

**Molekulare und zellbiologische Untersuchungen zum
Wirkmechanismus des Ionenkanalantagonisten Mibefradil an
humanen Linsenepithelzellen zur Entwicklung einer präventiven
Therapiestrategie des Nachstars**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer.nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von:

Arne Weidmann, geb. am 17.04.1979 in Wismar

Rostock, 03.Februar.2009

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0168-1

1. Gutachter: PD Dr. J. Barbara Nebe
Arbeitsbereich Zellbiologie
Medizinische Fakultät
Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. Birgit Piechulla
Institut für Biowissenschaften, Biochemie
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Groth
Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
Naturwissenschaftliche Fakultät
Universität Halle-Wittenberg

Datum der Einreichung : 03. Februar 2009

Datum der Verteidigung: 31. August 2009

1. EINLEITUNG	- 1 -
1.1. Anatomie und Funktion der Linse im menschlichen Auge	- 1 -
1.2. Linsenepithelzellen	- 2 -
1.3. Katarakt und Nachstar	- 3 -
1.3.1. Allgemeines	- 3 -
1.3.2. Der Nachstar – Definition und Differenzierung	- 4 -
1.3.3. Inzidenz des Nachstars	- 5 -
1.4. Aktueller Stand der Forschung	- 6 -
1.4.1. Derzeitige Therapien des Nachstars und mechanische Präventionsansätze	- 6 -
1.4.2. Pharmakologische Ansätze zu Nachstarprävention	- 7 -
1.4.3. Freisetzungssysteme	- 8 -
1.4.4. Kalziumkanalantagonisten	- 9 -
1.4.5. Der Kalziumkanalantagonist Mibefradil	- 9 -
1.5. Zelladhäsion und Signalwege	- 12 -
1.5.1. Mechanismus der Zelladhäsion	- 12 -
1.5.2. Integrin-vermittelte und Ionenkanal-gesteuerte Signalwege	- 14 -
1.6. Ziel der experimentellen Arbeit	- 15 -
2. MATERIALIEN	- 17 -
2.1. Reagenzien	- 17 -
2.2. Materialien	- 18 -
2.3. Medien, Lösungen und Puffer	- 19 -
2.4. Ionenkanal - Antagonisten	- 21 -
2.4.1. Der Kalziumkanal-Antagonist Mibefradil	- 21 -
2.4.2. Die Ionenkanalblocker Ethosuximid, Verapamil und 4-Aminopyridin	- 21 -
3. METHODEN	- 22 -
3.1. Zellen und Zellkultur	- 22 -
3.1.1. HLE-B3	- 22 -
3.1.2. Primäre humane Linsenepithelzellen (hLEZ)	- 22 -
3.2. Geräte	- 23 -
3.2.1. Konfokale Laser-Raster-Fluoreszenzmikroskope	- 23 -
3.2.2. Prinzip der Rasterelektronenmikroskopie	- 24 -
3.2.3. Prinzip der Transmissionselektronenmikroskopie	- 25 -
3.2.4. Durchflusszytometrie	- 25 -

3.2.5. Bionas Sensorchips	- 27 -
3.2.5.1. Allgemeiner Aufbau des Bionas Sensorchips	- 27 -
3.2.5.2. Der IDES-Sensor zur Messung der Adhäsion	- 27 -
3.2.6. Bio-Plex Suspensionsarray-System	- 28 -
3.3. Fluoreszenzfärbungen und Analysen	- 29 -
3.3.1. Analyse der Integrin-Untereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 1$	- 29 -
3.3.2. Färbung des Aktinzytoskeletts	- 30 -
3.3.3. Mikroskopische Untersuchung von ROCK-2	- 30 -
3.4. Quantitative Integrinexpressionsmessung	- 31 -
3.5. Proliferationsmessung von HLE-B3	- 31 -
3.6. BD Power Blot-Analyse von Signalproteinen	- 32 -
3.7. Zellkultivierung auf den Sensorchips und Versuchsaufbau	- 33 -
3.8. Bio-Plex Phosphoprotein-Assay	- 34 -
3.9. Grün fluoreszierendes Protein (GFP)-Vinkulin	- 35 -
3.9.1. Vermehrung des GFP-Vinkulin-Konstrukts	- 35 -
3.9.2. Transfektion von Linsenepithelzellen	- 35 -
3.9.3. Versuchsansätze und Auswertung der Vinkulin-Versuche	- 36 -
3.10. Vorbereitung der Zellen für das REM: Kritische Punkttrocknung	- 37 -
3.11. Herstellung von Dünnschnitten für das TEM	- 37 -
3.12. Immobilisiertes (mikroverkapseltes) Mibefradil	- 38 -
3.12.1. Mikroverkapselung von Mibefradil in PLGA	- 38 -
3.12.2. Proliferationsuntersuchungen mit verkapseltem Mibefradil	- 39 -
3.12.3. Live/Dead Vitalitätstest	- 39 -
3.13. MTS-Test	- 39 -
3.14. Western Blot	- 40 -
3.15. Statistische Auswertungen	- 41 -
4. ERGEBNISSE	- 42 -
4.1. Zellmorphologie unter Einfluss von Mibefradil	- 42 -
4.2. Analyse des Adhäsionskomplexes bei HLE-B3 Zellen und hLEZ	- 43 -
4.2.1. Expressionsanalyse von Vinkulin mittels Western Blot	- 43 -
4.2.2. Analyse GFP-transfizierter Zellen unter Mibefradil-Einfluss	- 44 -
4.2.2.1. Mikroskopische Untersuchung der Mobilität der Vinkulinkontakte	- 44 -
4.2.2.2. Quantitative Auswertung der Mobilität der Vinkulinkontakte	- 46 -
4.2.2.3. Quantifizierung von Länge und Anzahl der Vinkulinkontakte	- 47 -

4.3. Zellflächenanalyse	- 51 -
4.4. Einfluss der Ionenkanalblocker auf HLE-B3 Zellen	- 52 -
4.4.1. BD Powerblot Analyse	- 53 -
4.4.2. Lokalisation und Expression von ROCK-2	- 53 -
4.4.3. Untersuchung des Aktinzytoskeletts	- 55 -
4.4.4. Zeitabhängige Adhäsion unter Stoffoffeinfluss	- 57 -
4.4.5. Analyse der Zellzyklusphasen	- 60 -
4.4.6. Untersuchungen zur Expression der Integrinuntereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 1$	- 63 -
4.4.7. Vergleich des Stoffumsatzes unter Stoffoffeinfluss	- 67 -
4.4.8. Untersuchungen von Signalwegen	- 68 -
4.5. Vergleich der Sensitivität von konfluenten und subkonfluenten HLE-B3 Zellen auf Mibefradil	- 72 -
4.5.1. Analyse der Zellzyklusphasen	- 75 -
4.5.2. Vergleich der zeitabhängigen Adhäsionsmessungen	- 77 -
4.5.3. Messung der Stoffwechselaktivität	- 79 -
4.6. Versuche mit mikroverkapseltem Mibefradil	- 80 -
4.6.1. REM- und TEM-Analysen des immobilisierten, verkapselten Mibefradils	- 80 -
4.6.2. Zellkulturversuche mit den Immobilisaten	- 82 -
4.6.2.1. Stoffwechselaktivität unter Einfluss des freigesetzten Mibefradils	- 82 -
4.6.2.2. Live/Dead Vitalitätstest	- 83 -
4.6.2.3. Analyse der Zellzyklusphasen	- 84 -
5. DISKUSSION	- 86 -
6. ZUSAMMENFASSUNG	- 98 -
7. LITERATURVERZEICHNIS	- 100 -
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 122 -
9. ANHANG	- 124 -
9.1. Danksagung	- 124 -
9.2. Eidesstattliche Erklärung	- 125 -
9.3. Publikationen und Präsentationen	- 126 -

1. Einleitung

1.1. Anatomie und Funktion der Linse im menschlichen Auge

Das Auge des Menschen ist ein komplexes Organ. Die Linse des menschlichen Auges spielt für das Erfassen der Umwelt eine wichtige Rolle und stellt ein biochemisch und morphologisch hochgradig spezialisiertes Organ dar. Die Funktionen der Linse bestehen in ihrer Brechkraft, in der Befähigung des Auges zur Akkomodation und in ihrer protektiven Filterwirkung für Makula und Netzhaut durch Absorption von UV-Strahlung zwischen 300 und 400 nm.

Die Linse ist ein bikonvexes Organ mit einem äquatorialen Durchmesser von 9-10 mm und einem axialen Durchmesser von 4-5 mm beim Erwachsenen. Bei Neugeborenen beträgt der Durchmesser ca. 6-7 mm und die Dicke 3-4 mm [33, 59]. Die gesunde Linse eines Erwachsenen hat einen relativ geringen Wasseranteil von 65 %. Sie besitzt einen refraktiven Index, der sich sowohl von dem des Kammerwassers, als auch von dem des Glaskörpers unterscheidet. Zwischen Linseninnerem und Kammerwasser herrscht ein Ionenkonzentrationsgradient. Dieser wird durch eine aktive Kalium-Pumpe, die sich vor allem in der Membran der humanen Linsenepithelzellen befindet, aufrechterhalten [59]. Die Linse selbst enthält keine Gefäße und Nervenfasern und der Metabolismus erfolgt durch die Diffusion von Nährstoffen des Kammerwassers. Dabei ist das Linsenepithel mit den Linsenepithelzellen für den Ionentransfer sowie die Entfernung von Abbauprodukten verantwortlich [81].

Die Linse besteht neben der Kapsel aus der Linsenrinde und einem mehrschichtigen Linsenkern (Abbildung 1). In der äquatorialen Linsenregion unter der Linsenkapsel werden in einer Wachstumszone (Zona germinativa) stetig neue Zellen gebildet. Diese formen sich im weiteren Verlauf in längliche Fasern um und produzieren transparente Proteine, die Kristalline. Die neu gebildeten Fasern liegen den älteren Fasern schließlich zwiebelschalenähnlich von außen auf. Durch diesen Prozess nimmt die Dicke der Linsenrinde mit zunehmendem Alter immer mehr zu, wodurch diese immer starrer wird. Die Aufhängung der Linse am Ziliarkörper erfolgt über die seitlich in den Äquator der Linsenkapsel einstrahlenden Zonulafasern (Fibrae zonulares). Die Zonulafasern übertragen zudem die Akkomodationsbewegung des Ziliarmuskels auf die Linsenkapsel (Abbildung 1).

Die Linse ist ektodermalen Ursprungs. Die ursprüngliche Basalmembran des Ektoderms stellt die äußere Begrenzung der Linse, die Linsenkapsel, dar. Sie besteht aus einer elastischen, lichtmikroskopisch strukturlosen und durchsichtigen Basalmembran, die im vorderen und paraäquatorialen Bereich die größte Dicke aufweist. Wichtige Strukturkomponenten sind Kollagen I, III und IV, Laminin, Heparansulfat-Proteoglykane, Entactin und Fibronectin [81]. Aufgrund ihrer Elastizität spielt die Basalmembran eine wichtige Rolle in der Linsenverformung bei der Akkomodation. Neben der Aufgabe als Permeabilitätsbarriere dient die Linsenkapsel als Insertionsstruktur der Zonulafasern.

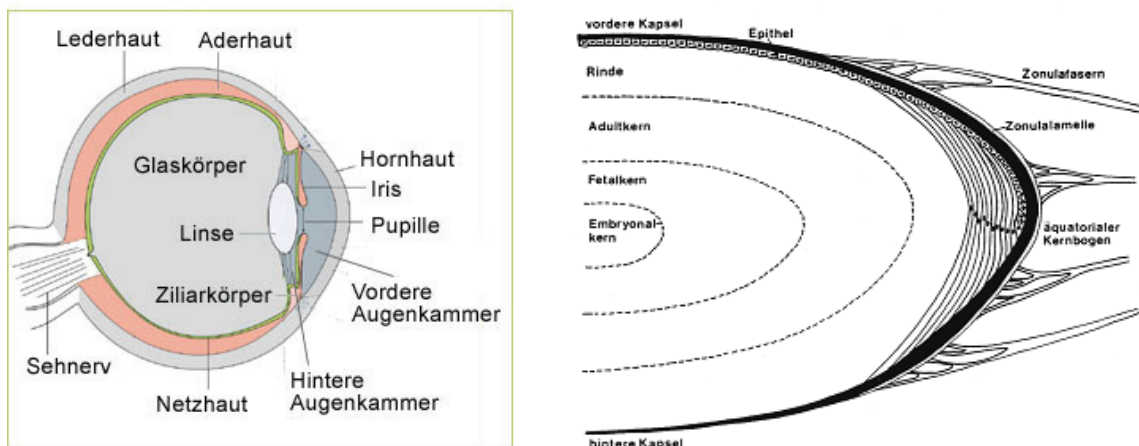


Abbildung 1: Allgemeiner Aufbau des Auges (linkes Bild) und Aufbau der Linse (rechtes Bild), nach Naumann [81]

Neben der Form der Linse sowie der regelmäßigen Anordnung der Linsenfasern sind die Struktur, Konzentration und Löslichkeit der Kristalline im Zytosol von besonderer Bedeutung für die Transparenz und den Brechungsindex. Diese speziellen Proteine machen über 90 % der wasserlöslichen Proteine der Linse aus. Neben den α -Kristallinen, welche etwa ein Drittel des gesamten Linsenproteingehaltes darstellen, treten noch β - und γ -Kristalline auf. Sie spielen eine große Rolle bei Regulationsprozessen in der Linse [34].

1.2. Linseneithelzellen

Unter der vorderen Kapsel befindet sich eine einschichtige Lage kubischer Epithelzellen. Diese Zellen bilden die Linseneithelzellen (LEC), die sich teilen und in horizontale Richtung bewegen können. Die Zelldichte nimmt vom Zentrum in Richtung Peripherie zu. Die Form der Zellen ändert sich ebenfalls bei der Linsenbildung. Sie werden schmaler, zylindrischer

und länger, bevor sie sich zu Linsenfäsern entwickeln. Epithelzellen am zentralen vorderen Pol befinden sich im Ruhezustand, Zellen des Äquators hingegen zeigen eine hohe Stoffwechselaktivität und höchste Mitoseraten. Hier erfolgt die Differenzierung der Epithelzellen in Fäserzellen. Die primären Linsenfäsern bilden sich durch Elongation der Zellen der posterioren Region. Die sekundären Linsenfäsern entstehen durch Proliferation der äquatorialen Zellen [59]. Unter der Hinterkapsel finden sich unter physiologischen Bedingungen keine Epithelzellen. Die Linsenepithelzellen spielen eine zentrale Rolle bei der Nachstarentwicklung.

1.3. Katarakt und Nachstar

1.3.1. Allgemeines

Etwa 95 % aller Personen über 65 Jahre haben sichtbare Linsentrübungen (Katarakt, Altersstar), die auf unterschiedlichen Wegen entstehen können. Bei intakter Linsenkapsel kann es zur Bildung einer Cataracta subcapsularis anterior durch Pseudometaplasie der anterioren Linsenepithelzellen kommen. Diese transformieren in fibrozytenähnliche Zellen und bilden eine fibröse Kollagen-Matrix, wodurch eine Faltenbildung der vorderen Kapsel hervorgerufen werden kann [22]. Die Bildung einer Cataracta subcapsularis posterior ist ebenfalls möglich. Die Ursache liegt dabei in der Migration der Linsenepithelzellen aus der äquatorialen Ebene. Auch hier findet eine Transformation der LEC in fibroblastenähnliche Zellen statt, welche aber keine extrazelluläre Matrix bilden. Die Zellen wandeln sich in große ballonförmige Zellen, die sogenannten Wedl-Blasenzellen, mit kleinem Nukleus und vakuolenreichem Zytoplasma um.

Im fortgeschrittenen Alter sind hingegen degenerative Änderungen des Auges durch physiologische Veränderungen zu beobachten. Es treten nekrotische Veränderungen des Epithels, Verkalkungen, Einlagerungen von z.B. Kalziumoxalat sowie Glykogengranula auf und bilden den sogenannten Altersstar.

Der Graue Star wiederum hat seine Ursachen in vielen Bereichen. Dazu zählen Allgemeinerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus), Verletzungen des Auges oder Augenerkrankungen (Iritis, Netzhautgefäßentzündungen). Ferner können Medikamentenwirkungen, Augenoperationen sowie Erkrankungen während der Schwangerschaft (z.B. Röteln oder Toxoplasmose) dazu beitragen. Symptome des Grauen Stars beinhalten eine allmähliche Abnahme des Sehvermögens, Blendung sowie eine

veränderte Farbwahrnehmung. Der Graue Star wird in 99 % der Fälle operativ ohne Komplikationen behandelt. Es handelt sich um den am häufigsten durchgeführten Eingriff in der Ophthalmologie. Die vorwiegende Operationsmethode ist die Zertrümmerung der Linse durch Ultraschall und Absaugen der Trümmer (Phakoemulsifikation) mit anschließender Implantation einer künstlichen Intraokularlinse (IOL). Allerdings ergeben sich nicht selten Komplikationen im weiteren Verlauf nach erfolgreicher Operation. Die Entwicklung eines Nachstars (Cataracta secundaria) ist eine der häufigsten Komplikationen nach Kataraktoperationen.

1.3.2. Der Nachstar – Definition und Differenzierung

Die Definition des Nachstars ist uneinheitlich. Prinzipiell wird darunter eine sekundäre Eintrübung der Linse nach Kataraktextraktion verstanden. Die Cataracta secundaria (Nachstar) ist eine der bedeutendsten Langzeitkomplikationen bei der Phakoemulsifikation sowie der extrakapsulären Kataraktoperation. Durch das Operationstrauma kommt es zu einer verstärkten Proliferation und einer damit verbundenen Regenerationsfähigkeit der verbliebenen Linsenepithelzellen im Kapselsack, vor allem der Linsenepithelzellen in der äquatorialen Region. Anatomisch wird der Nachstar in hinteren bzw. vorderen Nachstar unterschieden, je nach Lokalisation der auftretenden Trübung. Naumann unterscheidet die Cataracta secundaria simplex und die Cataracta secundaria accreta [81]. Histologisch wird im Wesentlichen in fibrotischen und regenerativen Nachstar differenziert. Der fibrotische Nachstar entsteht durch Proliferation und Migration der adhären Epithelzellen aus der Äquatorzone in Richtung Vorder- oder Hinterkapsel und ihrer Transformation zu Myofibroblasten. Es wird eine fibröse Matrix mit Kollagen, neuer Basalmembran und Hyaluronsäure gebildet.

Der regenerativen Nachstar bildet sich ebenfalls nach einem Transformationsprozess. Die proliferierenden und migrierenden Zellen bilden Konglomerate auf dem vorderen Areal der Hinterkapsel und trüben so wiederum die optische Achse [81].

Der Nachstar kann in zweierlei Hinsicht klinisch relevant sein. Einerseits wird durch ihn die Sehfunktion stark beeinträchtigt, sobald die Kapseltrübung die optische Achse erreicht [9, 10]. Andererseits kann durch eine Kapselfibrose und -schrumpfung eine Dezentrierung der Intraokularlinsen hervorgerufen werden, was wiederum zu Behinderungen des Sehvermögens führt. Der Nachstar ist somit ein multifaktorielles Problem.

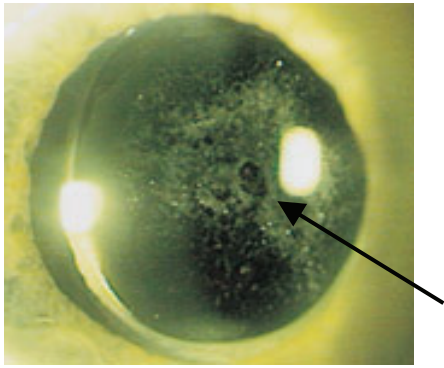


Abbildung 2: Foto eines Nachstars [Quelle: www.dr-hoeh.de]. In der Linsenkapsel sind deutlich die Linsenepithelzellen, welche die optische Achse eintrüben, zu erkennen (siehe Pfeil).

Üblicherweise wird die Nachstarhäufigkeit durch die Rate der Laser-Kapsulotomien ausgedrückt. Bei diesem Verfahren der YAG-Kapsulotomie (YAG: Yttrium-Aluminium-Granat) wird die Kapselmembran mit Hilfe eines Lasers zerstört und somit eine deutliche Visusverbesserung erreicht. Die Kriterien zur Indikationsstellung sind jedoch sehr subjektiv und eher ungenau [11, 15]. Die Nachstarbewertung beruht heute auf computergestützter Bildanalyse, wobei ein Retroilluminationsbild der Hinterkapsel analysiert wird. Dadurch ist eine Standardisierung der Bearbeitung möglich. Die Bewertung mit dieser Methode ist objektiver als die Analyse der YAG-Kapsulotomierate.

1.3.3. Inzidenz des Nachstars

Die Inzidenz des Nachstars ist in der Literatur sehr unterschiedlich angegeben. Sie variiert zwischen 10 und 50 % in einem Zeitraum von 3-5 Jahren nach der Operation [62, 70]. Es besteht ebenfalls eine Abhängigkeit zwischen Häufigkeit bzw. Schwere der Nachstarentwicklung von verwendeten Intraokularlinsen, Operationstechniken sowie auch dem Alter der Patienten. Mehrere Studien belegen z.B., dass Diabetes mellitus die Nachstar-raten ebenfalls erhöht. Die pathophysiologischen Mechanismen sind dabei noch nicht vollständig verstanden. Bei Kindern beträgt die Wahrscheinlichkeit, innerhalb von fünf Jahren einen postoperativen Nachstar zu entwickeln, über 95 % [68].

1.4. Aktueller Stand der Forschung

1.4.1. Derzeitige Therapien des Nachstars und mechanische Präventionsansätze

Trotz der Weiterentwicklung von Operationstechniken und Implantatmaterialien stellt der Nachstar immer noch die häufigste Langzeitkomplikation nach Kataraktoperationen dar [1, 48]. Eine effiziente und anerkannte Therapie des Nachstars ist die Behandlung mit der Nd:YAG-Laserkapsulotomie. Hierbei handelt es sich um eine Behandlung mit einem gepulsten Festkörperlaser mit 1054 nm Wellenlänge. Vorteile dieser Methode sind die nicht-operative Behandlung sowie die ambulante Anwendung. Jedoch können Nebenwirkungen wie Beschädigungen der Intraokularlinse, intraokularer Druckanstieg oder Entzündung der mittleren Augenhaut (Uveitis) auftreten [8]. Die Entfernung eines Nachstars kann nicht nur durch Laserbehandlung, sondern auch chirurgisch durch eine bulbuseröffnende Operation erfolgen. Bei der chirurgischen Nachstardiszission tritt allerdings im Vergleich zur Nachstarentfernung mit dem YAG-Laser eine erhöhte Inzidenz an Komplikationen wie Netzhautablösung und zystoide Makulaödeme auf. Weitere Folgen können Blutungen, Entzündungen sowie eine Kapselruptur an der Hinterkapsel sein [60, 83]. Bei Erhalt der Hinterkapsel ist nach Entfernung des Nachstars zudem die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs sehr hoch, da weiterhin Linsenepithelzellen im Kapselsack verbleiben. Diese können erneut einen regenerativen Nachstar verursachen.

Ein wichtiger Faktor für die Prävention des Nachstars sind die pro Jahr durch die Behandlungen entstehenden großen Kosten im Gesundheitssystem. Daher wurde in den vergangenen Jahren an neuen Therapieansätzen geforscht, um die Entstehung des Nachstars zu verhindern und somit die Kosten für eine Therapie einzusparen. Die Prävention des Nachstars ist daher von besonderer Bedeutung.

Bislang gibt es verschiedene Ansätze, um den Nachstar effektiv zu inhibieren. Fortschritte im Design der Intraokularlinsen haben bereits zu einer Reduktion des Nachstars und somit auch der Nachstarhäufigkeit geführt. Verbesserungen sind dabei durch die Geometrie der Intraokularlinsen erzielt worden [7]. Es wurden scharfe rechteckige Optikkanten konstruiert, die eine Barriere für migrierende Linsenepithelzellen darstellen [6, 8, 41]. Eine andere Methode ist eine spezielle Kapselknickbildung mit Verklebung der beiden Kapselblätter, welche ähnlich den scharfen Kanten der Intraokularlinsen sind [41].

Diese Techniken können die Nachstarproblematik aber nicht generell lösen [9, 58]. Die Häufigkeit und Ausprägung des Nachstars wurde dadurch zwar gesenkt, jedoch nicht gänzlich vermieden [2].

1.4.2. Pharmakologische Ansätze zu Nachstarprävention

Die Applikation von Pharmazeutika als Präventivansatz wird schon seit über 25 Jahren untersucht. Bevor es zur Ausbildung des Nachstars kommt, durchlaufen die Linsenepithelzellen verschiedene Prozesse wie Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung [37]. Diese einzelnen Prozesse stellen Angriffspunkte für Pharmazeutika dar. Bereits Ende der 1980er-Jahre wurde ein Konzept zur „Osmo-Lavage“ des Kapselsackes vorgestellt [24]. Dabei wurden osmotisch wirksame Lösungen wie z.B.: destilliertes Wasser eingesetzt. Verschiedene Arbeiten zeigten eine zellschädigende Wirkung auf Linsenepithelzellen, aber auch auf das umgebende Gewebe [16, 24].

Bisher sind Zytostatika experimentell am besten untersucht worden. Dazu zählen Antimetabolite wie Methotrexat [66], Arabinosylcytosin [45] und zytostatische Antibiotika wie Mitomycin C [5, 32, 33, 35]. Auch das Mitosespindelgift Colchizin, welches die zellulären Mikrotubuli schädigt sowie Anthrazykline, wie Daunomycin und Daunorubicin, sind getestet worden [43, 47, 63]. Der große Nachteil dieser zytotoxischen Substanzen ist die toxische Wirkung auf umliegende Gewebe. In Tierstudien wurden beträchtliche Schädigungen von Hornhautendothel, Iris, Ziliarkörper und Retina festgestellt [33, 63, 77].

Weiterhin kamen in *in vitro*-Versuchen nichtsteroidale Antiphlogistika wie Diclofenac [13, 32, 50] und Steroide wie Dexamethason zum Einsatz [4, 32, 45]. Diese Substanzen zeigten eine geringere Proliferationshemmung im Vergleich zu den antimetabolischen bzw. adhäsionshemmenden Pharmazeutika wie Colchizin oder Trypsin [32]. In klinischen Studien konnte keine wesentliche nachstarverringende Wirkung festgestellt werden [3, 19].

Ein weiterer Ansatz zur Nachstarprävention ist die Hemmung von Adhäsionsrezeptoren wie den Integrinen mit dem Desintegrin Salmosin und RGD-Peptiden (RGD = Aminosäuresequenz Arginin-Glyzin-Asparagin), die zur Adhäsions- sowie zur Migrationshemmung von Linsenepithelzellen führen [32, 36, 37, 55, 56]. Zudem wurden proteolytische Enzyme wie Trypsin [30], Dispase [49] sowie EDTA [5, 49, 52] erfolgreich *in vitro* appliziert. Allerdings zeigten diese Erfolg versprechenden Ansätze in anschließenden Tierversuchen nur eine unzureichende Hemmung der Migration und Proliferation von Linsenepithelzellen [1].

Darüber hinaus wurden *in vitro* Immunotoxine und osmotisch wirksame Lösungen bei Linsenepithelzellen zur Nachstarprävention eingesetzt. Speziell wurden die Immunotoxine Polylysin-Saporin-Konjugat, bFGF-Saporin sowie MDX-RA verwendet [12, 58]. In Tierversuchen traten wiederum Komplikationen wie beispielsweise Entzündungsreaktionen auf [12]. Untersuchte osmotisch wirksame Lösungen sind z.B. Alkohol (30 % in *Aqua dest.*),

0,01 % n-Dodecylsulfat-Natriumsalz und *Aqua dest* [16, 18, 22, 89]. Aufgrund von auftretenden Nebenwirkungen bei der nonselektiven intraokularen Applikation wurde die klinische Anwendung oftmals nicht weiter verfolgt.

Weitere Substanzen wie z.B. Heparin [21], Suramin [26] und Tranilast-Augentropfen [80] zeigten eine signifikante Reduktion des Nachstars. Allerdings konnte der Nachstar nicht wirkungsvoll verhindert werden. Viele der Substanzen sind interessant für die Nachstarprävention, allerdings sind ihre Wirkmechanismen noch nicht vollständig geklärt.

1.4.3. Freisetzungssysteme

Das Hauptproblem bei der Applikation von Wirkstoffen liegt meist in der kurzen, aber nicht ausreichenden Wirkzeit. Daher wurden Freisetzungssysteme entwickelt, welche die Stoffe kontinuierlich abgeben sollen. Häufig wurde ein Intraokularlinsen-gebundenes System verwendet, welches Daunorubicin bzw. Indomethacin freisetzt [63]. In Tierversuchen kam es zu Komplikationen bei der Freisetzung. Weiterhin wurden Hydrogel-IOLs appliziert, bei denen die Substanzen in dem Polymernetzwerk der Linsen verankert waren [3, 71]. Auch hier konnte keine antiproliferative Wirkung nachgewiesen werden. Einzig Polymethylmethacrylat-Intraokularlinsen (PMMA-IOLs) mit dem Wirkstoffen Thapsigargin und FGF2-Saporin in Verbindung mit einer Heparin-Oberflächenbeschichtung ermöglichten eine signifikante Hemmung der Proliferation von Linsenepithelzellen ohne Schädigung des umliegenden Gewebes [8, 17]. Pandey *et al.* testeten einen 5-Fluoruracil-freisetzenden Kapselspannring im Tierversuch. Eine Verminderung des Nachstars konnte nur durch eine mechanische Blockade festgestellt werden. Der Einfluss des Zytostatikums war nicht nachweisbar [57]. Eine Variante der pharmakologischen Behandlung durch Freisetzung beinhaltet ein Implantat auf Acryl-Basis mit einem Wirkstoffdepot. Als Wirkstoff wurde hier das Zytostatikum 5-Fluoruracil eingesetzt. Die Freisetzung erfolgt durch einen Zwei-Photon-Prozess, der mit gepulsten Lasersystemen induziert wird [82]. Viele weitere neuartige Systeme befinden sich derzeit in klinischen Studien. Dazu zählt z.B. das PerfectCapsule-System der australischen Firma Milvella, welches es ermöglichen soll, den Kapselsack mit einer Art Vakuumdeckel abzudichten und selektiv mit verschiedenen Substanzen zu spülen [16, 27, 30]. Weiterhin sind Silikonlinsen [6, 42] sowie hydrophile, scharfkantige Acrylatfaltlinsen [6] appliziert worden, mit denen erste Kurzzeitstudien einen Erfolg prognostizierten. Allerdings können erst Ergebnisse von Langzeitstudien, die bisher nicht vorliegen, Aufschluss über die Wirksamkeit geben. Aus den bisherigen Forschungen zum Thema Nachstar ergibt sich die

Schlussfolgerung, dass nur ein gezieltes Intervenieren in die Zellbiologie der Linsenepithelzellen das Problem entscheidend lösen kann.

1.4.4. Kalziumkanalantagonisten

Einen neuen speziellen Ansatz zur Nachstarprävention stellen die Kalziumkanalantagonisten dar. Kalziumkanäle in der Zellmembran spielen eine wichtige Rolle bei der zellulären Funktion und Homöostase. Kalziumkanäle gehören der Superfamilie der Transmembran-Ionenkanäle an, zu der auch spannungsabhängige Kalium- und Natriumkanäle gehören. Die Öffnung der Kalziumkanäle wird durch das Membranpotential sowie auch Hormone, Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, Toxine und Pharmaka reguliert. Spannungsabhängige Kalziumkanäle bilden eine wichtige Untergruppe und sind wesentlich an der Regulation der intrazellulären Konzentration von Ca^{2+} -Ionen, der Regulation von Enzymaktivitäten, der Genexpression, der Zellproliferation sowie Adhäsion und dem Zelltod beteiligt (Abbildung 6). Die spannungsabhängigen Kalziumkanäle lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: die HVA (high voltage aktivierte Ca-Kanäle) und die LVA (low voltage aktivierte Ca-Kanäle). Zu den high voltage aktivierten Kalziumkanälen gehört der T-Typ (transient) und zu den low voltage aktivierten Kalziumkanälen gehört der L-Typ (long lasting). Beide Gruppen unterscheiden sich durch ihre elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften [87].

Durch die adhäsionshemmende Wirkung von EDTA, ein Komplexbildner mit Kalziumbindung, konnten Nishi *et al.* nachweisen, dass Kalzium für die Aktivierung der Integrine wichtig ist. Zudem ist Kalzium in humanen Linsenepithelzellen für die Proliferation, Zellform und Adhäsion von besonderer Bedeutung [40]. Daher wurden Kalziumkanalantagonisten als Therapieansatz zur Prävention des Nachstars mit herangezogen. Tetrandin als L-Typ-Kalziumkanalblocker besitzt antiproliferative und antientzündliche Eigenschaften, wobei der Wirkmechanismus noch nicht geklärt werden konnte [38].

