

Aktivierung von Kaliumkanälen durch Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen in Mäusefibroblasten

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von Anja Dodt

aus Hanau

Gießen 2003

**Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
des Fachbereichs Medizin**

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gf. Direktor: Prof. Dr. H. Schmidt

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Dreyer

2. Gutachter: PD Dr. A. Scholz

Tag der Disputation: 24.06.2004

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung		1
1.1	Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und sein Rezeptor	2
1.2	Der Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF) und sein Rezeptor	4
1.3	Aufgabenstellung	5
2 Material und Methoden		
2.1	Verwendete Zelllinien	7
2.2	Zellkultur	8
2.3	Elektrophysiologische Messungen	10
2.3.1	Aufbereiten der Zellen für Patch-Clamp Experimente	10
2.3.2	Aufbau des Patch-Clamp Meßstandes	10
2.3.3	Herstellung der Glas-Mikropipetten („Patchpipetten“)	12
2.3.4	Ganzzell-Ableitungskonfiguration	13
2.3.5	Ionenlösungen	15
2.3.6	Korrektur für auftretende Liquid-Junction Potentiale	16
2.3.7	Osmolarität der Intra- und Extrazellulärlösungen	17
2.4	Verwendete Substanzen	18
2.5	Statistik	20
3 Ergebnisse		
3.1	LPA-induzierter Kaliumstrom in NIH3T3-Mäusefibroblasten	21
3.2.1	PDGF-induzierter Membranstrom in NIH3T3-Zellen	21
3.2.2	Strom/ Spannungsabhängigkeit des PDGF-induzierten Membranstroms	23
3.2.3	Abhängigkeit des PDGF-induzierten Kaliumstroms von der intrazellulären Calciumkonzentration	24

3.2.4	Pharmakologisches Profil des PDGF-induzierten Kaliumstroms	25
3.2.5	Bedeutung der Tyrosinkinaseaktivität des PDGF-Rezeptors für die Aktivierung des Kaliumstroms	26
3.3	Wirkung von EGF auf NIH3T3-Mäusefibroblasten	27
3.4.1	Aktivierung eines Kaliumstroms durch EGF in EGF-R Mäusefibroblasten	28
3.4.2	Konzentrations- Wirkungsbeziehung des EGF-Effekts	30
3.4.3	Sequenzielle Applikation von EGF	31
3.5	Aktivierung eines Kaliumstroms durch PDGF in EGF-R Zellen	33
3.6	Wirkung von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren	34
3.6.1	Selektiver Tyrosinkinase-Inhibitor AG 1478 für EGF-Rezeptoren	34
3.6.2	Selektiver Tyrosinkinase-Inhibitor AG 1295 für PDGF-Rezeptoren	36
3.6.3	Beeinflussung des LPA-induzierten Kaliumstroms durch AG 1295 und AG 1478	37
3.7	Aktivierung eines Kaliumstroms durch EGF und LPA in DEL Zellen	38
3.8	Wirkung von EGF und LPA auf NIH3T3-Gotoh Zellen	40
4 Diskussion		41
5 Zusammenfassung		46
6 Literaturverzeichnis		47

1 Einleitung

Bei der elektrophysiologischen Untersuchung von NIH3T3-Mäusefibroblasten wurde gezeigt, daß man in normalen Zellen keinen Kaliumstrom registrieren kann, wohingegen dies in transformierten Zellen, in denen die Onkogenprodukte v-Src, v-Ras oder v-Fms exprimiert sind oder das Protoonkogenprodukt c-Src überexprimiert ist, möglich ist (Draheim et al. 1995, Decker et al. 1998, Repp et al. 2001). Virale Onkogene (*v-onc*) unterscheiden sich von ihren zellulären Homologen (*c-onc*) durch Mutationen und Deletionen. Die entsprechenden viralen Proteine sind im Gegensatz zu den zellulären Homologen nicht mehr durch die normalen zellulären Regulationsmechanismen kontrollierbar. Das v-Src Gen des Rous-Sarkom-Virus (RSV) verursacht bei Hühnern Sarkome des Bindegewebes, v-Ras wird bei Leukämie, kolorektalen Karzinomen und Schilddrüsenkarzinomen gefunden. v-Fms ist das virale Onkogenprodukt des Kolonie-stimulierenden Faktor-Rezeptors c-Fms. Die Überexpression des Protoonkogenprodukts c-Src kann ebenfalls kolorektale Karzinome und Mammakarzinome verursachen (Lotz et al. 2003).

Die Aktivierung von Kaliumkanälen bei der Transformation von normalen Zellen zu dereguliert wachsenden Tumorzellen läßt vermuten, daß Kaliumkanäle neben den schon seit langem bekannten Funktionen wie der Regulation des Membranruhepotentials und der Modulation der Erregungsleitung (Cook 1990) auch bei der zellulären Proliferation eine wichtige Rolle spielen (Übersicht bei Wonderlin und Strobl 1996). Die Proliferation von Zellen kann durch verschiedene Mitogene und Wachstumsfaktoren beeinflußt werden. Ein wichtiges Mitogen ist die Lyso-phosphatidsäure (LPA=lysophosphatidic acid), deren Signale über einen G-Proteingekoppelten Rezeptor und die Aktivierung der Mitogen-activated-protein-kinase (MAP-Kinase-) Kaskade in den Zellkern weitergeleitet werden (Force und Bonventre 1998). Es konnte gezeigt werden, daß LPA in NIH3T3-Mäusefibroblasten einen spannungsunabhängigen, calciumabhängigen Kaliumkanal mit einer Einzelkanalleitfähigkeit von 33 pS aktiviert (Repp et al. 1998). Dieser Kaliumkanaltyp hat ähnliche Eigenschaften wie der vor einigen Jahren klonierte menschliche, spannungsunabhängige, calciumabhängige Kaliumkanal kleiner Leitfähigkeit (auch humaner Gardos- Kaliumkanal genannt), der als hSK₄-Kanal (human small conductance potassium channel) bezeichnet wird (Joiner et al. 1997). Eine besondere Eigenschaft des LPA-aktivierten Kaliumkanaltyps ist, daß er nicht nur

durch das Skorpiontoxin Charybdotoxin vollständig blockiert werden kann, sondern auch durch die Skorpiontoxine Margatoxin und Iberiotoxin (Repp et al. 1998). In diesem pharmakologischen Profil unterscheidet er sich entscheidend von allen anderen bisher beschriebenen Kaliumkanälen und auch vom hSK₄-Kanal, der durch Iberiotoxin nicht blockiert werden kann (Jensen et al. 1998).

Es stellte sich nun die Frage, ob auch Wachstumsfaktoren wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF=epidermal growth factor) und der Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF=platelet-derived growth factor), die ebenfalls eine proliferationsfördernde Wirkung haben, Kaliumkanäle in NIH3T3-Zellen aktivieren können. Die Signale dieser Wachstumsfaktoren werden nicht über G-Proteine, sondern über Liganden-gesteuerte Rezeptortyrosinkinasen in die Zelle weitergeleitet.

1.1 Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und sein Rezeptor

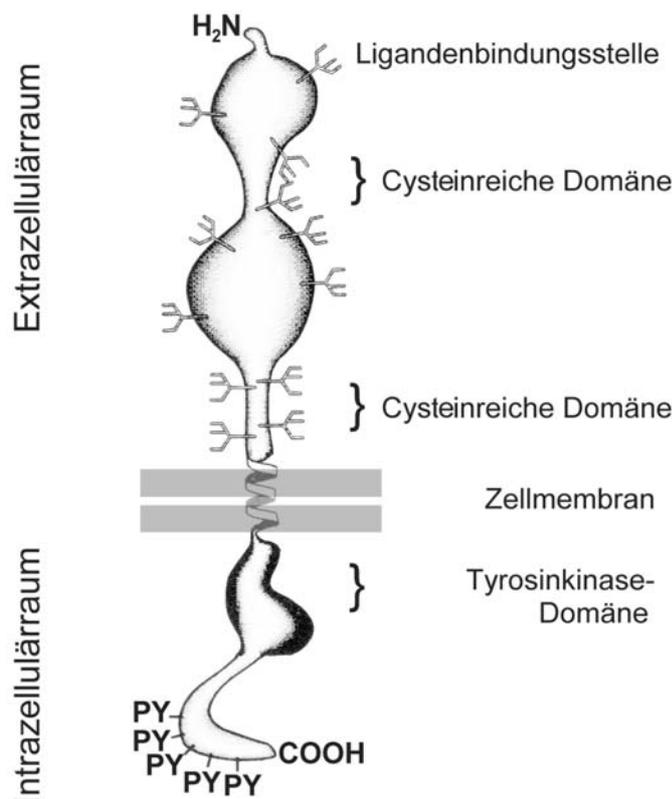


Abb. 1: Schematische Darstellung eines monomeren EGF-Rezeptors. PY kennzeichnet die phosphorylierbaren Tyrosinreste. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Der EGF-Rezeptor (Abb. 1) ist ein 170 kDa schweres Glykoprotein, das aus 1186 Aminosäuren aufgebaut ist, in der Zellmembran vieler Zelltypen zu finden ist und über eine rezeptorgebundene Tyrosinkinaseaktivität verfügt (Carpenter & Wahl 1990). Seine Ligandenbindungsstelle liegt extrazellulär, während die Tyrosinkinase-Domäne intrazellulär lokalisiert ist. Verbunden sind diese beiden Anteile durch eine helikale Domäne, die einspännig die Zellmembran durchläuft. Die EGF-Rezeptor-Familie zeichnet sich im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch zwei cysteinreiche Regionen in ihrer extrazellulären Domäne aus. Der zytoplasmatische Bereich der Rezeptortyrosinkinase wird in verschiedene Abschnitte eingeteilt: die Juxtamembranregion, die sich unmittelbar an die Transmembrandomäne anschließt, die Tyrosinkinasedomäne und der carboxyterminale Bereich, in dem sich besonders viele Andockstellen für signalübertragende Proteine finden (Ullrich & Schlessinger 1990). Neben EGF, einem 53 AS langen und 6 kDa schweren Polypeptid, das 1975 entdeckt wurde, sind mehrere andere Liganden ebenso fähig, an EGF-Rezeptoren zu binden: TGF- α (transforming growth factor- α), Amphiregulin, Heparin-bindendes EGF (HB-EGF) und Betacellulin. Aufgrund ähnlicher Aminosäuresequenzen und Aktivitäten gehören diese Mitogene zur EGF-Familie (Carpenter & Cohen 1990).

Nach der extrazellulären Bindung eines Liganden, z.B. eines EGF-Moleküls an ein Rezeptor-Monomer, findet eine Dimerisierung zweier Monomere statt (Schlessinger 1988) und es kommt sehr schnell zu einer Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste in der Tyrosinkinasedomäne und im carboxyterminalen Bereich des zytoplasmatischen Rezeptorteils (Ullrich & Schlessinger 1990). Diese Phosphorylierung führt zu einer verstärkten Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors, die jedoch nur transient ist. Dieser Vorgang ist die erste Stufe in der Signaltransduktion. Nach der Aktivierung durch EGF-Moleküle wird der Rezeptor innerhalb weniger Minuten internalisiert, d.h. er verschwindet von der Zelloberfläche (Übersicht bei Prigent & Lemoine 1992).

Durch die verstärkte Tyrosinkinaseaktivität werden eine Reihe von zytoplasmatischen Signalketten aktiviert. Am besten untersucht ist die MAP-Kinase-Kaskade über das monomere G-Protein Ras (Lee et al. 1996). Mutationen, Deletionen oder Überexpression des EGF-Rezeptors findet man bei vielen Tumortypen, z.B. dem epithelialen Karzinom, Bronchial-, Mamma-, Blasen- und Magenkarzinom (Prigent & Lemoine 1992). Diese Tumore gehen mit einer

schlechten klinischen Prognose einher. Die Anzahl der EGF-Rezeptoren kann man als prognostischen Marker für den Therapieerfolg bei Tumoren, die EGF-Rezeptoren überexprimieren, nutzen (Pierce et al. 1991).

1.2 Der Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF) und sein Rezeptor

Der Name PDGF (platelet-derived growth factor) weist auf den thrombozytären Ursprung dieses Wachstumsfaktors hin und ist eigentlich irreführend, da außer den Thrombozyten noch einige andere Zelltypen wie Endothelzellen, Makrophagen und Muskelzellen PDGF sezernieren können (Ross et al. 1986, Hughes et al. 1996).

Bei PDGF handelt es sich um ein Protein mit einer Molmasse von 30 kDa, das aus zwei Peptidketten besteht. Da es zwei verschiedene Peptidkettentypen (A und B) gibt, können sich Homodimere (AA oder BB) und Heterodimere (AB) bilden, wobei die Dimere über Disulfidbrücken verbunden sind. Thrombozyten sezernieren PDGF-AB, andere Zellen in der Regel AA oder BB (Collins et al. 1985, Matoskova et al. 1989).

PDGF bindet an PDGF α - und β -Rezeptoren. Der PDGF α -Rezeptor besteht aus 1089 AS, der PDGF β -Rezeptor aus 1106 AS. Wie in Abb. 2 ersichtlich, kann das PDGF Homodimer AA nur mit dem $\alpha\alpha$ -Rezeptor interagieren, während das BB-Homodimer sowohl mit $\alpha\alpha$ als auch mit $\alpha\beta$ und $\beta\beta$ interagieren kann. Das PDGF Heterodimer AB kann mit $\alpha\alpha$ und $\alpha\beta$ interagieren. Die verschiedenen Rezeptortypen sind für bestimmte Gewebe spezifisch.

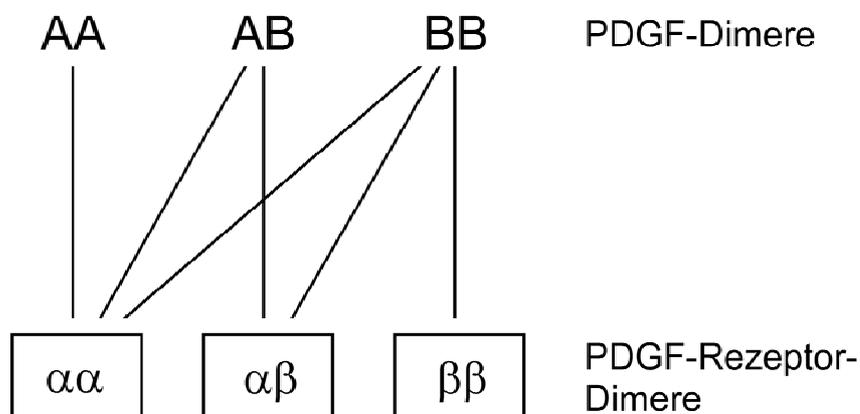


Abb. 2: Interaktionsmöglichkeiten zwischen PDGF-Dimeren und PDGF-Rezeptor-Dimeren.

Im Gegensatz zum EGF-Rezeptor enthält der PDGF-Rezeptor extrazellulär fünf Domänen mit strukturellen Homologien zu Immunglobulinen. Im zytoplasmatischen Bereich verfügt der PDGF-Rezeptor über zwei Kinasedomänen, die durch eine Insertion unterbrochen sind. Durch die extrazelluläre Bindung von PDGF kommt es zu einer Dimerisierung zweier Rezeptoren und zu einer Aktivierung der intrazellulär gelegenen Tyrosinkinase-Domäne. Das wichtigste Substrat des aktivierten Rezeptors stellt dieser selbst dar, wobei die aktivierte Kinasedomäne jeweils Tyrosinreste der anderen Rezeptoruntereinheit phosphoryliert (Transphosphorylierung). Die phosphorylierten Tyrosinreste der Rezeptoren dienen als Bindungsstellen für Proteine, über die verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden können.

Zur PDGF-Rezeptorfamilie gehören neben dem Plättchen-Wachstumsfaktor-Rezeptor auch der Makrophagenkolonie-stimulierende Faktor-Rezeptor (CSF-R). PDGF-Rezeptoren sind ein klassisches Beispiel für die Anfälligkeit von Rezeptor-Tyrosinkinasen für Deregulationen. Ein Protein, das vom *v-sis* Gen des Affensarkomvirus (*simian sarcoma virus*, SSV) codiert wird, hat eine ähnliche Aminosäuresequenz wie menschliches PDGF. Das *v-Sis* Onkogenprodukt regt eine Zelle an, große Mengen eines PDGF-ähnlichen Wachstumsfaktors zu produzieren. Dieser wiederum stimuliert nach Bindung an PDGF-Rezeptoren ein exzessives Wachstum durch einen autokrinen Mechanismus. Durch Bildung von Wachstumsfaktoren können die Zellen ihr eigenes Wachstum stimulieren. Dies kann zu ungehemmtem Wachstum führen (Robbins et al. 1985).

1.3 Aufgabenstellung

Zunächst sollte in der vorliegenden Arbeit die Frage beantwortet werden, ob die klassischen Wachstumsfaktoren, der Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF) und der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) in der Lage sind, über ihre entsprechenden Rezeptoren einen Kaliumstrom in NIH3T3-Zellen zu induzieren und inwieweit die Tyrosinkinaseaktivität dabei eine Rolle spielt.

