

**Calcium als Regulator zellulärer Wachstumsprozesse:  
die funktionelle Rolle von spannungsabhängigen  
Calciumkanälen in humanen Linsenepithelzellen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Anja Meißner, geb. am 5. Februar 1981 in Borna

aus Rostock

Rostock, den 20. Juli 2007

1. Gutachter: Prof. Thomas Noack  
Institut für Physiologie  
Medizinische Fakultät Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Steffen-Sebastian Bolz  
Department of Physiology  
Medical Faculty University of Toronto
3. Gutachter: Prof. Dieter Weiss  
Institut für Physiologie  
Mathematisch - Naturwissenschaftliche Fakultät  
Universität Rostock

eingereicht am 20. Juli 2007

verteidigt am 17. April 2008

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung

1.1	Der Intrazelluläre Calciumhaushalt und seine Regulation mittels Spannungsabhängiger Calciumkanäle.....	1
1.1.1	Der Calciumhaushalt der Zelle.....	1
1.1.2	Spannungsabhängige Calciumkanäle.....	3
1.1.3	T- und L- Typ Calciumkanal Antagonisten (CCA).....	6
1.2	Calcium und dessen Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Proliferation und Apoptose.....	8
1.2.1	Calcium als „second messenger“.....	8
1.2.2	Calcium und Zellproliferation.....	10
1.2.3	Calcium und Apoptose.....	13
1.3	Zielstellung der Arbeit.....	15

## 2 Material und Methoden

2.1	Zellbiologische Methoden.....	17
2.1.1	Arbeiten in der Zellkultur.....	17
2.1.2	Kryokonservierung und Inkulturnahme eukaryotischer Zellen.....	17
2.1.3	Inkubation der Zellen mit verschiedenen Blockern.....	18
2.1.4	Proliferationstest.....	18
2.1.5	Soft Agar Assay.....	19
2.1.6	MTT Assay.....	20
2.1.7	Vitalitätsbestimmung mittels Acridine Orange.....	20

## II

2.2	Proteinchemische Methoden.....	21
2.2.1	Zelllyse für nachfolgende Immunpräzipitation.....	21
2.2.2	Herstellung von Gesamtzelllysaten.....	21
2.2.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	22
2.2.4	Immunpräzipitation von Proteinen.....	23
2.2.5	SDS- Page.....	23
2.2.6	Transfer der Proteine auf eine PVDF- Membran.....	24
2.2.7	Antigen Detektion.....	24
2.2.8	Ablösen des Detektionsantikörpers.....	25
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.3.1	RNA- Isolierung .....	25
2.3.2	cDNA Synthese.....	26
2.3.3	PCR.....	27
2.3.4	Isolation genomischer DNA.....	28
2.4	Elektrophysiologische Methoden.....	29
2.4.1	Patch- Clamp Technik.....	29
2.4.1.1	Herstellung von Patchpipetten.....	30
2.4.1.2	Aufbau der Messeinrichtung.....	30
2.4.1.3	Verwendete Messprotokolle.....	31
2.4.2	Bestimmung der Calciumkonzentration mittels Fura-2.....	31
2.4.2.1	Beladung der Zellen mit Fura-2.....	32
2.4.2.2	Kalibrierung.....	33
2.4.2.3	Grundlagen der Berechnung der intrazellulären Calciumkonzentraion.....	33
2.4.2.4	Die Mangan- Quench Technik.....	34
2.5	Statistik.....	35

### 3 Ergebnisse

3.1	Beeinflussung des intrazellulären Calciumhaushaltes durch spannungsabhängige Calciumkanäle in Linsenepithelzellen.....	36
3.1.1	Untersuchungen zur Expression spannungsabhängiger Calciumkanäle in humanen Linsenepithelzellen.....	36
3.1.2	Untersuchungen zur Blockierung des Calciumeinstroms durch Calciumkanal- Antagonisten.....	39
3.1.3	Einfluss von Mibefradil und Verapamil auf die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration.....	42
3.2	Einfluss von Calciumkanalblockern auf zelluläre Funktionen.....	46
3.2.1	Beeinflussung der Proliferation durch Mibefradil und Verapamil.....	46
3.2.2	Mibefradil und Verapamil beeinflussen die Vitalität von humanen Linsenepithelzellen.....	50
3.2.3	Induktion von Apoptose durch die Calciumkanal- Antagonisten Mibefradil und Verapamil.....	53
3.3	Induktion von Apoptose durch die Calciumkanal- Antagonisten Mibefradil und Verapamil.....	58
3.3.1	Beeinflussung der Calcium-/ Calmodulin- abhängigen Kinase II (CaMKII).....	58
3.3.2	Beeinflussung der Extracellular regulated kinase ERK1/2.....	61
3.3.3	Untersuchungen zum Zusammenhang der Kinasen CaMKII, cRaf-1 und ERK1/2.....	65
3.3.4	Beeinflussung apoptotischer Vorgänge durch die Blocker Von CaMKII und ERK1/2.....	66

## **4 Diskussion**

4.1	Expression verschiedener spannungsabhängiger Calciumkanäle ( $\text{Ca}_v$ ) in HLE-B3 und deren Einfluss auf intrazelluläre Calciumkonzentrationen.....	70
4.2	Einfluss von $\text{Ca}_v$ - Antagonisten auf Zellwachstum humaner Linsenepithelzellen.....	75
4.3	Einfluss von $\text{Ca}_v$ - Antagonisten auf Zelltod humaner Linsenepithelzellen.....	81

## **5 Zusammenfassung**

## **6 Literatur**

## **7 Anhang**

7.1	Abkürzungen.....	105
7.2	Material.....	107
7.2.1	Zellen.....	107
7.2.2	Chemikalien.....	108
7.2.3	Proteine und Antikörper.....	109
7.2.4	Proteingrößenstandards.....	110
7.2.5	Sonstige Materialien und Hilfsmittel.....	110
7.3	Tabellen.....	112
7.4	Primersequenzen.....	113

Anlagen: Erklärung

Lebenslauf

Publikationsliste

Danksagung

## 1 Einleitung

### 1.1 *Der intrazelluläre Calciumhaushalt und seine Regulation mittels spannungsabhängiger Calciumkanäle*

#### 1.1.1 Der Calciumhaushalt der Zelle

Eine Vielzahl physiologischer Prozesse wird durch die Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen vermittelt. Zur Kontrolle dieses ubiquitären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals setzen die Zellen eine Reihe zellulärer Transportsysteme ein, die  $\text{Ca}^{2+}$  entweder aus dem Cytosol entfernen oder die Konzentration des Ions darin erhöhen können. In Muskelzellen bspw. aktivieren verschiedene Hormone und Neurotransmitter Kontraktionsprozesse durch die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern oder durch Einstrom des Ions aus dem Extrazellularraum (Morales et al., 1997). Aufgrund der unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Verteilung in den einzelnen Zellkompartimenten werden diese und zahlreiche andere wichtige zelluläre Prozesse ermöglicht, die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in engen Grenzen ist daher für eine intakte Zellphysiologie von enormer Bedeutung. Im Cytosol herrschen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im  $10^{-7}$  M Bereich vor, während in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern des endoplasmatischen Reticulums (ER) eine Konzentration von  $10^{-5}$  M zu finden ist (Berridge et al., 2003; Berridge, 2006). Da auch im extrazellulären Medium die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration weitaus höher ist ( $10^{-3}$  M) als im Cytosol, entsteht ein entsprechend hoher Gradient, der das  $\text{Ca}^{2+}$  in den Intrazellularraum treibt. Wenn durch Aktivierung verschiedener Kanäle  $\text{Ca}^{2+}$  ins Cytoplasma strömt, erhöht sich dort dessen Konzentration drastisch und kann somit  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Vorgänge in der Zelle aktivieren. Um diesen Signalmechanismus aufrechterhalten zu können, muss die Zelle die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration niedrig halten. Dazu verfügt die Zelle über die verschiedensten Mechanismen: zum einen kann die  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase, die die Hydrolyseenergie von ATP nutzt,  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle schleusen, zum anderen kann  $\text{Ca}^{2+}$  im Austausch gegen Natrium durch den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aus der Zelle

befördert werden und schließlich kann mit Hilfe der  $\text{Ca}^{2+}$ - Pumpe freies  $\text{Ca}^{2+}$  in Speichern abgelegt werden.

Für seine Funktion als intrazellulärer Botenstoff bei einer Vielzahl von zellulären Vorgängen kann  $\text{Ca}^{2+}$  auf verschiedenen Wegen mobilisiert werden. Entweder wird das Ion durch  $\text{Ca}^{2+}$ - Kanäle aus dem Umgebungsmedium in die Zelle befördert oder aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Die Aktivierung gespeicherten  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER kann durch intrazelluläre Botenstoffe wie Insositoltriphosphat ( $\text{InsP}_3$ ) oder B- Zelllymphoma 2 (Bcl-2) vermittelt werden.  $\text{InsP}_3$  bspw. öffnet durch Bindung an den  $\text{InsP}_3$  Rezeptor des ER denselbigen und moduliert damit die Freisetzung des im ER gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ . Das durch  $\text{InsP}_3$  freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$  wird schnell wieder aus dem Cytoplasma gepumpt und  $\text{InsP}_3$  relativ schnell wieder hydrolysiert, so dass es auf diesem Weg nur zu einem kurzfristigen Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  kommt. Der meist in erregbaren Zellen zu findende Ryanodinrezeptor (RyR) kann durch  $\text{Ca}^{2+}$  selbst aktiviert werden und vermittelt ebenfalls die Freisetzung des im ER gespeicherten  $\text{Ca}^{2+}$ . Für den Einstrom extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zellen spielen neben spannungsabhängigen Calciumkanälen ( $\text{Ca}_v$ ) auch Rezeptor- vermittelte (ROC) und Speicher- gekoppelte Kanäle (SOC) eine wichtige Rolle. Während die  $\text{Ca}_v$ s durch Membrandepolarisation aktiviert werden, wird der  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom durch SOC's in Abhängigkeit der Speicherfüllzustände reguliert. ROCs können durch Neurotransmitter, Hormone oder Wachstumsfaktoren aktiviert werden.

Physiologisch wird der Einstrom des  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle unterschieden in kapazitativen (CCE) und nicht- kapazitativen (NCCE), wobei der erstgenannte zunächst in nicht- erregbaren Zellen beschrieben wurde und durch die Kommunikation zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ - Speichern und Zellmembran geprägt ist. Dabei wird die Permeabilität der Membran für  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen, d.h. der Aktivierungszustand von Kanälen wie SOC's, von den Füllzuständen der intrazellulären Speicher bestimmt (Putney, Jr., 1986). NCCE dagegen scheint unabhängig von intrazellulär vorherrschenden  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentrationen zu sein, hierbei spielen ROCs oder GTP- bindende Proteine eine tragende Rolle, die durch verschiedene intra- oder



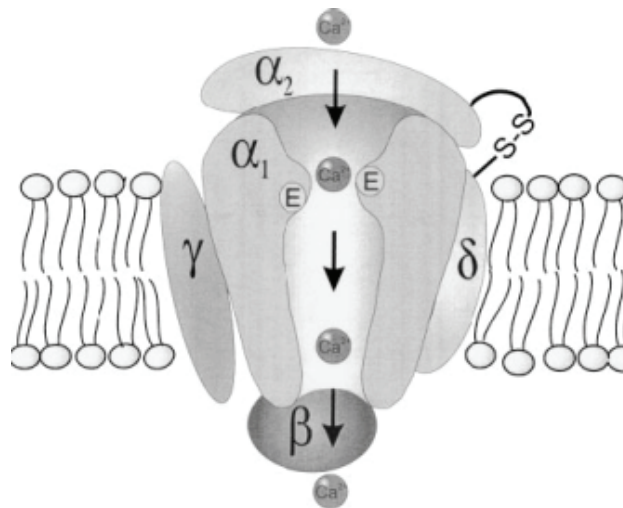
extrazelluläre Botenmoleküle aktiviert werden können. Wachstumsfaktoren wie vEGF wurden mit der Freisetzung von Arachidonsäure und NO in Verbindung gebracht, die schließlich den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellularraum modulieren konnten (Mottola et al., 2005).  $\text{Ca}_v\text{s}$  nehmen eine gewisse Sonderstellung ein und können nur schlecht einem der genannten Modelle zugeordnet werden, obwohl sie scheinbar Einfluss auf kontraktile Eigenschaften haben. In Gallenblasenzellen wurden die  $\text{Ca}_v\text{s}$  als wichtiger Mediator zur Aufrechterhaltung des Tonus beschrieben (Morales et al., 2004). Da diese Kanäle und deren Funktionen Gegenstand kontroverser Diskussionen sind, soll deren Anteil am  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom sowie deren Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Proliferation und Apoptose in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

#### 1.1.2 Spannungsabhängige Calciumkanäle

Spannungsabhängige Calciumkanäle ( $\text{Ca}_v\text{s}$ ) spielen in der Regulation einer Reihe von zellulären Prozessen wie Muskelkontraktion (Bakowski and Parekh, 2007; Kanaide, 2007), Hormon- und Neurotransmitterfreisetzung (Chen et al., 1999; Stojilkovic et al., 2005) oder auch der Genexpression (Naveh-Many and Nechama, 2007) eine wichtige Rolle. Diese Kanäle bilden einen der Hauptwege des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch die Plasmamembran erregbarer Zellen, indem sie den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bei Membrandepolarisation vermitteln.

Der spannungsabhängige Calciumkanal ( $\text{Ca}_v$ ) ist, biochemisch charakterisiert, ein Heteromultimer bestehend aus einer  $\alpha 1$  Untereinheit, einer intrazellulären  $\beta$  Untereinheit und einem transmembranären, über Disulfidbrücken verbundenen  $\alpha 2\text{d}$  Komplex. Die  $\alpha 1$  Untereinheit ist mit 180 bis 250 kDa die größte, sie schließt die Kanalpore, den Spannungssensor sowie den „Gating-Apparat“ ein.  $\alpha 1$  setzt sich aus vier homologen Domänen (I-IV) mit je sechs Transmembransegmenten (S1-S6) zusammen. Während S4 der Spannungssensor ist, bestimmen die Poren-loops zwischen den Transmembransegmenten S5 und S6 in jeder Domäne die Ionenleitfähigkeit und die Selektivität. Obwohl  $\alpha 1$  die Hauptfunktionseinheit ist,

werden alle anderen Untereinheiten für die Kanalfunktionalität benötigt:  $\alpha_2$  ist erforderlich für die extrazelluläre Struktur des Kanals und somit für die Kanalstimulation, während die mit  $\alpha_2$ -gekoppelte  $\alpha_1$  Untereinheit für spannungsabhängige Aktivierung und steady-state Inaktivierung verantwortlich ist (Catterall et al., 1991; Ertel et al., 2000; Lacinova, 2005).



**Abb.1.1: Schematische Darstellung eines spannungsabhängigen Calciumkanals (Klugbauer et al., 2003).**

Eine der bekannten Nomenklaturen für spannungsabhängige Calciumkanäle wurde aus den Bezeichnungen für die  $\alpha_1$  Untereinheit entwickelt, welche ausgehend von der  $\alpha_{1s}$  Untereinheit für die zuerst identifizierte Isoform des Skelettmuskels weitergeführt wurde. Nach dieser Nomenklatur werden L- Typ Kanäle ( $\text{Ca}_v1.1$  bis  $\text{Ca}_v1.4$ ) in  $\alpha_{1s}$ ,  $\alpha_{1c}$ ,  $\alpha_{1d}$  und  $\alpha_{1f}$  eingeteilt, T- Typ Kanäle ( $\text{Ca}_v3.1$  bis  $\text{Ca}_v3.3$ ) in  $\alpha_{1g}$ ,  $\alpha_{1h}$  und  $\alpha_{1i}$  und  $\text{Ca}_v2.1$  bis  $\text{Ca}_v2.3$  in  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$  und  $\alpha_{1e}$  (Lacinova, 2005). Bisher wurden fünf Klassen von spannungsabhängigen Calciumkanälen in Abhängigkeit ihrer Eigenschaften hinsichtlich Kinetik,  $\alpha_1$  Untereinheit, Pharmakologie, Einzelkanalleitfähigkeit und Spannungsabhängigkeit identifiziert: T-, L-, N-, P/ Q- und R- Typ. Diese fünf Klassen sind zu drei weitläufigen Gruppen zusammengefasst (Tab.1): 1) bei geringer Spannung aktivierende Kanäle (LVA: T- Typ), 2) bei hoher Spannung aktivierende Kanäle (HVA: L- Typ) und 3) bei hoher Spannung aktivierende, Dihydropyridin-unempfindliche Kanäle (N-, P/ Q- und R- Typ) (Ertel et al., 2000; Lacinova, 2005).

Klasse	Gruppe	Kanal	Blocker	Physiologische Funktion
LVA	T- Typ	Ca <sub>v</sub> 3.1	**	Ca <sup>2+</sup> - Spikes im kardialen Sinusknoten; Repetitive Aktivität in Neuronen, glatten Muskeln und endokrinen Zellen
		Ca <sub>v</sub> 3.2	**	siehe Ca <sub>v</sub> 3.1
		Ca <sub>v</sub> 3.3	**	siehe Ca <sub>v</sub> 3.1
HVA	L- Typ	Ca <sub>v</sub> 1.1	Dihydropyridin*	Vermittlung des Ca <sup>2+</sup> - Einstroms für Sekretion von Hormonen und Peptiden; Sensoren für Kopplung von Erregung und Kontraktion
		Ca <sub>v</sub> 1.2	Phenylalkylamin*	Hormonfreisetzung Regulation der Transkription
		Ca <sub>v</sub> 1.3	Benzothiazepin*	Synaptische Integration Regulation der Transkription
		Ca <sub>v</sub> 1.4	**	Neurotransmitterfreisetzung
HVA	P/Q- Typ	Ca <sub>v</sub> 2.1	Agatoxin	Neurotransmitterfreisetzung
	N- Typ	Ca <sub>v</sub> 2.2	CTx-GVIA	
	R- Typ	Ca <sub>v</sub> 2.3	SNX-482	
* blockieren alle Kanäle dieser Gruppe, außer Ca <sub>v</sub> 1.4				
** keine spezifischen Blocker bekannt				

**Tabelle1: Physiologische Funktionen und Antagonisten spannungsabhängiger Calciumkanäle.**

L- Typ Ca<sub>v</sub> benötigen zur Aktivierung eine starke Depolarisation, haben lange „Offenzeiten“ und können durch organische Antagonisten wie Verapamil blockiert werden, während T- Typ Ca<sub>v</sub> bereits bei schwacher Depolarisation aktivieren,

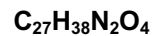
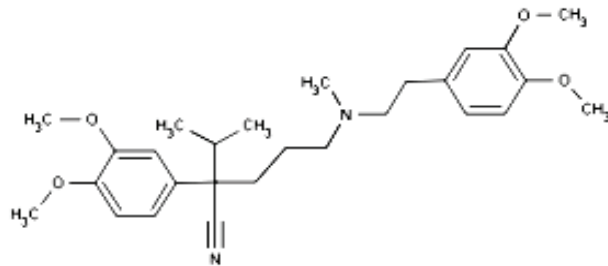
transient und weitgehend resistent gegen organische Antagonisten sind (Heady et al., 2001; Striessnig et al., 1990).

### 1.1.3 T- und L- Typ Calciumkanal Antagonisten (CCA)

Es sind eine Reihe verschiedenster Substanzen bekannt, die die Funktion von  $\text{Ca}_v\text{s}$  hemmen und somit den Calciumeinstrom in den Intrazellularraum nachhaltig beeinflussen. Gemäß ihrer Spezifität werden sie als L- und T- Typ  $\text{Ca}_v$ -Antagonisten bezeichnet. Die blockierende Wirkung auf L- Typ  $\text{Ca}_v$  im glatten Gefäßmuskel und im Herzen macht CCA zu wertvollen Therapeutika bei Erkrankungen wie Hypertonie, supraventrikulären Arrhythmien und Angina pectoris. Die derzeit klinisch angewandten, spezifischen CCA gehören drei chemisch und von ihrem Wirkungsprofil unterschiedlichen Stoffgruppen an: 1) Phenylalkylamine wie Verapamil, 2) Benzothiazepine wie Diltiazem und 3) Dihydropyridine wie Nifedipin. Diese Blocker zeichnen sich dadurch aus, dass sie, mit Ausnahme einiger Dihydropyridine, in therapeutisch tolerierbaren Konzentrationen T- Typ  $\text{Ca}_v\text{s}$  nicht inhibieren.  $\text{Ca}_v$ - Blocker mit geringer Spezifität, wie Fumarizin oder Cinnarizine, haben die Eigenschaft beide Kanaltypen zu beeinflussen, allerdings besitzen sie im Gegensatz zu anderen Antagonisten keinerlei erwähnenswerte therapeutischen Potenziale (Heady et al., 2001; Lacinova, 2004).

**Verapamil** gehört als Phenylalkylamin zu den L- Typ Kanal Antagonisten, dient als Antiarrhythmikum bei supraventrikulär bedingten Tachyarrhythmien, zur Prophylaxe von Angina pectoris- Anfällen und als Antihypertensivum. Die Substanz (Abb.1.2) stellt im physiologischen pH- Bereich ein kationisches amphiphiles Molekül dar, das nicht nur hemmend auf die glatte arterielle Gefäßmuskulatur, sondern auch auf die Herzmuskulatur wirkt. Die Substanz verhindert die für den Sinusknoten notwendige Depolarisation (Bildung elektrischer Erregung) durch Inhibierung des  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms. Durch seine negativ chronotrope und negativ ionotrope Wirkung im Herzen können bei Patienten verschiedene Nebenwirkungen wie Bradykardie oder fehlende Reflextachykardie auftreten. Verapamil wirkt als intrazellulärer Porenblocker, indem es die Poren von der cytoplasmatischen Seite

besetzt und dadurch den Kanal blockiert (Hockerman et al., 1995; Hockerman et al., 1997a; Hockerman et al., 1997b; Lacinova, 2004; Striessnig et al., 1990).

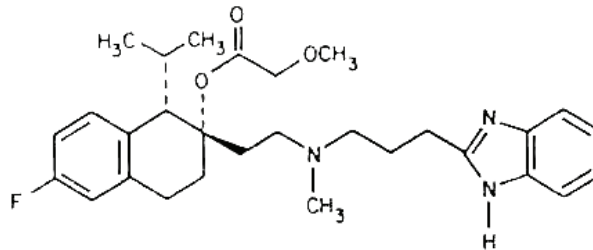


**Abb.1.2: Strukturformel des L- Typ- Kanal Antagonisten Verapamil [5-((3,4-Dimethoxyphenethyl)-methylamino)-2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-isopropylvaleronitril ].**

In verschiedenen Untersuchungen wurden durch das Medikament, in relativ hohen Konzentration appliziert, Wachstumsinhibierungen von Tumorzellen nachgewiesen (Panner and Wurster, 2006). Es konnte außerdem erfolgreich als Muskelrelaxanz im Rattenmodell eingesetzt werden (Badawi et al., 2006).

**Mibefradil** (Ro 40-6969) ist ein Tetralol- Derivat und ähnelt strukturell dem Phenylalkylamin Verapamil (Clozel et al., 1997) (Abb.1.3), es unterscheidet sich von anderen  $\text{Ca}^{2+}$ - Kanal Antagonisten dadurch, dass es präferentiell T- Typ Kanäle mit 10- bis 20- fach höherer Selektivität als L- Typ Kanäle blockiert (Lacinova, 2004; Mishra and Hermsmeyer, 1994b; Mishra and Hermsmeyer, 1994a). Es wurde vormals als Medikament in der Therapie von Angina pectoris und Hypertension eingesetzt, es reduzierte den Blutdruck und die Herzrate ohne die myokardiale Kontraktion zu beeinflussen (Van der Vring et al., 1999). Das Medikament bewirkte im Tiermodell eine erhöhte Überlebensrate bei wiederholt auftretenden myokardialen Infarkten, was möglicherweise auf antiarrhythmatische Effekte aufgrund einer T- Typ Kanalblockade zurückzuführen war (Clozel et al.,

1984). Es wurde aufgrund seiner Interaktion mit dem Cytochrom P-340 3A4 vom Markt genommen.



**Abb.1.3: Strukturformel des T- Typ- Kanal Antagonisten Mibefradil.**

Die Wirkung dieses Antagonisten auch auf L- Typ Kanäle kann auf verschiedene Gründe zurückzuführen sein: Huang et al. berichteten von der Produktion eines aktiven Metaboliten durch intrazelluläre Hydrolyse, der im Gegensatz zum nicht-hydrolysierten Analogon L- Typ Kanäle inhibiert. Außerdem scheint es, dass Mibefradil Bindestellen für Verapamil überspannt und an Dihydropyridin-Bindestellen bindet, ohne dabei die Bindung von Dihydropyridinen zu beeinflussen (Ferrante et al., 1991; Glasser et al., 2000). Es sind eine Reihe anderer Substanzen bekannt, die T- Typ Kanäle inhibieren wie Ethosuximid oder Kurtoxin, wobei die meisten allerdings in großem Maß andere Ionenkanäle und Transporter beeinflussen. Bisher konnte noch kein spezifischer Inhibitor für den T- Typ Kanal entwickelt werden (Heady et al., 2001), der ähnlich spezifisch auf T- Typ Kanäle wirkt wie das Tetralol- Derivat Mibefradil.

## *1.2 Calcium und dessen Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Proliferation und Apoptose*

### *1.2.1 Calcium als intrazellulärer Botenstoff*

$\text{Ca}^{2+}$  gilt als universeller „second messenger“, der eine Reihe verschiedener zellulärer Prozesse wie Proliferation, Entwicklung, Differenzierung, Apoptose,

Sekretion, Muskelkontraktion und Lernen reguliert (Berridge et al., 2000; Berridge et al., 2003; Carafoli, 2002; Taylor, 1995). Wie kann ein einziges Ion aber Träger solcher komplexen zellulären Prozesse sein?  $\text{Ca}^{2+}$  kann auf viele verschiedene Wege Proteine beeinflussen und damit zelluläre Prozesse vermitteln. Es kann bspw. direkt auf diverse Targetproteine wirken oder durch  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine seine Effekte vermitteln. Das ubiquitäre Vorkommen der Calciumsignale und die Existenz unzähliger Bindeproteine des Ions machen es möglich, dass sich jede Zelle die verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale für spezielle Funktionen zu nutze machen kann. Azinuszellen des Pankreas nutzen Calcium bspw. für die Freisetzung sekretorischer Granula, Neuronen nutzen die Frequenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale hingegen zur Regulation von Lern- und Erinnerungsprozessen (Zonta and Carmignoto, 2002). In Muskelzellen werden durch temporäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nahe der Plasmamembran Kaliumkanäle aktiviert, die zu einer Relaxation des Muskels führen, während  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, die weiter im Inneren der Zelle entstehen, zur Kontraktion der Muskeln führen (Nelson et al., 1995; Porter and Karathanasis, 1998). Dennoch scheint die Vermittlung von Proliferation, Differenzierung und Apoptose durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale eine der wichtigsten Funktionen des Ions überhaupt zu sein. Erhöhungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration werden mit der Progression des Zellzyklus, besonders mit S- und M-Phase Übergängen, in Verbindung gebracht (Berridge, 1994; Kahl and Means, 2003). Obwohl jede Zelle wachsen und sterben muss, sind die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Übertragungswege, die zu diesen zellulären Effekten führen, noch weitgehend ungeklärt. Da  $\text{Ca}^{2+}$  eine regulatorische Rolle als ubiquitärer allosterischer Aktivator oder Inhibitor auf verschiedene intrazelluläre Proteine ausübt, ist dessen Bedeutung für wichtige zelluläre Prozesse und Funktionen wie Wachstum und Zelltod durchaus naheliegend. Einige Proteine binden  $\text{Ca}^{2+}$  und wirken somit als  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer und limitieren somit auch die Diffusion des Ions. Andere wiederum besitzen keine eigene enzymatische Aktivität, können aber durch Bindung des Ions  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Enzyme und Ionenkanäle regulieren. Eines der bestbekannten Beispiele eines solchen Proteins ist Calmodulin (CaM), ein aus 148 Aminosäuren bestehendes hoch konserviertes  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein. Durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung werden hydrophobe Bindungsstellen frei, die eine Interaktion mit

Zielproteinen ermöglichen (Tjandra et al., 1995). CaM reguliert eine Vielzahl intrazellulärer Enzyme wie Phosphodiesterasen, Adenylcyclasen, Ionenkanäle, Proteinkinasen und Proteinphosphatasen (Chen et al., 1999).  $\text{Ca}^{2+}$ / CaM-abhängige Signalwege sind in der Regulation einer großen Vielfalt zellulärer Prozesse wie Sekretion, Transkription und Neurotransmitterfreisetzung involviert. Intrazelluläre CaM Expressionsgrade variieren während des Zellzyklus: in humanen Fibroblasten vermindert sich die CaM- Konzentration kurz nach der mitogenen Stimulation, steigt allerdings wieder auf das drei- bis vierfache mit dem Übergang von  $G_1$  zu S- Phase (Brooks-Frederich et al., 1993). Zellen haben eine Reihe verschiedener Schlüsselproteine entwickelt, die Genexpression und Calcium- abhängige Enzyme regulieren und somit an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt sind.

Weiterhin belegen zahlreiche Studien die Beteiligung  $\text{Ca}^{2+}$ - abhängiger Prozesse bei der Entstehung proliferationsbedingter Erkrankungen (Gown, 1978; Rodriguez-Mora et al., 2005). Eine dieser Erkrankungen ist der Nachstar, der in 25% der Fälle nach einer Kataraktoperation auftritt (Bertelmann and Kojetinsky, 2001). Diese Erkrankung geht mit einer erneuten Trübung der eingesetzten Kunstlinse und damit wiederum mit einer Verschlechterung des Sehvermögens einher. Die Trübung der Linse resultiert aus der verstärkten Proliferation und Migration von Linsenepithelzellen, die nach der Kataraktoperation im hinteren Kapselsack verblieben sind (Apple et al., 1992). Der gezielte Eingriff in die  $\text{Ca}^{2+}$ - Homöostase und damit die Beeinflussung von Zellwachstum, Migration und apoptotischen Prozessen könnte hierbei ein wichtiges Instrument zur Prävention dieser Erkrankung darstellen.

### 1.2.2 Calcium und Zellproliferation

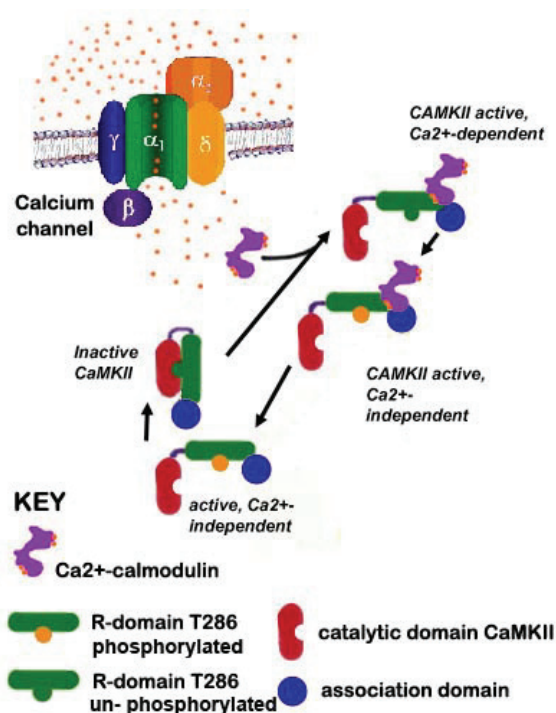
$\text{Ca}^{2+}$ - Ionen stellen wichtige Regulatoren zellulärer Prozesse wie Proliferation, Motilität, Apoptose oder Differenzierung dar (Berridge, 1994). In den vergangenen Jahren rückten Untersuchungen zum Zusammenhang von  $\text{Ca}^{2+}$ - Homöostase und



Zellwachstum immer mehr in den Fokus der Aufmerksamkeit, bis heute bleibt allerdings noch ungeklärt, welche Mechanismen der  $\text{Ca}^{2+}$ - abhängigen Proliferationskontrolle zugrunde liegen.

In allen eukaryotischen Zellen wird extra- sowie intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  für die Regulation von Zellwachstum und Zellteilung genutzt. In einigen Zellen konnte durch die Reduzierung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration bereits eine Verminderung des zellulären Wachstums gezeigt werden (Hickie et al., 1983). Die meisten Zellen reagieren sensitiv auf diese Verminderung besonders an zwei Punkten im Zellzyklus, zeitig in der  $G_1$ - Phase und am Übergang von der  $G_1$  zur S-Phase (Boynton and Whitfield, 1976b). Im Gegensatz zu einer Reduzierung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration kann auch eine Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern wachstumshemmend wirken (Greber and Gerace, 1995; Short et al., 1993). Deshalb wird angenommen, dass normale Zellen beide, extra- und intrazelluläre gut regulierte  $\text{Ca}^{2+}$ - Quellen, für adäquates Wachstum benötigen. Zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentrationen werden von intrazellulären Pools sowie durch den Einstrom des Ions durch membranständige Kanäle gesichert. In zahlreichen Studien wurde diese Homöostase hinsichtlich Zellwachstum und Motilität charakterisiert (Panner and Wurster, 2006; Schreiber, 2005). CaM, welches verschiedene membranständige Kanäle und Calcium- abhängige Kinasen reguliert, stimuliert über die **Calmodulin abhängige Kinase II** (CaMKII) einige Übergangspunkte bei der Zellzyklus- Progression (Kahl and Means, 2003). Die multifunktionale Familie dieser Serin/ Threonin- Proteinkinasen besteht aus CaMKI, CaMKII und CaMKIV, die eine  $\text{Ca}^{2+}$ / CaM- Bindedomäne besitzen (Means, 2000). Nach Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ / CaM kann CaMKII am Threonin 286 autophosphorylieren, was zwei verschiedene Konsequenzen haben kann. Einmal wird das Enzym autonom, d.h. CaM- unabhängig, nach Dissoziation des  $\text{Ca}^{2+}$ - Bindeproteins (Abb.1.4). Außerdem erhöht CaMKII durch diese Autophosphorylierung seine Affinität zu CaM um das 1000- fache (Soderling et al., 2001). Durch eine Inhibierung von CaMKII wurde die Progression des Zellzyklus blockiert, die Zellen verblieben in einem  $G_1$ - Arrest, in dem auch eine reduzierte Expression **Cyclin abhängiger Kinasen** (CdK) nachgewiesen werden konnte (Kahl

and Means, 2003). Neben der G<sub>1</sub>- Progression scheint CaMKII auch den Übergang von G<sub>2</sub> zu M- Phase zu modulieren. HeLa- Zellen hingegen verblieben in der S- Phase, wenn sie mit einem CaMKII- Blocker behandelt wurden (Patel et al., 1999). Obwohl noch nicht für alle Arten des Zellwachstums nachgewiesen, scheint CaMKII ein potentiell  $\text{Ca}^{2+}$ / CaM- abhängiges Enzym zu sein, welches Zellzyklusübergänge regulieren kann.



**Abb.1.4:**  $\text{Ca}^{2+}$ - / CaM- abhängige Proteinkinase- Aktivierung (Weick et al., 2003).  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom durch  $\text{Ca}_v\text{s}$  erhöht  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentrationen und führt zur Aktivierung von CaM, die eine Autophosphorylierung der CaMKII nach sich zieht. Auch nach Dissoziation des Calcium/ CaM- Komplexes kann die Kinase aktiv bleiben.

Verschiedene Studien belegen die Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$ - Signalen an der Aktivierung von CaMKII und anderen Proteinkinasen wie Raf-1, der extrazellulär regulierten Kinase (ERK1/2) und der Jun- N- terminalen Kinase (JNK), die zu gesteigerten Wachstumsraten führten (Illario et al., 2003; Schmitt et al., 2004; Vichi et al., 1999). Dabei konnte durch eine extrazelluläre Stimulation eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration entweder durch vermehrten Einstrom aus dem

Umgebungsmedium oder durch Freisetzung aus den intrazellulären Speichern erreicht werden, die zu einer starken Aktivierung von CaMKII, Raf-1 und ERK1/2 führte. Teilweise konnte in diesen Zellen auch eine Erhöhung des zellulären Wachstums gezeigt werden. Wie nun aber genau zelluläre Prozesse wie Proliferation, Migration oder Apoptose durch  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert werden können, ist weitgehend umstritten. Neben der CaM- oder CaMKII- vermittelten Signalübertragung könnten Rezeptor- Tyrosin- Kinasen (RTK) einen Beitrag zu einer Phospholipase C (PLC)- vermittelten MAPKinase- Kaskade Aktivierung und somit zu Progression im Zellzyklus leisten (Dai et al., 2002). Außerdem ist eine Beteiligung einer Arachidonsäure induzierten p-42 vermittelten Phospholipase A (PLA) – Aktivierung an proliferativen Zelleffekten, die zu einer Überschreitung des Restriktionspunkts in der  $G_0$ - Phase führt, denkbar (Lin et al., 1993; Lin and Hsu, 2000). Obwohl eine Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  an zellulären Prozessen wie Proliferation und Differenzierung unumstritten scheint, konnte bisher der Anteil von  $\text{Ca}_v\text{s}$  bei diesen Vorgängen noch nicht vollständig geklärt werden.

### 1.2.3 Calcium und Apoptose

Apoptose bezeichnet einen der zwei möglichen Arten des Zelltods, der als aktiver und stringent regulierter Prozess abläuft. Im Laufe der Apoptose werden definierte Signaltransduktionswege aktiviert: die Zellbestandteile werden in charakteristischer Weise zerkleinert, in sog. apoptotische Körperchen verpackt und von den Phagozyten des Immunsystems abtransportiert, ohne dass entzündliche Reaktionen entstehen. Das Programm der Apoptose kann grundsätzlich über zwei verschiedene Wege initiiert werden: durch extrazelluläre Liganden bei der extrinsischen Apoptoseinduktion oder aber durch intrinsische Signale, die spezifische mitochondriale Veränderungen hervorrufen. In der darauffolgenden Phase werden Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7) aktiviert, die zum einen proteolytisch wirkende Zielproteine wie DNAsen aktivieren und sich zum anderen aktiv am Abbau von Laminin und Actin beteiligen. Außerdem sind sie in der Lage, die DNA- Reparatur zu unterdrücken. Letztendlich wird die Zelle proteolytisch

zerkleinert, in apoptotische Körperchen verpackt und von Phagozyten aufgenommen.

Der extrinsische Aktivierungsweg wird über Ligandenbindung an Rezeptoren der Tumornekrosefaktoren (TNF- Rezeptoren) vermittelt. Intrazelluläre Domänen dieser Rezeptoren interagieren nach Trimerisierung mit TNF- Rezeptor assoziierten Proteinen (TRADD), welches anschließend an das Fas assoziierte Protein (FADD) bindet. An die DED (death effector domain) von FADD kann die Procaspase 8 binden, sich autokatalytisch aktivieren und somit die Caspase- Kaskade in Gang setzen.