1.4.5. Der Kalziumkanalantagonist Mibefradil

Mibefradil wird als selektiver T-Typ-Kalziumkanalblocker beschrieben [39, 44]. Die T-Typ-Kalziumkanäle gehören zu den „low voltage activated“ Kalziumkanälen und wurden 1984

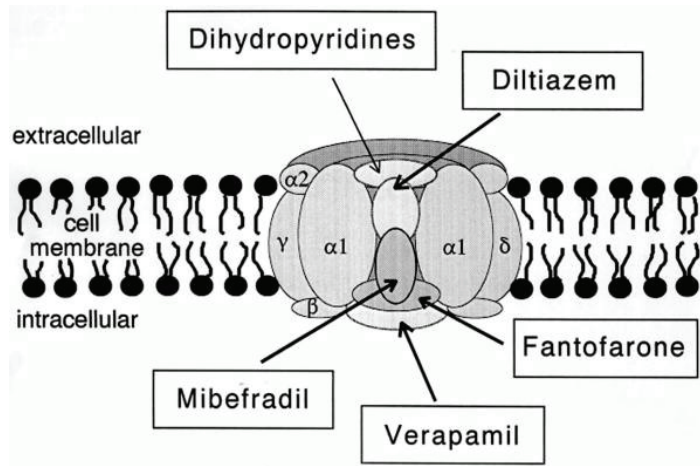


Abbildung 4: Aufbau eines spannungsgesteuerten Kalziumkanals (L-Typ) mit Wirkblockaden verschiedener Substanzen [87]

Die Elimination von Mibefradil aus dem humanen Körper geschieht größtenteils hepatisch und nur im geringen Maß auf renalem Weg. Der Wirkstoff wurde in der antihypertensiven und antipectanginösen Therapie eingesetzt. Im Jahre 1997 erfolgte die erstmalige Zulassung in Deutschland unter dem Handelsnamen Posicor[®] und Cerate[®]. Im Juni 1998 wurde Mibefradil wegen Interaktionen mit dem Cytochrom-P₄₅₀-System der Leber und daraus resultierenden Komplikationen wieder vom Markt genommen. Bei gleichzeitiger Einnahme von Mibefradil mit einigen anderen zur Blutdrucktherapie eingesetzten Medikamenten, insbesondere Betablockern, traten Wechselwirkungen auf, die zu schweren Herzrhythmusstörungen führen. Aktuell wird Mibefradil nur noch als Substanz vertrieben.

Neuere Erkenntnisse aus *in vitro*-Versuchen zeigten bereits neue Möglichkeiten in der anti-ginalen und anti-ischämischen Therapie für den Wirkstoff [14, 78]. Die Applikation von Mibefradil auf primäre humane Linseneithelzellen führte *in vitro* zu einer Depolarisation des Membranpotentials. Weiterhin konnte die Integrin-vermittelte Inhibierung der Zelladhäsion sowie die Induktion von Apoptose durch den Wirkstoff nachgewiesen werden [23, 25]. Bei Konzentrationen von 20 µM ist die Blockade von Kaliumkanälen möglich [84]. Somit bleibt die Substanz weiterhin für die Forschung bzw. die klinische Anwendung interessant.

1.5. Zelladhäsion und Signalwege

1.5.1. Mechanismus der Zelladhäsion

Im Gewebsverband stehen Zellen ständig mit benachbarten Zellen und ihrer extrazellulären Umgebung in Kontakt. Zell-Zell-Kontakte dienen der Aufrechterhaltung des Zellverbands einschließlich der Barrierefunktion und der Kommunikation zwischen den Zellen. Dazu gehören z.B. Tight Junctions. Sie limitieren durch ihre Barrierefunktion den parazellulären Transport und polarisieren die Zelle durch ihre Anordnung im apikalen Bereich. Gebildet werden die Tight Junctions durch transmembranäre Occludine und Claudine. Diese sind über intrazelluläre Proteine, wie z. B. das Zonula occludens Protein-1 (ZO-1) mit dem Aktingerüst verbunden [51].

Für die Adhäsion an Oberflächen und im Gewebe sind besondere Wechselwirkungen nötig. Diese Wechselwirkungen beeinflussen eine Vielzahl von Signalkaskaden, welche für Überlebens-, Differenzierungs- und auch Apoptoseprozesse wichtig sind. Es gibt bestimmte Zelladhäsionsmoleküle, die auch die Fähigkeit besitzen, Kaskaden der Signaltransduktion auszulösen und so die Zellprozesse zu beeinflussen [53]. Dazu zählen die Integrine, Cadherine sowie Selektine. Integrine stellen die wichtigste Gruppe der sogenannten Matrix-Rezeptoren dar und stehen mit vielen intra- und extrazellulären Prozessen in Verbindung. Sie bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit [75, 76]. Beide Untereinheiten besitzen neben einem längeren extrazellulären Teil (je nach Untereinheit 40-1800 Aminosäuren) eine kurze membranständige Region (20-30 Aminosäuren) sowie eine zytoplasmatische Domäne von 20-50 Aminosäuren. Beide Untereinheiten sind an der Bindung von Liganden der extrazellulären Matrix, wie z.B. Kollagen oder Fibronectin, beteiligt [100, 101, 110, 115].

Aktuell sind 18 unterschiedliche α - und acht unterschiedliche β -Untereinheiten bekannt, welche mindestens 24 Heterodimere bilden können [54]. Integrine sind transmembranös mit einem Komplex von Proteinen verbunden und in dynamische Prozesse eingebunden [61, 102].

Bei der Integrin-vermittelten Interaktion zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix sind die fokalen Kontakte im Adhäsionskomplex involviert [64, 65, 91]. Dieser Adhäsionskomplex ist ein Komplex aus einer Vielzahl von Proteinen (fokale Kontakte) und bildet die Hauptkomponente bei der Adhäsion der Zelle an die extrazelluläre Matrix (ECM). Die fokalen Kontakte vermitteln die Adhäsion zwischen der ECM und dem Aktinzytoskelett. Aktin-Stressfasern sind auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran über den fokalen Adhäsionskomplex mit den Integrinen verbunden, der neben Proteinkinasen, wie z.B. der

Einleitung

fokalen Adhäsionskinase (FAK), viele Strukturproteine wie Talin, Vinkulin und α -Aktinin enthält (Abbildung 5) [86]. Vinkulin ist einer der am besten untersuchten Bindungspartner in der Vermittlung des Aktinzytoskeletts zu den Integrinen und ist essentiell an zellulären Vorgängen wie der Ausbildung der Zellform, der Adhäsion sowie der Motilität beteiligt (Abbildung 5) [64, 65].

Vinkulin ist ein sogenanntes Multi-Ligandenprotein, da es mit einer Vielzahl struktureller und regulatorischer Proteine interagieren kann. Zu den Vinkulin-Liganden zählen Talin [116, 122, 123, 176], α -Aktinin [85, 125] und α -Catenin [132, 144], die an der Rekrutierung Vinkulins in Aktin-assoziierte Adhäsionskomplexe von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen beteiligt sind.

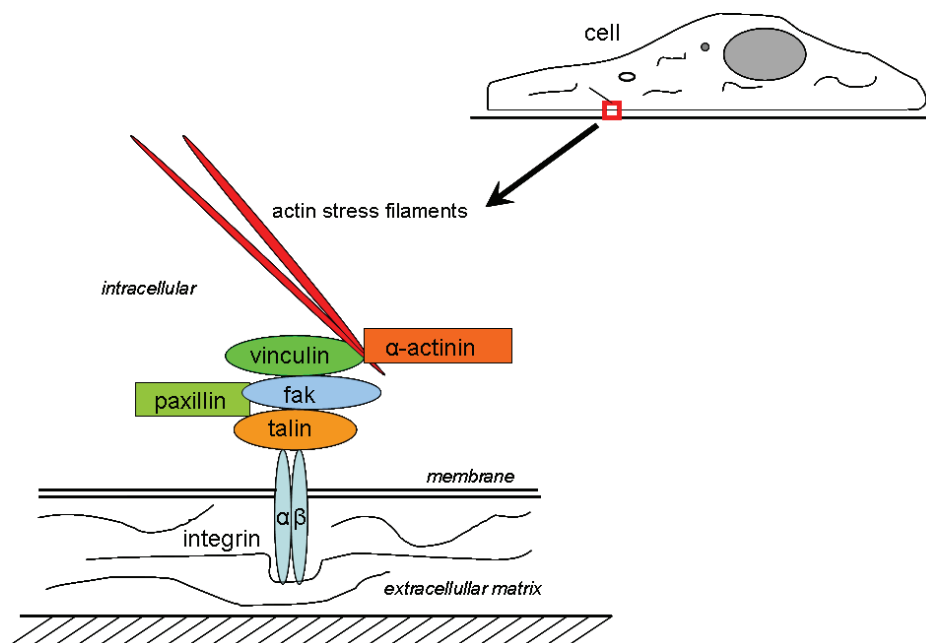


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Lokalisation von Integrinen und Vinkulin in der Zelle

Das Protein FAK ist ebenso ein zentrales Regulatorprotein. Es fungiert als Bindeglied zwischen Integrinen und z.B. der MAPK- oder AKT-Signalkaskade, wodurch das Ausbreiten der Zelle, die Migration und Proliferation gefördert wird (Abbildung 5 und 6) [103, 104, 105, 112].

1.5.2. Integrin-vermittelte und Ionenkanal-gesteuerte Signalwege

Eine Vielzahl von Signalwegen, welche mit dem Adhäsionskomplex verknüpft sind und wichtige Funktionen in der Zelle steuern, sind bereits gut untersucht worden (Abbildung 6). Einen zentralen Weg stellt der MAPK-Signalweg mit ERK1/2 und p38 dar, welcher eine Vielzahl von proliferativen aber auch apoptotischen Prozessen in der Zelle steuert.

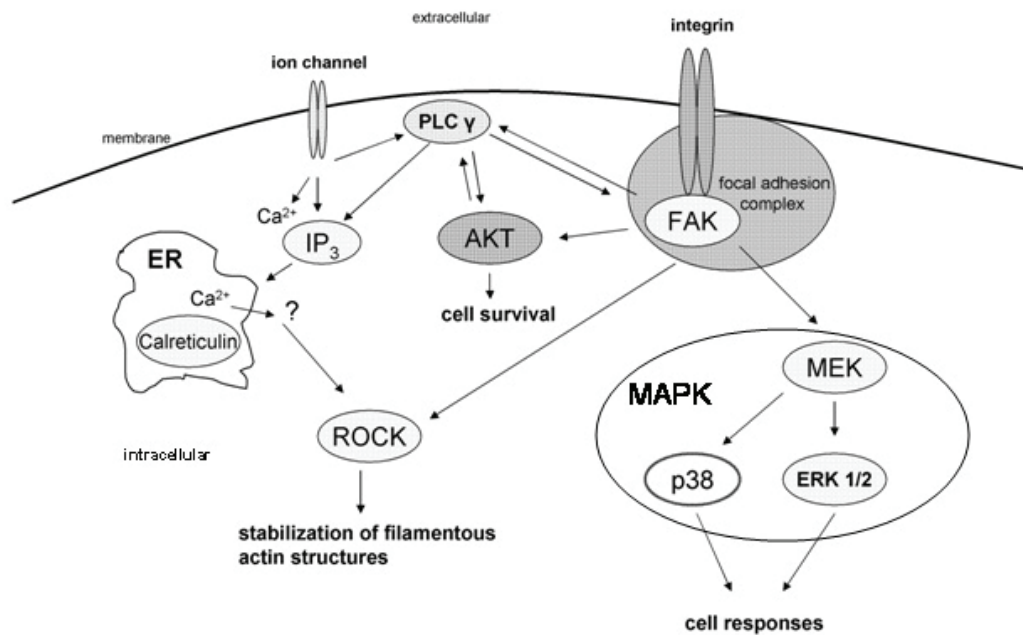


Abbildung 6: Mögliche Integrin- und Ionenkanal-vermittelte Signalwege in der Zelle.

Zellbewegung bzw. -migration wird durch Interaktionen der Zelle mit der extrazellulären Matrix und durch die Aktinzytoskelett-Reorganisation vermittelt [69]. Das Aktinzytoskelett ist das Grundgerüst einer Zelle und gibt der Zelle Form und Stabilität, welche im hohen Maße von intrazellulärem Kalzium abhängig sind. Weiterhin ist Kalzium für die Migration und viele andere Zellfunktionen elementar. Es wird durch Ionenkanäle in die Zelle hinein und wieder heraus geschleust. Die Zelle steuert damit die Homöostase. Die Ionenkanäle steuern indirekt somit auch den MAPK- sowie den AKT-Signalweg. Auch das Aktinzytoskelett wird durch verschiedenste Signalkaskaden und durch die Ionenkanäle mittels regulatorischer Proteine wie z.B. ROCK beeinflusst. Diese Mechanismen werden durch die Formation der

Fokalkontakte reguliert und kontrolliert. Zelladhäsion, -ausbreitung und -bewegungen werden durch Kalzium gesteuert [72, 74].

In diesem Zusammenhang ist z. B. die Phospholipase C $\gamma 1$ (PLC $\gamma 1$) von besonderer Bedeutung. PLC $\gamma 1$ spielt eine Schlüsselrolle in der Integrin-abhängigen Zellbewegung [67]. Intrazelluläres Kalzium wird von PLC $\gamma 1$ sowie von Calreticulin, einem kalziumbindenden Protein innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums (ER), vermittelt und gesteuert. Durch Rezeptoren an der Zellmembran und Ionenkanäle kontrolliert, hydrolysiert PLC $\gamma 1$ das stark phosphorylierte Phosphatidyl-4,5-Bisphosphat, wobei es zwei intrazelluläre Produkte erzeugt: Inositol-1,4,5-Trisphosphat, welches einen kalziummobilisierenden Botenstoff („Second messenger“) darstellt und Diacylglycerol, einen Aktivator der Proteinkinase C und den damit verbundenen AKT-Signalweg [106, 107]. AKT steuert hauptsächlich antiapoptotische Prozesse und spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des Gleichgewichtes zwischen der Zellvermehrung (Proliferation) und dem programmierten Zelltod (Apoptose). Es führt über verschiedene Stimuli zu Verschiebungen im Zellzyklus, zum Verlust der Zelladhäsion und zu DNA-Schädigungen.

1.6. Ziel der experimentellen Arbeit

Ausgangspunkt und Voraussetzung der Entstehung eines Nachstars ist die Proliferation und Migration der Linsenepithelzellen an der Kapsel. Nach einer Kataraktoperation befinden sich gelöste Linsenepithelzellen, welche wieder adhären können, sowie verbliebene, bereits adhären Zellen auf der Linsenkapsel, die eine erneute Eintrübung hervorrufen können.

Vorangegangene Arbeiten konnten generell inhibitorische Effekte des T-Typ-Kalziumkanalblockers Mibefradil dihydrochlorid auf das Auswachsen und das Zellwachstum sowie die Induktion der Apoptose bei primären humanen Linsenepithelzellen zeigen [23, 25].

Weiterführende Experimente in dieser Arbeit sollen die wissenschaftlichen Voraussetzungen schaffen, die es ermöglichen, den Einsatz des T-Typ-Kalziumkanalblockers Mibefradil als Therapeutikum für die Nachstarprävention zu etablieren. Ein wichtiges Ziel ist die Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Mibefradil auf die Integrin-vermittelte Signaltransduktion, welche zur Inhibierung der Proliferation sowie Migration der Linsenepithelzellen führt. Es soll untersucht werden, ob Mibefradil die Integrine durch Integrin-regulierte Signalwege, wie die Aktivierung der MAP-Kinasen, beeinflusst und damit auch das Aktinzytoskelett beeinträchtigt wird. Vergleichende Versuche mit anderen

Ionenkanalblockern sollen zeigen, in wieweit die Effekte auf den T-Typ-Kalziumkanalblocker Mibefradil zurückzuführen sind oder, ob diese auch durch andere Ionenkanalantagonisten hervorgerufen werden. In diesem Zusammenhang ist es von besonderer Bedeutung, ob die Wirkung von Mibefradil ihre Ursache in der Blockade von Kalziumkanälen hat oder, ob andere Mechanismen wie z.B. eine Blockade anderer Ionenkanäle eine Rolle spielen.

Für das Verständnis der inhibitorischen Effekte von Mibefradil auf die Migration der Zellen sowie die Induktion von Apoptose soll die Mobilität sowie Dynamik eines Proteins (Vinkulin) aus dem fokalen Adhäsionskomplexes eingehend betrachtet werden.

Viele bisher untersuchte pharmakologische Substanzen (Kapitel 1.4.) zeigten in *in vitro*-Versuchen inhibitorische Effekte auf Linsenepithelzellen. In Tierversuchen zeigten sich dann unerwünschte Nebenwirkungen, wie die Schädigung von umliegenden Geweben im Auge. Für zukünftige pharmakologische Therapieansätze ist die Vermeidung dieser Schädigungen von enormer Bedeutung. In dieser Arbeit sollen die Unterschiede in der Wirkung von Mibefradil auf auswachsende, stärker proliferierende Zellen und Zellen, welche im konfluenten Zellverband weniger proliferieren und bestehendes Gewebe *in vivo* simulieren, beleuchtet werden, um einen möglichen schädigenden Einfluss auf umliegende Gewebe im therapeutischen Einsatz zu vermeiden.

Zudem soll ein Ansatz für eine praktische Lösung zur Immobilisierung des Mibefradils in einem Freisetzungssystem aus dem biokompatiblen Material Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) untersucht werden. In enger Kooperation mit der Firma Micromod GmbH ist die Substanz während der Projektphase in PLGA mikroverkapselt worden. Diese Immobilisate sollen unter Beachtung ihrer Releaserate in der Zellkultur getestet werden. Dabei wird untersucht, ob das freigesetzte Mibefradil dieselbe Wirkung auf die Linsenepithelzellen wie die gelöste Substanz besitzt und, ob die Immobilisate praktikabel für weitergehende klinische Versuche sind.

2. Materialien

2.1. Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Azeton	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Agarose	Appligene Oncor, Gaithersburg, USA
4-Aminopyridin (4-AP)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
CDP-Star Detektionslösung	Roche, Basel, Schweiz
Cellfix™	Becton Dickinson, Erembodegem, Belgien
DC Proteinassay	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Dulbeccos modified Eagle medium	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Zentralapotheke, Universität Rostock
Ethosuximid (ETX)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Gentamicin	Ratiopharm, Deutschland
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glyzin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glyzerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kollagen I (Rattenschwanzkollagen)	Harbor Bio-Products, Norwood, USA
Kanamycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lysepuffer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Natriumchlorid	Reidel-de Haën, Seelze, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Serva, Heidelberg, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Materialien

Methylethylketon	Zentralapotheke, Universität Rostock
Mibefradil	Sigma, Steinheim, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Phosphat	Sigma, Steinheim, Deutschland
Phalloidin - TRITC	Sigma, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phenol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphat buffered saline (PBS)	Cambrex, New Jersey, USA
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Propidiumjodid	Sigma, Steinheim, Deutschland
RNase	Sigma, Steinheim, Deutschland
SDS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Trypton	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma, Steinheim, Deutschland
Verapamil	Sigma, Steinheim, Deutschland
Yeast Extract	Gibco, Paisley, Schottland

2.2. Materialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser, 20x20 mm und r = 11 mm, Dicke: 0,17 mm	Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig
Fotofilm	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Kryoröhrchen Cryo.S	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Objektträger, 76x76 mm	Engelbrecht, Edermünde
PVDF-Membran	Roche, Basel, Schweiz
50 ml Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
5 ml Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen T ₂₅ , T ₇₅	Greiner Bio-One, Frickenhausen
6-well, 12-well, 24-well, 48-well, 96-well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen	

2.3. Medien, Lösungen und Puffer

LB-Medium: 10 g Bacto[®] Tryptone
5 g Bacto[®] Yeast Extract
10 g NaCl
Aqua dest. ad 1 l
pH 7,0
Autoklavieren bei 121 °C für 30 min und dann auf 50 °C abkühlen lassen
50 mg Kanamycin

LB-Agar-Medium: 15 g Agar
LB-Medium ad 1 l
Autoklavieren bei 121 °C für 30 min und dann auf 50 °C abkühlen lassen
50 mg Kanamycin

Je 16 mm Petrischale wurden ca. 30 ml LB-Agar-Medium blasenfrei gegossen. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4 °C.

Trypsin-EDTA: 0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA (w/v) in PBS (Gibco Invitrogen, Karlsruhe)

Phosphat gepufferte Saline mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (PBS^{Ca2+,Mg2+}):
(Zentralapotheke der Universität Rostock)

4,335 g NaCl
0,1 g KCl
0,575 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
0,1 g KH₂PO₄
0,05 g CaCl₂ x 2 H₂O
Aqua dest. ad 0,5 l

Materialien

Einbettmedium: 30 g Glycerin
12 g Polyvinylalkohol
30 ml Aqua dest.
0,5 g Phenol
Substanzen mischen und 12 h bei 40-45 °C inkubieren
60 ml Tris 0,1 M pH 8,5
Lagerung bei 4 °C

Puffer für Western Blot

Waschpuffer pH 7,4: 4,84 g Tris (10 mM)
2,32 g NaCl (10 mM)
4 ml Tween 20 (0,1 %)
Aqua dest. ad 4 l

Blockpuffer: 285 ml Waschpuffer
15 g Milchpulver

Laufpuffer pH 8,3: 27,27 g Tris (75 mM)
126,9 g Glyzin
9 g SDS (10 mM)
Aqua dest. ad 3 l

Assaypuffer: 1,21 g Tris (10 mM)
0,584 g NaCl (10 mM)
2,03 g MgCl₂ x 6 H₂O (20 mM)
Aqua dest. ad 1 l

Transferpuffer:
(Tankblot) 9 g Tris
43,5 g Glyzin
Aqua dest. ad 3 l

2.4. Ionenkanal - Antagonisten

2.4.1. Der Kalziumkanal-Antagonist Mibefradil

Von dem T-Typ-Kalziumkanalblocker Mibefradil ((1S,2S)-2-[2-[[3-(2-benzimidazolyl propyl) methylamino] ethyl]-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphtyl-methoxy acetate dihydro-chlorid) wurde eine Stammlösung (50 mg/ml in *Aqua dest.*) hergestellt. Daraus wurde die entsprechende Menge für die gewünschte Endkonzentration entnommen und in das Komplettmedium gegeben. In den Versuchen wurden Konzentrationen von 10 μ M, 20 μ M bzw. 30 μ M Mibefradil eingesetzt [23, 25].

2.4.2. Die Ionenkanalblocker Ethosuximid, Verapamil und 4-Aminopyridin

Um den Wirkmechanismus von Mibefradil auf humane Linseneithelzellen besser zu verstehen, wurden die Zellen zum Vergleich mit Verapamil, Ethosuximid (ETX) und 4-Aminopyridin (4-AP) behandelt. Verapamil ist ein typischer L-Typ-Kalziumkanalblocker [90]. Als Stammlösung wurden 5 mg Verapamil je ml *Aqua dest.* gelöst. 4-AP stellt einen nonselektiven Kaliumkanalblocker dar, der in einer Stammlösung von 30 mg/ml in *Aqua dest.* angesetzt wurde. Ethosuximid ist ein reiner T-Typ-Kalziumkanalblocker und wurde in absolutem Ethanol dissoziiert (Stammlösung 100 mg/ml, Lagerung -20 °C). Es wurde Konzentrationen von 10 μ M Verapamil, 5 mM 4-AP und 10 mM Ethosuximid eingesetzt [23, 90, 92, 93, 94].

3. Methoden

3.1. Zellen und Zellkultur

3.1.1. HLE-B3

Die humane Linseneithelzelllinie HLE-B3 (ATCC: CRL-1142) stammt ursprünglich von einem 5-12 Monate alten Patienten mit einer Retinopathie. In der dritten Passage nach Entnahme aus dem Patienten sind die Zellen mit dem Virusvektor SV40T immortalisiert worden [95, 96]. Die Zellen wurden in Dulbeccos modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fetalem Kälberserum (engl. Fetal Calf Serum (FCS), FCS Gold, PAA) und 1 % Gentamicin (Ratiopharm) (Komplettmedium) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Das FCS Gold von der Firma PAA ist in seinen Bestandteilen genau definiert und im Gegensatz zu den meisten vertriebenen Seren nicht chargenabhängig. Das fertige Zellkulturmedium mit seinen Zusätzen wird im Folgenden als Komplettmedium bezeichnet.

Für die Versuche und zur Passage wurden die Zellen mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS) gewaschen und für 5 min mit Trypsin-EDTA inkubiert, um sie von der Oberfläche der Zellkulturflasche zu lösen. Die Protease Trypsin hemmt Adhäsionsproteine, während der Chelatbildner EDTA zweiwertige Kationen wie Ca²⁺ und Mg²⁺ bindet. Ca²⁺ und Mg²⁺ können Adhäsionsproteine stabilisieren. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in Komplettmedium aufgenommen und je nach Versuchsansatz in entsprechender Zellzahl in Zellkulturflaschen bzw. 6-, 12- oder 24-well Platten pipettiert. Im FCS enthaltene Protease-Inhibitoren hemmen die Wirkung von Trypsin-EDTA.

Für eine längere Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst, 5 min bei 2000 U/min (Hettich Universal, Tuttlingen, Deutschland) pelletiert und danach in Komplettmedium mit 10 % DMSO resuspendiert. Diese Zellsuspension ist in ein Gefriergefäß (2 ml Kryoröhrchen) überführt, mindestens 24 h auf -80 °C heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingelagert worden.

3.1.2. Primäre humane Linseneithelzellen (hLEZ)

Die Gewinnung primärer humaner Linseneithelzellen erfolgte aus der Kapsulorrhexis, welche während einer Kataraktchirurgie in der Universitätsaugenklinik Rostock entnommen

wurde. Die Kapsulorrhexis ist in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Gentamicin bei 37 °C und 5 % CO₂ für mindestens zwei Wochen in Kollagen I beschichteten 24-well Platten (BIOCOAT Col I, Greiner Bio-One) kultiviert worden, wobei die primären Zellen aus der Kapsulorrhexis herauswuchsen. Für anschließende Versuche wurden die Zellen mit PBS gespült und 30 min mit 100 µl Accutase bei 37 °C und 5 % CO₂ zum Ablösen inkubiert. Da primäre Zellen sehr empfindlich sind, bietet sich das Ablösen mit Accutase als besonders schonendes Reagens an. Für das Ausbringen von Primärzellen auf neue Oberflächen wurden wieder Kollagen I-beschichtete Zellkulturoberflächen mit Komplettmedium verwendet.

3.2. Geräte

3.2.1. Konfokale Laser-Raster-Fluoreszenzmikroskope

Gegenüber der konventionellen Lichtmikroskopie zeichnet sich die konfokale Mikroskopie durch den Vorteil der Darstellung des vom Probenobjekt emittierten Lichtes in einer Fokusebene aus. Durch eine Lochblende (pinhole, Konfokalebene) wird das Licht ober- und unterhalb der Fokusebene (= außerfokales Licht) ausgeblendet. So können hochauflösende optische Abbildungen einer Probe erzeugt werden. Zusätzlich ist es möglich, optische Schnitte mit definiertem Abstand in beispielsweise xy- oder xz-Ebenen durch das Präparat zu legen. Durch punktförmiges Abrastern des Objektfeldes wird das Streulicht von benachbarten Objektbereichen reduziert, sodass Schärfe und Kontrast des resultierenden Bildes erhöht werden. In der konfokalen Mikroskopie eignen sich Laser als Lichtquellen, da sie konstantes und sehr helles Licht abgeben. Zudem sind sie in der Intensität stabil, was bei quantitativen Messungen von Bedeutung ist.

Zwei konfokale Laser-Raster-Fluoreszenzmikroskope mit ähnlichem Aufbau wurden verwendet:

- a) Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar)
- b) LSM 410 (Carl Zeiss, Oberkochen)

a) Technischer Aufbau Leica TCS SP2

- Inverses Auflicht-Fluoreszenzmikroskop mit motorisiertem z-Hub
- Externer Argon-Laser (458 nm, 488 nm, 514 nm) sowie zwei interne Helium-Neon-Laser (543 nm, 633 nm)
- Hoch empfindliche Spektraldetektoren mit bis zu 4 parallelen Kanälen
- Scanner mit zwei unabhängigen Galvanometern
- Variable Lochblende (pinhole)
- Filterfreie Prismen-Spektrophotometer
- Leica 63x Öl-Immersionsobjektiv Plan-Neofluar (1.25 oil/ 0,17)
- Angeschlossener PC mit Leica-Software 2.6.

b) Technischer Aufbau LSM 410

- Inverses Auflicht-Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 100“ mit motorisiertem z-Hub
- Externer Argon-Laser (458 nm, 488 nm, 514 nm) und zwei interne Helium-Neon-Laser (543 nm, 633 nm)
- xy-Scanner mit zwei galvanisch angetriebenen Spiegeln
- Detektor mit einem Durchlichtdetektor sowie zwei Auflicht-Fluoreszenzdetektoren (PMT) mit vorgeschalteten Emissionsfiltern (für PMT 1: Langpassfilter (LP) 515 nm, LP 570 nm; für PMT 2: Bandpassfilter (BP) 510-525 nm, BP 590-610 nm) und variable Lochblende (pinhole)
- Angeschlossener PC mit LSM-Software 3.98
- Zeiss 63x Öl-Immersionsobjektiv Plan-Neofluar (1.25 oil/ 0,17)

3.2.2. Prinzip der Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie können Oberflächen mit einem fein gebündelten Elektronenstrahl (Primärelektronenstrahl) abgerastert werden. Prinzipiell ist ein Rasterelektronenmikroskop (REM) wie ein Lichtmikroskop aufgebaut. Anstatt einer Lichtquelle wird im Hochvakuum durch Anlegen einer Hochspannung (bis 40 keV) eine Wolfram-Glühkathode erhitzt. Diese erzeugt einen Primärelektronenstrahl, der an der Anode beschleunigt wird. Durch einen Steuerzylinder (Wehneltzylinder) werden die Elektronen fokussiert und durch elektromagnetische Spulen zu einem schmalen Strahl gebündelt. Durch den Primärelektronenstrahl werden aus einer metallbeschichteten Probenoberfläche (z.B.

Goldbeschichtung) Sekundärelektronen sowie energiereiche Rückstreuielektronen und Röntgenstrahlen emittiert (Sekundärelektronenstrahl). Der Sekundärelektronenstrahl wird mit einem Sekundärelektronendetektor erfasst, in Lichtsignale umgewandelt und so optisch auf einem Monitor dargestellt. Das Rasterelektronenmikroskop (REM) erreicht bis zu 100.000fache Vergrößerungen mit einer Auflösung von 4 nm. Untersuchungen an lebenden Zellen sind nicht möglich, da die zu untersuchenden Proben wasserfrei und die Oberfläche metallisch sein müssen. Zudem ist die Darstellung von Ergebnissen nur in schwarz-weiß möglich.

3.2.3. Prinzip der Transmissionselektronenmikroskopie

Das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) hat einen ähnlichen Aufbau wie das REM. Die Transmissionselektronenmikroskopie liefert gegenüber der Rasterelektronenmikroskopie Einblicke in die Struktur bzw. den Aufbau von Zellen. Für die Bildentstehung werden Elektronen durch die zu untersuchende Probe geleitet und das daraus resultierende Bild auf einem elektronenempfindlichen, fluoreszierenden Schirm fokussiert. Die Elektronen werden in der Glühkathode über die angelegte Hochspannung freigesetzt und beschleunigt. Der durch elektromagnetische Spulen gebündelte und gerichtete Elektronenstrahl fällt auf die Probe, in der die Elektronen elastisch gestreut werden. Elektronen erfahren durch Streuung oder Beugung in dichteren Objektstrukturen eine größere Richtungsänderung. Sie treffen nicht mehr senkrecht auf die Objektivlinse und werden daher durch die Objektivblende ausgeblendet. Die ungebeugten, ungestreuten Elektronen passieren hingegen die Blende und erzeugen ein Abbild der Strukturen in der Bildebene. Elektronenstrahlen können unbehandelte Gewebeproben unbeeinflusst durchqueren. Aus diesem Grund ist eine Anfärbung der Probe notwendig.

Um eine möglichst hohe Auflösung zu erreichen, sollten die untersuchten Objekte sehr dünn sein. Bei der Transmissionselektronenmikroskopie beträgt die Auflösungsgrenze 0,5 nm.

3.2.4. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt ein universelles Messprinzip dar, das sich für nahezu alle Fragen der Zellbiologie bewährt hat und quantitativ einsetzen lässt [97, 98]. Schon seit den 60iger Jahren existieren Durchflusszytometer für die Analyse und das Separieren von Zellen

bzw. Zellpopulationen unter Verwendung optischer und elektronischer Sensormethoden, mit denen verschiedene zytologische, biochemische und funktionelle Eigenschaften erkannt werden können.

Das Durchflusszytometer basiert auf der Fluoreszenz von Zellen und kann auf Einzelzellebene morphologische, physikalische und molekulare Eigenschaften von Zellen oder Partikeln erfassen. Das Grundprinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Messung der Laserlichtstreuung durch eine Zelle bzw. des emittierten Lichtes der verwendeten Fluorochrome. Die Streuung im Winkel von 0° bis 10° bestimmt Zellgröße und -durchmesser und wird als Forward Scatter (FSC) bezeichnet. Die Ablenkung des Lichts im 90° -Winkel, der Side-Scatter (SCC), gibt Auskunft über die Granularität der Zelle.