Von bestimmten Rezeptortyrosinkinasen wurde gezeigt, daß z. B. durch Aktivierung von EGF-Rezeptoren nach Ligandenbindung (z.B. EGF) auch die Tyrosinkinaseaktivitäten von PDGF-Rezeptoren erhöht werden kann, ohne daß diese PDGF-Rezeptoren von einem Liganden z.B. PDGF aktiviert wurden (Carpenter 2000, Li et al. 2000, He et al. 2001). Eine weitere Aufgabe in der vorliegenden Arbeit war daher

zu untersuchen, ob solche Transaktivierungen oder sogenannte „cross-talk“ Phänomene zwischen EGF- und PDGF-Rezeptoren auch zu einer transienten Aktivierung von Kaliumströmen führen können.

Es ist bekannt, daß Lysophosphatidsäure (LPA) eine Phosphorylierung des PDGF-Rezeptors induzieren kann (Daub et al. 1997, Herrlich et al. 1998). Als dritte Aufgabe sollte deshalb untersucht werden, ob entsprechende „cross-talk“ Phänomene auch hinsichtlich einer transienten Kaliumstromaktivierung zwischen dem Wachstumsfaktor-Rezeptor EGF und LPA auf der einen und PDGF und LPA auf der anderen Seite existieren.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendete **NIH3T3-Mäusefibroblastenzelllinie** wurde unserem Labor von Dr. H. Maruta (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australien) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich bei dieser Zelllinie um einen Subklon der NIH3T3 Zelllinie, die ursprünglich am National Institute of Health (NIH) in Bethesda (USA) durch Drittelung der Zellkultur mit Trypsin an jedem dritten Tag (3T3) aus einer Primärkultur embryonaler Mäusefibroblasten kloniert wurde (Jainchill et al. 1969). Diese Zelllinie wird seit vielen Jahren in Labors weltweit für Transfektions- und Transformationsexperimente verwendet. Die Zellen wurden 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 kultiviert. Ebenfalls verwendet wurden **NIH3T3-Gotoh-Mäusefibroblasten**. Diese Zelllinie exprimiert sehr wenige endogene EGF-Rezeptoren (Gotoh et al. 1993). Wir haben diese Zellen von Dr. N. Gotoh (Universität Tokyo, Japan) erhalten. Sie werden wie die normalen NIH3T3-Mäusefibroblasten kultiviert.

Bei den **EGF-R Zellen** handelt es sich um NIH3T3-Mäusefibroblasten, die EGF-Rezeptoren in hoher Dichte überexprimieren. In der Literatur wurde beschrieben, dass EGF-R Zellen zusätzlich mit 20 ng/ml EGF im Medium kultiviert werden müssen (Gotoh et al. 1993). Um zu untersuchen, ob EGF im Kulturmedium einen Einfluß auf die Membranströme hat, wurden EGF-R Zellen mit und ohne zusätzlichem EGF im Kulturmedium kultiviert und die Membranströme vor und nach Applikation von EGF im Verlauf von zwei Monaten gemessen. Es zeigte sich dabei, daß die Kultivierung mit EGF weder einen Einfluß auf den unspezifischen Membranstrom der EGF-R Zellen, noch auf die Amplitude des durch EGF induzierten Membranstroms hat. Deshalb wurde für die beschriebenen Experimente mit den EGF-R Zellen auf die zusätzliche Gabe von EGF bei der Zellkultivierung verzichtet.

DEL Zellen exprimieren einen trunkierten EGF-Rezeptor. Die Zellen wurden mit einer mutierten DNA stabil transfiziert, so daß in der Aminosäuresequenz des EGF-Rezeptors nach der Aminosäure 1011 ein zusätzliches Serin eingefügt wurde, was zu einem Kettenabbruch bei der Synthese führt. Diese EGF-Rezeptoren verfügen über eine verminderte Tyrosinkinaseaktivität. Drei Autotyrosinphosphorylierungs-

stellen fehlen (Gotoh et al. 1993). EGF-R Zellen und DEL Zellen wurden zusätzlich mit Geneticin kultiviert (400 µg/ml), das als Selektionsmarker diente.

2.2 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in einem Zellkultur-Inkubator (CO₂-Inkubator 6220, Fa. Heraeus, Hanau) bei 37°C und 95% Luftfeuchte in einer 94% Luft / 6% CO₂ Atmosphäre kultiviert. Das Wechseln des Zellkulturmediums erfolgte jeden zweiten Tag, bis der Boden der Petrischalen (ø 94 mm, Greiner GmbH, Nürtingen) dicht mit Zellen bewachsen war. Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit 5 ml phosphatgepufferter Lösung (PBS=phosphate buffered saline ; [in mM] : 170 NaCl, 3,4 KCl , 10,1 NaH₂PO₄, 2,2 K₂HPO₄, pH 7,4) gespült. Da die Zellen relativ stark am Petrischalenboden haften, wurde der konfluente Zellrasen anschließend mit 5 ml Trypsin-haltiger (0,05% w/v) PBS-Lösung behandelt, bis im Lichtmikroskop eine beginnende Ablösung der Zellen vom Petrischalenboden beobachtet werden konnte. Die Trypsin-PBS-Lösung wurde dann abgesaugt. Die nur noch schwach adherenten Zellen wurden durch kräftiges Abspülen mit frischem Zellkulturmedium (10 ml) und wiederholtes Aufziehen in eine 10 ml Glaspipette vereinzelt. Anschließend wurden der gewünschten Verdünnung entsprechende Mengen der entstandenen Zellsuspension aufgenommen und auf neue Petrischalen, in die frisches Zellkulturmedium vorgelegt war, ausplattiert. Dazu wurden z.B. 3 ml der entstandenen Zellsuspension in 7 ml vorgelegtes neues Zellkulturmedium pipettiert und anschließend durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturschale gut verteilt.

Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Um einen Totalverlust der Zellen durch mögliche Kontaminationen zu verhindern sowie für den Fall, daß sich die Zelllinien mit zunehmender Passagezahl in ihren Eigenschaften verändern könnten, wurden unmittelbar nach Erhalt und Anzüchtung der Zelllinien mehrere Aliquots eingefroren und in flüssigem Stickstoff bei ca. -200°C aufbewahrt. Das Einfrieren und Auftauen der Zellen erfolgte nach folgendem Protokoll:

a) Einfrieren:

1. Die Zellen einer konfluenten Petrischale (\varnothing 94 mm) wurden mit 5 ml Trypsin-PBS (0,05% w/v) behandelt, bis eine beginnende Ablösung vom Schalenboden beobachtet werden konnte. Die Lösung wurde daraufhin aus der Petrischale abgesaugt und die Zellen mit einer Glaspipette in 4 ml eiskaltem Einfrier-Medium (Zellkulturmedium mit 20% NKS-Gehalt und zusätzlich 10% DMSO (Dimethylsulfoxid)) aufgenommen.
2. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in vier 1,5 ml Cryo-Röhrchen (Nunc GmbH, Wiesbaden) aliquotiert.
3. Die Cryo-Röhrchen wurden für etwa 30 min bei 4°C (im Kühlschrank in einem vortemperierten Eppendorf-Kühlakku) vorgekühlt.
4. Danach wurden die Cryo-Röhrchen zwei Stunden bei -20°C aufbewahrt, dann 12 Stunden bei -70°C bis -80°C. Anschließend wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff zur unbegrenzten Lagerung überführt.

b) Auftauen:

1. Ein Cryo-Röhrchen wurde direkt aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37°C Wasserbad gestellt.
2. Unmittelbar (!) nach dem Auftauen der Zellsuspension wurde diese 120 s bei 1100 rpm zentrifugiert (Labofuge 400e, Fa. Heraeus, Hanau).
3. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Die Zellen wurden in einer mit Zellkulturmedium mit 20% NKS-Gehalt („Auftaumedium“) gefüllten Glaspipette resuspendiert und in ein mit 5 ml vorgewärmtem (37°C) Zellkulturmedium gefülltes Polystyrol-Röhrchen aufgenommen.
4. Die Zellsuspension wurde nochmals 120 s bei 1100 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in 10 ml „Auftaumedium“ resuspendiert.
5. Die Zellsuspension wurde auf eine 94 mm Petrischale ausplattiert und bis zur ersten Passage in „Auftaumedium“ kultiviert. Erst dann wurde wieder normales Zellkulturmedium verwendet.

Da sowohl beim Einfrieren als auch beim Auftauen eine Schädigung der Zellen nicht ausgeschlossen werden kann, wurden die frisch aufgetauten Zelllinien zunächst mindestens zweimal passagiert, bevor sie wieder für elektrophysiologische Experimente verwendet wurden.

2.3 Elektrophysiologische Messungen

2.3.1 Aufbereiten der Zellen für Patch-Clamp Experimente

a) NIH3T3-Mäusefibroblasten

Die Zellen wurden 36-48 Stunden vor dem Experiment in 35 mm Petrischalen in einer Dichte von ca. $1-2 \times 10^5$ Zellen pro Schale ausplattiert. Es wurde darauf geachtet, daß sich zum Zeitpunkt der Messung noch kein dichter Zellrasen gebildet hatte, um die Zellen in ihrer proliferativen Phase zu messen. Die Zelldichte betrug etwa 1×10^6 Zellen pro Schale. Artefakte durch wachstumsgehemmte oder bereits apoptotische Zellen sollten damit weitgehend vermieden werden. Einzeln liegende Zellen, die offensichtlich keine Kontakte zu anderen Zellen hatten, wurden ebenfalls nicht für Messungen verwendet.

An flach ausgebreiteten, zum Teil stark mit anderen Zellen in Verbindung stehenden, adhären Zellen war es jedoch kaum möglich, das Membranpotential mit Hilfe der Patch-Clamp Technik kontrolliert zu verändern. Zudem war es schwierig, die Patch-Pipette für eine stabile Ableitung an der Zelle zu positionieren. Daher war es notwendig, die Zellen vor dem Versuch in eine abgerundete Form zu überführen. Dies wurde durch 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 Zellen aber noch ausreichend am Petrischalenboden hafteten. Die weitere Ablösung wurde dann durch mehrmaliges Waschen mit trypsinfreier Extrazellulärlösung (s. Abschnitt 2.3.5, Tabelle 1A) abgestoppt. Nach etwa 10 Minuten Wartezeit waren die Fibroblasten dann spindel- bis dreieckig-birnenförmig, erschienen transparent und doppeltbrechend. In diesem Zustand waren sie für die elektrophysiologischen Experimente gut geeignet mit einer maximalen Länge von ungefähr 25 μm und einer maximalen Breite von ca. 18 μm . Spikes oder dünne Filopodien wurden dabei nicht berücksichtigt.

2.3.2 Aufbau des Patch-Clamp Meßstandes

Der schematische Aufbau der Meßanordnung zur Durchführung von Patch-Clamp Experimenten ist in der Abb. 3 skizziert.

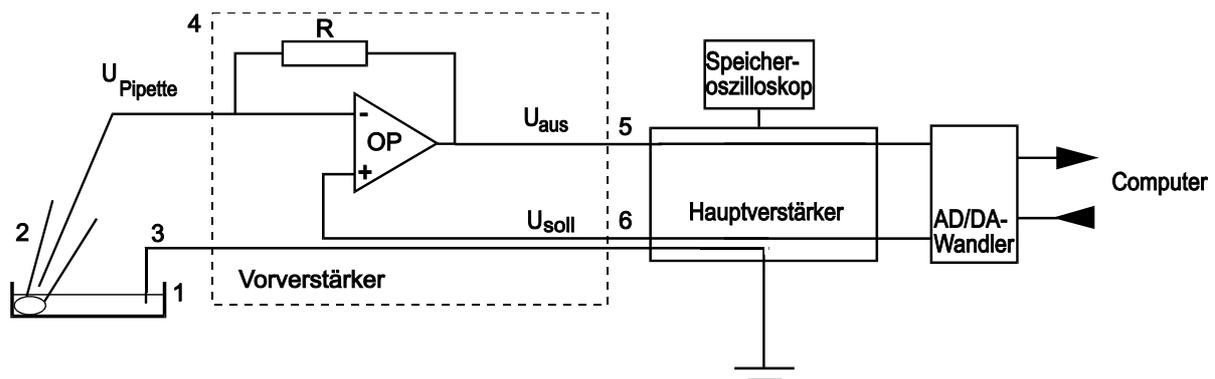


Abb. 3 : Schematischer Aufbau eines Patch-Clamp Meßstandes. (1) Meßkammer mit Badlösung, (2) Patch-Clamp Pipette mit Ableitelektrode und Zelle, (3) Referenzelektrode, (4) Vorverstärker, (5) Ausgangsspannung, die in Abhängigkeit vom hochohmigen Rückkopplungswiderstand R in einen Strom umgerechnet wird,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

Als Meßkammern werden 35 mm Petrischalen verwendet, in denen die Zellen 36-48h kultiviert wurden. Die Petrischalen können direkt in eine Halterung eingesetzt werden, die die Zellen im Strahlengang eines Invertmikroskops (Leica DM-IRB, Leica GmbH, Wetzlar) fixiert. Diese Halterung ermöglicht zudem die Kontrolle und Regelung der Temperatur der Badlösung auf 21°C während der Experimente (Temperature Controller, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen). In die Meßkammer hinein ragen die Referenz- und die Ableitelektrode. Die Ableitelektrode befindet sich in einer Glaskapillare („Patchpipette“), die mit einer Intrazellulärlösung gefüllt ist. Die Metallelektroden bestehen aus chloriertem Feinsilberdraht (Fa. Heraeus, Hanau). Die Halterung der Glaskapillare ist über 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 Registrierung der Ionenströme erfolgt über die in den Elektrolytlösungen der Badkammer bzw. der Patchpipette befindlichen chlorierten Silberelektroden. Die mit der Patchpipette aufgenommenen, sehr kleinen Signale werden über den direkt mit den Elektroden in Verbindung stehenden externen Vorverstärker des Patch-Clamp Verstärkers zunächst verstärkt, um ohne große Beeinträchtigung durch einstrahlende elektromagnetische Störungen zum räumlich getrennt stehenden Hauptgerät des

Patch-Clamp Verstärkers L/M-EPC-7 (List Electronics GmbH, Darmstadt) gelangen zu können. Nach der Endverstärkung und Aufbereitung durch den L/M-EPC-7 werden die Signale mit einem 4pol-Bessel-Tiefpaßfilter (LKB Electronics, Mauer) gefiltert, wobei als Cut-off-Frequenz jeweils ein Drittel der Frequenz der Aufnahmezeit der Datenpunkte (sampling rate) gewählt wurde.

Die Darstellung erfolgt dann analog auf einem Speicheroszillographen (Tektronix GmbH, Köln) und zusätzlich über den Analog/Digitalwandler des Interface-Gerätes ITC-16 (Instrutech Corp., Elmont NY, USA) digitalisiert auf dem Bildschirm eines Computers. 80% der Experimente wurden mit einem Atari-Mega ST4 Computer (Atari, Sunnyvale CA, USA) durchgeführt. Dieser ermöglicht mit seinem Patch-Clamp Datenaufnahme-Programm (M2-Lab Programm Acquire d. Instrutech Corp.) 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 über den Digital/Analogwandlerteil des ITC-16 an den Patch-Clamp Verstärker EPC-7 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 Membranpotential führen. Experimente im späteren Verlauf der vorliegenden Arbeit (ca. 20%) wurden mit einem PC (IBM Pentium 800) durchgeführt, mit dem das Atari-System am Meßstand ersetzt worden war. Dabei wurde das Programm Pulse und PulseFit Version 8.5 (HEKA Elektronik, Lambrecht) verwendet. Die Datenanalyse und -aufbereitung erfolgte mit dem gleichen Rechner und dem M2-Lab Softwarepaket Analysis der Instrutech Corporation.

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

2.3.3 Herstellung der Glas-Mikropipetten („Patchpipetten“)

Aus Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,87 mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld) werden in einem

mehrstufigen Prozess mit einem Horizontal-Puller (Flaming-Brown Puller P-97, Sutter Instrument Co., Novato CA, USA) die Mikropipetten („Patchpipetten“) gezogen, wobei je nach Einstellung Spitzenform und Öffnungsdurchmesser sehr variabel gewählt werden können. Danach werden die Pipettenspitzen mit Hilfe einer Beschichtungs- und Feuerpolier-Apparatur (CPZ101 Pipette Forge, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen) feuerpoliert. Durch das Feuerpolieren kann der Öffnungsdurchmesser der Pipette noch beeinflusst werden. Weiterhin werden durch das Feuerpolieren mögliche Oberflächenunebenheiten des Glases eingeschmolzen und Verunreinigungen von der Pipettenspitze entfernt. Dies ermöglicht einen besseren Kontakt zwischen der Glaswand der Pipettenspitze und der Zellmembran.

2.3.4 Ganzzell- Ableitungskonfiguration

In der Abb.4 ist die in dieser Arbeit verwendete Ganzzell (Whole-Cell) Ableitungskonfiguration der Patch-Clamp Technik gezeigt. Zunächst wird eine mit Intrazellulärlösung (s. Abschnitt 2.3.5, Tabelle 1B,C) gefüllte Patchpipette mittels eines Mikromanipulators unmittelbar an die Membran der in der Badkammer befindlichen Zelle positioniert. Ein mit einer 50 ml Kolbenspritze auf die Pipettenlösung angelegter leichter Überdruck verhindert dabei das Eindringen von Extrazellulärlösung in die Pipette sowie Verunreinigungen der Pipettenspitze beim Durchtritt durch die Badlösungsoberfläche oder durch Partikel in der Badlösung. Zudem wird dadurch die Zellmembran in der letzten Phase der Annäherung der Pipette leicht eingedellt. Der elektrische Widerstand der Patchpipette wird dabei ständig durch einen Testpuls von 10 mV und Messen des dadurch fließenden Stromes kontrolliert.

