhetikum durch die Zellmembran diffundieren muss, um von der intrazellulären Seite her die im Bereich der Kanalpore vermutete Bindungsstelle zu erreichen; allerdings sind andere Mechanismen ebenfalls in der Diskussion (Butterworth und Strichartz, 1990; Hille, 2001; Schwarz et al., 1977; Strichartz, 1973).

Da in den fraglichen Studien unterschiedliche Zelltypen verwendet wurden und die Aufnahme von Lanthanidionen sowie die intrazelluläre Bindung dieser Ionen durchaus zelltypabhängig sein könnte, ließen sich so die Unterschiede in den veröffentlichten Ergebnissen erklären, da dann nicht die extra- sondern die intrazelluläre freie Inhibitorkonzentration entscheidend wäre.

### ***Zielsetzung der Studie***

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese der intrazellulären Blockade des TRPC3-Kanals durch Lanthan- und Gadoliniumionen untersucht werden.

Hierzu wurde die Inhibition von TRPC3-Kanälen durch  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  in *patch-clamp*-Experimenten in der sogenannten „*inside-out*“-Konfiguration untersucht und mit den Ergebnissen von *patch-clamp*-Experimenten in der „*whole-cell*“-Konfiguration verglichen. Dies erlaubt eine Unterscheidung zwischen intrazellulären und extrazellulären Effekten, da in der

*inside-out*-Konfiguration der Inhibitor auf die cytosolische Seite der Plasmamembran appliziert wird, in der *whole-cell*-Konfiguration hingegen auf die extrazelluläre Seite, da diese Seiten jeweils dem Badmedium ausgesetzt sind.

Um zu klären, inwieweit die beobachteten intrazellulären Effekte bei extrazellulärer Applikation des Blockers Bedeutung gewinnen können, sollte zudem die Aufnahme von Lanthanidionen durch den im Experiment benutzten Zelltyp (CHO-Zellen) untersucht werden.

## Material und Methoden

### *Aufbau der Studie*

Die Studie läßt sich wie folgt gliedern:

1. Bestimmung der Konzentrations-Inhibitions-Beziehungen auf Grundlage der Ergebnisse von *whole-cell-patch-clamp*-Experimenten an TRPC3-exprimierenden CHO-Zellen.
2. Qualitative Untersuchung der Inhibition von TRPC3 durch Gadoliniumionen an DAG-stimulierten TRPC3-Kanälen in *inside-out-patch-clamp*-Experimenten.
3. Bestimmung der Konzentrations-Inhibitions-Beziehungen auf Grundlage der Ergebnisse von *inside-out-patch-clamp*-Experimenten an TRPC3-exprimierenden CHO-Zellen ohne DAG-Stimulation.
4. Untersuchung der  $\text{La}^{3+}$ -Aufnahme durch native, d.h. nicht TRPC3-exprimierende CHO-Zellen in Fura-2-Experimenten.

Die Versuche zu 1. wurden hauptsächlich durch Herrn Eberhard Jüngling durchgeführt, die entsprechende statistische Auswertung hauptsächlich durch Herrn Dr. Christof Zitt. Die übrige Versuchsdurchführung und -auswertung erfolgte durch den Autor. Sofern nicht anders angegeben, wurden als Inhibitoren sowohl Gadolinium- als auch Lanthanionen untersucht.

### *Zellkultur*

CHO-Zellen wurden beschafft von der *Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* in Braunschweig. Diese wurden kultiviert in Ham's F12-Medium, dem 0,259 g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin und 10 % fetales Kälberserum zugesetzt wurden. Die Zellen wurden ausgesetzt auf Glasplättchen in einer Dichte von weniger als  $10^3$  Zellen /  $\text{mm}^2$ . Die Zellen wurden dann mit Hilfe des Transfast Transfektionsreagenz (Promega) mit TRPC3-

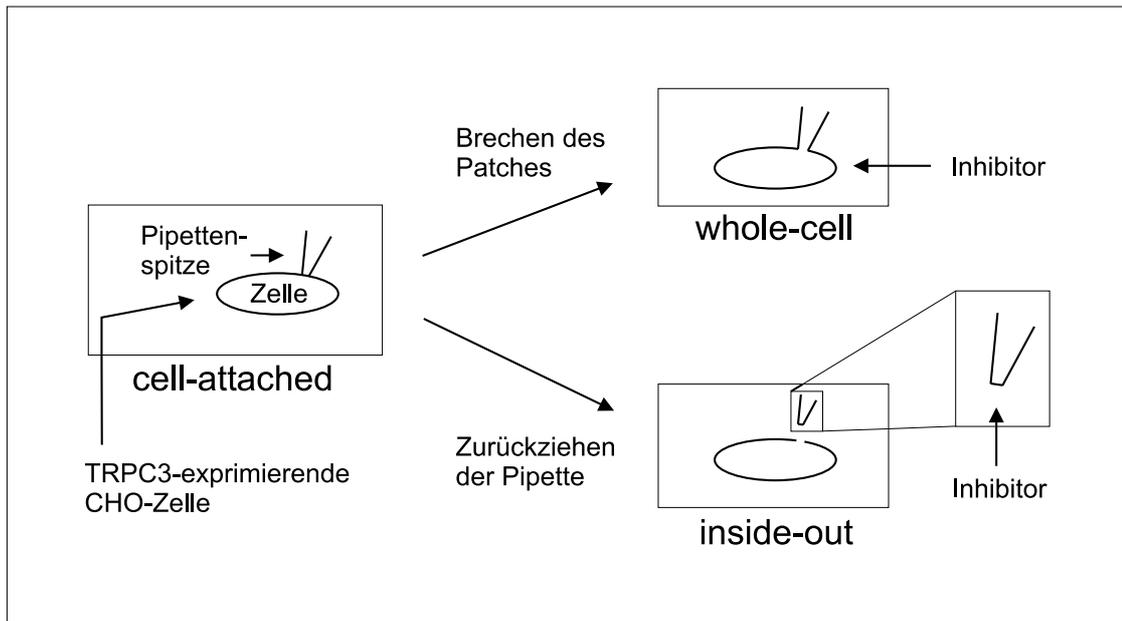
pcDNA3 Vektor (Invitrogen) nach Herstellerangaben transfiziert. Im Expressionsvektor war das Neomycinresistenzgen durch EGFP-cDNA ersetzt worden, so dass erfolgreich transfizierte Zellen anhand der EGFP-Fluoreszenz identifiziert werden konnten. Zusätzlich wurden Kontrollzellen transfiziert mit einem Vektor, der keine TRPC3-cDNA enthielt.

Dieser Teil der Arbeit wurden z.T. durch Herrn Dr. Christof Zitt und Frau Ilina Ionescu durchgeführt.

### ***Patch-clamp Experimente***

Ziel der *patch-clamp*-Technik ist die Messung transmembranärer elektrischer Ströme, wie sie beim Ionenfluss durch Kanäle auftreten. Während der Messung wird das Membranpotential auf einem vorgegebenen Wert gehalten (sog. *voltage-clamp*-Verfahren). Je nach verwendeter Konfiguration wird entweder der Strom über die gesamte Zellmembran gemessen (*whole-cell*) oder es wird der Strom über einen Membranflecken (*patch*) gemessen. In letzterem Fall können i.d.R. einzelne Kanalöffnungen aufgelöst werden, man spricht daher von Einzelkanalmessung (*single-channel-recording*). Bei der Einzelkanalmessung wird weiter unterschieden nach *cell-attached*-, *inside-out*- oder *outside-out*-Konfiguration. Von diesen hat für die vorliegende Studie nur die *inside-out*-Konfiguration Bedeutung. Die gemessenen elektrischen Ströme werden mit Hilfe eines PCs aufgezeichnet und auf Festplatte für die spätere Auswertung gespeichert. Für die Messung wurde ein *EPC-9 patch-clamp*-Verstärker der Firma HEKA und die Software *Pulse* der gleichen Firma verwendet.

In den durchgeführten Experimenten wurden zunächst diejenigen Zellen, die erfolgreich transfiziert wurden, anhand der EGFP-Fluoreszenz identifiziert. Diese Zellen konnten als TRPC3-exprimierend angenommen werden und werden im Folgenden als „TRPC3-Zellen“ bezeichnet. Nun wurde die Patchpipette, die die Messelektrode darstellt, an die Zellmembran herangeführt und das sogenannte *gigaseal* etabliert durch Sog an der Pipette. Man



**Abbildung 2: Patch-clamp Technik.** Beachte insbesondere die Applikation des Inhibitors auf die extrazelluläre (*whole-cell*) bzw. intrazelluläre (*inside-out*) Seite der Zellmembran.

befindet sich nun in der *cell-attached*-Konfiguration (vgl. hierzu und zum Folgenden Abb. 2). Je nachdem, ob der Versuch in der *whole-cell*- oder in der *inside-out*-Konfiguration durchgeführt werden sollte, wurde nun die Zellmembran unter der Pipettenöffnung durch verstärkten Sog zerstört, sogenanntes Brechen des Patches, oder durch Zurückziehen der Pipette aus der übrigen Membran ausgeschnitten, so dass der Membran-„patch“ die Pipettenöffnung verschloss. Im ersten Fall gelangte man in die *whole-cell*-Konfiguration, im zweiten in die *inside-out*-Konfiguration. Weitere Details zur *patch-clamp*-Technik sind u.a. in (Hamill et al., 1981) zu finden.

### Whole-cell Experimente

In der *whole-cell*-Konfiguration wurde ein Haltepotential von -60 mV angelegt. In dieser Konfiguration wurden zwei verschiedene Badlösungen eingesetzt: Normalbad („N“): 140 mM NaCl, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES; pH 7,4; NMDG-Bad („NMDG“): Entspricht Normalbad, in dem Na<sup>+</sup> durch NMDG ersetzt wurde.

Zusammensetzung der Pipettenlösung: 140 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EGTA, 0,3 mM ATP, 0,03 mM GTP, 10 mM HEPES; pH 7,2. LaCl<sub>3</sub> bzw. GdCl<sub>3</sub> wurde dem Normalbad in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt.