Die Mitochondrien sind zentrale Mediatoren des zweiten wichtigen Apoptose-Signaltransduktionswegs. Sie können auf verschiedenste Weise aktiviert werden und zeigen charakteristische Veränderungen im Verlauf dieser Aktivierung. Von zentraler Bedeutung für die Aktivierung von Mitochondrien sind die Mitglieder der Bcl-2- Familie, die ihrerseits von p53 aktiviert werden können. Man findet sie im Cytoplasma, aber auch assoziiert an Membranen, wie der äußeren Mitochondrienmembran, der äußeren Kernmembran oder der Membran des ER. Die verschiedenen Familienmitglieder bilden vermutlich Homo- und Heterodimere, die je nach Zusammensetzung pro- oder antiapoptotisch wirken: z.B. antiapoptotische Bcl-2/Bcl-2- Homo- und Bcl-2/Bax- Heterodimere sowie proapoptotische Bax/Bax- Homodimere. Bestimmte proapoptotische Signale beeinflussen die Verfügbarkeit und Aktivität der einzelnen Familienmitglieder – und damit die Zusammensetzung der Dimere – und aktivieren so das mitochondriale Zelltodprogramm (Gross et al., 1999a; Gross et al., 1999b; McConkey and Nutt, 2001).

Die Apoptoseinduktion durch  $\text{Ca}^{2+}$  kann möglicherweise durch eine Freisetzung gespeicherten  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER erfolgen, welches zu einem dauerhaft erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Spiegel führt. Dieser führt zur Anreicherung von  $\text{Ca}^{2+}$  in Mitochondrien, welche als  $\text{Ca}^{2+}$ - Puffer des Cytosols dienen. Durch diese plötzliche starke Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration in den Mitochondrien erfolgt eine Öffnung

der Poren der Zellorganelle und es kommt zu einer Cytochrom C Freisetzung ins Cytosol (Armstrong, 2006).

Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann nicht nur durch Freisetzung aus dem ER, sondern auch durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den Mitochondrien und durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Raum erfolgen (Bellomo et al., 1992). Der Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytoplasma wiederum aktiviert  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Enzyme wie Transglutaminasen, die möglicherweise zur Bildung apoptotischer Körperchen beitragen (Mazzantini et al., 2007; Orrenius, 2004). Endonukleasen können ebenfalls durch den Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktiviert werden. Diese Enzyme zerlegen die chromosomale DNA der Zelle durch internukleosomale Spaltung in Fragmente von 180 bp, die ein charakteristisches Merkmal der Apoptose sind (McConkey et al., 1990; McConkey and Nutt, 2001; Wang and Reed, 1998).

### 1.3 Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss spannungsabhängiger Calciumkanäle ( $\text{Ca}_v$ ), besonders der L- und T-Typ Kanäle, auf die Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in humanen Linsenepithelzellen (HLE-B3) zu untersuchen. Durch die Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mittels Blockierung der  $\text{Ca}_v$  durch die Kanalantagonisten Verapamil und Mibefradil sollten mögliche Veränderungen funktioneller Parameter wie Wachstum, Vitalität und Zelltod untersucht werden. In weiteren Analysen sollten Signalwege geprüft werden, die möglicherweise eine wichtige Rolle in dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Signalübertragung dieser zellulären Prozesse spielen könnten.

Das Verständnis der durch dieses Ion vermittelten Funktionen ist eine besondere Herausforderung für Untersuchungen, die auf die Prävention proliferationsbedingter Erkrankungen abzielen. Auch für die Prävention von Nachstar, an dessen Entstehung Migrations- und Proliferationsprozesse der Linsenepithelzellen beteiligt sind, könnte die Beeinflussung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts einen entscheidenden Fortschritt bringen. In der vorliegenden Arbeit wurden vor

dem klinischen Hintergrund neuer Therapieansätze in der Nachstarprävention Linsenepithelzellen (HLE-B3) als Untersuchungsobjekt eingesetzt. An diesen Zellen wurden bereits eine Reihe verschiedener Untersuchungen durchgeführt: Neben der Untersuchung verschiedener Ionentransporter z.B. der Na/K-ATPase wurde auch der Einfluss von Wachstumsfaktoren sowie das Wachstumsverhalten der Zellen unter verschiedenen Bedingungen geprüft. Allerdings beschäftigte sich bisher nur eine Gruppe mit dem Einfluss des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblockers Mibefradil als Therapieansatz in der Nachstarprävention (Nebe et al., 2004). Die Untersuchungen dieser Studie beschränkten sich allerdings auf den Einsatz des Antagonisten im mikromolaren Bereich und zeigten ausschließlich zelluläre Effekte wie bspw. Effekte auf Integrinexpression, Membrandepolarisation und Apoptose. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und einer eventuellen Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  an zellulären Signaltransduktionsprozessen, die Wachstum, Vitalität, Apoptose und Migration regulieren könnten, wurde in dieser Arbeit nicht nachgegangen.

Da bisher keinerlei Daten über  $\text{Ca}_v$  in HLE-B3 Zellen existieren und daher deren möglicher Einfluss auf die Veränderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts, auf das Wachstumsverhalten dieser Zellen sowie deren Beteiligung an mitogenen Signalen bekannt ist, ergaben sich für diese Arbeit somit folgende Zielstellungen:

1. Überprüfung der Existenz verschiedener  $\text{Ca}_v$ s sowie deren Einfluss auf die intrazelluläre Calcium-Homöostase
2. Einfluss verschiedener  $\text{Ca}_v$ -Blocker auf zelluläre Prozesse wie Proliferation, Vitalität und Apoptose
3. Untersuchung möglicher Mechanismen des Calcium-vermittelten Zellwachstums und des Zelltods



aufgenommen und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets in Kulturmedium resuspendiert und auf Zellkulturflaschen aliquotiert.

### 2.1.3 Inkubation der Zellen mit verschiedenen Blockern

Die Behandlung der Zellen erfolgte laut den Angaben in Tab. 2.2 in Kompletmedium 24h bzw. 48h vor der weiteren Behandlung.

Behandlung mit		Konzentration	Dauer
Mibefradil	T- Typ Kanalblocker	$10^{-9} - 10^{-5}$ M	24h/48h
Verapamil	L- Typ Kanalblocker	$10^{-9} - 10^{-5}$ M	24h/48h
Bay K 8644	Ca <sup>2+</sup> -Kanal Aktivator	$10^{-6}$ M	24h/48h
KN- 93	CaMKII- Inhibitor	$10^{-8} - 10^{-5}$ M	24h/48h
GW 5074	ERK1/2- Inhibitor	$10^{-7} - 10^{-5}$ M	24h/48h

**Tab. 2.2: Behandlung von Zellen**

### 2.1.4 Proliferationstest

Zur Untersuchung des Wachstums von Zellen wurden definierte Zellzahlen in Wells einer 6- well- Platte ausgesät und unter Kulturbedingungen 24h anwachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen unterschiedlicher Modulatoren über 24h und 48h inkubiert. Für jeden Ansatz wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Eine unbehandelte Probe lief über die gesamte Versuchsdauer als Proliferationskontrolle mit. Für die Auswertung wurden die Ansätze mit 500 µl Trypsin inkubiert, in 500 µl Kompletmedium aufgenommen und in einer THOMA Zählkammer die Zellzahl pro ml bestimmt. Dazu wurden 20 µl jeder Probe mit äquivalenter Menge an Trypanblau Farblösung gemischt und unter dem Mikroskop die Zahl der Zellen im Großquadrat bestimmt. Mit folgender Formel konnte die Zellzahl pro ml Zellsuspension errechnet werden:



---

**Gesamtzahl der gezählten Zellen (n)**

---

ausgezählte Fläche (mm<sup>2</sup>) x Grundfläche (mm<sup>2</sup>) x Kammerhöhe (mm) x Verdünnung mit Trypanblau

$$\frac{\text{gezählte Zellen (n)}}{80 \text{ mm}^2 \times (1/400 \text{ mm}) \times (1/10 \text{ mm}) \times (1/200)} = n \times 5 \times 10 \times 200 = n \times 10^4$$

### 2.1.5 Soft- Agar- Assay

Soft- Agar	0,6% Agar Nobile in Komplettmedium
MTT (5mg/ ml)	1:10 in Komplettmedium

Um das Wachstum der Zellen unter verschiedensten Bedingungen zu untersuchen, wurden Soft- Agar- Assays durchgeführt, um eine Art Matrix für den Zellverband zu simulieren. Dafür wurde 1 g Agar Noble in 100 ml autoklaviertem Wasser im Substraterhitzer verflüssigt und mit vorgewärmtem Komplettmedium auf 0,6% verdünnt. In jede Kammer einer 24- well- Platte wurden 500 µl des verdünnten Agars luftblasenfrei gefüllt und anschließend bei 4°C polymerisiert. Zellen wurden trypsinisiert (siehe 2.2.1) und die Zellzahl pro Kammer auf 10<sup>4</sup> Zellen pro 200 µl eingestellt, anschließend wurde die Zellsuspension mit 300 µl 0,6%igen Agar vermischt und das Volumen von 500 µl in eine Kammer der 24- well- Platte luftblasenfrei eingefüllt. Anschließend wurde die Platte 5 min bei 4°C und danach 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um dann 500 µl Komplettmedium in jeder Kammer der Platte zufüllen. Die Ansätze wurden mit unterschiedlichen Antagonisten, Wachstumsfaktoren etc. im Brutschrank unter Sterilbedingungen inkubiert und somit konnte das Wachstumsverhalten der Zellen über maximal 10-14 Tage beobachtet werden.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer 90-minütigen MTT- Färbung und anschließender mikroskopischer Visualisierung.

### 2.1.6 MTT Assay

MTT Stammlösung	5 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O gelöst
Dimethylsulfoxid (DMSO) 98%	

Dieser kolorimetrische Test beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) zu blauen Formazankristallen durch zelluläre Dehydrogenasen. Dehydrogenasen sind nur in vitalen Zellen aktiv, daher kann die Umwandlung von MTT als Maß für die Vitalität angesehen werden (Mosmann, 1983).

HLE-B3 wurden in definierten Zellzahlen in 24-well Platten gesät, mit verschiedenen Antagonisten inkubiert und anschließend nach Zugabe von 10 µl MTT Stammlösung (pro well) 60 min im Brutschrank inkubiert. Zum Lösen der Formazankristalle wurden 200 µl DMSO zugegeben und anschließend die Absorption der Proben photometrisch bei 550 nm bestimmt. Die Messung des Hintergrundes erfolgte durch Ermittlung der Absorption einer gleichbehandelten Probe, die keine Zellen enthielt. Die ermittelten Werte wurden bei der statistischen Auswertung berücksichtigt.

### 2.1.7 Vitalitätsbestimmung mittels Acridine Orange

Farbstoff	Inkubation	Filterset	Dicroischer Spiegel
Acridine Orange	1 µl/ml	BA 520	31001 BS
	10 min	Nikon	Chroma/ AHF

Der Farbstoff wurde im Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 420 nm angeregt und die Emission wurde bei 520 nm aufgezeichnet. Die Zellen wurden über eine Zeitspanne von sechs Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der Calciumkanalmodulatoren inkubiert und die Veränderungen der Fluoreszenzsignale aufgezeichnet. Das Signal von Kontrollzellen wurde über die gleiche Zeit aufgenommen, allerdings erfolgte hier lediglich eine Zugabe der Lösungsmittel der verschiedenen Modulatoren. Anschließend wurden die

Veränderungen der Signale der behandelten Zellen gegenüber der Kontrolle aufgetragen und statistisch ausgewertet.

## 2.2 *Proteinchemische Methoden*

### 2.2.1 Zelllyse für nachfolgende Immunpräzipitation

PBS- Puffer (5x)	80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 100 mM NaCl; 0.1% Tween
IP- Waschpuffer	100 mM Tris/HCl pH 8,0; 500 mM LiCl
IP- Lysepuffer	25 mM Tris pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5% Nonidet-P40; 10 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
Proteaseinhibitoren	1 Tbl. in 1,5 ml Wasser lösen, davon 25 µl zu 1ml Puffer

1\*10<sup>7</sup> Zellen wurden mit PBS gewaschen und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml IP- Lysepuffer, dem kurz zuvor Proteaseinhibitoren und ggf. Phosphataseinhibitoren zugesetzt wurden, resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und durch vortexen wieder aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension für 30 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die IP verwendet.

### 2.2.2 Herstellung von Gesamtzelllysaten

PBS- Puffer (5x)	80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 100 mM NaCl; 0.1% Tween
Extraktionspuffer A	10 mM Tris; 140 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% Triton X
Extraktionspuffer B	10 mM Tris; 140 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% Triton X; 1,5 M KCl
Proteaseinhibitoren	1 Tbl. in 1,5 ml Wasser lösen, davon 25 µl zu 1ml Extraktionspuffer

Zellen wurden nach Absaugen des Kulturmediums zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 1 ml PBS abgeschabt, in ein Eppendorfgefäß überführt und 2 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet mit entsprechender Extraktionspuffermenge (Extraktionspuffer A für Membranisolation; Extraktionspuffer B für zytosolische Bestandteile) und Protease- bzw. Phosphataseinhibitoren versetzt, geschüttelt, vier- bis fünfmal in flüssigen Stickstoff schock gefroren und anschließend bei 13000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Um eine photometrische Proteinbestimmung nach Bradford (BRADFORD, 1976) durchführen zu können, mussten zunächst verschiedene Verdünnungen einer BSA- Stammlösung hergestellt werden und eine Eichkurve erstellt werden. In Einwegküvetten wurden 900  $\mu\text{l}$  steriles Wasser, 2  $\mu\text{l}$  Probe und 100  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz pipettiert, anschließend geschüttelt und nach fünf min die Extinktion bei 595 nm ermittelt. Mit Hilfe der Eichkurve konnten aus den Extinktionen die Proteingehalte der Proben ermittelt werden.

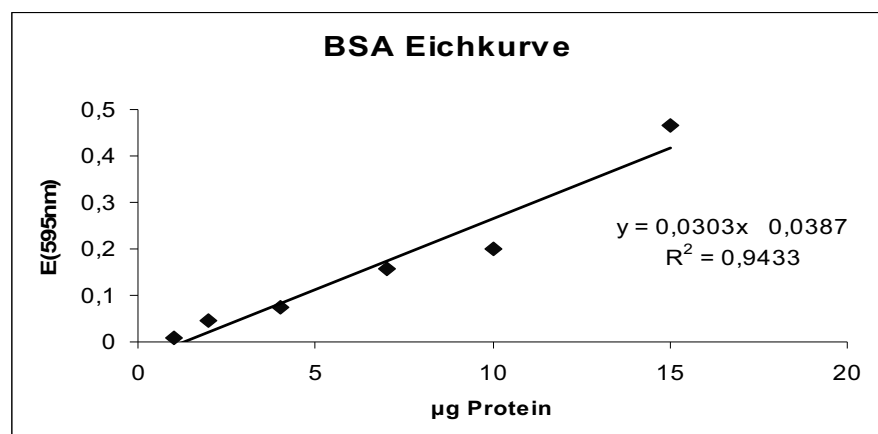


Abb. 2.4: BSA Eichkurve nach BRADFORD

#### 2.2.4 Immunpräzipitation von Proteinen

PBS- Puffer (5x)	80 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; 0,1% Tween
IP- Waschpuffer	100 mM Tris/HCl pH 8,0; 500 mM LiCl
IP- Lysepuffer	25 mM Tris pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5% Nonidet-P40; 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

Zur Anreicherung des zu detektierenden Proteins wurde der Überstand einer Zelllyse mit 50  $\mu\text{l}$  Affinitätsmatrix ( $\alpha$ - rabbit IgG Agarose), die zuvor in 1 ml Lysepuffer gewaschen wurde, für 30 min bei 4°C rotierend präabsorbiert. Anschließend wurden 10  $\mu\text{l}$  des spezifischen Antikörpers dazugegeben und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Zellüberstand abgesaugt und der bead- gekoppelte Antikörper in jeweils 1 ml Lysepuffer und Waschpuffer gewaschen, anschließend in äquivalenter Menge Probenpuffer aufgenommen, 10 min bei 96°C gekocht, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf ein Proteingel aufgetragen. Zur Kontrolle der aufzutragenden Proteinmengen wurde der Proteingehalt mit Hilfe des Zellüberstandes nach BRADFORD bestimmt.

#### 2.2.5 SDS- PAGE

SDS- Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,6; 950mM Glycin; 1,5% SDS
Sammelgelpuffer	625 mM Tris pH 6,8; 200ml Wasser
Trenngelpuffer	2.5 M Tris pH 8,0; 400ml Wasser
Proteinprobenpuffer	1M Tris/HCl pH 6,8; 8,7% Glycerin; 10% SDS; 2 ml 2- $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,1% Bromphenolblau; 1 M DTT; 0,1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

Die SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese bewirkt die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße, wobei der Auftrennungsbereich abhängig von der Acrylamidkonzentration ist. Für die verwendeten Proteingele wurden die Lösungen nach dem folgenden Pipettierschema eingesetzt (siehe Anhang Tabelle

7.3.1). Das vollständig polymerisierte Gel wurde in die Apparatur von WHATMAN eingespannt, die Kammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Geltaschen mit 10 µl des Proteingrößenstandards sowie je 15 µg Probenprotein beladen. Die Fokussierung im Sammelgel erfolgte bei 15 mA, die anschließende Auftrennung der Proteine bei 25 mA.

#### 2.2.6 Transfer der Proteine auf eine PVDF- Membran

Ponceau	2 g Ponceau; 30 g Trichloressigsäure; 1,7 ml SDS (20%)
Transferpuffer WB	50 mM Tris; 40 mM Glycin; 20% Methanol; 1,7 ml SDS (20%)
Coomassie- Färbelösung	70% Wasser, 10% Methanol, 20% Coomassie-Konzentrat
Entfärbelösung	70% Wasser, 10% Methanol, 20% Essigsäure
Fixierlösung	70% Wasser, 20% Ethanol, 10% Glycerin

Um die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine mit spezifischen Antikörpern detektieren zu können, mussten sie auf eine PVDF- Membran überführt werden. Der Transfer erfolgte in einer „semidry“ Blotkammer von WHATMAN nach Herstellerangaben bei 200 mA innerhalb 60 min. Anschließend konnte der Proteintransfer mit Ponceau- Rot überprüft werden (SAMBROOK et al., 1989). Nach Inkubation der Membran mit Ponceau- Rot erschienen rote Banden, wenn der Transfer funktioniert hatte. Durch Waschen mit warmem Wasser konnte der Farbstoff leicht wieder von der Membran entfernt werden. Als Gegenkontrolle konnten die Gele mit Coomassie- Blau gefärbt werden, um sicherzustellen, dass der Proteintransfer erfolgreich war.

#### 2.2.7 Antigen- Detektion

Die PVDF- Membran wurde nach dem Westernblot für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver gelöst in PBS-Tween blockiert. Anschließend

wurde die Membran mit primärem Antikörper über Nacht (üN) bei 4°C rotierend inkubiert, um das Zielmolekül zu binden (siehe Anhang Tabelle 7.3.2). Das Abwaschen des Erstantikörpers erfolgte durch 180-minütiges Waschen mit PBS-Tween. Daran schloss sich eine Inkubation mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 120 min bei Raumtemperatur an (siehe Anhang Tabelle 7.3.2). Der überschüssige Sekundärantikörper wurde anschließend mit PBS-Tween von der Membran gewaschen.

Darauf erfolgte in der Dunkelkammer die Detektion mit Hilfe einer chemolumineszierenden Lösung (ECL-Lösung), die für 5 min auf die Membran gebracht wurde. Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschlagen und durch Auflegen eines Films detektiert.

#### 2.2.8 Ablösen des Detektionsantikörpers von der Membran

Strip- Puffer	62,5 mM Tris/HCl; 2% SDS; 10 mM 2-β-Mercaptoethanol;
---------------	--

Um eine Membran mit mehreren Antikörpern detektieren zu können, musste der zuletzt verwendete Antikörper abgewaschen werden. Dies geschah durch sechzigminütige Inkubation mit Strip- Puffer bei 50°C. Die gestrippte Membran wurde anschließend mit PBS-Tween gewaschen, um das verbliebene SDS vollständig zu entfernen.

### 2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 2.3.1 RNA- Isolierung

Probenpuffer	2,5 M Harnstoff, 0,25 M EDTA, 5% SDS, 25% Saccharose, 0,1% Bromphenolblau; pH 8,0
--------------	---

$5\text{-}8 \cdot 10^5$  Zellen einer Zellkulturflasche wurden in 1 ml Trizol-Reagent aufgenommen und in Rnase- freie Eppendorfgefäße pipettiert. Jeder Ansatz wurde mit 200  $\mu\text{l}$  Chloroform versetzt, 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 12000 rpm bei 4°C für 15 min zentrifugiert. Die entstehende obere Phase wurde in ein neues Rnase- freies Eppendorfgefäß überführt und mit 200  $\mu\text{l}$  Isopropanol versetzt. Die Proben wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 12000 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml 75%igen reinem Ethanol gewaschen, bei 7500 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Pellet in 30  $\mu\text{l}$  sterilem DPEC behandeltem Wasser gelöst und bei 60°C für 10 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration im BioPhotometer. Um die Qualität der RNA zu prüfen, wurden jeweils 1  $\mu\text{g}$  RNA in 5  $\mu\text{l}$  Probenpuffer gelöst, auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und mit 120 V aufgetrennt.

### 2.3.1 cDNA- Synthese

Für die Synthese der cDNA wurden die ermittelten RNA-Konzentrationen auf 5  $\mu\text{g}$  eingestellt mit 1  $\mu\text{l}$  Oligo- dT- Primer versetzt, anschließend wurden die Proben bei 65°C für 5 min und bei 4°C für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 14  $\mu\text{l}$  Mastermix zu jeder Probe wurde die PCR gestartet.

Mastermix:	Puffer 5x	4 $\mu\text{l}$	Cycler Programm:	
	DTT	1 $\mu\text{l}$	50°C	45 min
	dNTPs	2 $\mu\text{l}$	85°C	5 min
	MLV	1 $\mu\text{l}$	37°C	20 min
	RNaseOut	1 $\mu\text{l}$		
	DPEC	5 $\mu\text{l}$		
TE- Puffer		10 mM Tris; 1 mM EDTA; 10 $\mu\text{M}$ RNase A ; pH 7,4		



Die PCR- Reaktion wurde mit 1µl EDTA abgestoppt und die gelöste cDNA in eine neues Eppendorfgefäß überführt, anschließend mit 3 µl 4 M LiCl und 90 µl 96%igen reinem Ethanol versetzt und für 30 min bei –80°C gefroren. Die Proben wurden für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen, um das Pellet anschließend in 500 µl 70%igen reinem Ethanol zu lösen und nochmals bei 13000 rpm zu zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet, in 25 µl TE-Puffer resuspendiert und bei –20°C gefroren. Vor dem Einsetzen der synthetisierten cDNA in einer PCR- Reaktion wurden 5 µg cDNA mit 5 µl Probenpuffer versetzt, auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und mit 150 V aufgetrennt.

### 2.3.3 PCR

Die PCR dient der Quantifizierung von mRNA. In dieser Arbeit wurde sie dazu verwendet, um Ergebnisse der Immunpräzipitationen oder der Westernblots zu verifizieren. Für die PCR Versuchsansätze zur Identifizierung der Expression von bax und bcl-2 wurden 1 µl pro Primer (siehe 7.4.1), 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 2 µl dNTPs, 5 µl Thermopol- Puffer, 1 µl Taq- Polymerase und 5 µg cDNA pipettiert und nach folgendem Protokoll amplifiziert:

95°C	2 min	}	30 Zyklen
94°C	45 s		
53°C	45 s		
72°C	1,5 min		
72°C	7 min		

Die PCR- Produkte wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, bei 120 V aufgetrennt und anschließend auf einem UV- Tisch (BIOMETRA) visualisiert.

Für die PCR Versuchsansätze zur Identifizierung der Expression von Zellzyklus Effektoren wurden 1 µl pro Primer (siehe 7.4.2), 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 2 µl dNTPs, 5 µl Thermopol- Puffer, 0.5 µl Taq- Polymerase und 5 µg cDNA pipettiert und nach folgendem Protokoll amplifiziert:

95°C	5 min	}	30 Zyklen
95°C	30 s		
55°C	30 s		
72°C	30 s		

Die PCR- Produkte wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, bei 120 V aufgetrennt und anschließend auf einem UV- Tisch (BIOMETRA) visualisiert.

#### 2.3.4 Isolation genomischer DNA

DNA- Lysepuffer	10 mM Tris; 100 mM EDTA; 0,5% SDS pH 8,0
-----------------	---

$10^5$  Zellen wurden nach Inkubation mit verschiedenen Modulatoren wie in Abschnitt 2.1.3 trypsiniert, zentrifugiert und das entstandene Pellet in 400 µl DNA-Lysepuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (10mg/ml) wurde die Probe 2h bei 65°C im Thermomixer inkubiert, anschließend wurde der Probe 50 µl RNase A (1 mg/ml) zugesetzt und diese für weitere 2h bei 37°C inkubiert.

Die Probe wurde nun mit einem Phenol: Chlorophorm: Isoamylalkohol Gemisch (25:24:1) versetzt und für 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die resultierende wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit einem Chlorophorm: Isoamylalkohol (24:1) Gemisch versetzt und erneut zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß pipettiert und mit 200 µl Isopropanol versetzt. Nach mehrfachem Umwenden des Gefäßes wurde ein DNA- Präzipitat sichtbar, welches mit Hilfe einer zugeschmolzenen Pipettenspitze entnommen wurde. Die DNA wurde einmal mit 70% und zweimal mit 96% reinem Alkohol gewaschen, zentrifugiert, getrocknet und anschließend in 50 µl TE- Puffer aufgenommen.

Die Bestimmung der DNA- Konzentration erfolgte mit Hilfe des BioPhotometers. 5 µg jeder Probe wurden mit 5 µl Probenpuffer versetzt, auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 50 V aufgetrennt, um DNA- Fragmentierung sichtbar zu machen. Die Visualisierung erfolgte auf einem UV- Tisch. Die DNA- proben konnten bei -20°C für mehrere Monate gelagert werden.

Für die PCR Versuchsansätze zur Identifizierung von Calciumkanälen wurden 1 µl pro Primer (siehe 7.4.3), 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 2 µl dNTPs, 5 µl Thermopol- Puffer, 0.5 µl Taq- Polymerase und 5 µg DNA pipettiert und nach folgendem Protokoll amplifiziert:

94°C	1 min	}	40 Zyklen
60°C	1 min		
72°C	1 min		

Die PCR- Produkte wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, bei 120 V aufgetrennt und anschließend auf einem UV- Tisch (BIOMETRA) visualisiert.

## 2.4 Elektrophysiologische Methoden

### 2.4.1 Patch-Clamp-Technik

PSS	141 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,8 mM CaCl <sub>2</sub> , 1,2 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM Hepes, 10 mM Glucose pH 7,4
Ca-freie PSS	141 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 3 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM Hepes, 10 mM Glucose, 10 mM EDTA pH 7,4
Pipettenlösung A	5 mM NaCl, 120 mM KCl, 5 mM Succinat, 2 mM Pyruvat, 5 mM Oxalacetat, 10 mM Hepes, 10 mM Glucose, 4,2 mM K-EGTA, 1,2 mM MgCl <sub>2</sub> , 1,2 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,3
Pipettenlösung B	128 mM CsCl, 5 mM Succinat, 2 mM Pyruvat, 5 mM Oxalacetat, 10 mM Hepes, 10 mM Glucose, 1,2 mM MgCl <sub>2</sub> , 4,2 mM Cs-EGTA, 1,2 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,3

Die in den 70er Jahren entwickelte und seitdem als Standardmethode der Elektrophysiologie etablierte Technik erlaubt die Ableitung von Strömen einzelner

Zellen. Eine mit Elektrolytlösung gefüllte Elektrode dient hierbei als Messelektrode, mit deren Hilfe der leitende Kontakt zum Zellinneren hergestellt wird. Am Rand der Messkammer befindet sich eine weitere Elektrode, die in die extrazelluläre Lösung eintaucht und somit als Referenzelektrode dient. Durch vorsichtiges Heranführen der Pipette an die Zellmembran wird die Verbindung zwischen Zelle und Elektrode hergestellt, ein leichter Unterdruck führt zur Einstülpung der Membran in die Pipettenöffnung. Es entsteht ein elektrischer Abdichtwiderstand im Gigaohm-Bereich. Durch erneutes Anlegen eines Unterdrucks wird das eingestülpte Membranstück zerrissen und das Cytoplasma ist nun direkt mit der Pipettenlösung verbunden (Ganzzellkonfiguration).

Zur Ableitung verschiedener Ströme wurden unterschiedliche Pipettenlösungen eingesetzt; zur Bestimmung von Kalium- Auswärtsströmen kam eine kaliumreiche interne Lösung zum Einsatz (Pipettenlösung A), während zur Erfassung von Calcium- Einwärtsströmen eine caesiumreiche Lösung (Pipettenlösung B) verwendet wurde. Kaliumkanäle sind für Cäsium und andere große, monovalente Kationen undurchlässig, der Ersatz von KCl durch solche Ionen verhindert somit Kalium- Leckströme und erhöht den Membranwiderstand. Als externe Badlösung wurde in beiden Fällen eine physiologische Salzlösung (PSS) verwendet.

#### 2.4.1.1 Herstellung der Pipetten

Die Patch- Pipetten wurden aus Borosilicatkapillaren mit Innenfilament (Außendurchmesser: 1,5 mm; Wandstärke 0,3 mm; World Precision Instruments, Inc.) mit Hilfe eines Pipettenziehgeräts hergestellt. Der Spitzendurchmesser lag zwischen 1 und 2  $\mu\text{m}$ , so dass nach Befüllen der Pipette mit Elektrolytlösung der Eingangswiderstand zwischen 2 und 6 M $\Omega$  betrug.

#### 2.4.1.2 Aufbau der Messeinrichtung

Ein schwingungsgedämpfter Tisch (World Precision Instruments Inc.), umgeben von einem Faraday- Käfig, bildete die Grundkomponente des Messaufbaus, welche das inverse Mikroskop (NIKON) mit aufgesetzter Versuchskammer und den

Mikromanipulator zur Feinsteuerung der Pipette vor Erschütterung schützte. Als Messverstärker wurde ein konventioneller Patch-Clamp-Verstärker (Axon Instruments Inc.) eingesetzt. Ein mit Software pClamp 5.0 ausgestatteter PC diente zur Steuerung des Verstärkers, zur digitalen Datenregistrierung und zur Aufzeichnung der Messdaten.

#### 2.4.1.3 Verwendete Messprotokolle

Zum Messen der Membranströme wurden zwei verschiedene Spannungssprungprotokolle verwendet. Ein Protokoll (AKT500) bestand aus 14 Spannungssprüngen mit einer Änderung der Testspannung um 10 mV pro Sprung ausgehend von -90 mV. Das Haltepotenzial lag bei -60 mV. Mit diesem Protokoll sollte der Gesamtstrom, resultierend aus der Summe von inaktivierbaren und nicht-inaktivierbaren Strömen, aufgezeichnet werden. Das zweite Protokoll (AKT500N) bestand ebenfalls aus 14 Sprungsequenzen in 10 mV Schritten ausgehend von -90 mV. Das hierbei angelegte Haltepotenzial lag bei -10 mV. Mit Hilfe dieses Protokolls sollten nicht- inaktivierbare Ströme aufgezeichnet werden.

Bei der Auswertung wurden die Stromverläufe des nicht- inaktivierbaren Stroms vom Gesamtstrom abgezogen und die resultierenden inaktivierbaren Ströme konnten mit Hilfe von Clampfit 8.0 analysiert werden. Um einwärts- gerichtete Calciumströme zu messen, wurde als Pipettenlösung eine caesiumreiche Lösung (Pipettenlösung B) verwendet, während zur Bestimmung von Kalium-Auswärtsströmen eine kaliumreiche interne Lösung zum Einsatz (Pipettenlösung A) kam.

#### 2.4.2 Bestimmung der Calciumkonzentrationen mittels Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM

Fura-2 ist der am häufigsten eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff zur Messung der intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$ . Für die Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration in intakten Zellen eignen sich diese

fluoreszierenden Farbstoffe bevorzugt, weil sie sich intrazellulär anreichern. FURA-2, Anfang der 80er Jahre aus BAPTA (1,2-bis-Aminophenoxyteraeessigsäure) entwickelt, ist ein mit hoher Selektivität für Calcium sensibler Fluoreszenzfarbstoff. Daher werden nur geringe Farbstoffkonzentrationen in den Zellen benötigt und dadurch die Calcium-Pufferung gering gehalten. Voran genannte Eigenschaften und der geringe Farbstoffverlust durch Diffusion gestatten mehrstündige Calcium-Messungen.

Fura-2-AM (Fura-2-Acetoxy-Methylester) ist ein weiterentwickelter Fluoreszenzfarbstoff mit zwei wichtigen Eigenschaften. Er ist zum einen in seiner Esterform lipophil, demzufolge membrangängig, und wird durch intrazelluläre Abspaltung des Esterrestes Calcium-sensitiv sowie hydrophil, so dass eine Rückdiffusion erschwert wird und er sich intrazellulär anreichern kann. Zum anderen ist die Fluoreszenzintensität von der ihn umgebenden Calciumkonzentration abhängig. Die Fluoreszenzintensität steigt mit zunehmender Calciumkonzentration bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm an, reduziert sich jedoch bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und umgekehrt (siehe Abb. 2.5). Dies ist darin begründet, dass Calcium-gebundenes Fura-2 bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 340 nm maximal fluoreszierendes Licht abgibt, wohingegen Calcium-freies Fura-2 bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 380 nm maximal fluoreszierenden Licht ausstrahlt. Zwischen diesen Maxima liegt bei 365 nm der isosbestische Punkt, bei dem infolge Anregung mit Licht dieser Wellenlänge sich die Fluoreszenzintensität nicht in Abhängigkeit von der intrazellulären Calciumkonzentration verändert.

#### 2.4.2.1 Beladung der Zellen mit Fura-2 AM

Für die Beladung der HLE-B3 Zellen wurde Fura-2 AM (die Carboxylat-Gruppen des Fura-2 sind mit Acetoxymethyl-Gruppen verestert) verwendet, das aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften Zellmembranen durchdringen kann, wenn es im Außenmedium angeboten wird. Vom aufgenommenen Fura-2 AM wird durch

intrazelluläre Esterasen die AM-Gruppe abgespalten, so dass das jetzt hydrophile Fura-2 die Zelle nicht mehr verlassen kann.

Die einstündige Beladung der Zellen mit  $10^{-5}$  M Fura-2 AM erfolgte in physiologischer Lösung (PSS) unter Sterilbedingungen im Brutschrank bei 37°C. Das für die Inkubation verwendete Fura-2 AM, wurde zuvor in wasserfreiem DMSO gelöst.

Nach Beladung wurden die auf einem Deckglas (Durchmesser 20 mm) kultivierten HLE-B3 Zellen zunächst mit PBS mehrfach gewaschen und das Deckglas anschließend in die Fluoreszenzmesskammer (Delta Dish) überführt.

#### 2.4.2.2 Kalibrierung

Für die Kalibrierung wurde in eine mit EGTA versetzte, Calcium-freie Lösung, Ionomycin ( $10^{-5}$  M) appliziert. Ionomycin zeichnet sich durch die Erhöhung der zellmembranären Calcium-Permeabilität aus, so dass Calcium entlang dem Gradienten leicht nach extrazellulär diffundiert. Unter diesen Bedingungen ist Fura-2 intrazellulär Calcium-frei und  $R_{\min}$  kann ermittelt werden. Im Anschluss wurde Calcium-haltige Badlösung mit ( $10^{-5}$  M) Ionomycin appliziert und  $R_{\max}$  konnte ermittelt werden.

#### 2.4.2.3 Grundlagen der Berechnung der intrazellulären Calciumkonzentration

Die Berechnung der intrazellulären Calciumkonzentration sollte von Störfaktoren wie Farbstoffkonzentration in der Zelle, Ausbleichen durch das anregende Licht sowie den Verlust an Farbstoff durch Exozytose und weiteren äußeren Faktoren weitgehend unabhängig sein. Dazu bildeten Grynkiewicz et al. den Quotienten aus den sich entgegengesetzt verhaltenden Fluoreszenzintensitäten bei den Wellenlängen von 340 und 380 nm. So war es möglich, die Furakonzentration der Zellen mathematisch zu kürzen. Der Quotient 340/380 nm ist proportional zur Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration.

Dadurch konnte die absolute intrazelluläre Calciumkonzentration unabhängig von den oben genannten Faktoren errechnet werden.

$[Ca^{2+}]_i = K_d \times \left( \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \times S_f$	$K_d$ = Dissoziationskonstante von Fura-2 (inverser log des x-Achsenabschnitts)
	$R$ = gemessener Ratiowert der Testsubstanz
	$R_{\min}/R_{\max}$ = Ratiowerte der niedrigsten (0 $\mu\text{mol/L}$ ) bzw. höchsten (39,8 $\mu\text{mol/L}$ ) $Ca^{2+}$ -Konzentration im Kit
	$S_f$ = Gerätekonstante $= \frac{\text{Intensität } F_{380 \text{ nm}} \text{ der } Ca^{2+}\text{-freien Lösung}}{\text{Intensität } F_{380 \text{ nm}} \text{ der } Ca^{2+}\text{-gesättigten Lösung}}$

**Abb.2.6: Berechnung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Grynkiewicz et al. (1985).**

#### 2.4.2.4 Die Mangan-Quench Technik

Die Mangan-Quench Methode basiert auf der Eigenschaft von  $Mn^{2+}$ -Ionen durch  $Ca^{2+}$  Kanäle in Zellen einzudringen und mit höherer Affinität als  $Ca^{2+}$  an Fura-2 zu binden und dessen Fluoreszenz zu unterdrücken. Nach einer Inkubation der Zellen bei 37 °C mit Fura-2 (siehe 2.5.2.1), wurden diese Experimente ebenfalls in PSS durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde bei Anregung mit der isosbestischen Wellenlänge von Fura-2 (365 nm) bestimmt, bei der die Fura-2 Fluoreszenz unabhängig von Änderungen der  $Ca^{2+}$ -Konzentration ist. Durch Zugabe von  $5 \cdot 10^{-5}$  M  $MnCl_2$  in das extrazelluläre Medium wurde das Fura-2 Signal ausgelöscht. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität zeigte somit den  $Mn^{2+}$ -Einstrom in die Zellen an und stellt einen qualitativen Indikator für den  $Ca^{2+}$ -Einstrom dar. Um die maximale Abnahme des Signals zu ermitteln, wurde  $R_{\min}$  mit Hilfe von Ionomycin ermittelt.