Mit der Pipette frei in der Badlösung beträgt der Elektrodenwiderstand zwischen 5 und 10 M Ω . Durch Wegnehmen des Überdrucks nähern sich Pipette und Zellmembran einander an, so daß der Widerstand auf etwa 50-100 M Ω ansteigt. Durch Erzeugen eines leichten Unterdrucks mittels der Kolbenspritze entsteht ein so enger Kontakt zwischen Membran und der Glaswand der Pipettenspitze, daß der elektrische Widerstand auf 5-50 G Ω ansteigt ('Giga-Seal', Hamill et al. 1981).

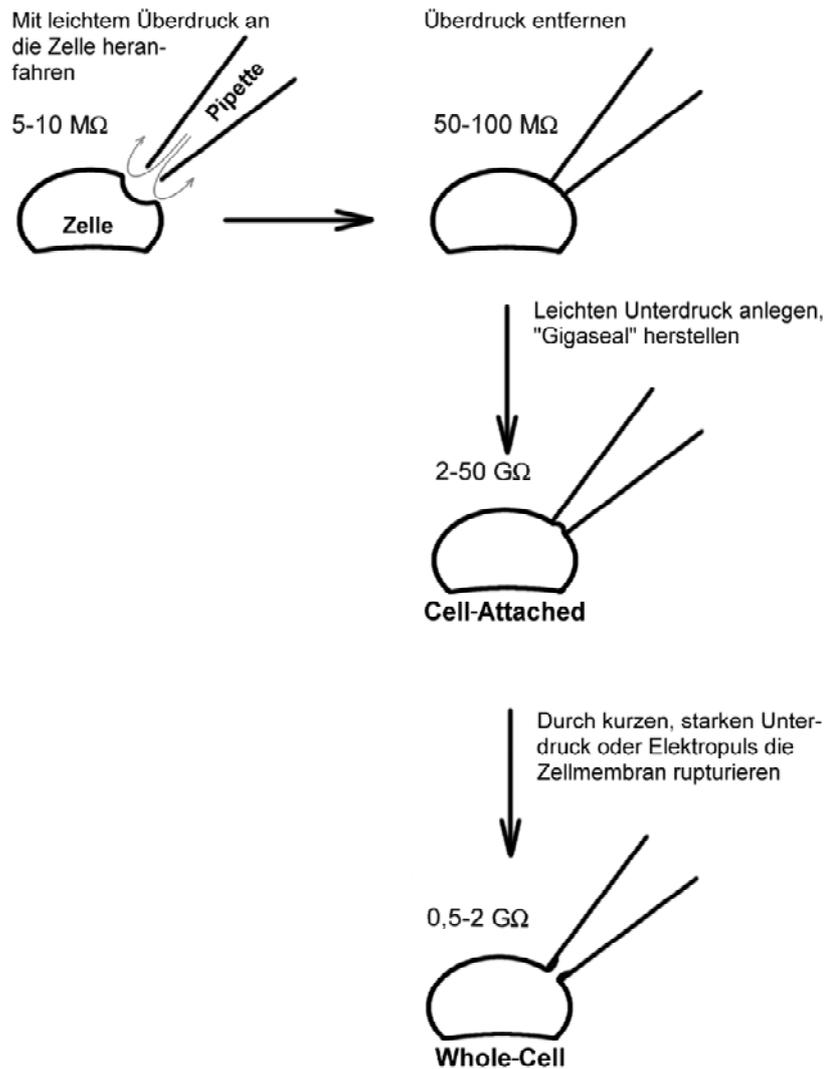


Abb. 4 : Ganzzell- Ableitungskonfiguration der Patch-Clamp Technik (verändert nach Hamill et al. 1981). Erläuterungen siehe Text.

Ausgehend von dieser 'Cell-Attached' Konfiguration kann man durch einen Unterdruckimpuls oder einen kurzen Spannungsimpuls die Membran unter der Pipettenöffnung durchbrechen und gelangt so zur Ganzzell-Ableitungskonfiguration (Whole-Cell Konfiguration), bei der die Elektrode leitend mit dem Zytoplasma verbunden ist. In der Whole-Cell Konfiguration lassen sich die Ionenströme über die Membran der gesamten Zelle messen.

2.3.5 Ionenlösungen

Die für die Patch-Clamp Experimente verwendeten Ionenlösungen sind in Tabelle 1 aufgelistet. Bei den Experimenten wurden die als Extrazellulärlösung bezeichneten Lösungen an der Zellmembranaußenseite und die als Intrazellulärlösung genannten Lösungen an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran eingesetzt.

Tabelle 1A-C : Ionenlösungen

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

A: Extrazellulärlösung

Name	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	Glucose	HEPES
E	140	3	2	2	15	10

Die Einstellung des pH-Werts auf 7,35 erfolgte mit etwa 4 mM NaOH, die finale Na⁺-Konzentration betrug etwa 144 mM.

E = Extrazellulärlösung für physiologische Lösungskombination.

B: In Bezug auf [Ca²⁺]_{frei} streng gepufferte Intrazellulärlösungen

Name	[Ca ²⁺] _{frei}	KGlu	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂	BAPTA	EGTA	HEPES
I10B	0	140	15	2	-	10	-	10
I1μM	1μM	140	10	2	4,35	-	5	10

Die Intrazellulärlösungen wurden mit etwa 4,5 mM KOH auf pH 7,30 eingestellt. Die finale K⁺-Konzentration betrug etwa 144,5 mM.

Glu: Glutamat, I: Intrazellulärlösung. Bei I10B gibt 10 die eingewogene Menge BAPTA in mM an. I1μM=1 μM freie Ca²⁺-Konzentration der Intrazellulärlösung.

C: In Bezug auf [Ca²⁺]_{frei} schwach gepufferte Intrazellulärlösung

Name	[Ca ²⁺] _{frei}	KGlu	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂	BAPTA	HEPES
IBL100 nM	100 nM	140	20	2	29,7μM	0,1	10

Die IBL- Lösung wurde mit etwa 0,3 mM KOH auf pH 7,30 eingestellt. Die finale K⁺-Konzentration betrug etwa 140,3 mM.

IBL: Intrazellulärlösung mit BAPTA, Low buffered. IBL100 nM=100 nM freie intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration.

Die Berechnung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration für die mit EGTA streng gepufferten Intrazellulärlösung erfolgte nach der Formel

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} = K_D \times \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Einwaage}}}{[\text{EGTA}]_{\text{Einwaage}} - [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Einwaage}}}$$

mit einer K_D von 150 nM für EGTA bei pH 7,3. ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ = freie Ca^{2+} -Konzentration in nM; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Einwaage}}$ = eingewogene Ca^{2+} -Konzentration; $[\text{EGTA}]_{\text{Einwaage}}$ = eingewogene EGTA-Konzentration).

In Experimenten, in denen mit Ca^{2+} -freier Intrazellulärlösung gearbeitet wurde, wurde anstelle von EGTA der Ca^{2+} -Chelator BAPTA eingesetzt, da dieser aufgrund einer schnelleren Kinetik in der Lage ist, freies Ca^{2+} schneller als EGTA zu binden (Tsien et al. 1980, Stern et al. 1992).

Zur Berechnung des für die schwach gepufferte Intrazellulärlösung einzuwiegenden Calciums wurde die Formel

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Einwaage}} = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} + \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} \times \text{BAPTA}_{\text{Einwaage}}}{K_D + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}}$$

eingesetzt. Hierbei bedeutet $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ = gewünschte freie Ca^{2+} -Konzentration; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Einwaage}}$ = einzuwiegende Ca^{2+} -Konzentration; $[\text{BAPTA}]_{\text{Einwaage}}$ = eingewogene BAPTA-Konzentration).

Der K_D -Wert für BAPTA in der für Ca^{2+} schwach gepufferten Intrazellulärlösung wurde nach der von Marks und Maxfield vorgeschlagenen Methode berechnet (Marks & Maxfield 1991). Die Dissoziationskonstante von BAPTA hängt stark von der Ionenstärke der verwendeten Lösung ab. Für die verwendete Intrazellulärlösung IBL 100nM ergab sich ein K_D - Wert für Ca^{2+} /BAPTA von 238 nM.

2.3.6 Korrektur für auftretende Liquid-Junction Potentiale

Bei Verwendung unterschiedlicher Ionen in den Intra- und Extrazellulärlösungen bildet sich durch deren unterschiedliche Beweglichkeiten an der Spitze der

Patchelektrode im Sinne eines Donnan-Potentials ein sog. Liquid-Junction Potential aus (Barry & Lynch 1991, Neher 1992). Es kann insbesondere dann einen relativ großen Wert annehmen, wenn Cl⁻-Ionen durch andere Anionen wie Gluconat oder Glutamat ersetzt werden. Für die verwendeten Intrazellulärlösungen liegt das Liquid-Junction Potential bei ca. -10 mV. Die Membranpotentiale wurden hinsichtlich dieses Potentials korrigiert.

2.3.7 Osmolarität der Intra- und Extrazellulärlösungen

Die verwendeten Zellen reagieren auf Osmolaritätsunterschiede zwischen Intra- und Extrazellulärlösung häufig mit einer Anschwellung oder der Bildung von schwellungsbedingten Membranaussackungen. Um Membranstromaktivierungen durch Zellschwellung weitestgehend auszuschließen („Stretch-activated-channels“, Ordway et al. 1995, Petrou et al. 1995), wurden alle eingesetzten Lösungen mit einem Halbmikro-Osmometer (Knauer, Berlin) auf ihre Osmolarität hin überprüft. Im Mittel betrug die Osmolarität der Extrazellulärlösung 300 mOsm und die der Intrazellulärlösung 310 mOsm. Der Unterschied wurde durch Zugabe von Sorbitol (10 mM) zur Extrazellulärlösung ausgeglichen. Kontrollexperimente zeigten, daß Sorbitol selbst die Ergebnisse nicht beeinflusst.

2.4 Verwendete Substanzen

Neonatales Kälberserum (NKS)

Das verwendete neonatale Kälberserum (NKS) wurde von den Firmen PAN-Systems GmbH, Aidenbach (Charge F82/173) bzw. PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich („Viralex“ Newborn Calf Serum, Lot No A03325-409) bezogen und sofort nach Erhalt bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wurde es bei 56°C komplementinaktiviert. Die Gesamtproteinkonzentration bei beiden NKS-Chargen betrug 60 mg/ml.

Plättchen-Wachstumsfaktor

Der Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF-AB) wurde als Lyophilisat bezogen (Sigma, München). Die Reinheit beträgt laut angefordertem Analysenzertifikat $\geq 97\%$. PDGF ist leicht wasserlöslich und wurde in Extrazellulärlösung mit 0,5% fettsäurefreiem bovinen Serumalbumin (fatty acid free = FAF-BSA) angesetzt. FAF-BSA diente als Schutzkolloid, um unspezifische Bindungen der Polypeptide an Oberflächen zu vermeiden (Petrou et al. 1994). Nach dem Ansetzen wurde die Lösung bei -20°C aufbewahrt.

Epidermaler Wachstumsfaktor

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) wurde von der Firma Tebu (Frankfurt a. M.) bezogen. Das Protein liegt in lyophilisierter Form vor und hat einen Reinheitsgrad von $\geq 98\%$. Es ist leicht wasserlöslich und wurde in Extrazellulärlösung mit 0,5% FAF-BSA angesetzt. Die Lösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

Lysophosphatidsäure

L- α -Lysophosphatidsäure, Oleoyl (C18:1, [cis]-9), (LPA) wurde als Natriumsalz (Mw.: 458,5) bezogen (Sigma, München). Die Reinheit beträgt 99.5% (w/w). Die Substanz ist nur sehr gering wasserlöslich. Deswegen wurde nach einer Möglichkeit gesucht, sie mit Hilfsmitteln besser zu lösen oder zumindest kolloidal bzw. feinverteilt in Lösung zu halten.

Da lipidähnliche Substanzen z.B. im Serum an Proteine gekoppelt sind und dadurch in Lösung gehalten werden können (Watanabe et al. 1996), wurde versucht, LPA an fettsäurefreies bovines Serum-Albumin (FAF-BSA) zu koppeln.

Es wurde immer in silikonisierten Eppendorfgefäßen gearbeitet, um unspezifische Bindungen der Substanz an der Innenseite des Eppendorfgefäßes zu verhindern. Die Stammlösung wurde bei einer Temperatur von ca. -20°C aufbewahrt. Bei dieser Aufbewahrung zeigte sich auch nach mehr als einem Jahr noch kein Nachlassen der biologischen Wirksamkeit. Mehrfaches Auftauen und Einfrieren (bis 3 Zyklen) hatte ebenfalls keinen negativen Effekt auf die Wirkung.

Substanzen zur Kaliumkanalcharakterisierung

Zur Charakterisierung von Kaliumströmen wurden verschiedene Peptidtoxine als spezifische Kaliumkanalblocker eingesetzt. Alle Peptidtoxine wurden in Extrazellulärlösung mit 0,5% (w/v) FAF-BSA gelöst, um unspezifische Bindungen der Toxine an Oberflächen zu vermindern. Die Lösungen wurden in 40-facher Endkonzentration angesetzt, bei -20°C aufbewahrt und erst direkt vor dem Einsatz aufgetaut. Eingesetzt wurden immer 50 μl , was bei einem Meßkammer-Badlösungsvolumen von 1950 μl zu einer 40-fachen Verdünnung führt und einer Endkonzentration von 0,0125% (w/v) FAF-BSA in der Badlösung entspricht.

Charybdotoxin (ChTX), bezogen von Latoxan (Rosans, Frankreich), ist ein stark basisches Peptid von 37 Aminosäuren (Mw.: 4296, Gimenez-Gallego et al. 1988) aus dem Gift des Skorpions *Leiurus quinquestriatus hebraeus* und blockiert sowohl Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle großer und mittlerer Leitfähigkeit (Miller et al. 1985, Reinhart et al. 1989) als auch Subtypen spannungsabhängiger Kaliumkanäle (Lewis & Calahan 1988).

Margatoxin (MgTX), bezogen von Peptide Institute (Osaka, Japan), ist ein aus 39 Aminosäuren bestehendes Peptid (Mw.: 4179), das aus dem Gift des Skorpions *Centruroides margaritatus* isoliert wurde (Garcia-Calvo et al. 1993, Knaus et al. 1995). Es gilt als selektiver Blocker bestimmter spannungsabhängiger Kaliumkanäle, insbesondere des $\text{K}_v1.3$.

Iberiotoxin (IbTX), ebenfalls von Peptide Institute (Osaka, Japan) bezogen, besteht aus 37 Aminosäuren (Mw.: 4231) und ist strukturell eng verwandt mit ChTX und MgTX. Es wurde aus dem Gift des Skorpions *Buthus tamulus* isoliert und gilt als

hochspezifisch für Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit, die sogenannten Maxi-K Kanäle (Übersicht bei Garcia et al. 1999).

Tyrosinkinaseinhibitoren

Bei dem **Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor AG 1295** (Calbiochem Schwalbach/Ts.) handelt es sich um einen selektiven Inhibitor des Plättchen-Wachstumsfaktor-Rezeptors (IC_{50} : 500nM). AG 1295 hat keinen Einfluß auf die EGF-Rezeptor-Autophosphorylierung und nur einen schwachen Einfluß auf die EGF- oder Insulin-stimulierte DNA Synthese. Die Substanz ist lichtempfindlich. Der Reinheitsgrad beträgt $\geq 95\%$. Gelöst wurden alle Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren in DMSO, das als Lösungsvermittler dient. Um auszuschließen, daß DMSO die Kaliumkanalaktivierung beeinflusst, wurden NIH3T3 Zellen in DMSO für 4h vorinkubiert. In Kontrollexperimenten zeigte sich, daß DMSO keinen Einfluß auf die Kaliumstromaktivierung durch LPA hatte.

Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor AG 1478 ist ein sehr potenter und selektiver Inhibitor der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase (IC_{50} : 3 nM). Erst ab einer Konzentration von $> 100 \mu\text{M}$ wird auch die PDGF-Rezeptortyrosinkinase inhibiert. Die lichtempfindliche Substanz hat einen Reinheitsgrad von $\geq 98\%$.

Alle übrigen verwendeten Feinchemikalien wurden von der Fa. Merck (Darmstadt) bzw. von der Fa. Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.5 Statistik

Die in der Arbeit aufgeführten Meßdaten sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts) angegeben. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 LPA-induzierter Kaliumstrom in NIH3T3-Mäusefibroblasten

Normale NIH3T3-Zellen haben ein Ruhemembranpotential von -29 ± 2 mV ($n=17$) und zeigen bei einem angelegten Membranpotential von $+30$ mV einen unspezifischen Membranstrom mit einer Amplitude von 536 ± 57 pA ($n=17$). Dieser Strom hat eine lineare Strom/ Spannungskarakteristik und ist von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration unabhängig. Er ist für den Kaliumkanalblocker Charybdotoxin (300 nM) nicht sensitiv.