### **Inside-out Experimente**

In der *inside-out*-Konfiguration wurde, wie auch in der *whole-cell*-Konfiguration, ein Membranpotential von -60 mV angelegt. Die dem Bad zugewandte Seite des Patches war dabei negativ geladen, so dass gleiche elektrische Verhältnisse herrschten wie in den *whole-cell* Messungen. Die Pipetten wurden zur Verminderung des Rauschens mit Sylgard überzogen wie in (Hamill et al., 1981) beschrieben. *Patches* von TRPC3-Zellen wurden für die Versuche herangezogen, sofern sie spontane Kanalaktivität zeigten. Die Bad- und Pipettenlösungen setzten sich wie folgt zusammen: Bad: 120 mM Na-isethionat, 11,86 mM Hemi-Ca-gluconat, 2 mM Hemi-Mg-gluconat, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose; pH 7,4; Pipette: 120 mM CsCl, 3,6 mM Hemi-Ca-gluconat, 2 mM Hemi-Mg-gluconat, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose; pH 7,4. Die Osmolalität beider Lösungen wurde mit Mannitol auf 300±10 mosm/kg eingestellt, wobei die Osmolalitätsdifferenz zwischen Bad- und Pipettenlösung unter 5 mosm/kg gehalten wurde.

Die zu untersuchenden Kanalblocker wurden jeweils in verschiedenen Konzentrationen der Badlösung zugesetzt. In einigen Experimenten wurde 1-Oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerol (OAG), ein membranpermeables DAG, dem Bad zugesetzt. OAG wurde hierzu zunächst in Me<sub>2</sub>SO aufgelöst und dann dem Bad zugegeben, so dass die endgültige OAG-Konzentration im Bad 100 µM, die Me<sub>2</sub>SO-Konzentration 1 Vol.-% betrug.

Das Mess-Signal wurde mit 3 kHz gefiltert (*Bessel*-Filter) und mit 15 kHz gesampelt. Vor der Auswertung wurden die Daten digital gefiltert (5-pass Binomialfilter). Als Maß für die Kanalaktivität wurde die  $NP_o$  (Produkt aus der Anzahl  $N$  der Kanäle im Membranpatch

und der Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  eines einzelnen Kanals) berechnet.<sup>4</sup> Bei der Berechnung kam die Schwellenwertmethode zum Einsatz, bei der Zeitintervalle, in denen der gemessene Strom einen bestimmten Schwellenwert, üblicherweise die halbe Einzelkanalamplitude, überschreitet, als Offenperioden gewertet werden. Die summierte Zeit der Offenperioden im Messintervall wird ins Verhältnis gesetzt zur zeitlichen Länge des Messintervalls. Dieser einheitenlose Quotient ist die gesuchte  $NP_o$ . Diese Berechnungen wurden durchgeführt mittels der Messdatenauswertungssoftware *Igor Pro 3.14* von Wavemetrics, wobei selbstentwickelte Makros zum Einsatz kamen.

### ***Datenauswertung***

Die sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve mit variabler Steigung wurde mittels nicht-linearer Regression (*least-square-fit*) an die gewonnenen Daten angepasst. Die Funktionsgleichung der Kurve lautet:

$$y = 1 / \left( 1 + 10^{(\log IC_{50} - x) \cdot slope} \right).$$

$y$  bezeichnet hierbei die relative Inhibition,  $x$  den dekadischen Logarithmus der Inhibitorkonzentration,  $\log IC_{50}$  den dekadischen Logarithmus der  $IC_{50}$  und  $slope$  den Steigungsfaktor. Hierbei kam die Software *GraphPad Prism 3.0* von GraphPad Software zum Einsatz. Die Kurvenanpassung lieferte als wesentliches Ergebnis die Inhibitorkonzentration, die zu einer 50%igen Inhibition des Kanals führte ( $IC_{50}$ ).

---

<sup>4</sup> Da die Einzelkanaloffenwahrscheinlichkeit  $P_o$  nur bei Kenntnis der Kanalanzahl  $N$  berechnet werden kann,  $N$  jedoch nur abgeschätzt werden kann, ist es üblich,  $NP_o$  zu betrachten.

## ***Fura-2-Experimente***

Fura-2 ist ein calciumempfindlicher Fluoreszenzfarbstoff, der gewöhnlich zur Bestimmung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen verwendet wird. Es zeigte sich aber, dass Fura-2 auch nach Bindung von  $\text{La}^{3+}$  eine Änderung im Anregungsspektrum aufwies.

Zunächst wurde für *in vitro* Versuche Fura-2-Salz in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in destilliertem Wasser gelöst. Exzitationsspektren dieser Lösung wurden nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von  $\text{La}^{3+}$  gemessen sowie nach Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  und EGTA. Die Exzitationswellenlängen lagen im Bereich von 300 bis 400 nm, die Emission wurde bei 510 nm gemessen. Für diese Versuche wurde ein Spectrofluorophotometer der Firma Shimadzu verwendet. Zusätzlich wurde die Fluoreszenz von Fura-2 (20  $\mu\text{M}$ ) in nominell  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freier PBS in Gegenwart unterschiedlicher  $\text{La}^{3+}$ -Konzentrationen gemessen. Hierbei wurde die Fluoreszenz mit Licht der Wellenlänge 360 nm angeregt und die Emission bei 510 nm gemessen, entsprechend den Parametern in den späteren *in vivo* Versuchen. Diese Messung erfolgte mit dem digitalen *imaging*-System (T.I.L.L. Photonics), das später auch für die *in vivo* Messungen verwendet wurde.

Für die *in vivo* Messungen wurden nichttransfizierte CHO-Zellen nach folgendem Protokoll mit Fura-2 beladen:

- Vorbereitung der Inkubationslösung aus

10 ml	Beladungspuffer	(s. Tabelle 1)
2 $\mu\text{l}$	0,5 M $\text{CaCl}_2$	final: 0,1 mM
20 $\mu\text{l}$	1 mM Fura-2-acetoxymethylester (gelöst in $\text{Me}_2\text{SO}$ )	final: 2 $\mu\text{M}$

Diese Lösung wurde vor Licht geschützt, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu vermeiden.

- Überführung der mit CHO-Zellen bewachsenen Glasplättchen in ein 6-well-plate
- Zugabe von 1 ml Inkubationslösung je Plättchen

- 30 min Inkubation bei Raumtemperatur, lichtgeschützt
- Zweimaliges Waschen der Plättchen in je 1 ml PBS
- Stehenlassen der Plättchen im PBS des zweiten Waschgangs für 30 min bei Raumtemperatur, lichtgeschützt

Hierbei wurde nominell  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freie PBS verwendet, um eine Beeinflussung der folgenden Messungen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zellen zu minimieren. Die mit Fura-2 beladenden Zellen wurden dann mit bereits oben erwähntem digitalen *imaging*-System untersucht. Dabei wurde das Fura-2 mit Licht der Wellenlänge 360 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 510 nm gemessen. Während der Messung wurden die Zellen in nominell  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gehalten. Diesem Badmedium wurde im Laufe des Experiments  $\text{La}^{3+}$  zugesetzt.

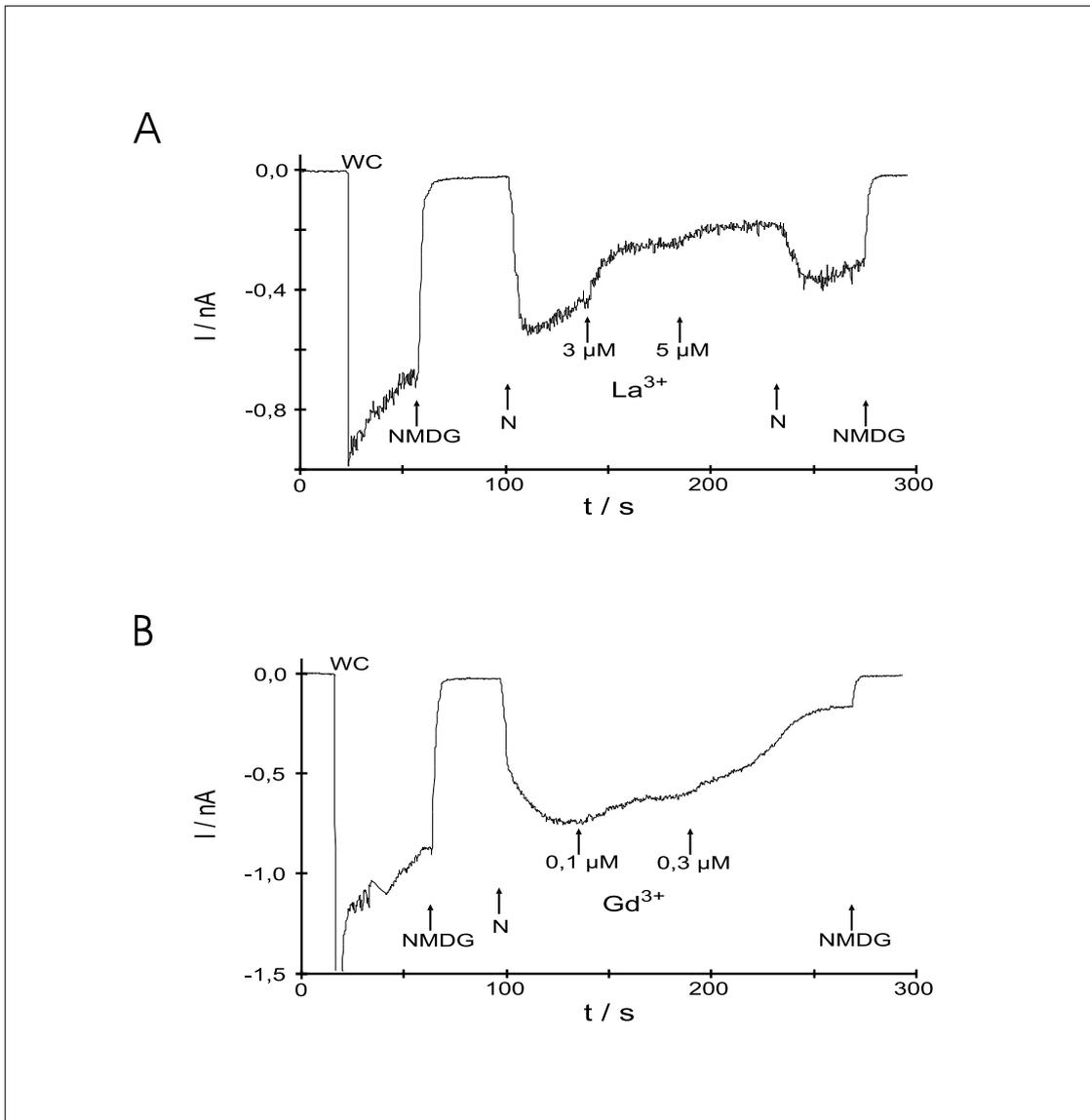
**Tabelle 1: Beladungspuffer**

	Konzentration [mM]
NaCl	138
KCl	6
MgSO <sub>4</sub>	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
NaHCO <sub>3</sub>	5
Glucose	5,5
HEPES	20
BSA	1 g/l