## 2.5 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  S.E.M. aus mind. drei Werten angegeben, außer es wird im Text anders ausgewiesen. Die Dosis- Wirkungsbeziehungen wurden mit Hilfe von dem Programm N-FIT durch die Gleichung  $y = y_{\max} * [x^n / (x^n + EC50^n)]$  erstellt.

Das Signifikanzniveau wurde mit Hilfe des Students T- Test bestimmt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner oder gleich 5% ( $p < 0,05$ ) wird von signifikant gesprochen.

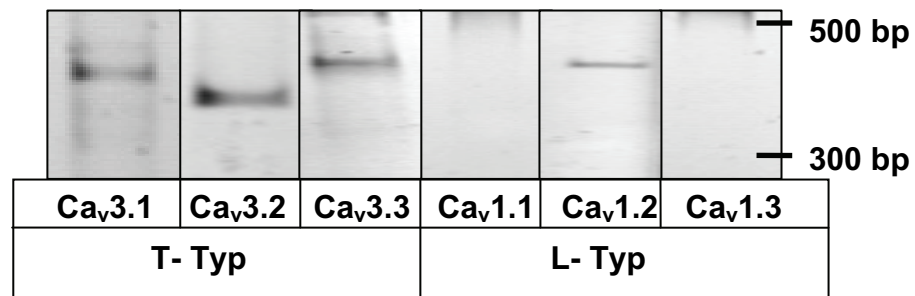
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *Beeinflussung des intrazellulären Calciumhaushaltes durch spannungsabhängige Calciumkanäle in humanen Linsenepithelzellen*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), dessen Homöostase, die an der Regulation beteiligten Kanäle sowie dessen Einfluss auf verschiedene zelluläre Prozesse untersucht werden. Das Hauptaugenmerk hierbei lag auf der Untersuchung spannungsabhängiger Calciumkanäle, insbesondere der L- und T- Typ Calciumkanäle ( $\text{Ca}_v\text{s}$ ), und deren Bedeutung für unterschiedliche zelluläre Funktionen in humanen Linsenepithelzellen.

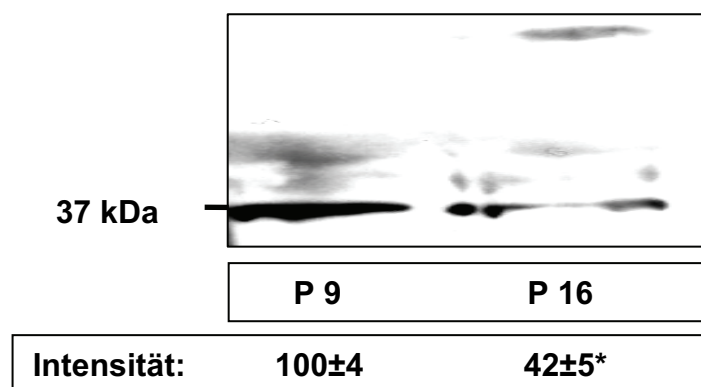
##### 3.1.1 Untersuchungen zur Expression spannungsabhängiger Calciumkanäle in humanen Linsenepithelzellen

Zunächst sollte die Existenz von spannungsabhängigen Calciumkanälen ( $\text{Ca}_v$ ) in HLE-B3 Zellen analysiert werden. Dazu wurde zunächst aus HLE-B3 Zellen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und deren Integrität auf einem 1,5%igem Agarosegel überprüft. Die intakte cDNA wurde anschließend als Template für die folgenden PCR Experimente eingesetzt. Mit Hilfe der Primer-spezifischen PCR Programme wurde die mRNA der jeweiligen Proteine, sofern sie vorhanden waren, amplifiziert. Die PCR Produkte wurden anschließend auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe der BIOMETRA Software detektiert. Das Programm gab die Intensität der Banden in Bandenintensitäten aus, die verglichen und statistisch ausgewertet werden konnten. Wie in Abbildung 3.1 exemplarisch dargestellt, wird in HLE-B3 Zellen neben drei verschiedenen T- Typ  $\text{Ca}_v$  Kanälen ( $\text{Ca}_{v3.1}$ ,  $\text{Ca}_{v3.2}$  und  $\text{Ca}_{v3.3}$ ), nur ein L- Typ  $\text{Ca}_v$  Kanal ( $\text{Ca}_v 1.2$ ) exprimiert. Die Expression jedes  $\text{Ca}_v\text{s}$  wurde in mindestens drei Experimenten untersucht.



**Abb.3.1: PCR Analyse von HLE-B3 Zellen.** Die RNA der Zellen wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, aufgearbeitet und mit den spezifischen Primern für die jeweiligen Kanäle amplifiziert (n=3).

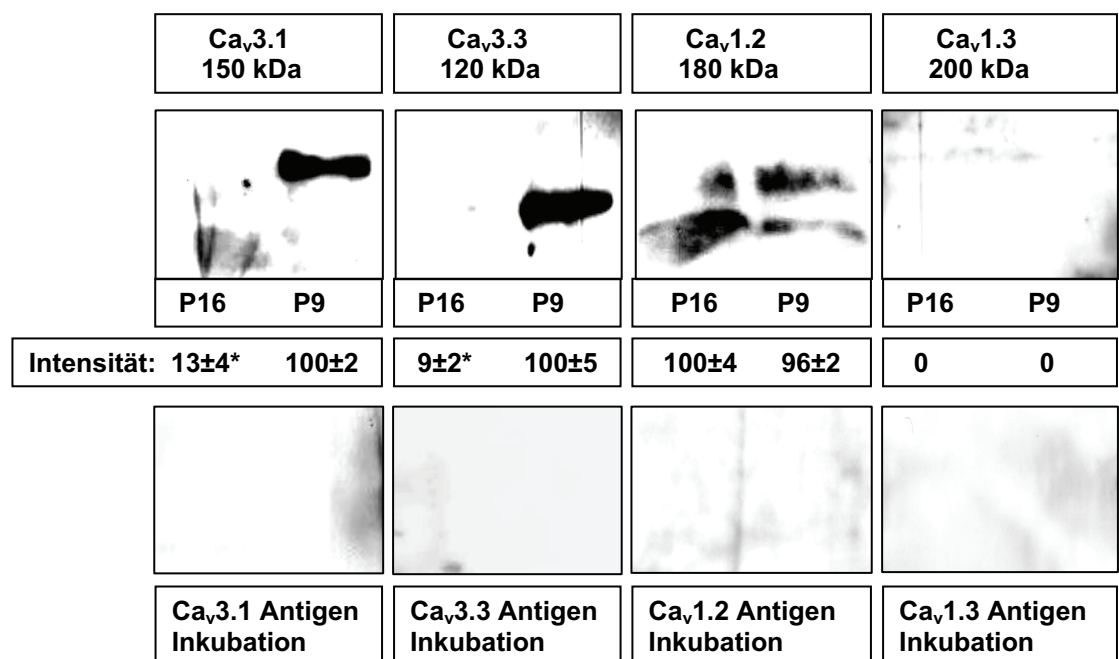
Da die Zellen in der Kultur ab Passage 15 ein stark verlangsamtes Wachstum aufwiesen, sollte die Hypothese untersucht werden, ob sich die Expression der detektierten Ca<sub>v</sub> Kanäle wachstumsabhängig verändert. Deshalb wurden jeweils Zellen in einer stark proliferierenden Passage (P9) und Zellen einer Passage mit stagnierendem Wachstum (P16) zu den folgenden Untersuchungen herangezogen. Zunächst wurden die Zelllysate der verschiedenen Passagen hinsichtlich ihrer Teilungsaktivität mit Hilfe eines Antikörpers gegen das „proliferation associated nuclear antigen (p105)“ untersucht (Abb.3.2). Dieses Protein ist im Chromatin des Zellkerns lokalisiert und seine Expression ist in sich nicht teilenden Zellen deutlich vermindert (Clevenger et al., 1987a).



**Abb.3.2: Immunpräzipitation und anschließende Westernblot Analyse von HLE-B3 Zellen verschiedener Wachstumsstadien.** Die Zellen der Passagen 9 und 16 wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, aufgearbeitet und mit einem primären Antikörper gegen p105 (1:500) über Nacht inkubiert. Daten sind als Mittelwerte ± SD (n=3) angegeben (\*- p<0,05).

Auch in HLE-B3 Zellen konnte nachgewiesen werden, dass p105 in Zellen der 9. Passage deutlich stärker exprimiert wurde als in Zellen der 16. Passage. Abbildung 3.2 zeigt die signifikant unterschiedliche Expression des Proteins p105: die Zellen der Passage 9 zeigten Bandenintensitäten von  $100 \pm 4$  ( $n=3$ ), während diese in Zellen der Passage 16 auf  $42 \pm 5$  ( $n=3$ ;  $p < 0,05$ ) reduziert wurden.

Im weiteren Versuchsverlauf wurden die für die Bestimmung der p105 Aktivität eingesetzten Lysate beider Passagen für die Untersuchungen der Expression der verschiedenen  $\text{Ca}_v$  verwendet. Dafür wurden Westernblot Experimente mit Antikörpern gegen die T- Typ Calciumkanäle  $\text{Ca}_v3.1$  und  $\text{Ca}_v3.3$  sowie gegen die L- Typ Calciumkanäle  $\text{Ca}_v1.2$  und  $\text{Ca}_v1.3$  durchgeführt (Abb.3.3)<sup>1</sup>.



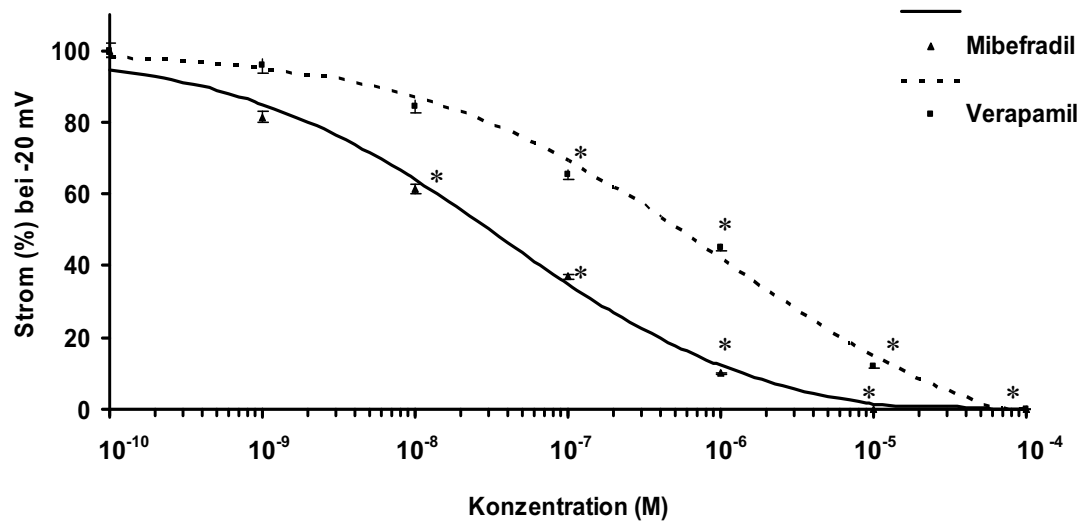
**Abb.3.3: Westernblot Analyse von HLE-B3 Zellen verschiedener Wachstumsstadien. Die Zellen der Passagen 9 und 16 wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, aufgearbeitet und mit einem primären Antikörper gegen  $\text{Ca}_v3.1$  und  $\text{Ca}_v3.3$  sowie  $\text{Ca}_v1.2$  und  $\text{Ca}_v1.3$  (1:500) über Nacht inkubiert. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=5$ ) angegeben (\*-  $p < 0,05$ ).**

<sup>1</sup> Antikörper zu  $\text{Ca}_v3.2$  und  $\text{Ca}_v1.1$  wurden zur Zeit dieser Untersuchungen nicht im Sortiment von ALOMONE Labs geführt.

Die Bandenintensitäten in Abbildung 3.3 zeigen bei den T- Typ Calciumkanälen eine deutliche wachstumsabhängige Expression: während  $\text{Ca}_v3.1$  in Zellen der proliferierenden Passage 9 Bandenintensitäten von  $100 \pm 2$  ( $n=5$ ) zeigen, verminderten sich diese in Zellen der Passage 16 signifikant auf  $13 \pm 4$  ( $n=5$ ;  $p < 0,05$ ); die Intensitäten für  $\text{Ca}_v3.3$  in Passage 9 waren  $100 \pm 5$  ( $n=5$ ), während sich die der Passage 16 auf  $9 \pm 2$  ( $n=5$ ;  $p < 0,05$ ) reduzierten. Im Gegensatz zu den T- Typ Calciumkanälen konnte von den beiden getesteten L- Typ Kanälen nur die Expression von  $\text{Ca}_v1.2$  gezeigt werden. Wie in Abbildung 3.3 deutlich erkennbar, konnte zwischen den beiden getesteten Zellpassagen kein signifikanter Unterschied in der Expression von  $\text{Ca}_v1.2$  gezeigt werden ( $n=5$ ,  $p=0,14$ ).

### 3.1.2 Untersuchungen zur Blockierung des Calciumeinstroms durch Calciumkanal- Antagonisten

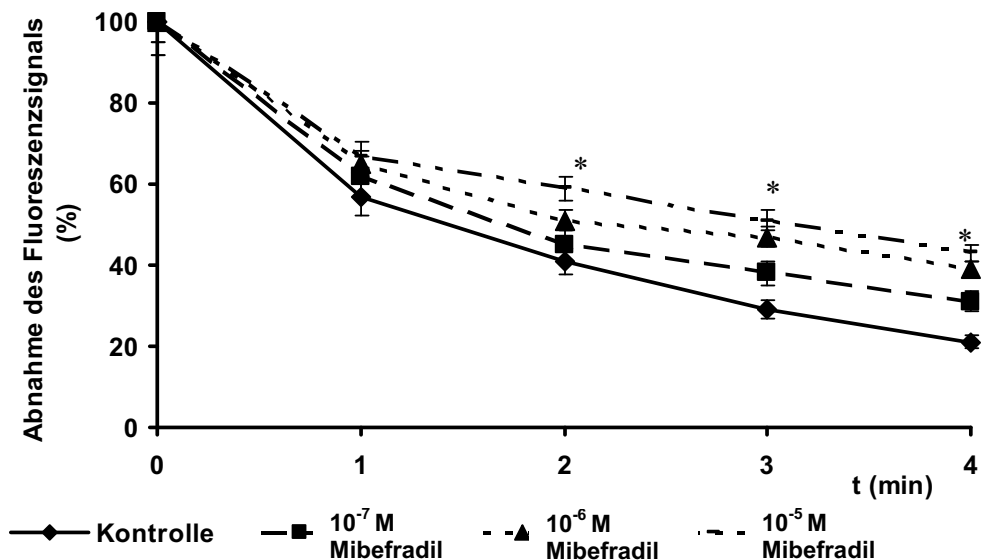
In den folgenden Untersuchungen sollte analysiert werden, ob die  $\text{Ca}^{2+}$ - Kanal- Antagonisten Mibefradil und Verapamil den  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom in die Zelle blockieren. Dazu wurden Patch- Clamp Untersuchungen in der whole- cell Konfiguration unter Verwendung einer cäsiumhaltigen Pipettenlösung durchgeführt. Die Stromantwort auf Spannungsimpulse in 10 mV Schritten von einem Haltepotenzial von -90 mV auf +50 mV wurde aufgezeichnet. Unter Kontrollbedingungen konnte in proliferierenden HLE-B3 Zellen (Passage 8-12) der maximale einwärts gerichteter Calciumstrom von  $120 \pm 30$  pA bei einem Potenzial von -20 mV aufgenommen werden, welcher durch beide Blocker dosisabhängig inhibiert werden konnte. Dabei konnte beobachtet werden dass Mibefradil in der Lage war, den  $\text{Ca}^{2+}$ - Strom in weitaus geringeren Konzentrationen zu inhibieren als der L- Typ Kanalblocker Verapamil. Für beide Antagonisten wurden aus den ermittelten Daten Dosis- Wirkungsbeziehungen erstellt (Abb. 3.4): Mibefradil blockierte den  $\text{Ca}^{2+}$ - Strom mit einem  $\text{IC}_{50}$  von  $4 \cdot 10^{-8} \pm 0,2 \cdot 10^{-8}$  M ( $n=5$ ), während Verapamil 50% des  $\text{Ca}^{2+}$ - Stroms erst bei einer Konzentration von  $9 \cdot 10^{-7} \pm 0,4 \cdot 10^{-7}$  M ( $n=5$ ) inhibieren konnte.



**Abb.3.4:** Einfluss der Antagonisten auf den Calciumeinstrom in HLE-B3 Zellen. Dosis-Wirkungskurven von Mibefradil und Verapamil zeigen die Dosis- abhängige Inhibierung des Einwärtsstroms bei einer Testspannung von -20 mV (n=5). Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (n=5) angegeben (\*-  $p < 0,05$ ).

Um den Einfluss der  $\text{Ca}_v\text{s}$  auf den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle zu untersuchen und die Patch- Clamp Experimente zu verifizieren, wurden Fluoreszenzversuche mit dem Farbstoff Fura-2 durchgeführt und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom mit Hilfe der Mangan- Quench- Technik dargestellt. Die Mangan-Quench Methode basiert auf der Eigenschaft von  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in Zellen einzudringen und mit höherer Affinität als  $\text{Ca}^{2+}$  an Fura-2 zu binden und dessen Fluoreszenz zu unterdrücken (Grynkiewicz et al., 1985). Die Fluoreszenz wurde bei Anregung mit der isosbestischen Wellenlänge von Fura-2 (360 nm) bestimmt, bei der die Fura-2 Fluoreszenz unabhängig von Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration ist. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zeigt somit den  $\text{Mn}^{2+}$ -Einstrom in die Zellen an und stellt einen qualitativen Indikator für den  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom dar. In proliferierenden HLE-B3 Zellen (Passage 8-12) konnte unter Kontrollbedingungen durch Zugabe von Mangan eine rapide Abnahme des Fluoreszenzsignal gezeigt werden (Abb.3.5): eine Minute nach Zugabe von  $10^{-4}$  M Manganchlorid sank das Signal auf  $57 \pm 3\%$  (n=3,  $p < 0,05$ ) des Ausgangswertes; nach vier Minuten erreichte das Signal nur noch Werte von  $21 \pm 4\%$  (n=3,  $p < 0,05$ ) der Ausgangsfluoreszenz. Der durch spannungsabhängige Calciumkanäle vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom sollte nun durch den Einsatz spezifischer L- und T- Typ  $\text{Ca}^{2+}$ - Kanalblocker geprüft

werden. Dazu wurden die Zellen vor Zugabe des Manganchlorids fünf Minuten mit verschiedenen Konzentrationen Mibefradil und Verapamil inkubiert und anschließend die Abnahme des Fluoreszenzsignals bestimmt.



**Abb.3.5:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms mit Hilfe der Mangan- Quench Technik. Durch Inkubation mit Mibefradil wurden T- Typ Kanäle blockiert und somit auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach Zugabe von  $\text{MnCl}_2$  reduziert, was sich durch eine geringerer Abnahme der Fluoreszenzintensität auszeichnete. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3) angegeben (\*- p<0,05).

Mibefradil reduzierte deutlich die Verminderung des Signals (Abb.3.5): nach Applikation von  $10^{-7}$  M Mibefradil wurde die Ausgangsintensität nach einer Minute nur auf  $65 \pm 5\%$  (n=3, p<0,05) und nach vier Minuten nur auf  $39 \pm 3\%$  (n=3, p<0,05) reduziert; durch Applikation von  $10^{-5}$  M Mibefradil wurde die Fluoreszenzintensität nach einer Minute sogar nur auf  $67 \pm 2\%$  (n=3, p<0,05) und nach vier Minuten auf  $50 \pm 4\%$  (n=3, p<0,05) herabgesetzt. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom konnte demzufolge durch den T- Typ Kanalblocker Mibefradil konzentrationsabhängig um bis zu 38% vermindert werden.

Der L- Typ Kanalblocker Verapamil beeinflusste ebenfalls konzentrationsabhängig den  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom, allerdings nicht in dem Maße wie Mibefradil (Abb.3.6): nach Zugabe von  $10^{-7}$  M Verapamil wurde die Fluoreszenzintensität nach einer Minute auf  $60 \pm 3\%$  (n=3, p<0,05) und nach vier

Minuten auf  $41 \pm 4\%$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) reduziert; eine Inkubation mit  $10^{-5}$  M Verapamil verminderte die Ausgangsfluoreszenz allerdings nur auf  $62 \pm 2\%$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) nach einer Minute und auf  $38 \pm 3\%$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) nach vier Minuten.

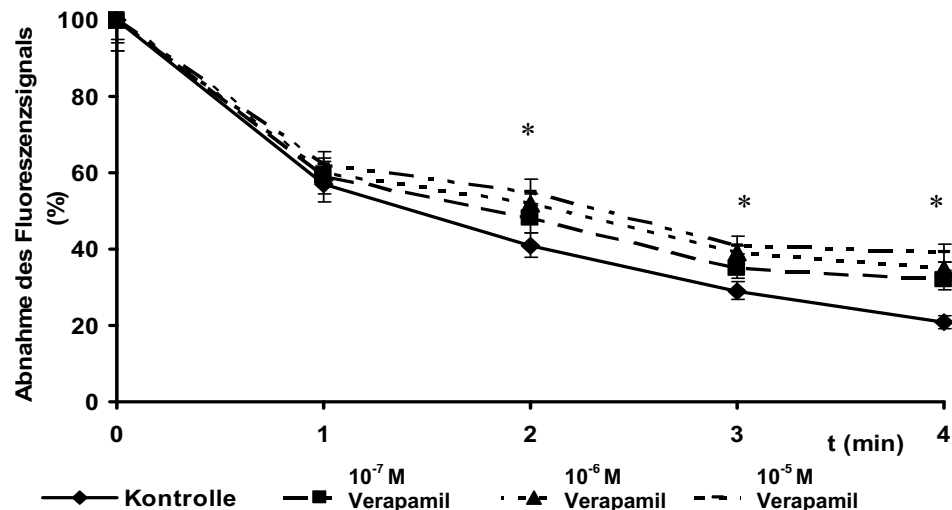


Abb.3.6: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms mit Hilfe der Mangan- Quench Technik. Durch Inkubation mit Verapamil wurden L- Typ Kanäle blockiert und somit auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach Zugabe von  $\text{MnCl}_2$  reduziert, was sich durch eine geringerer Abnahme der Fluoreszenzintensität auszeichnete. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=3$ ) angegeben (\*-  $p<0,05$ ).

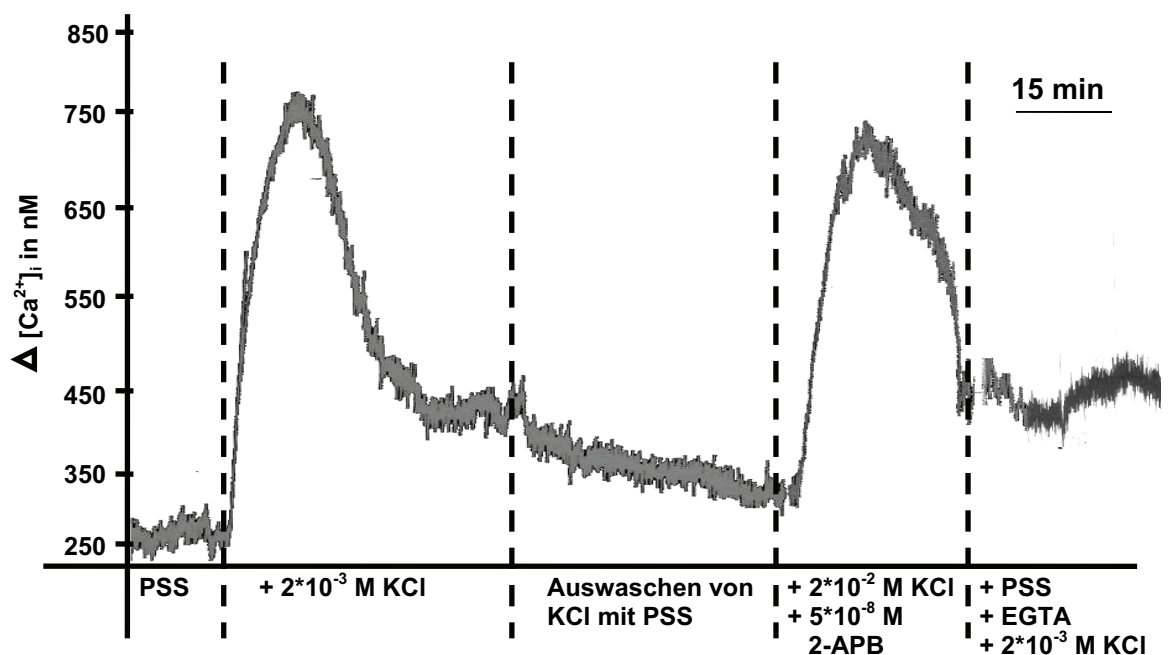
Somit konnte durch eine Inkubation mit Verapamil der  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom um 24% in Bezug auf die Kontrollzellen vermindert werden. Im Gegensatz zu Mibefradil zeigt der L- Typ Kanalblocker Verapamil also eine um ca. 14% geringere Beeinflussung des  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms.

### 3.1.3 Einfluss von Mibefradil und Verapamil auf die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration

Dem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration kann ein  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom aus dem Extrazellulärraum oder eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern, wie dem ER, zugrunde liegen. Ein Einstrom erfolgt durch spannungs- oder ligandenaktivierte,  $\text{Ca}^{2+}$ - permeable Ionenkanäle, die durch die Depolarisation der Zelle bzw. durch die Aktivierung von Rezeptoren geöffnet werden. Um in den Untersuchungen einen  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom durch die Aktivierung von  $\text{Ca}_v$ s in HLE-B3 Zellen zu erreichen, wurden diese kurzzeitig mit

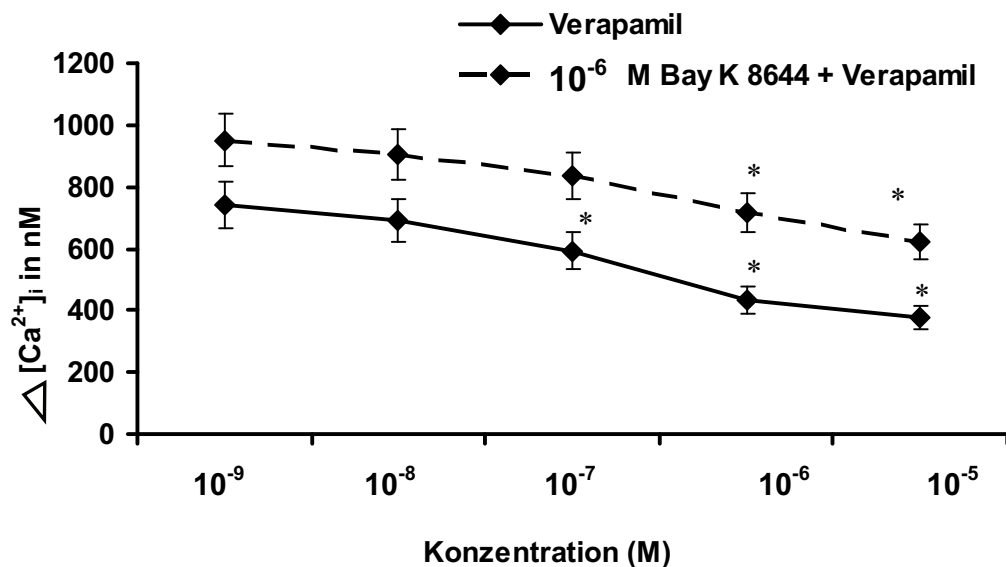


Kaliumchlorid (KCl) umspült, welches durch Depolarisation der Zellmembran  $\text{Ca}_v\text{s}$  aktiviert. Dies führte, wie in Abb.3.7 ersichtlich, zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration: die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration stieg durch Zugabe von  $2 \cdot 10^{-2}$  M KCl von  $2,5 \cdot 10^{-7} \pm 0,5 \cdot 10^{-7}$  M ( $n=6$ ) auf  $7,5 \cdot 10^{-7} \pm 0,5 \cdot 10^{-7}$  M ( $n=6$ ;  $p < 0,05$ ). Um sicherzustellen, dass diese Erhöhung nicht ausschließlich auf die Entleerung intrazellulärer Speicher zurückzuführen ist, wurde den Zellen  $5 \cdot 10^{-8}$  M 2-APB als Inhibitor für „store-operated calcium channels“ (SOCs) appliziert. In Anwesenheit von 2-APB erhöhte sich durch Zugabe von KCl die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf  $7,3 \cdot 10^{-7} \pm 0,5 \cdot 10^{-7}$  M ( $n=3$ ;  $p < 0,05$ ). Die Antwort auf KCl veränderte sich durch Inkubation mit 2-APB im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nicht signifikant ( $n=3$ ;  $p=0,07$ ). Außerdem wurde die Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Zugabe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators EGTA zum Umgebungsmedium, wodurch freies  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden wurde, gemessen. Diese Untersuchungen ergaben, dass die Depletion des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  zu einem nur geringen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Depolarisation durch KCl führte.



**Abb.3.7:** Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration mit dem Farbstoff Fura-2. Ein Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels wurde durch Zugabe von KCl induziert. Bei Blockierung der SOCs konnte keine erhebliche Verminderung der KCl-induzierten Calciumerhöhung beobachtet werden. Durch Zugabe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators EGTA konnte nur eine geringe Antwort auf eine KCl-Gabe aufgezeichnet werden.

Es sollte nun überprüft werden, in welchem Maß die Inhibierung dieser Kanäle Einfluss auf den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Spiegel hat. Dazu wurden die Zellen bei der Fluoreszenzmikroskopie mit verschiedenen Konzentrationen von Mibefradil und Verapamil inkubiert und der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ - Spiegel bei Zugabe von KCl bestimmt. Verapamil reduzierte die KCl- induzierte Veränderung des  $\text{Ca}^{2+}$ - Spiegels konzentrationsabhängig (Abb.3.8): während die Zellen bei Applikation von  $2 \cdot 10^{-2}$  M KCl mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ - Anstieg von  $2,5 \cdot 10^7 \pm 0,5 \cdot 10^7$  M (n=6) auf  $7 \cdot 10^7 \pm 0,5 \cdot 10^7$  M (n=6;  $p < 0,05$ ) reagierten, verminderten  $10^{-5}$  M Verapamil diesen Anstieg auf nur  $4,25 \cdot 10^7 \pm 0,5 \cdot 10^7$  M (n=6;  $p < 0,05$ ).

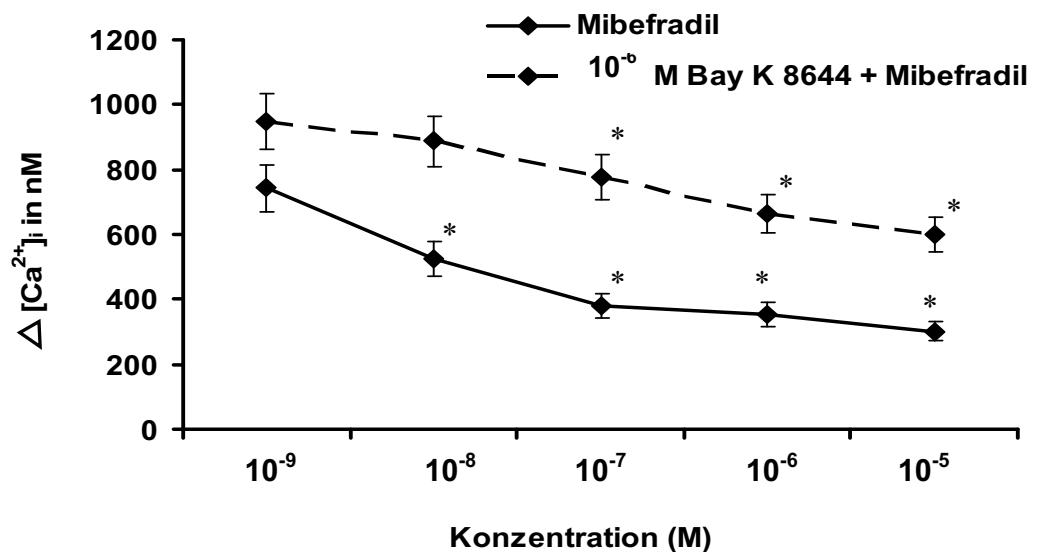


**Abb.3.8:** Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration mit dem Farbstoff Fura-2. Als Kontrollwerte wurden hierbei die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel nach Applikation von KCl eingesetzt. Geringere Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ - Spiegels wurden in Anwesenheit von Verapamil beobachtet. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD (n=6) angegeben (\*-  $p < 0,05$ ).

Der L- Typ Calciumkanal Agonist Bay K 8644 wurde als Aktivator des  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms in die Zelle ebenfalls in diesen Untersuchungen eingesetzt. Die Zellen reagierten nach Zugabe von  $10^{-6}$  M Bay K 8644 sensibler auf eine Depolarisation durch KCl: bei diesen Untersuchungen konnte ein KCl- induzierte Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ - Spiegels auf  $9,85 \cdot 10^7 \pm 0,5 \cdot 10^7$  M (n=6;  $p < 0,05$ ) beobachtet werden. Gleichzeitig konnte durch den L- Typ Agonisten der Effekt der CCA auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration beeinflusst werden: während

durch die Blockierung der  $\text{Ca}_v\text{s}$  mit  $10^{-5}$  M Verapamil die KCl- induzierte Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration sich nur auf  $4,25 \cdot 10^7 \pm 0,5 \cdot 10^7$  M ( $n=6$ ;  $p<0,05$ ) erhöhte, konnten durch Verapamil nach Zugabe von Bay K 8644 Konzentrationen von  $7,9 \cdot 10^7 \pm 0,5 \cdot 10^7$  M ( $n=6$ ;  $p<0,05$ ) verzeichnet werden.

Der T- Typ Kanal Antagonist Mibefradil reduzierte ebenfalls die KCl- induzierte Veränderung des  $\text{Ca}^{2+}$ - Spiegels konzentrationsabhängig (Abb.3.9): während die Zellen bei Applikation von  $2 \cdot 10^{-2}$  M KCl mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ - Anstieg von  $2,5 \cdot 10^7 \pm 0,5 \cdot 10^7$  M ( $n=6$ ) auf  $7,5 \cdot 10^7 \pm 0,5 \cdot 10^7$  M ( $n=6$ ;  $p<0,05$ ) reagierten, verminderte  $10^{-7}$  M Mibefradil diesen Anstieg auf nur  $4 \cdot 10^7 \pm 0,5 \cdot 10^7$  M ( $n=6$ ;  $p<0,05$ ). Die Zellen reagierten erheblich sensibler auf eine Blockierung durch den T- Typ Blocker Mibefradil als auf den L- Typ Antagonisten Verapamil. Der L- Typ Calciumkanal Aktivator Bay K 8644 wurde ebenfalls in diesen Untersuchungen mit dem T- Typ Antagonisten eingesetzt.



**Abb.3.9:** Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration mit dem Farbstoff Fura-2. Als Kontrollwerte wurden hierbei die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel nach Applikation von KCl eingesetzt. Geringere Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ - Spiegels wurden in Anwesenheit von Mibefradil beobachtet. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=6$ ) angegeben (\*-  $p<0,05$ ).

Wie bereits in den Verapamil- behandelten Zellen konnte auch hier durch Inkubation mit dem Agonisten eine geringere Veränderung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Spiegels in Anwesenheit von Mibefradil beobachtet werden:  $10^{-5}$  M Mibefradil reduzierte den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Spiegel auf  $3,5 \cdot 10^{-7} \pm 0,5 \cdot 10^{-7}$  M ( $n=6$ ;  $p<0,05$ ), während die Konzentration durch zusätzliche Gabe von Bay K 8644  $7,2 \cdot 10^{-7} \pm 0,5 \cdot 10^{-7}$  M ( $n=6$ ;  $p<0,05$ ) betrug.

### 3.2 *Einfluss von Calciumkanalblockern auf zelluläre Funktionen*

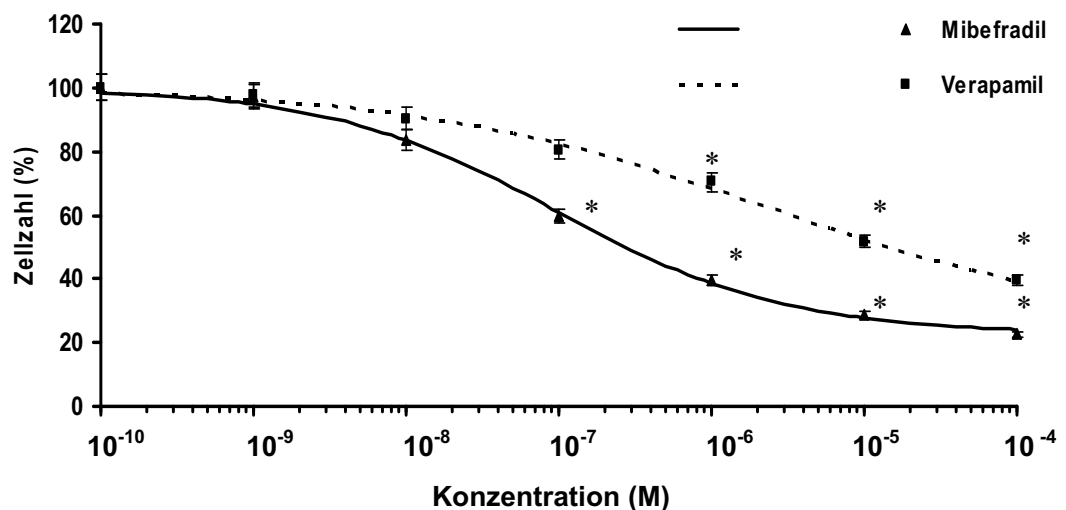
Im vorangegangenen Kapitel wurde die Existenz von  $\text{Ca}_v\text{s}$  und deren Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom- und- Haushalt in humanen Linsenepithelzellen gezeigt. Neben der Reduktion des Einstroms mit Hilfe der für die Kanäle spezifischen Antagonisten, konnte auch der  $\text{Ca}^{2+}$ - Haushalt durch diese beeinflusst werden. Da dem  $\text{Ca}^{2+}$  in einer Vielzahl von Zellen eine entscheidende Funktion in Prozessen wie Zellteilung und Differenzierung zukommt, sollte geklärt werden, ob die Blockierung des  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms ein vermindertes Zellwachstum in humanen Linsenepithelzellen zur Folge hat.