Abbildung 5A zeigt, daß durch die Applikation des Mitogens LPA ($1 \mu\text{M}$) bei NIH3T3-Zellen nach einer Latenz von etwa 10 s ein Membranstrom induziert wird, der innerhalb von 5 s ein Maximum erreicht und nach weiteren 100 s wieder vollständig inaktiviert. Frühere Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe (Repp et al. 1998) haben gezeigt, daß es sich bei diesem LPA-induzierten Membranstrom um einen Kaliumstrom handelt, der vom Membranpotential unabhängig ist (lineare Strom/ Spannungskarakteristik) und von der intrazellulären Calciumkonzentration abhängt. Er wird durch die klassischen Kaliumkanalblocker Charybotoxin, Margatoxin und Iberiotoxin mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich inhibiert (Repp et al. 1998). In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigten eigene Kontrollmessungen an NIH3T3-Zellen bei Applikation von LPA einen transienten Kaliumstromanstieg mit einer maximalen Amplitude von 1023 ± 303 pA ($n=7$) bei $+30$ mV. Verbunden mit diesem Kaliumstromanstieg kam es zu einer transienten Hyperpolarisation des Membranpotentials auf Werte von -85 ± 9 mV ($n=7$).

3.2.1 PDGF-induzierter Membranstrom in NIH3T3-Zellen

Während LPA über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Kaliumkanäle aktiviert (Repp et al. 1998), sollte nun untersucht werden, ob auch eine Aktivierung dieser Kaliumkanäle über Rezeptortyrosinkinasen stattfindet. Ein wichtiger Vertreter ist der PDGF-Rezeptor. Wie Abb.5B zeigt, induziert PDGF (10 ng/ml) nach einer Latenz von etwa 30 s einen zusätzlichen Membranstrom, der innerhalb von 120 s seine maximale Amplitude erreicht und nach weiteren 200 s wieder vollständig inaktiviert. Die maximale Stromamplitude liegt bei 1379 ± 479 pA ($n=4$) bei einem

Membranpotential von +30 mV. Der PDGF-induzierte Membranstrom geht im Current-Clamp-Ableitungsmodus mit einer Hyperpolarisation des Membranpotentials auf -93 ± 4 mV ($n=4$) einher. Dies läßt bereits vermuten, daß durch PDGF Kaliumkanäle aktiviert werden. Bei einer 10-fach höheren PDGF Konzentration (100 ng/ml) erhöhte sich die maximale Stromamplitude nicht signifikant. Vergleicht man die Effekte von LPA und PDGF auf die induzierten Membranströme in Abb.5, so fällt auf, daß die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken deutlich voneinander abweichen, während die maximalen Stromamplituden sich nicht signifikant unterscheiden.

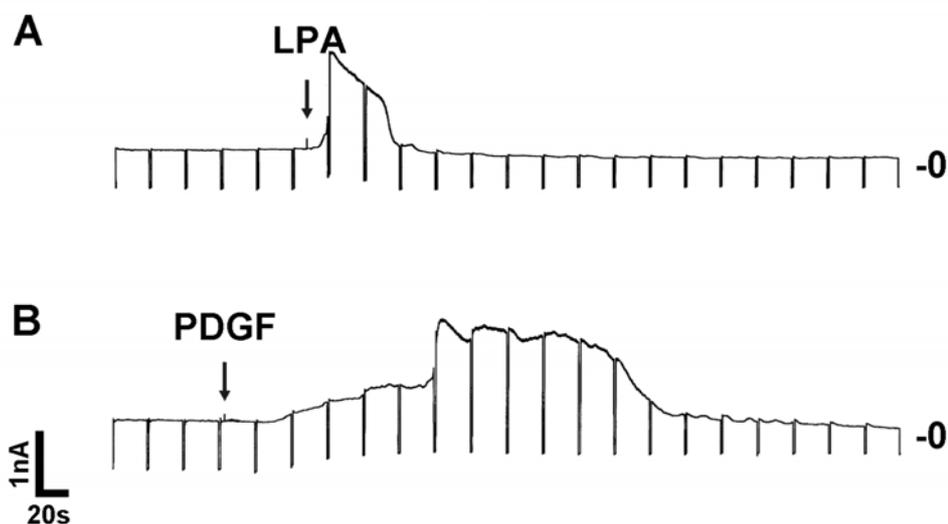


Abb. 5: Typische Aktivierungen eines Membranstroms an NIH3T3-Zellen (A) durch LPA (1 μ M) und (B) PDGF (10 ng/ml). Die Mitogene wurden zu dem mit dem Pfeil markierten Zeitpunkt appliziert. Das Membranpotential wurde dabei wiederholend jeweils für 20 s auf +30 mV und darauf folgend für 0,5 s auf -90 mV gehalten. „0“ kennzeichnet die Nulllinie. Die Nulllinie kennzeichnet den Punkt im Graphen, bei dem kein Stromfluß gemessen werden kann. Als Extrazellulärlösung wurde E eingesetzt, als Intrazellulärlösung IBL100 nM.

3.2.2 Strom/ Spannungsabhängigkeit des PDGF-induzierten Membranstroms

Mißt man den Membranstrom einer NIH3T3-Zelle vor (Abb. 6A) und während des maximalen PDGF-induzierten Membranstroms (Abb. 6B) bei verschiedenen Membranpotentialen zwischen -130 und +30 mV, so zeigt sich, daß das Umkehrpotential dieses Membranstroms bei etwa -90 mV liegt (Abb. 6C).

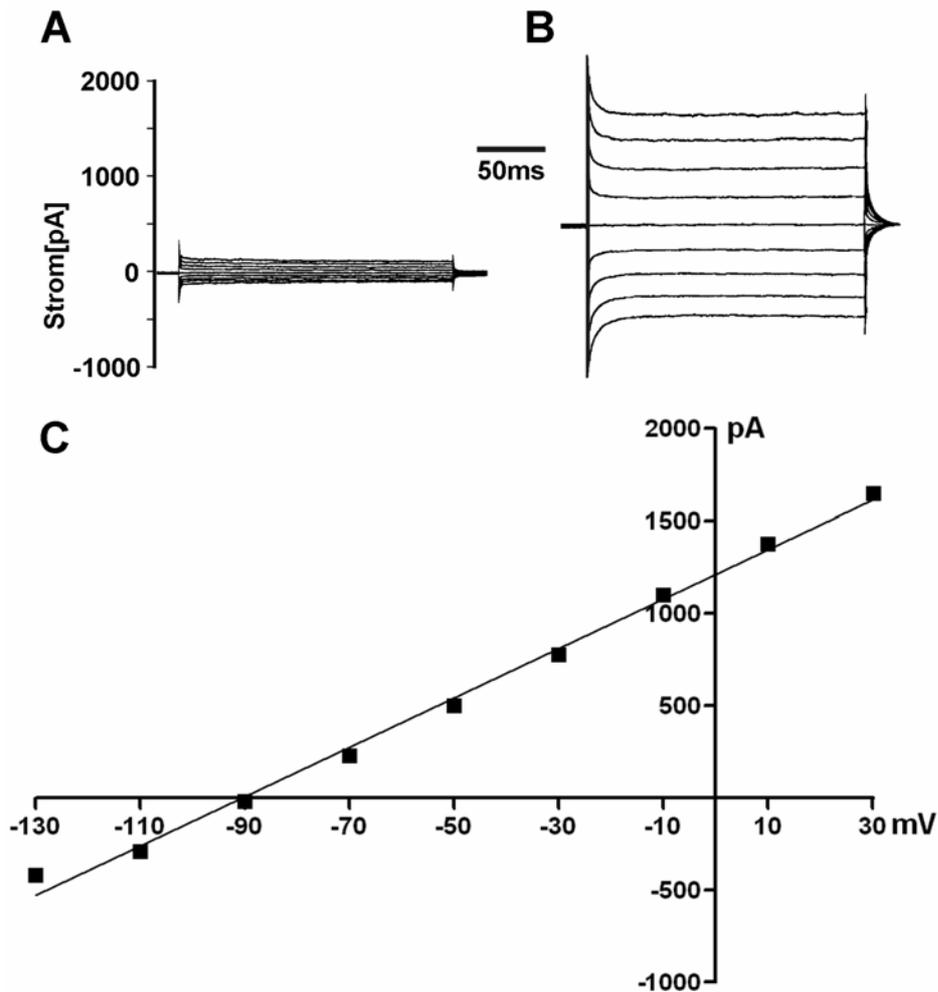


Abb. 6: Originalregistrierungen und Strom/ Spannungsbeziehungen der Membranströme in einer NIH3T3-Zelle vor (A) PDGF-Applikation und während (B) des PDGF-induzierten Membranstroms. Ausgehend von einem Haltepotential von -50 mV wurde das Membranpotential in 20 mV-Schritten von 200 ms Dauer von -130 mV bis +30 mV verändert. (C) Strom/Spannungsbeziehungen des PDGF-induzierten Membranstroms. Die Gerade wurde durch Linearregression erhalten.

Dieses Ergebnis zeigt, daß PDGF in NIH3T3-Zellen einen spannungsunabhängigen Kaliumstrom aktiviert, denn das Umkehrpotential dieses Membranstroms liegt mit einem Wert von -93 ± 4 mV ($n=4$) nahe dem Kaliumgleichgewichtspotential, das für die gewählte physiologische Lösungskombination -98 mV beträgt.

3.2.3 Abhängigkeit des PDGF-induzierten Kaliumstroms von der intrazellulären Calciumkonzentration

Die Aktivierung des PDGF-induzierten Kaliumstroms ist von der intrazellulären Calciumkonzentration abhängig (Abb.7). Da die Stromamplitude bei $1 \mu\text{M}$ freiem Calcium in der Intrazellulärlösung nicht signifikant verschieden von der Stromamplitude bei 100 nM freiem Calcium ist, wurde bei allen von mir durchgeführten Experimenten 100 nM freies Calcium in der Intrazellulärlösung verwendet.

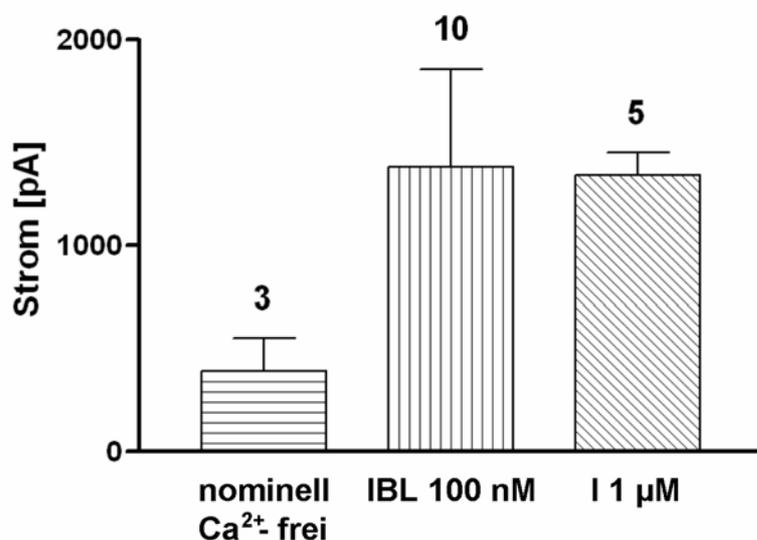


Abb. 7: Abhängigkeit des durch PDGF-induzierten Kaliumstroms in NIH3T3-Zellen von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Die nominell Ca^{2+} -freie Intrazellulärlösung entspricht I10B in Tab. 1B, IBL 100 nM bedeutet eine freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von 100 nM, I $1 \mu\text{M}$ eine freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von $1 \mu\text{M}$. Die applizierte PDGF-Konzentration betrug jeweils 10 ng/ml. Die Zahlen über den Balken kennzeichnen die Anzahl der gemessenen Zellen.

Bemerkenswert ist, daß selbst mit nominell calciumfreier Intrazellulärlösung durch PDGF noch eine Stromamplitude von 29% des Maximalwerts induziert wird (n=3). Eine mögliche Erklärung für diese Kaliumstromaktivierung könnte sein, daß eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären calciumspeichernden Kompartimenten (Calcium-stores) wie dem sarcoendoplasmatischen Reticulum erfolgt und zur Kaliumkanalaktivierung beiträgt.

3.2.4 Pharmakologisches Profil des PDGF-induzierten Kaliumstroms

Bei der pharmakologischen Charakterisierung des PDGF-induzierten Kaliumstroms zeigte sich, daß die Kaliumkanal-blockierenden Peptidtoxine Charybdotoxin, Margatoxin und Iberiotoxin jeweils den PDGF-induzierten Kaliumstrom in NIH3T3-Zellen vollständig inhibieren (jeweils 300 nM, n=3 für jedes Toxin). Abbildung 8 zeigt als Beispiel die vollständige Blockade eines PDGF-induzierten Kaliumstroms durch 300 nM Charybdotoxin.

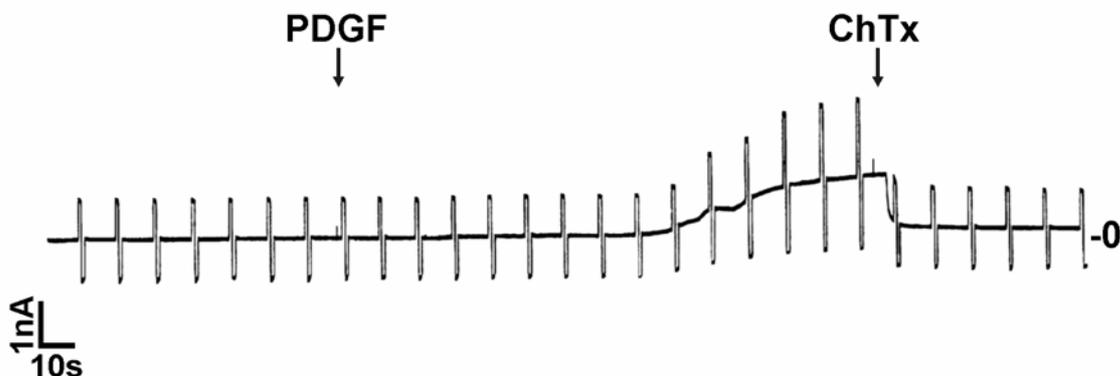


Abb. 8: Blockade des PDGF-induzierten Kaliumstroms durch Charybdotoxin an einer NIH3T3-Zelle. Zum Zeitpunkt des ersten Pfeils wurde PDGF (10 ng/ml) in die Badlösung gegeben. Die Applikation von Charybdotoxin (300 nM) ist durch den zweiten Pfeil gekennzeichnet. Das Membranpotential wurde wiederholend für 9 s auf -30 mV, dann für 0,5 s auf +30 mV und dann 0,5 s auf -90 mV verändert. „0“ kennzeichnet die Nulllinie. Als Extrazellulärlösung wurde E eingesetzt, als Intrazellulärlösung IBL100 nM.

3.2.5 Bedeutung der Tyrosinkinaseaktivität des PDGF-Rezeptors für die Aktivierung des Kaliumstroms

Die Bedeutung der Tyrosinkinaseaktivität des PDGF-Rezeptors für die Aktivierung der Kaliumkanäle wurde zunächst mit Hilfe des spezifischen PDGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors AG 1295 untersucht (Banai et al. 1998). NIH3T3-Zellen wurden für 4h bei 37°C mit 10 µM AG 1295 im Zellkulturmedium vorinkubiert. Kurz vor Meßbeginn wurde der Extrazellulärlösung bei Raumtemperatur wiederum 10 µM AG 1295 zugegeben. Durch Applikation von PDGF (10 ng/ml) konnte danach kein Kaliumstrom mehr induziert werden (Abb. 9A). Die Kontrollzellen wurden unter identischen Bedingungen gemessen, jedoch ohne eine Vorinkubation mit AG 1295 und ohne AG 1295 in der Extrazellulärlösung (Abb. 9B). Hier führte PDGF zu einer typischen Kaliumstromaktivierung.