## Ergebnisse

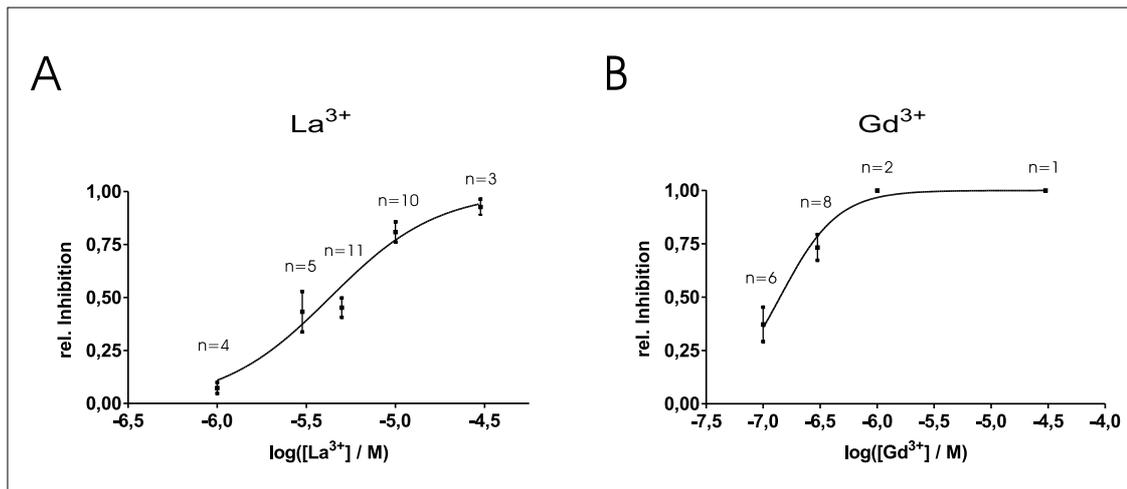
### *Whole-cell-Experimente*

Nach Erreichen der *whole-cell*-Konfiguration war in TRPC3-exprimierenden CHO-Zellen ein Kationeneinstrom messbar, der in den nicht-TRPC3-exprimierenden Kontrollzellen nicht zu beobachten war. Der Strom erreichte sein Maximum unmittelbar nach Etablierung der *whole-cell*-Konfiguration und nahm dann über die Zeit beständig ab. Wurde  $\text{Na}^+$  in der Badlösung durch das große, impermeable Kation NMDG ersetzt, zeigte sich ein nahezu vollständiger, reversibler Rückgang des Stroms (Abb. 3). Dies zeigt, dass der gemessene elektrische Strom tatsächlich durch Kationeneinstrom vermittelt wurde. Diese Befunde stehen in Einklang mit den veröffentlichten Daten über die Charakterisierung des TRPC3-Kanals (Zitt et al., 1997).



**Abbildung 3: Dosisabhängige Inhibition von *whole-cell*-TRPC3-Strömen durch  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$ .** Der *whole-cell*-Strom  $I$  ist gegen die Zeit aufgetragen. Der Zeitpunkt, zu dem die *whole-cell*-Konfiguration erreicht wurde, ist mit „wc“ gekennzeichnet. NMDG-Bad, Normalbad („N“),  $\text{La}^{3+}$  (A) oder  $\text{Gd}^{3+}$  (B) wurden zu den jeweils bezeichneten Zeitpunkten gegeben. Für  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  sind die jeweiligen Konzentrationen angegeben.

Zugabe von  $\text{La}^{3+}$  (Abb. 3A) oder  $\text{Gd}^{3+}$  (Abb. 3B) zur Badlösung resultierte in einer Abnahme des Stroms. Diese Versuche wurden mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen durchgeführt. In einigen Versuchen wurde der Inhibitor wieder ausgewaschen: nur im Fall von  $\text{La}^{3+}$  war die Inhibition reversibel; wenn  $\text{Gd}^{3+}$  als Blocker verwendet wurde, konnte der Strom



**Abbildung 4: Konzentrations-Inhibitions-Beziehungen basierend auf *whole-cell* Messungen.** Die relative Inhibition ist gegen die InhibitorKonzentration aufgetragen. Die Anzahl der jedem Datenpunkt zugrundeliegenden Messungen ist jeweils angegeben.  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden durch Fitten der Datenpunkte mit der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve mit variabler Steigung gewonnen. Es ergibt sich für  $\text{La}^{3+}$  eine  $\text{IC}_{50}$  von  $4 \mu\text{M}$  (A) und für  $\text{Gd}^{3+}$  von  $0,1 \mu\text{M}$  (B).

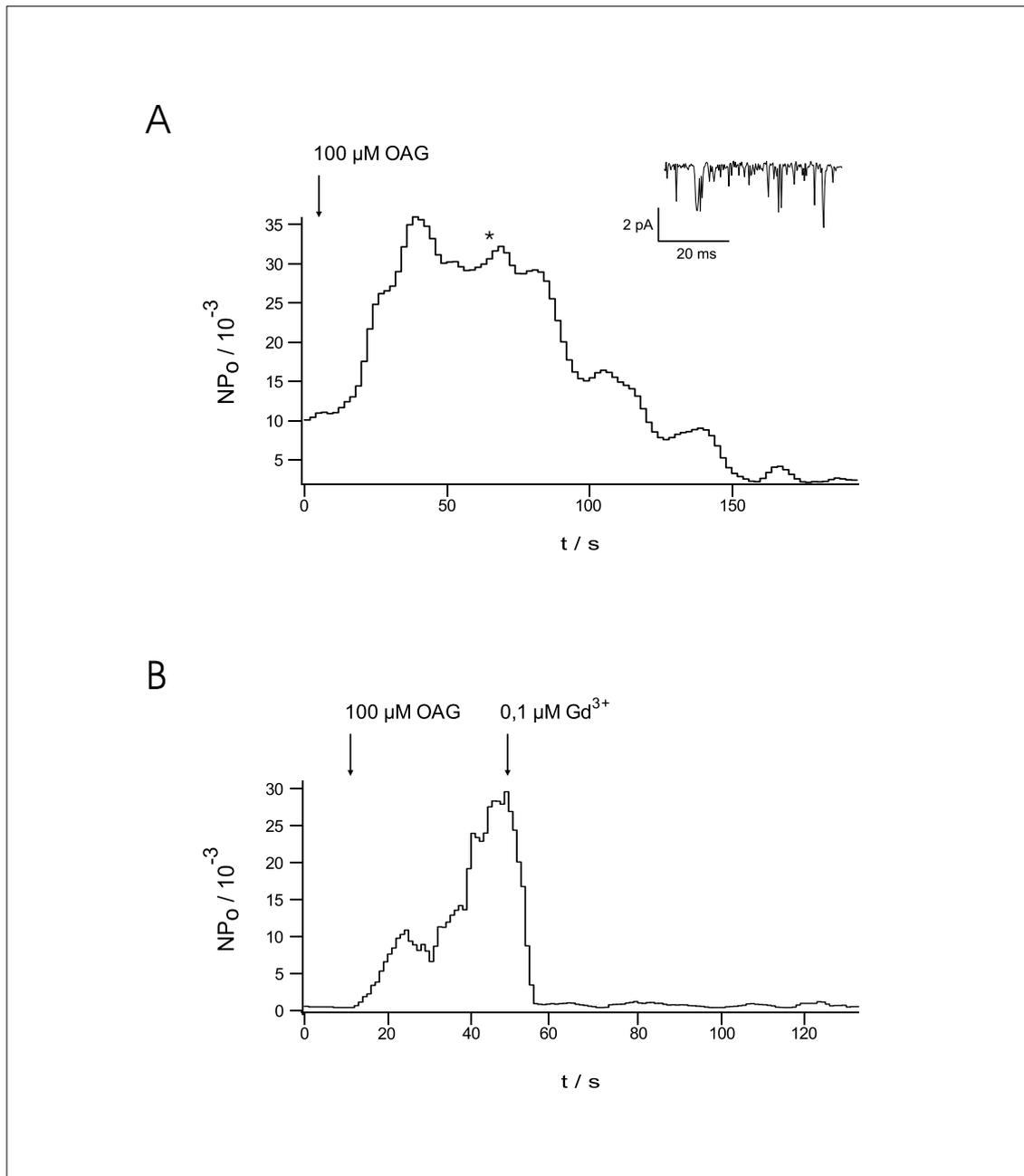
durch den Auswasch nicht wiederhergestellt werden. Die Quantifizierung der Inhibition wurde angesichts der spontanen Abnahme des Stroms, wie sie für den TRPC3-Kanal typisch ist, wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde durch graphische Extrapolation – ausgehend von Zeitintervallen, in denen kein Inhibitor im Bad vorhanden war – der Strom bestimmt, der ohne Inhibitorzugabe zu erwarten gewesen wäre. Durch Vergleich des Stroms unter Einfluss des jeweiligen Inhibitors mit dem so extrapolierten Strom wurde nun die relative Inhibition bestimmt. Diese zeigte eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit (Abb. 4).

Aus der Konzentrations-Inhibitions-Beziehung wurde die  $\text{IC}_{50}$  für  $\text{La}^{3+}$  mit  $4 \mu\text{M}$  und für  $\text{Gd}^{3+}$  mit  $0,1 \mu\text{M}$  abgeschätzt. Die Abschätzung erfolgte durch Anpassung der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve an die Daten mittels nichtlinearer Regression.