Die einzelnen fluoreszenzmarkierten Zellen einer Zellsuspension werden über eine Kapillare angesaugt und hydrodynamisch fokussiert. Die Fokussierung der Zellen erfolgt mit einem aufwendigen Flüssigkeitssystem, bei dem die Zellsuspension unter Druck in eine Quarzküvette überführt wird. Die dazu verwendete Stahlkapillare wird von einer zellfreien Flüssigkeit (Hüllstrom) umspült, welche auf die Zellflüssigkeit trifft und eine Vereinzelnung der Zellen verursacht. Die hydrodynamisch fokussierten Zellen werden ähnlich einer Perlenkette aufgereiht einzeln an einem Argon-Laserstrahl vorbeigeführt und mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt.

Durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen können so Zelloberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine quantitativ analysiert werden. Ein komplexes System aus Blenden und unterschiedlichen Filtern teilt das von den Zellen emittierte Fluoreszenz- bzw. Streulicht und trennt es in verschiedene Farbbereiche auf. Das Licht wird dann mit spezifischen Detektoren erfasst, in elektrische Signale umgewandelt und kann mit einer spezifischen Software ausgewertet werden [108, 109]. Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA) durchgeführt. Die Akquisition erfolgte mit der Software CellQuest Pro Vers. 4.0.1. und die Analyse der Zellzyklusphasen mit der Software ModFit LT Vers. 4.0 (BD Biosciences).

3.2.5. Bionas Sensorchips

3.2.5.1. Allgemeiner Aufbau des Bionas Sensorchips

Für zeitabhängige Adhäsionsuntersuchungen wurden Bionas[®] Sensorchips verwendet, die von der Firma Bionas GmbH (Rostock) in Kooperation mit dem Halbleiterhersteller Micronas (Freiburg) entwickelt wurden (Abbildung 7). Sie dienen der Untersuchung von Zellen hinsichtlich ihres Adhäsions- und Metabolismus-Verhaltens unter bestimmten Substanzinflüssen. Das Verhalten wird anhand physikalischer und chemischer Größen analysiert. Die besiedelbare Fläche der Mediumkammer des Sensorchips beträgt 0,7088 cm². Auf dem Chip befinden sich Sensoren zur Messung verschiedener Parameter der Zellen sowie deren Milieus. Neben Sauerstoffsensoren (Clarkensensoren) und Sensoren zur Messung der Ansäuerung des Milieus (ISFET = ionensensitiver Feldeffekttransistor) befindet sich auch ein IDES-Sensor (Interdigitated Electrode Structure) auf dem Chip, welcher für die Adhäsionsmessung von Zellen relevant ist [111]. Mit Hilfe des speziellen Messsystems Bionas[®] 2500 wurden bis zu sechs Chips gleichzeitig analysiert. Das System wurde mit einer Durchflussrate von 56 µl/min betrieben und befand sich in einer 37 °C-temperierten Inkubator-kammer. Von besonderem Interesse für die Adhäsionsuntersuchungen waren die Ergebnisse der IDES-Sensoren.

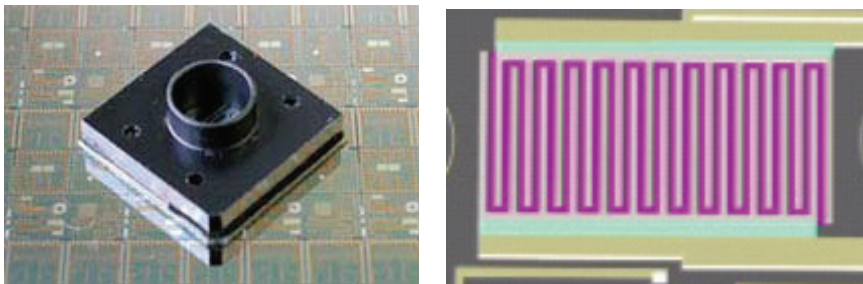


Abbildung 7: Bionas Sensorchip SC1000 (linkes Bild) und schematische Darstellung des IDES-Sensors (rechtes Bild), welcher sich auf der Oberfläche des Sensorchips befindet. Der IDES-Sensor besitzt eine Zwei-Kammstruktur.

3.2.5.2. Der IDES-Sensor zur Messung der Adhäsion

Der IDES-Sensor liefert anhand elektrischer Signale Aussagen über den zellulären Bedeckungszustand seiner Oberfläche. Dazu sind zwei Kammstrukturen im Sensorchip integriert (Abbildung 7). Das Prinzip beruht auf der Messung der Impedanz (= komplexer Wechselstromwiderstand) an interdigitalen Elektrodenstrukturen [111]. Lebende Zellen sind

sehr schwache Leiter. Adhärenz Zellen an die Sensorfläche und bedecken diese, steigt die Impedanz an [113]. Der Sensor liefert eine Impedanz mit ohmschen und kapazitiven Anteilen, deren Änderung mit dem Adhäsionsverhalten und dem Bedeckungsgrad der Zellen auf dem IDE-Sensor korreliert. Wird eine schwache Wechselspannung angelegt, können der Betrag der Änderung und die Phasenverschiebung bestimmt werden. Aus dieser Wechselstromwiderstandsänderung werden der ohmsche Widerstand und die Kapazitäten berechnet. Zu dem Bedeckungsgrad tragen die Anzahl der adhärenz wachsenden Zellen, die Größe der Grundfläche der Zellmembranen sowie die räumliche Nähe der Membranen und Zell-Zell-Verbindungen (tight junctions) bei. Somit können morphologische Veränderungen der Zellen während eines Experiments ermittelt werden. Sinkt die ermittelte Kapazität, deutet dies auf eine höhere Zellkonfluenz und intensivere Anhaftung der Zellen auf den Sensor hin. Stark konfluente Zellverbände erzielen nach eigenen messtechnischen und mikroskopischen Erfahrungen kapazitive Werte bis 9 nF. Werte über 9 nF verweisen hingegen auf vermehrt subkonfluente Zellen. Die Messwerte der Adhäsionsmessungen werden im Folgenden als relative Zellimpedanz (in %) ausgedrückt. Sie wurden normiert auf den Ausgangswert von 100 % und korrelieren mit der Adhäsion bzw. den Anteil der adhärenz Zellen.

3.2.6. Bio-Plex Suspensionsarray-System

Zur Untersuchung phosphorylierter Proteine wurde die Bio-Plex Workstation von Bio-Rad (Hercules, USA) eingesetzt. Es handelt es sich hierbei um die Luminex xMAPTM-Technologie, eine Bead-basierte Multiplex-Analyse. Die Beads (Polystyrene microspheres) sind intern mit spektral unterscheidbaren Fluorochromen gefärbt und mit einem spezifischen Antikörper gegen den zu untersuchenden Analyten gekoppelt. Die Analyten werden von dem Antikörper erkannt und an das Bead gebunden. Der entstehende Bead-Antikörper-Analyt-Komplex wird mit einem biotinylierten Detektionsantikörper erkannt. Die Menge des Analyten wird mittels eines Fluorochrom-gekoppelten Reporters quantifiziert. Bei diesem Reporter handelt es sich um ein Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat, wobei Streptavidin an das Biotin bindet. Bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm emittiert Phycoerythrin Licht einer Wellenlänge von 570 nm, welches von einem Scanner detektiert wird. Die Intensität des emittierten Lichtes ist proportional zur Menge des Analyten. Damit können z.B. mehrere phosphorylierte Proteine parallel in einer speziellen 96-well Mikrotiterplatte (Millipore, Bedford, USA) gemessen werden. Diese Mikrotiterplatten besitzen als Boden eine Teflonmembran mit einer Porengröße von 1,2 µm, da die Lösungen

aus den Wells der Mikrotiterplatten aufgrund der Beads von unten mit Vakuum abgesaugt werden müssen. Die Größe der Beads beträgt 5,6 μm , sodass sie die Teflonmembran nicht passieren können.

Das Analysesystem, welches aus einer Durchflusszelle mit zwei Lasern besteht, saugt ein bestimmtes Probenvolumen aus jedem Well an und detektiert die Beads mittels zwei verschiedener Laser. Ein Laser bewirkt die Farbanregung des jeweiligen Beads und dient der Identifizierung des Spektralbereiches. Der zweite Laser regt die Reportermoleküle, die mit dem Bead assoziiert sind, an und erlaubt so eine Quantifizierung spezifisch gebundener Analyte. High-speed digital Signalprozessoren und die spezielle Bio-Plex Manager-Software 4.1. verarbeiten die Fluoreszenzsignale für jedes Bead gleichzeitig und geben die Daten quantitativ über den angeschlossenen PC wieder.

Für die simultane mehrfache (multiplex) Messung verschiedener phosphorylierter Proteine einer Probe ist eine relativ kleine Proteinkonzentration von etwa 500 $\mu\text{g/ml}$ notwendig.

3.3. Fluoreszenzfärbungen und Analysen

3.3.1. Analyse der Integrin-Untereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 1$

Zur Beurteilung der Expression und Lokalisation der Integrin-Untereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 1$ wurden die Zellen auf einem Deckglas (20x20 mm) bei 37 °C, 5 % CO_2 und 85 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Nach anschließender 24-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen bei gleichen Bedingungen wurden die Zellen zweimal mit kalzium- und magnesiumhaltigem PBS ($\text{PBS}^{\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}}$) gewaschen. Die Zugabe von Ca^{2+} und Mg^{2+} ist notwendig, um ein Ablösen der unfixierten Zellen zu verhindern. Die Zellen sind daraufhin bei Raumtemperatur (RT) mit dem Primärantikörper Maus anti Integrin (1:6 verdünnt in $\text{PBS}^{\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}}$, $\alpha 2$, $\beta 1$ Immunotech, Marseille, Frankreich) für 30 min inkubiert worden. Nach wiederholtem Waschen mit $\text{PBS}^{\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}}$ erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT mit dem Alexa Fluor[®] 488 markierten Sekundärantikörper Ziege anti Maus (1:300 verdünnt in $\text{PBS}^{\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}}$, Molecular Probes, Eugene, USA). Nach erneutem zweimaligen Waschen mit $\text{PBS}^{\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}}$ wurden die Zellen 10 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA, in PBS gelöst) bei RT fixiert. Nach einem letzten Waschvorgang mit PBS wurden die Proben mit Einbettmedium auf einem Objektträger fixiert und über Nacht bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Analyse der Präparate erfolgte mit dem konfokalen Laser-Raster-Fluoreszenzmikroskop (LSM 410, Zeiss, Oberkochen) bei einer Excitation von 488 nm und einer Emission von 515 nm.

3.3.2. Färbung des Aktinzytoskeletts

Zur Beurteilung der Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts unter Wirkstoffeinfluss wurden Zellen auf Deckgläsern (20x20 mm) in Kompletmedium kultiviert und über 24 h mit den Ionenkanal-Antagonisten behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 10 min 4 % PFA fixiert. Nach erneuter zweimaliger Spülung mit PBS wurde die Zellmembran durch eine 10-minütige Inkubation mit 0,1 % Triton (in PBS) bei RT permeabilisiert. Zur Markierung der Aktinfilamentstrukturen wurden die Zellen 30 min bei RT mit TRITC-konjugiertem Phalloidin (1:100, Sigma, Steinheim) inkubiert. Nach einem letzten Waschschritt mit PBS wurden die Deckgläser mit Einbettmedium auf einem Objektträger fixiert. Die Untersuchung der Präparate erfolgte mit einem konfokalen Laser-Raster-Fluoreszenzmikroskop (LSM 410, Zeiss, Oberkochen) bei einer Anregung von 550 nm und einer Emission von 570 nm.

3.3.3. Mikroskopische Untersuchung von ROCK-2

Für die mikroskopische Untersuchung des Proteins ROCK-2 wurden die HLE-B3 Zellen auf Deckgläsern (20x20 mm) zunächst in Kompletmedium und dann für 24 h unter Wirkstoffeinfluss kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, 10 min mit 4 % PFA bei RT fixiert und erneut mit PBS gespült. Die Zellmembran wurde durch 10-minütige Einwirkung von 0,1 % Triton (in PBS) bei RT permeabilisiert und die Zellen anschließend mit 1 % BSA (gelöst in PBS) inkubiert, um unspezifischen Färbungen vorzubeugen. Für die Detektion des intrazellulären Proteins wurden die fixierten und permeabilisierten Zellen 24 h in einer feuchten Kammer bei 4 °C mit 50 µl primärem polyklonalem Kaninchen anti human ROCK-2 Antikörper (1:100, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS sind die Zellen 1 h mit dem sekundären Alexa Fluor® 488 markierten Ziege anti Kaninchen IgG Antikörper (1:300, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) markiert und anschließend auf einem Objektträger mit Einbettmedium fixiert worden. Die Detektion der Verteilung von ROCK-2 erfolgte mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop LSM 410 (Zeiss, Oberkochen) bei einer Excitation von 488 nm und einer Emission von 515 nm.

3.4. Quantitative Integrinexpressionsmessung

Für die quantitative Bestimmung der Expressionsänderung der Integrin-Untereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 1$ in HLE-B3 Zellen unter 24-stündigem Einfluss von Mibefradil sowie den Vergleichswirkstoffen wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Zunächst erfolgte die Kultivierung der Zellen in Komplettmedium in 6-well-Zellkulturschalen und anschließend eine 24-stündige Behandlung mit den Wirkstoffen. Adhärente Zellen wurden mit 0,05% Trypsin-EDTA abgelöst und in 5 ml Rundbodenröhrchen überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 2000 U/min (Hettich Universal, Tuttlingen) wurde das Zellpellet zunächst mit PBS gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe von 20 μ l Primäantikörper Maus anti Integrin ($\alpha 2$, $\beta 1$, 1:6 verdünnt in PBS, Immunotech, Marseille, Frankreich) zu dem Zellpellet sowie eine Inkubation für 30 min bei RT. Als Kontrolle dienten mit Maus IgG1 ($\gamma 1$, Becton Dickinson, Heidelberg) gefärbte Zellen sowie unbehandelte Zellen. Die Zellen wurden darauf zweimal mit PBS gewaschen, das Pellet mit 100 μ l FITC-konjugiertem Sekundäantikörper Schaf anti Maus IgG1 (Fab2 1:16 verdünnt in PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) versetzt und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und bei 2000 U/min (Hettich Universal, Tuttlingen) zentrifugiert. Für die Messung im Durchflusszytometer wurden die Zellen in 500 μ l FACSflow-Puffer (Becton Dickinson, Heidelberg) verdünnt. Die Proben wurden im Durchflusszytometer FACSCalibur bei 488 nm mit dem Programm CellQuest Pro 4.0.1 gemessen und ausgewertet.

3.5. Proliferationsmessung von HLE-B3

Zur Untersuchung des Einflusses der Wirkstoffe auf die Proliferation bzw. die Zellzyklusphasen der Linsenepithelzellen wurden HLE-B3 Zellen in 6-well Zellkulturschalen für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, mit PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin-EDTA von der Oberfläche der Zellkulturschalen abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Komplettmedium aufgenommen und in 5 ml Rundbodenröhrchen überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 2000 U/min (Hettich Universal, Tuttlingen) wurde das Komplettmedium vorsichtig abgezogen und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Die Zellen sind daraufhin mit 1 ml eiskaltem 70 %igen Ethanol versetzt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert worden. Die fixierten Zellen wurden dann mit 1 ml PBS versetzt und 8 min bei 2000 U/min (Hettich Universal, Tuttlingen)

zentrifugiert. Nachdem der Waschvorgang mit PBS einmal wiederholt und der Überstand vorsichtig abgezogen worden ist, wurde 1 ml RNase (1 mg/ml, 37 °C) zum Zellsediment hinzugegeben. Nach Inkubation der Zellen bei 37 °C im Wasserbad für 15 min und anschließender Zentrifugation bei 2000 U/min (Hettich Universal, Tuttlingen) für 8 min wurde der Überstand abgezogen und die DNA der Zellen mit 500 µl Propidiumjodid (50 µg/ml) über Nacht bei 0 °C gefärbt. Die Messung der Zellen erfolgte im FACSCalibur mit der Software CellQuest Pro 4.0.1. und die Auswertung mit der für DNA-Histogramme Software ModFit LT 4.0.

3.6. BD Power Blot-Analyse von Signalproteinen

Zur Untersuchung des Einflusses der Ionenkanalblocker auf die Linsenepithelzellen wurde der BD Power Blot (BD Biosciences, USA) verwendet. Es handelt sich dabei um eine Art multi-screening Western Blot, mit dessen Hilfe eine größere Anzahl von Proteinen gleichzeitig detektiert und quantitativ ausgewertet werden kann. Für diese Untersuchung ist jedoch eine relativ große Proteinmenge von ca. 5 mg erforderlich. Diese Menge entspricht je Probe in etwa 6 konfluent mit Linsenepithelzellen bewachsenen T₇₅-Zellkulturflaschen (ca. 1,5-2 x 10⁷ Zellen). Da dieses Verfahren im Verlauf eingestellt wurde, konnte nur der Einfluss von 30 µM Mibefradil sowie 10 mM ETX analysiert werden.

Für den Versuch wurden HLE-B3 Zellen 24 h unter dem Einfluss von 30 µM Mibefradil bzw. 10 mM ETX in T₇₅-Zellkulturflaschen kultiviert. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte, in Kompletmedium gewachsene Zellen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 2 ml heißem Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,4, 1 mM sodium ortho-vanadate, 1 % SDS; 100 °C im Wasserbad) lysiert und in ein 50 ml Röhrchen transferiert. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -80 °C eingefroren. Die Durchführung des BD Power Blot erfolgte durch die Firma BD Biosciences (USA) und wurde folgendermaßen als Serviceleistung durchgeführt. Die Proben sind in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt worden. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Antikörpern markiert. Die Fluoreszenzen wurden mit dem Odyssey™ Infrarot Imaging-System aufgezeichnet und mit der PDQuest-Software (Bio-Rad, Hercules, USA) analysiert [108]. Im Anschluss war diese Testmethode, welche in den USA von BD Biosciences angeboten und durchgeführt wurde, leider nicht mehr verfügbar. Somit konnten keine weiteren Vergleichswirkstoffe getestet werden.

3.7. Zellkultivierung auf den Sensorchips und Versuchsaufbau

Die Sensorchips wurden vor den Versuchen unter sterilen Bedingungen mit einem Gemisch aus 70 % Ethanol und 1 % Methylethylketon gereinigt. Die Mediumkammern der Chips sind zunächst 10 min mit 70 %igem Ethanol inkubiert und anschließend mehrmals mit Kompletmedium gespült worden. Für die Messung der Sensorchips wurde das Gerätesystem zur Desinfektion zunächst mit 5 ml 70 %igem Ethanol und anschließend mit 10 ml PBS gespült.

Die HLE-B3 Zellen wurden aus der Zellkulturflasche mit 0,05 % Trypsin-EDTA abgelöst und mit Hilfe einer Neubauer-Kammer (Brand, Wertheim) gezählt. Für eine subkonfluente Kultur wurden etwa 8×10^4 Zellen auf die Sensoroberfläche aufgebracht. Für konfluente Kulturen wurden $1-1,5 \times 10^5$ Zellen eingesetzt. Die Zellen sind ca. 42 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Luftfeuchte auf den Chips kultiviert worden. Vor dem Einsetzen der Sensorchips in das Messsystem wurde das Zellwachstum auf der Chipoberfläche mit einem aufrechten Auflichtmikroskop (Olympus BX51M, Hamburg) begutachtet und mit einer angeschlossenen Digitalkamera sowie der Software Olympus DP Soft (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Münster) fotodokumentiert.

Nach dem Spülen des Systems mit PBS wurden die Sensorchips in die jeweiligen Steckplätze des Systems eingesetzt. Für den Vorlauf des Systems sind 20 ml Runningmedium (DMEM, 0,1 % FCS, pH 7,4, Osmolarität 270-340 mOsmol/kg) eingesetzt worden. Zur Messung des Stoffeinflusses über 22 h wurde je Chip die zu untersuchende Wirkstoffkonzentration in einem 50 ml Röhrchen mit Runningmedium hergestellt. Es sind 10, 20 und 30 µM Mibefradil, 10 mM ETX, 10 µM Verapamil sowie 5 mM 4-AP eingesetzt worden. Während des Versuchs wurde das Runningmedium mit bzw. ohne Wirkstoff (als Kontrolle) den Zellen auf den Chips aus diesen vorbereiteten Röhrchen mit einer Flussrate von 56 µl/min zugeführt. Weiterhin ist für jeden Sensorchip zum Abbruch des Versuchs ein Röhrchen mit 10 ml Tötungsmedium (Runningmedium mit 0,2 % Triton X-100) vorbereitet worden.

Die zeitliche Steuerung bzw. Koordinierung der Zuflüsse wurde durch die speziell entwickelte Gerätesoftware Bionas[®] 2500 SW 1.15 geregelt. Die Versuchsdurchführung erfolgte bei der Firma Bionas GmbH.

3.8. Bio-Plex Phosphoprotein-Assay

Für die Versuche wurden Linsenepithelzellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Luftfeuchte in 6-well Zellkulturplatten kultiviert und mit den Ionenkanal-Antagonisten 2, 4, 6, 12 und 24 h inkubiert (Wirkstoffkonzentrationen siehe Kapitel 2.4.1.). Anschließend sind die Zellen mit einem Lysepuffer (Bio-Rad), welcher Protease-Inhibitoren enthält, lysiert worden. Die für die Durchführung notwendigen Lösungen und Materialien (z.B. Waschpuffer und Resuspensionspuffer, Beads, 96-well Mikrotiterplatten mit Teflonmembranboden sowie das Streptavidin-Phycoerythrin (PE, 100x) als Reporter) stammen aus dem Bio-Plex Phosphoprotein Kit (Bio-Rad, Hercules, USA).

Zur Vorbereitung des Versuches wurden zum einen für jedes Well 1 µl Beads, gekoppelt mit spezifischem Antikörper, mit Waschpuffer auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht. Zum anderen sind zur Detektion pro Well jeweils 1 µl Beads mit Detektionsantikörpern in Waschpuffer auf ein Endvolumen von 25 µl suspendiert worden. Weiterhin wurden für jedes Well 0,5 µl Streptavidin-PE (100x) und 49,5 µl Waschpuffer vermischt. Für die Versuche sind folgende spezielle Antikörperbeads von Bio-Rad (Hercules, USA) verwendet worden:

- p-Akt (Ser473)
- p-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷)
- p-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²)

Im ersten Schritt des Bio-Plex Phosphoprotein-Assays wurde die 96-well Mikrotiterplatte in einem Waschschrift bestehend aus Spülung mit Waschpuffer und anschließendem Absaugen mittels Vakuum gereinigt. Die Suspension der mit Antikörpern gekoppelten Beads wurde durch kurzes Vortexen homogenisiert und 50 µl in jedes Well gegeben. Nachdem die Wells mit Vakuum abgesaugt wurden, schlossen sich zwei Waschschriffe an. Die aufgetauten Zelllysate sind behutsam mit dem Vortex gemischt und in jedes Well 50 µl der Probe gegeben worden. Die Zelllysate wurden zusammen mit den gekoppelten Beads 15-18 h bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit schlossen sich wiederum drei Waschschriffe an, bevor der vorbereitete Detektionsantikörper zugegeben und die Proben für mindestens 30 min bei RT inkubiert worden sind. Nach drei Waschschriffen erfolgte die Zugabe von jeweils 50 µl der Streptavidin-PE-Suspension und anschließend eine 10-minütige Inkubation bei RT im Dunkeln. Danach sind drei Waschschriffe mit je 100 µl Resuspensionspuffer durchgeführt und die Proben abschließend in 125 µl Resuspensionspuffer resuspendiert worden. Als Kontrollen

wurden von Bio-Rad (Hercules, USA) mitgelieferte speziell behandelte Zelllysate (z.B. TNF α - und UV-behandelte HeLa-Zellen) mitgeführt, welche einen hohen Anteil der zu untersuchenden phosphorylierten Proteine aufweisen.

Die Messung der Mikrotiterplatten erfolgte mit dem Bio-Plex-System, die Auswertung wurde mit der Software Bio-Plex Manager 4.0 vorgenommen. Die ermittelten Daten wurden in ein Microsoft Excel-Datenblatt (Microsoft Office 2003) transferiert.

3.9. Grün fluoreszierendes Protein (GFP)-Vinkulin

3.9.1. Vermehrung des GFP-Vinkulin-Konstrukts

Das für die Transfektion benutzte GFP-Vinkulin-Konstrukt stammt ursprünglich von B. Geiger, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine Vorkultur mit 100 μ l kompetenten Bakterien (*E. coli* XL2, Gibco Invitrogen, Karlsruhe), 5 μ l Plasmid des GFP-Vinkulin-Konstrukts (maximal 500 ng/l) und 900 μ l lysogeny broth-Medium (LB-Medium) angesetzt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock im Brutschrank bei 42 °C für 1-2 min. Die Bakterien sind nach 1 h Schütteln bei 37 °C auf Selektionsagarplatten mit Kanamycin (50 mg/l) ausgestrichen und 24 h bei 37 °C kultiviert worden. Je Agarplatte wurden 10 Kolonien entnommen, in 5 ml LB-Medium suspendiert und 2 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen in 400 ml LB-Medium überführt und auf dem Schüttler bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nachdem die Bakterien bei 4500 g (Kontron, Hamburg) für 30 min zentrifugiert wurden, erfolgte die Aufbereitung der DNA mit dem NucleoBond[®] plasmid purification Kit (Machery-Nagel, Düren). Die das GFP-Vinkulin-Konstrukt enthaltende DNA wurde bei -20 °C gelagert. Die DNA-Konzentration der Proben wurde mittels UV-Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000, Peqlab, Erlangen) bei 260/280 nm ermittelt. Für die Versuche wurde die DNA 1:10 in *Aqua dest.* auf eine Konzentration von 0,43 μ g/ μ l verdünnt.

3.9.2. Transfektion von Linsenepithelzellen

Die immortalisierten Linsenepithelzellen HLE-B3 wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kompletmedium kultiviert. Für die Transfektion sind die Zellen 5 min mit 0,05 % Trypsin-

EDTA abgelöst und mit der Neubauerkammer gezählt worden. Die Zellen wurden anschließend in frischem Komplettmedium resuspendiert. Für die Verwendung eines 4-well Lab-Tek Chambered Coverglass (Nalge Nunc International, New York, USA) wurde eine Zellmenge von ca. 1×10^5 Zellen/ml für eine subkonfluente Kultur entnommen, zentrifugiert und das Zellpellet in 350 μ l Komplettmedium resuspendiert. Zeitgleich wurde 0,43 μ g/ μ l DNA (GFP-Vinkulin-Konstrukt) mit Hilfe des Transfektionskits Qiagen Effectene[®] Transfection Reagent (1.0 ml) (Qiagen, Hildesheim) in 60 μ l Buffer EC gemischt, 1,6 μ l Enhancer aus dem Kit zugegeben und das Gemisch für 4 min bei RT inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 5 μ l Effectene und 8-minütiger Inkubation bei RT wurde das Gemisch in die Zellsuspension überführt. Nach nochmaligem Mischen wurde der Zell-DNA-Ansatz in ein Well der Lab-Tek Chambered Coverglass (Nalge Nunc International, New York, USA) überführt und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert.

Für die Transfektion primärer humaner Linseneithelzellen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 min mit Accutase inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden anschließend in frischem Komplettmedium resuspendiert und nach der oben beschriebenen Vorgehensweise transfiziert. Für eine optimale Adhäsion der primären Zellen wurden die 4-well Lab-Tek Chambered Coverglass (Nalge Nunc International, New York, USA) mit ca. 300 μ l Kollagen I (1:10 in Ethanol verdünnt, Harbor Bio-Products, Norwood, USA) beschichtet.

Durch Optimierung der Methode der Transfektion auf die Linseneithelzellen konnte eine Transfizienzrate von etwa 30-35 % bei der immortalisierten Zelllinie und den Primärzellen erreicht werden.

Die lebenden GFP-Vinkulin exprimierenden Zellen wurden in einer mikroskopangepassten Inkubator-kammer (EMBLEM Technology Transfer GmbH, Heidelberg) bei 37 °C und 5 % CO₂ mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop Leica TCS-SP2 betrachtet. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Leica 63x Öl-Immersionsojektiv Plan-Neofluar und externem Argon/Kryptonlaser bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und mit einem Langpass 515 nm Filter.

3.9.3. Versuchsansätze und Auswertung der Vinkulin-Versuche

Für jeden Versuch wurde die Vinkuline der in den Lab-Tek Chambered Coverglass (Nalge Nunc International, New York, USA) transfizierten humanen Linseneithelzellen ohne Mibefradil-Einfluss als Startwert festgehalten. Anschließend wurde Mibefradil (10 bzw.

20 μM) aus der Stammlösung hinzugegeben und nach 10, 30, 60, 120 und 180 min mikroskopiert. Die Versuchsdurchführung erfolgte in gleicher Weise bei den hLEZ wie auch bei der Zelllinie HLE-B3. Anzahl und Länge der vinkulinhaltigen Fokalkontakte sowie die Zellfläche wurden mit der Software Leica LCS Lite 2.61 gemessen. Die Bilder der einzelnen Zeitpunkte wurden zum LSM410 (Zeiss, Oberkochen) transferiert, mit der LSM 410-Software übereinandergelegt und die Bewegung der Vinkulinkontakte mit dem UTHSCSA Imagetool 3.0 (The University of Texas Health Science Center in San Antonio, USA) analysiert.

3.10. Vorbereitung der Zellen für das REM: Kritische Punkttrocknung

HLE-B3 Zellen wurden 48 h auf einem Deckglas (Durchmesser 11 mm) kultiviert, anschließend mit 4 % Glutaraldehyd fixiert und mittels kritischer Punkttrocknung für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen vorbereitet. Im ersten Schritt wurden die Proben zweimal mit 0,1 M Na-Phosphat gespült. Anschließend wurde in einer aufsteigenden Reihe mit verschiedenen Konzentrationen von Aceton (30 % 5 min, 50 % 5 min, 75 % 10 min, 90 % 15 min, 100 % zweimal 10 min) das Wasser aus den Proben entzogen. Die weitere Probenvorbereitung erfolgte nach Herstellerangaben im Emitech K850 (Emitech, Taunusstein). Nach der kritischen Punkttrocknung sind die Proben aus dem Gerät entnommen und auf eine spezielle leitfähige, doppelseitig klebende Folie aufgebracht worden. Die Proben wurden abschließend im Vakuum mit dem Sputter Coater (SCD 004, BAL-TEC, Walhuf; Schichtdicke 15-50 nm) gleichmäßig mit Gold besputtert.

Die vorbereiteten Zellen sind im Rasterelektronenmikroskop DSM 960A (Zeiss, Oberkochen) des Elektronenmikroskopischen Zentrums der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock analysiert worden.

3.11. Herstellung von Dünnschnitten für das TEM

Das verkapselte immobilisierte Mibefradil wurde 5 min bei 2000 U/min (Hettich Universal, Tuttlingen) und RT zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Fixierung mit 4 % Glutaraldehyd (gepuffert in 0,1 M Na-Phosphat). Die Proben erfuhren mehrfache Spülungen mit Puffer, bevor sie in einer aufsteigenden Acetonreihe von 30-100 %

entwässert wurden. Danach erfolgte die Anpassung an das Einbettungsmittel durch ein Gemisch aus Aceton und Kunstharz. Die Polymerisation der Proben in reinem Einbettungsmedium (Epoxidharz „Araldit“, Fluka, St. Gallen, Schweiz) dauerte zwei bis drei Tage und wurde bei 58 °C im Brutschrank durchgeführt. Am Ende des Präparationsvorganges wurden die Proben mit einem Ultramikrotom (LKB, Schweden) geschnitten. Es wurden Semidünnschnitte hergestellt. Bei Semidünnschnitten (0,5-1,5 µm) erfolgt die Probenanfärbung mit einer Lösung aus Toluidinblau, Borax und Pyronin. Die elektronenmikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop EM 902 (Carl Zeiss, Oberkochen) im Elektronenmikroskopischen Zentrum der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock. Die Dünnschnitte wurden mit der Software ITEM (Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Münster) aufgenommen und verarbeitet.

3.12. Immobilisiertes (mikroverkapseltes) Mibefradil

3.12.1. Mikroverkapselung von Mibefradil in PLGA

Die Mikroverkapselung von Mibefradil sowie die Messung von Wirkstoffgehalt und Releaserate erfolgten durch die Firma Micromod GmbH in Rostock-Warnemünde.

Das gelöste Mibefradil-dihydrochlorid wurde mit dem Solvent-Evaporations-Verfahren unter Verwendung von PLGA (Poly(lactid-co-glycolid)) mikroverkapselt und in eine poröse Silikatmatrix inkorporiert. Die Linkerchemie zwischen Substanz und PLGA basiert auf der kovalenten Aminolyse von Epoxiden. Die sphärischen Mikrokapseln weisen eine Wirkstoffbeladung von 38 mg/g auf. Die Freisetzung des Wirkstoffes aus den Kapseln wurde mittels UV/VIS-Spektroskopie (Specord M40, Carl Zeiss, Jena) bestimmt. Die durchschnittliche Freisetzungsrate (Releaserate) beträgt 7,6 mg Wirkstoff je Liter Medium und Tag, wobei jedoch am ersten Tag 15,5 mg Mibefradil je Liter freigesetzt werden. Für die Versuche wurde anhand der Freisetzungsrates die Menge der Immobilisate berechnet, die für die jeweilige Konzentration eingesetzt werden musste. Für eine Konzentration von 10 µM Mibefradil nach 24 h in 1 ml Komplettmedium wurden 3,68 mg, für 20 µM 7,36 mg und für 30 µM 11,03 mg der Partikel mit einer Feinwaage (Chyo JL-200, Kyoto, Japan) eingewogen.