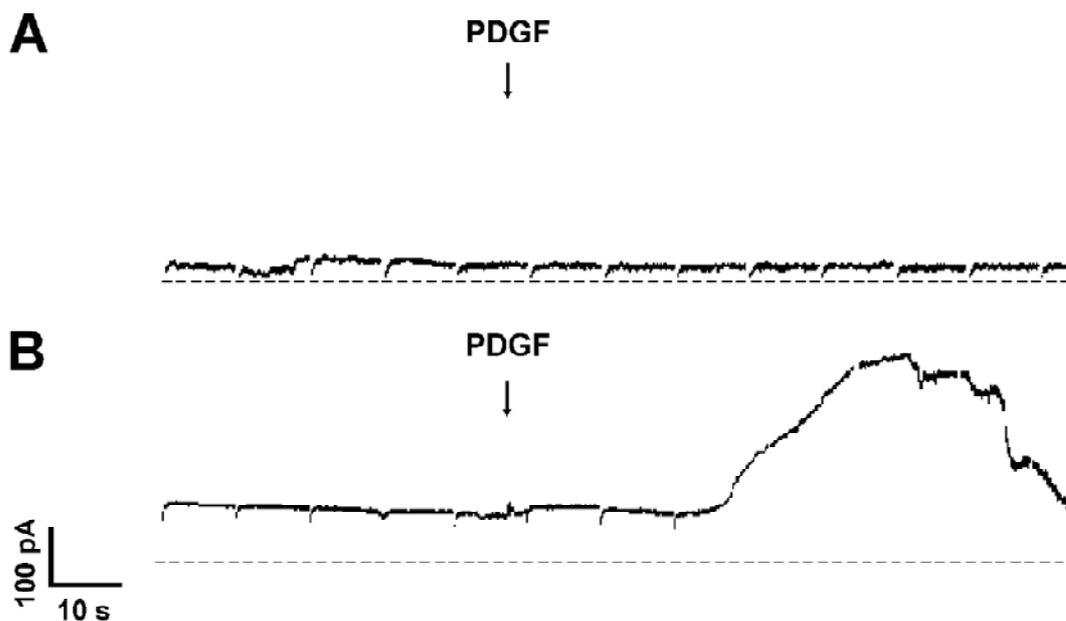


Abb.9: Wirkung des spezifischen PDGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors AG 1295 auf die Kaliumstromaktivierung durch PDGF in NIH3T3-Zellen. (A) Hemmung der Kaliumstromaktivierung durch Vorinkubation (4h) mit der Substanz AG 1295. (B) Typische Kaliumstromaktivierung in einer Kontrollzelle ohne Vorinkubation mit AG 1295. Das Membranhaltepotential betrug -30 mV. Der Pfeil zeigt die Applikation von PDGF (10 ng/ml). Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Nulllinie. Als Extrazellulärlösung wurde E eingesetzt, als Intrazellulärlösung IBL100 nM.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Tyrosinkinaseaktivität des PDGF-Rezeptors in der Signalkaskade zu den Kaliumkanälen eine entscheidende Rolle spielt. Um sicher zu sein, daß der Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor AG 1295 den PDGF-Rezeptor selektiv blockiert und nicht andere Signalwegskomponenten einschließlich der Kaliumkanäle, wurde jeweils als Kontrollsubstanz LPA (1 μ M) bei NIH3T3-Zellen appliziert, die mit AG 1295 vorinkubiert waren und keine Kaliumstromaktivierung auf PDGF gezeigt hatten. Die Amplituden der LPA-induzierten Kaliumströme in den mit AG 1295 vorbehandelten Zellen waren nicht signifikant verschieden zu den Kaliumstromamplituden, die in nicht-vorinkubierten NIH3T3-Zellen induziert werden konnten (jeweils n=3, s. Abb. 5A).

Dies läßt darauf schließen, daß die Substanz AG 1295 als selektiver PDGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor andere Signalwegskomponenten, die zur Kaliumkanalaktivierung führen, nicht beeinflusst.

3.3 Wirkung von EGF auf NIH3T3-Mäusefibroblasten

Nachdem es gelungen war, mit PDGF in normalen NIH3T3-Zellen einen Kaliumstrom zu induzieren, stellte sich nun die Frage, ob auch ein anderer wichtiger Vertreter der Wachstumsfaktorfamilie, EGF, ebenfalls dazu in der Lage ist. Wie in Abb. 10 zu sehen ist, zeigt die Applikation von EGF (10 ng/ml) auf NIH3T3-Zellen jedoch keinen Effekt (n=10). Um zu prüfen, ob die untersuchte Zelle intakt war, wurde jeweils anschließend LPA (1 μ M) appliziert (Abb.10). LPA führte zur typischen Kaliumstromaktivierung, wie in Abb. 5A bereits gezeigt wurde. Auch durch eine Erhöhung der EGF-Konzentration auf 100 ng/ml konnte kein Kaliumstrom induziert werden (n=10).

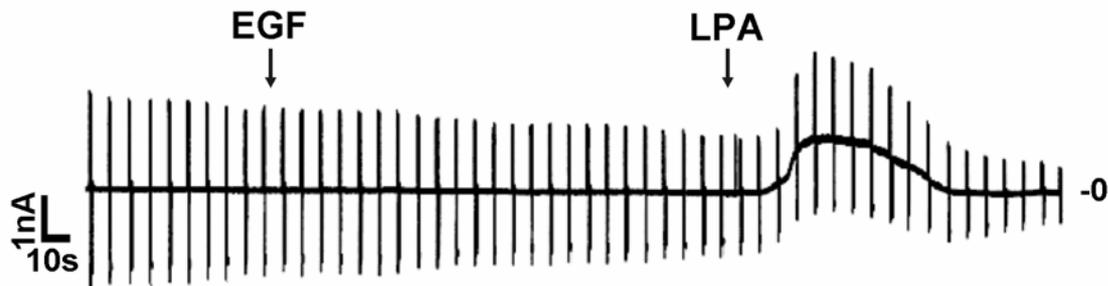


Abb. 10: Sequentielle Applikation von EGF (10 ng/ml) und LPA (1 μ M) auf eine NIH3T3-Zelle. EGF und LPA wurden jeweils zu den mit dem Pfeilen gekennzeichneten Zeitpunkten appliziert. Das Membranpotential wurde wiederholend für 9 s auf -30 mV, dann für 0,5 s auf +30 mV und dann 0,5 s auf -90 mV verändert. „0“ kennzeichnet die Nulllinie. Als Extrazellulärlösung wurde E eingesetzt, als Intrazellulärlösung IBL100 nM.

3.4.1 Aktivierung eines Kaliumstroms durch EGF in EGF-R Mäusefibroblasten

Nachdem EGF in normalen NIH3T3-Zellen keinen Kaliumstrom induzieren konnte, folgten Messungen an NIH3T3-Mäusefibroblasten, die EGF-Rezeptoren in hoher Dichte an der Zellmembran exprimieren (EGF-R Zellen). Diese Zellen haben im Ruhezustand ein Membranpotential von -25 ± 6 mV ($n=16$). Bei einem angelegten Membranpotential von +30 mV fließt ein unspezifischer Membranstrom mit einer Amplitude von 482 ± 69 pA ($n=16$). Dieser Strom hat eine lineare Strom/Spannungscharakteristik und ist unabhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. In dieser Hinsicht haben die EGF-R Zellen die gleichen Eigenschaften wie normale NIH3T3-Zellen.

Die Applikation von EGF (10 ng/ml) in die Badlösung führte im Gegensatz zu normalen NIH3T3-Zellen nach einer Latenz von ca. 35 s zu einem schnellen Anstieg der Amplitude des Membranstroms (Abb. 11), der nach Erreichen des Maximums innerhalb von etwa 200 s inaktivierte.

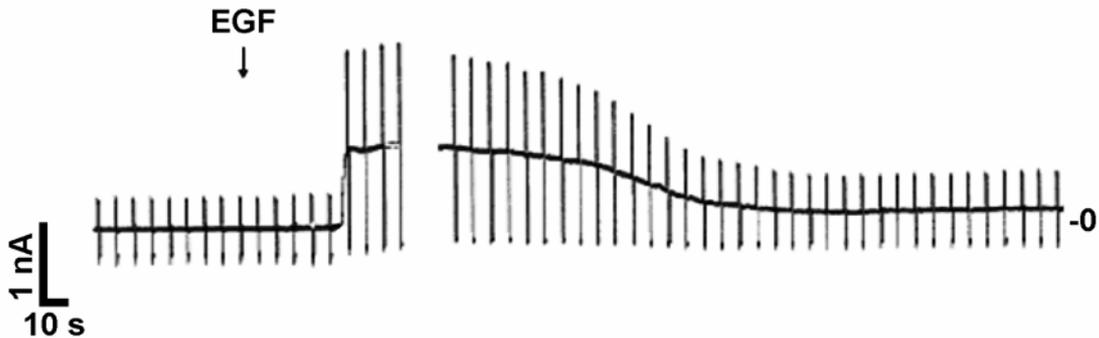


Abb. 11: Kaliumstromaktivierung durch EGF bei einer EGF-R Zelle. Zu dem mit dem Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkt wurde EGF (10 ng/ml) appliziert. Die in der Registrierung erkennbare Lücke ist darauf zurückzuführen, daß zu diesem Zeitpunkt eine Strom/Spannungskurve gemessen wurde. Das Membranpotential wurde wiederholend für 9 s auf -30 mV, dann für 0,5 s auf +30 mV und dann 0,5 s auf -90 mV verändert. „0“ kennzeichnet die Nulllinie. Als Extrazellulärlösung wurde E eingesetzt, als Intrazellulärlösung IBL100 nM.

Dieser Membranstromanstieg unterscheidet sie deutlich vom Zeitverlauf des PDGF-induzierten Kaliumstroms in normalen NIH3T3-Zellen (s. Abb. 5B) und entspricht eher der Kaliumstromaktivierung durch LPA (s. Abb. 5A). Auffallend ist jedoch die längere Latenz zwischen EGF-Applikation und dem Wirkungsbeginn im Vergleich zu LPA (Tab. 2).

Die gemessenen Strom/ Spannungsbeziehungen des EGF-induzierten Membranstroms an EGF-R Zellen zeigten eine lineare Charakteristik mit einem Umkehrpotential von -88 ± 5 mV ($n=16$), das nahe dem Kaliumgleichgewichtspotential liegt.

Abbildung 12 zeigt ein Beispiel für die pharmakologische Charakterisierung des EGF-induzierten Kaliumstroms mit Hilfe des Kaliumkanalblockers Iberiotoxin. Dieser war in der Lage, den durch EGF induzierten Kaliumstrom in EGF-R Zellen in einer Konzentration von 300 nM vollständig zu blockieren. Eine vollständige Blockade wurde auch mit den Kaliumkanalblockern Charybdotoxin und Margatoxin (jeweils 300nM, $n=3$) erreicht.

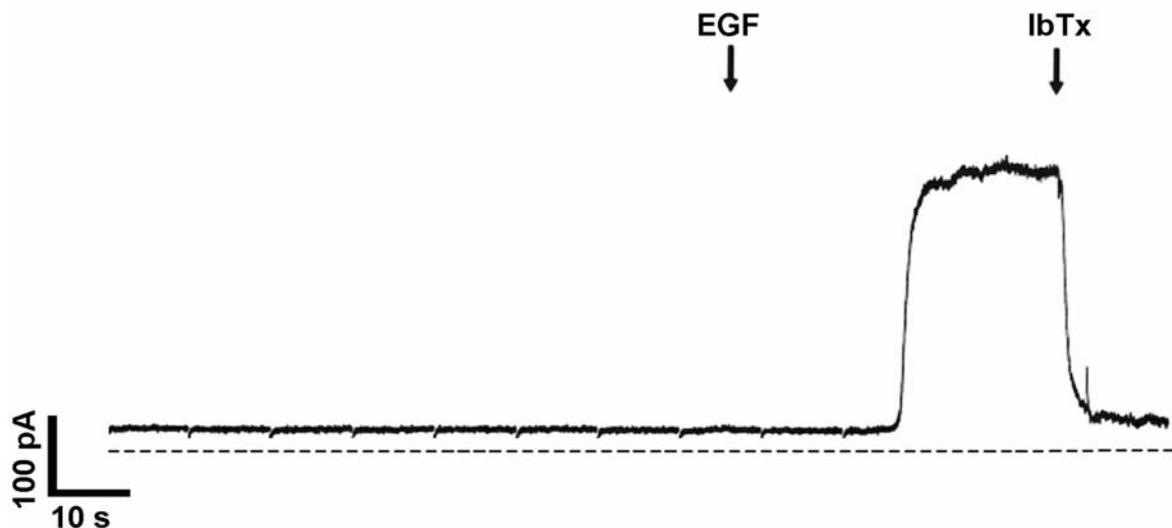


Abb. 12: Blockade des EGF-aktivierten Kaliumstroms durch Iberiotoxin (IbTx) in einer EGF-R Zelle. Zu dem mit dem ersten Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkt wurden EGF (10 ng/ml) appliziert. Der zweite Pfeil kennzeichnet die Applikation von Iberiotoxin (300 nM). Das Haltepotential beträgt -30 mV. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Nulllinie. Als Extrazellulärlösung wurde E eingesetzt, als Intrazellulärlösung IBL100 nM.

3.4.2 Konzentrations- Wirkungsbeziehung des EGF-Effekts

Abbildung 13 zeigt die Abhängigkeit der Aktivierung des Kaliumstroms von der eingesetzten EGF-Konzentration in EGF-R Zellen. Bei EGF-Konzentrationen über 10 ng/ml konnte keine signifikante Steigerung der maximalen Stromamplitude mehr gemessen werden.

Die in Abb. 13 dargestellte Kurve wurde mit Hilfe der Hill-Gleichung

$$I = \frac{I_{\max}}{1 + (EC_{50} / [c])^n}$$

ermittelt. Dabei ist I_{\max} die maximal erreichbare Amplitude, $[c]$ die eingesetzten EGF-Konzentrationen, EC_{50} die halbmaximal effektive EGF-Konzentration und n der Hill-Koeffizient. Die beste Kurvenanpassung an die Meßwerte wurde im Least-squares-Fit Verfahren mit einem Hill-Koeffizienten von 1,5 und einem EC_{50} -Wert von 1,6 ng/ml EGF erreicht.

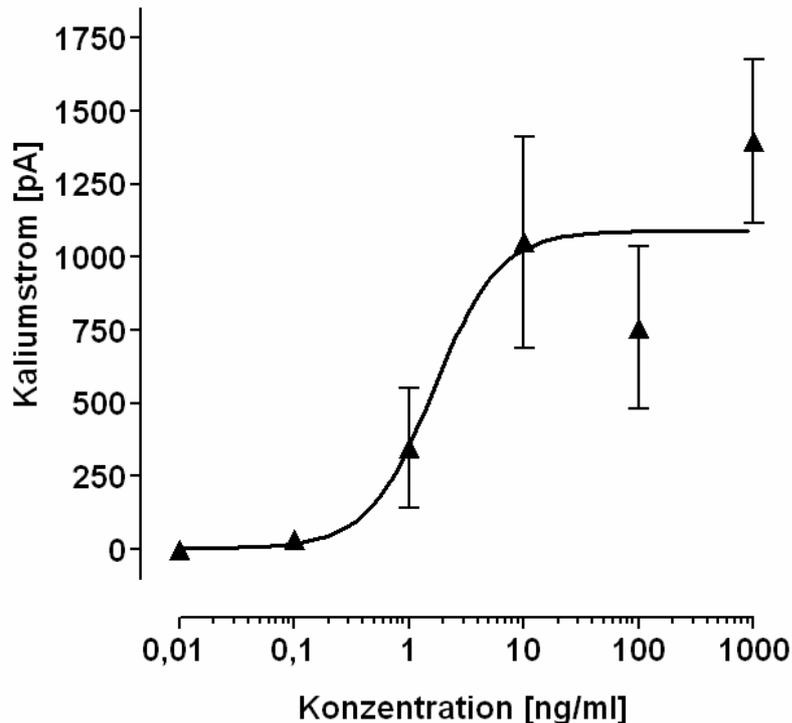


Abb. 13: Abhängigkeit der Kaliumstromamplitude von der eingesetzten EGF-Konzentration in EGF-R Zellen. Die Kaliumstromamplituden wurden bei +30 mV ermittelt. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert \pm SEM aus 10 Messungen. Als Extrazellulärlösung wurde E eingesetzt, als Intrazellulärlösung IBL100 nM.

3.4.3 Sequenzielle Applikation von EGF

Es ist bekannt, daß EGF-Rezeptoren nach Bindung von Liganden und der dadurch bedingten Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase internalisiert werden (Weimann und Kiess 1995). Daher wurde eine sequenzielle Applikation von EGF durchgeführt, um zu prüfen, ob bei wiederholter Applikation von EGF erneut ein Kaliumstrom aktiviert werden kann. Als Kontrollsubstanz diente LPA, die in EGF-R Zellen einen transienten Kaliumstrom mit einer maximalen Stromamplitude von 1268 ± 114 pA ($n=25$) bei +30 mV aktiviert. Sowohl die Amplitude des LPA-induzierten Kaliumstroms als auch die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken sind bei EGF-R Zellen nicht verschieden im Vergleich zu normalen NIH3T3-Zellen (s. Abschnitt 3.1).

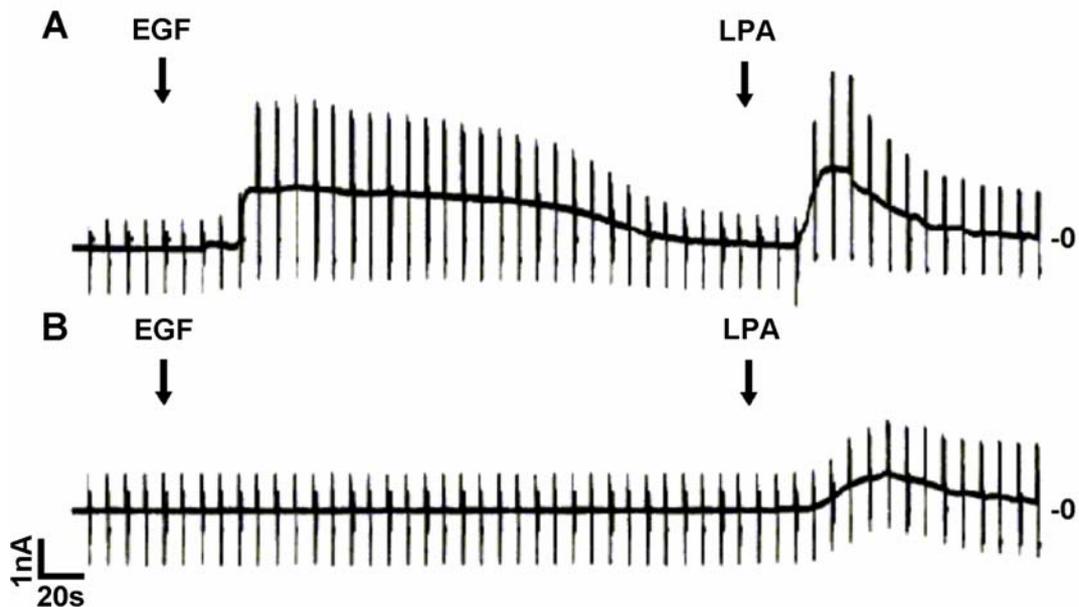


Abb. 14: Internalisierung von EGF-Rezeptoren durch EGF-Aktivierung und Einfluß auf die Kaliumstromaktivierung. (A) Applikation von 10 ng/ml EGF und von LPA (1 μ M) an einer EGF-R Zelle. Danach wurden die Zellen in der Meßkammer mehrfach gespült, um eine EGF- und LPA-freie Extrazellulärlösung zu erhalten. (B) Nach 30 Minuten erfolgte eine Wiederholung der sequenziellen Applikationen auf eine weitere EGF-R Zelle in der gleichen Meßkammer. Das Membranpotential wurde wiederholend für 9 s auf -30 mV, dann für 0,5 s auf +30 mV und dann 0,5 s auf -90 mV verändert. „0“ kennzeichnet die Nulllinie. Als Extrazellulärlösung wurde E eingesetzt, als Intrazellulärlösung IBL100 nM.