### ***Inside-out-Experimente***

TRPC3-exprimierende Zellen zeigten nach Erreichen der *inside-out*-Konfiguration spontane Kanalaktivität. Die Kanalöffnungen waren mit einer mittleren Offenzeit (*mean open time* / MOT) von unter 0,2 ms sehr kurz, die Einzelkanalamplitude betrug bei einem Membranpotential von -60 mV ca. 4 pA (vgl. Einsatz Abb. 5). Diese Befunde stehen im Einklang mit einem früheren Bericht über die funktionale Charakterisierung des TRPC3-Kanals (Zitt et al., 1997). Da die Spontanaktivität nur relativ gering war, wurden die Kanäle zunächst mit dem Diacylglycerol OAG stimuliert.

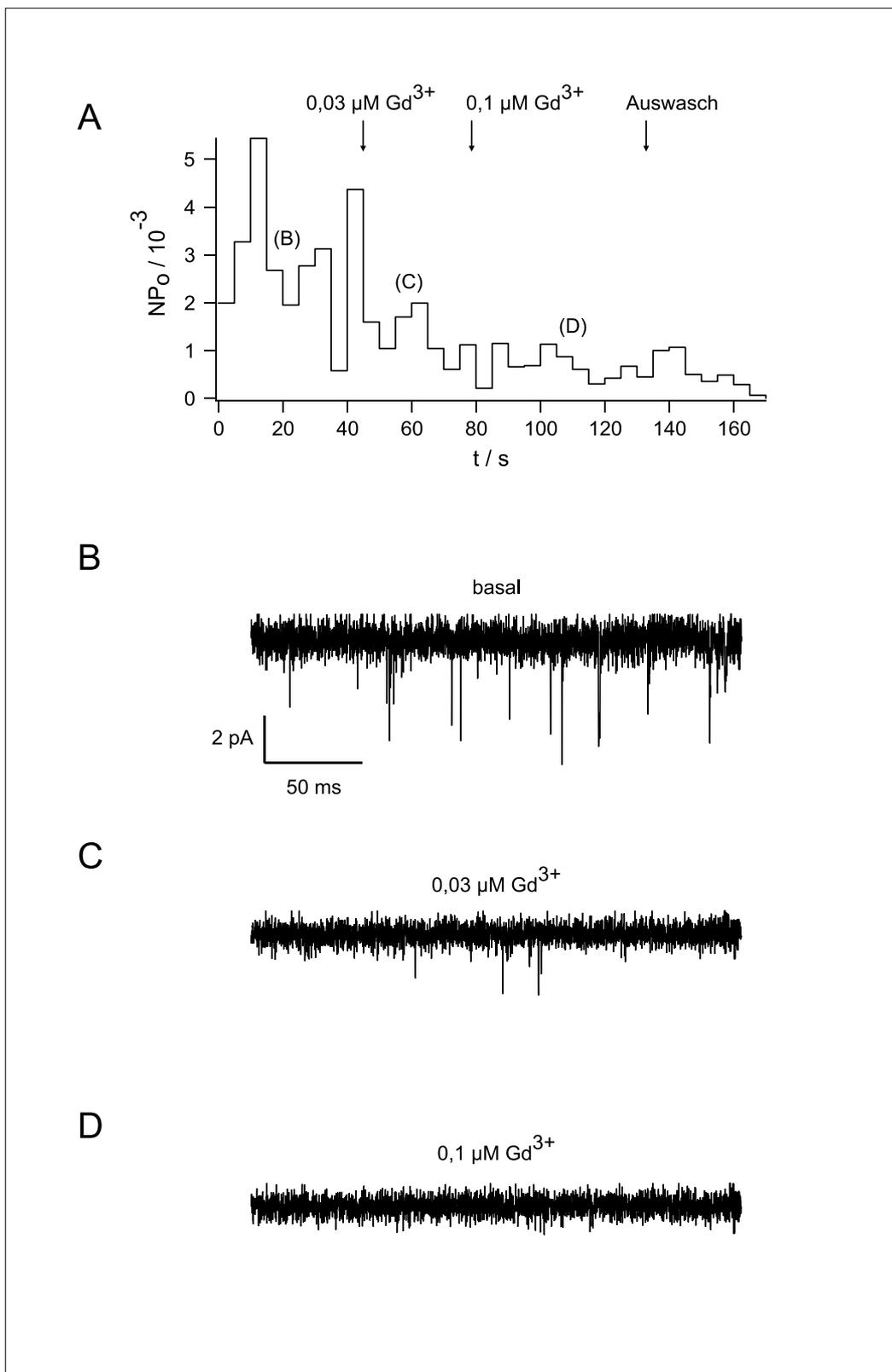
Zugabe von OAG (100  $\mu\text{M}$ ) resultierte in einer deutlichen Zunahme der Kanalaktivität für ca. 2 min (Abb. 5A). Dies entspricht den Befunden von Hofmann et al. (1999). In weiteren Experimenten wurde dem Badmedium  $\text{Gd}^{3+}$  zugesetzt – entsprechend einer Applikation auf die cytosolische Seite der Zellmembran – zu einem Zeitpunkt, an dem die OAG-stimulierte Kanalaktivität deutlich über der spontanen Aktivität lag. Es wurden dabei  $\text{Gd}^{3+}$ -Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  (5 Versuche) und 0,1  $\mu\text{M}$  (10 Versuche) gewählt. In allen Fällen war eine rasche Abnahme der Kanalaktivität zu beobachten, die sich deutlich von der zuvor beobachteten spontanen Aktivitätsabnahme unterschied (Abb. 5B).



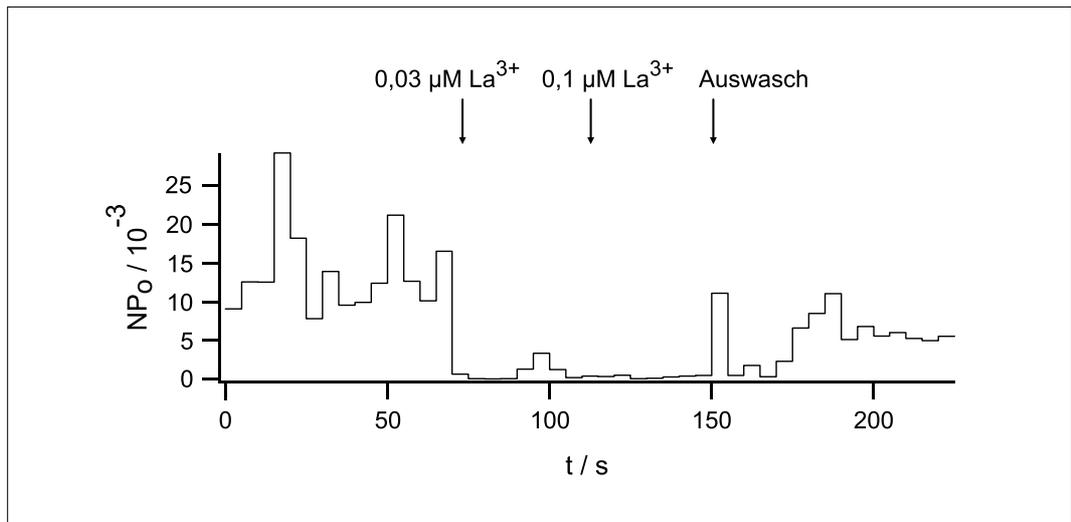
**Abbildung 5: Inhibition von OAG-stimulierter TRPC3-Kanalaktivität in *inside-out*-Messungen durch  $\text{Gd}^{3+}$ .** Dargestellt ist jeweils die Kanalaktivität  $NP_o$  gegen die Zeit. Ein Ausschnitt aus der Einzelkanalaufzeichnung ist in Abb. A eingefügt. Der Zeitpunkt, zu dem dieser Ausschnitt aufgezeichnet wurde, ist mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. A: Gabe von  $100 \mu\text{M OAG}$  zum bezeichneten Zeitpunkt. B: Gabe von  $100 \mu\text{M OAG}$  bzw.  $0,1 \mu\text{M Gd}^{3+}$  zu den jeweils bezeichneten Zeitpunkten.

Da die Überlagerung von OAG-abhängiger Aktivitätszu- und -abnahme und durch den Blocker induzierter Inhibition eine Quantifizierung der Inhibition nicht zuließ, wurden weiterführende Messungen an nichtstimulierten Kanälen durchgeführt. In diesen Versuchen wurde der jeweilige Blocker ( $Gd^{3+}$  oder  $La^{3+}$ ) in jeweils zwei Konzentrationen gegeben, entweder  $0,03 \mu M$  gefolgt von  $0,1 \mu M$  oder  $0,3 \mu M$  gefolgt von  $1,0 \mu M$ . Insgesamt wurden somit vier Konzentrationen getestet.