3.12.2. Proliferationsuntersuchungen mit verkapseltem Mibefradil

Zur Untersuchung des Einflusses des immobilisierten Wirkstoffes auf die Proliferation der humanen Linseneithelzellen bzw. den Zellzyklus wurden HLE-B3 Zellen in 6-well Zellkulturschalen (Greiner Bio-One) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Luftfeuchte kultiviert und 24 h mit Mibefradil-beladenen Partikeln in speziellen 6-well Einsätzen (Greiner Bio-One Thincert; Frickenhausen, Porengröße 0,4 µm) inkubiert. Die weitere Durchführung sowie Auswertung des Versuches erfolgte wie bei der Proliferationsmessung von HLE-B3 (siehe Kapitel 3.5.).

3.12.3. Live/Dead Vitalitätstest

Zur Darstellung der Vitalität von humanen Linseneithelzellen wurde der Live/Dead[®] Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet, der Calcein und Ethidiumhomodimer enthält. Das Ethidiumhomodimer-1 kann geschädigte Zellmembranen passieren und so an Nucleinsäuren in den Zellen binden. Bei geschädigten Zellen wird somit eine rote Fluoreszenz erzeugt (Emission bei 635 nm). Calcein ist nicht Kernmembran-gängig und färbt vitale Zellen an, welche dadurch grün fluoreszieren (Emission bei 515 nm). Durch Zugabe von 2 µM Ethidiumhomodimer und 4 µM Calcein-AM konnte die Vitalität der Zellen, welche 24 h mit immobilisierten Mibefradil inkubiert wurden, nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM 410, Zeiss, Oberkochen) analysiert werden.

3.13. MTS-Test

Die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen von vitalen primären Linseneithelzellen sowie Zellen der Linie HLE-B3 unter Stoffwechseleinfluss wurde mit dem CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation-Assay (Promega, Madison, USA) oder auch kurz „MTS-Test“ zu verschiedenen Zeitpunkten quantitativ untersucht. Mit Hilfe des im Kit enthaltenen Elektronenfängers Phenanzin-Methosulfat (PMS) wandeln vitale Zellen das Substrat MTS (3-(4,5-Dimethylthiozol-2-yl)-5-(3-carboxymeth-oxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)2H-tetrazoliumsalz) zu Formazan um. Durch die Umwandlung des Substrates zeigt das Zellkulturmedium eine Farbreaktion, die mittels spektrophotometrischer Absorptionsmessung

bei 492 nm detektiert werden kann. Dabei ist die Extinktion des Formazans direkt proportional zur metabolischen Aktivität der vitalen Zellen.

Für den Versuch wurden Linsene­pithelzellen in einer Zellzahl von ca. 1×10^5 (in 300 μl Komplettmedium) in 48-well Zellkulturplatten ausgesät, 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen an Ionenkanalblockern (siehe Kapitel 2.3.) je 4, 24 und 48 h behandelt. Danach wurde je Well 60 μl MTS-Lösung aus dem Kit zu den Zellen gegeben und die Proben für 2 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Von dem Überstand wurden je 100 μl in ein Well einer 96-well Zellkulturplatte überführt und die Extinktion mit dem ELISA-Reader (Anthos 2010, Anthos, Eugendorf, Österreich) bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen.

3.14. Western Blot

Western Blots dienen der Trennung und Übertragung von Proteinen auf Trägermembranen zum anschließenden Nachweis mit Antikörpern. In dieser Arbeit wurde die Expression von Vinkulin unter Einfluss von Mibefradil untersucht.

HLE-B3 Zellen wurden in 6-well Zellkulturplatten kultiviert und mit 10 und 20 μM Mibefradil für 30 min, 1, 2 und 3 h inkubiert. Anschließend sind die Zellen mit je 100 μl Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (Bio-Rad, Hercules, USA) lysiert worden. Die Zelllysate wurden mit dem Bio-Rad D_C-Proteinassay (Bio-Rad, Hercules, USA) im ELISA-Reader (Anthos 2010, Anthos, Eugendorf, Österreich) bei einer Wellenlänge von 620 nm analysiert. Gleiche Proteinmengen von 20 μg konnten so in einem 4-20 % Tris-Glyzin Gel (PAGEr[®] Duramide[®] Precast Gels, Cambrex, New Jersey, USA) aufgetragen und bei 120 V über 2 h aufgetrennt werden. Vor dem Auftragen wurden die Lysate mit Lämmli­puffer versetzt. Die stark hydrophoben PVDF-Membranen (Roche, Mannheim) wurden vor dem Proteintransfer in Methanol geschwenkt und anschließend zweimal mit *Aqua dest.* gewaschen. Die Membranen erhalten somit hydrophile Eigenschaften. Mittels Kapillar­blotverfahren sind die aufgetrennten Proteine im Transblot (Bio-Rad, Hercules, USA) mit Transferpuffer über Nacht bei 220 mA auf die PVDF-Membran transferiert worden. Die mit Proteinen beladene Membran wurde anschließend 1-2 h in Blockpuffer geschwenkt und anschließend 1 h mit dem Primärantikörper Maus anti Vinkulin (Sigma, Steinheim) bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen mit Waschpuffer ist die Membran 1 h mit Alkalische Phosphatase (AP)-konjugiertem Sekundärantikörper Kaninchen anti Maus (1:10000 Verdünnung in Blockpuffer,

Dako, Dänemark) inkubiert worden. Nach erneutem mehrmaligem Waschen und abschließender Spülung mit Assaypuffer wurde ca. 1 ml Detektionslösung (CDP-Star, Roche, Mannheim) auf die Membran gegeben. Es handelt sich hierbei um eine Lumineszenzlösung zur Detektion AP-konjugierter Sekundärantikörpern auf den PVDF-Membranen.

Zur Bestimmung der Lumineszenz der Proben wurde die Membran in Folie (Roth, Karlsruhe) eingeschweißt und mit einem unbelichteten Fotofilm (Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien) im Dunkeln inkubiert. Der Fotofilm wurde im Curix 60 (Agfa, Köln) entwickelt.

3.15. Statistische Auswertungen

Bei unabhängig voneinander durchgeführten Wiederholungen (n) gleicher Versuche wurden die gemessenen Versuchsergebnisse als Mittelwerte \pm Standardabweichung bzw. \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Die Prüfung der Ergebnisse auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Kolgomorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung, mit gepaartem und ungepaartem T-Test sowie mittels Mann-Whitney-U-Test. Signifikanz zwischen den Messreihen wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen. Abstufungen in der Stärke der Signifikanz wurden mit den Wahrscheinlichkeiten $p < 0,05$ (*; schwach signifikant), $p < 0,01$ (**; signifikant) und $p < 0,001$ (***; stark signifikant) dargestellt. Die erhaltenen Messwerte wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 15.0 verglichen und ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Zellmorphologie unter Einfluss von Mibefradil

Die Morphologie der humanen Linseneithelzellen nach Mibefradil-Einfluss ist zunächst im Rasterelektronenmikroskop betrachtet worden. Die REM-Aufnahmen zeigen eine Beeinflussung durch den Kalziumkanalantagonisten Mibefradil. Die Linseneithelzellen erscheinen in der unbehandelten Kontrolle sowie unter Einfluss von 10 μM Mibefradil nach 24 h intakt. Sie sind flach und auf der Oberfläche ausgebreitet (Abbildung 8).

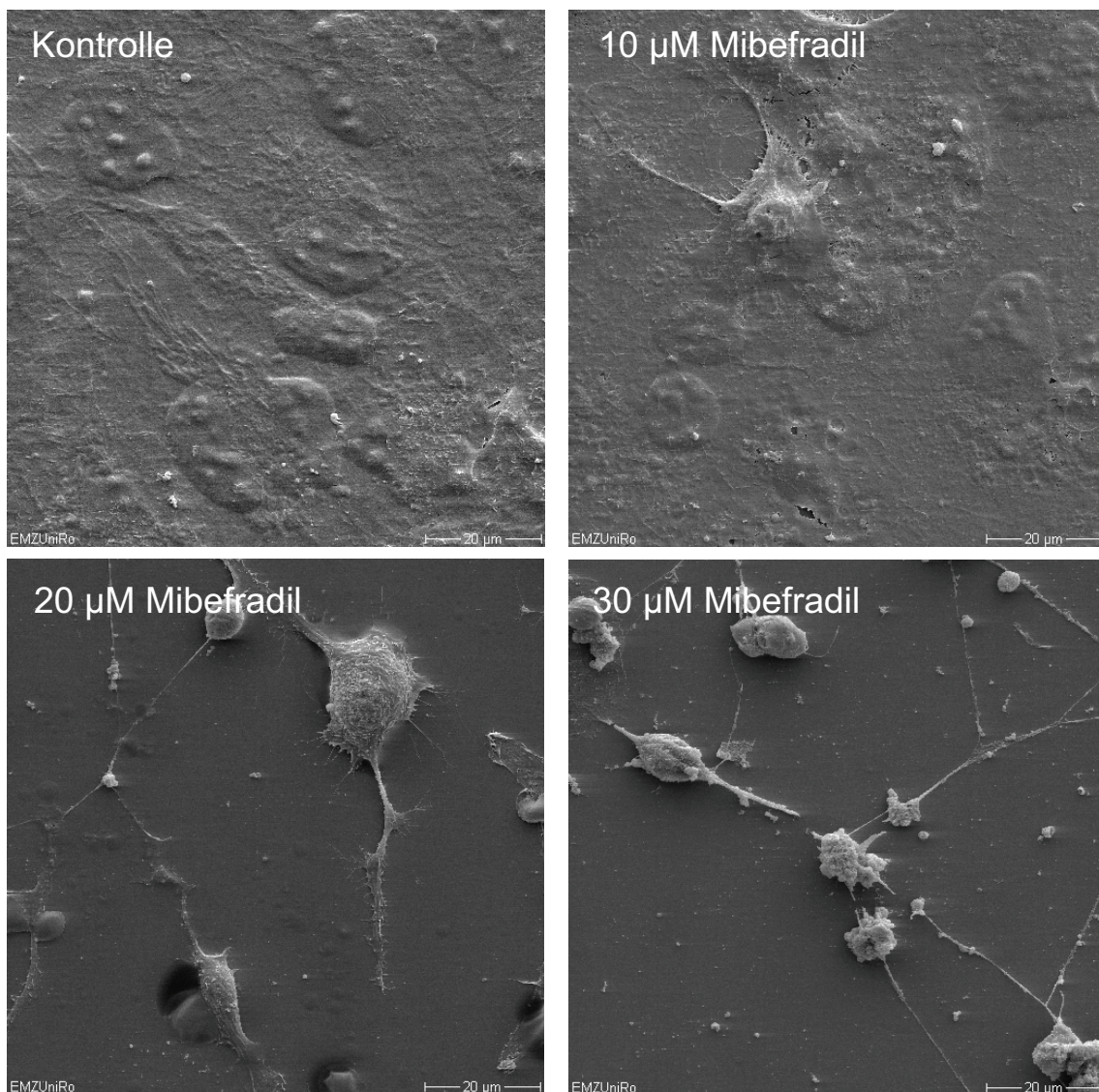


Abbildung 8: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von unbehandelten HLE-B3 Zellen (Kontrolle) und Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 10, 20 und 30 μM Mibefradil. Die Zellen zeigen mit zunehmender Mibefradilkonzentration morphologische Veränderungen.

Mit einer Erhöhung der Konzentrationen an Mibefradil ändert sich die Zellmorphologie. Die HLE-B3 Zellen sind nicht mehr so ausgebreitet, haben den Kontakt zu den Nachbarzellen verloren und kugeln sich von der Oberfläche ab.

4.2. Analyse des Adhäsionskomplexes bei HLE-B3 Zellen und hLEZ

Für die Untersuchung des Einflusses von Mibefradil auf den Adhäsionskomplex der Zellen ist das Protein Vinkulin für die Quantifizierung und den Zustand des Komplexes betrachtet worden. Vinkulin ist Bestandteil des Fokalkontaktes und separat als Protein untersucht worden. Die höchste Konzentration von Mibefradil bei den Versuchen mit Primärzellen wurde mit 20 μM gewählt. Zum Vergleich wurde die immortalisierte Zelllinie bei einer ähnlichen Konfluenz ebenfalls mit maximal 20 μM Mibefradil behandelt.

4.2.1. Expressionsanalyse von Vinkulin mittels Western Blot

Die Beurteilung der Veränderung der Expression von Vinkulin in den ersten drei Stunden nach Zugabe von Mibefradil kann aufgrund der hohen benötigten Proteinmenge nur bei der immortalisierten Zelllinie HLE-B3 Western Blot-Analysen durchgeführt werden. Die Untersuchung der Gesamtproteinlysate von 10 und 20 μM Mibefradil beeinflussten Linsenepithelzellen bei den Zeitpunkten 30 min, 1 h, 2 h, und 3 h im Western Blot zeigt eine veränderte Vinkulin-expression gegenüber der Kontrolle. Während sich die Expression bei den unbehandelten Zellen kaum ändert, ist bei den mit Mibefradil behandelten Zellen eine deutliche Expressionsabnahme zu beobachten (Abbildung 9).

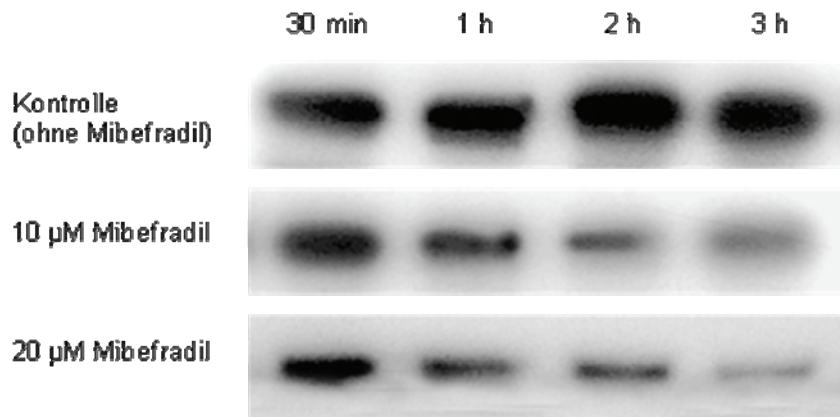


Abbildung 9: Western Blot zum Nachweis des Vinkulinproteins aus dem Lysat von HLE-B3 Zellen zu den Zeitpunkten 30 min, 1 h, 2 h sowie 3 h nach Mibefradilzugabe. Die Expression von Vinkulin nimmt bereits nach 1 h unter Wirkstoffeinfluss ab.

4.2.2. Analyse GFP-transfizierter Zellen unter Mibefradil-Einfluss

4.2.2.1. Mikroskopische Untersuchung der Mobilität der Vinkulinkontakte

Kontrollzellen, die in Kompletmedium ohne Wirkstoffeinfluss kultiviert worden sind, zeigen 24 h nach Mibefradilzugabe eine Ausbreitung in der Ebene, eine Bewegung der Vinkulinkontakte in die periphere Richtung und teilweise Neubildung von Kontakten (Abbildung 10 und 11). Die Mobilität der Vinkulinkontakte unter Einfluss von Mibefradil zeigt dagegen einen entgegengesetzten Effekt. Wie in Abbildung 11 zu sehen, stagniert die Mobilität von Vinkulin unter Einwirkung von 10 µM Mibefradil in den ersten 30 min. Im Vergleich zu den Kontrollzellen ist bereits teilweise eine gegenläufige Bewegung der Kontakte in zentripetale Richtung zu beobachten. Diese Bewegungsänderung verstärkt sich unter Einfluss von 20 µM Mibefradil. Die Effekte auf die Mobilität der Vinkulinkontakte sind sowohl bei HLE-B3 Zellen als auch bei primären hLEZ zu beobachten.

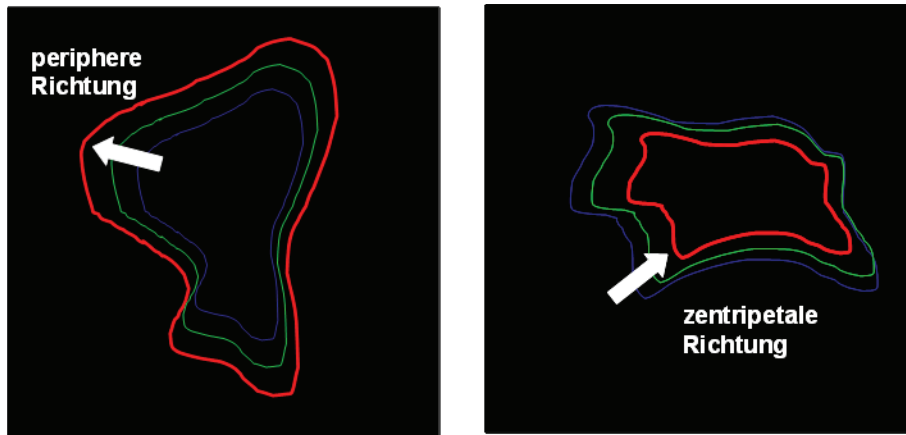


Abbildung 10: Schema der Bewegungsrichtung der Vinkulinkontakte bei humanen Linsenepithelzellen (HLE-B3, hLEZ) der unbehandelten Kontrolle (links) und unter Mibefradil-Einfluss (rechts).

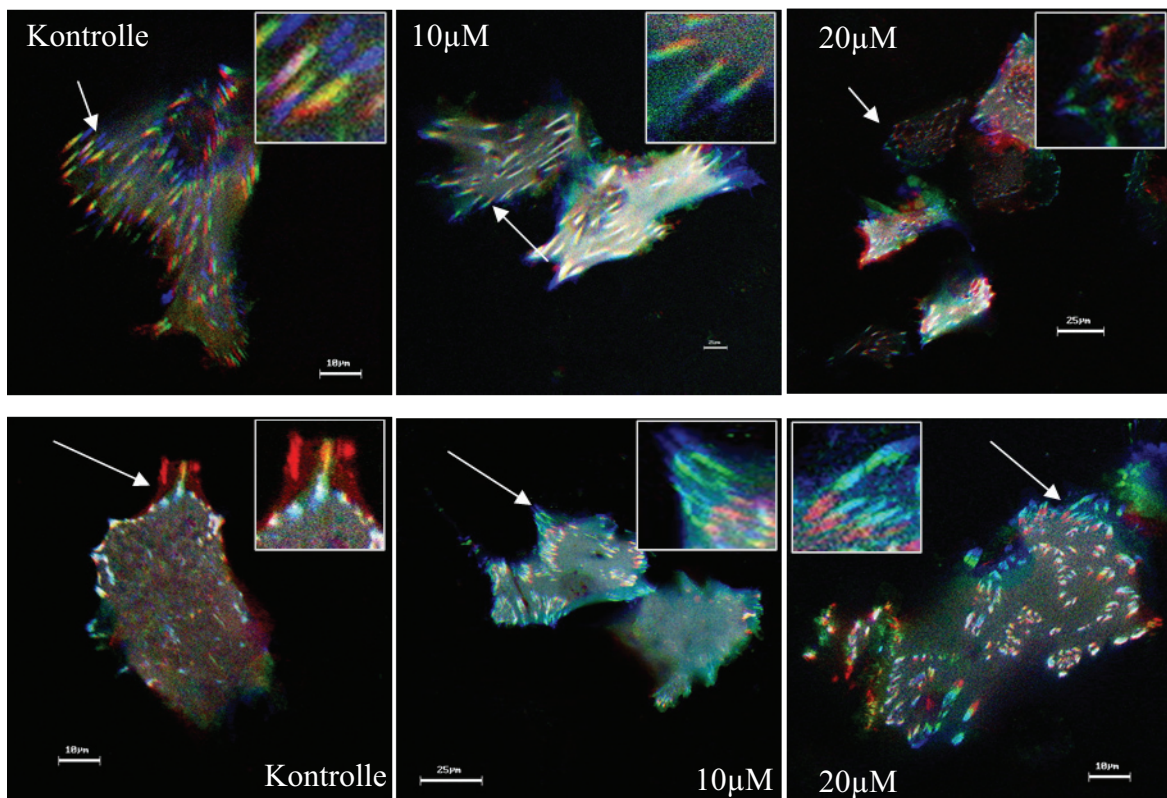


Abbildung 11: Mobilität von HLE-B3 Zellen (obere Reihe) und primären hLEZ (untere Reihe) unter Einfluss von 10 bzw. 20 µM Mibefradil. Die Bilder bestehen aus drei übereinandergelegten Einzelaufnahmen zu den Zeitpunkten 0 min (Start, blau), 10 min (grün) und 30 min (rot). Liegen alle drei Farbkanäle direkt übereinander, entsteht ein weißer Farbton. (Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie, LSM Leica TCS-SP2)

4.2.2.2. Quantitative Auswertung der Mobilität der Vinkulinkontakte

Die Bewegung der Vinkulinkontakte ist in den ersten 30 min quantitativ ausgewertet und die Geschwindigkeit in nm/min berechnet worden. Die Geschwindigkeit der Kontaktbewegungen bei den Kontrollzellen sowie von den Zellen unter Einfluss von 10 μ M Mibefradil ist vom Betrag her gleich, jedoch ist die Richtung der Bewegung entgegengesetzt (Abbildung 12 und 13). Bei den HLE-B3 Zellen und hLEZ, die mit einer Konzentration von 20 μ M Mibefradil behandelt wurden, kann die Verstärkung der Vinkulinkontaktbewegung auch quantitativ verdeutlicht werden (Abbildung 12 und 13). Diese Geschwindigkeitserhöhung mit zunehmender Konzentration ist jedoch nicht signifikant.

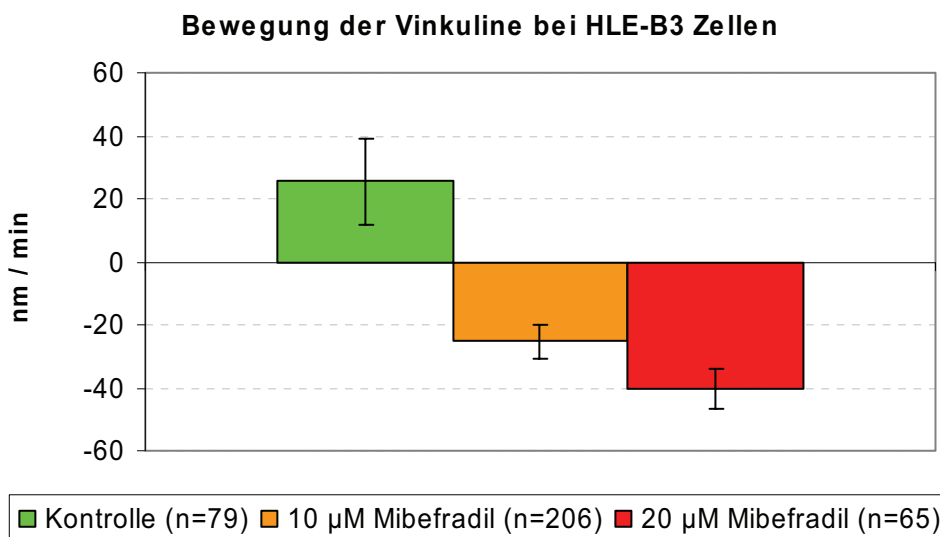


Abbildung 12: Geschwindigkeit der Vinkulinkontakte bei der immortalisierten Zelllinie HLE-B3 in 3 h unter Wirkstoffeinfluss. Positive Werte (grüner Balken, n entspricht der Anzahl der gemessenen Vinkuline, Mittelwert \pm SEM) weisen auf eine periphere Richtungsänderung hin. Die zentripetale Richtungsänderung ist entsprechend mit negativer Geschwindigkeit dargestellt (oranger bzw. roter Balken, n entspricht der Anzahl der gemessenen Vinkuline, Mittelwert \pm SEM).

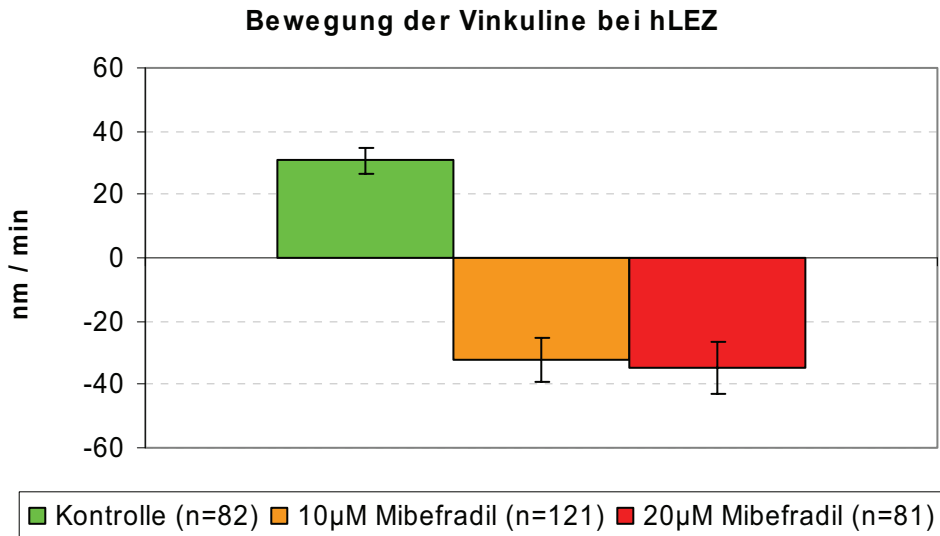


Abbildung 13: Geschwindigkeit der Vinkulinkontakte bei primären humanen Linsene­pithelzellen nach 3 h. Positive Werte (grüner Balken, n entspricht der Anzahl der gemessenen Vinkuline, Mittelwert \pm SEM) zeigen eine periphere Richtungsänderung an. Die zentripetale Richtungsänderung geht mit einer negativen Geschwindigkeit der Vinkulinkontaktbewegung einher (oranger bzw. roter Balken, n entspricht der Anzahl der gemessenen Vinkuline, Mittelwert \pm SEM).

4.2.2.3. Quantifizierung von Länge und Anzahl der Vinkulinkontakte

Um den Einfluss von Mibefradil auf die Vinkulinkontakte zusätzlich zu charakterisieren, wurden die Kontakte von HLE-B3 und hLEZ zu den Probenzeitpunkten gezählt und vermessen. Die Länge der einzelnen Vinkulinkontakte ändert sich unter normalen Kulturbedingungen weder bei den Primärzellen noch bei der Zelllinie (Abbildung 14 und 15). Bei HLE-B3 Zellen bleibt die Länge unter Einfluss von Mibefradil bis zum Zeitpunkt 1 h nach Wirkstoffzusatz nahezu konstant. 2 h und 3 h nach Mibefradilzugabe verkürzten sich die Kontakte unabhängig von der Wirkstoffkonzentration signifikant (Abbildung 14).

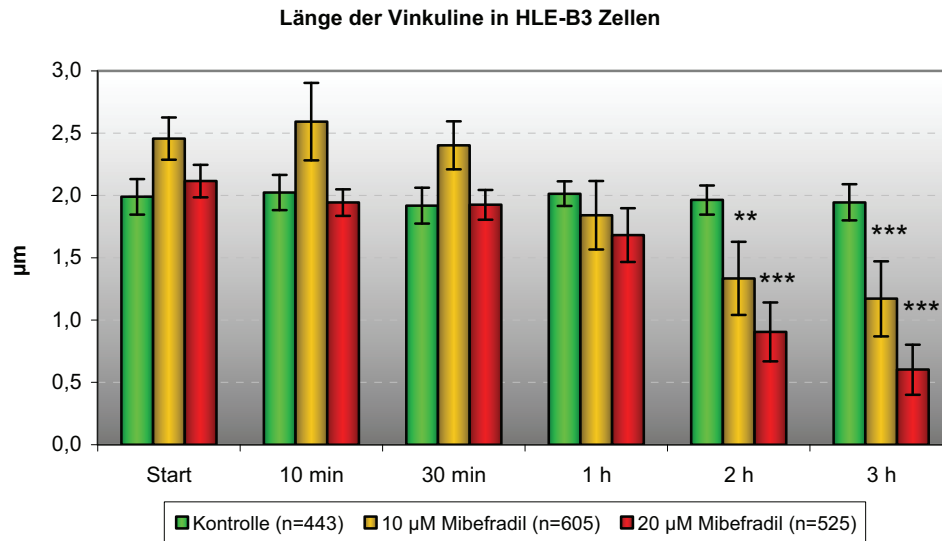


Abbildung 14: Länge der Vinkulinkontakte von HLE-B3 Zellen. Die Länge nimmt unter Einfluss von Mibefradil über die Versuchszeit signifikant ab (Mittelwert \pm SEM, t-Test gepaart; ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$; n entspricht der Anzahl der gemessenen Vinkulinkontakte).**

Bei den primären humanen Linsenepithelzellen zeigt sich ein ähnliches Bild. Die Länge der Vinkulinkontakte verringert sich unter Einwirkung von 10 μM Mibefradil nach 3 h signifikant. Bei der höheren Konzentration von 20 μM Mibefradil ist eine signifikante Längenreduzierung bereits nach 1 h zu beobachten. Die Länge der Vinkulinkontakte bleibt bei den unbehandelten Linsenepithelzellen konstant (Abbildung 15).

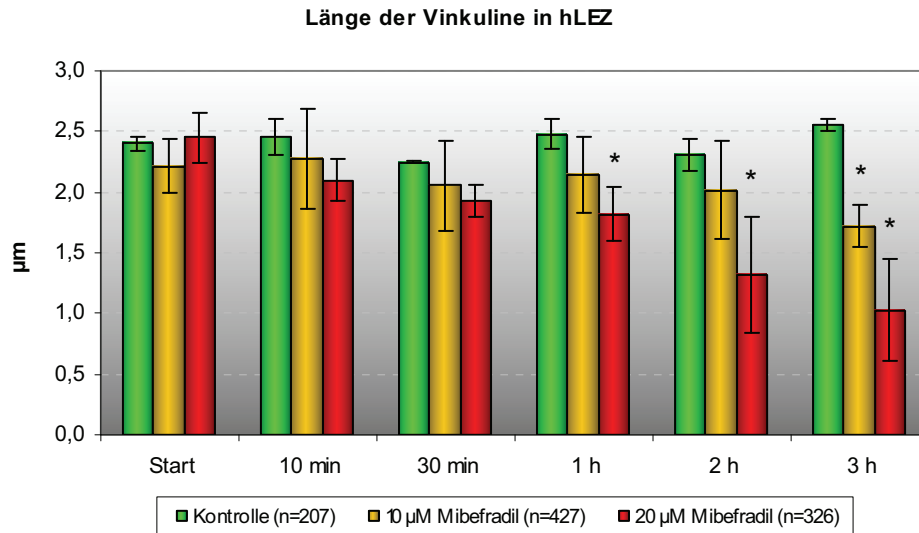


Abbildung 15: Länge der Vinkulinkontakte von hLEZ. Die Länge nimmt unter Einfluss von Mibefradil über die Versuchszeit signifikant ab (Mittelwert \pm SEM, t-Test gepaart; * $p < 0,05$; n entspricht der Anzahl der gemessenen Vinkulinkontakte).

Die Anzahl der Vinkulinkontakte bei den HLE-B3 Zellen ist über die beobachteten 3 h unter normalen Kultivierungsbedingungen ebenfalls konstant. Unter Einfluss von 10 μM Mibefradil kommt es bereits nach 30 min zu einer signifikanten Verringerung der Kontaktanzahl. Im weiteren Verlauf ist eine fortlaufende Reduzierung der Anzahl um ca. 50 % feststellbar. Bei Zugabe von 20 μM Mibefradil ist die Anzahl der Vinkuline ebenfalls nach 30 min signifikant reduziert, wobei sich der Abbau der Kontakte in den weiteren Stunden fortsetzt und die Anzahl nach 3 h Mibefradil-Einfluss insgesamt um mehr als 80 % gegenüber dem Ausgangswert verringert ist (Abbildung 16).