Abbildung 14A zeigt, daß nach Applikation von EGF (10 ng/ml) bei EGF-R Zellen eine typische Aktivierung stattfindet. Anschließend führt LPA (1 μ M) zu einer nochmaligen Stromaktivierung (Abb. 14A). Danach wurden die Zellen in der Meßkammer mehrfach gespült, um eine EGF- und LPA-freie Lösung zu erhalten. Anschließend wurde nach 30 min eine weitere Zelle in dieser Meßkammer gemessen. Wie die Abb. 14B zeigt, war EGF jetzt nicht mehr in der Lage, einen Kaliumstrom zu aktivieren, während LPA als Kontrollsubstanz wieder in der Lage war, eine Kaliumstromaktivierung hervorzurufen (Abb. 14B). Dieses Experiment ist ein Hinweis dafür, daß eine einmalige Applikation von EGF dazu führt, daß EGF-Rezeptoren offenbar innerhalb von 30 min internalisiert werden. Die nachfolgende Kaliumstromaktivierung durch LPA zeigt, daß dieser Prozeß bei LPA-Rezeptoren nicht abläuft. Es wurden drei Experimente mit jeweils dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

3.5 Aktivierung eines Kaliumstroms durch PDGF in EGF-R Zellen

Nachdem EGF in EGF-R Zellen einen Kaliumstrom aktivierte, war zu untersuchen, ob auch PDGF in diesen Zellen einen Kaliumstrom induzieren kann. Abbildung 15 zeigt, daß PDGF (10 ng/ml) mit einer Latenz von ca. 30 s einen Kaliumstrom aktiviert, der nach etwa 250 s wieder vollständig inaktiviert.

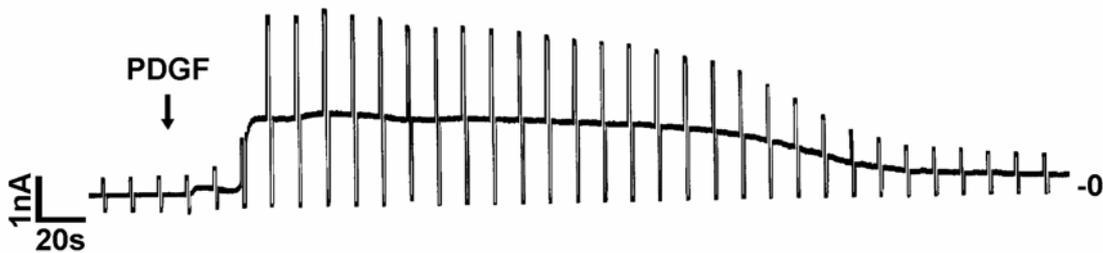


Abb.15: Aktivierung eines Kaliumstroms an EGF-R Zellen durch PDGF. Zum mit dem Pfeil markierten Zeitpunkt wurde PDGF (10 ng/ml) in die Badlösung appliziert. Das Membranpotential wurde wiederholend für 9 s auf -30 mV, dann für 0,5 s auf +30 mV und dann 0,5 s auf -90 mV verändert. „0“ kennzeichnet die Nulllinie. Als Extrazellulärlösung wurde E eingesetzt, als Intrazellulärlösung IBL100 nM.

Mißt man die Membranströme während der maximalen Stromamplitude bei verschiedenen Membranpotentialen, so zeigt der PDGF-induzierte Membranstrom eine lineare Strom/ Spannungsbeziehung (I/U-Kurve) mit einem Umkehrpotential in der Nähe des Kaliumgleichgewichtspotentials. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß auch PDGF in EGF-R Zellen einen spannungsunabhängigen Kaliumstrom aktiviert. Dieser Kaliumstrom hat eine maximale Stromamplitude von 1159 ± 162 pA ($n=13$) bei einem angelegten Membranpotential von +30 mV und führt im Current-Clamp-Ableitungsmodus zu einer Hyperpolarisation auf -78 ± 4 mV ($n=13$). Die PDGF-induzierte maximale Kaliumstromamplitude entspricht der PDGF-induzierten maximalen Stromamplitude in normalen NIH3T3-Zellen und der EGF-induzierten maximalen Stromamplitude in EGF-R Zellen.

Auffällig ist allerdings, daß bei EGF-R Zellen das Intervall zwischen der Applikation von PDGF und Beginn der Kaliumstromaktivierung mit 38 ± 7 s (Tab. 2) kürzer ist als bei NIH3T3-Zellen. Weiterhin ist auffallend, daß nach dieser Latenz PDGF in EGF-R

Zellen mit 7 ± 2 s signifikant schneller einen Kaliumstrom aktiviert als in NIH3T3-Zellen (s. Abschnitt 3.2.1).

Der PDGF-induzierte Kaliumstrom ist von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig. Jedoch auch mit nominell Ca^{2+} -freier Intrazellulärlösung kann PDGF noch eine Kaliumstromamplitude von ca. 32% des Maximalwerts induzieren (n=3). Die pharmakologische Charakterisierung durch die Kaliumkanalblocker Charybdotoxin, Margatoxin und Iberiotoxin zeigte in einer Konzentration von jeweils 300 nM eine vollständige Blockade des PDGF-induzierten Stroms in EGF-R Zellen (n=3 für jedes Toxin).

Tabelle 2. Kenndaten zur Aktivierung und Inaktivierung eines Kaliumstroms durch die Mitogene EGF (10 ng/ml), PDGF (10 ng/ml) und LPA (1 μM) in EGF-R Zellen.

	Latenz zwischen Applikation und Aktivierung	Dauer des Membranstromanstiegs	Inaktivierungs-Dauer
EGF	23,9 \pm 8,1 s (n=9)	5,6 \pm 1,2 s (n=8)	206 \pm 29 s (n=6)
PDGF	38,0 \pm 7,1 s (n=5)	7,3 \pm 2,2 s (n=5)	180 \pm 28 s (n=5)
LPA	5,9 \pm 1,1 s (n=7)	8,5 \pm 2,0 s (n=6)	47,0 \pm 7,6 s (n=6)

3.6 Wirkung von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren

3.6.1 Selektiver Tyrosinkinase-Inhibitor AG 1478 für EGF-Rezeptoren

Als selektiver und hochspezifischer EGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor gilt die Substanz AG 1478 (Eguchi et al. 1998). EGF-R Zellen wurden für 4h mit 10 μM AG 1478 bei 37°C im Inkubator vorinkubiert. Der Extrazellulärlösung wurde vor Beginn der Messung bei Raumtemperatur ebenfalls 10 μM AG 1478 zugegeben. Wie Abb. 16 A zeigt, verhinderte die Vorinkubation mit diesem Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor die Aktivierung eines Kaliumstroms durch EGF (n=5, siehe auch Abb. 18). Kontrollzellen wurden unter identischen Bedingungen kultiviert, jedoch ohne Zugabe von AG 1478. Hier führte EGF zu einer Kaliumstromaktivierung (Abb. 16 B).

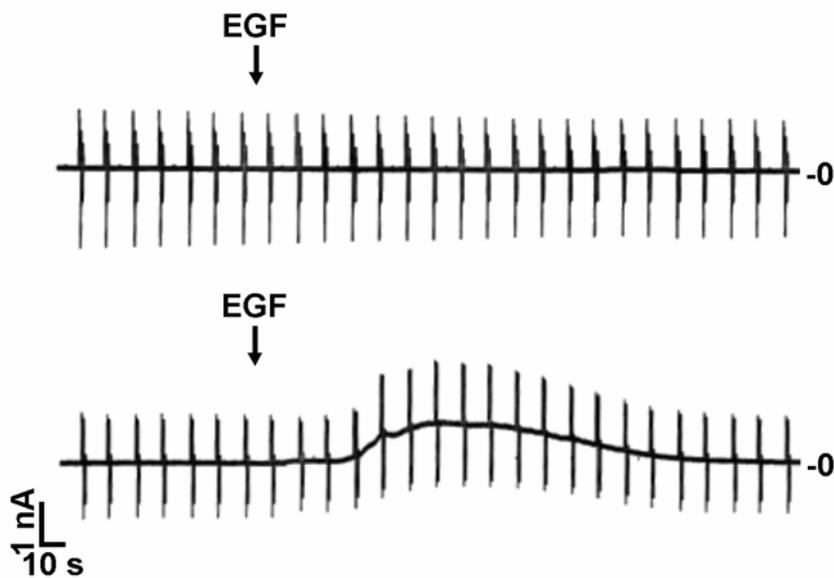


Abb. 16: Wirkung des spezifischen EGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors AG 1478 auf den EGF-induzierten Kaliumstrom in EGF-R Zellen. Die ersten Pfeile zeigen die Applikation von EGF (10 ng/ml). (A) Einfluß der Substanz AG 1478 auf den EGF-induzierten Kaliumstrom. Nachfolgend induzierte LPA einen Kaliumstrom (nicht gezeigt). (B) Typische Kaliumstromaktivierung durch EGF in einer Kontrollzelle ohne Vorinkubation. Das Membranpotential wurde wiederholend für 9 s auf -30 mV, dann für 0,5 s auf +30 mV und dann 0,5 s auf -90 mV verändert. „0“ kennzeichnet die Nulllinie. Als Extrazellulärlösung wurde E eingesetzt, als Intrazellulärlösung IBL100 nM.

Obwohl AG 1478 in der verwendeten Konzentration von 10 μM keinen Einfluß auf die Tyrosinkinaseaktivität des PDGF-Rezeptors hat, kam es erstaunlicherweise nach Applikation von PDGF (10 ng/ml) bei EGF-R Zellen nach Vorinkubation mit AG 1478 ebenfalls zu keiner Aktivierung eines Membranstroms (Abb. 17A, 18). In allen Kontrollzellen, die nicht mit AG 1478 vorinkubiert wurden, konnte dagegen nach Applikation von PDGF ein Kaliumstrom in Höhe von 1655 ± 151 pA ($n=5$) bei +30 mV gemessen werden (Abb. 17B).

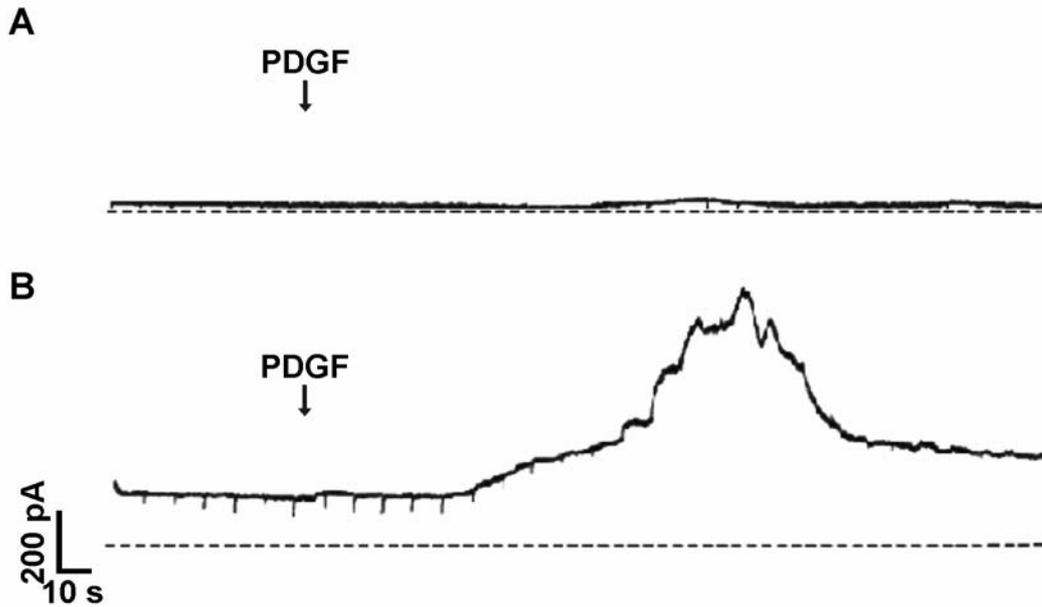


Abb. 17: Wirkung des EGF-Rezeptor spezifischen Tyrosinkinaseinhibitors AG 1478 auf die PDGF-induzierte Kaliumstromaktivierung in EGF-R Zellen durch PDGF. Der Pfeil zeigt die Applikation von PDGF (10 ng/ml). (A) Einfluß der Vorinkubation für 4h mit der Substanz AG 1478 auf den PDGF-induzierten Membranstrom. (B) Typische Kaliumstromaktivierung in einer Kontrollzelle. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Nulllinie. Das Haltepotential beträgt -30 mV. Als Extrazellulärlösung wurde E eingesetzt, als Intrazellulärlösung IBL100 nM.

Applizierte man jedoch LPA ($1\mu\text{M}$) bei EGF-R Zellen nach Vorinkubation mit $10\mu\text{M}$ AG 1478, so war die Amplitude des zusätzlich aktivierten Kaliumstroms verglichen mit der in Kontrollzellen registrierbaren Amplitude nicht signifikant verschieden.

3.6.2 Selektiver Tyrosinkinase-Inhibitor AG 1295 für PDGF-Rezeptoren

In den folgenden Experimenten wurde die Tyrosinkinaseaktivität der PDGF-Rezeptoren in den EGF-R Zellen durch den selektiven PDGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor AG 1295 blockiert. Dazu wurden die EGF-R Zellen vor der Messung für 4h mit $10\mu\text{M}$ AG 1295 bei 37°C vorinkubiert und unmittelbar vor dem Experiment wurde bei Raumtemperatur ebenfalls $10\mu\text{M}$ AG 1295 in die Extrazellulärlösung appliziert. Es zeigte sich, daß der PDGF-induzierte Kaliumstrom signifikant auf ca.

10% reduziert wurde (90 ± 90 pA, n=3). Erstaunlicherweise wurde auch der EGF-induzierte Kaliumstrom signifikant auf 1206 ± 163 pA (n=7) im Vergleich zu den Kontrollzellen mit 2026 ± 255 pA (n=6) vermindert (Abb. 18), während der durch LPA induzierbare Kaliumstrom keine signifikante Reduktion zeigte.

3.6.3 Beeinflussung des LPA-induzierten Kaliumstroms durch AG 1295 und AG 1478

LPA wurde in bisherigen Experimenten als Kontrollsubstanz appliziert, um anhand der Kaliumstromaktivierung zumindest die Intaktheit der durch LPA-aktivierten Signalkaskade in der untersuchten Zelle zu kontrollieren. Inkubierte man EGF-R Zellen unter den zuvor genannten Bedingungen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor AG 1295 oder AG 1478, so zeigte sich nach LPA-Applikation im Vergleich zu den nicht-vorinkubierten Kontrollzellen jeweils keine signifikante Reduktion des Kaliumstroms, wobei die große Streubreite der Daten im Vergleich zu den Messungen mit EGF bzw. PDGF auffallend ist (Abb. 18). Inkubierte man jedoch EGF-R Zellen mit beiden Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren, d.h. für 4 h mit AG 1295 (10 μ M) und AG 1478 (10 μ M), so wurde auch der LPA-induzierte Membranstrom mit 982 ± 194 pA (n=5) gegenüber den Kontrollzellen ohne Vorinkubation mit 1896 ± 144 pA (n=8) signifikant reduziert.

Abbildung 18 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der Experimente mit den EGF- und PDGF-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die Kaliumstromaktivierungen durch die Mitogene EGF, PDGF und LPA.