#### 3.2.1 Beeinflussung der Proliferation durch Mibefradil und Verapamil

Um eine Aussage über das Wachstumsverhalten von HLE-B3 Zellen treffen zu können, wurden Proliferationsassays unter Sterilbedingungen in der Zellkultur durchgeführt. Dazu wurde eine definierte Zellzahl eingesetzt und diese in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$ - Kanalblockern über 24 Stunden kultiviert. Durch die Zellzahlbestimmung in den einzelnen Versuchsansätzen konnten die Wachstumsraten unter den verschiedenen Bedingungen analysiert werden.

Zunächst sollten verschiedene Konzentrationen beider Antagonisten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, das Wachstum von HLE-B3 Zellen zu blockieren, getestet werden. Die Zellen ohne Zugabe eines Blockers wurden als Proliferationskontrolle verwendet und alle Ergebnisse wurden auf diese Kontrolle normiert. In den Untersuchungen blockierte der T- Typ Kanalantagonist Mibefradil bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  M das Wachstum

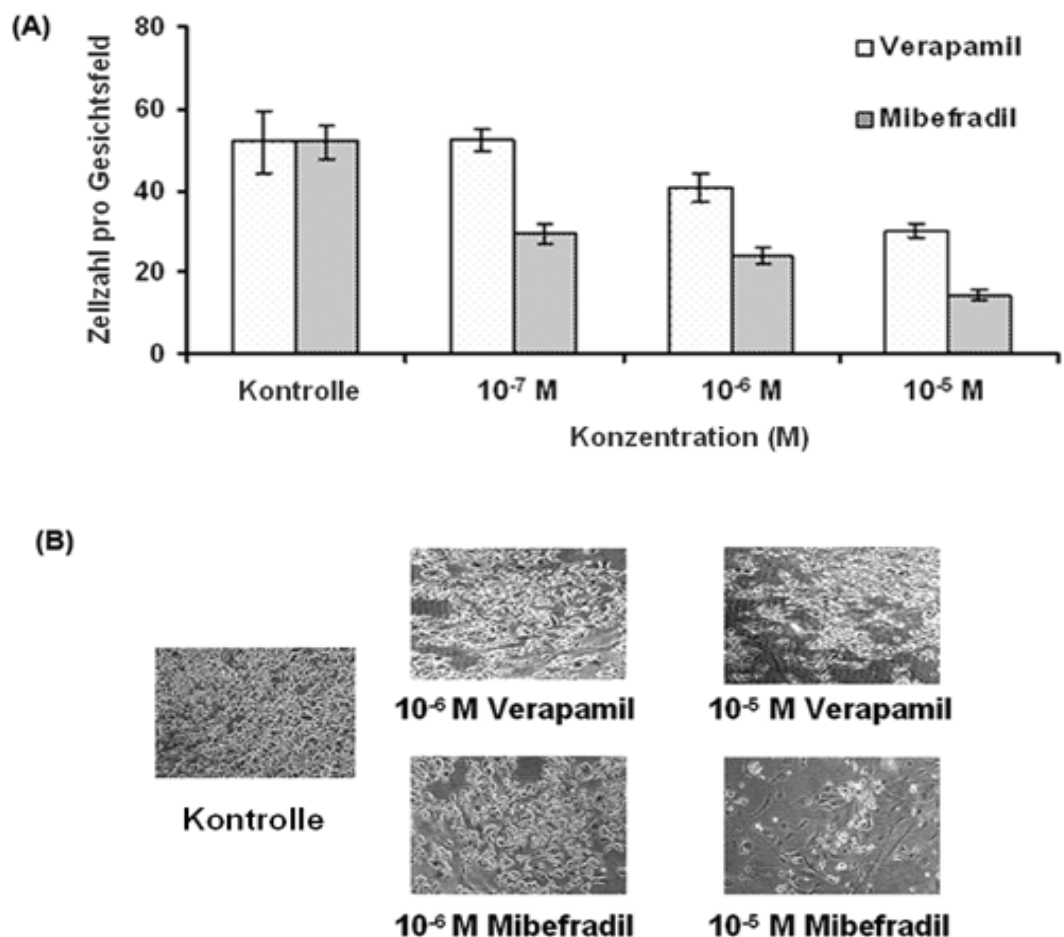
der Zellen um  $38 \pm 4\%$  ( $n=10$ ;  $p<0,05$ ), bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M sogar um  $78 \pm 3\%$  ( $n=10$ ;  $p<0,05$ ) (Abb.3.10). Daraus konnte für Mibefradil ein  $EC_{50}$  – Wert von  $1,0 \pm 0,2 \cdot 10^{-7}$  M ( $n = 10$ ;  $p<0,05$ ) ermittelt werden. Der L- Typ Antagonist Verapamil inhibierte ebenfalls die Proliferation von HLE-B3 Zellen, allerdings in höheren Konzentrationen als Mibefradil. Verapamil inhibierte das Zellwachstum bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  M um  $18 \pm 2\%$  ( $n=10$ ;  $p<0,05$ ), bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M um  $58 \pm 4\%$  ( $n=10$ ;  $p<0,05$ ) (Abb.3.10). Daraus ergab sich für Verapamil ein  $EC_{50}$  – Wert von  $2,7 \pm 0,7 \cdot 10^{-6}$  M ( $n = 10$ ;  $p<0,05$ ) (Abb.3.8). Zusammenfassend kann folglich festgestellt werden, dass sowohl Mibefradil als auch Verapamil die Proliferation von HLE-B3 Zellen konzentrationsabhängig inhibieren können. Wobei allerdings der Einfluss des T-Typ Kanalblockers Mibefradil in den getesteten Konzentrationsbereichen deutlich stärker ist als der des L- Typ Kanalblockers Verapamil.



**Abb.3.10: Wachstumsrate von HLE-B3 Zellen unter verschiedenen Bedingungen. Die Zellzahl in den einzelnen Versuchsansätzen wurde nach 24-stündiger Inkubation mit der jeweiligen Blockerkonzentrationen bestimmt. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. ( $n=10$ ) angegeben (\*-  $p<0,05$ ).**

Verifiziert wurden diese Untersuchungen durch Soft- Agar- Assays, die das Wachstum der Zellen in einem Gewebeverband simulieren. Mit Hilfe dieser Versuche konnte das Wachstum der Zellen über zwei Wochen beobachtet werden. Abb.3.11 zeigt die Veränderung der Zellzahl pro Gesichtsfeld (A) und digitale Aufnahmen (B) eines solchen Assays mit und ohne Applikation von

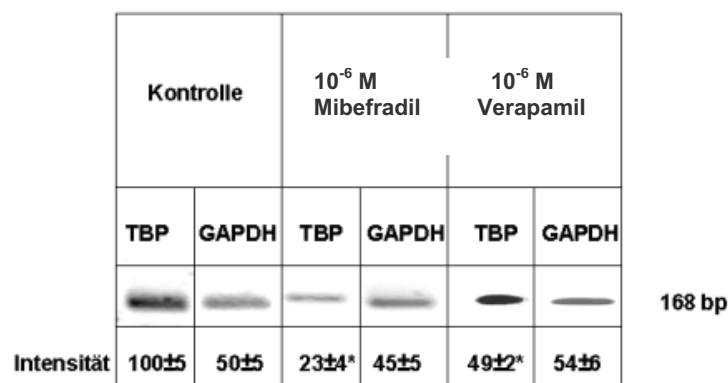
Mibefradil und Verapamil. Dabei ist deutlich erkennbar, dass der T- Typ-Kanalblocker das Wachstum der HLE-B3 Zellen in den angegebenen Konzentrationen deutlicher hemmt als der L- Typ Antagonist Verapamil. Bei unbehandelten Zellen konnten pro Gesichtsfeld  $52 \pm 4$  ( $n=5$ ) Zellen mit MTT sichtbar gemacht werden, während nach einer Behandlung mit  $10^{-6}$  M Mibefradil nur noch  $21 \pm 6$  ( $n=5$ ;  $p<0,05$ ) Zellen und nach Applikation von  $10^{-5}$  M Mibefradil sogar nur  $16 \pm 5$  ( $n=5$ ;  $p<0,05$ ) Zellen pro Gesichtsfeld mit MTT sichtbar gemacht werden konnten.  $10^{-6}$  M Verapamil reduzierten die Zellzahl pro Gesichtsfeld von  $52 \pm 4$  ( $n=5$ ) auf  $42 \pm 3$  ( $n=5$ ;  $p<0,05$ ),  $10^{-5}$  M Verapamil auf  $37 \pm 5$  ( $n=5$ ;  $p<0,05$ ).



**Abb.3.11: Veränderung der Zellzahl pro Gesichtsfeld (A) und digitale Aufnahmen (B) von HLE-B3 Zellen in einem Soft- Agar- Assay. Das Wachstumsverhalten der Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Zugabe von Mibefradil und Verapamil wurde über 2 Wochen beobachtet.**

Da der  $\text{Ca}^{2+}$ - Kanal- Agonist Bay K 8644 in den Untersuchungen zur intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration zu einem starken Anstieg dieser führte, sollte das Wachstumsverhalten der Zellen unter Einfluss dieses Agonisten ebenfalls untersucht werden. Durch die Inkubation der Zellen mit  $10^{-6}$  M Bay K 8644 konnte eine Erhöhung des zellulären Wachstums um  $32 \pm 6\%$  ( $n=6$ ;  $p<0,05$ ) verzeichnet werden. Während Mibefradil allein in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M das Zellwachstum um  $59 \pm 4\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ) verminderte, wurde durch zusätzliche Inkubation mit  $10^{-6}$  M Bay K 8644 die Proliferation nur um  $22 \pm 6\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ) reduziert. Der Effekt von Bay K 8644 war in den Untersuchungen mit Verapamil ausgeprägter als in den Versuchen mit Mibefradil: bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M Verapamil allein wurde das Wachstum um  $25 \pm 2\%$  ( $n=10$ ;  $p<0,05$ ) reduziert, durch zusätzliche Inkubation mit  $10^{-6}$  M Bay K 8644 wurde die Proliferation nur um  $20 \pm 4\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ) reduziert.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde die Expression des TATA- Box Bindeproteins, eines Markers für zelluläres Wachstum, vergleichend zwischen Kontrollzellen und behandelten Zellen überprüft. Dazu wurde zunächst aus proliferierenden HLE-B3 Zellen (Passage 8-12) RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der Primer- spezifischen PCR Programme wurden die mRNA der jeweiligen Proteine, sofern sie vorhanden waren, amplifiziert.



**Abb.3.12:** Expression des TATA- Box Bindeproteins (TBP) in HLE-B3 Zellen in der Kontrolle und in Anwesenheit von Mibefradil oder Verapamil behandelten Zellen. Glycerinaldehydphosphat- Dehydrogenase (GAPDH) dient als Ladekontrolle. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=3$ ) angegeben (\*-  $p<0,05$ ).

Abb. 3.12 zeigt eine Abnahme der Expression von TBP bei einer 24- stündigen Inkubation mit Mibefradil und Verapamil im Gegensatz zu den Kontrollzellen. Durch Inkubation mit  $10^{-6}$  M Mibefradil wurden die Bandenintensitäten des Proteins von  $100 \pm 5$  auf  $23 \pm 4$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) reduziert. Obwohl  $10^{-6}$  M Verapamil ebenfalls zu einer signifikant verminderten Expression des Proteins von  $100 \pm 5$  auf  $49 \pm 2$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) führte, konnte festgestellt werden, dass der T- Typ Calciumkanalblocker Mibefradil die Expression von TBP stärker reduziert als Verapamil.

### 3.2.2 Mibefradil und Verapamil beeinflussen die Vitalität von humanen Linsenepithelzellen

Da Mibefradil und Verapamil die Proliferation von humanen Linsenepithelzellen stark beeinträchtigten, wurden Untersuchungen zur Vitalität der Zellen mittels MTT- Test durchgeführt. Dieser kolorimetrische Test beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliums Salzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) zu blauen Formazankristallen durch zelluläre Dehydrogenasen. Dehydrogenasen sind nur in vitalen Zellen aktiv, daher kann die Umwandlung von MTT als Maß für die Vitalität angesehen werden (Mosmann, 1983). Diese Versuche wurden ebenfalls in der Zellkultur durchgeführt, die Inkubation der Zellen mit den Kanalantagonisten erfolgte in den gleichen Konzentrationsbereichen wie die Proliferationsuntersuchungen. Die Zellen ohne Zugabe eines Blockers wurden als Kontrolle verwendet und alle Ergebnisse wurden auf diese normiert. In den Untersuchungen konnte eine Inhibierung der Zellvitalität um  $24 \pm 6\%$  ( $n=5$ ;  $p<0,05$ ) durch  $10^{-7}$  M des T- Typ Kanalantagonisten Mibefradil ( $n=5$ ;  $p<0,05$ ) erreicht werden (Abb.3.13). Verapamil hingegen konnte in diesen Konzentrationsbereichen die Vitalität um nur  $19 \pm 3\%$  ( $n=5$ ;  $p<0,05$ ) reduzieren (Abb.3.14). Auch hier konnte durch eine Co- Inkubation mit dem L- Typ Agonisten Bay K 8644 eine Reduzierung des Effekts beider Blocker beobachtet werden. Während Mibefradil bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  M  $26 \pm 4\%$  ( $n=5$ ;  $p<0,05$ ) der Vitalität inhibierte, verminderte sich bei dieser Konzentration die Vitalität der Zellen bei einer Co-Inkubation mit  $10^{-6}$  M Bay K 8644 um nur  $17 \pm 4\%$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ). Auch in hohen Konzentrationsbereichen wurde der Effekt von Mibefradil durch den Agonisten reduziert: während Mibefradil die Vitalität bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  M



um  $48 \pm 3\%$  ( $n=5$ ;  $p<0,05$ ) verminderte, wurde bei dieser Konzentration in Gegenwart von  $10^{-6}$  M Bay K 8644 die Vitalität der Zellen nur um  $26 \pm 4\%$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) reduziert.

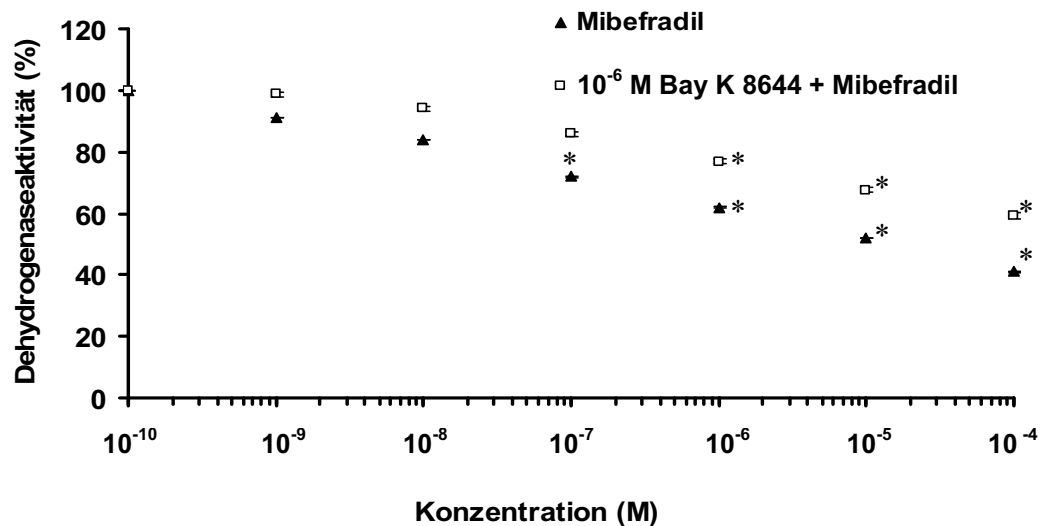


Abb.3.13: Konzentrationsabhängige Reduzierung der Vitalität von HLE-B3 Zellen durch Mibefradil. Der Calciumkanal-Agonist Bay K 8644 reduzierte den Effekt des T-Typ Antagonisten Mibefradil. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. ( $n=5$ ) angegeben (\*-  $p<0,05$ )

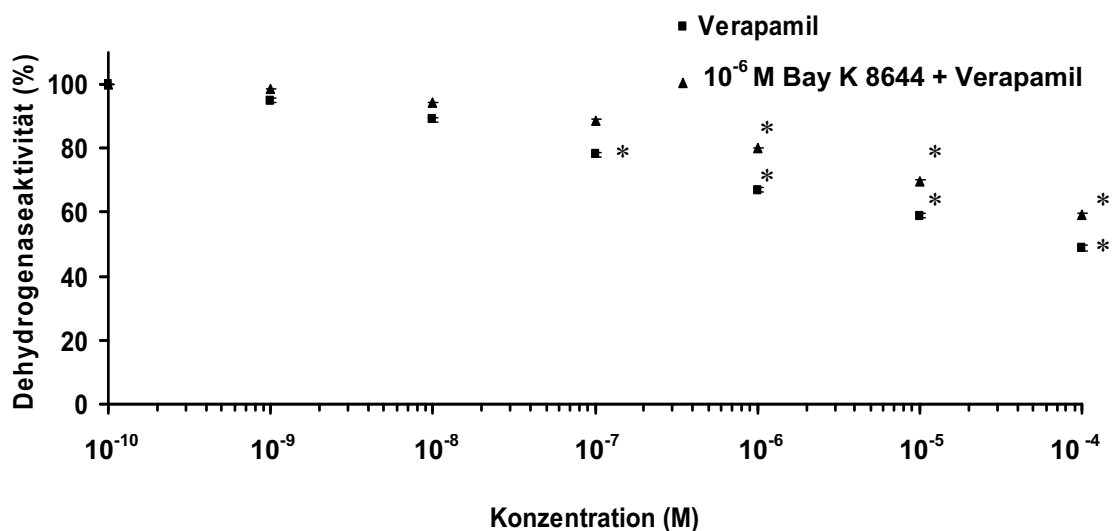


Abb.3.14: Konzentrationsabhängige Reduzierung der Vitalität von HLE-B3 Zellen durch Verapamil. Der Calciumkanal-Agonist Bay K 8644 reduzierte den Effekt des L-Typ Antagonisten Verapamil. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. ( $n=5$ ) angegeben (\*-  $p<0,05$ ).

Der L- Typ Kanalantagonist Verapamil reduzierte die Vitalität der Zellen bei einer Konzentration von  $10^7$  M um  $19\pm3\%$  ( $n=5$ ;  $p<0,05$ ), bei einer Konzentration von  $10^4$  M um  $42\pm6\%$  ( $n=5$ ;  $p<0,05$ ) (Abb.3.14). Der L- Typ Kanalagonist Bay K 8644 reduzierte auch bei diesen Experimenten den Effekt der Blocker. Bei einer Co- Inkubation mit  $10^6$  M Bay K 8644 nahm die Vitalität der Zellen bei einer Verapamil Konzentration von  $10^7$  M nur um  $8\pm3\%$ , bei einer Konzentration von  $10^5$  M Verapamil nur um  $31\pm5\%$  ( $n=5$ ;  $p<0,05$ ) und bei einer Konzentration von  $10^4$  M Verapamil um  $38\pm4\%$  ( $n=5$ ;  $p<0,05$ ) ab (Abb.3.14).

Verifiziert wurden diese Ergebnisse durch fluoreszenzmikroskopische Experimente mit Acridine Orange, einem Farbstoff, der in vitalen Zellen bei einer Wellenlänge von 525 nm emittiert. Bei diesen Versuchen wurden die Fluoreszenzsignale bei 525 nm aufgezeichnet und die Abnahme der Signale nach Applikation der verschiedenen Kanalblocker gegen die Kontrolle aufgetragen. Hierbei sollte untersucht werden, wie viel Zeit zum Erreichen der Effekte der Kanalblocker notwendig ist. Die ersten signifikanten Effekte traten nach einer Inkubationsperiode von sechs Stunden auf. Wie in Abbildung 3.15 (A) dargestellt reduzierte  $10^6$  M Mibefradil das Signal um  $39\pm6\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ), während  $10^6$  M Verapamil (Abb.3.15 B) das Signal nur um  $35\pm3\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ) verringert. Auch hier konnten durch den Einsatz des L- Typ- Kanal Antagonisten die Effekte der Kanalblocker verringert werden: bei einer Konzentration von  $10^6$  M Mibefradil wurde das Signal nur um  $19\pm5\%$  ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ) verringert;  $10^6$  M Verapamil reduzierten das Signal nur um  $16\pm4\%$  ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen des MTT- Assays.

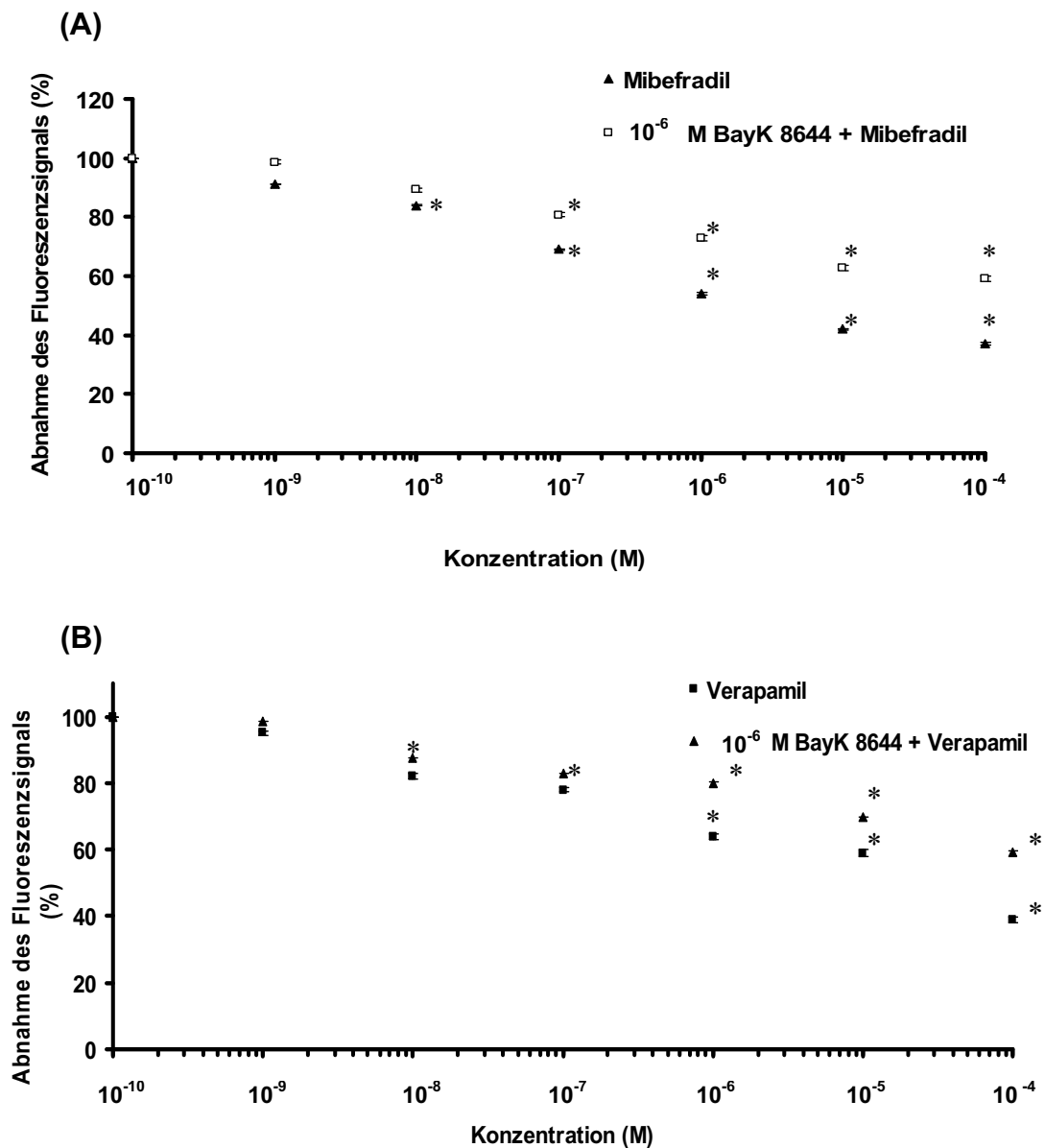
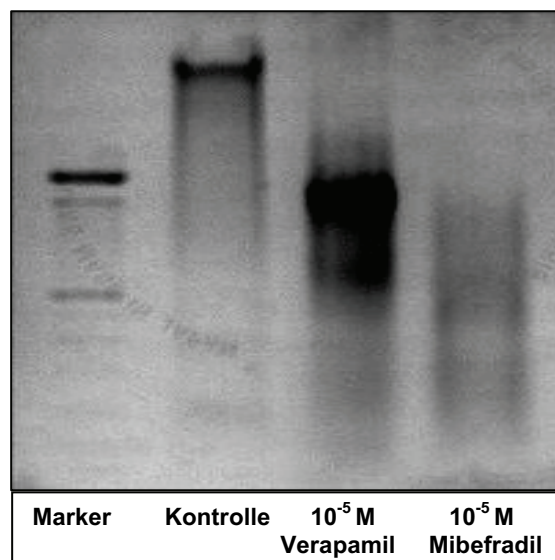


Abb.3.15: Konzentrationsabhängige Abnahme des Fluoreszenzsignals von Acridine Orange in HLE-B3 Zellen durch (A) Mibefradil und (B) Verapamil. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (n=4) angegeben (\*-  $p < 0,05$ ).

### 3.2.3 Induktion von Apoptose durch die Calciumkanal- Antagonisten Mibefradil und Verapamil

Da in Zellkultur- Experimenten beobachtet werden konnte, dass unter Einfluss der Kanalblocker die Zellzahl stark reduziert wurde, sollten geklärt werden, ob dieses auf eine Induzierung apoptotischer Vorgänge zurückzuführen ist. Apoptose oder auch programmierter Zelltod ist ein

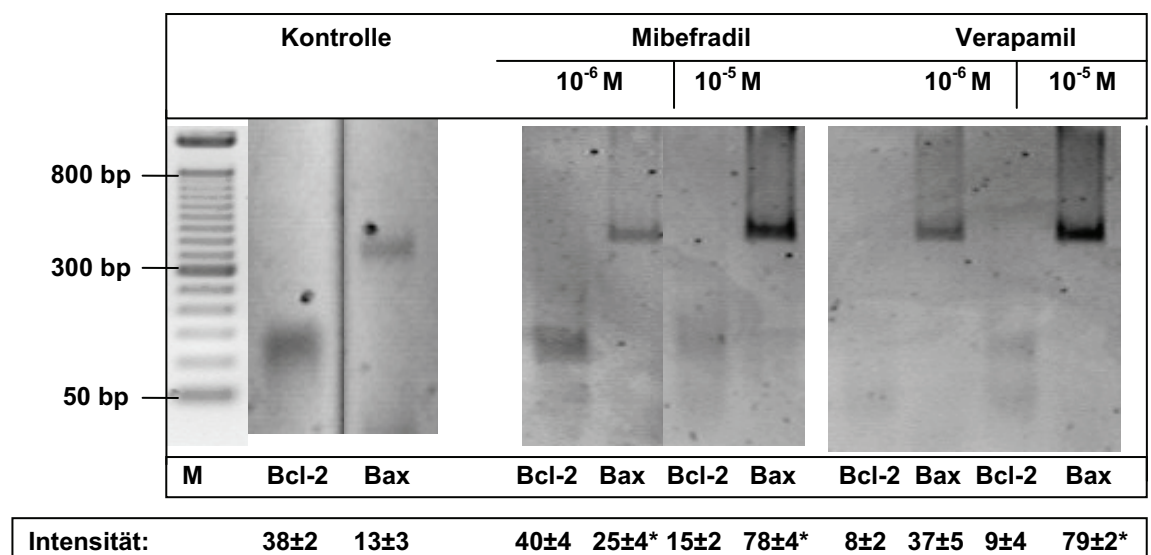
essentieller Prozess, der die Integrität genomischer DNA der Zelle im Laufe der Entwicklung vielzelliger Organismen und in der Homöostase adulter Organismen sicherstellt. Im Laufe des programmierten Zelltods schneiden DNasen die Kern-DNA in den Linkerregionen zwischen den Histonen, wodurch DNA-Fragmente von  $n \cdot 180\text{bp}$  entstehen. Diese können durch eine Gelelektrophorese nach Färbung mit Ethidiumbromid als Leitermuster nachgewiesen werden. Für diese Versuche wurden HLE-B3 Zellen mit Mibefradil und Verapamil über 24h und 48h inkubiert, anschließend genomische DNA isoliert, in einem 1,5%igen Agarosel aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Erst durch Inkubation der Zellen mit  $10^{-5}\text{ M}$  Mibefradil oder Verapamil über 48h konnte eine DNA- Fragmentierung nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 3.16 dargestellt, ist eine deutliche Fragmentierung der DNA nach Zugabe von Mibefradil und Verapamil nachweisbar.



**Abb.3.16: DNA- Fragmentierung in HLE-B3 Zellen nach Zugabe der T- und L- Typ Kanalantagonisten Mibefradil und Verapamil.**

Die Regulation apoptotischer Vorgänge ist ebenso wichtig wie die Kontrolle des Zellzyklus. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Gene gefunden, die mit Apoptose verlinkt sind. Die bcl-2 Familie kann den programmierten Zelltod entweder positiv oder negativ regulieren. Bcl-2 und andere Mitglieder dieser Familie wirken anti- apoptotisch, während Bax (Bcl-2 associated X protein) einen potenten Mediator für den programmierten Zelltod

darstellt (Agarwal et al., 1998). In diesem Zusammenhang wurde die Expression beider Gene in behandelten und unbehandelten Zellen untersucht. Abbildung 3.17 zeigt den konzentrationsabhängigen Einfluss der beiden Kanalblocker auf die Expression von Bcl-2 und Bax: unter Kontrollbedingungen wurden Bandenintensitätswerte von  $38 \pm 2$  ( $n=5$ ) für Bcl-2 und  $13 \pm 3$  ( $n=5$ ) für Bax detektiert; diese veränderten sich durch Inkubation mit Mibefradil konzentrationsabhängig zugunsten einer gesteigerten Bax- Expression. Während sich bei einer Applikation von  $10^{-6}$  M Mibefradil ausschließlich die Intensitäten für die Bax- Expression signifikant auf  $25 \pm 4$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) erhöhten, konnten für die Bandenintensitäten für Bcl-2 keine Änderung ( $40 \pm 4$ ;  $n=5$ ,  $p=0,45$ ) verzeichnet werden. Bei einer Inkubation mit  $10^{-5}$  M Mibefradil veränderten sich die Werte der Bandenintensitäten sowohl für Bax mit einer Erhöhung auf  $78 \pm 4$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) als auch die für Bcl-2 mit einer Reduktion auf  $15 \pm 2$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ). Der L- Typ Blocker Verapamil führte zu ähnlichen Veränderungen in der Expression beider Gene: durch  $10^{-6}$  M Verapamil reduzierten sich die Intensitäten für Bcl-2 auf  $8 \pm 2$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ), durch  $10^{-5}$  M Verapamil auf  $9 \pm 4$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ). Die Werte der Bandenintensitäten für Bax wurden durch  $10^{-6}$  M Verapamil auf  $37 \pm 5$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) und durch  $10^{-5}$  M Verapamil auf  $79 \pm 2$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) erhöht.



**Abb.3.17:** PCR- Produkte von Bcl-2 (127 bp) und Bax (487 bp) in HLE-B3 Zellen mit und ohne Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Mibefradil und Verapamil. Bandenintensitäten wurden durch Densitometrie- Bestimmung mit Hilfe der Biometra Software ermittelt. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=5$ ) angegeben (\*-  $p<0,05$ ).

Die intrazelluläre Bax/ Bcl-2 Ratio kann die Fähigkeit der Zelle beeinflussen, auf apoptotische Stimuli zu reagieren. Je stärker sich diese zugunsten von Bcl-2 verändert, desto besser ist die Zelle befähigt, apoptotische Signale abzuwenden (McConkey et al., 1990). Zur Determinierung des Zustands von HLE-B3 Zellen wurde nun die Bax/ Bcl-2 Ratio bestimmt: In unbehandelten Zellen lag diese bei  $0,34 \pm 0,06$  ( $n=5$ ), nach Inkubation mit  $10^{-6}$  M Mibefradil bereits bei  $0,63 \pm 0,08$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) und nach Inkubation mit  $10^{-5}$  M Mibefradil bei  $5,2 \pm 0,6$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ). Durch Applikation von  $10^{-6}$  M Verapamil konnte die Ratio auf  $4,6 \pm 0,4$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) erhöht werden und bei Inkubation mit  $10^{-5}$  M Verapamil sogar auf  $8,8 \pm 0,7$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ).

Durch die Formierung pro- apoptotischer Homodimere aus Bad und Mitgliedern der Bcl-2 Familie (Bcl-xl, Bax) an der Mitochondrienmembran kann es durch verschiedene Aktivatoren wie Cytochrom c oder SMAC zur Freisetzung von Caspasen kommen. Diese Proteasen sind essentiell für den programmierten Zelltod. Die Effektor- Caspase 3 wird direkt durch die Cytochrom c aktivierte Initiator- Caspase 9 protolysiert und stellt somit einen wichtigen Marker für apoptotische Prozesse in der Zelle dar. In HLE-B3 Zellen konnte eine Aktivierung von Caspase 3 durch Inkubation mit dem Calciumkanal- Antagonisten Mibefradil gezeigt werden (Abb.3.18).

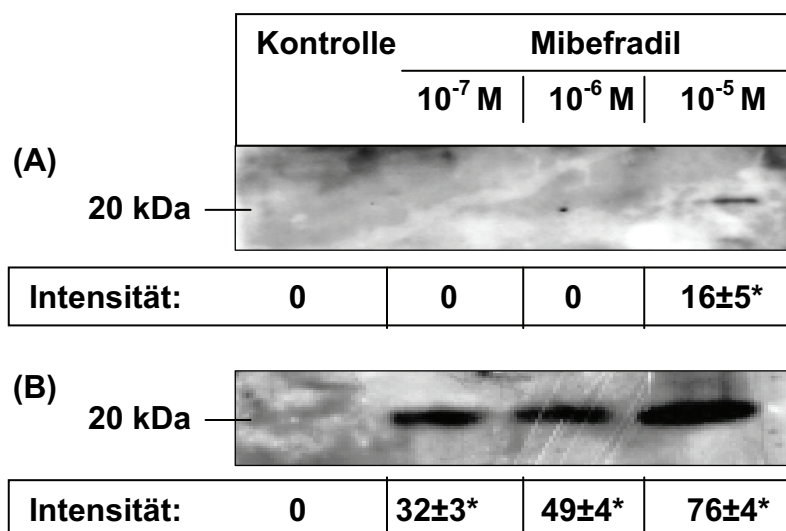
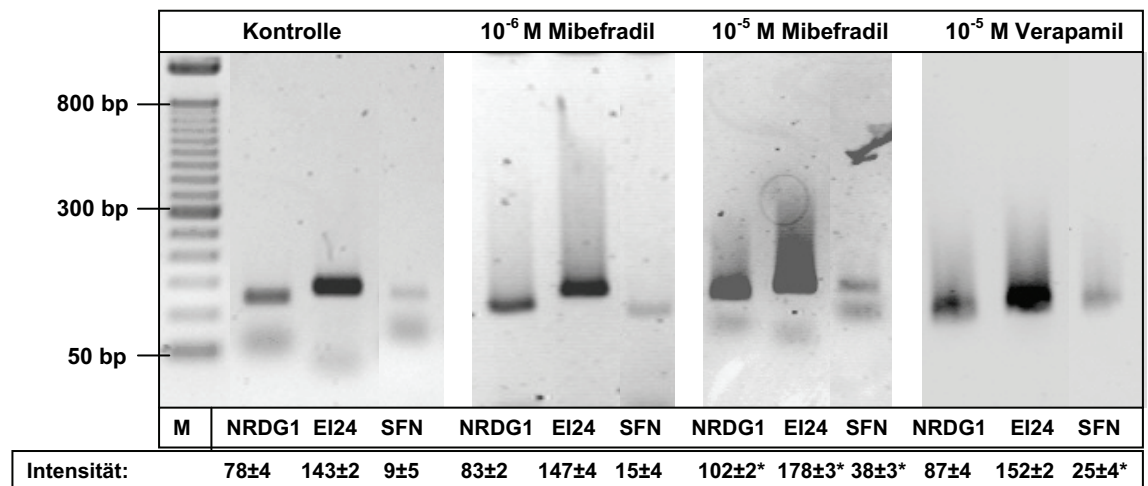


Abb.3.18: Westernblot des apoptotischen Fragments (p20) der Caspase 3 in Abhängigkeit der Zeit und der Blockerkonzentration. Detektion nach 24-stündiger (A) und 48-stündiger (B) Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen Mibefradil. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=3$ ) angegeben (\*-  $p<0,05$ ).

In unbehandelten Zellen konnte das apoptotische Fragment (p20) der Caspase nicht nachgewiesen werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine 24-stündige Inkubation mit Mibefradil zu keiner Aktivierung von p20 führte, außer bei Konzentrationen von  $10^{-5}$  M Mibefradil (Abb.3.18 A). Im Gegensatz dazu führte eine 48-stündige Applikation von  $10^{-7}$  M Mibefradil zur Erhöhung der Intensitäten von 0 auf  $32 \pm 3$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ); bei Inkubation mit  $10^{-6}$  M Mibefradil auf  $49 \pm 4$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) und bei Applikation von  $10^{-5}$  M Mibefradil sogar auf  $76 \pm 4$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) (Abb.3.18 B).

Weiterhin konnte durch PCR- Experimente die unterschiedliche Expression von verschiedenen Apoptosemarkern (NRDG1, EI24 und SFN) zwischen behandelten und unbehandelten Zellen gezeigt werden. Die Expression von NRDG1 (N- myc downstream regulated gene), einem sog. DNA- damage response gene, erfolgt bei p53- Aktivierung und verstärkter HIF1 $\alpha$ - Expression, die zu einer gesteigerten Apoptoserate in Tumorzellen führt [GUO et al. 2001]. Während SFN (Stratifin) als Negativregulator des Zellwachstums am G<sub>2</sub> – Checkpoint fungiert, inhibiert EI24 (Etoposide induced 2.4 mRNA) das Zellwachstum, indem es Apoptose Signalwege aktiviert (Gu et al., 2000).



**Abb.3.19:** PCR- Produkte der Apoptosemarker NRDG1 (N- myc downstream regulated gene), EI24 (Etoposide induced 2.4 mRNA) und SFN (Stratifin) in unbehandelten Zellen (control) im Vergleich zu mit Mibefradil und Verapamil behandelten Zellen. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=3$ ) angegeben (\*-  $p<0,05$ ).