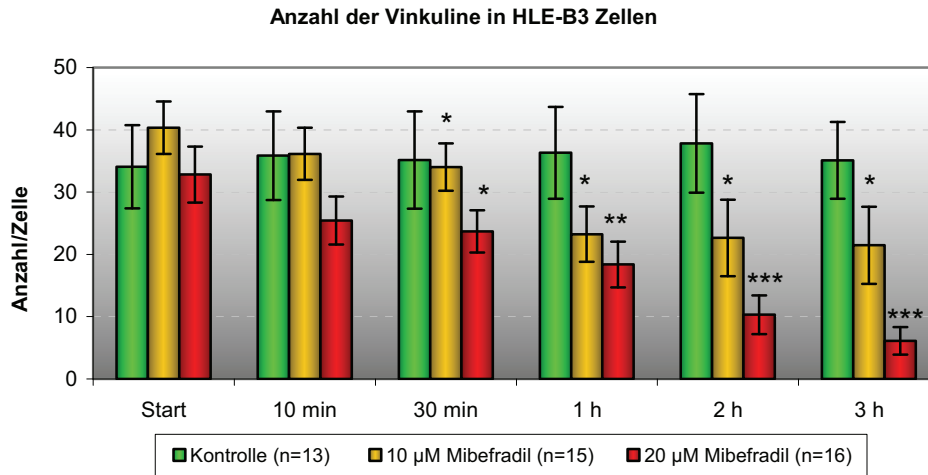


Abbildung 16: Anzahl der Vinkulinkontakte in HLE-B3 Zellen. Unter Einfluss von Mibefradil nimmt die Anzahl der Vinkuline über die Versuchszeit signifikant ab (Mittelwert ± SEM, t-Test gepaart; * p<0,05, ** p<0,01, * p<0,001; n entspricht der Anzahl der untersuchten Zellen).**

Im Gegensatz zu der gleichbleibenden Anzahl an Vinkulinkontakten bei unbehandelten hLEZ sinkt die Kontaktanzahl bei den mit 20 µM Mibefradil inkubierten Zellen nach 1 h signifikant. Bei einer Konzentration von 10 µM Mibefradil ist ebenfalls eine Reduktion der Kontaktanzahl zu beobachten, welche jedoch erst nach 3 h signifikant ist (Abbildung 17).

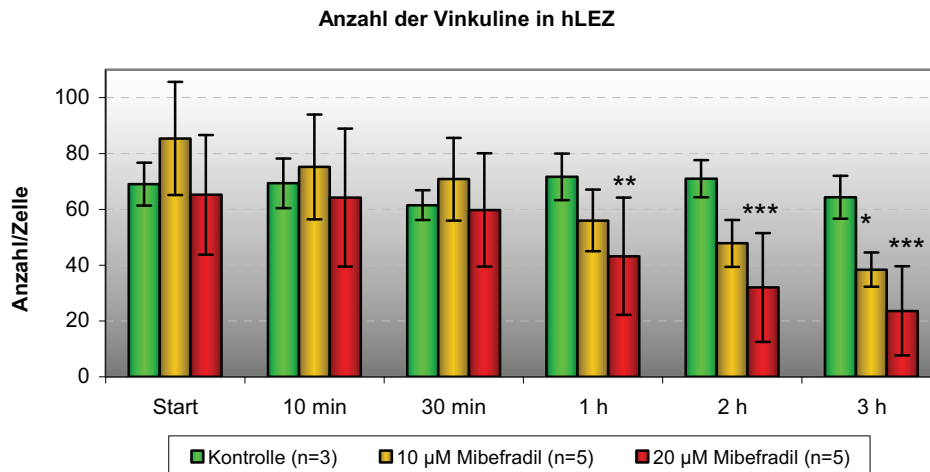


Abbildung 17: Anzahl der Vinkulinkontakte in hLEZ. Unter Einfluss von Mibefradil nimmt die Anzahl der Vinkuline über die Versuchszeit signifikant ab (Mittelwert ± SEM, t-Test gepaart; * p<0,05, ** p<0,01, * p<0,001, n entspricht der Anzahl der untersuchten Zellen).**

4.3. Zellflächenanalyse

Anhand der aus der Transfektion resultierenden unspezifischen Fluoreszenz des Zellkörpers konnte die Zellfläche zur Untersuchung des Einflusses von Mibefradil analysiert werden.

Bei der immortalisierten Zelllinie HLE-B3 und den primären hLEZ sind, ähnlich wie bei der Analyse der Vinkulinkontakte, Parallelen zu beobachten. Während sich die Zellflächen bei unbehandelten HLE-B3 Zellen im Versuchsverlauf noch vergrößern, kommt es nach Mibefradilzugabe zu einer deutlichen Reduktion der Fläche (Abbildung 18). Bereits nach 30 min verringert sich die durchschnittliche Zellfläche unter Einfluss von 10 μM Mibefradil signifikant. Diese Zellflächenverkleinerung ist in Gegenwart von 20 μM Mibefradil noch deutlicher. Die Signifikanz nimmt dabei mit zunehmender Zeit zu.

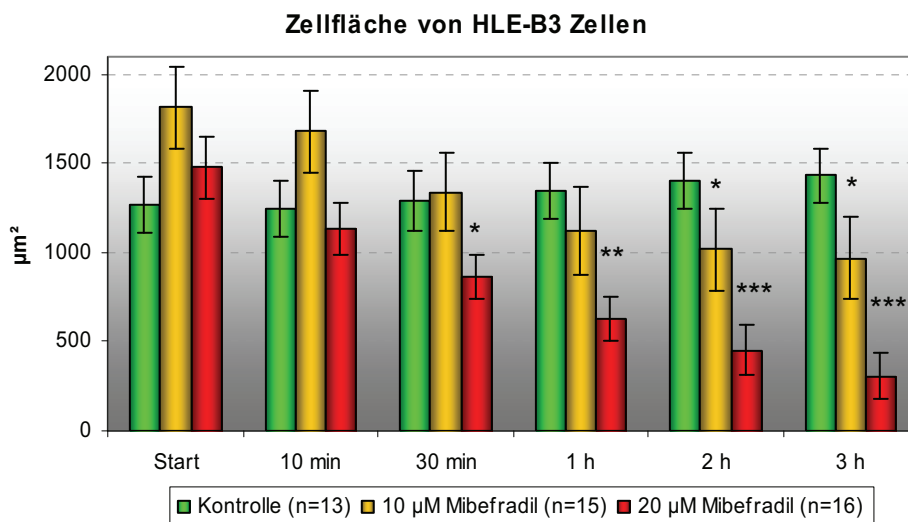


Abbildung 18: Vergleich der Zellflächen von unbehandelten HLE-B3 Zellen sowie HLE-B3 Zellen unter Einfluss von 10 und 20 μM Mibefradil über 3 h (Mittelwert \pm SEM, t-Test gepaart; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$; n entspricht der Anzahl der vermessenen Zellen).**

Diese Zellflächenveränderung unter Einfluss von 10 bzw. 20 μM Mibefradil kann auch bei den primären hLEZ gemessen werden. Bei den unbehandelten Zellen bleibt die Fläche über die Versuchszeit konstant (Abbildung 19). Bei einer geringeren Wirkstoffkonzentration nimmt die Fläche der Zellen mit der Zeit ab, wobei die Verkleinerung nach 3 h gegenüber dem Ausgangswert schwach signifikant ist. Unter Einfluss von 20 μM Mibefradil verringert sich die Zellfläche schon nach 1 h signifikant und wird im Verlauf der Versuchszeit zunehmend geringer.

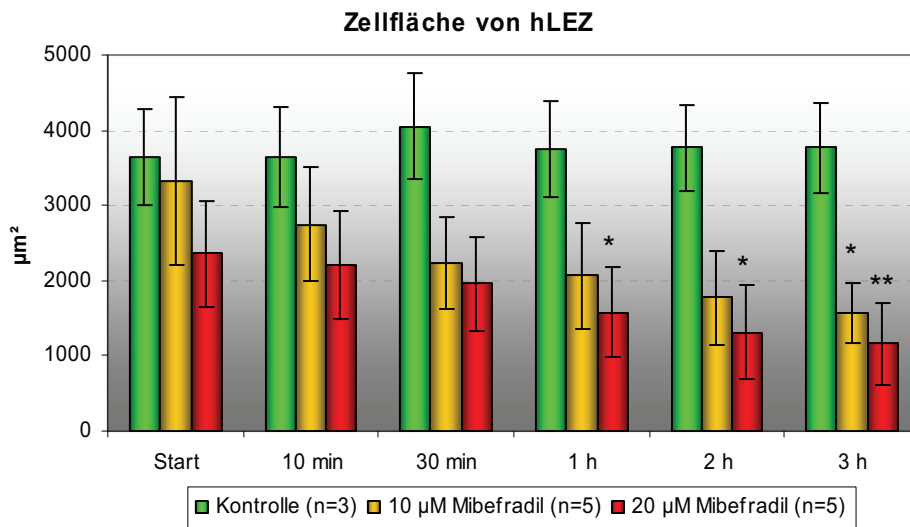


Abbildung 19: Vergleich der Zellflächen von unbehandelten hLEZ sowie unter Einfluss von 10 und 20 µM Mibefradil stehenden hLEZ über 3 h (Mittelwert ± SEM, t-Test gepaart; * p<0,05, ** p<0,01, n entspricht der Anzahl der vermessenen Zellen).

Generell ist festzustellen, dass die aus der humanen Kapsulorrhexis ausgewachsenen primären Linsenepithelzellen und die SV40 immortalisierten humanen HLE-B3 Linsenepithelzellen eine vergleichbare Reaktivität auf Mibefradil zeigen.

4.4. Einfluss der Ionenkanalblocker auf HLE-B3 Zellen

Anhand der Zelllinie HLE-B3 soll untersucht werden, inwieweit die beobachteten Auswirkungen durch Mibefradil selektiv auf diesen speziellen Wirkstoff zurückzuführen sind. Da der T-Typ-Kalziumkanalblocker Mibefradil auch das Potential besitzt, L-Typ-Kalziumkanäle sowie Kaliumkanäle zu inhibieren, wurden für die Versuche der typische T-Typ-Kalziumkanalblocker Ethosuximid (ETX), der typische L-Typ-Kalziumkanalblocker Verapamil und der nonselektive Kaliumkanalblocker 4-Aminopyridin (4-AP) als Vergleichswirkstoffe eingesetzt.

4.4.1. BD Powerblot Analyse

Zur Erfassung von Veränderungen in den Signalwegen unter Einfluss von 30 μ M Mibefradil wurde der BD Power Blot genutzt. Zum Vergleich wurden Lysate von Zellen unter 24-stündigem Einfluss von 10 mM ETX gemessen. Wie in Abbildung 20 zu sehen, ergeben sich Unterschiede in der Expression der Signalproteine ROCK-2, Phospholipase C γ 1 und Calreticulin. Die Expression von ROCK-2 wurde signifikant um ca. 40 % reduziert. Weiterhin ist auch eine signifikante Reduktion der Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) zu beobachten. Hier beträgt die Abnahme sogar mehr als 60 %. Gegensätzlich dazu wird Calreticulin überexprimiert. Die Expression ist gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen signifikant um 116 % erhöht. Im Vergleich dazu sind bei ETX-behandelten Zellen keine Veränderungen bei den genannten Proteinen zu beobachten.

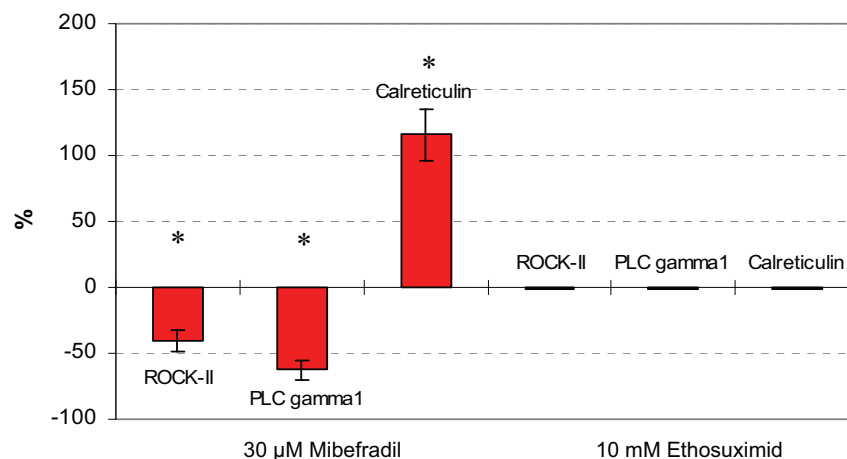


Abbildung 20: Ergebnisse des BD Power Blots. Dargestellt sind die Ergebnisse von HLE-B3 Zellen unter 24-stündigem Einfluss von 30 μ M Mibefradil sowie 10 mM ETX. Bei den Mibefradil-behandelten Zellen sind signifikante Veränderung in der Expression zu beobachten (n=3, Mann-Whitney-U-Test, * p<0,05). Der T-Typ-Kalziumkanalblocker ETX verursacht keine Veränderung in der Expression von ROCK-2, PLC γ 1 und Calreticulin.

4.4.2. Lokalisation und Expression von ROCK-2

Der BD Power Blot zeigt eine signifikante Reduktion der Expression von ROCK-2 in HLE-B3 Zellen unter Einfluss von Mibefradil. Die Verteilung und Expression von ROCK-2 wurde mittels Fluoreszenzfärbung genauer und vergleichend für alle eingesetzten Substanzen betrachtet. Bei den HLE-B3 Zellen ist ROCK-2 unter normalen Kulturbedingungen

gleichmäßig im Zellkern sowie Zytoplasma verteilt. Die zelluläre Anordnung ändert sich jedoch unter Einfluss von Mibefradil. Das Protein ist nicht gleichmäßig im Zellkern und Zytoplasma verteilt und die Expression von ROCK-2 ist unter höheren Konzentrationen von 20 und 30 μM stark vermindert (Abbildung 21). Wie in den konfokalen Mikroskopaufnahmen zu sehen, ändert sich auch die Morphologie der Zelle unter Einfluss von 20 und 30 μM Mibefradil.

Im Vergleich zu Mibefradil zeigen die mit 5 mM 4-AP, 10 mM ETX sowie 10 μM Verapamil behandelten Zellen nach 24 h eine ebenso gleichmäßige Verteilung von ROCK-2 wie die unbehandelten Kontrollzellen. Somit wird die Lokalisation des Proteins ROCK-2, wie bereits durch den BD Power Blot gezeigt, nur durch den Wirkstoff Mibefradil beeinflusst.

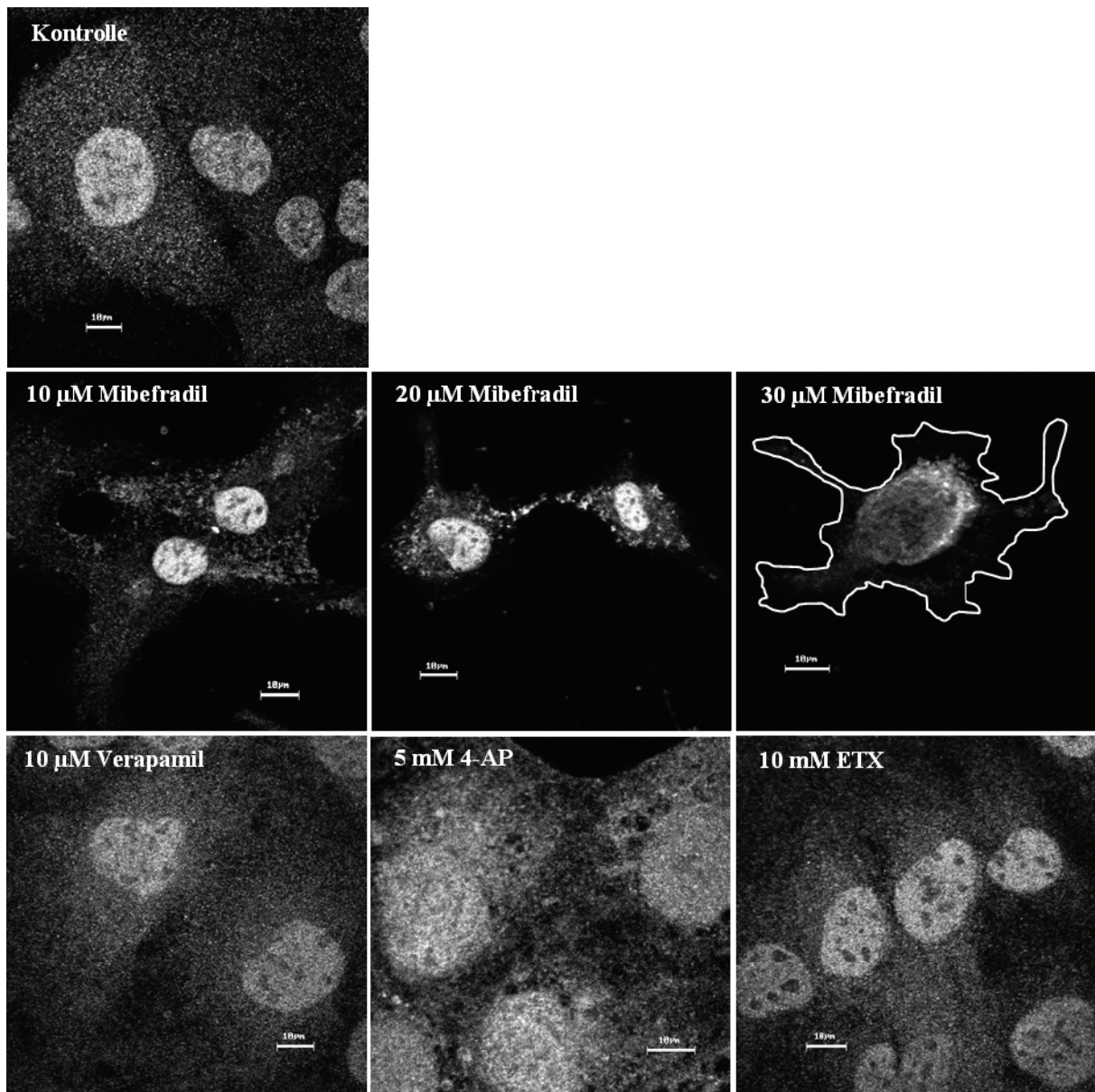


Abbildung 21: Konfokale Laserscanning-Mikroskopieaufnahmen der ROCK-2-Verteilung in unbehandelten HLE-B3 Zellen sowie HLE-B3 Zellen unter Einfluss verschiedener Wirkstoffe nach 24 h (LSM410, Carl Zeiss, Objektiv: Zeiss I 63x Öl-Immersionsobjektiv).

4.4.3. Untersuchung des Aktinzytoskeletts

In unbehandelten HLE-B3 Zellen ist das Aktinzytoskelett mit vielen Stressfasern ausgeprägt. Das Aktinzytoskelett wird nach 24-stündiger Inkubation mit 20 µM Mibefradil stark fragmentiert und abgebaut. Wie bereits in den Untersuchungen zur Zellmorphologie (siehe Kapitel 4.1.) gezeigt, schrumpft die Zelle zudem mit höherer Mibefradil-Konzentration. Die geringe Konzentration von 10 µM Mibefradil hat scheinbar keinen Einfluss auf das Aktinzytoskelett der Linsenepithelzellen. Die höchste Konzentration von 30 µM Mibefradil zeigt den gleichen Effekt wie bei der Behandlung mit 20 µM. Mibefradil. Auch hier ist das

Ergebnisse

Aktinzytoskelett nach 24 h stark fragmentiert und die Morphologie der Zellen entsprechend verändert.

Unter Einfluss der Vergleichsantagonisten sind im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen keine Veränderungen nach 24 h sichtbar (Abbildung 22). Weder bei 4-AP noch bei ETX oder Verapamil ist das Aktinzytoskelett in seiner Form beeinflusst.

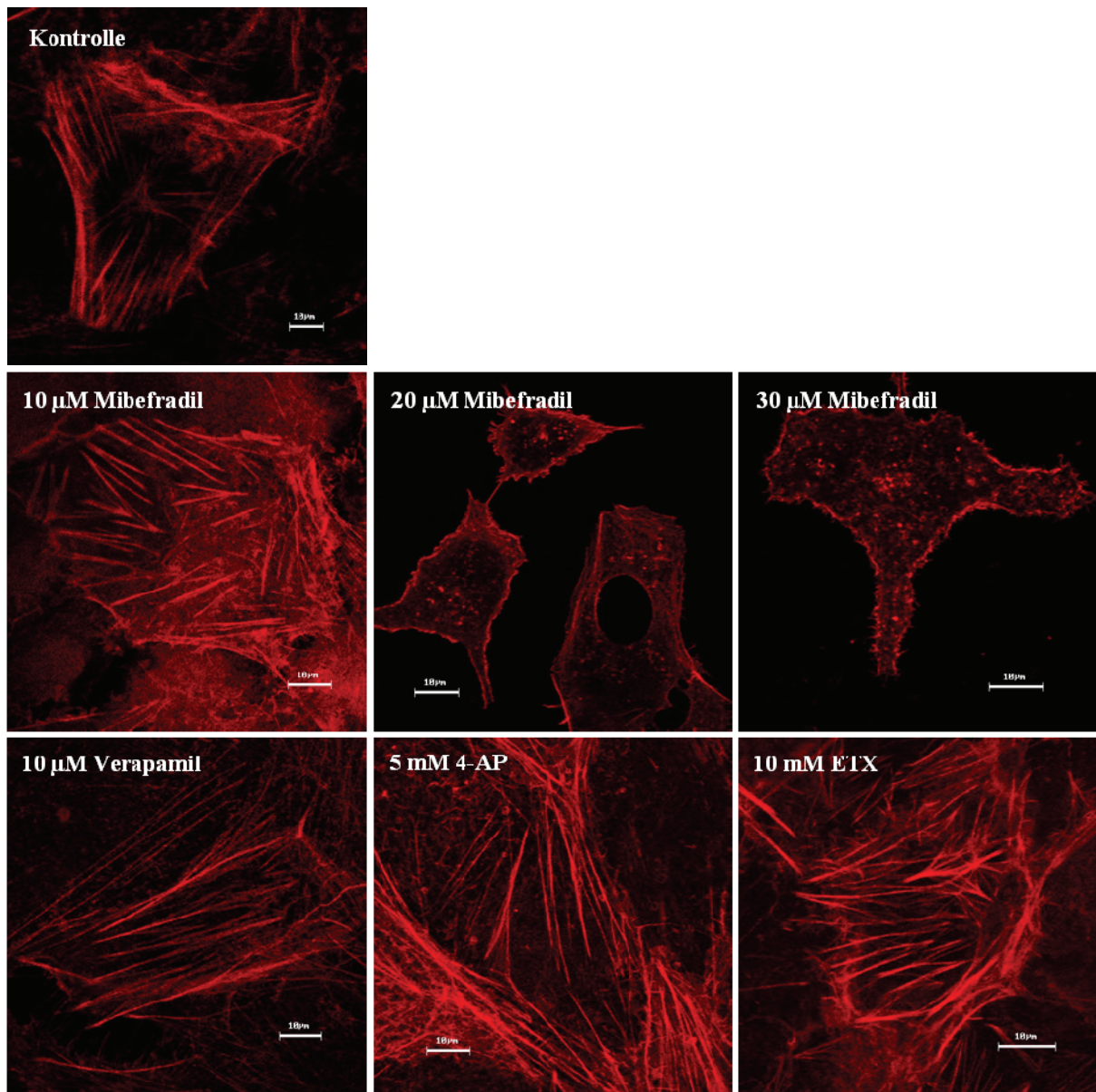


Abbildung 22: Konfokale Laserscanning-Mikroskopieaufnahmen von HLE-B3 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Ionenkanalantagonisten und 30minütiger Anfärbung des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin-TRITC (LSM410, Carl Zeiss, Objektiv: Zeiss 1 63x Öl-Immersionsobjektiv).

4.4.4. Zeitabhängige Adhäsion unter Stoffeinfluss

Die zeitabhängige Adhäsion von HLE-B3 Zellen unter Einfluss der Wirkstoffe wurde mit den Bionas[®] Sensorchips getestet. Die gemessene relative Zellimpedanz korreliert mit der Adhäsion und dem Bewachungszustand. Wie in Abbildung 23 zu sehen, adhären die Linseneithelzellen gut auf der Oberfläche des Sensorchips.

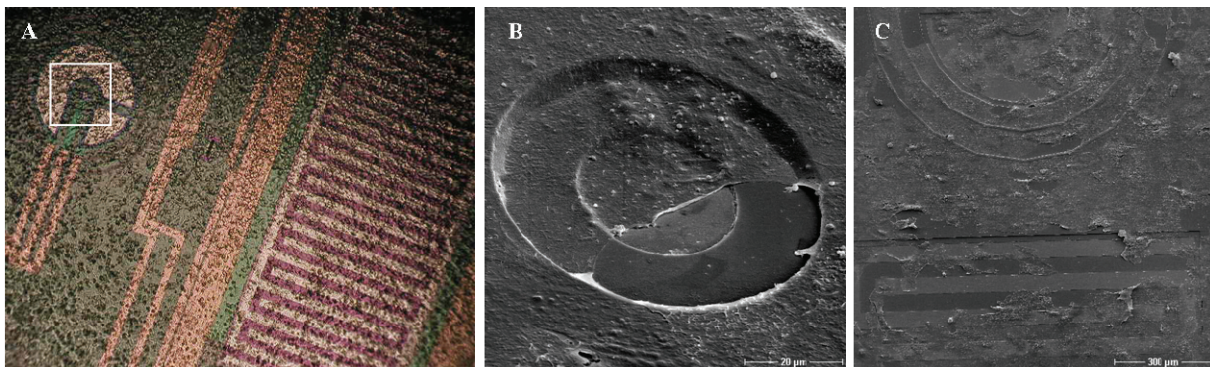


Abbildung 23: A: Mikroskopische Aufnahme von der Oberfläche eines mit Linseneithelzellen bewachsenen Bionas[®] Sensorchips. B: REM-Aufnahme der Oberfläche des Chips (Ausschnitt weißer Rahmen in A). Die HLE-B3 Zellen passen sich der Oberfläche an. C: REM-Aufnahme von HLE-B3 Zellen auf der Oberfläche des Sensorchips. Zu sehen sind die Zellen auf dem IDEs (untere Bildhälfte).

Die gemessenen Zelldichten bzw. die Konfluenz der Zellen waren in allen Versuchen in etwa gleich. Die Zellen zeigten einen subkonfluenten bis fast konfluenten Bedeckungszustand.

Der Vergleich von Mibefradil-behandelten Zellen mit unbehandelten Zellen zeigt, dass schon geringere Konzentrationen des Wirkstoffs die Adhäsion und Anzahl der adhären Zellen vermindern. In Gegenwart von 20 und 30 µM Mibefradil kommt es bereits 2 h nach Zugabe von Mibefradil zu einer signifikanten Reduktion der relativen Zellimpedanz, welche mit der Adhäsion der Zellen korreliert (Abbildung 24). Die Zellen kugeln sich von der Oberfläche ab, verlieren den Kontakt und verlieren ebenso den Zellkontakt zueinander. Dadurch sinkt die Impedanz. Während bei den unbehandelten Zellen die Adhäsion bzw. Konfluenz der Zellen über die Zeit weiter zunimmt, ist unter Mibefradil-Einfluss eine starke Abnahme bis auf knapp 10 % des Ausgangswertes zu beobachten. Auflichtmikroskopaufnahmen bestätigen, dass sich bei den Mibefradil-behandelten LEZ nach etwa 22 h fast alle Zellen abgelöst haben (Abbildung 24).

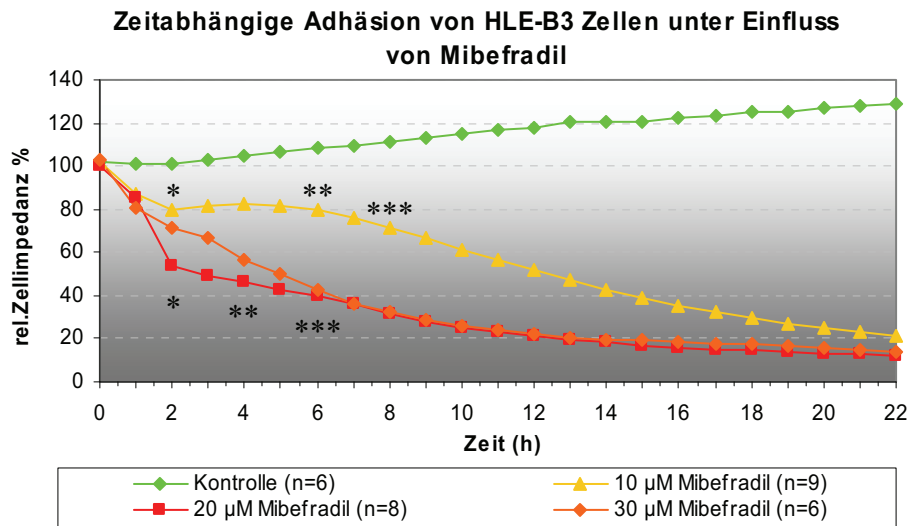


Abbildung 24: Zeitabhängiger Einfluss der verschiedenen Mibefradil-Konzentrationen auf die Adhäsion von HLE-B3 Zellen über 22 h. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Versuche n. Die relative Zellimpedanz bei Inkubation mit 10, 20 und 30 µM Mibefradil wurden mit dem T-Test statistisch ausgewertet. Die Adhäsion bzw. der Prozentsatz der adhärenenten Zellen nimmt bei allen getesteten Konzentrationen schon nach 2 h signifikant ab (* p<0,05, ** p<0,01, * p<0,001).**

Nach dem Versuch wurden die Chips aus dem Messsystem entnommen und zur besseren visuellen Begutachtung etwas Medium abgezogen. Abbildung 25 zeigt HLE-B3 Zellen auf dem IDEs Sensor vor und nach Beeinflussung mit 30 µM Mibefradil. Es ist deutlich zu sehen, dass nach Versuchsende kaum noch Zellen auf der Sensoroberfläche adhärenent sind.

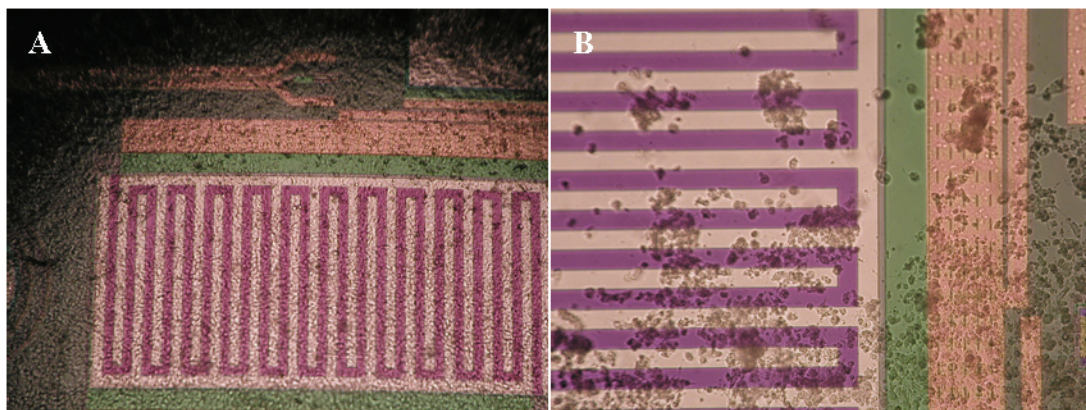


Abbildung 25: HLE-B3 Zellen kultiviert auf einem Sensorchip Bionas®. A: Zellen vor Versuchsbeginn (5fache Vergrößerung). B: Verbliebene Zellen nach 22-stündiger Inkubation mit 30 µM Mibefradil. Die Zellen sind abgekugelt und kaum noch adhärenent (10fache Vergrößerung).

Des Weiteren wurden die Versuche mit den Vergleichswirkstoffen simultan wiederholt. Dabei zeigte sich keine langfristige Beeinträchtigung der LEZ durch 10 μ M Verapamil und 10 mM ETX (Abbildung 26). In Gegenwart von ETX kam es zu einem Abfall der relativen Zellimpedanz nach ca. 1 h. Diese Abnahme ist allerdings nicht signifikant. Im anschließenden Verlauf steigt die Kurve wieder an. Es handelt sich demnach nur um eine kurze Beeinträchtigung der Zellen.

Die weiteren Versuche mit dem nonselektiven Kaliumkanalblocker 4-AP zeigen eine Beeinflussung der HLE-B3 Zellen. Die relative Zellimpedanz fiel allmählich über die Zeit von 22 h bis auf etwa 40 % des Anfangswertes ab. Allerdings ist dieser Abfall durch recht unterschiedliche Verläufe einzelner Versuche zu keinem Zeitpunkt signifikant.

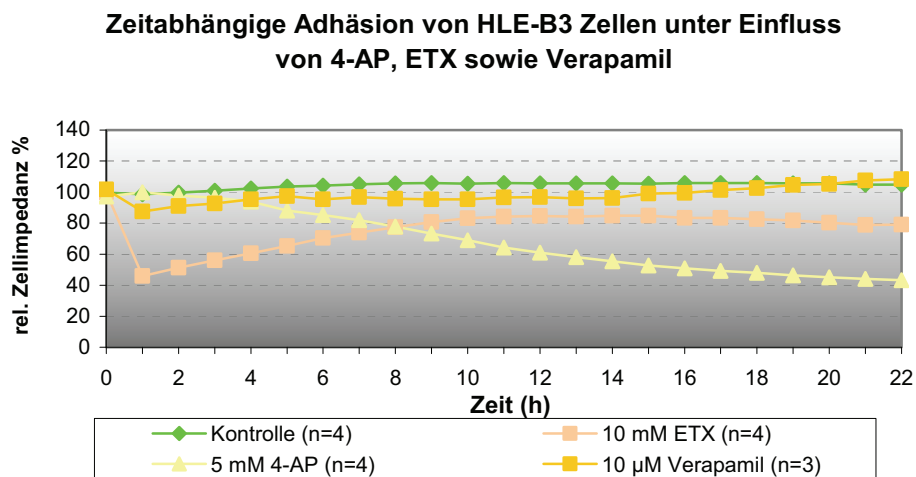


Abbildung 26: Zeitabhängiger Einfluss von 5 mM 4-AP, 10 mM ETX sowie 10 μ M Verapamil auf die Adhäsion von HLE-B3 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zellimpedanzen der einzelnen Versuche für jede Substanz. Die Abnahme der Zellimpedanz unter Einfluss von 5 mM 4-AP ist zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Die Vergleichsantagonisten 4-AP, ETX und Verapamil zeigten in den untersuchten Konzentrationen keine Effekte auf die relative Zellimpedanz der HLE-B3 Zellen auf den Sensorchips und somit keine wesentliche Beeinflussung der Adhäsion.