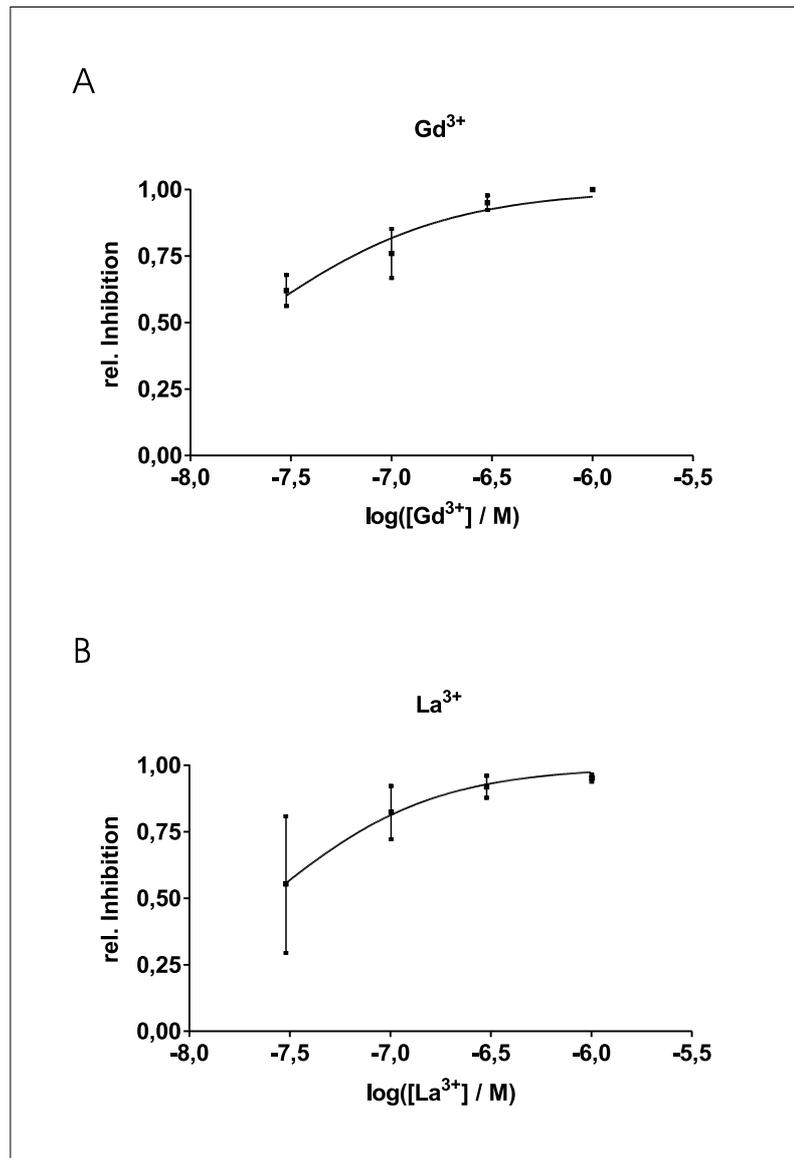
Es war sowohl bei Gabe von  $Gd^{3+}$  (Abb. 6) als auch bei Gabe von  $La^{3+}$  (Abb. 7) eine dosisabhängige Abnahme der Kanalaktivität zu beobachten. Die Inhibition durch  $Gd^{3+}$  war nicht reversibel, im Gegensatz zur reversiblen  $La^{3+}$ -Wirkung. Die Konzentrations-Inhibitions-Beziehung ergab sowohl für  $Gd^{3+}$  als auch für  $La^{3+}$  eine  $IC_{50}$  von  $0,02 \mu M$  (Abb. 8).



**Abbildung 6: Konzentrationsabhängige irreversible Inhibition von TRPC3-Kanalaktivität durch  $\text{Gd}^{3+}$  in *inside-out*-Messungen.** A: Kanalaktivität  $\text{NP}_o$  gegen Zeit. Gabe von 0,03  $\mu\text{M}$  und 0,1  $\mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$  bzw. Auswasch des Inhibitors zu den jeweils bezeichneten Zeitpunkten. B–D: Ausschnitte aus der zugrundeliegenden Einzelkanalmessung, die entsprechenden Zeitpunkte sind in A bezeichnet. B: Basale Kanalaktivität. C: 0,03  $\mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$ , D: 0,1  $\mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$ .



**Abbildung 7: Konzentrationsabhängige reversible Inhibition von TRPC3-Kanalaktivität durch  $\text{La}^{3+}$  in *inside-out*-Messungen.** Kanalaktivität  $NP_o$  gegen Zeit. Zu den bezeichneten Zeitpunkten wurde die Badlösung wie angegeben gewechselt.



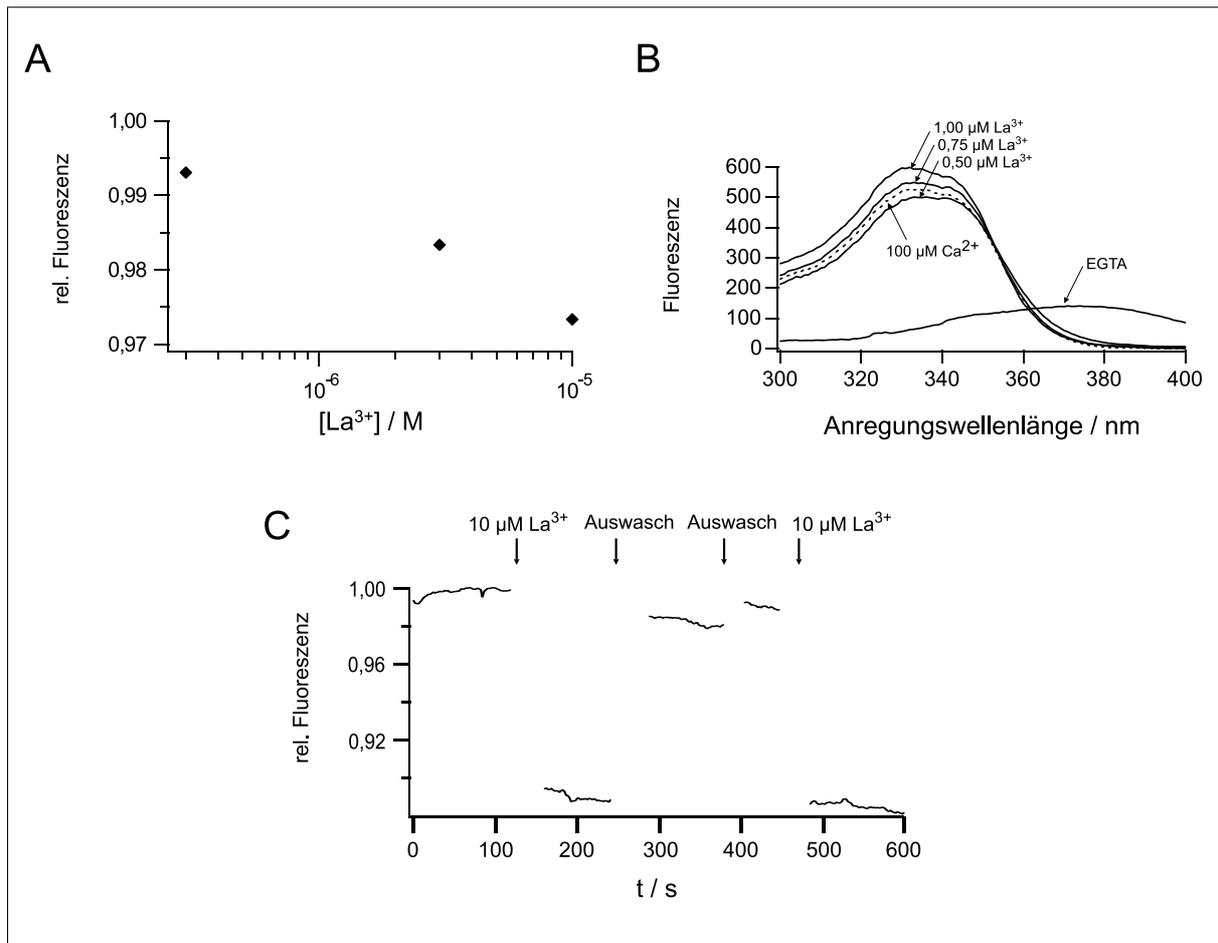
**Abbildung 8: Konzentrations-Inhibitions-Beziehungen basierend auf *inside-out* Messungen.** Jeder Datenpunkt repräsentiert zwei oder drei Messungen. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden durch fitten der Datenpunkte mit der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve mit variabler Steigung gewonnen. Es ergibt sich eine IC<sub>50</sub> für La<sup>3+</sup> (A) und für Gd<sup>3+</sup> (B) von je 0,02 µM.

### ***Fura-2-Experimente***

Um zu überprüfen, ob Lanthanidionen tatsächlich die Plasmamembran von CHO-Zellen überwinden können, wurden Versuche mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 durchgeführt. Zunächst musste getestet werden, ob und wie die Fura-2-Fluoreszenz durch La<sup>3+</sup> und Gd<sup>3+</sup>

beeinflusst wird. Es ist berichtet worden (Kwan und Putney, Jr., 1990), dass bei Anregungswellenlängen im Bereich von 300 bis 350 nm die Fura-2-Fluoreszenz in Gegenwart von  $\text{La}^{3+}$  zunimmt, während wir bei 360 nm eine konzentrationsabhängige Abnahme der Fluoreszenz beobachten konnten (Abb. 9A). Eine genauere Untersuchung von Anregungsspektren im Bereich von 300 bis 400 nm (Abb. 9B) bestätigte die Fluoreszenzzunahme im Bereich von 300 bis 350 nm, bei längeren Anregungswellenlängen war eine Abnahme der Fluoreszenz zu verzeichnen. Die Fura-2-Fluoreszenz erscheint bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm als von der  $\text{La}^{3+}$ -Konzentration unabhängig. Für die weiteren Versuche wurde eine Anregungswellenlänge von 360 nm gewählt, da hier der isosbestische Punkt für  $\text{Ca}^{2+}$  liegt, d.h. die Fluoreszenz ist bei dieser Wellenlänge von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unabhängig. Versuche mit  $\text{Gd}^{3+}$  ergaben leider keine messbare Fluoreszenzänderung, so dass nur die  $\text{La}^{3+}$ -Aufnahme in CHO-Zellen untersucht werden konnte.

Zugabe von  $\text{La}^{3+}$  in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zum Badmedium führte in Fura-2-beladenen CHO-Zellen zu einer raschen Abnahme der Fluoreszenz, die nach Auswasch des Lanthanids wieder nahezu auf den Basalwert anstieg. Durch einen weiteren Waschschrift ließ sich die Fluoreszenz noch stärker dem Basalwert annähern. Erneute  $\text{La}^{3+}$ -Zugabe führte wiederum zur Fluoreszenzabnahme (Abb. 9C).



**Abbildung 9: La<sup>3+</sup>-Aufnahme durch CHO-Zellen.** A: Konzentrationsabhängige Abnahme der Fura-2-Fluoreszenz *in vitro* nach Zugabe von La<sup>3+</sup>. Fluoreszenz angegeben relativ zur Fluoreszenz vor La<sup>3+</sup>-Zugabe. Fura-2 (20 μM) gelöst in nominell Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freier PBS,  $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$ . B: Anregungsspektren von Fura-2. Fura-2 (1 μM) gelöst in destilliertem Wasser. La<sup>3+</sup> wurde kumulativ zugegeben, die jeweiligen Endkonzentrationen sind angegeben. Die weitere Zugabe von Ca<sup>2+</sup> (100 μM) resultierte in dem als gestrichelte Linie dargestellten Spektrum. Ein weiteres Spektrum wurde aufgenommen nach Zugabe von EGTA (2 mM).  $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$ . C: Reversible Abnahme der Fura-2-Fluoreszenz in CHO-Zellen nach Zugabe von La<sup>3+</sup> (10 μM) zur Badlösung (nominell Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freie PBS).  $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$ .