Die Expression der in Abb. 3.19 dargestellten Gene nimmt mit steigender Blockerkonzentration zu: während die Bandenintensität für NRDG1 in Kontrollzellen  $78 \pm 4$  ( $n=3$ ) ist, erhöht sich diese in mit  $10^{-6}$  M Mibefradil behandelten Zellen bereits auf  $83 \pm 3$  ( $n=3$ ,  $p=0,12$ ) und in mit  $10^{-5}$  M Mibefradil behandelten Zellen signifikant auf  $102 \pm 2$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ). Durch eine Inkubation mit  $10^{-5}$  M Verapamil konnte keine signifikant veränderte Expression von NDRG1 festgestellt werden, die Intensitätswerte erhöhten sich lediglich von  $78 \pm 4$  ( $n=3$ ) auf  $87 \pm 4$  ( $n=3$ ,  $p=0,57$ ). Ähnliche Beobachtungen konnten auch für die Gene EI24 und SFN gemacht werden: die Intensitäten unbehandelter Zellen lagen bei  $143 \pm 2$  ( $n=3$ ) für EI24 und bei  $9 \pm 5$  ( $n=3$ ) für SFN; nach einer Inkubation mit  $10^{-6}$  M Mibefradil konnte keine signifikante Veränderung dieser festgestellt werden, während die Werte durch eine Inkubation mit  $10^{-5}$  M Mibefradil auf  $178 \pm 3$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) für EI24 und auf  $38 \pm 3$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) für SFN signifikant erhöht wurden. Durch eine Inkubation mit  $10^{-5}$  M Verapamil wurde die Expression von EI24 nicht signifikant beeinflusst, während die Expression von SFN erhöht wurde. Die Bandenintensitäten für dieses Gen stiegen nach der Inkubation mit Verapamil von  $9 \pm 5$  ( $n=3$ ) auf  $25 \pm 4$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) an.

### 3.3 *Mögliche Mechanismen der Calcium- induzierten Veränderung des zellulären Wachstums*


$\text{Ca}^{2+}$  vermittelt verschiedene zelluläre Prozesse und ist auch in HLE-B3 Zellen an der Vermittlung mitogener Signale beteiligt, wie im vorangegangenen Kapitel dargestellt wurde. Der Eintritt in den Zellzyklus geht oft mit einer Aktivierung Ras- regulierter Signalwege einher, in denen Raf-, MEK- und ERK- Phosphorylierungen dominieren. Es sollte daher untersucht werden, ob der durch Kanalblocker modifizierte  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom Einfluss auf mitogene Signalkaskaden hat.

#### 3.3.1 Beeinflussung der Calcium-/ Calmodulin- abhängigen Kinase II (CaMKII)

Da die Phosphorylierung der CaMK II ( $\text{Ca}^{2+}$  / Calmodulin- abhängige Kinase) in einer Reihe von Zellen zur Aktivierung von c-Raf und ERK 1/2 führt (Illario et al., 2003), wurde zunächst der Einfluss von Mibefradil und Verapamil auf die



Phosphorylierung von CaMKII, c-Raf und ERK 1/2 untersucht. Dafür wurden zunächst Lysate von unbehandelten und behandelten HLE-B3 Zellen hergestellt und diese in Westernblot Experimenten hinsichtlich der Aktivierung von CaMK II untersucht. Abbildung 3.20 zeigt eine abnehmende Phosphorylierung des Proteins mit steigender Blockerkonzentration: während unbehandelte Zellen Intensitäten von  $100 \pm 2$  ( $n=3$ ) aufweisen, werden diese durch Applikation von  $10^{-7}$  M Mibefradil bereits auf  $62 \pm 6$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) und bei Inkubation mit  $10^{-5}$  M Mibefradil sogar auf  $12 \pm 6$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) reduziert. Der L- Typ Kanalb blocker Verapamil reduzierte ebenfalls die Phosphorylierung des Proteins (Daten nicht gezeigt). Hier konnten die Intensitäten bei einer Inkubation mit  $10^{-5}$  M Verapamil auf  $48 \pm 4$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) verringert werden.<sup>2</sup> Als Kontrolle für diese Versuche wurden Zellen mit KN-93, einem CaMKII- Inhibitor, inkubiert und die Phosphorylierung des Proteins in Westernblot Experimenten untersucht. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Verminderung der Aktivität gezeigt werden; bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  M KN-93 konnte die Phosphorylierung von CaMKII vollständig inhibiert werden (Daten nicht gezeigt). Da der Calciumkanal- Agonist Bay K 8644 einen erheblichen Einfluss auf Wachstum und Vitalität der Zellen hatte, wurde der Einfluss des Agonisten auf die Aktivierung der CaMKII untersucht. Nach Inkubation mit  $10^{-6}$  M Bay K 8644 wurden die Bandenintensitäten von  $100 \pm 2$  ( $n=3$ ) in unbehandelten Zellen auf  $137 \pm 4$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) erhöht (Daten nicht gezeigt).

Kontrolle		Mibefradil			
52 kDa					
	-	5*10 <sup>-8</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-5</sup> M
Intensität::	100±2	92±2	62±6*	16±4*	12±6*

**Abb.3.20: Aktivierung von CaMKII in HLE-B3 Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen von Mibefradil. Bandenintensitäten wurden durch Densitometrie-Bestimmung mit Hilfe der Biometra Software ermittelt. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=3$ ) angegeben (\*-  $p<0,05$ ).**

<sup>2</sup> Bei diesen Experimenten wurde auf eine Konzentrationsreihe verzichtet, da die Effekte des L- Typ Kanalb blockers in allen bisherigen Untersuchungen erst bei einem Einsatz höherer Konzentrationen verzeichnet werden konnten.

In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss der CaMKII auf das Wachstum von HLE-B3 Zellen untersucht. Dazu wurden Proliferationstests mit KN-93 durchgeführt. Die Dosis- Wirkungsbeziehung in Abb. 3.21 A zeigt eine Inhibierung des Zellwachstum nach Inkubation mit dem CaMKII- Inhibitor: eine Konzentration von  $10^{-7}$  M KN-93 reduzierte das Wachstum der Zellen um  $72\pm6\%$  ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ),  $10^{-6}$  M KN-93 inhibierte das Wachstum um  $86\pm3\%$  ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ) und  $10^{-5}$  M KN-93 um  $94\pm6\%$  ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ). Für den CaMKII- Inhibitor KN-93 ergab sich somit ein  $EC_{50}$ - Wert von  $8\cdot 10^{-9}$  M. Weiterhin sollten verschiedene Transkriptionsfaktoren hinsichtlich ihrer Expression nach einer Inkubation mit dem CaMKII- Inhibitor KN-93 untersucht werden. Map4 ist durch die Aktivierung verschiedener Kinasen wie Pak1 oder MEKK1 maßgeblich am Übergang von der  $G_1$  zur S- Phase und von der  $G_2$  zur M- Phase beteiligt.

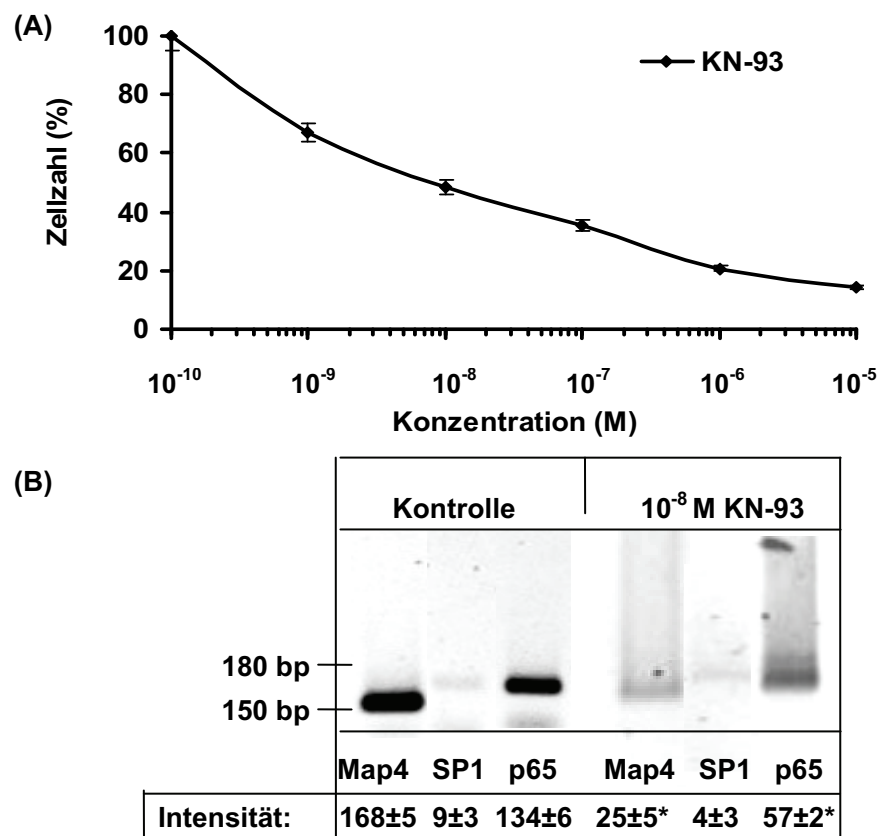


Abb.3.21: Inhibierung des Wachstums von HLE-B3 Zellen durch den CaMKII- Inhibitor KN-93. (A) Konzentrationsabhängige Reduzierung der Zellzahl durch KN-93. (B) Verminderung der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren durch Inkubation mit  $10^{-7}$  M KN-93: Map4 (151 bp), SP1 (182 bp) and p65 (176 bp). Bandenintensitäten wurden durch Densitometrie- Bestimmung mit Hilfe der Biometra Software ermittelt. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=3$ ) angegeben (\*-  $p<0,05$ ).

Die Expression des Transkriptionsfaktors wurde durch  $10^{-8}$  M KN-93 vermindert (Abb.3.21 B): während unbehandelte Zellen Bandenintensitäten von  $168 \pm 5$  ( $n=3$ ) aufwiesen, wurden diese durch eine Inkubation mit dem CaMKII- Inhibitor auf  $25 \pm 5$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) reduziert. Durch MEKK1 und ERK1/2 kann der Transkriptionsfaktor p65 aktiviert werden, dessen Expression ebenfalls durch eine Inkubation mit  $10^{-8}$  M KN-93 verringert werden konnte: in Kontrollzellen wurden Bandenintensitäten von  $134 \pm 6$  ( $n=3$ ) gezeigt, die nach Applikation von  $10^{-8}$  M KN-93 auf  $57 \pm 2$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) reduziert wurden.

### 3.3.2 Beeinflussung der Extracellular regulated kinase ERK1/2

ERKs werden durch verschiedene Stimuli aktiviert und können Zellwachstum und Differenzierung induzieren. Vorgeschaltete Komponenten im Signalweg, die zu einer ERK- Aktivierung führen, sind u.a. MEK und die Proteinkinase Raf-1 (Howe and Juliano, 1998). Nachdem bereits die Phosphorylierung von CaMKII durch Mibefradil und Verapamil inhibiert werden konnte und der Einfluss dieser Kinase auf das Wachstum der HLE-B3 Zellen gezeigt werden konnte, sollte nun der Einfluss der Kanalblocker und der Kinase auf Raf-1 und ERK1/2 untersucht werden. Zunächst wurden Westernblot Experimente zur Untersuchung der Phosphorylierung von Raf-1<sup>3</sup> und ERK1/2 gemacht. Die in Abb.3.22 dargestellten Ergebnisse dieser Versuche zeigen eine deutlich verminderte Aktivität beider Proteine nach Applikation des T- Typ-Kanalblockers Mibefradil. Die Phosphorylierung von Raf-1 an den Tyrosinresten 340/341 nahm bereits durch Applikation von  $10^{-7}$  M Mibefradil deutlich ab (Abb.3.22 A): während Kontrollzellen Bandenintensitäten von  $120 \pm 6$  ( $n=3$ ) aufwiesen, wurden diese durch Zugabe von  $10^{-7}$  M Mibefradil auf  $54 \pm 4$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) und bei Applikation von  $10^{-5}$  M Mibefradil sogar auf  $10 \pm 3$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) reduziert. Ähnliche Beobachtungen konnten auch durch Zugabe des L- Typ-Kanalblockers Verapamil gemacht werden, dabei konnten die Intensitäten von  $120 \pm 6$  ( $n=3$ ) in unbehandelten Zellen auf  $16 \pm 3$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) durch Applikation

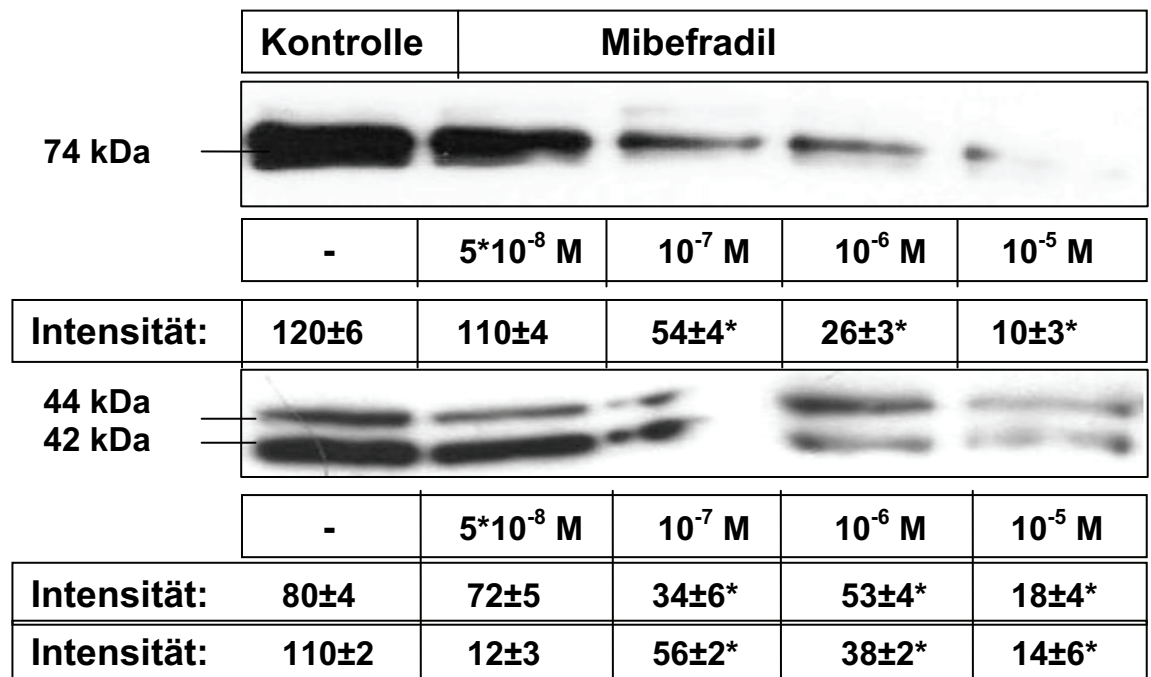
---

<sup>3</sup> Verschiedene Raf-1- Phosphorylierungen sind bekannt, die entweder positive oder negative Effekte auf seine katalytische Aktivität ausüben können: Ser 621- Phosphorylierungen scheint die Kinaseaktivität zu inhibieren (MISCHAK, 1996), während Tyr 340 und Tyr 341 Phosphorylierungen für die Aktivierung von Raf-1 notwendig ist (FABIAN, 1993). Daher wurde für diese Experimente ein Antikörper herangezogen, der gegen die Tyr 340/341- Reste des Proteins gerichtet ist.

von  $10^{-5}$  M Verapamil vermindert werden (Daten nicht gezeigt). Auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal- Agonist Bay K 8644 beeinflusste die Aktivierung der Proteinkinase: die Bandenintensitäten wurden nach Zugabe von  $10^{-6}$  M Bay K 8644 von  $120 \pm 6$  ( $n=3$ ) auf  $140 \pm 3$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) erhöht (Daten nicht gezeigt).

Auch ERK1/2 wurde in Anwesenheit der  $\text{Ca}^{2+}$ - Kanal- Antagonisten nur eingeschränkt phosphoryliert (Abb.3.22 B): im Gegensatz zu den Kontrollzellen, deren Bandenintensitäten bei  $80 \pm 4$  ( $n=5$ ) für p42 und bei  $110 \pm 2$  ( $n=5$ ) für p44 lagen, wurden durch eine Inkubation mit  $10^{-7}$  M Mibefradil nur noch  $34 \pm 6$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) für p42 und  $56 \pm 2$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) für p44 erreicht. Eine Applikation von  $10^{-5}$  M des Blockers führte zu einer Verminderung der Intensitäten auf  $18 \pm 4$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) für p42 und auf  $14 \pm 6$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) für p44. Die Ergebnisse der Proliferationsversuche mit dem Calciumkanal- Agonisten Bay K 8644 in der Zellkultur sollten ebenfalls durch Westernblot Experimente verifiziert werden. Durch eine Inkubation mit  $10^{-6}$  M Bay K 8644 wurden die Bandenintensitäten von phospho- ERK1/2 auf  $100 \pm 5$  ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ) für p42 und auf  $137 \pm 4$  ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ) für p44 erhöht. Durch die zusätzliche Inkubation mit  $10^{-6}$  M Bay K 8644 wurde die Wirkung von Mibefradil auf die ERK 1/2 Phosphorylierung reduziert. Nach Inkubation mit  $10^{-7}$  M Mibefradil verminderten sich die Intensitäten für p42 von  $100 \pm 5$  ( $n=4$ ) nur auf  $96 \pm 3$  für p42 ( $n=3$ ,  $p=0,07$ ) und für p44 von  $137 \pm 4$  auf nur  $129 \pm 6$  ( $n=3$ ,  $p=0,08$ ). Erst bei einer zusätzlichen Applikation von  $10^{-5}$  M Mibefradil konnte die ERK- Phosphorylierung beeinflusst werden: die Intensitäten für p42 sanken auf  $42 \pm 3$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) und auf  $60 \pm 6$  ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) für p44 (Daten nicht gezeigt).

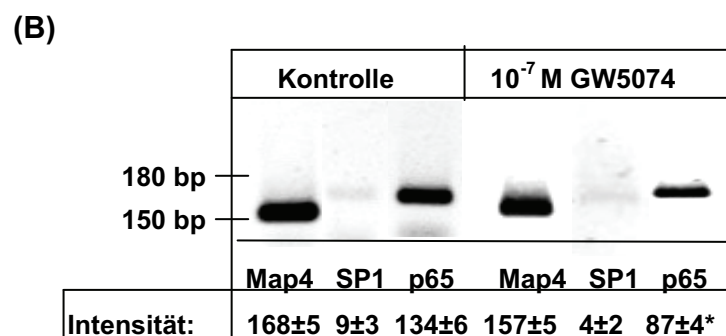
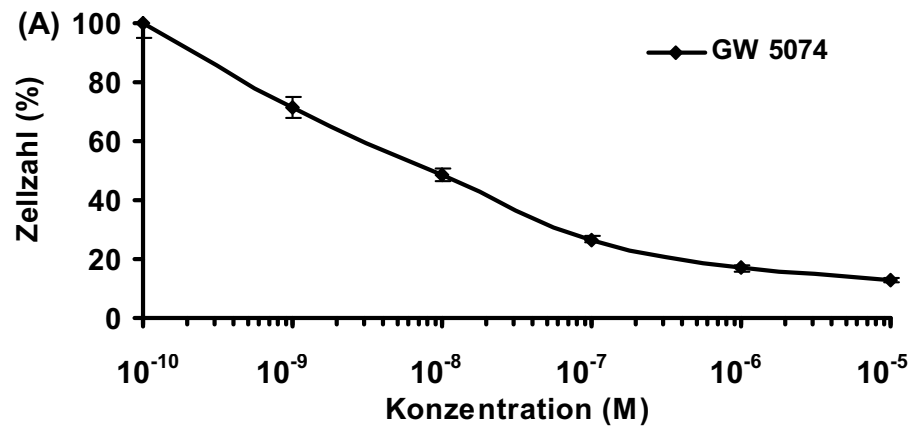
Im Fall von Verapamil konnte auch eine Abnahme der Aktivität von ERK 1/2 beobachtet werden: im Gegensatz zu den Kontrollzellen, deren Bandenintensitäten bei  $80 \pm 4$  ( $n=5$ ) für p42 und bei  $110 \pm 2$  ( $n=5$ ) für p44 lagen, wurden durch Inkubation mit  $10^{-6}$  M Verapamil nur  $64 \pm 2$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) für p42 und  $87 \pm 4$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) für p44 erreicht. Eine Applikation von  $10^{-5}$  M des Blockers führte zu einer Verminderung der Intensitäten auf  $10 \pm 2$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) für p42 und auf  $26 \pm 4$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) für p44 (Daten nicht gezeigt).



**Abb.3.22: Dosisabhängige Abnahme der Phosphorylierung von cRaf-1 (A) und ERK1/2 (B) durch Inkubation mit Mibefradil.** Bandenintensitäten wurden durch Densitometrie-Bestimmung mit Hilfe der Biometra Software ermittelt. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD (n=5) angegeben (\*-  $p < 0,05$ ).

Um den Einfluss der extrazellulär regulierten Kinase (ERK1/2) auf das Wachstum von HLE-B3 Zellen zu prüfen, wurden die Zellen mit einem ERK1/2-Inhibitor inkubiert und anschließend deren Proliferationsrate und die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren geprüft. Die Dosis- Wirkungsbeziehung in Abb. 3.23 A zeigt eine konzentrationsabhängige Inhibierung des Zellwachstums durch Inkubation mit dem ERK1/2- Inhibitor: Konzentrationen von  $10^{-9}$  M GW 5074 reduzierten das Wachstum der Zellen bereits um  $34 \pm 5\%$  (n=4,  $p < 0,05$ ),  $10^{-8}$  M GW 5074 inhibierten das Wachstum um  $48 \pm 5\%$  (n=4,  $p < 0,05$ ) und  $10^{-7}$  M GW 5074 um  $72 \pm 4\%$  (n=4,  $p < 0,05$ ). Für den ERK1/2- Inhibitor GW 5074 ergab sich somit ein  $EC_{50}$ - Wert von  $10^{-8}$  M. Weiterhin sollten verschiedene Transkriptionsfaktoren hinsichtlich ihrer Expression nach einer Inkubation mit dem Inhibitor untersucht werden. Wie bereits erwähnt ist Map4 maßgeblich am Übergang von der  $G_1$  zur S- Phase und von der  $G_2$  zur M- Phase beteiligt. Die Expression des Transkriptionsfaktors wurde durch  $10^{-8}$  M GW 5074 nicht vermindert (Abb.3.23 B): während unbehandelte Zellen Bandenintensitäten von

168±5 (n=3) aufwiesen, betrugen diese bei einer Inkubation mit dem ERK1/2-Inhibitor 157±6 (n=3, p=0,07).

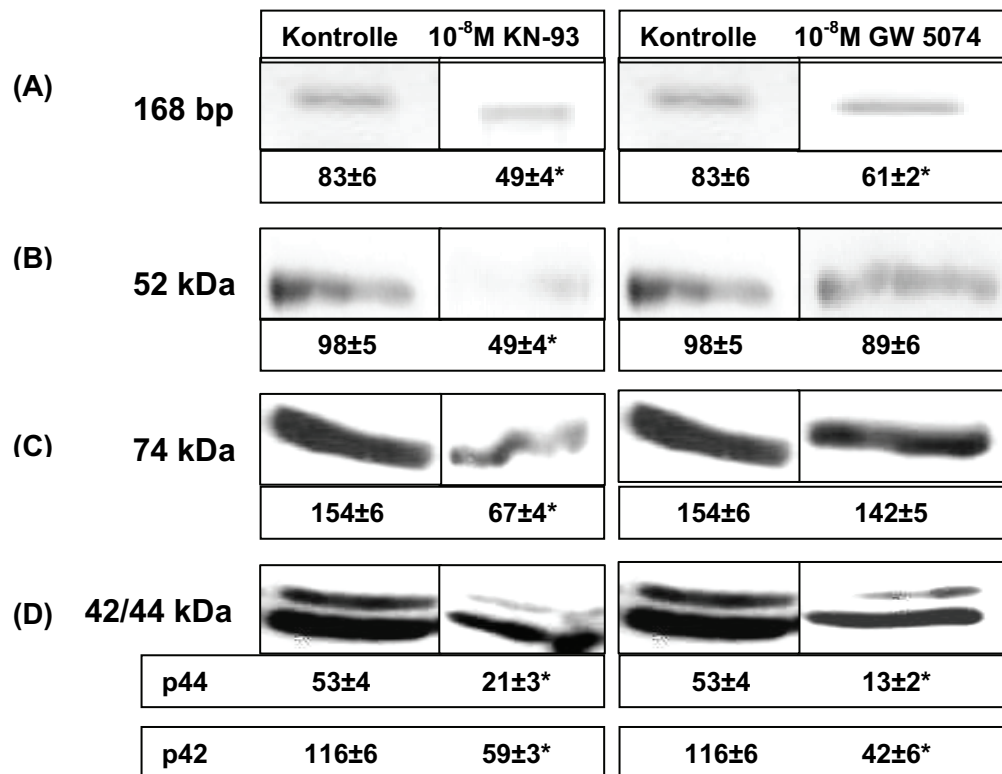


**Abb.3.23: Inhibierung des Wachstums von HLE-B3 Zellen durch den ERK1/2- Inhibitor GW 5074. (A) Konzentrationsabhängige Reduzierung der Zellzahl durch GW 5074. (B) Beeinflussung der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren durch Inkubation mit 10<sup>-8</sup> M GW 5074: Map4 (151 bp), SP1 (182 bp) and p65 (176 bp). Bandenintensitäten wurden durch Densitometrie- Bestimmung mit Hilfe der Biometra Software ermittelt. Daten sind als Mittelwerte ± SD (n=3) angegeben (\*- p<0,05).**

Durch MEKK1 und ERK1/2 kann der Transkriptionsfaktor p65 aktiviert werden, dessen Expression durch eine Inkubation mit 10<sup>-8</sup> M GW 5074 verringert werden konnte: in Kontrollzellen wurden Bandenintensitäten von 134±6 (n=3) gezeigt, die nach Applikation von 10<sup>-8</sup> M GW 5074 auf 87±4 (n=3, p<0,05) reduziert wurden.

### 3.3.3 Untersuchungen zum Zusammenhang der Kinasen CaMKII, cRaf-1 und ERK1/2

An diesem Punkt der Untersuchungen konnte noch keine Aussage über den direkten Zusammenhang von CaMK II- Aktivierung und Raf- bzw. ERK 1/2- Phosphorylierung getroffen werden. Um diesen Zusammenhang zu prüfen, wurden HLE-B3 Zellen einmal mit KN-93, dem Inhibitor für CaMK II, und zum anderen mit GW 5074, einem ERK1/2- Inhibitor, inkubiert und die Aktivierung von cRaf-1 und ERK1/2 überprüft. In Kapitel 3.3.1 wurde der inhibitorische Effekt von KN-93 auf CaMKII bereits dargestellt. Die Ergebnisse in Abb.3.24 zeigen den Einfluss des Blockers auf cRaf-1 und ERK1/2, wobei eine verminderte Phosphorylierung beider Proteine durch Blockierung der CaMK II erkennbar ist: während in den Kontrollzellen Bandenintensitäten von  $154 \pm 6$  (n=3) für cRaf-1 **(C)**, von  $116 \pm 6$  (n=3) für p42 und  $53 \pm 4$  (n=3) für p44 **(D)** auftraten, wurden diese durch Applikation von  $10^{-8}$  M KN-93 auf  $67 \pm 4$  (n=3,  $p < 0,05$ ) für cRaf-1 **(C)**, auf  $21 \pm 3$  (n=3,  $p < 0,05$ ) für p42 und auf  $59 \pm 3$  (n=3,  $p < 0,05$ ) für p44 **(D)** reduziert. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass CaMKII die Aktivität von cRaf-1 und ERK1/2 beeinflusst, möglicherweise könnte die Kinase in diesem Signalweg den beiden anderen vorgeschaltet sein. Um diesen Sachverhalt zu prüfen, wurde der ERK1/2- Blocker GW 5074 in die Untersuchungen einbezogen. Hierzu wurden GW 5074 inkubierte HLE-B3 Zellen hinsichtlich der CaMKII-, cRaf- und ERK- Phosphorylierung untersucht. Abbildung 3.24 zeigt den Einfluss des ERK1/2- Inhibitors auf die Aktivität der drei Kinasen: unbehandelte Zellen weisen Bandenintensitäten von  $98 \pm 5$  (n=3) für CaMKII **(B)**,  $154 \pm 6$  (n=3) für cRaf-1 **(C)**,  $116 \pm 6$  (n=3) für p42 und  $53 \pm 4$  (n=3) für p44 **(D)** auf. Nach Inkubation der Zellen mit  $10^{-8}$  M GW 5074 wurden Bandenintensitäten von  $89 \pm 6$  (n=3,  $p = 0,9$ ) für CaMKII **(B)**,  $142 \pm 5$  (n=3,  $p = 0,07$ ) für cRaf-1 **(C)**,  $42 \pm 6$  (n=3,  $p < 0,05$ ) für p42 und  $13 \pm 2$  (n=3,  $p < 0,05$ ) für p44 **(D)** erhalten. Außerdem ist in Abb.3.24 zusätzlich die Reduzierung der TBP- Expression nach Inkubation mit KN-93 und GW 5074 dargestellt **(A)**: die Bandenintensitäten von  $83 \pm 6$  (n=3) unter Kontrollbedingungen wurden durch  $10^{-8}$  M KN-93 auf  $49 \pm 4$  (n=3;  $p < 0,05$ ) und durch  $10^{-8}$  M GW 5074 auf  $61 \pm 2$  (n=3;  $p < 0,05$ ) reduziert.

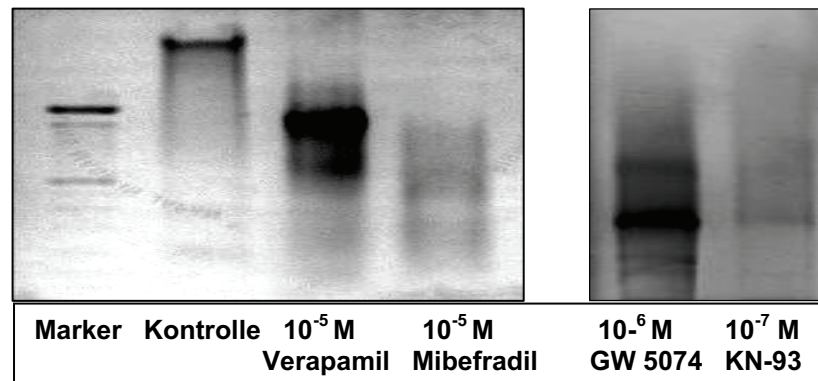


**Abb.3.24:** Einfluss von KN-93, einem CaMKII- Inhibitor, und GW 5074, einem ERK1/2- Blocker auf die Aktivität von CaMKII, cRaf-1 und ERK1/2. Der Einfluss beider Blocker auf das Zellwachstum wurde mit Hilfe des TATA Box Bindeproteins (TBP) dargestellt. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3) angegeben (\*- p<0,05).

### 3.3.4 Beeinflussung apoptotischer Vorgänge durch die Blocker von CaMKII und ERK1/2

Da in den bis hier dargestellten Ergebnissen die Auswirkung der Calciumkanal- Antagonisten Mibefradil und Verapamil auf die Proliferation in Zusammenhang mit der Aktivität von CaMKII, cRaf-1 und ERK1/2 in HLE-B3 Zellen gezeigt werden konnte, sollte nun auch die Beteiligung der genannten Kinasen an apoptotischen Prozessen untersucht werden. Wie in Abschnitt 3.2.3 gezeigt, konnte sowohl Mibefradil als auch Verapamil Apoptose induzieren. Um den Einfluss von CaMKII und ERK1/2 auf diese Vorgänge zu prüfen, wurden HLE-B3 Zellen mit GW 5074, dem ERK1/2- Inhibitor, und KN-93, dem CaMKII- Inhibitor, inkubiert und deren Effekte auf die DNA- Fragmentierung, Expression von Apoptose- Markern und auf die Bax/ Bcl-2 Ratio untersucht.



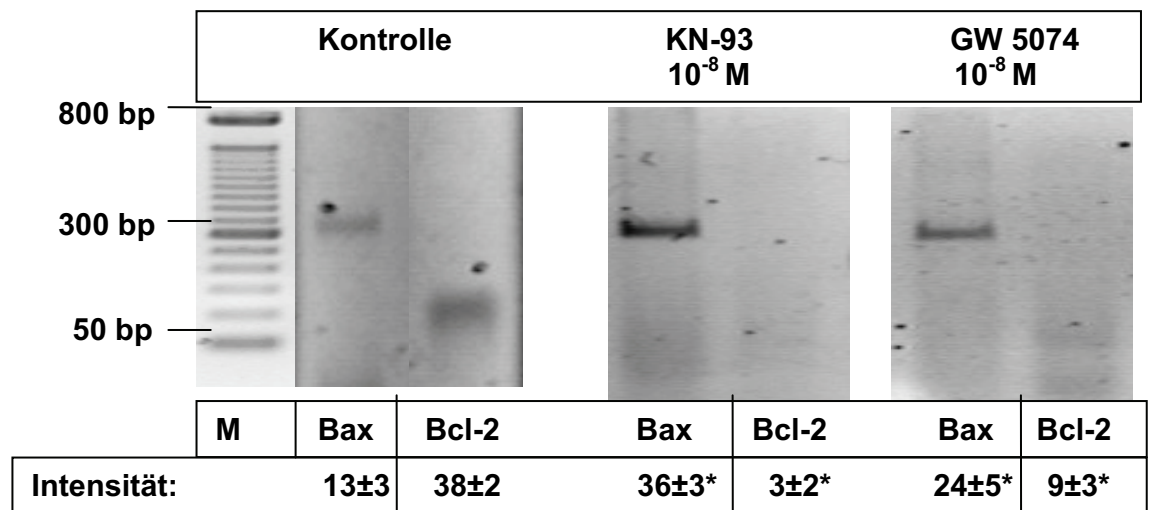


**Abb.3.25:** DNA- Fragmentierung in HLE-B3 Zellen nach Zugabe der T- und L- Typ Kanalantagonisten Mibefradil und Verapamil sowie nach Zugabe des ERK1/2- Blockers GW 5074 und des CamKII- Inhibitors KN-93.

Durch eine 48-stündige Inkubation der HLE-B3 Zellen mit den Inhibitoren der Kinasen CaMKII und ERK1/2 konnte neben wachstumshemmenden Effekten auch die Induktion von apoptotischen Vorgängen nachgewiesen werden. Ein Merkmal des apoptotischen Zelltods in vielen Zellen ist der DNA-Abbau, der sich häufig als so genannte Leiter in Agarosegelen nachweisen lässt. Der Grund hierfür ist die Aktivierung von Endonukleasen, welche die chromosomale DNA zwischen den Nukleosomen schneiden und so DNA-Fragmente mit definierten Längen herstellen. Während in Kontrollzellen ein in hohen Basenpaarbereichen relativ durchgehendes DNA- Signal nachgewiesen werden konnte, waren nach einer Inkubation mit KN-93 und GW 5074 Fragmente in den unteren Bereichen erkennbar (Abb.3.25).

Weiterhin konnte durch die Applikation der beiden Kinase- Inhibitoren eine Veränderung der Expression von Bax und Bcl-2 im Vergleich zu Kontrollzellen gezeigt werden. Die bcl-2 Familie kann den programmierten Zelltod entweder positiv oder negativ regulieren. Bcl-2 und andere Mitglieder dieser Familie wirken anti- apoptotisch, während Bax (Bcl-2 associated X protein) einen potenten Mediator für den programmierten Zelltod darstellt (Agarwal et al., 1998). Abbildung 3.26 zeigt den konzentrationsabhängigen Einfluss der beiden Kanalblocker auf die Expression von Bcl-2 und Bax: unter Kontrollbedingungen wurden Bandenintensitäten von  $38 \pm 2$  (n=5) für Bcl-2 und  $13 \pm 3$  (n=5) für Bax detektiert; diese veränderten sich durch Applikation des CaMKII- Inhibitors KN-93 zugunsten einer gesteigerten Bax- Expression. Bei einer Applikation von  $10^{-8}$

M KN-93 änderten sich die Intensitäten für die Bax- Expression auf  $36\pm3$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ), für Bcl-2 konnte eine Änderung der Bandenintensitäten auf  $3\pm2$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) verzeichnet werden. Der ERK1/2 Blocker GW 5074 führte zu ähnlichen Veränderungen in der Expression beider Gene: durch  $10^{-8}$  M GW 5074 reduzierten sich die Intensitäten der Bcl-2- Banden auf  $9\pm3$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ). Die Bandenintensitäten für Bax wurden durch  $10^{-8}$  M GW 5074 auf  $24\pm5$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) erhöht.

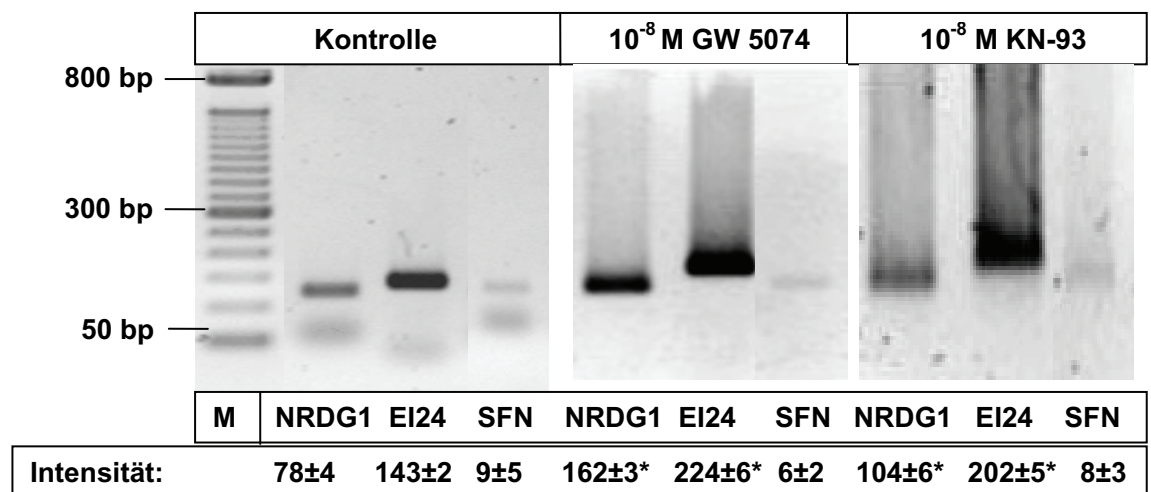


**Abb.3.26:** PCR- Produkte von Bcl-2 (127 bp) und Bax (487 bp) in HLE-B3 Zellen mit und ohne Inkubation mit dem CaMKII- Inhibitor KN-93 und dem ERK1/2- Inhibitor GW 5074. Bandenintensitäten wurden durch Densitometrie- Bestimmung mit Hilfe der Biometra Software ermittelt. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=5$ ) angegeben (\*-  $p<0,05$ ).