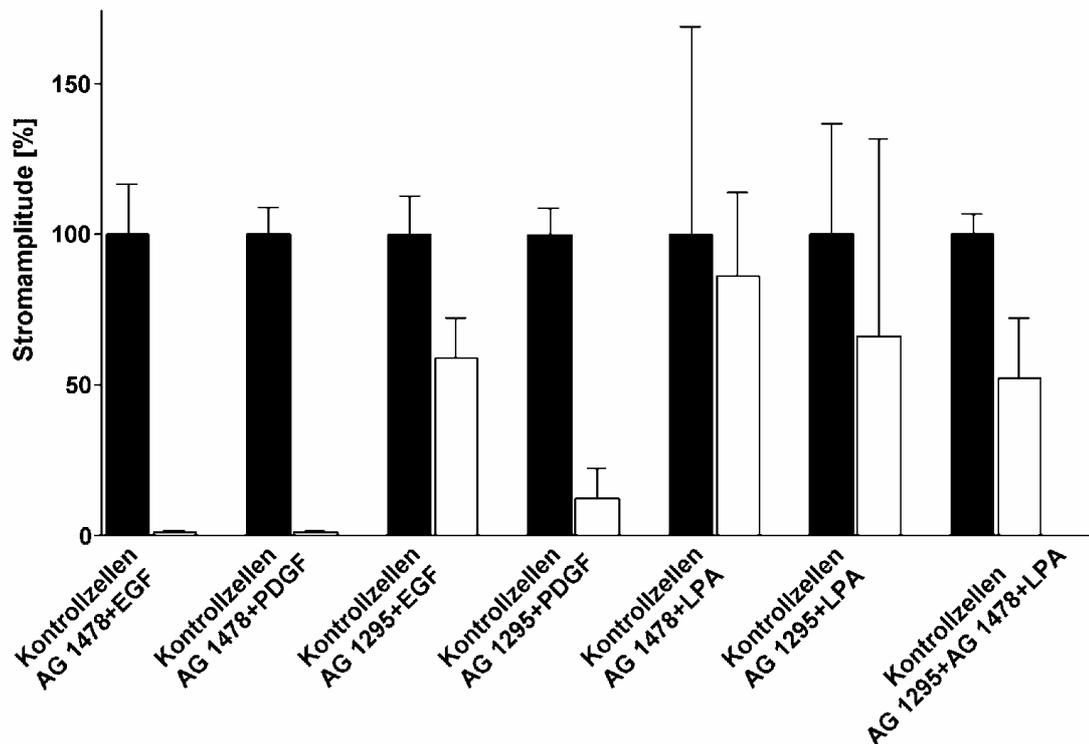


Abb. 18: Wirkung der EGF- und PDGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren auf die Aktivierung der Kaliumströme durch die Substanzen EGF, PDGF und LPA in EGF-R Zellen. AG 1478=selektiver Inhibitor des EGF-Rezeptors, AG 1295=selektiver Inhibitor des PDGF-Rezeptors. Die Stromamplitude der Kontrollzellen wurde gleich 100% gesetzt.

3.7 Aktivierung eines Kaliumstroms durch EGF und LPA in DEL Zellen

Bei DEL Zellen handelt es sich um NIH3T3-Zellen, die mit trunkierten EGF-Rezeptoren stabil transfiziert wurden, d.h. in die Aminosäuresequenz des EGF-Rezeptors wurde nach der Aminosäure 1011 ein zusätzliches Serin eingefügt, was zu einem Kettenabbruch bei der Synthese führt. Sie verfügen über eine verminderte Tyrosinkinaseaktivität, da drei Autotyrosinphosphorylierungsstellen an der intrazellulären Seite des Rezeptors fehlen (Gotoh et al. 1993). Es stellte sich die Frage, ob über diese veränderten EGF-Rezeptoren noch Kaliumkanäle aktiviert werden können. Abbildung 19 zeigt die Aktivierung eines Kaliumstroms durch EGF (10 ng/ml) in DEL Zellen, der im Mittel einen Wert von nur 544 ± 110 pA ($n=13$) erreichte. Als Kontrolle wurden die EGF-Rezeptor überexprimierenden (EGF-R) Zellen herangezogen. EGF induzierte in diesen Zellen einen transienten Kaliumstrom

mit einer Amplitude von 1340 ± 153 pA ($n=23$). Mit diesen Experimenten wurde deutlich, daß die Tyrosinkinaseaktivität der EGF-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Kaliumstroms spielt.

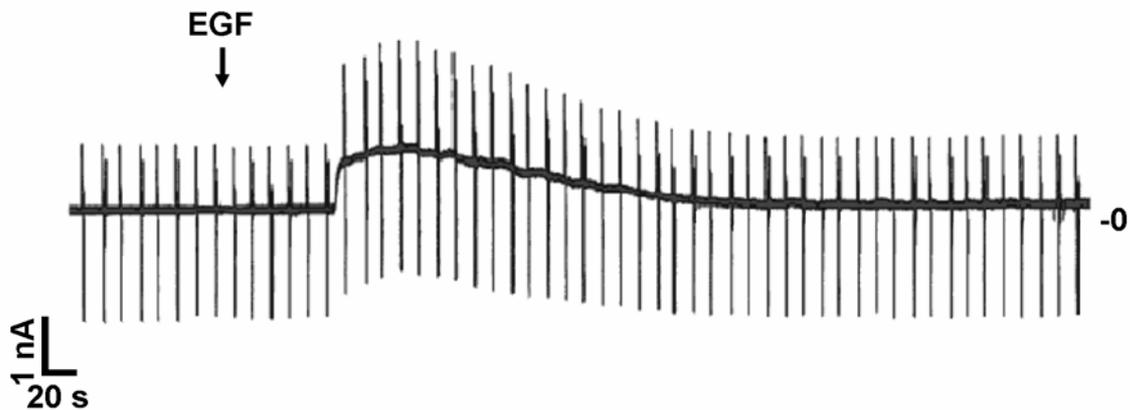


Abb. 19: Aktivierung eines Kaliumstroms in einer DEL Zelle durch EGF (10 ng/ml). EGF wurde zu dem mit dem Pfeil markierten Zeitpunkt appliziert. Das Membranpotential wurde wiederholend für 9 s auf -30 mV, dann für 0,5 s auf +30 mV und dann 0,5 s auf -90 mV verändert. „0“ kennzeichnet die Nulllinie. Als Extrazellulärlösung wurde E eingesetzt, als Intrazellulärlösung IBL100 nM.

Vergleicht man die Kaliumstromaktivierung nach Applikation von LPA, so ist diese mit einer Amplitude von 488 ± 180 pA ($n=4$) bei DEL Zellen nicht signifikant niedriger als in EGF-R Zellen, in denen LPA bei Parallel-Experimenten einen Kaliumstrom mit einer Amplitude von 561 ± 81 pA ($n=21$) induzierte. Auffällig war jedoch, daß sowohl LPA als auch EGF zu dem Zeitpunkt der Experimente an DEL und NIH3T3-Gotoh-Zellen (s. Abschnitt 3.8) im Vergleich zu früheren Experimenten an allen Zelllinien sehr niedrige maximale Kaliumstromamplituden induzierten. Diese Tatsache ist wahrscheinlich auf die Verwendung eines neuen Serums bei der Zellkultivierung zurückzuführen. Deshalb wurden nur Kaliumstromamplituden von Zellen verglichen, die im gleichen Zeitraum kultiviert wurden.

3.8 Wirkung von EGF und LPA auf NIH3T3-Gotoh-Zellen

Bei NIH3T3-Gotoh-Mäusefibroblasten handelt es sich um Zellen, die besonders wenige EGF-Rezeptoren besitzen. Sie sind die Kontrollzellen zu den EGF-R Zellen. Abbildung 20 zeigt, daß bei NIH3T3-Gotoh-Zellen nach Applikation von 10 ng/ml EGF kein zusätzlicher Kaliumstrom aktiviert wird. Appliziert man anschließend LPA, wird ein transientser Kaliumstrom aktiviert, der jedoch mit 143 ± 55 pA ($n=3$) auch um 74% niedriger als bei EGF-R Zellen mit 561 ± 81 pA ($n=5$) ist.

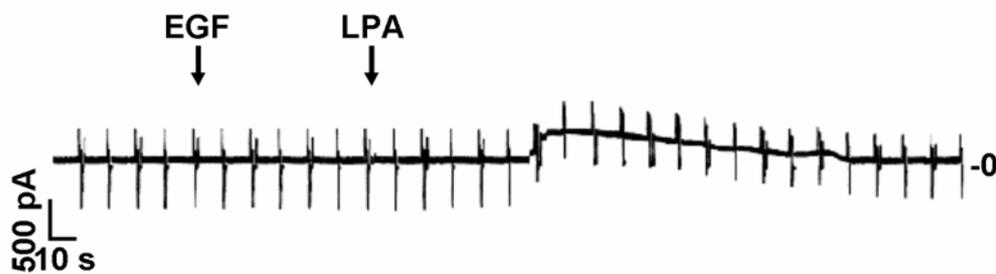


Abb. 20: Wirkung von EGF und anschließend LPA auf eine NIH3T3-Gotoh-Zelle. Zum Zeitpunkt, der mit dem ersten Pfeil gekennzeichnet ist wurde EGF (10 ng/ml) appliziert, der zweite Pfeil kennzeichnet die Applikation von LPA (1 μ M). Das Membranpotential wurde wiederholend für 9 s auf -30 mV, dann für 0,5 s auf +30 mV und dann 0,5 s auf -90 mV verändert. „0“ kennzeichnet die Nulllinie. Als Extrazellulärlösung wurde E eingesetzt, als Intrazellulärlösung IBL100 nM.

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, daß der Wachstumsfaktor PDGF bereits in einer Konzentration von 10 ng/ml ($\approx 0,33$ nM) in normalen NIH3T3-Mäusefibroblasten transient einen calciumabhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumstrom maximal aktiviert, vergleichbar mit der Wirkung von 1 μ M LPA (Repp et al. 1998). Diese Aktivierung geht mit einer starken Hyperpolarisation des Membranpotentials einher. Der PDGF-aktivierte Kaliumstrom läßt sich durch die Peptidtoxine Charybdotoxin, Margatoxin und Iberiotoxin in nanomolaren Konzentrationen vollständig blockieren. Bei dem diesem Kaliumstrom zugrundeliegenden Kaliumkanälen handelt es sich um einen Kaliumkanaltyp, der auch durch LPA aktiviert wird. Aufgrund seiner Eigenschaften scheint der durch PDGF aktivierbare Kaliumkanal der NIH3T3-Zellen das murine Homolog zum humanen SK4-Kanal (Gardos-Kanal) zu sein (Joiner et al. 1997).

Im Vergleich mit dem LPA-induzierten Kaliumstrom fällt jedoch auf, daß die Latenz zwischen PDGF-Applikation und dem Beginn der Kaliumstromaktivierung mit etwa 30 s sehr lang ist. Das Maximum der Stromamplitude wird erst nach weiteren 120 s erreicht und es dauert weitere 200 s, bis eine vollständige Inaktivierung stattgefunden hat. Diese lange Latenz zwischen PDGF-Applikation und maximaler Kaliumstromaktivierung läßt im Vergleich zur schnellen Kaliumstromaktivierung durch LPA, die bereits wenige Sekunden nach Applikation auftritt (Repp et al. 1998), auf eine Signalkette mit langsam ablaufenden Prozessen schließen. Ob dies am PDGF-Rezeptor selbst oder bei nachgeschalteten Signalkettenkomponenten liegt, ist noch unklar.

Von EGF- und PDGF-Rezeptoren ist bekannt, daß sie nach einer Aktivierung durch EGF bzw. PDGF innerhalb von 20 min internalisiert werden und dadurch ihre Wirkung für die Signaltransduktion zeitlich begrenzt wird (Weimann & Kiess 1995). Daß diese auch für die Kaliumstromaktivierung eine Rolle spielt, wurde in der vorliegenden Arbeit durch folgendes Experiment gezeigt. Wurde nach einer transienten Aktivierung des Kaliumstroms durch PDGF die Badlösung der Meßkammer gegen eine PDGF-freie Extrazellulärlösung ausgetauscht, bewirkte eine erneute Applikation von PDGF nach 30 Minuten in einer anderen Zelle in der gleichen Meßkammer keinen erneuten Membranstromanstieg, während LPA unverändert einen Kaliumstrom induzierte. Dies beruht offenbar auf einer

Internalisierung der PDGF-Rezeptoren nach ihrer ersten Stimulation durch PDGF, während G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (z.B. LPA-Rezeptoren) nach ihrer Stimulation einem Internalisierungsprozeß nicht unterliegen. Diese Experimente zeigen weiterhin, daß die gleichen Kaliumkanäle in einer Zelle durch unterschiedliche Signalketten aktiviert werden können und daß die transiente Aktivierung eine Eigenschaft der jeweiligen Signalkette ist und nicht der Kaliumkanäle selbst.

Die Bedeutung der Rezeptortyrosinkinaseaktivität des PDGF-Rezeptors für die Kaliumstromaktivierung wurde mit dem spezifischen PDGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor AG 1295 untersucht. Nach Vorinkubation von NIH3T3-Zellen mit der Substanz AG 1295 konnte PDGF keinen Kaliumstrom induzieren, während der LPA-induzierte Kaliumstrom durch diese Substanz nicht beeinflußt wurde.

Überraschend war, daß EGF als weiterer wichtiger Wachstumsfaktor in normalen NIH3T3-Zellen selbst in einer Konzentration von 100 ng/ml keine Aktivierung von Kaliumkanälen bewirkte. Ursache hierfür ist offenbar die geringe Dichte an EGF-Rezeptoren in normalen NIH3T3-Zellen. Diese Vermutung konnte in weiteren Experimenten an EGF-R Zellen, die EGF-Rezeptoren in hoher Dichte überexprimieren, bestätigt werden. In diesen Zellen war EGF in der Lage, innerhalb von etwa 30 s einen Kaliumstrom maximal zu aktivieren, der erst nach weiteren 200 s inaktivierte. Bei einer Konzentration von 10 ng/ml erreichte der EGF-induzierte Kaliumstrom eine Stromamplitude, die sich durch höhere EGF-Konzentrationen nicht signifikant steigern ließ.

Auch PDGF induzierte in EGF-R Zellen transient einen Kaliumstrom. Dieser Kaliumstrom hatte jedoch einen anderen zeitlichen Verlauf als in normalen NIH3T3-Zellen. Etwa 40 s nach PDGF-Applikation wurde dieser Kaliumstrom innerhalb weniger Sekunden aktiviert und inaktivierte nach etwa 180 s wieder vollständig (s. Tab. 2). In dem schnellen Membranstromanstieg unterscheidet sich der PDGF-induzierte Kaliumstrom in EGF-R Zellen signifikant von dem PDGF-induzierten Kaliumstrom in NIH3T3-Zellen, wo es etwa 120 s dauert, um den Kaliumstrom maximal zu aktivieren, was auf einen deutlich langsameren Ablauf der Signalkette hinweist. Da in EGF-R Zellen PDGF viel schneller zu einer maximalen Kaliumkanalaktivierung führt als in NIH3T3-Zellen, die im Vergleich zu EGF-R Zellen über eine sehr viel geringere EGF-Rezeptorendichte verfügen, könnte dieser Unterschied ein

erster Hinweis dafür sein, daß PDGF in der Lage ist, auch unter Einbeziehung von EGF-Rezeptoren die Signalkette zu den Kaliumkanälen zu aktivieren.

In zwei Eigenschaften unterscheiden sich die Signalkaskaden der Rezeptortyrosinkinasen und der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren deutlich (Tab. 2). Erstens ist für die Wachstumsfaktoren die lange Latenz zwischen der Applikation und dem Beginn der Stromaktivierung im Vergleich zu LPA charakteristisch. Zweitens fallen die langen Inaktivierungszeiten mit etwa 200 s im Vergleich zu LPA mit 50 s auf, während die Membranstromanstiege alle etwa gleich schnell im Bereich von unter 10 s liegen.

Auch in EGF-R Zellen konnte eine Internalisierung sowohl der PDGF-Rezeptoren als auch der überexprimierten EGF-Rezeptoren nach ihrer Stimulation gezeigt werden. Eine zweite Stimulation der Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch EGF bzw. PDGF etwa 30 min nach ihrer Erststimulation führte nicht zu einer zweiten Kaliumstromaktivierung, während im Gegensatz dazu LPA, das zeitlich versetzt als Kontrollsubstanz appliziert wurde, einen zweiten transienten Kaliumstrom aktivierte. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß in der Tat EGF-Rezeptoren nach ihrer Aktivierung durch EGF internalisiert werden und damit zumindest in den folgenden 30 min eine nochmalige Kaliumkanalaktivierung durch EGF nicht möglich ist, im Gegensatz zu den G-Protein gekoppelten LPA-Rezeptoren, die keinem Internalisierungsprozeß nach ihrer Aktivierung unterliegen.

Die Bedeutung der Tyrosinkinaseaktivität für die Aktivierung der Kaliumkanäle wird durch die Ergebnisse aus den Experimenten mit spezifischen Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren deutlich. Sowohl die EGF- als auch die PDGF-aktivierte Signalkaskade zu den Kaliumkanälen wurde dadurch unterbrochen. Auffallend jedoch war, daß auch der PDGF-induzierte Kaliumstrom nach Vorinkubation mit dem selektiven EGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor AG 1478 vollständig blockiert wurde (s. Abb. 18). Dies könnte wiederum darauf hinweisen, daß PDGF auch über EGF-Rezeptoren Signale vermittelt. In EGF-R Zellen, die mit dem spezifischen PDGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor AG 1295 vorinkubiert waren, konnte PDGF nur noch 8 % des Kaliumstroms aktivieren (s. Abb. 18). Aber auch EGF induzierte einen signifikant niedrigeren Kaliumstrom als bei EGF-R Zellen, die nicht mit der Substanz AG 1295 vorinkubiert waren. Eine mangelnde Selektivität der Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren für den jeweiligen Rezeptor kann als mögliche Erklärung für die

beobachteten Effekte nahezu ausgeschlossen werden, da die Substanz AG 1295 keinen Einfluß auf die EGF-Rezeptor-Autophosphorylierung hat (Banai et al. 1998) und die Substanz AG 1478 erst ab einer Konzentration von über 100 μM auch die PDGF- Rezeptortyrosinkinase inhibiert.