## Diskussion

Die Ergebnisse der *inside-out*-Experimente zeigen, dass die untersuchten Lanthanidionen  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  den TRPC3-Kanal von der cytosolischen Seite der Plasmamembran her inhibieren können. Die dazu benötigten Konzentrationen liegen im Fall von Lanthan um den Faktor 200 und im Fall von Gadolinium um den Faktor 5 unter den bei extrazellulärer Applikation benötigten Konzentrationen. Die  $\text{IC}_{50}$  war mit  $0,02 \mu\text{M}$  bei intrazellulärer Gabe für  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  gleich. Im Licht der Arbeit von Jung et al. (2003), in der gezeigt wurde, dass die Stimulation des TRPC5 durch  $\text{La}^{3+}$  über eine extrazelluläre Bindungsstelle erfolgt, könnte der große extrazelluläre Konzentrationsunterschied auf eine stimulatorische Wirkung des extrazellulären  $\text{La}^{3+}$  auch am TRPC3 hindeuten, die der Inhibition entgegenwirkt und somit eine höhere Inhibitorkonzentration notwendig macht.

Zudem konnte gezeigt werden, dass Lanthanionen die Zellmembran von CHO-Zellen überwinden können. Da die Experimente zur Lanthanaufnahme an nichttransfizierten Zellen durchgeführt wurden, ist diese von der TRPC3-Expression unabhängig. Es wird zwar im Allgemeinen angenommen, dass Zellmembranen impermeabel für Lanthanidionen sind (Evans, 1990), jedoch gibt es Berichte über die Aufnahme von Lanthanionen durch Herzmuskelzellen (Peeters et al., 1989) sowie über die Aufnahme von Lanthan-, Gadolinium- und anderen Lanthanidionen durch Erythrozyten (Cheng et al., 1999). Die Annahme, dass auch Gadoliniumionen in CHO-Zellen eindringen können, ist also naheliegend, auch wenn im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit eine direkte Demonstration hierzu aus technischen Gründen nicht möglich war.

Eine Beeinflussung der Ergebnisse der Fura-2-Experimente durch Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration – z.B. durch Blockade von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen – ist vorstellbar. Da das Badmedium nominell calciumfrei ist – geschätzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration:  $50 \mu\text{M}$  – sind

jedoch allenfalls geringe und langsame Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als Folge einer Kanalblockade zu erwarten. Im Experiment wurde jedoch ein deutlicher, rasch einsetzender Effekt beobachtet. Zudem wurde die Exzitationswellenlänge mit 360 nm so gewählt, dass die gemessene Fluoreszenz als nahezu unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration angenommen werden kann. Man kann also davon ausgehen, dass die beobachtete Fluoreszenzabnahme tatsächlich auf eine Lanthanaufnahme durch die CHO-Zellen zurückzuführen ist und nicht auf Änderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

Lanthanidionen können durch zahlreiche  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatoren komplexiert werden, so auch durch EGTA und Fura-2 (Evans, 1990). In Experimenten, in denen  $\text{La}^{3+}$  in einer extrazellulären Konzentration von  $0,5 \mu\text{M}$  den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom inhibierte, konnte die Zugabe von EGTA ( $10 \mu\text{M}$ ) diesen Effekt vollständig aufheben (Aussel et al., 1996). Eine Dissoziationskonstante von  $\log_{10} K = -17,5$  für den GdEGTA-Komplex ist veröffentlicht worden (Caldwell et al., 1998). Diese würde bedeuten, dass in den Experimenten, in denen cytosolisch EGTA in einer Konzentration von  $10 \text{ mM}$  vorlag, nahezu das gesamte cytosolische  $\text{Gd}^{3+}$  als EGTA-Komplex gebunden war. Dies trifft auch für *whole-cell* Messungen zu, in denen EGTA der Pipettenlösung zugesetzt wurde und betrifft somit nahezu alle *whole-cell*-Messungen, auch die anderer Arbeitsgruppen, da ohne einen effektiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator in der Pipettenlösung eine ausreichend niedrige, aber dennoch definierte cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht erreicht werden kann. Für  $\text{La}^{3+}$  dürfte ähnliches wie für  $\text{Gd}^{3+}$  gelten. Zudem ist anzunehmen, dass auch Fura-2 Lanthanidionen bindet (s.o.). Es ist folglich nicht auszuschließen, dass der eigentliche Inhibitor in den hier vorgestellten Experimenten ein Lanthanidkomplex ist; für inhibitorische Effekte von  $\text{Gd}^{3+}$  in Gegenwart von Phosphat- und Bicarbonat-Anionen, die beide mit  $\text{Gd}^{3+}$  Komplexe bilden (Martell und Smith, 1976), ist ein solcher Mechanismus bereits vorgeschla-

gen worden (Caldwell et al., 1998). Sollte dies der Fall sein, wären die grundsätzlichen Schlussfolgerungen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht wesentlich beeinflusst.

Die nachgewiesene intrazelluläre Wirksamkeit und die im Fall von Lanthan nachgewiesene und im Fall von Gadolinium vermutete Membranpermeabilität können die inhibitorische Wirkung der untersuchten Ionen bei extrazellulärer Gabe erklären. Ob die Inhibition auf einer strikt auf die cytosolische Seite der Zellmembran beschränkten Wirkung beruht, kann jedoch nicht mit Sicherheit gesagt werden, da es denkbar ist, dass sowohl ein extra- als auch ein intrazellulärer Wirkmechanismus existiert. *Outside-out-patch-clamp*-Experimente könnten hier eventuell Klarheit bringen, falls in diesen keine Inhibition beobachtet würde. In der *outside-out*-Konfiguration würde der Inhibitor auf die extrazelluläre Membranseite appliziert, ein Ausbleiben der Wirkung würde somit gegen einen extrazellulären Effekt sprechen. Leider ist es aufgrund des hohen Hintergrundrauschens in *outside-out*-Messungen nicht möglich gewesen, in dieser Konfiguration TRPC3-Kanalaktivität darzustellen. Ein wesentlicher Grund hierfür ist die sehr kurze mittlere Offenzeit (*mean open time* / MOT) des TRPC3 von unter 0,2 ms (Zitt et al., 1997). Eine nähere Erläuterung des Konzepts der MOT ist im Anhang A (S. 38) zu finden. Die kurze MOT macht eine relativ hohe Filterfrequenz (3 kHz) bei der Messung erforderlich, da sonst ein zu großer Anteil der Kanalöffnungsereignisse übersehen würde (vgl. Sakmann und Neher, 1995). Eine hohe Filterfrequenz aber resultiert zwangsläufig in einem starken Hintergrundrauschen. Da es zudem nicht auszuschließen ist, dass es den Lanthanidionen möglich gewesen wäre, auch in dieser Konfiguration die Zellmembran von extra- nach intrazellulär zu überwinden – der Mechanismus des Membranübertritts dieser Ionen ist noch weitgehend ungeklärt –, wäre eine Inhibition der Kanalaktivität in der *outside-out*-Konfiguration noch nicht beweisend für einen extrazellulären Wirkmechanismus.

In jedem Fall muss davon ausgegangen werden, dass bei extrazellulärer Applikation von Lanthanidionen die beobachtete Wirkung durch intrazelluläre Effekte mitbeeinflusst wird, da bei dieser Applikationsform mit großer Wahrscheinlichkeit intrazellulär für eine Inhibition ausreichende Lanthanidkonzentrationen erreicht werden. Die intrazelluläre  $\text{La}^{3+}$ -Konzentration nach extrazellulärer Gabe des Ions zu bestimmen, um diese Annahme zu belegen, war jedoch leider nicht möglich, da zum einen nicht bekannt ist, wie die Fluoreszenzabnahme von der  $\text{La}^{3+}$ - und der Fura-2-Konzentration abhängt, und zum anderen die intrazelluläre Fura-2-Konzentration in den beladenen CHO-Zellen nicht bekannt ist.

Somit ist zu erwarten, dass die Aufnahmerate der Zelle für Lanthanidionen in die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung eingeht. Diese Aufnahmerate könnte durchaus zellspezifisch sein, so dass die in solchen Experimenten bestimmten effektiven Konzentrationen ebenfalls zellspezifisch wären. Demnach ist eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in den veröffentlichten inhibitorischen Konzentrationen bezüglich des TRPC3-Kanals, die den Ausgangspunkt der hier vorliegenden Arbeit bildeten, gefunden, da die verschiedenen Arbeitsgruppen ihre Versuche an unterschiedlichen Zelltypen durchgeführt haben. Den Konzentrationsunterschieden müssen also nicht zwangsläufig Unterschiede im exprimierten Kanal zugrunde liegen.

Im Licht der niedrigen  $\text{IC}_{50}$ -Werte von ca. 20 nM bei intrazellulärer Applikation der Inhibitoren besteht zudem die Hoffnung, in *inside-out*-Messungen Gadolinium und Lanthan effektiv zur Kanalcharakterisierung einzusetzen. Es ist zu erwarten, dass andere Kanäle höhere Inhibitorkonzentrationen erfordern, wozu allerdings noch weitere Experimente notwendig wären, da die intrazelluläre inhibitorische Aktivität dieser anorganischen Kanalblocker i.d.R. nicht gesondert untersucht wird. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen sollte grundsätzlich eine Evaluierung sowohl der intra- als auch der extrazellulären Effekte erfolgen, wenn

Lanthanidionen zur Kanalcharakterisierung eingesetzt werden. Dies erscheint nicht nur für Untersuchungen am TRPC3 ratsam, da intrazelluläre Lanthanideffekte auch bei anderen Kanälen nicht von vornherein ausgeschlossen werden können. Im Hinblick auf die enge Verwandtschaft der TRP-Kanäle TRPC3, TRPC6 und TRPC7 (Clapham et al., 2001; Zitt et al., 2002) ist es nicht unwahrscheinlich, dass sich auch an TRPC6 und TRPC7 ein intrazellulärer Lanthanidblock nachweisen ließe. Der Umstand, dass TRPC4 und TRPC5 durch  $\text{La}^{3+}$  stimuliert werden können (Jung et al., 2003), ist in diesem Zusammenhang erwähnenswert und kann bei der Kanalidentifizierung hilfreich sein.