Die intrazelluläre Bax/ Bcl-2 Ratio ist entscheidend für die Reaktion der Zellen auf apoptotische Stimuli (McConkey et al., 1990). Je stärker sich diese zugunsten von Bcl-2 verändert, desto besser ist die Zelle befähigt apoptotische Prozesse abzuwenden. Zur Determinierung des Zustands von HLE-B3 Zellen wurde deshalb die Bax/ Bcl-2 Ratio bestimmt: In unbehandelten Zellen lag diese bei  $0,34\pm0,06$  ( $n=5$ ), nach Inkubation mit  $10^{-8}$  M des CaMKII- Inhibitors KN-93 bei  $12,34\pm0,28$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) und nach Inkubation mit  $10^{-8}$  M des ERK1/2- Inhibitors GW 5074 bei  $2,6\pm0,4$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ).

Außerdem wurde PCR- Experimente die Veränderung der Expression verschiedener Apoptosemarker (NRDG1, EI24 und SFN) nach Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren für CaMKII und ERK1/2 untersucht. Die Expression

von NRDG1 (N- myc downstream regulated gene) erfolgt verstärkt bei p53-Aktivierung und kann zu einer gesteigerten Apoptoserate in Tumorzellen führt (Guo et al., 2001). Während SFN (Stratifin) als Negativregulator des Zellwachstums am G<sub>2</sub> – Checkpoint fungiert, inhibiert EI24 (Etoposide induced 2.4 mRNA) das Zellwachstum, indem es Apoptose Signalwege aktiviert (Gu et al., 2000). Die Expression der in Abb. 3.27 dargestellten Gene nimmt mit steigender Blockerkonzentration zu: während die Bandenintensitäten für NRDG1 in Kontrollzellen  $78 \pm 4$  (n=3) betragen, erhöhen sich diese in mit  $10^{-8}$  M GW 5074 behandelten Zellen auf  $162 \pm 3$  (n=3,  $p < 0,05$ ) und in mit  $10^{-8}$  M KN-93 behandelten Zellen auf  $104 \pm 6$  (n=3,  $p < 0,05$ ). Ähnliche Beobachtungen konnten auch für EI24 gemacht werden: die Bandenintensitäten unbehandelter Zellen lagen bei  $143 \pm 2$  (n=3); nach einer Inkubation mit  $10^{-8}$  M GW 5074 stiegen die Bandenintensitäten auf  $224 \pm 6$  (n=3,  $p < 0,05$ ) für EI24. Durch eine Inkubation mit  $10^{-8}$  M KN-93 erhöhten sich die Intensitäten für EI24 auf  $202 \pm 5$  (n=3,  $p < 0,05$ ).



**Abb.3.27:** PCR- Produkte von den Apoptosemarkern NRDG1 (N- myc downstream regulated gene), EI24 (Etoposide induced 2.4 mRNA) und SFN (Stratifin) in unbehandelten Zellen (control) im Vergleich zu mit GW 5074 und KN-93 behandelten Zellen. Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3) angegeben (\*-  $p < 0,05$ ).

Die Expression von SFN wurde durch beide Inhibitoren nicht signifikant beeinflusst. Beide Kinase- Inhibitoren induzierten eine stärkere Expression der genannten Apoptosemarker als die  $\text{Ca}^{2+}$ - Kanalantagonisten Mibefradil und Verapamil.

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss spannungsabhängiger Calciumkanäle ( $\text{Ca}_v$ ), besonders der L- und T- Typ Kanäle, auf zelluläre Prozesse wie Wachstum und Apoptose humaner Linsenepithelzellen (HLE-B3) zu untersuchen. Die Kanäle sollten durch verschiedene Antagonisten blockiert werden und somit deren möglicher Einfluss auf Veränderungen verschiedener funktioneller Parameter untersucht werden. In weiteren Analysen sollte untersucht werden, ob der durch die CCA modifizierte  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom Einfluss auf mitogene Signalkaskaden hat.

Da intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  eine Reihe zellulärer Effekte wie bspw. Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose vermittelt (Berridge et al., 2000; Bootman et al., 2002; Boynton and Whitfield, 1976a; Perris and Whitfield, 1967; Schreiber, 2005; Whitfield et al., 1987; Whitfield, 1992; Whitfield et al., 1995), könnte die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ - Homöostase ein wichtiges Instrument zur Prävention verschiedenster proliferationsbedingter Erkrankungen wie bspw. Hyperplasie (Gown, 1978), diverser Augenerkrankungen (Grant and Acosta, 1996) oder Brustkrebs (Rodriguez-Mora et al., 2005) sein. Auch für die Prävention von Nachstar, an dessen Entstehung die Proliferation und Migration von Linsenepithelzellen maßgeblich beteiligt zu sein scheint (Apple et al., 1992), könnte die Beeinflussung des  $\text{Ca}^{2+}$ - Haushalts einen entscheidenden Fortschritt bringen. In der vorliegenden Arbeit wurden vor dem klinischen Hintergrund neuer Therapieansätze in der Nachstarprävention humane Linsenepithelzellen (HLE-B3) als Untersuchungsobjekt eingesetzt.

### 4.1 *Expression verschiedener spannungsabhängiger Calciumkanäle ( $\text{Ca}_v$ ) in HLE-B3 und deren Einfluss auf intrazelluläre Calciumkonzentrationen*

$\text{Ca}^{2+}$ - Ionen spielen eine kritische Rolle in der Regulation vieler verschiedener biologischer Prozesse. Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -

Konzentration regulieren unter anderem die neuronale Erregbarkeit (Foster, 2007; Fuchs et al., 2007) , die Neurotransmitter- und Hormonfreisetzung (Chen et al., 1999; Stojilkovic et al., 2005), Muskelkontraktion (Bakowski and Parekh, 2007; Kanaide, 2007), die Zelldifferenzierung (Park et al., 2007a; Si et al., 2007) und die Expression verschiedener Gene (Naveh-Manly and Nechama, 2007).

Intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentrationen können entweder durch Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum oder durch Einstrom aus dem Extrazellularraum erhöht werden. Einen wichtigen Weg des Ions in die Zelle stellen in einer Reihe verschiedener Zelltypen spannungsabhängige Calciumkanäle ( $\text{Ca}_v$ ) dar (Cribbs, 2006; Curtis et al., 2007; Yao et al., 2006; Zhao et al., 2002). Da besonders L- und T- Typ  $\text{Ca}_v$  in zellulären Ereignissen wie Proliferation, Differenzierung und Migration beteiligt zu sein scheinen (Gray et al., 2004; Lacinova, 2004; Lacinova, 2005; McGivern, 2006; Xia et al., 2004), wurde die Expression dieser  $\text{Ca}_v$ - Familien in HLE-B3 Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass neben drei T- Typ  $\text{Ca}_v$ s ( $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$  und  $\text{Ca}_v3.3$ ), nur ein L- Typ  $\text{Ca}_v$  ( $\text{Ca}_v1.2$ ) in diesen Zellen exprimiert wird. Gleichzeitig konnte eine wachstumsabhängige Expression der T- Typ  $\text{Ca}_v$ s ( $\text{Ca}_v3.1$  und  $\text{Ca}_v3.3$ ) nachgewiesen werden. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits Abhängigkeiten der T- Typ Kanalexpression von Wachstum, Differenzierung und Zellzyklus nachweisen: In Neuronen (Kostyuk et al., 1993; McCobb et al., 1989; Tarasenko et al., 1998), Herzmuskelzellen (Kuga et al., 1996; Kuga et al., 2000) und Skelettmuskelzellen (Beam and Knudson, 1988; Gono, 1993) sind T- Typ  $\text{Ca}_v$ s vorwiegend in der frühen embryonalen oder neonatalen Phase der Entwicklung exprimiert. Darüber hinaus konnte eine verstärkte Expression der Kanäle in Tumorzellen (Hirooka et al., 2002; Panner et al., 2005) und in aktiv, bspw. durch erhöhten Druck (Nuss and Houser, 1993) stimuliert, wachsenden Muskelzellen festgestellt werden. Einige dieser Studien belegen, dass Zellen, die sich in proliferierenden Phasen befinden, vorübergehend T- Typ  $\text{Ca}_v$ s exprimieren (Kuga et al., 1996; Lory et al., 2006), während Zellen in nicht- proliferierenden Phasen nur L- Typ  $\text{Ca}_v$ s aufweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass auch in humanen Linsenepithelzellen die Expression der L- Typ  $\text{Ca}_v$ s, die sowohl in proliferierenden Zellpassagen als auch in Zellen mit stagniertem Wachstum nachgewiesen werden konnten, unabhängig von Zellzyklus und

Wachstumsphase der Zellen zu sein scheinen. Wohingegen sich die T- Typ-Expression abhängig vom Wachstumsverhalten der Zellen zeigte. Kuga et al. 1996 demonstrierten an vaskulären Muskelzellen die wachstumsabhängige Expression von L- und T- Typ  $\text{Ca}_v$ s: mit Hilfe der Zellzyklusmarker PCNA und Ki-67, die unterschiedlich stark in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus exprimiert werden. In der  $G_1$ - und S- Phase konnten sowohl L- als auch T- Typ Calciumströme gemessen werden, während in Zellen der  $G_0$ - und M- Phase der Anteil der L- Typ Calciumströme überwog. In HLE-B3 Zellen wurde die Wachstumsabhängigkeit der Kanalexpression mit Hilfe des „proliferation associated antigens“ (p105), dessen Konzentration kurz vor Eintritt in die S-Phase, während der S- Phase und beim Übergang von  $G_2$  zu M- Phase ansteigt (Clevenger et al., 1987b; Clevenger et al., 1987a), untersucht. In Zellen, die p105 stark exprimierten, konnten neben L- Typ  $\text{Ca}_v$ s verstärkt auch T- Typ  $\text{Ca}_v$ s nachgewiesen werden, während in Zellen ohne oder mit einer schwachen p105 Expression nur L- Typ  $\text{Ca}_v$ s gefunden werden konnten (vgl.3.1.1).

Die Beteiligung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ - Kanäle an der Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  und somit möglicherweise auch an zellulären Funktionen wurde bereits verschiedenartig untersucht. Dabei kam es bspw. durch kurz- oder längerfristige Blockierung der Kanalexpression mittels siRNA- Techniken oder regulierbarer Promotoren in verschiedenen Zellen zu einer Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms, in dessen Zusammenhang auch wachstumshemmende Effekte gezeigt werden konnten (Rodman et al., 2005a; Rodman et al., 2005b). Eine andere Möglichkeit der Überprüfung des Kanaleinflusses stellen Kanalantagonisten dar, die gleichzeitig Therapeutika zur Prävention verschiedener Krankheiten sein können. Leider ist die Brauchbarkeit der unterschiedlichen Antagonisten durch geringe Spezifität (Bertolesi et al., 2002), durch geringe Selektivität (Coulter et al., 1989) oder durch die Pharmakologie des Agents limitiert.

Um die vorhandenen L- Typ  $\text{Ca}_v$ - Kanäle zu inhibieren, wurden HLE-B3 Zellen mit dem Phenylalkylamin Verapamil behandelt, während zur Blockierung der T- Typ Kanäle das Tetralolderivat Mibefradil eingesetzt wurde. Dieser Wirkstoff besitzt die Eigenschaft, sowohl T- als auch L- Typ Kanäle blockieren zu können, wobei dieser Effekt konzentrationsabhängig zu sein scheint (Clozel

et al., 1997; Clozel et al., 1990; Lee et al., 2004; Leuranguer et al., 2001). Mibefradil wird zudem eine zehnfach höhere Affinität zu T- Typ als zu L- Typ Kanälen zugesprochen (Park et al., 2007b).

Der L- Typ Kanal- Antagonist Verapamil z.B. zeigte in manchen Zellen keinen Effekt auf T- Typ Ströme (Fox and Green, 1986), während er in anderen Zellen T- Typ Ströme in Konzentrationsbereichen zwischen  $10^6$  bis  $10^5$  M inhibierte (Akaike et al., 1981; Kuga et al., 1990; Takahashi et al., 1992). In den meisten Zellen, die ausschließlich T- Typ Kanäle exprimieren, konnte Verapamil allerdings nur in sehr hohen Konzentrationen ( $10^4$  M) den  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom inhibieren (Panner, 2005). Der Anteil der durch Verapamil blockierbaren  $\text{Ca}_v$ s am gesamten  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom in die HLE-B3 Zellen lag bei 24% (vgl.3.1.2). In diesen Zellen konnten 50% des von den  $\text{Ca}_v$ - getragenen  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms durch  $9 \cdot 10^{-7} \pm 0.4 \cdot 10^{-7}$  M Verapamil inhibiert werden, eine komplette Blockierung dieses Einstroms konnte allerdings erst in sehr hohen Konzentrationsbereichen ( $10^4$  M) erreicht werden (vgl.3.1.2).

Der Anteil der durch Mibefradil blockierbaren  $\text{Ca}_v$ s am gesamten  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom in die HLE-B3 Zellen lag bei 38% (vgl.3.1.2). Der T- Typ Antagonist reduzierte 50% des von den  $\text{Ca}_v$ - getragenen  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms bereits bei Konzentrationen von  $4 \cdot 10^{-8} \pm 0.2 \cdot 10^{-8}$  M (vgl.3.1.2), welche in Bereichen liegen, die als selektiv für eine T- Kanalblockade beschrieben wurden (Hermsmeyer et al., 1997; Mishra and Hermsmeyer, 1994b; Mishra and Hermsmeyer, 1994a). Mibefradil konnte bereits, im Gegensatz zu seinem L- Typ- spezifischen Gegenspieler, in Konzentrationsbereichen von  $5 \cdot 10^6$  M den gesamten  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom in die Zelle blockieren. In Muskelzellen des Harnleiters konnten in Konzentrationsbereichen von  $10^8$  M Mibefradil 80% des T- Typ  $\text{Ca}^{2+}$ - Stroms, aber kein L- Typ  $\text{Ca}^{2+}$ - Strom blockiert werden. Wurde die Blockerkonzentration auf das dreifache erhöht, konnten wiederum nur ca. 20% des L- Typ  $\text{Ca}^{2+}$ - Stroms inhibiert, während reine L- Typ Kanalblocker wie Nifedipine 90% der L- Typ Kanäle blockieren konnten (Bradley et al., 2004). Diese Evidenzen weisen darauf hin, dass Mibefradil konzentrationsabhängig einmal T- Typ  $\text{Ca}^{2+}$ - Kanäle und zum anderen L- Typ Kanäle zu blockieren vermag und somit in physiologisch relevanten Konzentrationen zur spezifischen Inhibierung des  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms eingesetzt werden kann. Obwohl in einer Vielzahl von Publikationen Interaktionen mit einer Reihe anderer Kanäle wie

spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanälen (Perchenet and Clement-Chomienne, 2000; Strege et al., 2005), Chloridkanälen (Nilius et al., 1997) oder anderen Kaliumkanälen (Chouabe et al., 1998; Chouabe et al., 2000; Gomora et al., 1999) beschrieben wurden, liegen die dort verwendeten wirksamen Konzentrationen von Mibefradil in 5- bis 500-fach höheren Bereichen als der Antagonist in den vorliegenden Untersuchungen den  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom und das Wachstum von HLE-B3 Zellen inhibieren konnte.

Neben der Blockade des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms konnte in HLE-B3 Zellen auch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch den Einsatz von Mibefradil und Verapamil moduliert werden. Durch die Depolarisation der Zellmembran mittels Kaliumchlorid (KCl) und die dadurch erzeugte Aktivierung der  $\text{Ca}_v$ s konnte eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration des Ions um das dreifache beobachtet werden, während diese durch Zugabe des T-Typ Kanalblockers ( $10^{-7}$  M) deutlich reduziert wurde. Verapamil konnte einen ähnlichen Effekt erst in höheren Konzentrationen ( $10^{-6}$ - $10^{-5}$  M) erreichen (vgl. 3.1.3). Dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über  $\text{Ca}_v$ s bedeutend für zelluläre Prozesse sein kann, wurde in verschiedenen Arbeiten durch den Einsatz des  $\text{Ca}_v$ -Agonisten Bay K 8644 beschrieben (Carbone et al., 1990; Janis et al., 1984; Rampe et al., 1984; Rampe et al., 1993). Zunächst erhöhte dieser den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration pankreatischer  $\beta$ -Zellen, Herzmuskelzellen (Sinnegger-Brauns et al., 2004), Lymphozyten (Kunert-Radek et al., 1990) und wie in dieser Arbeit gezeigt ebenso humaner Linsenepithelzellen. Gleichzeitig konnte sowohl im Rahmen dieser als auch in den angeführten Arbeiten eine zelluläre Antwort auf die Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$  durch Inkubation mit Bay K 8644 beobachtet werden: Lymphozyten reagierten mit erhöhtem Zellwachstum (Kunert-Radek et al., 1990) und Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK1/2) (Kotturi et al., 2003) und in  $\beta$ -Zellen sowie Herzmuskelzellen wurde die Fos-Expression erhöht (Sinnegger-Brauns et al., 2004). Diese Resultate unterstützen einmal mehr die Vermutung, dass  $\text{Ca}_v$ s durch eine Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  mitogene Signale auslösen und durch eine Modulation eben dieser Kanäle Zellwachstum beeinflusst werden kann. Panner et al. zeigten ebenfalls in verschiedenen Tumorzellen die Inhibition von  $\text{Ca}_v$ s und gleichzeitig eine Abnahme der Proliferation durch Gabe von Mibefradil im sub-mikromolaren Bereichen. Diese Effekte konnten auch in HLE-B3 Zellen gezeigt



werden, was den Schluss zulässt, dass Mibefradil ein potentieller Antagonist zur Untersuchung des Einflusses von T- Typ  $\text{Ca}_v\text{s}$  auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und zelluläre Effekte wie Proliferation und Apoptose ist.

#### *4.2 Einfluss von $\text{Ca}_v$ - Antagonisten auf Zellwachstum humaner Linsenepithelzellen*

Nachdem der  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom in humanen Linsenepithelzellen mittels  $\text{Ca}_v$ -Antagonisten konzentrationsabhängig blockiert werden konnte, zeigten diese auch inhibitorische Effekte auf Vitalität und Proliferation. Da das Zellwachstum dieser Zellen maßgeblich an der Entstehung von Nachstar beteiligt ist (Apple et al., 1992), könnte der Einsatz spezifisch wirkender Blocker zur Prävention dieser Erkrankung beitragen. Die wachstumsabhängige Expression der T- Typ Kanäle scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu übernehmen, denn stark proliferierende HLE-B3 Zellen, die verstärkt T- Kanäle exprimierten, konnten bereits durch  $1 \pm 0.2 \cdot 10^{-7}$  M Mibefradil zu 50% in ihrem Wachstum gehemmt werden, während der L- Typ Blocker 27-fach höhere Konzentrationen benötigte (vgl.3.2.1). In Muskelzellen der Pulmonararterie, die neben einem L- Typ zwei T- Typ  $\text{Ca}_v\text{s}$  exprimieren, konnte ebenfalls eine Wachstumshemmung durch Mibefradil gezeigt werden, während der L- Typ Antagonist Diltiazem erst in 50-fach höheren Dosen ähnliche Effekte erzielen konnte (Rodman et al., 2005a). Dass der  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom in die Zellen maßgeblich an der Proliferation beteiligt ist, konnte mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ - Aktivators Bay K 8644 auch in Proliferations- und Vitalitätstests gezeigt werden: durch die Inkubation mit dem Agonisten wurde die Zellzahl und die Dehydrogenase- Aktivität von HLE-B3 Zellen erhöht bzw. die Effekte der Kanalblocker Mibefradil und Verapamil vermindert, wobei der Effekt des L- Typ Kanalblockers weitaus stärker reduziert wurde als der von Mibefradil. Diese Erkenntnisse sprechen zwar für eine Beteiligung beider Kanaltypen an Wachstumsprozessen dieser Zellen, zeigen aber auch den stärkeren Einfluss der T- Typ Kanäle. Denn obwohl Bay K 8644 ausschließlich L- Typ Kanäle beeinflusst, ist die Proliferation bei Blockierung der L- Typ Kanäle und zusätzlicher Inkubation mit dem Agonisten weniger stark reduziert als bei einer Blockade der T- Typ Kanäle. Somit scheinen die noch nicht blockierten T- Typ Kanäle auszureichen, um  $\text{Ca}^{2+}$ - abhängige mitogene Signale vermitteln zu

können. Denn erst in hohen Konzentrationen, in denen Mibefradil sowohl T- als auch L- Typ Kanäle blockieren kann, konnte das Wachstum der HLE-B3 Zellen stark reduziert werden.

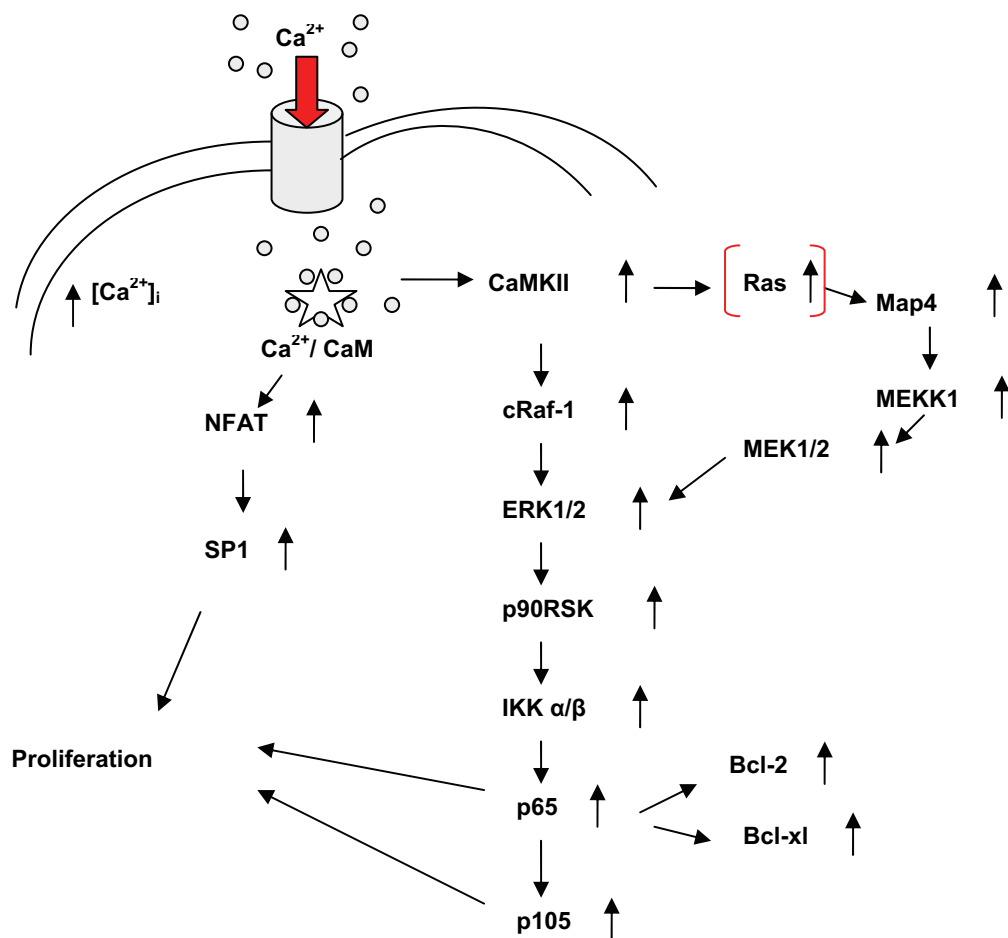
Die Bedeutung der T- Kanal- vermittelten Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  und damit der Proliferation wurde in verschiedenen wissenschaftlichen Beiträgen bereits kontrovers diskutiert, wobei einige der Autoren zwar von einem T- Kanal- bedingten Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration in der Zelle berichteten, allerdings keine Effekte auf zelluläres Wachstum feststellen konnten (Chemin et al., 2000). Besonders Studien zur Überexpression von  $\text{Ca}_v3.1$  in Muskelzellen und die von  $\text{Ca}_v3.2$  in HEK- Zellen widerlegten diese Thesen und zeigten eine starke Wachstumsabhängigkeit der Zellen von T- Kanal- Expression und dadurch ansteigenden intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentrationen (Gray and Macdonald, 2006; Rodman et al., 2005a; Rodman et al., 2005b). Die Beziehung zwischen T- Kanal Expression und erhöhtem Zellwachstum scheint viel mehr ein fein regulierter Mechanismus zu sein, als bisher angenommen. Möglicherweise bestimmt ein gewisser Schwellenwert der T- Kanal Expression deren Einfluss auf die Proliferation (Bijlenga et al., 2000; Panner and Wurster, 2006); wird dieser unterschritten, erfolgt zwar ein  $\text{Ca}^{2+}$ - Anstieg in der Zelle, dieser wiederum führt aber nicht zur Steigerung der zellulären Wachstumsrate (Panner et al., 2005). Obwohl der Mechanismus für die verschiedenen Effekte der  $\text{Ca}_v$ - Blocker Mibefradil und Verapamil auf zelluläre Funktionen wie Proliferation und Apoptose weitgehend unerklärt ist, wird durch diese und eine Reihe anderer Studien deutlich, wie wichtig  $\text{Ca}^{2+}$  als mitogenes Signal in verschiedenen Zellen zu sein scheint und dass  $\text{Ca}_v$ - Blocker möglicherweise in einer Vielzahl von proliferationsbedingten Erkrankungen zum Einsatz kommen könnten.

Wie aber der Einfluss des  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms durch L- und T- Typ  $\text{Ca}_v$  und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration mitogene Signalwege in HLE-B3 Zellen beeinflussen kann, sollte einmal durch die Blockade der  $\text{Ca}_v$ s mit Hilfe der Kanalantagonisten Mibefradil und Verapamil sowie durch Aktivierung des  $\text{Ca}_v$ - Einstroms mittels dem  $\text{Ca}^{2+}$ - Aktivator Bay K 8644 untersucht werden. Nahe liegend schien hierbei die Hypothese, dass Calmodulin (CaM) und dessen zahlreiche Targets (Tran et al., 2005) an der Vermittlung zellulärer Prozesse

beteiligt sein könnte. Eine der wichtigsten Targets dieses Proteins ist die Calmodulin- abhängige Kinase II (CaMKII). CaM führte bereits in verschiedenen Zellen durch zur Aktivierung von CaMKII, die durch den  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom über  $\text{Ca}_v\text{s}$  und somit durch die Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelt wurde (Gatti et al., 1987; Hook and Means, 2001; Illario et al., 2005; Madgwick et al., 2005; Maier et al., 2003). In diesen Arbeiten wurde auch eine damit verbundene erhöhte Wachstumsrate der Zellen beschrieben. Diese konnte in HLE-B3 Zellen durch den  $\text{Ca}^{2+}$ - Aktivator Bay K 8644 nachgewiesen werden, wobei gleichzeitig eine verstärkte Phosphorylierung von CaMKII verzeichnet werden konnte. Ein reduziertes Wachstum der HLE-B3 Zellen und die gleichzeitig verminderte Phosphorylierung der CaMKII konnte sowohl durch die Blockierung des  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms als auch durch die Inhibierung der Kinase selbst gezeigt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die CaMKII ein wichtiges Element der  $\text{Ca}^{2+}$ - vermittelten Proliferation zu sein scheint.

CaMKII wirkt multifunktional auf Wachstum (Lorca et al., 1994), Genexpression (Enslin and Soderling, 1994) und mRNA Translation (Qin et al., 1999) und scheint andere Proteinkinasen wie Raf-1 (v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1) (Schmitt et al., 2004) und ERK1/2 (extracellular regulated kinase 1/2) (Illario et al., 2003) zu aktivieren. Einer möglichen Interaktion der CaMKII mit Proteinen der MAPK- Kaskade (Raf-1, ERK1/2) wurde mit Hilfe für die einzelnen Proteine spezifischer Blocker (KN-93 für CaMKII, GW 5074 für ERK1/2) nachgegangen. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei einer Blockierung von CaMKII die Phosphorylierung der Proteinkinasen Raf-1 und ERK1/2 reduziert werden konnte, während durch die Inhibierung von ERK1/2 keine verminderte Aktivität von CaMKII und Raf-1 verzeichnet werden konnte. Die Blockierung der  $\text{Ca}_v\text{s}$  durch Mibefradil und Verapamil führte allerdings zu einer stark reduzierten Phosphorylierung aller drei Kinasen (CaMKII, Raf-1 und ERK1/2). Diese Resultate sprechen für eine Beteiligung von CaMKII, Raf-1 und ERK1/2, die ausgehend von einem  $\text{Ca}^{2+}$ - Signal nacheinander aktiviert werden und somit das Zellwachstum nachhaltig beeinflussen könnten (vgl.3.3.3). Der mögliche Einfluss von CaMKII wurde in verschiedenen Zellen bereits kontrovers diskutiert, wobei bereits beschrieben wurde, dass einerseits die  $\text{Ca}^{2+}$ - vermittelte CaMKII-, Raf-1- und ERK1/2- Phosphorylierung zur Aktivierung von Zellwachstum führt (Illario et al., 2005; Rodriguez-Mora et al., 2005; Schmitt et al., 2004), andererseits allerdings auf diesem Weg auch apoptotische Prozesse

ausgelöst werden können (Hecquet et al., 2003; Li et al., 2002b). Dass  $\text{Ca}^{2+}$  über die genannten Kinasen mitogene Signale in HLE-B3 Zellen vermitteln kann, wird zusätzlich unterstützt durch die Induktion eines vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in die Zellen nach Inkubation mit dem Agonisten Bay K 8644, welcher zu einer verstärkten Phosphorylierung aller drei Proteinkinasen und zu einer erhöhten Proliferationsrate führte.



**Abb.4.1:** Schematische Darstellung des möglichen Signalwegs, der in humanen Linsenepithelzellen zu Zellwachstum führen könnte. Durch einen  $\text{Ca}_v$ -vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle wird, höchstwahrscheinlich durch CaM, CaMKII aktiviert. Die nachfolgende Aktivierung von ERK1/2, die entweder über Raf-1 oder über Map4 und MEK1/2 erfolgt, führt zur Phosphorylierung von verschiedenen Faktoren wie p65 oder p105, die ihrerseits wiederum zur Expression anti- apoptotischer Faktoren (Bcl-2, Bcl-xl) oder direkt zur Zellzyklus- Progression beitragen.

Außer über die CaMKII- und Raf-1- vermittelte Aktivierung von ERK1/2 kann die auch CaMKII- vermittelte Ras- Aktivierung eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Proteinkinase ERK1/2 einnehmen. Durch ein Ras- bedingte Aktivierung von Map 4 können nachfolgende Proteinkinasen wie MEKK1 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1) und MEK1/2 (mitogen-activated protein kinase kinase 1/2) phosphoryliert werden, die wiederum zu einer ERK1/2- Aktivierung und somit zur Induktion mitogener Signale führen kann. Durch die Blockierung von  $\text{Ca}_v\text{s}$  sowie durch Inhibierung der CaMKII konnte die Map 4- Expression beeinflusst werden: die Expression wurde unter beiden Bedingungen reduziert. Somit könnte die  $\text{Ca}^{2+}$ - abhängige Inhibierung des Zellwachstums in HLE-B3 zusätzlich zur Blockade des CaMKII-Raf-ERK1/2- Weges auch über die Blockierung von Ras, Map 4 und den nachgeschalteten ERK1/2- aktivierenden Kinasen erfolgen. Diese Annahme wird zusätzlich unterstützt durch die angeführten Ergebnisse, die zeigen, dass von einer ERK1/2- Blockade die Map 4- Expression nicht beeinflusst wurde, während die Inhibierung von CaMKII zu einer signifikanten Reduktion der Map 4- Expression führte.

Ein weiterer Interaktionspartner von CaM und CaMKII ist der Transkriptionsfaktor SP1, der maßgeblich an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist (Good et al., 1996; Wells et al., 1996). SP1 ist ein multifunktional wirkender Promotor der Transkription, der durch Interaktion mit verschiedenen Faktoren (TBP, E2F, CREB usw.) den Übergang von  $G_1$  zu S- Phase reguliert. In Herzmuskelzellen konnten verschiedene Gruppen bereits die Beteiligung von CaM und Calcineurin an dessen Aktivierung zeigen, die durch eine MEK- ERK- und NFAT- Aktivierung vermittelt wurde (Sanna et al., 2005; Shen et al., 2001). Die Präsenz des Transkriptionsfaktors fördert den Übergang zur S- Phase (Birnbaum et al., 1995), seine reduzierte Expression in Mibefradil- und Verapamil- behandelten Linseneithelzellen könnte bereits ein Hinweis auf die  $\text{Ca}^{2+}$ - Abhängigkeit dieses Prozesses sein. Die ebenfalls verminderte Expression von SP1 nach Behandlung der Zellen mit dem CaMKII- und dem ERK- Inhibitor unterstützen diese Aussage und belegen eine Beteiligung der Proteinkinasen an der mitogenen Signalübertragung in HLE-B3 Zellen (vgl.3.3.1/3.3.2).

Neben den bisher genannten existieren eine Reihe anderer Proteine, die an der Vermittlung mitogener Signale auf diesem MAPK- abhängigen Weg beteiligt sein könnten. Da die Expression des Transkriptionsfaktors RELA (p65) ebenfalls durch Inkubation der HLE-B3- Zellen mit den verschiedenen Blockern (Mibefradil, Verapamil, KN-93, GW 5074) vermindert werden konnte, kann eine Beteiligung des NF $\kappa$ B (Nuclear factor kB)- Signalweges nicht ausgeschlossen werden. Dieser konnte bereits mit ERK- vermittelten Zellwachstum in Verbindung gebracht werden (Liang et al., 2007), wobei p65 eine zentrale Rolle durch Interaktion mit SP1 (Liu et al., 2004) einzunehmen scheint. Dieser entweder durch Traf-4- oder Raf-1- Aktivierung induzierte Prozess, zieht eine Modifizierung von MEKK1 und IKK (conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase) nach sich (Nawata et al., 2003; Zhou et al., 2003). Diese wiederum vermitteln Dimerisierungs-, Phosphorylierungs- und Transitionsprozesse zwischen p65 und p105 (Parameswaran et al., 2006), die zur Transkription verschiedener anti- apoptotischer und proliferativer Proteine führen (Bonvin et al., 2002; Sanchez-Perez et al., 1998). Beide Transkriptionsfaktoren (p65, p105) wurden nach Inkubation der HLE-B3 Zellen mit Mibefradil und Verapamil vermindert exprimiert und können daher ebenfalls mit Ca<sup>2+</sup>- vermittelten Wachstumsereignissen in Verbindung gebracht werden. In jedem Fall scheint allerdings eine Beteiligung von CaMKII, Raf-1 und ERK1/2 in HLE-B3 Zellen von Bedeutung für die nachfolgenden Prozesse zu sein, da die Expression der verschiedenen Transkriptionsfaktoren auch durch die Blockierung der einzelnen Proteinkinasen (CaMKII, ERK1/2) beeinflusst werden konnte (vgl.3.3.1/3.3.2).

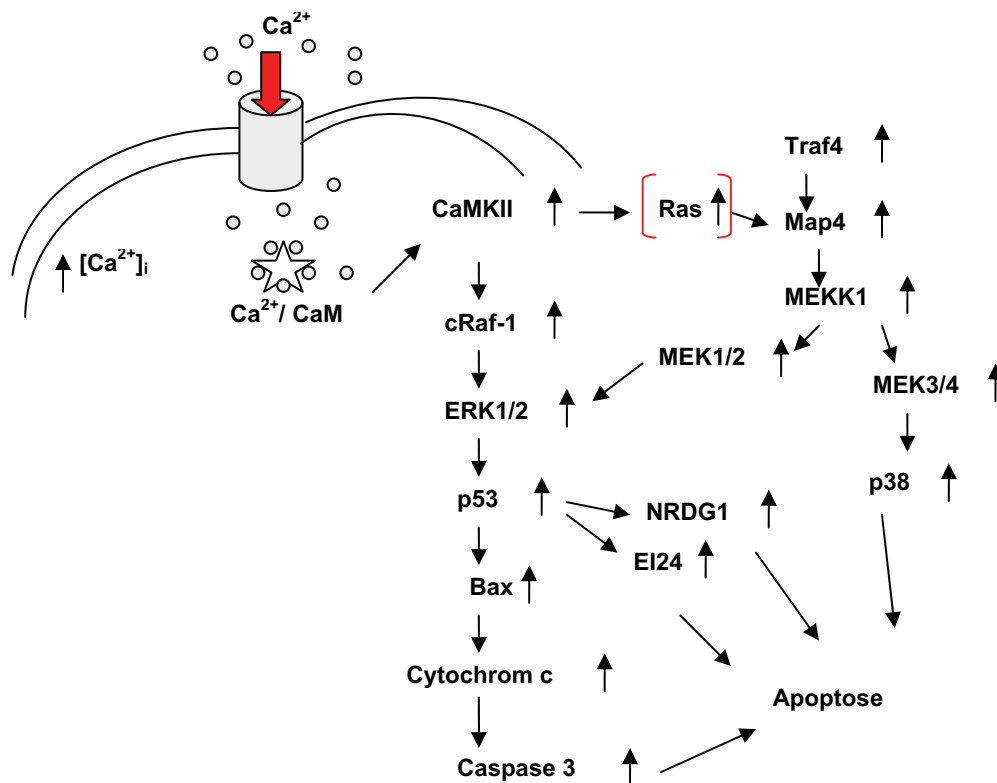
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch Blockierung von Ca<sub>v</sub>s das Wachstum von HLE-B3 Zellen inhibiert werden kann. Die in dieser Arbeit gezeigten Resultate belegen eine Beteiligung der Proteinkinasen CaMKII, Raf-1 und ERK1/2 an den Ca<sup>2+</sup>- abhängigen mitogenen Prozessen in diesen Zellen, diese vermitteln entweder direkt oder indirekt über andere zwischengeschaltete Kinasen proliferative Signale. Durch die Ergebnisse, die mit Hilfe des Ca<sup>2+</sup>- Aktivators Bay K 8644 gewonnen werden konnten, scheint die Beteiligung der Ca<sub>v</sub>s an zellulären Wachstumsprozessen unumstößlich.