4.4.5. Analyse der Zellzyklusphasen

Um zu untersuchen, ob die verschiedenen Substanzen Effekte im Zellzyklus der Linsenepithelzellen induzieren, wurde die Proliferation mittels DNA-Analyse im Durchflusszytometer bestimmt. Es wurden die einzelnen Zellzyklusphasen G0/G1 (Protein- und RNA-Synthese/Ruhephase), S (Synthesephase), G2/M (Zellteilungsphase) und Apoptose im späten Stadium detektiert. Die Zellzyklusphasen S und G2/M markieren die proliferative Phase. Wie die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, kann auch hinsichtlich der Zellzyklusphasen keine signifikante Beeinträchtigung durch die L-Typ-Kalziumkanalblocker Verapamil und T-Typ Kalziumkanalblocker ETX sowie den nonselektiven Kaliumkanalblocker 4-AP festgestellt werden (Abbildung 27-Abbildung 30).

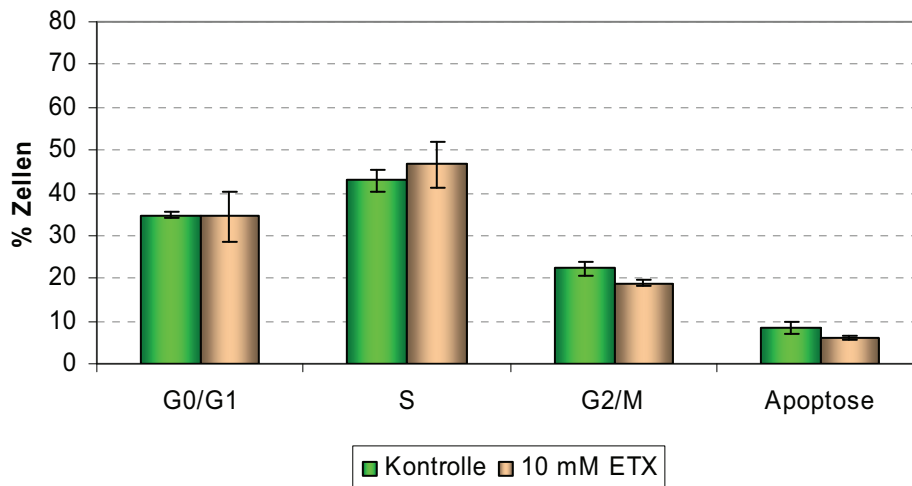


Abbildung 27: Vergleich der durchflusszytometrisch analysierten Zellzyklusphasen von HLE-B3 Zellen unter Einfluss von 10 mM ETX gegenüber unbehandelten Zellen. Es treten keine Unterschiede zwischen Kontrolle und behandelten Zellen auf. Dargestellt sind die Mittelwert \pm SEM (n=5).

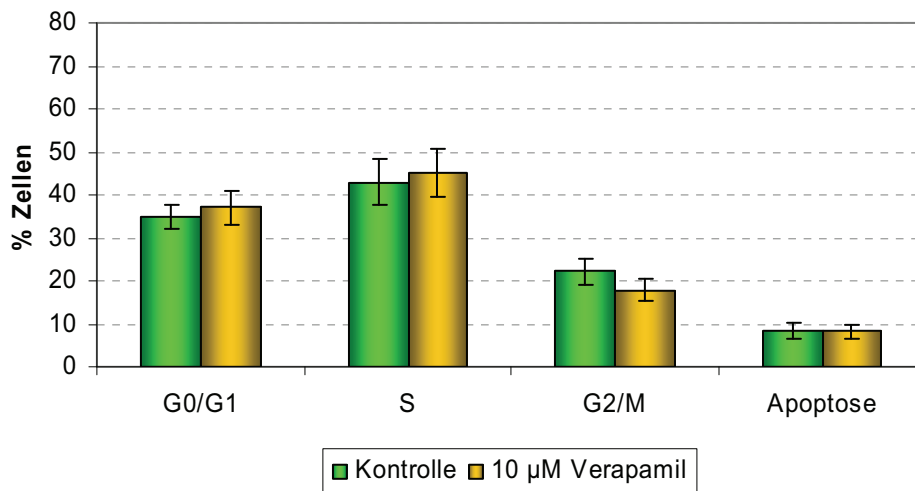


Abbildung 28: Vergleich der durchflusszytometrisch analysierten Zellzyklusphasen von HLE-B3 Zellen unter Einfluss von 10 µM Verapamil gegenüber unbehandelten Zellen. Es treten keine Unterschiede zwischen Kontrolle und behandelten Zellen auf. Dargestellt sind die Mittelwert ± SEM (n=5).

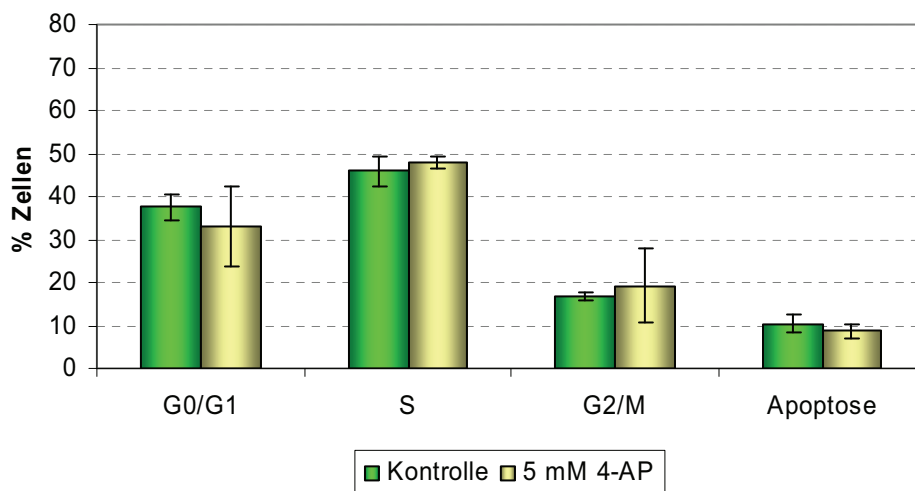


Abbildung 29: Vergleich der durchflusszytometrisch analysierten Zellzyklusphasen von HLE-B3 Zellen bei Inkubation mit 5 mM 4-AP gegenüber unbehandelten Zellen. Unter Einfluss von 4-AP treten keine Unterschiede in den Zellzyklusphasen auf. Dargestellt sind die Mittelwert ± SEM (n=5).

Nur bei 24-stündigem Einfluss von 30 µM Mibefradil kann gezeigt werden, dass die Linseneithelzellen in Gegenwart dieser Substanz vermehrt in der G0/G1 Phase verbleiben (Abbildung 30). Der Anteil der Zellen in der Synthesephase sinkt der prozentual leicht ab. Dieser Abfall ist allerdings nicht signifikant.

In der Zellteilungsphase G2/M ist der prozentuale Anteil der Zellen unter Mibefradil-Einfluss signifikant reduziert, der Anteil der apoptotischen Zellen hingegen signifikant erhöht.

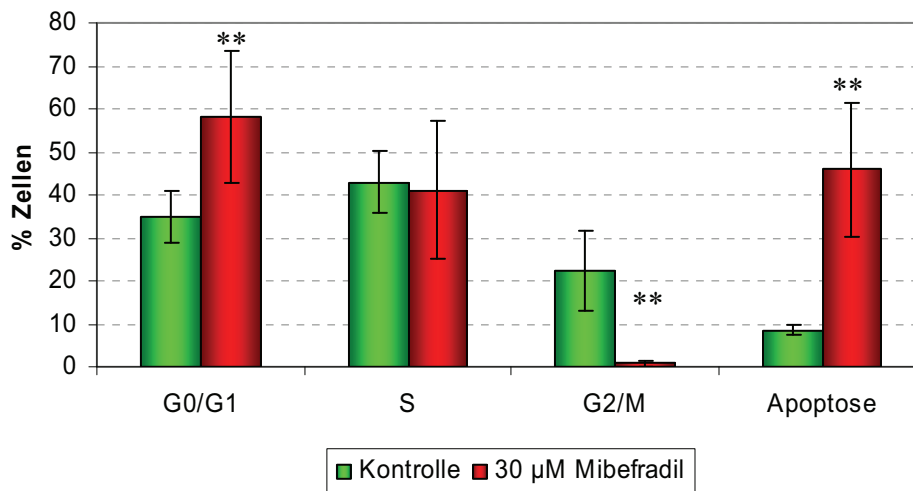


Abbildung 30: Vergleich der durchflusszytometrisch analysierten Zellzyklusphasen von HLE-B3 Zellen bei Inkubation mit 30 µM Mibefradil gegenüber unbehandelten Zellen. Unter Einfluss von 30 µM Mibefradil sind signifikante Veränderungen in der G0/G1 und G2/M-Phase sowie in der Apoptose zu beobachten (Mittelwert ± SEM, n=5, t-Test, ** p<0,01).

Des Weiteren wurden Linseneithelzellen mit allen Vergleichswirkstoffen zusammen (4-AP, ETX und Verapamil in Kompletmedium) für 24 h inkubiert. Damit sollten theoretisch die T-Typ und L-Typ Kalziumkanäle sowie die Kaliumkanäle gleichzeitig blockiert und somit die Wirkung von Mibefradil erreicht werden. Das Ergebnis zeigt jedoch nicht dasselbe Muster der Beeinflussung wie bei der Inkubation der Zellen mit 30 µM Mibefradil. Der Anteil der kombiniert behandelten HLE-B3 Zellen ist zwar in der S-Phase gegenüber unbehandelten HLE-B3 Zellen reduziert und der Anteil der apoptotischen Zellen erhöht, jedoch sind die Unterschiede nicht signifikant. Die durchschnittliche prozentuale Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen ist nicht mit den Zellen unter Mibefradil-Einfluss vergleichbar (Abbildung 31). Eine gleichzeitige Blockierung von T-Typ- und L-Typ-Kalziumkanälen sowie Kaliumkanälen hat nicht dieselbe Wirkung auf die Linseneithelzellen wie allein die Inkubation mit 30 µM Mibefradil.

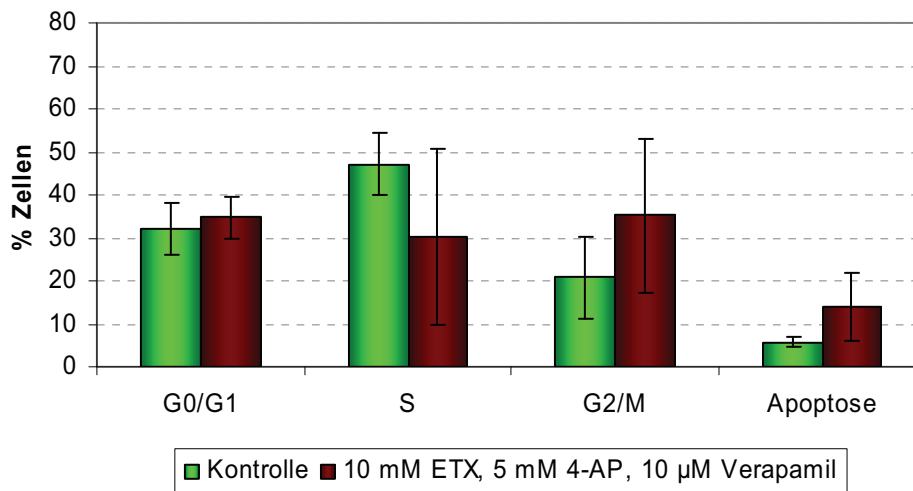


Abbildung 31: Vergleich der durchflusszytometrisch analysierten Zellzyklusphasen von HLE-B3 Zellen unter kombiniertem Einfluss von 10 mM ETX, 5 mM 4-AP und 10 µM Verapamil gegenüber unbehandelten Zellen. Es sind Unterschiede in der S und G2/M-Phase sowie in der Apoptose zu beobachten, die jedoch nicht signifikant sind (Mittelwert ± SEM, n=5).

4.4.6. Untersuchungen zur Expression der Integrinuntereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 1$

Integrine spielen eine Schlüsselrolle bei der Adhäsion der Zellen an Oberflächen. Linseneithelzellen bilden u.a. auch die Integrinuntereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 1$ aus. Die Analyse des Einflusses von Mibefradil und den Vergleichswirkstoffen auf die Integrinexpression sollte weiteren Aufschluss über den Wirkmechanismus von Mibefradil geben.

Durchflusszytometrische Untersuchungen und konfokale Mikroskopieaufnahmen belegen eine deutliche Verminderung der Expression der Integrinuntereinheit $\alpha 2$ (CD 49b) in HLE-B3 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 20 µM und 30 µM Mibefradil (Abbildungen 32 und 33). Im Gegensatz dazu zeigen die Vergleichswirkstoffe keine signifikanten Veränderungen.

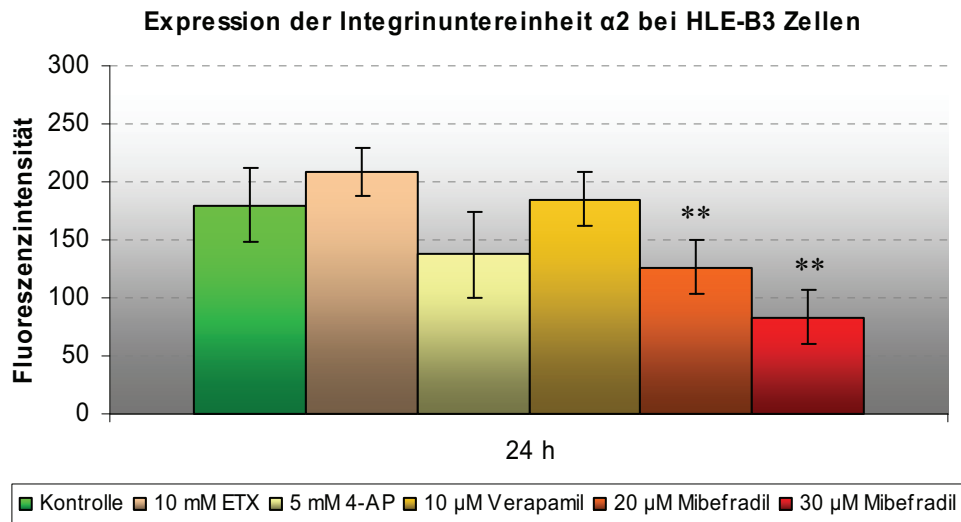


Abbildung 32: Die Expression der Integrinuntereinheit $\alpha 2$ wird nicht durch 24-stündige Inkubation mit ETX und Verapamil beeinflusst. Unter Einfluss von 5 mM 4-AP ist eine leichte, aber nicht signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität (FL) und damit der Expression zu beobachten. Unter Einfluss von 20 und 30 μM Mibefradil ist eine signifikante Reduktion der Expression zu messen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=5, t-Test, ** p<0,01).

Konfokale Aufnahmen bestätigen die durchflusszytometrischen Messungen. Bei der Kontrolle sowie bei Zellen, die 24 h mit 5 mM 4-AP, 10 mM ETX bzw. 10 μM Verapamil behandelt wurden, zeigt sich eine feine Verteilung der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheiten. Es sind keine Beeinträchtigungen in der Verteilung bzw. Intensität der Fluoreszenz zu beobachten. Unter Einfluss von 10 μM Mibefradil ist die Verteilung ebenso gleichmäßig. Bei den höheren Mibefradil-Konzentrationen sind die Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheiten nicht mehr gleich verteilt. Vielmehr sind sie randständig lokalisiert und in ihrer Anzahl deutlich reduziert. Zudem weisen die untersuchten Zellen eine Änderung der Zellform auf. Sie schrumpfen und sind nicht mehr so ausgebreitet.

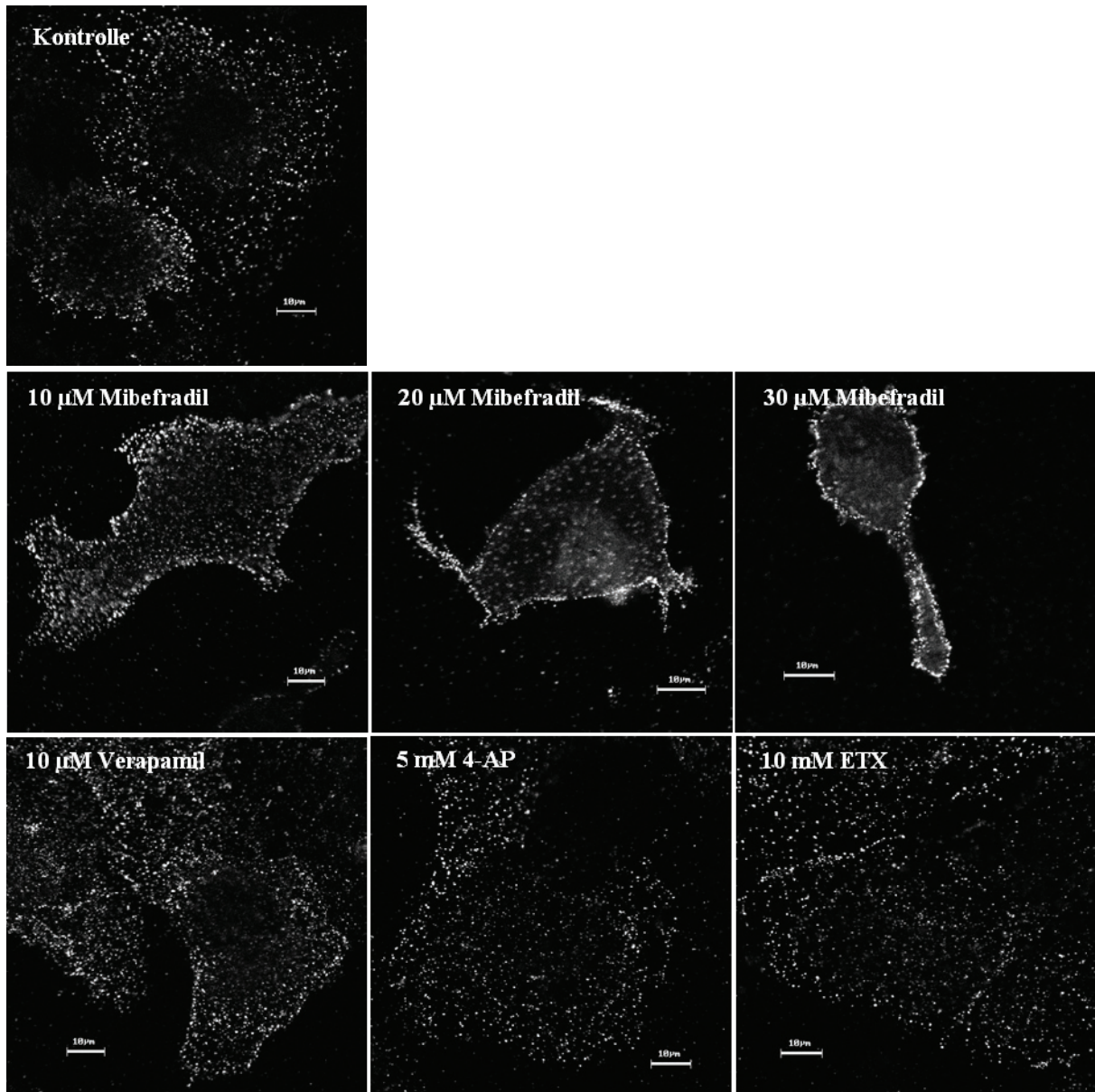


Abbildung 33: Konfokale Mikroskopieaufnahmen der Verteilung der Integrinuntereinheit $\alpha 2$ in HLE-B3 Zellen nach 24-stündiger Inkubation (LSM410, Carl Zeiss, Objektiv: Zeiss 1 63x Öl-Immersionsobjektiv).

Bei der Untersuchung der Integrinuntereinheit $\beta 1$ (CD29) zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Analysen der Integrinuntereinheit $\alpha 2$. Anhand durchflusszytometrischer Tests kann ebenfalls eine signifikante Reduktion von $\beta 1$ nach 24 h Inkubation mit 20 μ M und 30 μ M Mibefradil beobachtet werden, wobei die höhere Konzentration eine stärkere Verminderung verursacht (Abbildung 34). Die Vergleichswirkstoffe zeigen dagegen keine Beeinflussung der Integrinuntereinheit $\beta 1$ nach 24 h.

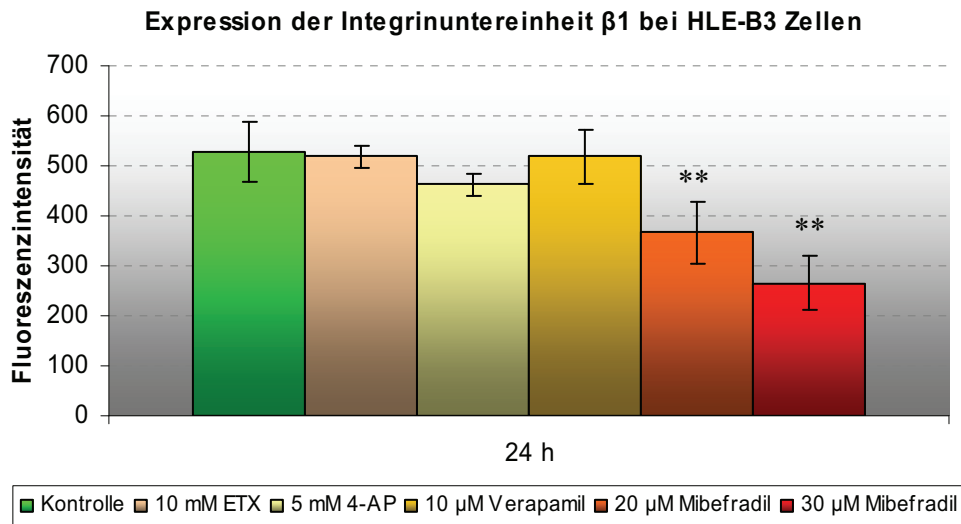


Abbildung 34: Durchflusszytometrische Messung der Expression der Integrinuntereinheit $\beta 1$ nach Inkubation der HLE-B3 Zellen mit den verschiedenen Ionenkanalblockern für 24 h. Nur unter Einfluss von Mibefradil sind die Fluoreszenzintensitäten (FL) und damit die Expression, signifikant reduziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=5, t-Test, ** p<0,01).

Bei der vergleichenden Fluoreszenzmarkierung von HLE-B3 Zellen mit einem Antikörper gegen Integrin $\beta 1$ wird die durchflusszytometrische Messung visuell bestätigt. Die konfokalen Aufnahmen zeigen die Verteilung und Intensität von Integrin $\beta 1$ bei der immortalisierten Zelllinie unter Einfluss der einzelnen Wirkstoffe. In Abbildung 35 ist deutlich zu erkennen, dass bei der Kontrolle sowie bei den mit 10 mM ETX, 10 μ M Verapamil sowie 5 mM 4-AP behandelten Zellen Integrin $\beta 1$ gleichmäßig über die Zellfläche verteilt ist. Bei gleichen Aufnahmeparametern scheint es, als ob die Fluoreszenz bei den Vergleichswirkstoffen etwas intensiver ist. Auch unter Einfluss von 10 μ M Mibefradil ist Integrin $\beta 1$ nach 24 h noch nicht beeinflusst. Erst bei Konzentrationen von 20 μ M bzw. 30 μ M Mibefradil sind wieder deutliche morphologische Veränderungen zu beobachten (Abbildung 35). Weiterhin sind Veränderungen in der Verteilung des Integrin $\beta 1$ über die Zelle sichtbar. Die Fluoreszenzintensität nimmt ab und die $\beta 1$ -Untereinheiten sind eher randständig angeordnet.

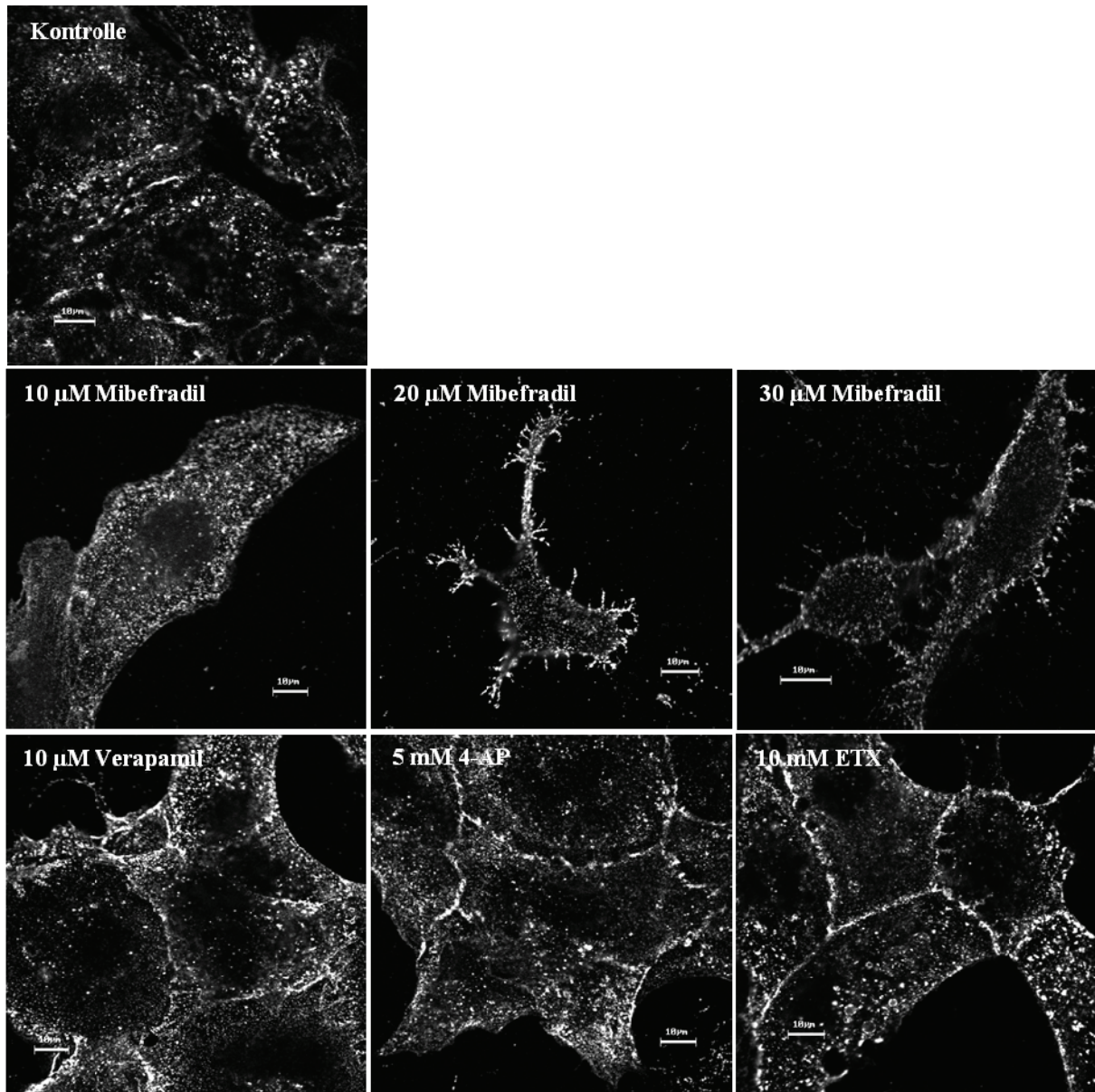


Abbildung 35: Konfokale Laserscanning-Mikroskopieaufnahmen der Expression der Integrinuntereinheit β 1 in der Zelllinie HLE-B3 nach 24 h (LSM410, Carl Zeiss, Objektiv: Zeiss I 63x Öl-Immersionsobjektiv).

4.4.7. Vergleich des Stoffumsatzes unter Stoffeinfluss

Der Stoffumsatz bzw. die metabolische Aktivität von HLE-B3 Zellen nach 4, 24 und 48 h unter Stoffeinfluss wurde mit dem MTS-Test analysiert.

Wie in Abbildung 36 dargestellt, wird die metabolische Aktivität der Zellen nicht negativ durch die einzelnen Vergleichswirkstoffe beeinflusst. Zum Zeitpunkt 24 h nach Zugabe der Vergleichsantagonisten scheinen die Zellen sogar eine höhere metabolische Aktivität zu haben. Auch die relativ geringe Konzentration von 10 μ M Mibefradil zeigt keine signifikante

Beeinflussung des Stoffumsatzes zu den verschiedenen Zeitpunkten. Nach 48 h liegt die Aktivität immer noch bei über 80 %. Anders sieht das Bild bei den Zellen unter Einfluss von 20 und 30 μM Mibefradil aus. Nach 4 h Wirkstoffeinfluss ist noch keine Reduktion der Aktivität zu erkennen. Nach 24 h sinkt die Aktivität bei 20 μM signifikant auf 80 % des Ausgangswertes, bei einer Konzentration von 30 μM sogar auf 60 % ab. Nach 48 h ist der Metabolismus der Zellen bei 20 μM Mibefradil dann auf unter 60 % des Ausgangswertes reduziert. Bei der Höchstkonzentration von 30 μM Mibefradil beträgt die Verminderung der Stoffwechselaktivität nach 48 h über 70 %.

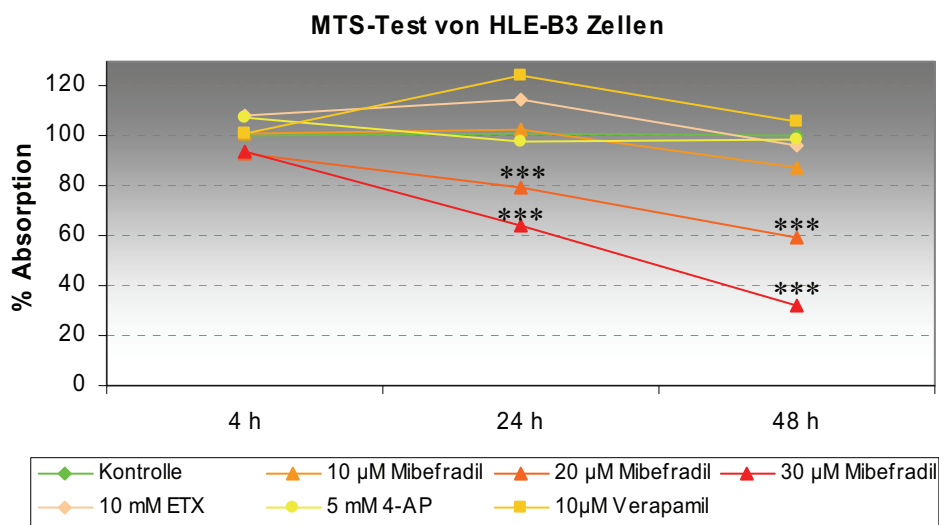


Abbildung 36: Der MTS-Test zeigt, dass die metabolische Aktivität nur unter Einfluss von 20 und 30 μM Mibefradil nach 24 h signifikant verändert ist. Nach 48 h ist eine weitere Reduktion erkennbar. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Versuchen (Mann-Whitney-U-Test, *** $p < 0,001$).

4.4.8. Untersuchungen von Signalwegen

Für die Detektion der phosphorylierten Signalproteine p-ERK1/2, p-Akt und p-p38 MAPK wurden HLE-B3 Zellen mit den verschiedenen Ionenkanalblockern inkubiert und mit dem Luminex xMAP™-Messsystem untersucht.

Zu jedem Probenzeitpunkt wurde zeitgleich eine Kontrolle mitgemessen und an dieser die Ratio berechnet. Die Ratio der unbehandelten Kontrollzellen entspricht in den folgenden Grafiken immer 1. Aus Messungen von verschiedenen phosphorylierten Signalproteinen ergaben sich bei Phospho-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷), Phospho-p38 (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²) und Phospho-AKT (Ser⁴⁷³) einige Unterschiede. Weiterhin wurden die Lysate im Western

Blot aufgetragen und jeweils die Expression des Gesamtproteins detektiert. Damit eine Aussage über den Einfluss der Wirkstoffe auf aktive Proteine getroffen werden kann, sollte das nichtaktive, unphosphorylierte Protein in der Kontrolle und den Proben gleich verteilt sein.