Da die TRP-Kanalfamilie sowohl aus Sicht der Grundlagenforschung als auch aus klinischer Sicht zunehmend an Bedeutung gewinnt, werden Blocker dieser Kanäle immer wichtiger. Man beginnt gerade erst, die physiologische und pathophysiologische Rolle der TRP-Kanäle zu verstehen. Um hier das Wissen erweitern zu können, ist es entscheidend, diese Kanäle in nativen Zellen identifizieren zu können, was in elektrophysiologischen Messungen mit Hilfe möglichst spezifischer Kanalblocker am überzeugendsten und rationellsten zu erreichen ist. Mit dem Fortschreiten der Erkenntnisse über die pathophysiologische Rolle der TRP-Kanäle werden diese als Angriffspunkt für eine pharmakologische Therapie zunehmend interessant.

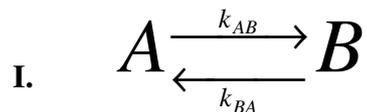
Die bereits jetzt vorliegenden Hinweise auf die funktionelle Bedeutung dieser Kanäle geben Anlass zu der Hoffnung, TRP-Antagonisten eines Tages als antiinflammatorische Medikamente einsetzen zu können, da zum einen TRP-Kanäle für die Granulocytenfunktion offensichtlich wichtig sind (Heiner et al., 2003; Li et al., 2002). Zum anderen scheint an der bei entzündlichen Prozessen häufig anzutreffenden Bildung eines interstitiellen Ödems, insb. in der Lunge, der TRPC4-Kanal entscheidend beteiligt zu sein (Tiruppathi et al., 2002). Auch bei einigen nichtentzündlichen Krankheitsprozessen ist eine Beteiligung von TRP-Kanälen zu

vermuten. Die mögliche Rolle des TRPC4 für die Relaxation der Gefäßmuskulatur sei an dieser Stelle nochmals erwähnt (Freichel et al., 2001). Des Weiteren könnte die Arbeit von (Schlingmann et al., 2002) für die Therapie der autosomal-rezessiven Form der Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypercalciämie Bedeutung gewinnen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lanthanidionen  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$ , wenn man ihre intrazelluläre Wirksamkeit berücksichtigt, den TRPC3-Ionenkanal mit hoher Potenz blockieren. Die Potenz bei extrazellulärer Anwendung ist wesentlich geringer und vermutlich zelltypabhängig. Daher ist eine Neuinterpretation früherer Ergebnisse, die große Diskrepanzen bezüglich der inhibitorisch wirksamen Konzentrationen bei extrazellulärer Gabe aufwiesen, erforderlich.

## Anhang A: Die mittlere Offenzeit eines Ionenkanals

Wir betrachten zunächst ein einfaches kinetisches Modell eines Ionenkanals, der die beiden Zustände  $A$  und  $B$  kennt, wobei der Kanal im Zustand  $A$  offen und in  $B$  geschlossen sei. Der Kanal lässt sich kinetisch mit folgender Gleichung beschreiben:



Für die Offenzeit des Kanals ist nur der Übergang  $A \rightarrow B$ , also das Schließen des Kanals von Bedeutung:



Dies entspricht einer nichtreversiblen Kinetik 1. Ordnung. Die entsprechende Differentialgleichung lautet:

$$\text{III.} \quad \frac{dA}{dt} = -k_{AB} \cdot A$$

Wird eine große Anzahl  $A_0$  von Kanälen betrachtet, die zum Zeitpunkt  $t = 0$  im Zustand  $A$ , also offen sind ( $A(t=0) = A_0$ ), so ergibt sich als Lösung der Differentialgleichung:

$$\text{IV.} \quad A(t) = A_0 \exp(-k_{AB} \cdot t)$$

D.h., zum Zeitpunkt  $t$  sind  $A(t)$  Kanäle noch offen. Existiert nicht nur ein Geschlossen-zustand, sind mehrere Inaktivierungswege möglich. Existieren  $n$  verschiedene Wege mit den Übergangskonstanten  $k_1, k_2, \dots, k_n$ , so wird die Lösung zu

$$\text{V.} \quad A(t) = A_0 \exp(-(k_1 + k_2 + \dots + k_n)t)$$

Führt man die Zeitkonstante  $\tau = 1/(k_1 + k_2 + \dots + k_n)$  ein, so lässt sich V. schreiben als

$$\text{VI.} \quad A(t) = A_0 \exp(-t/\tau)$$

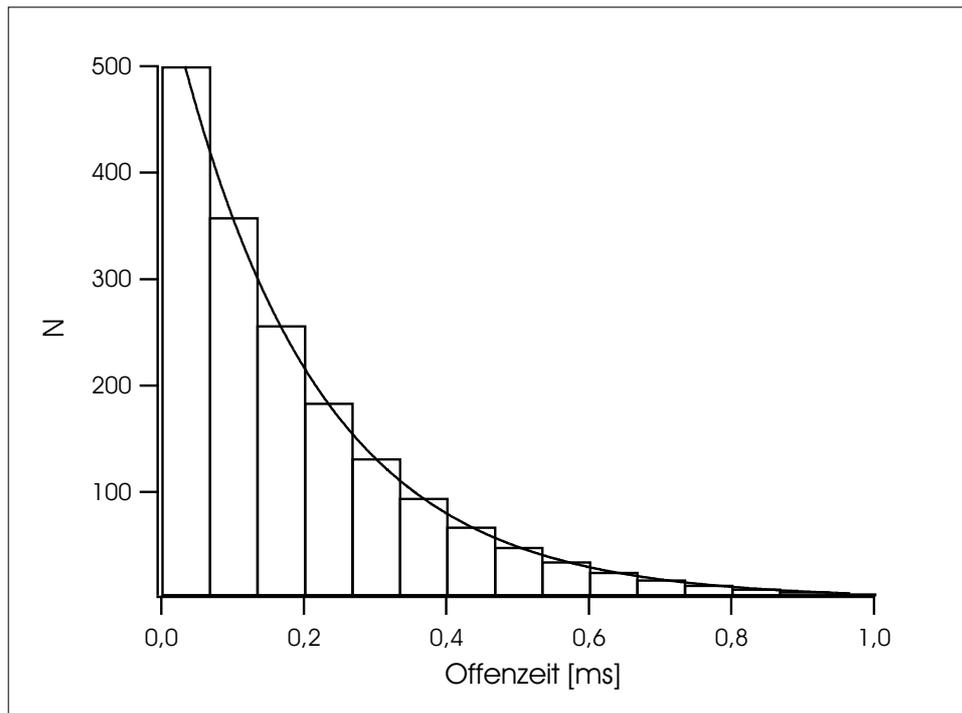
Wird ein einzelner Ionenkanal betrachtet, kann der Zustand des Kanals zum Zeitpunkt  $t$  nicht vorhergesagt werden. Lediglich Aussagen zur Wahrscheinlichkeit, das sich der Kanal zu diesem Zeitpunkt in einem bestimmten Zustand befindet, können gemacht werden. Die Kanaloffenzeit wird bestimmt durch die Wahrscheinlichkeit  $p(t)$ , dass ein Kanal, der zum Zeitpunkt  $t_0 = 0$  offen war, zum Zeitpunkt  $t$  ( $t > t_0$ ) noch immer offen ist, ohne sich zwischendurch geschlossen zu haben. Diese Wahrscheinlichkeit ist nicht von der Vergangenheit des Kanals abhängig, nur sein Zustand zum Zeitpunkt  $t_0$  ist entscheidend (sog. *Markov'sche Annahme*). Diese Wahrscheinlichkeit ergibt sich aus VI. durch Division durch  $A_0$ :

$$\text{VII. } p(t) = \exp(-t / \tau)$$

Die MOT wird nun definiert als  $\tau$ . Experimentell kann sie bestimmt werden durch Messen der Öffnungszeiten möglichst vieler Kanalöffnungen. Aus den gemessenen Zeiten wird ein Histogramm erstellt, das bei linearer Achseneinteilung einen exponentiellen Abfall zeigt (vgl. Abb. 10). Durch Kurvenanpassung wird die Zeitkonstante des Abfalls bestimmt.<sup>5</sup> Diese Zeitkonstante entspricht der gesuchten MOT.

---

<sup>5</sup> Es existieren Methoden mit logarithmischer Einteilung der Zeitachse, die die Bestimmung der Zeitkonstante vereinfachen, da die so gewonnenen Histogramme ein Maximum aufweisen, dessen Lage mit  $\tau$  korrespondiert. Zu Details sei z.B. auf (Sakmann und Neher, 1995) verwiesen.



**Abbildung 10: Theoretisches Offenzeithistogramm.** Ein theoretisch berechnetes „ideales“ Offenzeithistogramm ist als Säulendiagramm dargestellt. Eine Exponentialkurve wurde an das Histogramm angepasst und ist als durchgezogene Linie eingezeichnet. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Ereignisse aufgetragen, auf der Abszisse die jeweilige Offenzeit.

## Literaturverzeichnis

1. Acharya, J.K., Jalink, K., Hardy, R.W., Hartenstein, V. und Zuker, C.S. (1997). InsP<sub>3</sub> receptor is essential for growth and differentiation but not for vision in *Drosophila*. *Neuron* 18, 881-887.
2. Aussel, C., Marhaba, R., Pelassy, C. und Breittmayer, J.P. (1996). Submicromolar La<sup>3+</sup> concentrations block the calcium release-activated channel, and impair CD69 and CD25 expression in CD3- or thapsigargin-activated Jurkat cells. *Biochem. J.* 313 (Pt 3), 909-913.
3. Balzer, M., Lintschinger, B. und Groschner, K. (1999). Evidence for a role of Trp proteins in the oxidative stress-induced membrane conductances of porcine aortic endothelial cells. *Cardiovasc.Res.* 42, 543-549.
4. Boulay, G., Brown, D.M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M.X., Chen, Z., Birnbaumer, M., Mikoshiba, K. und Birnbaumer, L. (1999). Modulation of Ca<sup>2+</sup> entry by polypeptides of the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor (IP<sub>3</sub>R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP<sub>3</sub>R in store depletion-activated Ca<sup>2+</sup> entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14955-14960.
5. Butterworth, J.F. und Strichartz, G.R. (1990). Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology* 72, 711-734.
6. Caldwell, R.A., Clemo, H.F. und Baumgarten, C.M. (1998). Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical considerations. *Am. J. Physiol.* 275, C619-C621.