### 4.3 Einfluss von $\text{Ca}_v$ -Antagonisten auf Zelltod humaner Linsenepithelzellen

$\text{Ca}^{2+}$  kann neben der Vermittlung von proliferativen Zellfunktionen durch Verschiebung der Ionen zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten auch zytotoxische Effekte wie Apoptose oder Nekrose nach sich ziehen. Apoptose, einer der best bekannten Wege des Zelltods, kann auf extrinsischen oder intrinsischen Signalwegen ausgelöst werden (Kerr et al., 1972). Einer der viel diskutierten Mediatoren für den programmierten Zelltod ist  $\text{Ca}^{2+}$ , dessen Feinregulation über Tod oder Leben der Zelle entscheidend zu sein scheint. Die Auslösemechanismen des programmierten Zelltods durch  $\text{Ca}^{2+}$  können vielfältig sein. Zum einen könnte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pool des endoplasmatischen Retikulums (ER) entleert werden und somit verschiedene apoptotische Signalwege in Gang setzen (Kaufmann et al., 2000), zum anderen wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem Mitochondrium durch Aktivierung eines Proteinkomplexes (PTP), bestehend aus verschiedenen Ionenkanälen, als wichtiges proapoptotisches Signal beschrieben (Halestrap, 2006; Weis et al., 1995).

Eine Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms und damit ein Anstieg der intrazellulären Ionenkonzentration wurde ebenfalls in Zusammenhang mit apoptotischen Vorgängen gebracht (Li et al., 2002a). Eine solche Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle durch einen vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom konnte in dieser Arbeit mit Hilfe des L-Typ Agonisten Bay K 8644 in HLE-B3 Zellen gezeigt werden und bereits in anderen Arbeiten mit Hilfe von Calcimycin in Linsenepithelzellen des Hasen nachgewiesen werden (Li et al., 2002a). Wie im vorangegangenen Kapitel ausführlich diskutiert, konnte durch eine Inkubation mit Bay K 8644 über einen Zeitraum von 24 Stunden eine verstärkte Proliferationsrate, die Aktivierung von CaMKII, Raf-1 und ERK1/2 sowie verschiedener Transkriptionsfaktoren in HLE-B3 Zellen beobachtet werden. Nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden allerdings schienen die Zellen morphologisch verändert und obwohl es zu keiner Veränderung in der Aktivierung der Proteinkinasen (CaMKII, Raf-1, ERK1/2) kam, konnten diverse Apoptose-Marker nachgewiesen werden. Der dauerhafte Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$  in der Zelle scheint ein notwendiges Ereignis zur Induktion von Apoptose zu sein (McConkey et al., 1990; McConkey and Nutt, 2001; Orrenius, 2004; Orrenius et

al., 2007). Dieses kann bspw. über die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Aktivierung der Protein-Phosphatase 2B (PP-2B) (Asai et al., 1999) erfolgen, die Bad, ein in dephosphoryliertem Zustand pro- apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie (Gross et al., 1999a), dephosphorylieren kann (Wang et al., 1999).



**Abb.4.2: Schematische Darstellung des  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Zelltods induziert durch den L-Typ Agonist Bay K 8644.** Hierbei erfolgt durch die Aktivierung von CaMKII eine Raf-1 und ERK1/2- Phosphorylierung, die zur Aktivierung von p53 führt. Diese kann einmal über NRDG1 oder EI24 zur Induktion von Apoptose führen oder zum anderen durch eine Aktivierung von Bax zu einer Caspase3- vermittelten Induktion von apoptotischen Prozessen führen. Weiterhin kann es entweder durch CaMKII oder durch Traf4 zu einer Map4- vermittelten Aktivierung von p38 kommen, die Apoptose auslösen kann.

Außerdem führt ein Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - in HLE-B3 Zellen zu einer verstärkten Aktivierung von Traf-4 (Tumornekrosefaktor – Rezeptor assoziierter Faktor 4), der über eine Interaktion mit MEKK1 und darauffolgender Aktivierung von MEK3/4 die Phosphorylierung von p38 (MAPK11/12/13/14) nach sich ziehen kann, welche maßgeblich an einer  $\text{Ca}^{2+}$ - induzierten Vermittlung apoptotischer Vorgänge beteiligt zu sein scheint (Lotem and Sachs, 1998; Weston et al., 2003). Da durch 48-stündige Inkubation der HLE-B3 Zellen



mit Bay K 8644 die Aktivität von CaMKII, Raf-1 und ERK1/2 nicht herabgesetzt werden konnte, ist eine Beteiligung dieser Kinasekaskade an einem  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Zelltod durchaus denkbar. Durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Ras-Aktivierung (Rosen et al., 2000) könnte ERK1/2 und die der Kinase vorgeschalteten Proteine (MEK1/2 und Raf-1) phosphoryliert werden (Li et al., 2002a) und eine verstärkte p53 Expression nach sich ziehen (Agarwal et al., 1998). Bax, ein direktes Target von p53, das ebenfalls durch eine Inkubation mit Bay K 8644 reguliert werden konnte, könnte durch die Interaktion mit Bad oder Bcl-xl im Mitochondrium (Gross et al., 1999a) zur Aktivierung von Caspase-3 zur Induktion apoptotischer Vorgänge in humanen Linsenepithelzellen führen.

Während die Induktion von Apoptose durch erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom scheinbar auch durch CaMKII, Raf-1 und ERK1/2 vermittelt werden kann, scheint eine Blockade des Einstroms den Zelltod nicht auf diesem Wege zu vermitteln, da sowohl bei 24- als auch bei 48-stündiger Inkubation mit Mibefradil und Verapamil die Aktivität aller drei Kinasen herabgesetzt war. Bereits in Tumorzellen konnte durch die Inhibierung von CaMKII mittels KN-93 die Fragmentierung von DNA nachgewiesen werden (Rodriguez-Mora et al., 2005). Obwohl in Muskelzellen eine verstärkte Wachstumsrate durch eine ERK1/2-Aktivierung auch bei einer verminderten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration gezeigt werden konnte (Kip et al., 2005), wird in der gleichen Arbeit die Induktion von Apoptose durch eben diese verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ - Spiegel beschrieben. Dabei konnte durch die Applikation von Verapamil eine verstärkte Expression von Bax und Cytochrom c sowie eine Aktivierung der Caspasen 9 und 3 nachgewiesen werden, was eine Beteiligung der Mitochondrien auf diesem Weg der Apoptoseinduktion nahelegt. Andere Arbeiten belegen eine verminderte Proliferation und verstärkte Apoptose durch Verapamil aufgrund einer Inhibierung von Wachstumsfaktoren durch den Antagonisten (Guigliano et al., 1982), auf einem p53- unabhängigen Weg (Shchepotin et al., 1997) und durch die Veränderung des Membranpotenzials (Nebe et al., 2002).

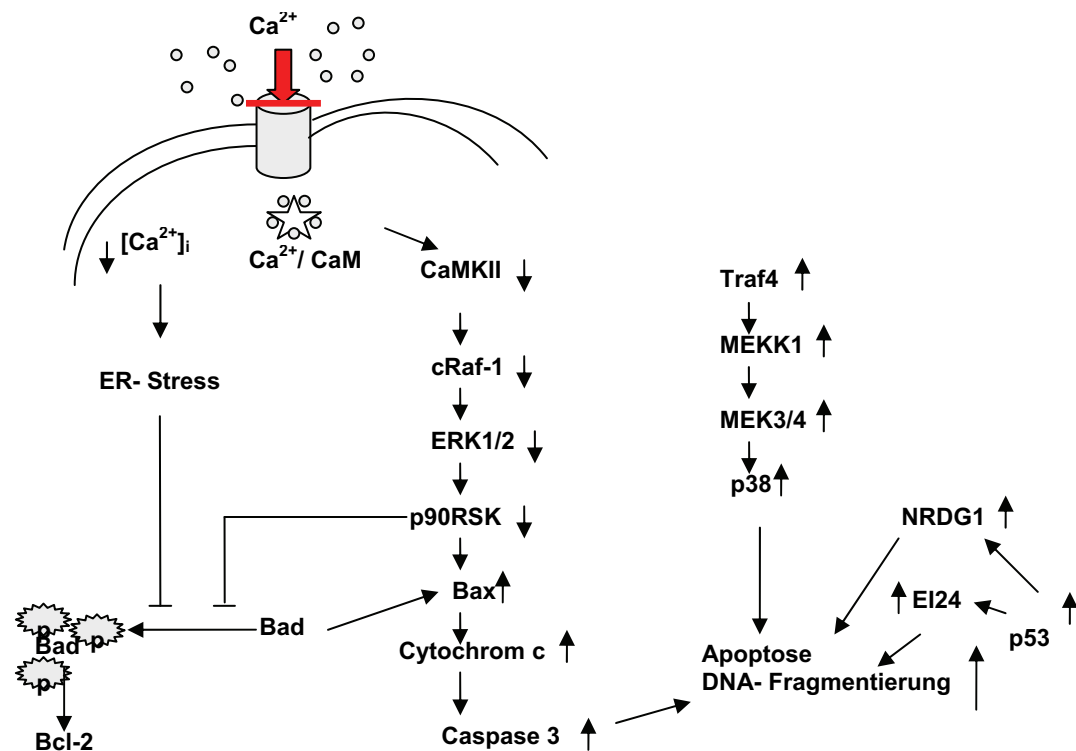
Die vorangegangenen Untersuchungen an humanen Linsenepithelzellen zeigen neben der Reduktion der Kinasen (CaMKII, c-Raf und ERK1/2) eine verstärkte Expression von Bax, Traf-4, EI24, NRDG1 und SFN sowie eine Aktivierung von Caspase 3 nach 48- stündiger Inkubation mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -

Kanalantagonisten Mibefradil und Verapamil. Durch eine sich stark verändernde Bax/ Bcl- 2 Ratio in Richtung Bax und eine Caspase- Aktivierung könnte eine Beteiligung der Mitochondrien durchaus in Frage kommen (vgl.3.2.3). Eine durch die Blockierung des  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms bedingte Induktion apoptotischer Vorgänge könnte auch aufgrund der verstärkten Expression der Apoptose-Marker EI24 und NRDG1, beides ebenfalls Targets von p53, hingegen der zahlreich postulierten Ansicht in diesen Zellen auch auf p53- abhängigem Weg erfolgen. Die Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher als Folge des reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms und der dadurch verminderten Konzentration des Ions in der Zelle (ER- Stress), die durch eine Bax- vermittelte Caspase 3- Aktivierung zu einer Fragmentierung der DNA führen kann, ist somit möglicherweise Aktivator von p53, das nun aufgrund seiner Funktion als „DNA- damage response gene“ Apoptose induziert. Die Überladung der Speicher oder wie in diesem Fall die Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ - Speicher können zur Veränderung von Proteinfaltung und zellulärem Stress führen, die über die verschiedensten Mechanismen zur Induktion apoptotischer Prozesse führen (Orrenius et al., 2007).

Eine andere Möglichkeit der Apoptoseinduktion scheint die Traf-4- vermittelte p38- Aktivierung in diesen Zellen darzustellen, da eine äußerst starke Expression des Tumornekrosefaktor- Rezeptor assoziierten Faktors 4 nach der Behandlung der Zellen mit beiden Blockern zu verzeichnen war. In jedem Fall scheint allerdings p53 in den  $\text{Ca}^{2+}$ - vermittelten Zelltod humaner Linsenepithelzellen involviert zu sein.

Die Beteiligung des Aktivitätszustandes von CaMKII konnte nur auf indirektem Wege nachgewiesen werden: mit Hilfe des Inhibitors KN-93 konnte sowohl eine Proliferationshemmung als auch die Induktion apoptotischer Vorgänge gezeigt werden, wobei die Induktion apoptotischer Vorgänge, ähnlich wie bei den Kanalblockern, erst nach einer Inkubationsdauer von mindestens 48h nachgewiesen werden konnte. Die Expression der p53- assoziierten Proteine EI24 und NRDG1 wurde durch KN-93 verstärkt, Traf-4 als Mediator des p38- vermittelten Zelltods wurde ebenfalls durch Inkubation mit KN-93 stark exprimiert und die Bax/ Bcl-2 Ratio wurde zugunsten von Bax verschoben. Auch die Aktivität einer der nachgeschalteten Kinasen (ERK1/2) beeinflusste die Induktion des Zelltods in diesen Zellen p53- abhängig. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Signalkaskade über CaMKII und ERK1/2 abhängig

von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen p38- und p53- abhängige apoptotische Vorgänge auslösen kann.



**Abb.4.3: Schematische Darstellung der Induktion apoptotischer Vorgänge in HLE-B3 durch  $\text{Ca}_v$ -Blockade mittels Mibefradil und Verapamil.** Durch einen verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle wird die Phosphorylierung von CaMKII, Raf-1 ERK1/2 verhindert und somit auch die Phosphorylierung von Bad, wodurch es nun pro-apoptotische Funktionen wie die Aktivierung von Bax ausführen kann. Dies kann auch durch Depletion intrazellulärer Speicher aufgrund der verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle erfolgen. Bax vermittelt die Aktivierung von Caspase 3, die zur DANN-Fragmentierung führt und in dessen Folge p53 aktiviert werden kann.

Aufgrund der hier gezeigten Resultate und verschiedener Arbeiten anderer Gruppen ist es durchaus möglich, dass durch eine Inhibierung spezifischer spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in Zellen, die diese verstärkt und möglicherweise auch noch wachstumsabhängig exprimieren, die Regulation der Proliferation und des programmierten Zelltods nachhaltig beeinflusst werden kann. Diese Regulation kann bspw. über Kanalantagonisten erfolgen, die effektiv dosiert, spezifisch einzelne Kanäle blockieren können. Verapamil bspw. zeigte sowohl antiproliferative als auch proapoptotische Effekte in Intima- und Adventitiazellen sowie in verschiedenen Tumorzellen, ähnlich Beobachtungen

konnten auch durch Mibefradil in verschiedenen Tumorzellen und humanen Muskelzellen gemacht werden. Somit scheint die Regulation des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ , in diesem Fall durch Modulation spannungsabhängiger Kanäle, über Leben und Tod einer Zelle entscheidend zu sein. Damit könnten auch spezifische Inhibitoren wie die hier getesteten Mibefradil und Verapamil in der Prävention proliferations- bedingter Erkrankungen wie Nachstar an Bedeutung gewinnen.

## 5 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von L- und T- Typ  $\text{Ca}_v$ -Kanälen auf zelluläre Prozesse wie Wachstum und Zelltod untersucht. Vor dem klinischen Hintergrund neue Therapieansätze in der Nachstarprävention zu finden, wurden in den Analysen humane Linsenepithelzellen (HLE-B3), die maßgeblich an der Entstehung dieser proliferationsbedingten Erkrankung beteiligt sind, als Zellmodell eingesetzt.

Zunächst wurden die HLE-B3 Zellen hinsichtlich ihrer L- und T- Typ Kanalexpression untersucht, die sich bei den  $\text{Ca}_v$  der T- Subfamilie als wachstumsabhängig erwies. Die T- Typ Kanäle  $\text{Ca}_v3.1$  und  $\text{Ca}_v3.3$  wurden verstärkt in proliferierenden Zellpassagen exprimiert, während der einzig vorhandene L- Typ Kanal  $\text{Ca}_v1.2$  sowohl in proliferierenden Zellen als auch in Zellen mit stagniertem Wachstum ähnlich stark exprimiert wurde. Für beide Kanaltypen konnte eine Beteiligung am  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom in diese Zellen gezeigt werden, welche konzentrationsabhängig sowohl vom L- Typ Kanalblocker Verapamil als auch vom T- Typ Antagonisten Mibefradil blockiert werden konnte. Dieser  $\text{Ca}_v$ - vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom beeinflusste die intrazelluläre Konzentration des Ions.

Hinsichtlich ihres Wachstums zeigten die HLE-B3 Zellen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Verhalten: durch Blockierung der L- und T- Typ Kanäle konnte eine stark reduzierte Proliferationsrate beobachtet werden, während durch die Inkubation mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ - Aktivator Bay K 8644, der den Einstrom des Ions über L- Typ Kanäle erhöht, ein verstärktes Wachstum der Zellen gezeigt werden konnte. In diesem Zusammenhang wurde die Beteiligung der Proteinkinasen CaMKII, Raf-1 und ERK1/2 an der Vermittlung mitogener Signale beobachtet, die sich als abhängig vom  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom in die HLE-B3 Zellen erwies. Die Aktivität aller drei Proteine konnte durch den L- Typ Agonisten erhöht und durch eine Blockierung des  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms mittels Mibefradil und Verapamil reduziert werden.

In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss von Verapamil und Mibefradil auf apoptotische Vorgänge geprüft. Erst nach einer Inkubationsperiode von 48 Stunden mit höheren Konzentrationen beider Antagonisten konnte Apoptose in HLE-B3 Zellen induziert werden. Die Wege der Aktivierung des programmierten Zelltods scheinen allerdings abhängig vom

Ca<sup>2+</sup>- Einstrom: nachdem der L- Typ Agonist innerhalb der ersten 24 Stunden die Proliferationsrate der Zellen erhöhen konnte, führte eine Inkubation über 48 Stunden zur Induktion von Apoptose. Die Proteinkinasen CaMKII, Raf-1 und ERK1/2 scheinen unter diesen Bedingungen ebenfalls an der Vermittlung apoptotischer Vorgänge beteiligt zu sein, die eine Aktivierung von p53 oder aber p38 nach sich zieht. Im Gegensatz dazu zeigen durch einen verminderten Ca<sup>2+</sup>- Einstrom in die Zellen alle drei Proteinkinasen reduzierte Aktivität, welche zu einer verstärkten Aktivierung von Bax und damit zu einem Caspase 3-vermittelten Zelltod führen kann.

Diese Untersuchungen zeigen, dass durch eine spezifische Inhibierung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>- Kanäle die Regulation der Proliferation und des programmierten Zelltods nachhaltig beeinflusst werden kann. Die Regulation des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>, in diesem Fall durch Modulation spannungsabhängiger Kanäle, scheint über Leben und Tod einer Zelle entscheidend zu sein. Somit könnten auch spezifische Inhibitoren wie die hier getesteten Mibefradil und Verapamil in der Prävention proliferations- bedingter Erkrankungen wie dem Nachstar an Bedeutung gewinnen.

## 6. Literatur

- Agarwal,M.L., W.R.Taylor, M.V.Chernov, O.B.Chernova and G.R.Stark: The p53 network. *J.Biol.Chem. Dev.* 273, 1-4 (1998).
- Akaike,N., A.M.Brown, K.Nishi and Y.Tsuda: Actions of verapamil, diltiazem and other divalent cations on the calcium-current of *Helix* neurones. *Br.J.Pharmacol. Dev.* 74, 87-95 (1981).
- Apple,D.J., K.D.Solomon, M.R.Tetz, E.I.Assia, E.Y.Holland, U.F.Legler, J.C.Tsai, V.E.Castaneda, J.P.Hoggatt and A.M.Kostick: Posterior capsule opacification. *Surv.Ophthalmol. Dev.* 37, 73-116 (1992).
- Armstrong,J.S.: The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion. Dev.* 6, 225-234 (2006).
- Asai,A., J.Qiu, Y.Narita, S.Chi, N.Saito, N.Shinoura, H.Hamada, Y.Kuchino and T.Kirino: High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J.Biol.Chem. Dev.* 274, 34450-34458 (1999).
- Badawi,J.K., H.Li, S.Langbein, S.T.Kwon, S.Kamp and S.Bross: Inhibitory effects of L- and T-type calcium antagonists on contractions of human detrusor muscle. *Eur.J.Clin.Pharmacol. Dev.* 62, 347-354 (2006).
- Bakowski,D. and A.B.Parekh: Regulation of store-operated calcium channels by the intermediary metabolite pyruvic Acid. *Curr.Biol. Dev.* 17, 1076-1081 (2007).
- Beam,K.G. and C.M.Knudson: Calcium currents in embryonic and neonatal mammalian skeletal muscle. *J.Gen.Physiol Dev.* 91, 781-798 (1988).
- Bellomo,G., M.Perotti, F.Taddei, F.Mirabelli, G.Finardi, P.Nicotera and S.Orrenius: Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res. Dev.* 52, 1342-1346 (1992).
- Berridge,M.J.: The biology and medicine of calcium signalling. *Mol.Cell Endocrinol. Dev.* 98, 119-124 (1994).
- Berridge,M.J.: Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium Dev.* 40, 405-412 (2006).
- Berridge,M.J., M.D.Bootman and H.L.Roderick: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol. Dev.* 4, 517-529 (2003).

- Berridge, M.J., P. Lipp and M.D. Bootman: The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Dev. 1, 11-21 (2000).
- Bertelmann, E. and C. Kojetinsky: Posterior capsule opacification and anterior capsule opacification. *Curr. Opin. Ophthalmol.* Dev. 12, 35-40 (2001).
- Bertolesi, G.E., C. Shi, L. Elbaum, C. Jollimore, G. Rozenberg, S. Barnes and M.E. Kelly: The  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists mibefradil and pimozide inhibit cell growth via different cytotoxic mechanisms. *Mol. Pharmacol.* Dev. 62, 210-219 (2002).
- Bijlenga, P., J.H. Liu, E. Espinos, C.A. Haenggeli, J. Fischer-Lougheed, C.R. Bader and L. Bernheim: T-type  $\alpha_1\text{H}$   $\text{Ca}^{2+}$  channels are involved in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Dev. 97, 7627-7632 (2000).
- Birnbaum, M.J., A.J. van Wijnen, P.R. Odgren, T.J. Last, G. Suske, G.S. Stein and J.L. Stein: Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochemistry* Dev. 34, 16503-16508 (1995).
- Bonvin, C., A. Guillon, M.X. van Bemmelen, P. Gerwins, G.L. Johnson and C. Widmann: Role of the amino-terminal domains of MEKKs in the activation of NF kappa B and MAPK pathways and in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Cell Signal.* Dev. 14, 123-131 (2002).
- Bootman, M.D., M.J. Berridge and H.L. Roderick: Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr. Biol.* Dev. 12, R563-R565 (2002).
- Boynton, A.L. and J.F. Whitfield: Different calcium requirements for proliferation of conditionally and unconditionally tumorigenic mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Dev. 73, 1651-1654 (1976a).
- Boynton, A.L. and J.F. Whitfield: The different actions of normal and supranormal calcium concentrations on the proliferation of BALB/c 3T3 mouse cells. *In Vitro* Dev. 12, 479-484 (1976b).
- Bradley, J.E., U.A. Anderson, S.M. Woolsey, K.D. Thornbury, N.G. McHale and M.A. Hollywood: Characterization of T-type calcium current and its contribution to electrical activity in rabbit urethra. *Am. J. Physiol Cell Physiol* Dev. 286, C1078-C1088 (2004).
- Brooks-Frederich, K.M., F.L. Cianciarulo, S.R. Rittling and V.J. Cristofalo: Cell cycle-dependent regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  in young and senescent WI-38 cells. *Exp. Cell Res.* Dev. 205, 412-415 (1993).
- Carafoli, E.: Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Dev. 99, 1115-1122 (2002).



- Carbone, E., A. Formenti and A. Pollo: Multiple actions of Bay K 8644 on high-threshold Ca channels in adult rat sensory neurons. *Neurosci. Lett. Dev.* 111, 315-320 (1990).
- Catterall, W.A., T. Scheuer, W. Thomsen and S. Rossie: Structure and modulation of voltage-gated ion channels. *Ann. N.Y. Acad. Sci. Dev.* 625, 174-180 (1991).
- Chemin, J., A. Monteil, C. Briquaire, S. Richard, E. Perez-Reyes, J. Nargeot and P. Lory: Overexpression of T-type calcium channels in HEK-293 cells increases intracellular calcium without affecting cellular proliferation. *FEBS Lett. Dev.* 478, 166-172 (2000).
- Chen, X.L., D.A. Bayliss, R.J. Fern and P.Q. Barrett: A role for T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the synergistic control of aldosterone production by ANG II and  $\text{K}^{+}$ . *Am. J. Physiol. Dev.* 276, F674-F683 (1999).
- Chouabe, C., M.D. Drici, G. Romey and J. Barhanin: Effects of calcium channel blockers on cloned cardiac  $\text{K}^{+}$  channels  $\text{IKr}$  and  $\text{IKs}$ . *Therapie Dev.* 55, 195-202 (2000).
- Chouabe, C., M.D. Drici, G. Romey, J. Barhanin and M. Lazdunski: HERG and  $\text{KvLQT1/IsK}$ , the cardiac  $\text{K}^{+}$  channels involved in long QT syndromes, are targets for calcium channel blockers. *Mol. Pharmacol. Dev.* 54, 695-703 (1998).
- Clevenger, C.V., A.L. Epstein and K.D. Bauer: Modulation of the nuclear antigen p105 as a function of cell-cycle progression. *J. Cell Physiol. Dev.* 130, 336-343 (1987a).
- Clevenger, C.V., A.L. Epstein and K.D. Bauer: Quantitative analysis of a nuclear antigen in interphase and mitotic cells. *Cytometry Dev.* 8, 280-286 (1987b).
- Clozel, J.P., N. Danchin, P. Genton, J.L. Thomas and F. Cherrier: Effects of propranolol and of verapamil on heart rate and blood pressure in hyperthyroidism. *Clin. Pharmacol. Ther. Dev.* 36, 64-69 (1984).
- Clozel, J.P., E.A. Ertel and S.I. Ertel: Discovery and main pharmacological properties of mibefradil (Ro 40-5967), the first selective T-type calcium channel blocker. *J. Hypertens. Suppl. Dev.* 15, S17-S25 (1997).
- Clozel, J.P., M. Veniant and W. Osterrieder: The structurally novel  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker Ro 40-5967, which binds to the  $[3\text{H}]$  desmethoxyverapamil receptor, is devoid of the negative inotropic effects of verapamil in normal and failing rat hearts. *Cardiovasc. Drugs Ther. Dev.* 4, 731-736 (1990).

- Coulter, D.A., J.R. Huguenard and D.A. Prince: Characterization of ethosuximide reduction of low-threshold calcium current in thalamic neurons. *Ann. Neurol. Dev.* 25, 582-593 (1989).
- Cribbs, L.L.: T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in vascular smooth muscle: multiple functions. *Cell Calcium Dev.* 40, 221-230 (2006).
- Curtis, T.M., C. Scholfield and D.J. McGeown: Calcium signaling in ocular arterioles. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr. Dev.* 17, 1-12 (2007).
- Dai, G., Z. Zhang, M. Zhou and S. Yu: [The role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in the action mechanism of PYM-induced KB cells apoptosis]. *Zhonghua Kou Qiang. Yi. Xue. Za Zhi. Dev.* 37, 97-98 (2002).
- Enslen, H. and T.R. Soderling: Roles of calmodulin-dependent protein kinases and phosphatase in calcium-dependent transcription of immediate early genes. *J. Biol. Chem. Dev.* 269, 20872-20877 (1994).
- Ertel, E.A., K.P. Campbell, M.M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T.P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R.W. Tsien and W.A. Catterall: Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron Dev.* 25, 533-535 (2000).
- Ferrante, J., D.J. Triggle and A. Rutledge: The effects of chronic depolarization on L-type 1,4-dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in chick neural retina and rat cardiac cells. *Can. J. Physiol Pharmacol. Dev.* 69, 914-920 (1991).
- Foster, T.C.: Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell Dev.* 6, 319-325 (2007).
- Fox, J. and D.T. Green: Direct effects of calcium channel blockers on duodenal calcium transport in vivo. *Eur. J. Pharmacol. Dev.* 129, 159-164 (1986).
- Fuchs, A., M. Rigaud, C.D. Sarantopoulos, P. Filip and Q.H. Hogan: Contribution of Calcium Channel Subtypes to the Intracellular Calcium Signal in Sensory Neurons: The Effect of Injury. *Anesthesiology Dev.* 107, 117-127 (2007).
- Gatti, G., R. Masera, R. Cavallo, M.L. Sartori, D. Delponte, R. Carignola, A. Salvadori and A. Angeli: Studies on the mechanism of cortisol inhibition of human natural killer cell activity: effects of calcium entry blockers and calmodulin antagonists. *Steroids Dev.* 49, 601-616 (1987).
- Glasser, S.P., W. Frishman, W.B. White, P. Stone and M.F. Johnson: Circadian heart rate response to chronotherapy versus conventional therapy in patients with hypertension and myocardial ischemia. *Clin. Cardiol. Dev.* 23, 524-529 (2000).

- Gomora, J.C., J.A. Enyeart and J.J. Enyeart: Mibefradil potently blocks ATP-activated K(+) channels in adrenal cells. *Mol. Pharmacol. Dev.* 56, 1192-1197 (1999).
- Gonoi, T.: Patch-clamp study of developmental changes in voltage-dependent ion channels of mouse skeletal muscle fibers. *Ann. N.Y. Acad. Sci. Dev.* 707, 352-355 (1993).
- Good, L., G.P. Dimri, J. Campisi and K.Y. Chen: Regulation of dihydrofolate reductase gene expression and E2F components in human diploid fibroblasts during growth and senescence. *J. Cell Physiol Dev.* 168, 580-588 (1996).
- Gown, A.M.: Multicellular origin of parathyroid "adenomas". *N. Engl. J. Med. Dev.* 298, 53-54 (1978).
- Grant, R.L. and D. Acosta: Interactions of intracellular pH and intracellular calcium in primary cultures of rabbit corneal epithelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim Dev.* 32, 38-45 (1996).
- Gray, L.S. and T.L. Macdonald: The pharmacology and regulation of T type calcium channels: new opportunities for unique therapeutics for cancer. *Cell Calcium Dev.* 40, 115-120 (2006).
- Gray, L.S., E. Perez-Reyes, J.C. Gomora, D.M. Haverstick, M. Shattock, L. McLatchie, J. Harper, G. Brooks, T. Heady and T.L. Macdonald: The role of voltage gated T-type Ca<sup>2+</sup> channel isoforms in mediating "capacitative" Ca<sup>2+</sup> entry in cancer cells. *Cell Calcium Dev.* 36, 489-497 (2004).
- Greber, U.F. and L. Gerace: Depletion of calcium from the lumen of endoplasmic reticulum reversibly inhibits passive diffusion and signal-mediated transport into the nucleus. *J. Cell Biol. Dev.* 128, 5-14 (1995).
- Gross, A., J.M. McDonnell and S.J. Korsmeyer: BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev. Dev.* 13, 1899-1911 (1999a).
- Gross, A., X.M. Yin, K. Wang, M.C. Wei, J. Jockel, C. Millman, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and S.J. Korsmeyer: Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem. Dev.* 274, 1156-1163 (1999b).
- Grynkiewicz, G., M. Poenie and R.Y. Tsien: A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem. Dev.* 260, 3440-3450 (1985).

- Gu,Z., C.Flemington, T.Chittenden and G.P.Zambetti: ei24, a p53 response gene involved in growth suppression and apoptosis. *Mol.Cell Biol. Dev.* 20, 233-241 (2000).
- Guigliano,D., N.Passariello, S.Sgambato, R.Torella, A.Ceriello and F.D'Onofrio: Glucose metabolism in patients receiving chronic calcitonin treatment. *Diabete Metab Dev.* 8, 213-216 (1982).
- Guo,Z., S.Yikang, H.Yoshida, T.W.Mak and E.Zacksenhaus: Inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor induces apoptosis protease-activating factor-1 dependent and independent apoptotic pathways during embryogenesis. *Cancer Res. Dev.* 61, 8395-8400 (2001).
- Halestrap,A.P.: Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem.Soc.Trans. Dev.* 34, 232-237 (2006).
- Heady,T.N., J.C.Gomora, T.L.Macdonald and E.Perez-Reyes: Molecular pharmacology of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Jpn.J.Pharmacol. Dev.* 85, 339-350 (2001).
- Hecquet,C., G.Lefevre, M.Valtink, K.Engelmann and F.Mascarelli: Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelium cells: JNK1, P38 kinase, and cell death. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci. Dev.* 44, 1320-1329 (2003).
- Hermesmeyer,K., S.Mishra, K.Miyagawa and R.Minshall: Physiologic and pathophysiologic relevance of T-type calcium-ion channels: potential indications for T-type calcium antagonists. *Clin.Ther. Dev.* 19 Suppl A, 18-26 (1997).
- Hickie,R.A., J.W.Wei, L.M.Blyth, D.Y.Wong and D.J.Klaassen: Cations and calmodulin in normal and neoplastic cell growth regulation. *Can.J.Biochem.Cell Biol. Dev.* 61, 934-941 (1983).
- Hirooka,K., G.E.Bertolesi, M.E.Kelly, E.M.Denovan-Wright, X.Sun, J.Hamid, G.W.Zamponi, A.E.Juhasz, L.W.Haynes and S.Barnes: T-Type calcium channel  $\alpha 1\text{G}$  and  $\alpha 1\text{H}$  subunits in human retinoblastoma cells and their loss after differentiation. *J.Neurophysiol. Dev.* 88, 196-205 (2002).
- Hockerman,G.H., B.D.Johnson, M.R.Abbott, T.Scheuer and W.A.Catterall: Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment IIIS6 and the pore region of the  $\alpha 1$  subunit. *J.Biol.Chem. Dev.* 272, 18759-18765 (1997a).
- Hockerman,G.H., B.D.Johnson, T.Scheuer and W.A.Catterall: Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels. *J.Biol.Chem. Dev.* 270, 22119-22122 (1995).

- Hockerman, G.H., B.Z. Peterson, B.D. Johnson and W.A. Catterall: Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. Dev.* 37, 361-396 (1997b).
- Hook, S.S. and A.R. Means:  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. Dev.* 41, 471-505 (2001).
- Howe, A.K. and R.L. Juliano: Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of integrin-mediated activation of the Raf/MEK/mitogen-activated protein kinase cascade. *J. Biol. Chem. Dev.* 273, 27268-27274 (1998).
- Illario, M., A.L. Cavallo, K.U. Bayer, T. Di Matola, G. Fenzi, G. Rossi and M. Vitale: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated ERK activation. *J. Biol. Chem. Dev.* 278, 45101-45108 (2003).
- Illario, M., A.L. Cavallo, S. Monaco, E. Di Vito, F. Mueller, L.A. Marzano, G. Troncone, G. Fenzi, G. Rossi and M. Vitale: Fibronectin-induced proliferation in thyroid cells is mediated by  $\alpha\text{v}\beta 3$  integrin through Ras/Raf-1/MEK/ERK and calcium/CaMKII signals. *J. Clin. Endocrinol. Metab. Dev.* 90, 2865-2873 (2005).
- Janis, R.A., D. Rampe, J.G. Sarmiento and D.J. Triggle: Specific binding of a calcium channel activator, [ $^3\text{H}$ ]BAY k 8644, to membranes from cardiac muscle and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun. Dev.* 121, 317-323 (1984).
- Kahl, C.R. and A.R. Means: Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr. Rev. Dev.* 24, 719-736 (2003).
- Kanaide, H.: [Regulation of the vascular smooth muscle tone--the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of the contractile apparatus]. *Fukuoka Igaku Zasshi Dev.* 98, 1-10 (2007).
- Kaufmann, R., S. Patt, M. Zieger, R. Kraft, S. Tausch, P. Henklein and G. Nowak: The two-receptor system PAR-1/PAR-4 mediates alpha-thrombin-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mobilization in human astrocytoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol. Dev.* 126, 91-94 (2000).
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie and A.R. Currie: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer Dev.* 26, 239-257 (1972).
- Kip, S.N., L.W. Hunter, Q. Ren, P.C. Harris, S. Somlo, V.E. Torres, G.C. Sieck and Q. Qian:  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reduction increases cellular proliferation and apoptosis in

vascular smooth muscle cells: relevance to the ADPKD phenotype. *Circ.Res. Dev.* 96, 873-880 (2005).

Klugbauer,N., E.Marais and F.Hofmann: Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *J.Bioenerg.Biomembr. Dev.* 35, 639-647 (2003).

Kostyuk,P., N.Pronchuk, A.Savchenko and A.Verkhatsky: Calcium currents in aged rat dorsal root ganglion neurones. *J.Physiol Dev.* 461, 467-483 (1993).

Kotturi,M.F., D.A.Carlow, J.C.Lee, H.J.Ziltener and W.A.Jefferies: Identification and functional characterization of voltage-dependent calcium channels in T lymphocytes. *J.Biol.Chem. Dev.* 278, 46949-46960 (2003).

Kuga,T., S.Kobayashi, Y.Hirakawa, H.Kanaide and A.Takeshita: Cell cycle--dependent expression of L- and T-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ.Res. Dev.* 79, 14-19 (1996).

Kuga,T., J.Sadoshima, H.Tomoike, H.Kanaide, N.Akaike and M.Nakamura: Actions of Ca<sup>2+</sup> antagonists on two types of Ca<sup>2+</sup> channels in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *Circ.Res. Dev.* 67, 469-480 (1990).

Kuga,T., H.Shimokawa, Y.Hirakawa, Y.Kadokami, Y.Arai, Y.Fukumoto, K.Kuwata, T.Kozai, K.Egashira and A.Takeshita: Increased expression of L-type calcium channels in vascular smooth muscle cells at spastic site in a porcine model of coronary artery spasm. *J.Cardiovasc.Pharmacol. Dev.* 35, 822-828 (2000).

Kunert-Radek,J., H.Stepien, K.Lyson and M.Pawlikowski: Effects of calcium channel modulators on the proliferation of mouse spleen lymphocytes in vitro. *Agents Actions Dev.* 29, 254-258 (1990).

Lacinova,L.: Pharmacology of recombinant low-voltage activated calcium channels. *Curr.Drug Targets.CNS.Neurol.Disord. Dev.* 3, 105-111 (2004).

Lacinova,L.: Voltage-dependent calcium channels. *Gen.Physiol Biophys. Dev.* 24 Suppl 1, 1-78 (2005).

Lee,Y.S., B.H.Lee, S.J.Park, S.B.Kang, H.Rhim, J.Y.Park, J.H.Lee, S.W.Jeong and J.Y.Lee: 3,4-Dihydroquinazoline derivatives as novel selective T-type Ca<sup>2+</sup> channel blockers. *Bioorg.Med.Chem.Lett. Dev.* 14, 3379-3384 (2004).

Leuranguer,V., M.E.Mangoni, J.Nargeot and S.Richard: Inhibition of T-type and L-type calcium channels by mibefradil: physiologic and pharmacologic

bases of cardiovascular effects. *J.Cardiovasc.Pharmacol. Dev.* 37, 649-661 (2001).

Li,D., Y.Zhang, W.Cao, L.Sun, H.Xu and W.Lu: Regulative function of telomerase and extracellular regulated protein kinases to leukemic cell apoptosis. *J.Huazhong.Univ Sci.Technolog.Med.Sci. Dev.* 22, 292-4, 301 (2002a).

Li,D.J., Y.Z.Zhang, F.K.Meng, D.H.Zhang and W.L.Liu: Regulative function of extracellular regulated protein kinases and telomerase in apoptosis of hepatocarcinomatous and leukemic cell lines. *Zhongguo Shi Yan.Xue.Ye.Xue.Za Zhi. Dev.* 10, 294-298 (2002b).

Liang,K.C., C.W.Lee, W.N.Lin, C.C.Lin, C.B.Wu, S.F.Luo and C.M.Yang: Interleukin-1 $\beta$  induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB signaling pathways in human tracheal smooth muscle cells. *J.Cell Physiol Dev.* 211, 759-770 (2007).