Die wechselseitige Abhängigkeit der Kaliumstromaktivierung durch den einen Wachstumsfaktor von der Rezeptortyrosinkinaseaktivität des anderen Rezeptors könnte ein Hinweis darauf sein, daß ein sogenannter „cross-talk“ zwischen PDGF- und EGF-Rezeptoren bei der Kaliumkanalaktivierung stattfindet. Die Transaktivierung des PDGF-Rezeptors durch den EGF-Rezeptor wurde bislang nur im Zusammenhang mit der Stimulation der Zellmigration von Fibroblasten beschrieben (He et al. 2001).

Für den PDGF-Rezeptor wurden Transaktivierungs-Phänomene durch LPA beschrieben (Herrlich et al. 1998). Unklar bleibt in der vorliegenden Arbeit, ob LPA auch in der Lage ist, über EGF- bzw. PDGF-Rezeptoren Kaliumkanäle zu aktivieren. Gegen einen solchen Zusammenhang spricht der Befund, daß durch die Blockierung der EGF bzw. der PDGF-Rezeptortyrosinkinase die LPA-induzierte Kaliumstromamplitude nicht beeinflußt wurde. Auf der anderen Seite war jedoch bei gleichzeitiger Blockierung der EGF- und PDGF-Rezeptortyrosinkinase mit beiden Substanzen auch die LPA-induzierte Kaliumstromamplitude auf 50 % des Kontrollwerts erniedrigt. Weitere Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von EGF-Rezeptoren an der Kaliumstromaktivierung durch LPA erbrachten Experimente an NIH3T3-Gotoh-Zellen.

NIH3T3-Gotoh-Zellen exprimieren besonders wenige EGF-Rezeptoren. Bei dieser Zelllinie konnte EGF (10 ng/ml) keinen Kaliumstrom induzieren. Überraschenderweise war auch der LPA-induzierte Kaliumstrom signifikant niedriger als in EGF-R Zellen und in normalen NIH3T3-Zellen. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß entweder NIH3T3-Gotoh-Zellen über eine geringere Anzahl an LPA-Rezeptoren verfügen oder daß tatsächlich EGF-Rezeptoren bei den Signalwegen zwischen LPA-Rezeptoren und den Kaliumkanälen eine Rolle spielen.

DEL Zellen exprimieren einen trunkierten EGF-Rezeptor, dem drei Tyrosinphosphorylierungsstellen fehlen und dessen Tyrosinkinaseaktivität dadurch reduziert ist (Gotoh et al. 1993). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß EGF im Vergleich zu EGF-R Zellen in DEL Zellen einen signifikant geringeren Kaliumstrom induzierte.

Dies zeigt nochmals die Bedeutung der EGF-Rezeptortyrosinkinaseaktivität für die Signalkaskade vom EGF-Rezeptor zum calciumabhängigen, spannungsunabhängigen Kaliumkanal.

In der vorliegenden Arbeit konnte nicht nur erstmals gezeigt werden, daß die Wachstumsfaktoren EGF und PDGF calciumabhängige, spannungsunabhängige Kaliumkanäle transient aktivieren können, sondern auch, daß in der Signalkaskade die Tyrosinkinaseaktivitäten der Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen. Weiterhin konnten erstmals Hinweise darauf gefunden werden, daß Transaktivierungsprozesse zwischen EGF- und PDGF-Rezeptoren bei der Kaliumkanalaktivierung ablaufen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß über Ligandengesteuerte Rezeptortyrosinkinasen ein calciumabhängiger spannungsunabhängiger Kaliumstrom transient aktivieren kann. In NIH3T3-Mäusefibroblasten reichte hierzu eine Konzentration von 10 ng/ml Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF) aus. Die pharmakologische Charakterisierung zeigte eine vollständige Blockade des Kaliumstroms durch die Skorpiontoxine Charybdotoxin, Iberiotoxin und Margatoxin in nanomolaren Konzentrationen. Der selektive PDGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor AG 1295 verhinderte in NIH3T3-Zellen vollständig einen PDGF-induzierten Kaliumstrom. Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) konnte in NIH3T3-Zellen in einer Konzentration bis 100 ng/ml keinen Kaliumstrom induzieren.

In EGF-R Zellen, die EGF-Rezeptoren in hoher Dichte überexprimieren, waren sowohl PDGF als auch EGF in der Lage, in einer Konzentration von 10 ng/ml einen spannungsunabhängigen, calciumabhängigen Kaliumstrom maximal zu aktivieren. Charakteristisch im Vergleich zur Kaliumstromaktivierung durch den G-Proteingekoppelten LPA-Rezeptor ist bei den Rezeptortyrosinkinasen zum einen die lange Latenz zwischen Applikation des Wachstumsfaktors und Beginn der Kaliumstromaktivierung und zum anderen die langen Inaktivierungszeiten mit 200 s im Vergleich zu LPA mit 50 s. Es konnte gezeigt werden, daß die Wachstumsfaktor-Rezeptoren nach ihrer ersten Stimulation einem Internalisierungsprozeß unterliegen. Eine zweite Kaliumstromaktivierung ist durch EGF bzw. PDGF innerhalb von 30 min nicht möglich, im Gegensatz zum G-Protein-gekoppelten LPA-Rezeptor. Die Kaliumstromaktivierung konnte durch die entsprechenden selektiven EGF- bzw. PDGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren AG 1478 und AG 1295 vollständig blockiert werden. Dies zeigt die wichtige Rolle der Rezeptortyrosinkinaseaktivität für die Signalweiterleitung von den Rezeptoren zum Kaliumkanal. Dies wird auch bestätigt durch Experimente an DEL-Zellen, deren EGF-Rezeptoren drei fehlende Autophosphorylierungsstellen und deshalb eine verminderte Tyrosinkinaseaktivität haben. Eine Blockade der EGF-Rezeptortyrosinkinase durch den selektiven EGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor AG 1478 führte auch zu einer Blockade der PDGF-vermittelten Kaliumstromaktivierung und umgekehrt. Die vorliegende Arbeit konnte damit auch erstmals zeigen, daß eine Transaktivierung bzw. ein „cross-talk“ zwischen Wachstumsfaktor-Rezeptoren auch hinsichtlich einer Kaliumkanalaktivierung stattfindet.

6 Literaturverzeichnis

- Banai S., Wolf Y., Golomb G., Pearle A., Waltenberger J., Fishbein I., Schneider A., Gazit A., Perez L., Huber R., Lazarovichi G., Rabinovich L., Levitzki A. and Gertz S. D. (1998) PDGF-Receptor tyrosine kinase blocker AG 1295 selectively attenuates smooth muscle cell growth in vitro and reduces neointimal formation after balloon angioplasty in swine. *Circulation* **97**: 1960-1969
- Barry P.H., Lynch J.W. (1991) Liquid junction potential and small cell effects in patch clamp analysis. *J. Membrane Biol.* **121**: 101-117
- Carpenter G. (2000) EGF Receptor Transactivation Mediated by the Proteolytic Production of EGF-like Agonists. *Sci.STKE* **15**: PE1
- Carpenter G. & Cohen S. (1990) Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **265**: 7709-7712
- Carpenter G. & Wahl M.I. (1990) The epidermal growth factor family. *Handbook Exptl. Pharmacol.* **95 Teil 1**: 69-171
- Collins T., Ginsburg D., Boss J.M., Orkin S.H., Pober J.S. (1985) Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor B chain: cDNA cloning and structural analysis. *Nature* **316**: 748-750
- Cook N.S. (1990) Potassium channels. Structure, classification, function & therapeutic potential. *Ellis Horwood Limited, Chichester*
- Daub H., Wallasch C, Lanckenau A, Herrlich A, Ullrich A. (1997) Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.* **16**: 7032-7044
- Decker K., Koschinski A, Trouliaris S, Tamura T, Dreyer F, Repp H. (1998) Activation of a Ca²⁺-dependent K⁺ current by the oncogenic receptor protein tyrosine kinase v-Fms in mouse fibroblasts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **357**: 378-384
- Draheim H.J., Repp H., & Dreyer F. (1995) Src-transformation of mouse fibroblasts induces a Ca²⁺-activated K⁺ current without changing the T-type Ca²⁺ current. *Biochim. Biophys. Acta.* **1269**: 57-63
- Eguchi S., Numaguchi K., Iwasaki H., Matsumoto T., Yamakawa T., Utsunomiya H., Motley E.D., Kawakatsu H., Owada K.M., Hirata Y., Marumo F. & Inagami T. (1998) Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 8890-8896
- Force T. & Bonventre J.V. (1998) Growth factors and mitogen activated protein kinases. *Hypertension* **31**: 152-161

- Garcia M.L., Hanner M., Knaus H.G., Slaughter R., Kaczorowski G.J. (1999) Scorpion toxins as tools for studying potassium channels. *Methods Enzymol.* **294**: 624-639
- Garcia-Calvo M., Leonard R.J., Novick J., Stevens S.P., Schmalhofer W., Kaczorowski G.J. and Garcia M.L. (1993) Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides marginatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J. Biol. Chem.* **268**: 18866-18874
- 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. USA* **85**: 3329-3333
- Gotoh N., Tojo A., Muroya K., Hashimoto Y., Hattori S., Nakamura S., Takenawa T., Yazaki Y. & Shibuya M. (1993) Epidermal growth factor-receptor mutant lacking the autophosphorylation sites induces phosphorylation of Shc protein and Shc-Grb2/ASH association and retains mitogenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 167-171
- 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. *Pflügers Arch.* **391**: 85-100
- He H., Levitzki A., Zhu H.J., Walker F., Burgess A., Maruta H. (2001) Platelet-derived growth factor requires epidermal growth factor receptor to activate p21-activated kinase family kinases. *J. Biol. Chem.* **276**: 26741-26744
- Herrlich A., Daub H., Knebel A., Herrlich P., Ullrich A., Schultz G., Gundermann T. (1998) Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8985-8990
- Hughes A.D., Clunn G.F., Refson J., Demoliou-Mason C. (1996) Platelet-derived growth factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle. *Gen. Pharmacol.* **27**: 1079-1089
- 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., Silahdaroglu A., Olesen S.P. and Ahring P.K. (1998) Characterisation of the cloned human intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *Am. J. Physiol.* **275**: C848-856
- Joiner W.J., Wang L.Y., Tang M.D. & Kaczmarek L.K. (1997) hSK4, a cloned member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 11013-11018

- Knaus H.G., Koch R.O.A., Eberhart A., Kaczorowski G.J., Garcia M.L., Slaughter R.S. (1995) [¹²⁵I]margatoxin, an extraordinarily high affinity ligand for voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *Biochemistry* **34**: 13627-13634
- Lee T., Feig L., Montell D.J. (1996) Two distinct roles for Ras in a developmentally regulated cell migration. *Development* **122**: 409-418
- Lewis R.S. & Calahan M.D. (1988) Subset-specific expression of potassium channels in developing murine T lymphocytes. *Science* **239**: 771-775
- Li J., Kim Y.N., Bertics P.J. (2000) Platelet-derived growth factor-stimulated migration of murine fibroblasts is associated with epidermal growth factor receptor expression and tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **275**: 2951-2958
- Lotz M., Wang H.H., Cance W., Matthews J., Pories S. (2003) Epidermal growth factor stimulation can substitute for c-Src overexpression in promoting breast carcinoma invasion *J. Surg. Res.* **109**: 123-129
- Marks P.W. & Maxfield F.R. (1991) Preparation of solutions with free calcium concentration in the nanomolar range using 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane N,N,N',N'-tetraacetic acid. *Anal. Biochem.* **193**: 61-71
- Matoskova B., Rorsman F., Svensson V., Betsholtz C. (1989) Alternative splicing of the platelet-derived growth factor A-chain transcript occurs in normal as well as tumor cells and is conserved among mammalian species. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3148-3150
- Miller C., Moczydlowski E., Latorre R. and Phillips M. (1985) Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated potassium channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* **313**: 316-318
- Neher E. (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp Experiments. *Methods Enzymol.* **207**: 123-131
- Ordway R.W., Petrou S., Kirber M.T., Walsh J.V.Jr., and Singer, J.J. (1995) Stretch activation of a toad smooth muscle K⁺ channel may be mediated by fatty acids. *J. Physiol.* **484**: 331-337
- Petrou S., Ordway R.W., Hamilton J.A., Walsh J.V.Jr. and Singer J.J. (1994) Structural requirements for charged lipid molecules to directly increase or suppress K⁺ channel activity in smooth muscle cells. Effects of fatty acids, lysophosphatide, acyl coenzyme A and spingosine. *J. gen. Physiol.* **103**: 471-486
- Petrou S., Ordway R.W., Kirber M.T., Dopico A.M., Hamilton J.A., Walsh J.V.Jr., Singer J.J. (1995) Direct effects of fatty acids and other charged lipids on ion channel activity in smooth muscle cells. *Prostaglandines Leukotrienes and essential fatty acids* **52**: 173-178

- Pierce J.H., Arnstein P., Di Marco E., Artrip J., Kraus M.H., Lonardo F., Di Fiore P.P. & Aaronson S.A. (1991) Oncogenic potential of erbB-2 in human mammary epithelial cells. *Oncogene* **6**: 1189-1194
- Prigent S.A. & Lemoine N.R. (1992) The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog. Growth Factor Res.* **4**: 1-24
- Reinhart P.H., Chung S. & Levitan I.B. (1989) A family of calcium-dependent potassium channels from rat brain. *Neuron* **2**: 1031-1041
- Repp H., Koschinski A., Decker K. & Dreyer F. (1998) Activation of a Ca²⁺-dependent K⁺ current in mouse fibroblasts by lysophosphatidic acid requires a pertussis toxin-sensitive G protein and Ras. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **358**: 509-517
- Repp H., Birringer J., Koschinski A., Dreyer F. (2001) Activation of a Ca²⁺-dependent K⁺ current in mouse fibroblasts by sphingosine-1-phosphate involves the protein tyrosine kinase c-Src. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **363**: 295-301
- Robbins K.C., Leal F., Pierce J.H., Aaronson S.A. (1985) The v-sis/PDGF-2 transforming gene product localizes to cell membranes but is not a secretory protein *EMBO J.* **4**: 1783-1792
- Ross R., Raines E.W., Bowen-Pope D.F. (1986) The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* **46**: 155-169
- Schlessinger J. (1988) The epidermal growth factor as a multifunctional allosteric protein. *Biochemistry* **27**: 3119-3123
- Stern M.D. (1992) Buffering of calcium in the vicinity of a channel pore. *Cell Calcium* **13**: 183-192
- Tsien R.Y. (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* **19**: 2396-2404
- Ullrich A. & Schlessinger J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212
- Watanabe S., Sato T. (1996) Effects of free fatty acids on the binding of bovine and human serum albumin with steroid hormones. *Biochim. Biophys. Acta.* **1289**: 385-396
- Weimann E. & Kiess W. (1995) Wachstumsfaktoren: Grundlagen und klinische Anwendung. *Schattauer Verlagsgesellschaft*. **2. Aufl.**, Stuttgart, New York
- Wonderlin W.F. & Strobl J.S. (1996) Potassium channels, proliferation and G₁ progression. *J. Membrane Biol.* **154**: 91-107

Versicherung

„Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den 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.“

Gießen, November 2003

Anja Dodt

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dreyer für die Überlassung des interessanten Themas, seine hervorragende Betreuung und den großzügig gewährten Freiraum bei der Durchführung der Arbeit. Die stete Hilfsbereitschaft im Bezug auf die Doktorarbeit und auch während des Studiums waren einmalig.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts, namentlich Herrn Dr. Repp, der mir bei allen Fragen und Interpretationen der Ergebnisse hilfreich zur Seite stand und Herrn Dr. Koschinski, der mich in großer Geduld in die Geheimnisse der Zellkultur, des Patchens und der Bildbearbeitung einweihte und auch alle anderen Meßstand- und Computerfragen lösen konnte.

Frau Zibuschka gilt mein Dank für die Hilfe bei der Zellkultur und der Betreuung der Zellen bei meiner Abwesenheit. Besonders dankbar war ich für die gute Stimmung unter den Doktoranden und die netten Kontakte, die manchmal über das Labor hinausgingen.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht haben und denen die Fertigstellung dieser Arbeit ein besonderes Anliegen war.

Lebenslauf

Name: Anja Yvonne Dodt
Geburtstag: 11.05.1976
Geburtsort: Hanau
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1982-1986 Grundschule Nieder-Mörlen
1986-1995 St. Lioba Schule, Bad Nauheim
Mai 1995 Abitur

Studium

1995-1996 Studium der Rechtswissenschaften an der
Justus-Liebig-Universität Gießen
1996-2002 Studium der Humanmedizin an der
Justus Liebig-Universität Gießen
Oktober 2002 dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit

April 2003-März 2004 Ärztin im Praktikum an der Helios William
Harvey Klinik (Gefäßzentrum) in Bad
Nauheim
seit April 2004 Ärztin im Praktikum am St. Vincenz
Krankenhaus in Limburg, Abteilung für
Allgemein-, Gefäß- und Viszeralchirurgie