Die phosphorylierte Form der p38-MAP-Kinase ist zeitabhängig untersucht worden und die Abbildung 37 zeigt, dass bereits nach 1 h fast eine signifikante Verdopplung unter Einfluss von 10 mM ETX und 5 mM 4-AP zu sehen ist. Nach 4 h ist bei nahezu allen Wirkstoffen fast doppelt so viel aktiviertes p38 zu finden wie in der dazugehörigen Kontrolle. Allerdings sind die Erhöhungen der Aktivierung bei den Konzentrationen 10 und 20 μ M Mibefradil nicht signifikant. Nach 6 h scheint sich das Niveau insgesamt wieder etwas abzusenken, wobei die Aktivierung unter 5 mM 4-AP und 10 mM ETX noch immer signifikant fast doppelt so hoch ist. Nach 12 h ist unter Einfluss von 20 μ M Mibefradil eine leichte Erhöhung der Proteinmenge gegenüber der Kontrolle, 10 μ M Mibefradil sowie den Vergleichswirkstoffen zu beobachten. Unter Einfluss von 30 μ M ist diese Erhöhung drastisch und signifikant. Die Menge an aktiviertem p38-MAPK ist viermal so hoch. Nach 24 h liegt unter Einfluss von 20 bzw. 30 μ M Mibefradil mehr als doppelt so viel phosphoryliertes p38-MAPK wie in der Kontrolle vor. Wie die Abbildung 37 zeigt, ist Phospho-p38 nach 24 h auch durch die Vergleichswirkstoffe beeinflusst worden. Dabei zeigt sich, dass die Unterschiede bei Behandlung mit ETX, 4-AP und 30 μ M Mibefradil gegenüber der Kontrolle signifikant sind. Der Einfluss von 10 μ M Verapamil zeigte keine Veränderung von p-p38 MAPK über die Zeit.

Die Gesamtproteinmenge von p38 war sowohl in der unbehandelten Kontrolle als auch in den behandelten Lysaten gleich. Das Protein wird sowohl durch Mibefradil als auch durch ETX und 4-AP zu bestimmten Zeiten aktiviert, während Verapamil keinen Einfluss hat.

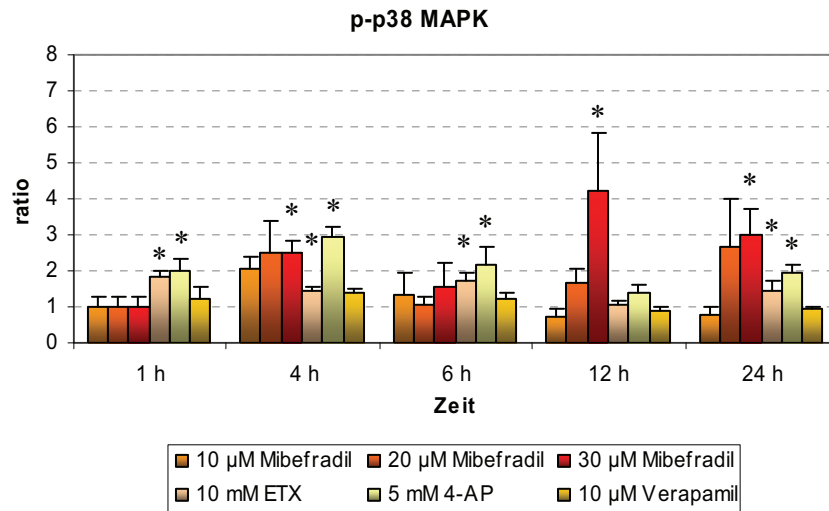


Abbildung 37: Auswertung der Bio-Plex-Messung von Phospho-p38. Es ist das Verhältnis (Ratio) von phosphoryliertem p38-Protein unter Stoffwechseleinfluss zu der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$, Mann-Whitney-U-Test, * $p<0,05$).

Bei der Betrachtung von p-AKT (Phospho-AKT), welches an Serin 473 phosphoryliert ist, sind kaum signifikante Unterschiede aufgetreten. Es sind während der Behandlung mit 4-AP, ETX sowie den Konzentrationen 10 und 20 μM Mibefradil zu den einzelnen Zeitpunkten Unterschiede in der Menge von p-AKT aufgetreten, die jedoch keine Signifikanz aufweisen. Nur nach 4 h Behandlung mit 10 μM Verapamil war die Menge an phospho-AKT signifikant erhöht. Unter Einfluss von 30 μM Mibefradil liegt Phospho-AKT nach 4, 12 und 24 h signifikant vermindert vor. Einzig nach 6 h zeigt der gemessene Wert des aktivierten AKT-Proteins eine nicht signifikante Erhöhung gegenüber der dazugehörigen Kontrolle (Abbildung 38).

Auch hier war in der Kontrolle und den wirkstoffbehandelten Proben die Gesamtproteinmenge von AKT gleich. Die Phosphorylierung des Proteins AKT wird nur durch 30 μM Mibefradil und 10 μM Verapamil signifikant beeinflusst, während die weiteren Ionenkanalantagonisten sowie die niedrigeren Konzentrationen keine Veränderung zeigen.

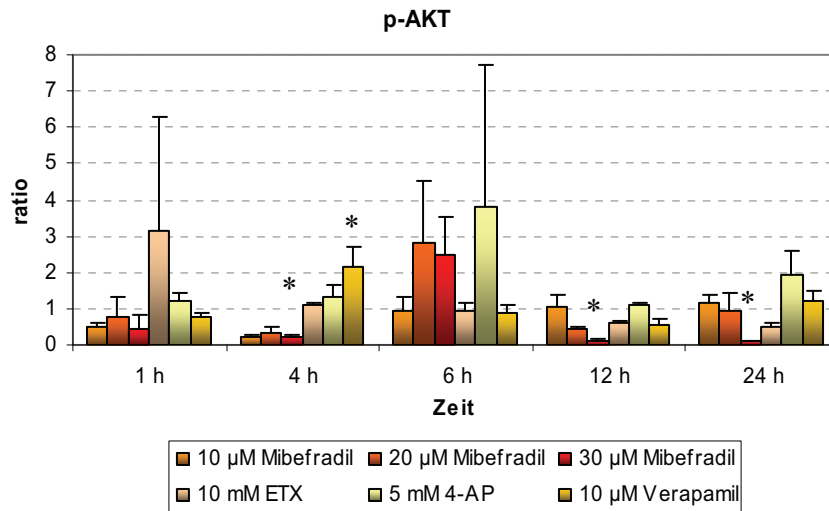


Abbildung 38: Auswertung der Bio-Plex-Messung von Phospho-AKT. Es ist das Verhältnis (Ratio) von Phospho-AKT unter Wirkstoffeinfluss im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$, Mann-Whitney-U-Test, * $p<0,05$).

Weiterhin wurde das aktivierte ERK1/2 untersucht, welches an Threonin 202/Tyrosin 206 und an Threonin 185/Tyrosin 187 phosphoryliert ist. Die Inkubation mit 10 und 20 μM Mibefradil in drei gleichen Ansätzen zeigt keine signifikanten Veränderungen. Lediglich beim Einsatz der Höchstkonzentration von 30 μM Mibefradil sind signifikante Änderungen in der Menge von Phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2) zu beobachten. Die phosphorylierte Form des ERK1/2 nach liegt nach 1 h in etwa zweifacher Menge in den Linsenepithelzellen vor. Nach 4 h ist die Aktivierung dieser Kinase wiederum signifikant herunterreguliert (Abbildung 39). Zu den weiteren gemessenen Zeitpunkten kommt es erneut zu einer Erhöhung der phosphorylierten Form. Nach einer 6- und 12stündigen Behandlung ist etwa viermal mehr p-ERK1/2 vorhanden als in der zeitgleichen Kontrolle. Selbst nach 24 h ist noch eine signifikante Erhöhung der Menge an phosphoryliertem ERK1/2 um den Faktor 1,5 zu beobachten. Das Gesamtprotein lag in den Mibefradil-behandelten sowie den Vergleichsantagonisten-behandelten Proben in gleicher Menge vor.

Der T-Typ Kalziumkanalblocker ETX und der L-Typ Kalziumkanalblocker Verapamil zeigten über die gesamte Zeit keine signifikanten Veränderungen in der Aktivierung von ERK1/2. Auch die eingesetzte Konzentration von 5 mM 4-AP zeigt nach 1 h noch keine Reaktion bei den Linsenepithelzellen. Nach 4, 6, 12 und 24 h ist die Menge von p-ERK1/2 jedoch signifikant gesteigert (Abbildung 39). Während Verapamil und ETX keinen Einfluss

auf Phospho-ERK1/2 zeigen, kommt es zu einer signifikanten Erhöhung durch Mibefradil und 4-AP.

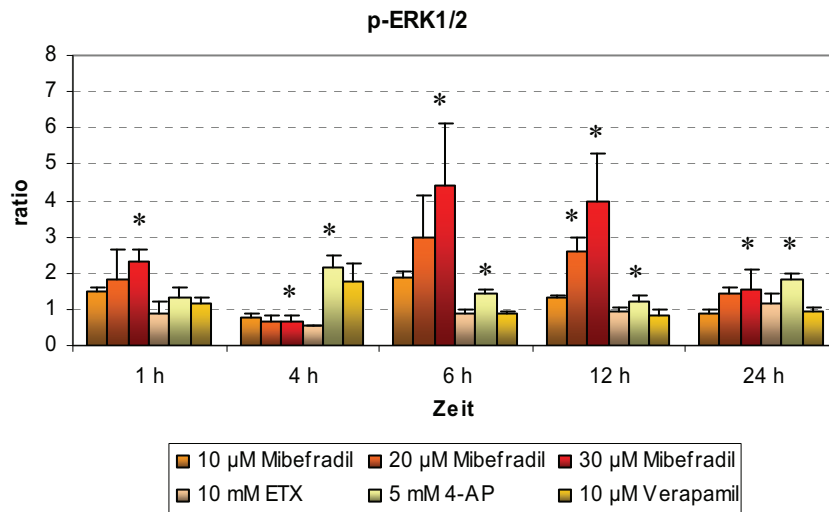


Abbildung 39: Auswertung der Bio-Plex-Messung von Phospho-ERK1/2. Es ist das Verhältnis (Ratio) von Phospho-ERK1/2 unter Wirkstoffeinfluss zu der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3, Mann-Whitney-U-Test, * p<0,05).

4.5. Vergleich der Sensitivität von konfluenten und subkonfluenten HLE-B3 Zellen auf Mibefradil

Um den Einfluss von Mibefradil auf verschiedene Zelldichten bzw. auf stärker proliferierende Zellen zu untersuchen, wurden HLE-B3 Zellen für mehrere Tage in Kultur gehalten, bis der Zellrasen konfluent war. Damit sollte ein bestehendes Gewebe simuliert werden. Für eine subkonfluente Linsenepithelzellkultur, also einen lockeren Zellrasen mit Zwischenräumen und stärker proliferierenden Zellen, wurden die Zellen in geringerer Zelldichte für 24 h ausgesät, um die Verhältnisse bei der Nachstarentwicklung darzustellen.

In Abbildung 40 ist die immortalisierte Zelllinie HLE-B3 in einem konfluenten sowie subkonfluenten Bewachungszustand zu sehen.

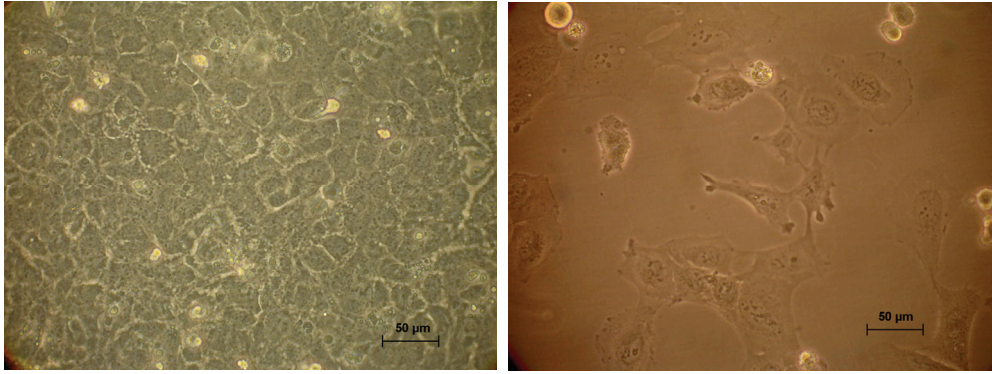


Abbildung 40: Die Lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine konfluenten Zellrasen (linkes Bild) und eine subkonfluente Zellkultur (rechtes Bild), bei der die Epithelzellen einzelne Inseln bilden und weiter auswachsen können. Bei dem konfluenten Zellrasen liegen die Epithelzellen eng beieinander und es stehen keine freien Flächen mehr zum Bewuchs zur Verfügung.

Die folgenden Lichtmikroskopieaufnahmen dokumentieren die Veränderungen der Linsenepithelzellen in der Zellkultur in konfluentem Zustand infolge eines 24-stündigen Mibefradil-Einflusses (Abbildung 41). Bis zu einer Konzentration von 20 μM Mibefradil ist kein Einfluss auf die Zellmorphologie bzw. auf das Epithel selbst zu beobachten. Die höchste Konzentration von 30 μM zeigt hierbei jedoch Effekte. Der Zellverbund ist schon etwas gelockert und einige Zellen haben sich abgelöst. Die meisten Zellen sind jedoch noch adhären.

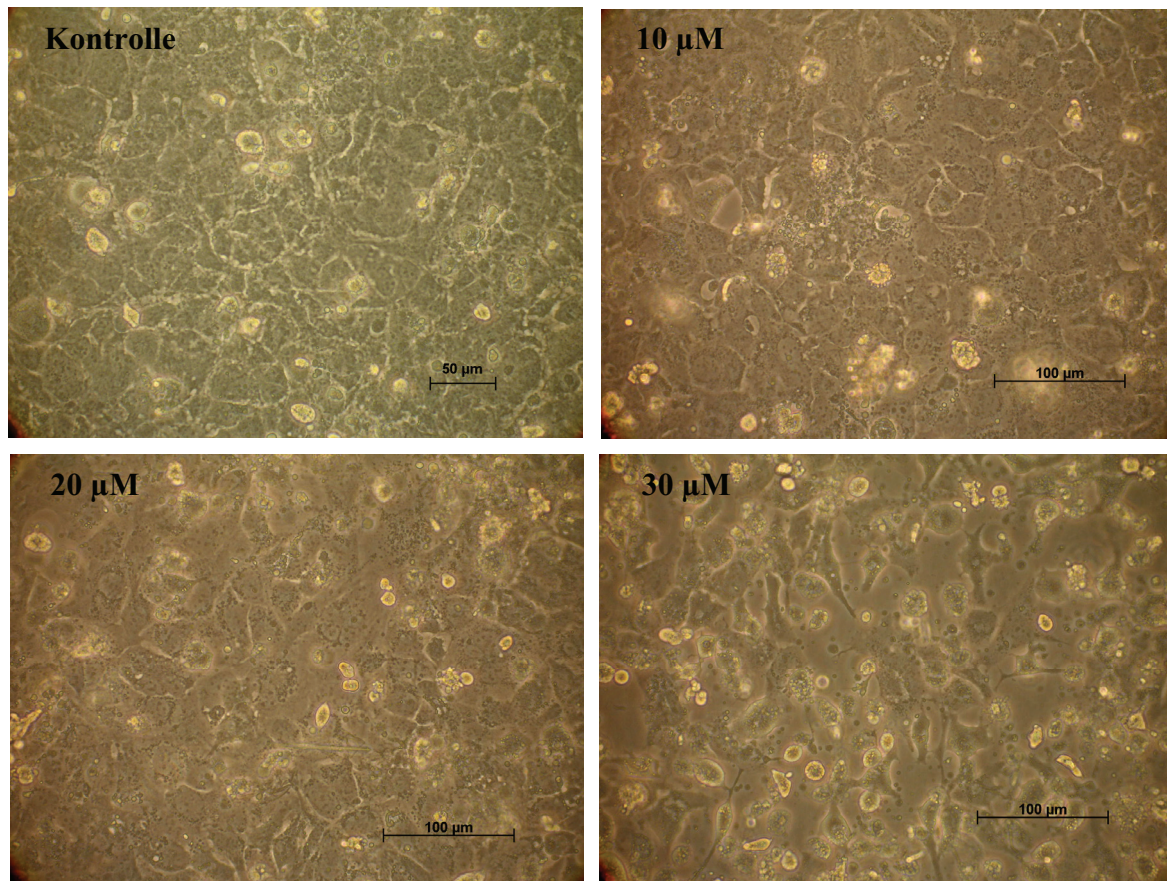


Abbildung 41: Lichtmikroskopische Aufnahmen von konfluenten HLE-B3 Zellen nach 24 h unter Mibefradil-Einfluss. Bei der Kontrolle sowie bei den Konzentrationen 10 und 20 µM Mibefradil sind keine Effekte zu sehen. Erst unter 30 µM Mibefradil beginnt eine Auflockerung des Zellverbandes.

Bei der subkonfluenten Zellkultur sind mit dem Lichtmikroskop deutlichere Effekte nach 24 h Mibefradil-Einfluss zu beobachten. Bei den unbehandelten Zellen kommt es zu weiterem Wachstum. Sie bilden einen fast geschlossenen Zellverband (Abbildung 42). Bereits unter Einfluss von 10 µM Mibefradil sind einige Zellen leicht in ihrer Morphologie verändert. Unter Einfluss von 20 µM sind kaum noch adhärenente Zellen vorhanden. Die meisten Zellen sind bereits von der Oberfläche abgelöst. Bei der höchsten Konzentration von 30 µM Mibefradil sind alle Zellen abgelöst (Abbildung 42).

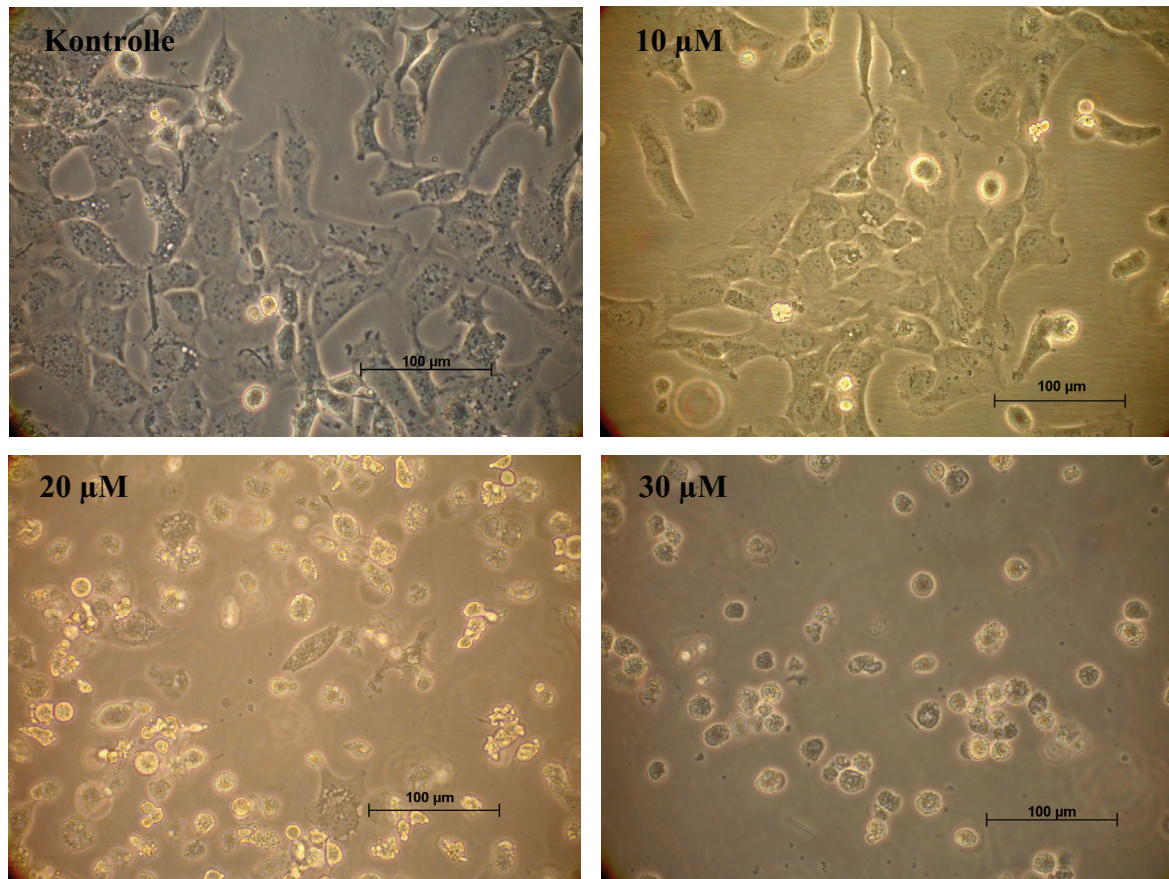


Abbildung 42: Lichtmikroskopische Aufnahmen von subkonfluenten HLE-B3 Zellen nach 24 h unter Mibefradil-Einfluss. In der Kontrolle haben die Zellen fast einen festen Zellverband gebildet. In Gegenwart von der Konzentration 10 µM Mibefradil sind bereits Effekte nach 24 h zu sehen. Bei den höheren Konzentrationen 20 und 30 µM sind kaum noch adhärente Zellen vorhanden.

4.5.1. Analyse der Zellzyklusphasen

Um zu untersuchen, ob Mibefradil in den Konzentrationen von 10 - 30 µM verschiedene Effekte in den konfluent und subkonfluent gewachsenen Linsenepithelzellen induziert, wurden die Zellzyklusphasen mittels DNA-Analyse im Durchflusszytometer bestimmt. Die Phasen S (Synthesephase) und G2/M (Zellteilungsphase) wurden in diesen Versuchen als proliferative Phase (G2/M + S) zusammengefasst.

Wie in Abbildung 43 zu sehen, ruft Mibefradil bei den konfluent gewachsenen HLE-B3 Zellen in den Phasen G0/G1 und G2/M + S keine signifikante Beeinträchtigung hervor. Nur der 24-stündige Einfluss von 20 bzw. 30 µM Mibefradil bewirkt eine signifikant erhöhte Apoptose bei den Zellen.

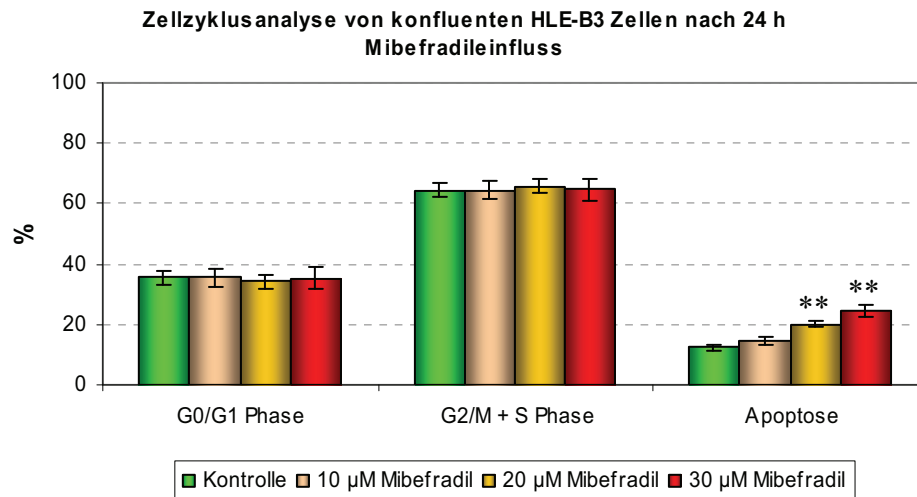


Abbildung 43: Zellzyklusanalyse von HLE-B3 Zellen im konfluenten Bewachungszustand in unbehandelten Proben sowie unter 24-stündigem Einfluss von 10 - 30 µM Mibefradil. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=5, t-Test, * $p < 0,05$).

Subkonfluent gewachsene HLE-B3 Zellen zeigen eine stärkere Beeinflussung durch den T-Typ-Kalziumkanalblocker Mibefradil (Abbildung 44). Das Zellwachstum ist gehemmt. Der prozentuale Zellanteil in der proliferativen Phase G2/M + S Phase ist bereits bei einer Konzentration von 10 µM Mibefradil signifikant reduziert. Dadurch steigt in der G0/G1 Phase der prozentuale Anteil bei den Mibefradil-behandelten HLE-B3 Zellen signifikant. Eine ähnliche Steigerung zeigt sich bei der Betrachtung der Apoptose. Gegenüber den unbehandelten Zellen steigt der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen schon unter Einfluss geringerer Mibefradil-Konzentrationen.

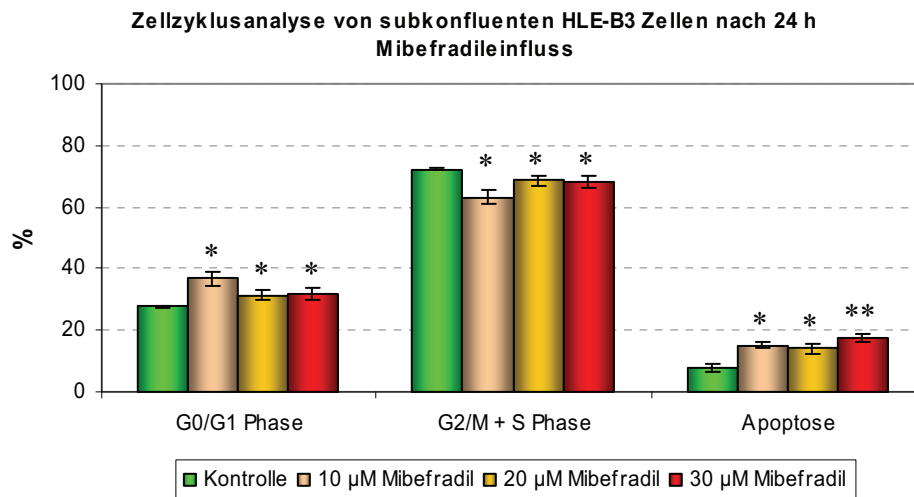


Abbildung 44: Zellzyklusanalyse von HLE-B3 Zellen im subkonfluenten Bewachungszustand unter 24-stündigem Einfluss von 10 - 30 µM Mibefradil gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=5, t-Test, * p<0,05, ** p<0,01).

4.5.2. Vergleich der zeitabhängigen Adhäsionsmessungen

Die Adhäsionsversuche mit konfluent und subkonfluent gewachsenen Linsenepithelzellkulturen zeigen unter Einfluss von Mibefradil ebenfalls deutliche Unterschiede bei den Untersuchungen mit den Sensorchips.

Die konfluenten HLE-B3 Zellen werden über den gesamten Zeitraum hinsichtlich ihrer gemessenen relativen Zellimpedanz nicht wesentlich durch die Behandlung mit 10 und 20 µM Mibefradil in ihrer Adhäsion beeinflusst (Abbildung 45). Einzig die höchste Konzentration von 30 µM des Ionenkanalblockers reduziert die relative Zellimpedanz signifikant prozentual um knapp 25 % nach 18 h. Am Ende der zeitlichen Erfassung ist die relative Zellimpedanz und damit die Zelladhäsion um ca. 35 % verringert.

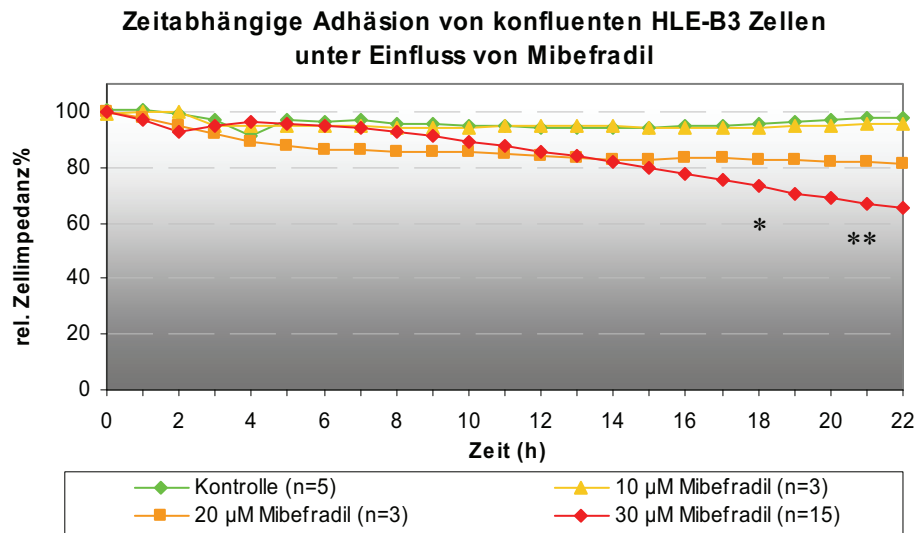


Abbildung 45: Verlauf der zeitabhängigen Adhäsion von konfluent gewachsenen HLE-B3 Zellen. Während die Konzentrationen 10 und 20 µM Mibefradil keine signifikante Beeinträchtigung der Zelladhäsion über die Zeit zeigen, ist bei der höchsten Konzentration eine signifikante Abnahme der relativen Zellimpedanz nach 18 h zu beobachten. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (t-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Der Vergleich von Mibefradil-behandelten Zellen mit unbehandelten Zellen in subkonfluenter Kultur zeigt, dass schon geringe Konzentrationen des Wirkstoffs die relative Zellimpedanz und damit auch die Anzahl der adhären Zellen über die Zeit deutlich vermindern. In Gegenwart von 20 µM Mibefradil kommt es bereits nach 2 h zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsion, welche auch unter Einfluss von 30 µM Mibefradil auftritt (Abbildung 46). Während bei den unbehandelten Zellen die relative Zellimpedanz und damit die Adhäsion bzw. Konfluenz der Zellen über die Zeit weiter zunimmt, ist unter Mibefradil-Einfluss eine starke Abnahme bis auf knapp 10 % des Ausgangswertes zu beobachten. Gegenüber der konfluenten Kultur reagieren die subkonfluenten Zellen deutlich sensibler als die konfluenten Zellen.

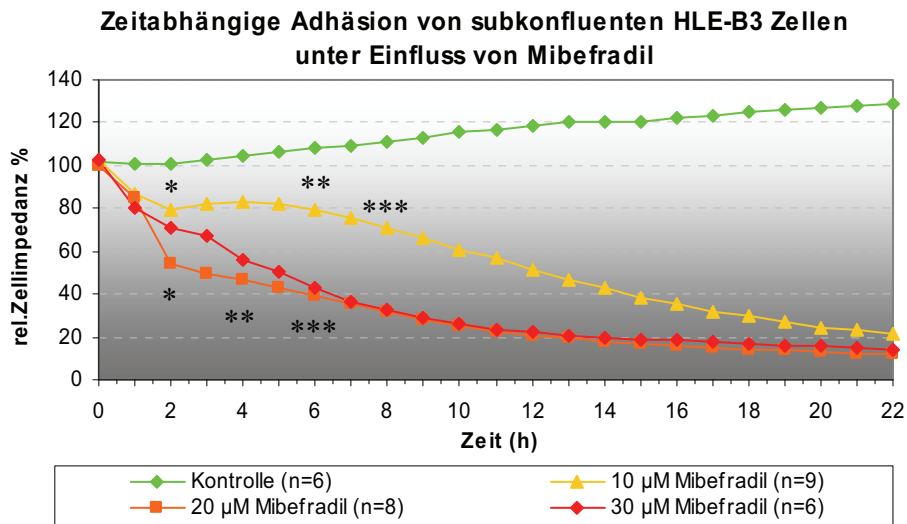


Abbildung 46: Zeitabhängiger Einfluss von Mibefradil auf die Adhäsion von subkonfluenten HLE-B3 Zellen über 22 h. Die relative Zellimpedanz bei Inkubation mit 10, 20 und 30 µM Mibefradil nimmt über die Zeit deutlich ab. Diese Reduktion der Adhäsion bei 10, 20 und 30 µM ist bereits nach 2 h signifikant. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Versuche (t-Test, * p<0,05, ** p<0,01, * p<0,001).**

4.5.3. Messung der Stoffwechselaktivität

Mit dem MTS-Test werden die Adhäsions-Ergebnisse auch in metabolischer Hinsicht bestätigt. Auch hier zeigt sich, dass konfluent ausgewachsene Linseneithelzellen metabolisch nicht in dem Maße hinsichtlich ihrer metabolischen Aktivität von Mibefradil beeinflusst werden wie subkonfluente Zellen. Bei stärker proliferierenden subkonfluenten Zellen wird die Stoffwechselaktivität schon bei niedrigen Konzentrationen von 10 µM signifikant nach 24 h vermindert. Der Einfluss der höheren Konzentrationen zeigt einen größeren Abfall in der metabolischen Aktivität bei den HLE-B3 Zellen (Abbildung 47).