7. Cheng, Y., Huo, Q., Lu, J., Li, R. und Wang, K. (1999). The transport kinetics of lanthanide species in a single erythrocyte probed by confocal laser scanning microscopy. *J. Biol. Inorg. Chem.* 4, 447-456.
8. Clapham, D.E., Runnels, L.W. und Strubing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 387-396.
9. Evans, C.H. (1990). *Biochemistry of the Lanthanides*. (New York: Plenum Press), S. 15-30, 219-223.
10. Förstermann, U. (1998). Gefäßwirksame Pharmaka mit Angriff an Ionenkanälen. In *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Herausgeber: W. Forth, D. Henschler, W. Rummel und K. Starke S. 420-423.
11. Freichel, M., Suh, S.H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., Hofmann, F., Flockerzi, V. und Nilius, B. (2001). Lack of an endothelial store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  current impairs agonist-dependent vasorelaxation in  $\text{TRP4}^{-/-}$  mice. *Nat. Cell Biol.* 3, 121-127.
12. Funayama, M., Goto, K. und Kondo, H. (1996). Cloning and expression localization of cDNA for rat homolog of TRP protein, a possible store-operated calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) channel. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 43, 259-266.
13. Groschner, K., Hingel, S., Lintschinger, B., Balzer, M., Romanin, C., Zhu, X. und Schreibmayer, W. (1998). Trp proteins form store-operated cation channels in human vascular endothelial cells. *FEBS Lett.* 437, 101-106.

14. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. und Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85-100.
15. Hardie, R.C. und Minke, B. (1992). The *trp* gene is essential for a light-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8, 643-651.
16. Harteneck, C., Obukhov, A.G., Zobel, A., Kalkbrenner, F. und Schultz, G. (1995). The *Drosophila* cation channel *trpl* expressed in insect Sf9 cells is stimulated by agonists of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* 358, 297-300.
17. Heiner, I., Eisfeld, J., Halaszovich, C.R., Wehage, E., Jüngling, E., Zitt, C. und Lückhoff, A. (2003). Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through LTRPC2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem. J.* (*in press*)
18. Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes.* (Sunderland: Sinauer Associates).
19. Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T. und Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 259-263.
20. Hoth, M. und Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353-356.
21. Hu, Y. und Schilling, W.P. (1995). Receptor-mediated activation of recombinant *Trpl* expressed in Sf9 insect cells. *Biochem. J.* 305 ( Pt 2), 605-611.

22. Jung, S., Mühle, A., Schaefer, M., Strotmann, R., Schultz, G. und Plant, T.D. (2003). Lanthanides Potentiate TRPC5 Currents by an Action at Extracellular Sites Close to the Pore Mouth. *J. Biol. Chem.* 278, 3562-3571.
23. Kiselyov, K., Mignery, G.A., Zhu, M.X. und Muallem, S. (1999). The N-terminal domain of the IP<sub>3</sub> receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol.Cell* 4, 423-429.
24. Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G., Zhu, X., Birnbaumer, L. und Muallem, S. (1998). Functional interaction between InsP<sub>3</sub> receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 396, 478-482.
25. Kwan, C.Y. und Putney, J.W., Jr. (1990). Uptake and intracellular sequestration of divalent cations in resting and methacholine-stimulated mouse lacrimal acinar cells. Dissociation by Sr<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> of agonist-stimulated divalent cation entry from the refilling of the agonist-sensitive intracellular pool. *J. Biol. Chem.* 265, 678-684.
26. Li, H.S., Xu, X.Z. und Montell, C. (1999). Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. *Neuron* 24, 261-273.
27. Li, S.W., Westwick, J. und Poll, C.T. (2002). Receptor-operated Ca<sup>2+</sup> influx channels in leukocytes: a therapeutic target? *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 63-70.
28. Löffler, G. und Petrides, P.E. (1997). *Biochemie und Pathobiochemie.* (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), S. 407-410.
29. Ma, H.T., Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K. und Gill, D.L. (2000). Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Science* 287, 1647-1651.

30. Martell, A.E. und Smith, R.E. (1976). Critical Stability Constants. Inorganic Complexes. (New York: Plenum Press), S. 37, 56.
31. Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R.J., Bruford, E.A., Caterina, M.J., Clapham, D.E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D., Kojima, I., Mori, Y., Penner, R., Prawitt, D., Scharenberg, A.M., Schultz, G., Shimizu, N. und Zhu, M.X. (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol. Cell* 9, 229-231.
32. Moss, M. und Roland Jr., H. (2001). IX Disorders of the Respiratory System: Acute Respiratory Distress Syndrome. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Herausgeber: E. Braunwald, A. S. Fauci, D. L. Kasper, S. L. Hauser, D. L. Longo und J. L. Jameson, S. 1523-1526.
33. Pak, W.L., Grossfield, J. und Arnold, K.S. (1970). Mutants of the visual pathway of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 227, 518-520.
34. Peeters, G.A., Kohmoto, O. und Barry, W.H. (1989). Detection of  $La^{3+}$  influx in ventricular cells by indo-1 fluorescence. *Am. J. Physiol.* 256, C351-C357.
35. Petersen, C.C., Berridge, M.J., Borgese, M.F. und Bennett, D.L. (1995). Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila trp* and evidence for the existence of vertebrate homologues. *Biochem. J.* 311 ( Pt 1), 41-44.
36. Philipp, S., Cavalie, A., Freichel, M., Wissenbach, U., Zimmer, S., Trost, C., Marquart, A., Murakami, M. und Flockerzi, V. (1996). A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila TRP* and *TRPL*. *EMBO J.* 15, 6166-6171.

37. Poeck, K. und Hacke, W. (2001). Neurologie. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), S. 426.
38. Preuss, K.D., Noller, J.K., Krause, E., Gobel, A. und Schulz, I. (1997). Expression and characterization of a trpl homolog from rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240, 167-172.
39. Putney, J.W., Jr. und McKay, R.R. (1999). Capacitative calcium entry channels. *Bioessays* 21, 38-46.
40. Sakmann, B. und Neher, E. (1995). Single-Channel Recording. (New York: Plenum).
41. Schlingmann, K.P., Weber, S., Peters, M., Niemann, N.L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., Syrrou, M., Nielsen, S., Sassen, M., Waldegger, S., Seyberth, H.W. und Konrad, M. (2002). Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat. Genet.* 31, 166-170.
42. Schütz, W. (1998). Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: das Herz. In *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Herausgeber: W. Forth, D. Henschler, W. Rummel und K. Starke, S. 363-406.
43. Schwarz, W., Palade, P.T. und Hille, B. (1977). Local anesthetics. Effect of pH on use-dependent block of sodium channels in frog muscle. *Biophys. J.* 20, 343-368.
44. Strichartz, G.R. (1973). The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine. *J. Gen. Physiol.* 62, 37-57.

45. Suss-Toby, E., Selinger, Z. und Minke, B. (1991). Lanthanum reduces the excitation efficiency in fly photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 98, 849-868.
46. Tirupathi, C., Freichel, M., Vogel, S.M., Paria, B.C., Mehta, D., Flockerzi, V. und Malik, A.B. (2002). Impairment of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in TRPC4<sup>-/-</sup> mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circ. Res.* 91, 70-76.
47. Vaca, L., Sinkins, W.G., Hu, Y., Kunze, D.L. und Schilling, W.P. (1994). Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am. J. Physiol.* 267, C1501-C1505.
48. Voets, T., Prenen, J., Fleig, A., Vennekens, R., Watanabe, H., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J., Droogmans, G., Penner, R. und Nilius, B. (2001). CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties. *J. Biol. Chem.* 276, 47767-47770.
49. Wes, P.D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G. und Montell, C. (1995). TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9652-9656.
50. Yue, L., Peng, J.B., Hediger, M.A. und Clapham, D.E. (2001). CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* 410, 705-709.
51. Zhu, X., Chu, P.B., Peyton, M. und Birnbaumer, L. (1995). Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the Drosophila trp gene. *FEBS Lett.* 373, 193-198.

52. Zhu, X., Jiang, M. und Birnbaumer, L. (1998). Receptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$  influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *J. Biol. Chem.* 273, 133-142.
53. Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E. und Birnbaumer, L. (1996). trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Cell* 85, 661-671.
54. Zitt, C., Halaszovich, C.R. und Lückhoff, A. (2002). The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry. *Prog. Neurobiol.* 66, 243-264.
55. Zitt, C., Obukhov, A.G., Strubing, C., Zobel, A., Kalkbrenner, F., Lückhoff, A. und Schultz, G. (1997). Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium-activated cation currents not related to store depletion. *J. Cell Biol.* 138, 1333-1341.
56. Zitt, C., Zobel, A., Obukhov, A.G., Harteneck, C., Kalkbrenner, F., Lückhoff, A. und Schultz, G. (1996). Cloning and functional expression of a human  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* 16, 1189-1196.
57. Zweifach, A. und Lewis, R.S. (1993). Mitogen-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6295-6299.

## Lebenslauf

Name: Christian Rudolf Halaszovich, geboren am 4. Juni 1975 in Aachen.

Vater: Dr. ing. Stephan Halaszovich

Mutter: Ellen Halaszovich, geborene Gorzny

1982-84 Besuch der Katholischen Grundschule in Jülich

1984-86 Besuch der Gemeinschaftsgrundschule in Linnich

1986-95 Besuch des Gymnasiums Haus Overbach in Jülich-Barmen

1995 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

1995-1996 Wehrdienst im Sanitätsdienst der Luftwaffe:  
Grundausbildung an der Sanitätsschule der Luftwaffe in Giebelstadt,  
anschließend Dienst in der Sanitätsstaffel der NATO-Airbase Geilenkirchen

1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der RWTH Aachen

1998 Beginn der Doktorarbeit „Inhibition des TRPC3-Kationenkanals durch Lanthanidionen“ am Institut für Physiologie unter der Betreuung des Herrn Prof. A. Lückhoff

1998 Ärztliche Vorprüfung

1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1999 Einschreibung für Physik als zweiten Studiengang

2000-2003 Tätigkeit als Studentische Hilfskraft am Institut für Physiologie

2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2002-2003 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Aachen

2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

ab 12/2003 AiP am Institut für Pharmakologie der RWTH Aachen