Lin,L.L., M.Wartmann, A.Y.Lin, J.L.Knopf, A.Seth and R.J.Davis: cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell Dev.* 72, 269-278 (1993).

Lin,W.W. and Y.W.Hsu: Cycloheximide-induced cPLA(2) activation is via the MKP-1 down-regulation and ERK activation. *Cell Signal. Dev.* 12, 457-461 (2000).

Liu,A., P.W.Hoffman, W.Lu and G.Bai: NF-kappaB site interacts with Sp factors and up-regulates the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J.Biol.Chem. Dev.* 279, 17449-17458 (2004).

Lorca,T., A.Abrieu, A.Means and M.Doree: Ca<sup>2+</sup> is involved through type II calmodulin-dependent protein kinase in cyclin degradation and exit from metaphase. *Biochim.Biophys.Acta Dev.* 1223, 325-332 (1994).

Lory,P., I.Bidaud and J.Chemin: T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium Dev.* 40, 135-146 (2006).

Lotem,J. and L.Sachs: Different mechanisms for suppression of apoptosis by cytokines and calcium mobilizing compounds. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A Dev.* 95, 4601-4606 (1998).

Madgwick,S., M.Levasseur and K.T.Jones: Calmodulin-dependent protein kinase II, and not protein kinase C, is sufficient for triggering cell-cycle resumption in mammalian eggs. *J.Cell Sci. Dev.* 118, 3849-3859 (2005).

Maier,L.S., T.Zhang, L.Chen, J.DeSantiago, J.H.Brown and D.M.Bers: Transgenic CaMKII $\delta$ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling: reduced SR Ca<sup>2+</sup> load and activated SR Ca<sup>2+</sup> release. *Circ.Res. Dev.* 92, 904-911 (2003).

- Mazzantini,R.P., A.de Conti and F.S.Moreno: Persistent and remodeling hepatic preneoplastic lesions present differences in cell proliferation and apoptosis, as well as in p53, Bcl-2 and NF-kappaB pathways. *J.Cell Biochem. Dev.* (2007).
- McCobb,D.P., P.M.Best and K.G.Beam: Development alters the expression of calcium currents in chick limb motoneurons. *Neuron Dev.* 2, 1633-1643 (1989).
- McConkey,D.J. and L.K.Nutt: Calcium flux measurements in apoptosis. *Methods Cell Biol. Dev.* 66, 229-246 (2001).
- McConkey,D.J., S.Orrenius and M.Jondal: Cellular signalling in programmed cell death (apoptosis). *Immunol.Today Dev.* 11, 120-121 (1990).
- McGivern,J.G.: Pharmacology and drug discovery for T-type calcium channels. *CNS.Neurol.Disord.Drug Targets. Dev.* 5, 587-603 (2006).
- Means,A.R.: Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. *Mol.Endocrinol. Dev.* 14, 4-13 (2000).
- Mishra,S.K. and K.Hermsmeyer: Resting state block and use independence of rat vascular muscle  $Ca^{++}$  channels by Ro 40-5967. *J.Pharmacol.Exp.Ther. Dev.* 269, 178-183 (1994a).
- Mishra,S.K. and K.Hermsmeyer: Selective inhibition of T-type  $Ca^{2+}$  channels by Ro 40-5967. *Circ.Res. Dev.* 75, 144-148 (1994b).
- Morales,J.A., J.L.Ram, J.Song and R.A.Brown: Acetaldehyde inhibits current through voltage-dependent calcium channels. *Toxicol.Appl.Pharmacol. Dev.* 143, 70-74 (1997).
- Morales,S., P.J.Camello, S.Alcon, G.M.Salido, G.Mawe and M.J.Pozo: Coactivation of capacitative calcium entry and L-type calcium channels in guinea pig gallbladder. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol Dev.* 286, G1090-G1100(2004).
- Mosmann,T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods Dev.* 65, 55-63 (1983).
- Mottola,A., S.Antoniotti, D.Lovisololo and L.Munaron: Regulation of noncapacitative calcium entry by arachidonic acid and nitric oxide in endothelial cells. *FASEB J. Dev.* 19, 2075-2077 (2005).
- Naveh-Many,T. and M.Nechama: Regulation of parathyroid hormone mRNA stability by calcium, phosphate and uremia. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens. Dev.* 16, 305-310 (2007).



- Nawata,R., T.Yujiri, Y.Nakamura, K.Ariyoshi, T.Takahashi, Y.Sato, Y.Oka and Y.Tanizawa: MEK kinase 1 mediates the antiapoptotic effect of the Bcr-Abl oncogene through NF-kappaB activation. *Oncogene Dev.* 22, 7774-7780 (2003).
- Nebe,B., C.Holzhausen, J.Rychly and W.Urbaszek: Impaired mechanisms of leukocyte adhesion in vitro by the calcium channel antagonist mibefradil. *Cardiovasc.Drugs Ther. Dev.* 16, 183-193 (2002).
- Nebe,B., F.Kunz, A.Peters, J.Rychly, T.Noack and R.Beck: Induction of apoptosis by the calcium antagonist mibefradil correlates with depolarization of the membrane potential and decreased integrin expression in human lens epithelial cells. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol. Dev.* 242, 597-604 (2004).
- Nelson,M.T., H.Cheng, M.Rubart, L.F.Santana, A.D.Bonev, H.J.Knot and W.J.Lederer: Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science Dev.* 270, 633-637 (1995).
- Nilius,B., J.Prenen, M.Kamouchi, F.Viana, T.Voets and G.Droogmans: Inhibition by mibefradil, a novel calcium channel antagonist, of Ca(2+)- and volume-activated Cl<sup>-</sup> channels in macrovascular endothelial cells. *Br.J.Pharmacol. Dev.* 121, 547-555 (1997).
- Nuss,H.B. and S.R.Houser: T-type Ca<sup>2+</sup> current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ.Res. Dev.* 73, 777-782 (1993).
- Orrenius,S.: Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol.Lett. Dev.* 149, 19-23 (2004).
- Orrenius,S., V.Gogvadze and B.Zhivotovsky: Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. Dev.* 47, 143-183 (2007).
- Panner,A.: Is there a role for T-type Ca(2+) channel in glioma cell proliferation? *Cell Calcium Dev.* 38, 597(2005).
- Panner,A., L.L.Cribbs, G.M.Zainelli, T.C.Origitano, S.Singh and R.D.Wurster: Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells. *Cell Calcium Dev.* 37, 105-119 (2005).
- Panner,A. and R.D.Wurster: T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell Calcium Dev.* 40, 253-259 (2006).
- Parameswaran,N., C.S.Pao, K.S.Leonhard, D.S.Kang, M.Kratz, S.C.Ley and J.L.Benovic: Arrestin-2 and G protein-coupled receptor kinase 5 interact with NFkappaB1 p105 and negatively regulate lipopolysaccharide-stimulated ERK1/2 activation in macrophages. *J.Biol.Chem. Dev.* 281, 34159-34170 (2006).

- Park,G.T., H.Y.Kim, E.K.Kim and J.M.Yang: Autocrine extracellular signal-regulated kinase activation in normal human keratinocytes is not interrupted by calcium triggering and is involved in the control of cell cycle at the early stage of calcium-induced differentiation. *J.Korean Med.Sci. Dev.* 22, 290-297 (2007a).
- Park,J.H., J.K.Choi, E.Lee, J.K.Lee, H.Rhim, S.H.Seo, Y.Kim, M.R.Doddareddy, A.N.Pae, J.Kang and E.J.Roh: Lead discovery and optimization of T-type calcium channel blockers. *Bioorg.Med.Chem. Dev.* 15, 1409-1419 (2007b).
- Patel,R., M.Holt, R.Philipova, S.Moss, H.Schulman, H.Hidaka and M.Whitaker: Calcium/calmodulin-dependent phosphorylation and activation of human Cdc25-C at the G2/M phase transition in HeLa cells. *J.Biol.Chem. Dev.* 274, 7958-7968 (1999).
- Perchenet,L. and O.Clement-Chomienne: Characterization of mibefradil block of the human heart delayed rectifier hKv1.5. *J.Pharmacol.Exp.Ther. Dev.* 295, 771-778 (2000).
- Perris,A.D. and J.F.Whitfield: Calcium and the control of mitosis in the mammal. *Nature Dev.* 216, 1350-1351 (1967).
- Porter,J.D. and P.Karathanasis: Extraocular muscle in merosin-deficient muscular dystrophy: cation homeostasis is maintained but is not mechanistic in muscle sparing. *Cell Tissue Res. Dev.* 292, 495-501 (1998).
- Putney,J.W., Jr.: A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium Dev.* 7, 1-12 (1986).
- Qin,N., R.Olcese, M.Bransby, T.Lin and L.Birnbaumer: Ca<sup>2+</sup>-induced inhibition of the cardiac Ca<sup>2+</sup> channel depends on calmodulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A Dev.* 96, 2435-2438 (1999).
- Rampe,D., B.Anderson, V.Rapien-Pryor, T.Li and R.C.Dage: Comparison of the in vitro and in vivo cardiovascular effects of two structurally distinct Ca<sup>++</sup> channel activators, BAY K 8644 and FPL 64176. *J.Pharmacol.Exp.Ther. Dev.* 265, 1125-1130 (1993).
- Rampe,D., R.A.Janis and D.J.Triggle: BAY K 8644, a 1,4-dihydropyridine Ca<sup>2+</sup> channel activator: dissociation of binding and functional effects in brain synaptosomes. *J.Neurochem. Dev.* 43, 1688-1692 (1984).
- Rodman,D.M., J.Harral, S.Wu, J.West, M.Hoedt-Miller, K.A.Reese and K.Fagan: The low-voltage-activated calcium channel CAV3.1 controls proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Chest Dev.* 128, 581S-582S (2005a).

- Rodman,D.M., K.Reese, J.Harral, B.Fouty, S.Wu, J.West, M.Hoedt-Miller, Y.Tada, K.X.Li, C.Cool, K.Fagan and L.Cribbs: Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Circ.Res. Dev.* 96, 864-872 (2005b).
- Rodriguez-Mora,O.G., M.M.LaHair, J.A.McCubrey and R.A.Franklin: Calcium/calmodulin-dependent kinase I and calcium/calmodulin-dependent kinase kinase participate in the control of cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res. Dev.* 65, 5408-5416 (2005).
- Rosen,K., J.Rak, T.Leung, N.M.Dean, R.S.Kerbel and J.Filmus: Activated Ras prevents downregulation of Bcl-X(L) triggered by detachment from the extracellular matrix. A mechanism of Ras-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *J.Cell Biol. Dev.* 149, 447-456 (2000).
- Sanchez-Perez,I., J.R.Murguia and R.Perona: Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene Dev.* 16, 533-540 (1998).
- Sanna,B., O.F.Bueno, Y.S.Dai, B.J.Wilkins and J.D.Molkentin: Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol.Cell Biol. Dev.* 25, 865-878 (2005).
- Schmitt,J.M., G.A.Wayman, N.Nozaki and T.R.Soderling: Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I. *J.Biol.Chem. Dev.* 279, 24064-24072 (2004).
- Schreiber,R.: Ca<sup>2+</sup> signaling, intracellular pH and cell volume in cell proliferation. *J.Membr.Biol. Dev.* 205, 129-137 (2005).
- Shchepotin,I.B., V.Soldatenkov, J.T.Wroblewski, A.Surin, M.Shabahang, R.R.Buras, R.J.Nauta, H.Pulyaeva and S.R.Evans: Apoptosis induced by hyperthermia and verapamil in vitro in a human colon cancer cell line. *Int.J.Hyperthermia Dev.* 13, 547-557 (1997).
- Shen,M.R., C.Y.Chou, J.A.Browning, R.J.Wilkins and J.C.Ellory: Human cervical cancer cells use Ca<sup>2+</sup> signalling, protein tyrosine phosphorylation and MAP kinase in regulatory volume decrease. *J.Physiol Dev.* 537, 347-362 (2001).
- Short,A.D., J.Bian, T.K.Ghosh, R.T.Waldron, S.L.Rybak and D.L.Gill: Intracellular Ca<sup>2+</sup> pool content is linked to control of cell growth. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A Dev.* 90, 4986-4990 (1993).

- Si, J., L. Mueller and S. J. Collins: CaMKII regulates retinoic acid receptor transcriptional activity and the differentiation of myeloid leukemia cells. *J. Clin. Invest. Dev.* 117, 1412-1421 (2007).
- Sinnegger-Brauns, M. J., A. Hetzenauer, I. G. Huber, E. Renstrom, G. Wietzorrek, S. Berjukov, M. Cavalli, D. Walter, A. Koschak, R. Waldschutz, S. Hering, S. Bova, P. Rorsman, O. Pongs, N. Singewald and J. J. Striessnig: Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J. Clin. Invest. Dev.* 113, 1430-1439 (2004).
- Soderling, T. R., B. Chang and D. Brickey: Cellular signaling through multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem. Dev.* 276, 3719-3722 (2001).
- Stojilkovic, S. S., H. Zemkova and F. Van Goor: Biophysical basis of pituitary cell type-specific  $\text{Ca}^{2+}$  signaling-secretion coupling. *Trends Endocrinol. Metab. Dev.* 16, 152-159 (2005).
- Strege, P. R., C. E. Bernard, Y. Ou, S. J. Gibbons and G. Farrugia: Effect of mibefradil on sodium and calcium currents. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. Dev.* 289, G249-G253 (2005).
- Striessnig, J., H. Glossmann and W. A. Catterall: Identification of a phenylalkylamine binding region within the  $\alpha 1$  subunit of skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Dev.* 87, 9108-9112 (1990).
- Takahashi, K., H. Kameda, M. Kataoka, S. Ueno and N. Akaike: Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  antagonists and antiepileptics on tetrodotoxin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -conducting channels in isolated rat hippocampal CA1 neurons. *Neurosci. Lett. Dev.* 148, 60-62 (1992).
- Tarasenko, A. N., D. S. Isaev, A. V. Eremin and P. G. Kostyuk: Developmental changes in the expression of low-voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rat visual cortical neurones. *J. Physiol. Dev.* 509 (Pt 2), 385-394 (1998).
- Taylor, C. W.: Why do hormones stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization? *Biochem. Soc. Trans. Dev.* 23, 637-642 (1995).
- Tjandra, N., H. Kuboniwa, H. Ren and A. Bax: Rotational dynamics of calcium-free calmodulin studied by  $^{15}\text{N}$ -NMR relaxation measurements. *Eur. J. Biochem. Dev.* 230, 1014-1024 (1995).
- Tran, Q. K., D. J. Black and A. Persechini: Dominant effectors in the calmodulin network shape the time courses of target responses in the cell. *Cell Calcium Dev.* 37, 541-553 (2005).

- Van der Vring, J.A., T.J. Cleophas, E.E. Van der Wall and M.G. Niemeyer: T-channel-selective calcium channel blockade: a promising therapeutic possibility, only preliminarily tested so far: a review of published data. T-Channel Calcium Channel Blocker Study Group. *Am.J.Ther. Dev.* 6, 229-233 (1999).
- Vichi, P., A. Whelchel, H. Knot, M. Nelson, W. Kolch and J. Posada: Endothelin-stimulated ERK activation in airway smooth-muscle cells requires calcium influx and Raf activation. *Am.J.Respir. Cell Mol. Biol. Dev.* 20, 99-105 (1999).
- Wang, H.G., N. Pathan, I.M. Ethell, S. Krajewski, Y. Yamaguchi, F. Shibasaki, F. McKeon, T. Bobo, T.F. Franke and J.C. Reed: Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science Dev.* 284, 339-343 (1999).
- Wang, H.G. and J.C. Reed: Bcl-2, Raf-1 and mitochondrial regulation of apoptosis. *Biofactors Dev.* 8, 13-16 (1998).
- Weick, J.P., R.D. Groth, A.L. Isaksen and P.G. Mermelstein: Interactions with PDZ proteins are required for L-type calcium channels to activate cAMP response element-binding protein-dependent gene expression. *J. Neurosci. Dev.* 23, 3446-3456 (2003).
- Weis, M., J. Schlegel, G.E. Kass, T.H. Holmstrom, I. Peters, J. Eriksson, S. Orrenius and S.C. Chow: Cellular events in Fas/APO-1-mediated apoptosis in JURKAT T lymphocytes. *Exp. Cell Res. Dev.* 219, 699-708 (1995).
- Wells, J., P. Held, S. Illenye and N.H. Heintz: Protein-DNA interactions at the major and minor promoters of the divergently transcribed dhfr and rep3 genes during the Chinese hamster ovary cell cycle. *Mol. Cell Biol. Dev.* 16, 634-647 (1996).
- Weston, C.R., K. Balmanno, C. Chalmers, K. Hadfield, S.A. Molton, R. Ley, E.F. Wagner and S.J. Cook: Activation of ERK1/2 by deltaRaf-1: ERK\* represses Bim expression independently of the JNK or PI3K pathways. *Oncogene Dev.* 22, 1281-1293 (2003).
- Whitfield, J.F.: Calcium signals and cancer. *Crit Rev. Oncog. Dev.* 3, 55-90 (1992).
- Whitfield, J.F., R.P. Bird, B.R. Chakravarthy, R.J. Isaacs and P. Morley: Calcium-cell cycle regulator, differentiator, killer, chemopreventor, and maybe, tumor promoter. *J. Cell Biochem. Suppl Dev.* 22, 74-91 (1995).
- Whitfield, J.F., J.P. Durkin, D.J. Franks, L.P. Kleine, L. Raptis, R.H. Rixon, M. Sikorska and P.R. Walker: Calcium, cyclic AMP and protein kinase C--

partners in mitogenesis. *Cancer Metastasis Rev. Dev.* 5, 205-250 (1987).

Xia, M., J.J. Salata, D.J. Figueroa, A.M. Lawlor, H.A. Liang, Y. Liu and T.M. Connolly: Functional expression of L- and T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in murine HL-1 cells. *J. Mol. Cell Cardiol. Dev.* 36, 111-119 (2004).

Yao, J., L.A. Davies, J.D. Howard, S.K. Adney, P.J. Welsby, N. Howell, R.M. Carey, R.J. Colbran and P.Q. Barrett: Molecular basis for the modulation of native T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in vivo by  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Clin. Invest Dev.* 116, 2403-2412 (2006).

Zhao, P.L., X.T. Wang, X.M. Zhang, V. Cebotaru, L. Cebotaru, G. Guo, M. Morales and S.E. Guggino: Tubular and cellular localization of the cardiac L-type calcium channel in rat kidney. *Kidney Int. Dev.* 61, 1393-1406 (2002).

Zhou, L., A. Tan, S. Iasvovskaia, J. Li, A. Lin and M.B. Hershenson: Ras and mitogen-activated protein kinase kinase-1 coregulate activator protein-1- and nuclear factor-kappaB-mediated gene expression in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. Dev.* 28, 762-769 (2003).

Zonta, M. and G. Carmignoto: Calcium oscillations encoding neuron-to-astrocyte communication. *J. Physiol Paris Dev.* 96, 193-198 (2002).

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bad	bcl-2 antagonist of cell death
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan- tetraacetic acid
Bax	bcl-2 associated X protein
Bcl-2	apoptosis regulator bcl-2
Bcl-xl	BCL2-like
BSA	bovine serum albumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasell
Ca <sub>v</sub>	spannungsabhängige Calciumkanäle
CCA	calcium channel antagonists
CCE	kapazitativer Calciumeinstrom
cdK	cyclin dependent kinase
cDNA	copy- Desoxyribonukleinsäure
CREB	cAMP response element-binding protein
ddH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
E2F	eukaryotischer Transkriptionsfaktor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EI 24	Etoposide induced 2.4 mRNA
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	extracellular regulated kinase 1/2
FCS	Fötales Kälberserum

GADPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
HVA	high- voltage activated calcium- channels
IC <sub>50</sub>	Inhibitorkonzentration bei halbmaximalem Effekt
IKK	conserved helix- loop- helix ubiquitous kinase
InsP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
InsP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat- Rezeptor
JNK	Jun- N- terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
Kd	Dissoziationkonstante von Fura-2
LVA	low-voltage activated calcium- channels
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
Map 4	Microtubuli- assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen-activated kinase
MEK 1/2	mitogen activated protein kinase kinase 1/2
MEK 3/4	mitogen activated protein kinase kinase 3/4
MEKK 1	mitogen activated protein kinase kinase kinase 1
Mn <sup>2+</sup>	Mangan
mRNA	messenger RNA
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
n	Anzahl
NCCE	Nicht- kapazitiver Calciumeinstrom
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NFκβ	nuclear factor kappa β
NRDG 1	N- myc downstream regulated gene 1
p	Signifikanzniveau
p38	mitogen activated protein kinase p38
p42	mitogen activated protein kinase p42
p44	mitogen activated protein kinase p44
p53	Tumorprotein p53
p90RSK	ribosomale S90 Kinase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA	Proteinkinase A



PLC	Phospholipase C
R	gemessener Ratiowert einer Testsubstanz
R <sub>min</sub>	kleinster Ratiowert
R <sub>max</sub>	maximaler Ratiowert
Raf-1	murine leukemia viral oncogene homolog 1
Ras	rat sarcoma viral oncogene homolog
RELA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in b- cells 3
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Rezeptor- gekoppelte Calciumkanäle
ROI	reaktive Sauerstoffspezies
RTK	Rezeptor- Tyrosin- Kinase
RyR	Ryanodinrezeptor
SDS	Sodium-dodecylsulfat
Ser	Serin
SFN	Stratifin
SOC	Speicher- gekoppelte Calciumkanäle
SP1	SP1 Transkriptionsfaktor
TBP	TATA- Box Bindeprotein
<i>TEMED</i>	Tetramethylethyldiamin
<i>TNF</i>	<i>Tumornekrosefaktor</i>
<i>TRAF 4</i>	<i>TNF- Rezeptor assoziierter Faktor 4</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin

## 7.2 *Material*

### 7.2.1 Zellen

HLE-B3 humane Linsenepithelzelllinie, gewonnen aus humaner Linse 24h nach einer Retinopathie- Behandlung; in Passage 3 wurden die konfluenten Zellen mit Ad12-SV-40 Virus immortalisiert

## 7.2.2

## Chemikalien

AMERSHAM:	Western Blot Chemoluminescence Reagent Plus
BAKER:	Essigsäure Natriumchlorid
BIOCHROM:	Trypsin dry substance (1:250)
BIOMOL:	GW 5074 (ERK1/2- Inhibitor) KN-93 (CaMKII- Inhibitor)
BIORAD:	Acrylamid/ Bisacrylamid 29:1 Temed
FLUKA:	Lithium Chloride Ammoniumpersulfat (APS)
GIBCO:	Basismedium (DMEM) Fötales Kälberserum (FCS) Gentamycin Phosphate buffered saline (PBS)
MERK:	Calciumchlorid Dikaliumhydrogenphosphat Dinatriumhydrogenphosphat Glucose Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphosphat Mercaptoethanol Natriumhydrogencarbonat
INVITROGEN:	Desoxyribonukleotid-triphosphat (dNTP 10mM) Dithiothreitol (DTT 0.1 mM) M-MLV Reverse Transcriptase

M-MLV Reverse Transcriptase Buffer 5x, 1ml  
 Oligo (dT) Primer (20bp) 25µg  
 Rnase H-, Point Mutant, 2500 U  
 Trizol Reagent

ROCHE: Mibefradil hydrochlorid  
 Phosphataseinhibitoren  
 Proteaseinhibitoren

SERVA: Magnesiumchlorid  
 Sodiumdodecylsulfat (SDS)  
 Tris  
 Tween 20

SIGMA: Acridine Orange  
 Bradford Solution  
 Bromphenolblau  
 Bovine serum albumin (BSA)  
 Dimethylsulfoxid (DMSO)  
 Ethidiumbromid  
 Glycerin  
 Glycin  
 Low Melting Agarose  
 Ponceau Rot  
 Triton X  
 Verapamil hydrochloride

### 7.2.3 Proteine und Antikörper

ALOMONE: Ca<sub>v</sub> 3.1 (polyclonal, rabbit)  
 Ca<sub>v</sub> 1.2 (polyclonal, rabbit)  
 Ca<sub>v</sub> 3.3 (polyclonal, rabbit)  
 Ca<sub>v</sub> 1.3 (polyclonal, rabbit)

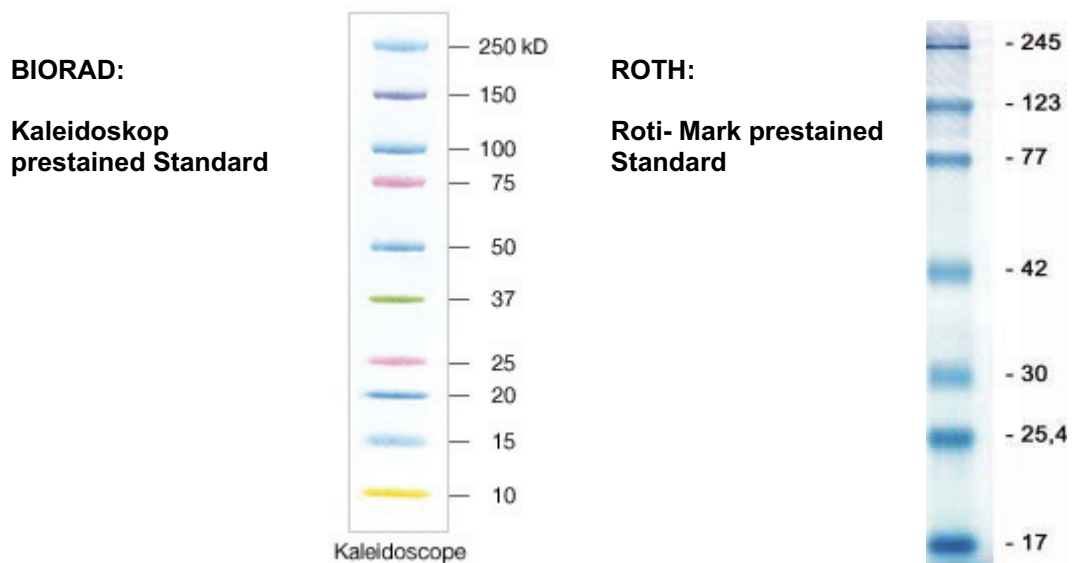
AMERSHAM: IgG-α-rabbit Sekundärantikörper

iGG-  $\alpha$ -mouse Sekundärantikörper  
bead- gekoppelte Antikörper

**BIOMOL:** phospho ERK 1/2 (polyclonal, rabbit)  
p105 (polyclonal, mouse)  
phospho CaMKII (polyclonal, rabbit)  
phospho c-Raf (polyclonal, rabbit)

**STRESSGEN:** Caspase 3 (monoclonal, rabbit)  
ERK 1/2 (polyclonal, rabbit)

#### 7.2.4 Proteingrößenstandards



#### 7.2.5 Sonstige Materialien und Hilfsmittel:

**AMERSHAM:** PVDF- Blotting- Membran

**BIOMETRA:** Biodoc Analyse Software  
Stromversorgungsgeräte  
UV- Tisch

EPPENDORF:	Bio-Photometer
	Kühlzentrifuge
	PCR- Platten
	PCR-Thermocycler
	RNase- freie Reaktionsgefäße
	Thermomixer
HERAEUS:	BBD 6220 Brutschrank
	Sterilbank
MILIPORE:	PVDF- Transfermembran
	Sterilfilter
SARSTEDT:	Falcon- Röhrchen
	Petrischalen, steril
	Pipetten, steril
	Zellkulturflaschen
	Zellkulturplatten (6-well, 12-well)
WHATMAN:	MINI Semi-dry Blotter
	Rundfilter
	SDS- Gelelektrophoresekammern

### 7.3 Tabellen

Lösung	Sammelgel	Trenngel (10%)	Trenngel (12%)
Acrylamid (29:1)	0,7 ml	2,5 ml	2,5 ml
Wasser	2 ml	3,3 ml	2,5 ml
Glycerin (87%)		4 ml	2 ml
Sammelgelpuffer pH 6,8	1,3 ml		
Trenngelpuffer pH 8		2 ml	2,5 ml
SDS (20%)	25 µl	50 µl	100 µl
APS	40 µl	50 µl	60 µl
TEMED	10 µl	10 µl	20 µl

**Tabelle 7.3.1: Pieltierschema Proteingel**

Zielmolekül	Erstantikörper	h	Zweitantikörper	h
c-Raf 1	α-phospho c-Raf 1 (1:500)	24	anti- Rabbit, (1:40000)	1
CaMKII	α-phospho CaMKII (1:500)	24	anti-Rabbit, (1:40000)	1
Caspase-3	α-Caspase-3 (1:500)	24	anti-Rabbit (1:20000)	2
ERK 1/2	α-ERK1/2 α-phospho ERK1/2 (1:500)	48	anti-Rabbit (1:20000)	24
Ca <sub>v</sub> - Familie	α-Ca <sub>v</sub> 1.2, 1.3 α-Ca <sub>v</sub> 3.1, 3.3 (1:200)	24	anti-Rabbit (1:40000)	1
p105	p105 (1:500)	24	anti-Mouse (1:10000)	

**Tabelle 7.3.2: Verwendete Antikörper**

## 7.4 Primersequenzen:

### 7.4.1 Verwendete Primer für die Untersuchungen zur bax/bcl-2 Expression:

bax 3'antisense	CATCTTCTTCCAgtggT	487 bp
bax 5'sense	gTTTCATCCAggATCgAgCAg	
bcl-2 3'antisense	gAgACAgtCCAggAgAAAT	127 bp
bcl-2 5'sense	CCTgtggATgACTgAgTACC	
GAPDH 3'antisense	TgCCTgCTTCACCACCTT	349 bp
GAPDH 5'sense	TgCATCCTgCACCACCAACT	

### 7.4.2. Verwendete Primer für die Untersuchungen zur Expression von Zellzyklus- Effektoren:

MAP4 3'antisense	TTgTCTCCTggATCTggCTgT	151 bp
MAP4 5'sense	CTCAgtCTTCAAgCACCTCCT	
RELA 3'antisense	CACCATggACCCTgAgACCTgCC	176 bp
RELA 5'sense	AgTCTggCAgCAgCTgCACTTC	
TBP 3'antisense	gACgACgGAATTCCAAAATATT	169 bp
TBP 5'sense	gAggAggCggCCgCTCACAgC	
SP1 3'antisense	gCCAAgCCCCgCCCCTTTAgCCAgt	182 bp
SP1 5'sense	ggCTggCCAAgCCgTATTCC	
HSP70 3'sense	gTgAAgATCTgCgTCTgTTgg	197 bp
HSP70 5'antisense	TTTgACAACAgtCTggTGAACC	
El24 3'sense	gAAgggCAAGTAgtTCT	207 bp
El24 5'antisense	CAAACAaggggAgCCAC	
NDRG1 3'sense	AggCgCgCgTAgtTAATTCAT	173 bp
NDRG1 5'antisense	CgCCCTCTgCTTTgggA	
SFN 3'sense	CCTgTAgtCATTAgCCCAgtACATgTCC	162 bp

SFN 5'antisense	ggAgTAgggACATgTCTgggCTAAgC	
TRAF4 3'sense	gCTgCATCCACAgTgAggAggg	173 bp
TRAF4 5'antisense	CTCAgAggTggCATgCTgggCC	

#### 7.4.2 Verwendete Primer für die Untersuchungen zur Ca<sub>v</sub>- Expression:

Ca <sub>v</sub> 1.1 Forward	gCgAggTCATggACgTggACgA	200 bp
Ca <sub>v</sub> 1.1 Reverse	gATCACCAgCCAATAgAAgAC	
Ca <sub>v</sub> 1.2 Forward	CAGgAggTgATggAgAAgCCA	316 bp
Ca <sub>v</sub> 1.2 Reverse	CTgCAggCggAACCTgTTgTT	
Ca <sub>v</sub> 1.3 Forward	ggggTCCAgCTgTTCAAgggggAA	555 bp
Ca <sub>v</sub> 1.3 Reverse	gCATgATgAggACgAACATCATg	
Ca <sub>v</sub> 3.1 Forward	gTggAgggTTTCCAaggCAgAgg	279 bp
Ca <sub>v</sub> 3.1 Reverse	gTgCTggAgCTCTTggg	
Ca <sub>v</sub> 3.2 Forward	AgAggAAgATTTcGATAAgCT	328 bp
Ca <sub>v</sub> 3.2 Reverse	gCTgTTCCAgCTggAgCgCC	
Ca <sub>v</sub> 3.3 Forward	CAGgATCCggAACTTgTT	850 bp
Ca <sub>v</sub> 3.3 Reverse	gATgAggACCAgAgCTCA	



# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name:	Anja Meißner
Geburtsdatum:	geboren am 05.02.1981 in Borna
Adresse:	Flensburger Strasse 22 18109 Rostock Tel.: 0381-5109361

## Schul Ausbildung

1987-1991	Grundschulen in Pegau und Zeitz
1991-1999	Geschwister- Scholl- Gymnasium Zeitz

## Hochschulausbildung

10/ 1999-09/ 2004	Studium der Ernährungswissenschaften an der FSU Jena,
02/ 2003-09/ 2004	Diplomarbeit am Biochemischen Institut der FSU Jena; Thema: "Einfluss von STAT 3 auf die Motilität verschiedener Epithelzelllinien" Abschluss: Diplom Trophologin
10/ 2004-10/2007	wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) am Institut für Physiologie der Universität Rostock, Mitarbeit an einem DFG- geförderten Projekt: „ Mibefradil als Therapieansatz in der Nachstarprävention“
11/2007-12/2007	wissenschaftlicher Assistent im Biomedizinischen Forschungszentrum, Abteilung Zellbiologie, Universität Rostock
seit 01/2008	wissenschaftlicher Mitarbeiter (Postdoc) Department of Physiology, University of Toronto

## Publikationen

Poehlmann TG, Fitzgerald JS, **Meissner A**, Wengenmayer T, Schleussner E, Friedrich K, Markert UR. Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3. Placenta. 2005 Apr;26 Suppl A:S37-41.

Cramer A, Kleiner S, Westermann M, **Meissner A**, Lange A, Friedrich K. Activation of the c-Met receptor complex in fibroblasts drives invasive cell behaviour by signalling through transcription factor STAT3. J Cell Biochem. 2005 Jul 1;95(4):805-16.

Fitzgerald JS, Tsareva SA, Poehlmann TG, Berod L, **Meissner A**, Corvinus FM, Wiederanders B, Pfitzner E, Markert UR, Friedrich K. Leukemia inhibitory factor triggers activation of signal transducer and activator of transcription 3, proliferation, invasiveness, and altered protease expression in choriocarcinoma cells. Int J Biochem Cell Biol. 2005 Nov;37(11):2284-96. Epub 2005 Mar 17.

**Meissner A**, Noack T. Modulation of proliferation in lens epithelial cells (LECs) via calcium channel blockers: Mibefradil as an inhibitor of mitogen activated kinase 3 (ERK1/2). Acta Physiol 186, 178. 2006.

**Meissner A**, Noack T. Voltage gated calcium channels modulate the calcium induced proliferation of human lens epithelial cells. Acta Physiol 189. 2007.

**Meissner A**, Nebe B, Beck R, Guthoff R, Noack T. Importance of calcium and potassium currents in human lens epithelial cells (hLEC) and the effect of the calcium channel blocker Mibefradil. TRACE ELEMENTS AND ELECTROLYTES; 2007, S: 228-234

**Meissner A**, Noack T. Proliferation of human lens epithelial cells (HLE-B3) is inhibited by blocking of voltage gated calcium channels. Pflugers Arch. 2008 Oct;457(1):47-59.

**Meissner A**, Noack T. Ca<sup>2+</sup>- mediated proliferation is mediated by CaMKII, Raf-1 and ERK1/2 in human lens epithelial cells. submitted

## Poster und Vorträge

**Meissner A**, Noack T. The T- Type calcium channel blocker Mibefradil inhibits potassium currents in human lens epithelial cells

Poster zur 103. Tagung der DOG/ SOE, 24.-28. September 2005, Berlin

**Meissner A**, Noack T. Charakterisierung von Calcium- und Kaliumkanälen in humanen Linsenepithelzellen und deren Beeinflussung durch verschiedene Modulatoren.

Vortrag zur Augenärzterweiterbildung, 8.September 2005

**Meissner A**, Noack T. Modulation of proliferation in lens epithelial cells via calcium channel blockers: Mibefradil as an inhibitor of mitogen activated kinase 3

Poster zum Joint Meeting of the German Society of Physiology, 26.-29. März 2006, München

**Meissner A**, Hopp HH, Noack T. Ionenkanalmodulation und Zellproliferation

Vortrag anlässlich des 11. Treffen der Physiologen des Ostseeraumes, 10. Mai 2006, Lübeck

**Meissner A**, Noack T. Proliferation of human lens epithelial cells is determined by sustained intracellular calcium levels

Poster zur 104. Tagung der DOG, 21.-24. September 2006, Berlin

**Poster erhielt den Posterpreis der DOG**

**Meissner A**, Noack T. Voltage gated calcium channels modulate the calcium induced proliferation of human lens epithelial cells

Poster zum Joint Meeting of the German Society of Physiology, 25.-28. März 2007, Hannover

**Meissner A**, Noack T. Spannungsabhängige Calciumkanäle (Cav) modulieren die Ca<sup>2+</sup>- induzierte Proliferation in humanen Linsenepithelzellen (hLEZ).

Vortrag anlässlich des 12. Treffen der Physiologen des Ostseeraumes, 11. Mai 2007, Kiel

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorgelegte Arbeit noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat. Außer den in dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden habe ich keine weiteren Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Rostock, den 20. Juli 2007

Anja Meißner

## **Dankesworte**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Thomas Noack danke ich dafür, dass er mir die Möglichkeit gab, an diesem Projekt zu arbeiten, für die produktive Zusammenarbeit, für sein Vertrauen und seine Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Rudolf Schubert, der stets bereit war, meine zu Papier gebrachten geistigen Ergüsse zu korrigieren und mir durch seine kompetenten Anmerkungen stets Raum für neue Ideen und Diskussionen bot. Bei den Mitarbeitern des Instituts für Physiologie der Universität Rostock möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die vielseitige Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima bedanken.

Schlussendlich danke ich den Menschen von ganzem Herzen, die mich zu dem gemacht haben, was ich heute bin – meine Familie. Meinen Eltern gebührt ein großer Dank für die andauernde Unterstützung und den Zuspruch, all das schaffen zu können. Stefan und Doreen möchte ich für die vielen geopfert Stunden beim Lesen meines Manuskripts danken. Christian danke ich dafür, dass er mich bei all meinen Entscheidungen unterstützt hat, was letztendlich einen großen Anteil an der erfolgreichen Durchführung dieser Arbeit hatte.