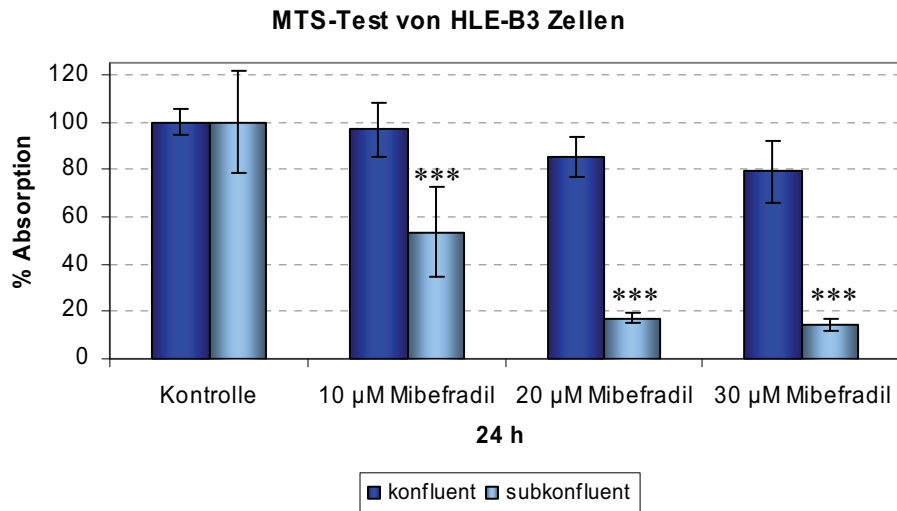


Abbildung 47: MTS-Test zur Beurteilung der Stoffwechselaktivität von HLE-B3 Zellen unter 24-stündigem Einfluss des Ionenkanalblockers Mibefradil in den Konzentrationen von 10 – 30 µM. Während bei der konfluenten Zellkultur keine wesentliche Beeinträchtigung zu sehen ist, wird bei der subkonfluenten Zellkultur der Metabolismus der Zellen bereits ab 10 µM Mibefradil signifikant vermindert. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung (n=5, t-Test, * p<0,001).**

4.6. Versuche mit mikroverkapseltem Mibefradil

Für erste *in vitro* Versuche und für den geplanten praktischen Einsatz wurde Mibefradil von der Firma Micromod Partikeltechnologie GmbH immobilisiert und mikroverkapselt. Diese Immobilisate wurden eingehend analysiert und in Zellkulturversuchen getestet.

4.6.1. REM- und TEM-Analysen des immobilisierten, verkapselten Mibefradils

Die genauere Betrachtung des Aussehens der sphärischen Mikropartikel erfolgte mittels REM- und TEM-Aufnahmen. In Abbildung 48 ist eine TEM-Aufnahme eines solchen Partikels dargestellt. Der innere, helle Bereich beinhaltet die Wirkstoffkomponente. Der breite begrenzende Bereich stellt das PLGA dar, welches nach außen hin mit Zerklüftungen („Fransen“) abschließt. Diese Zerklüftungen oder Risse entstehen bei der Herstellung der Immobilisate durch die Gefriertrocknung.

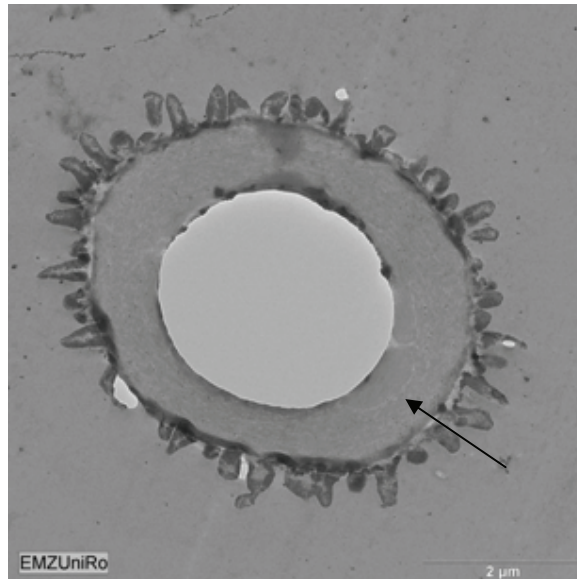


Abbildung 48: TEM-Aufnahme von verkapseltem Mibefradil. Die Wirkstofflösung wird in die Partikel eingeschlossen. Der helle innere Bereich beinhaltet den Wirkstoff. Im äußeren Rand besteht aus PLGA (siehe Pfeil).

Die Partikel haben bei äußerer Betrachtung ein granulatähnliches Aussehen, besitzen aber bei näherer Betrachtung eine inhomogene Form (Abbildung 49, Bild A). Sie haben eine weiße Farbe und zeigen bei entsprechender Vergrößerung ein felsenartiges Aussehen (Abbildung 49, Bild B). Diese „Felsen“ bestehen aus kleinen Kapseln (Abbildung 49, Bild C), aus welchen der Wirkstoff zeitabhängig freigesetzt werden kann.

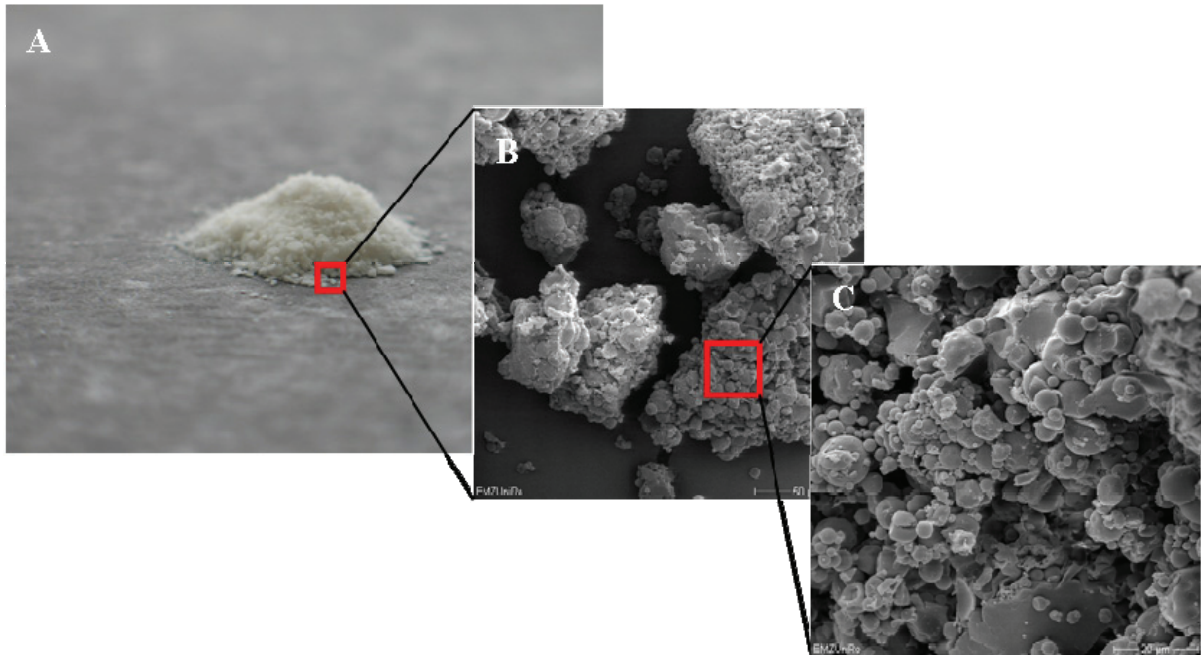


Abbildung 49: A: Sphärisches verkapseltes Mibefradil (Digitalfotografie, Canon Powershot G6, 4x Zoom); B: REM-Aufnahme von Mikropartikeln (500fache Vergrößerung.); C: vergrößerte REM-Aufnahme der Mikropartikel (1000fache Vergrößerung).

4.6.2. Zellkulturversuche mit den Immobilisaten

In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, ob die Freisetzung des immobilisierten verkapselten Wirkstoffes in das Komplettmedium eine ähnliche bzw. die gleiche Wirkung auf die HLE-B3 Zellen hat, wie eine wässrige Lösung von Mibefradil, wie sie in den vorherigen *in vitro* Versuchen eingesetzt wurde.

4.6.2.1. Stoffwechselaktivität unter Einfluss des freigesetzten Mibefradils

Der MTS-Test wurde für die ersten *in vitro* Versuche mit dem immobilisierten Wirkstoff durchgeführt. Wie in Abbildung 50 dargestellt, nimmt die metabolische Aktivität der Linsenepithelzellen nach 24 h bereits bei einer Konzentration von 10 μM freigesetztem Mibefradil signifikant auf etwa 75 % des Kontrollwertes ab. Unter Einfluss von höheren Konzentrationen freigesetzten Wirkstoffs (20 μM und 30 μM) sinkt die metabolische Aktivität der Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle noch weiter. Hier beträgt der Abfall jeweils über 30 %. Die beobachteten Effekte sind ähnlich den Ergebnissen des MTS-Tests bei subkonfluent gewachsenen Zellen mit der gelösten Substanz.

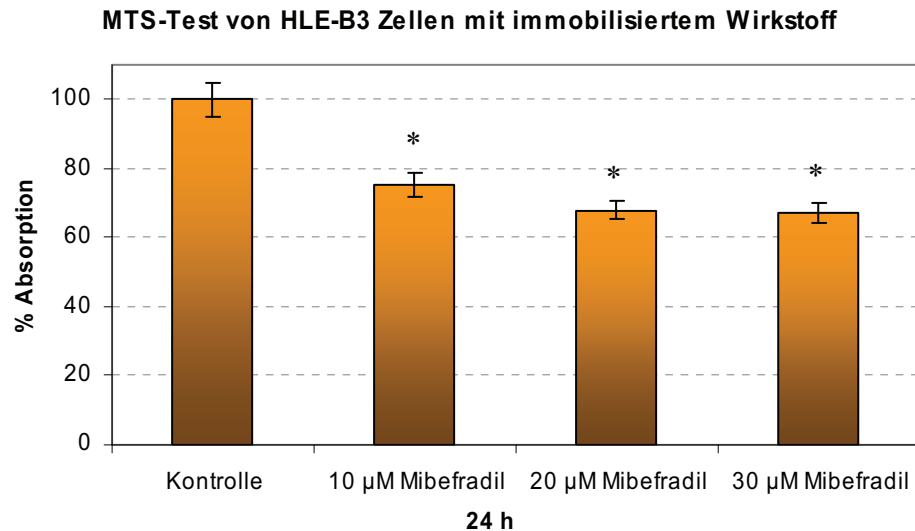


Abbildung 50: MTS-Test nach 24-stündiger Inkubation von HLE-B3 Zellen mit immobilisiertem verkapseltem Mibefradil. Die metabolische Aktivität der Zellen nimmt bei allen Konzentrationen signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle ab (Mittelwerte \pm SEM, $n=5$, t-Test, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, * $p<0,001$).**

4.6.2.2. Live/Dead Vitalitätstest

Der Live/Dead Vitalitätstest ist eine relativ ungenaue Methode und zeigt die lebenden Zellen (grün) sowie die toten Zellen (rot). Durch Perforationen der Zellmembran kann der Farbstoff in die Zelle eindringen. Dieser Prozess kann reversibel sein.

Wie in den Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 51 zu sehen ist, sind in der Kontrolle alle Zellen vital. Bei einer freigesetzten Konzentration von 10 μM Mibefradil sind die meisten Zellen noch vital, jedoch sind auch schon tote Zellen zu erkennen. Bei Konzentrationen von 20 bzw. 30 μM freigesetztem Mibefradil sind die meisten Zellen tot und kaum noch vitale Zellen zu beobachten.

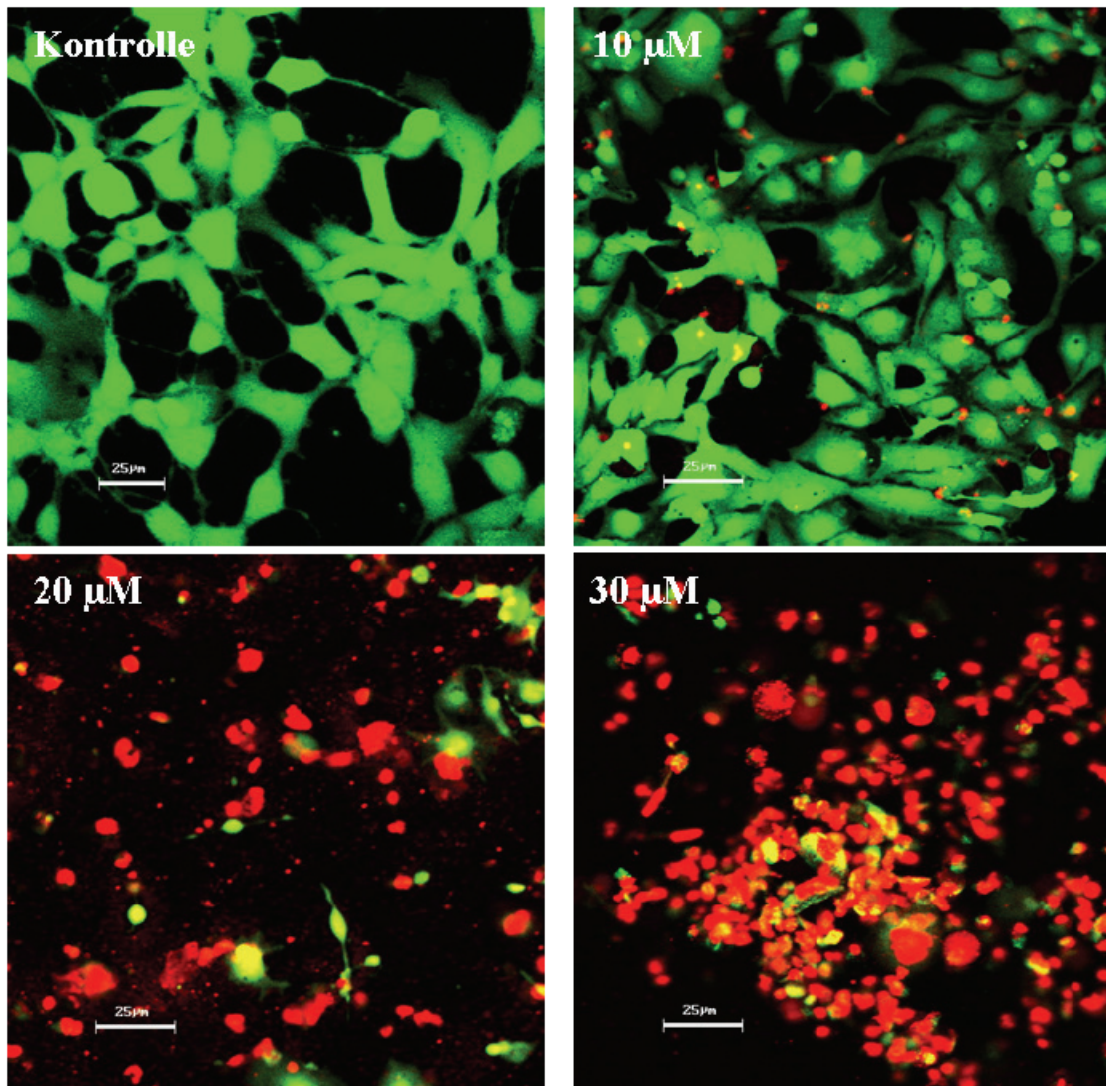


Abbildung 51: Fluoreszenzaufnahmen nach dem Live/Dead Vitalitätstest. Während in der unbehandelten Kontrolle bzw. bei der Probe mit 10 µM Mibefradil alle bzw. fast alle Zellen vital sind (grün), sind bei den Konzentrationen von 20 und 30 µM Wirkstoff fast alle Zellen tot (rot).

4.6.2.3. Analyse der Zellzyklusphasen

In weiteren Versuchen wurden die Zellzyklusphasen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Grafik zeigt, dass sich gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen bei 20 µM und 30 µM Mibefradil mehr Zellen in der G0/G1-Phase befinden. In der proliferativen Phase (hier wieder zusammengefasst aus S-Phase und G2/M-Phase) nimmt der Anteil der mit höheren Mibefradil-Konzentrationen behandelten LEZ signifikant ab. Der Anteil der apoptotischen Zellen steigt signifikant um mehr als 10 % gegenüber der Kontrolle an (Abbildung 52).

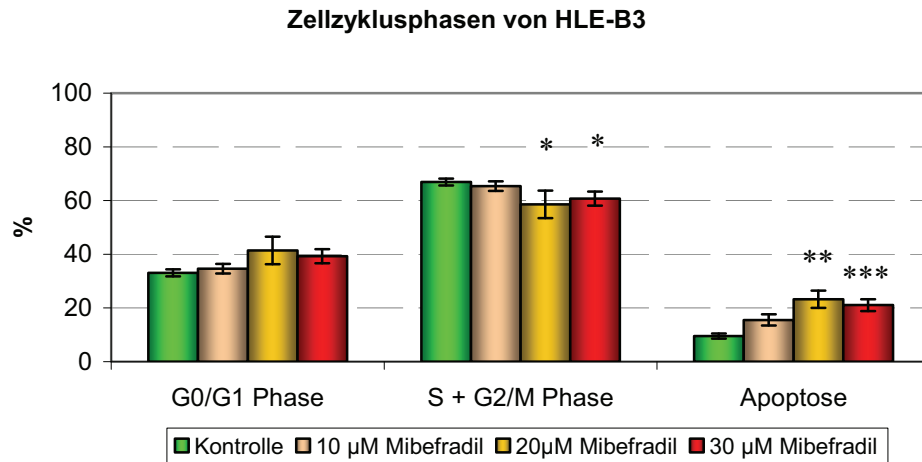


Abbildung 52: Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation anhand der Zellzyklusphasen von HLE-B3 Zellen unter Einfluss von 10, 20 und 30 µM freigesetztem Mibefradil. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Versuchen ± SEM (n=5, t-Test, * p<0,05, ** p<0,01, * p<0,001).**

Die Analyse der Zellzyklusphasen von HLE-B3 Zellen zeigt unter Einfluss von Mibefradil, freigesetzt aus PLGA-Mikropartikel, die gleichen Ergebnisse wie unter dem Einfluss von dissoziiertem Mibefradil.

5. Diskussion

Obwohl Apple *et al.* (2001) postulieren, die moderne Katarakt-Chirurgie sei dem Ziel der kompletten Nachstar-„Eradikation“ sehr nahe, ist ein entscheidender Durchbruch in der Prävention des Nachstars bisher nicht erreicht worden [117, 118]. Es wurden viele Ansätze, wie beispielsweise Verbesserungen in der Geometrie von IOLs [7, 119], verfolgt, bei denen *in vitro* Versuche jedoch keine Lösung der generellen Nachstarproblematik zeigten [58, 65]. Die Häufigkeit und Ausprägung des Nachstars wurde zwar gesenkt, jedoch nicht verhindert [1].

Das Eingreifen in die Biologie von Linsenepithelzellen ist daher scheinbar die einzige Möglichkeit zur Lösungsfindung. Auch hier wurden bereits viele Ansätze wie die Anwendung von Toxinen, Adhäsionshemmern und Entzündungshemmern untersucht [1, 11]. Das wesentliche Handicap bei den bisher verfolgten zellbiologischen Strategien liegt in der Gewebsspezifität der eingesetzten Substanzen. Zudem werden die Wirkstoffe schnell über den Austausch des Kammerwassers abtransportiert [81]. Aus diesem Grund eignen sich Freisetzungssysteme, welche den Wirkstoff kontinuierlich abgeben.

Das Ziel der hier vorliegenden Untersuchungen bestand darin, die Wirkungsweise des Ionenkanalblockers Mibefradil in *in vitro*-Modellen zu prüfen. Es ist hinreichend bekannt, dass Mibefradil die Proliferation von glatten Muskelzellen [120; 121], Endothelzellen [124], Ösophaguskrebszellen [126] und humanen Linsenepithelzellen inhibiert [25]. In primären hLEZ konnten erste Hinweise auf die Wirkungsweise von Mibefradil beobachtet werden [23]. Es kommt zu einer Reduzierung der Integrinexpression, einer Fragmentierung des Aktinzytoskeletts sowie einer Membrandepolarisation. Welche genauen Wirkmechanismen bei Mibefradil greifen, konnte bislang nicht geklärt werden. Diese Mechanismen sind jedoch von enormer Bedeutung für weitere Applikationen von Mibefradil bei Mensch und Tier.

Die in dieser Arbeit untersuchten Konzentrationen des T-Kanalblockers Mibefradil bewegen sich zum einen innerhalb der Spanne, in welcher der Wirkstoff *in vitro* physiologische Effekte wie die Inhibierung der Zellproliferation gezeigt hat [160, 129]. Zum anderen orientieren sich die eingesetzten Konzentrationen von Mibefradil an eigenen Forschungsergebnissen, in denen nach verschiedenen Untersuchungen die höchste anwendbare Konzentration für hLEZ mit 20 μ M und für die HLE-B3 mit 30 μ M Mibefradil festgelegt wurden [23].

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen lieferten die ersten Hinweise auf den Einfluss von Mibefradil. Während unbehandelte Zellen ausgebreitet sind, kugeln sich mit

Mibefradil behandelten Zellen ab und lösen sich von der Oberfläche. Die Zellen verlieren den Halt an der extrazellulären Matrix und der Oberfläche des Deckglases.

Die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation, dem Zellwachstum und der Proliferation. In der Integrin-vermittelten Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix sind die fokalen Kontakte bzw. die Adhäsionskomplexe beteiligt [61, 65, 91]. Die fokale Adhäsion beinhaltet mehr als 100 Komponenten [61]. Eine dieser Komponenten stellt das Protein Vinkulin dar [128, 130, 131, 133, 149]. Versuche mit Mibefradil, die zu einer Inhibierung von Vinkulin führten, zeigten eine dramatische Veränderung in der Beweglichkeit der Zellen, in der Adhäsion und der Größe der Fokalkontakte. Damit stand fest, dass Vinkulin eine Schlüsselrolle in der Regulation der Zelladhäsion spielt [128, 129; 135, 153, 149]. Vinkulin ist ein wesentlicher Bindungspartner in der Vermittlung des Aktinzytoskeletts zu den Integrinen. Somit ist dieses Protein essentiell an zellulären Vorgängen wie der Ausbildung der Zellform, welche durch das Aktinzytoskelett geformt und stabilisiert wird, der Adhäsion sowie der Motilität beteiligt [64, 65]. Grosheva *et al* (2006) konnten sogar nachweisen, dass Vinkulin bei einem zerstörten Aktinzytoskelett nicht mehr vorhanden ist [134]. Da das Aktinzytoskelett von hLEZ unter Einfluss von 20 μM Mibefradil stark fragmentiert ist [114], belegen die Resultate aus den Lebendzellversuchen mit GFP-Vinkulin transfizierten Linsenepithelzellen die Aussagen von Grosheva *et al*. Die Expression von Vinkulin wird schon in den ersten drei Stunden nach Zugabe von niedrigeren Konzentrationen Mibefradil (10 μM) vermindert. Unter Einfluss von 20 μM Mibefradil ist die Vinkulinexpression in HLE-B3 Zellen schon deutlich reduziert. Für eine weitere Charakterisierung wurden die Vinkulinkontakte der Zellen gezählt und vermessen. Die quantitative Charakterisierung der Vinkuline ist eine etablierte Methode [64, 140]. Die Quantifizierung der Vinkuline zeigt, dass die Anzahl und Länge der Vinkuline unter 10 μM Mibefradil schon nach kurzer Inkubationszeit vermindert wird.

Diener *et al*. (2005) haben gezeigt, wie Oberflächen von Biomaterialien die Länge, Anzahl und vor allem die Mobilität von Vinkulinen von Osteoblasten beeinflussen können. Durch diese Erkenntnis wurde ebenso die Mobilität der fokalen Kontakte in der initialen Zeit bei der Zelllinie HLE-B3 sowie bei primären hLEZ unter Mibefradil-Einfluss untersucht. Während sich die Vinkuline in den unbehandelten Kontrollzellen mit der Zellfläche ausbreiten und in die periphere Richtung bewegen, kommt es unter Einfluss von Mibefradil zu einer entgegengesetzten Bewegung in die zentripetale Richtung. Zudem war unter Mibefradil-Einfluss eine signifikante Reduktion in Länge und Anzahl der Vinkuline in der

Beobachtungsdauer von 3 h messbar. Gleichzeitig kommt es ebenso zu einer starken Abnahme der Zellflächen. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass die primären hLEZ unter Mibefradil-Einfluss ähnlich wie HLE-B3 Zellen reagieren. Der Trend wird bei den primären Linsenepithelzellen wie auch bei der Zelllinie HLE-B3 durch die höhere Konzentration von 20 μM weiter verstärkt.

Die Beeinflussung in Mobilität, Anzahl und Länge der Vinkuline durch den Antagonisten Mibefradil ist nicht unmittelbar mit der Wirkung der Oberflächen von Biomaterialien vergleichbar. Die Biomaterialien können die Adhäsionskomplexe durch ihre Oberflächenbeschaffenheit (z.B. Oberflächentopographie und unterschiedliche Beschichtungen) beeinflussen, aber nicht wie Mibefradil inhibieren. Die Beeinträchtigung durch den Wirkstoff Mibefradil ist so stark, dass sich die Zellen abkugeln. Dieser Verlust der Adhäsion an die extrazelluläre Matrix durch die Reduktion der Vinkulinexpression ist ein Grund für apoptotische Prozesse in Epithelzellen. Anoikis, bekannt als die Heimatlosigkeit von adhären Zellen, ist die Ursache von Apoptose, welche durch das Ablösen von epithelialen Zellen von der extrazellulären Matrix entsteht [114, 136, 137, 138].

Generell und entgegen aller Diskussionen hinsichtlich der Verwendung von immortalisierten Zelllinien verdeutlichen die vergleichenden Versuche mit GFP-Vinkulin, dass die primären Linsenepithelzellen, isoliert aus humaner Kapsulorrhaxis, als auch die mit dem Virusvektor SV40T immortalisierten humanen HLE-B3 Linsenepithelzellen eine vergleichbare Reaktivität auf Mibefradil zeigen. Aus dieser Sicht haben beide hier verwendeten Zelltypen ihre Berechtigung hinsichtlich der Untersuchung der Substanz Mibefradil auf die Adhäsionshemmende Wirkung: Primäre humane Linsenepithelzellen, welche nur in geringen Mengen zur Verfügung stehen, wären nur für ausgewählte Methoden geeignet. Dagegen eignen sich die HLE-B3 Zellen für Analysen, die quantitativ sowohl mehr Zellen (z.B. FACS) als auch mehr Protein erfordern (z.B. Western Blot). Humane Zelllinien haben den Vorteil der häufigen Passagierbarkeit und relativen Homogenität des Ursprungs. Weiterhin konnten Wang Su *et al.* (2003) durch Proteomanalysen der immortalisierten Zelllinie HLE-B3 zeigen, dass die Eigenschaften dieser Zelllinie denen der primären Zellen gleich bzw. ähnlich sind [139]. Dagegen sind humane Primärzellen nicht mit dem Tumorpotential des immortalen Wachstums versehen. Sie weisen allerdings Heterogenität aufgrund des Ursprungs auf (Patienten-abhängige Einflussfaktoren wie z.B. Alter, Gender, Medikamenteneinnahme) und die Ergebnisse können somit im Sinne einer statistischen Analyse starken Schwankungen unterliegen.

Humane Linsenepithelzellen besitzen nachweislich Kalziumkanäle vom T- und L- Typ sowie auch Kaliumkanäle, welche durch Mibefradil in Patch Clamp-Versuchen geschlossen werden konnten (114, 150). Die Wirkungsweise von Mibefradil als T-Typ-Kalziumantagonist, der auch L-Typ-Kalziumkanäle zu schließen vermag, scheint daher deutlich [141, 142; 143]. Zudem ist damit auch die Wirkung von Mibefradil als Adhäsions- und Proliferationshemmer sowie Signaltransduktionsinducer möglich. Ca^{2+} -vermittelte Signalwege umfassen ein weites Feld intrazellulärer Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Stoffwechsel, Differenzierung oder auch Endozytose [145, 146, 147]. Darin regulierend eingebunden sind die Phospholipase $\text{C}\gamma 1$ ($\text{PLC}\gamma 1$), Calreticulin und auch das Aktinzytoskelett. Intrazelluläres Kalzium ist als Stabilisator für die Zellmorphologie bekannt und stellt einen wichtigen Faktor für das Aktinzytoskelett dar. Aktin und Aktin-bindende Proteine reagieren sehr empfindlich auf Kalzium. Bei Kalziummangel kann das Aktinzytoskelett nicht aufgebaut und stabilisiert werden [148].

Die Analyse des Aktin-regulierenden Proteins ROCK-2 sowie von Calreticulin und $\text{PLC}\gamma 1$ mittels BD Power Blot-Untersuchung brachte erste Erkenntnisse hinsichtlich der Wirkung von Mibefradil und dem vergleichend betrachteten Ionenkanalblocker ETX auf Linsenepithelzellen (HLE-B3). ROCK-2 wird auch Rho-Kinase genannt und ist eine Ser/Thr-Proteinkinase, welche mit der GTP-bindenden Form von RhoA interagiert. Das Protein ist ein wichtiger Regulator der Aktinfilamente und in dessen Reorganisation involviert. ROCK-2 ist mit dem Adhäsionskomplex verbunden und für die Formation des Aktinzytoskeletts erforderlich [127, 151, 152, 154]. Mibefradil (30 μM) verursachte nach 24-stündiger Inkubation eine 40 %ige Expressionshemmung von ROCK-2 sowie eine Reduktion der $\text{PLC}\gamma 1$ von über 60 %. Ferner konnte eine Überexpression des kalziumbindenden Proteins Calreticulin festgestellt werden. Der T-Typ Kalziumkanalblocker ETX hatte dagegen keinen Einfluss auf diese Signalproteine.

Die Erhöhung der Calreticulin-Expression von über 100 % nach 24 h unter Einfluss von 30 μM Mibefradil stellt ein interessantes Ergebnis dar. Groenendyk *et al.* (2005) beschrieben, dass Calreticulin als ER-Chaperon die Ca^{2+} -Konzentration innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums puffert. Eine Überexpression von Calreticulin wurde dann in verschiedenen Zellen generiert mit dem Ergebnis, dass in den Zellen Apoptose induziert bzw. apoptotische Signalwege detektiert wurden [155, 156, 157]. Über eine neue tragende Rolle von Calreticulin in der Apoptose wurde schon spekuliert. Bei einer Überexpression von Calreticulin kommt es zu einer Störung der für die Zelle lebenswichtigen Ca^{2+} -Homöostase [158]. Nach Kageyama *et al.* (2002) kann eine Überexpression von Calreticulin Apoptose induzieren und

die phosphorylierte Form von AKT unterdrücken [159]. Da Kalziumionen auch über andere Kanäle, wie z.B. L-Typ-Kalziumkanäle, in die Zelle geschleust werden können, kann ETX durch die selektive Blockierung der T-Typ-Kalziumkanäle nicht die Ca^{2+} -Homöostase beeinträchtigen. Die Methode BD Power Blot konnte nur vergleichend für ETX durchgeführt werden, da im Laufe der Untersuchungen der Service eingestellt wurde und die Methode somit nicht mehr zur Verfügung stand.

Ausgehend von den Ergebnissen des BD Power Blots und der Erkenntnis, dass Mibefradil in der Lage ist, T-Typ- und L-Typ-Kalziumkanäle sowie Kaliumkanäle zu blockieren, wurden in weiteren Versuchen die Effekte von Mibefradil auf humane Linseneithelzellen mit den Wirkungen des selektiven L-Typ-Kalziumkanalblockers Verapamil, des selektiven T-Typ-Kalziumkanalblockers ETX und des nonselektiven Kaliumkanalblockers 4-AP verglichen. Mibefradil blockiert zwar T-Typ Kanäle 10-20x stärker als L-Typ Kalziumkanäle, jedoch werden in höheren Konzentrationen auch L-Typ Kanäle komplett geschlossen [39, 161, 162]. Es könnte die Möglichkeit bestehen, dass der Wirkmechanismus von Mibefradil durch die Blockierung der L-Typ-Kalziumkanäle zu erklären ist. Zudem ist Mibefradil auch in der Lage, Kaliumkanäle zu blockieren, welche mitunter bei Linseneithelzellen zu finden sind [84, 150, 163]. Kaliumkanäle können eine wichtige Rolle in der Apoptose spielen [129]. Daher wurde der Gedanke verfolgt, den nonselektiven Kaliumkanalblocker 4-AP als Vergleichsantagonist einzusetzen. Vielleicht könnte aber auch hier der entscheidende Wirkmechanismus aufgedeckt werden. Zu dieser Fragestellung der Wirkungsweise von Mibefradil wurden die Linseneithelzellen daher jeweils mit den verschiedenen Ionenkanalblockern inkubiert und deren Effekte auf die Proteinexpression, zeitabhängige Adhäsion, Integrinexpression, metabolische Aktivität und die Zellzyklusphasen beobachtet.

In den ersten vergleichenden Untersuchungen wurde die Expression und Verteilung von ROCK-2 mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie analysiert. Hier konnte beobachtet werden, dass unter höheren Mibefradil-Konzentrationen (20 und 30 μM) die Expression und Verteilung des Proteins stark reduziert ist. Die Vergleichsantagonisten 4-AP und Verapamil sowie auch ETX zeigten hingegen keinen Einfluss auf die Verteilung und Expression von ROCK-2. Dieses Ergebnis untermauert das Resultat des BD Power Blots hinsichtlich der unterschiedlichen Effekte von Mibefradil und ETX.

Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Betrachtung des Aktinzytoskeletts. Nebe *et al.* (2004) zeigten, dass bei primären hLEZ das Aktinzytoskelett unter Mibefradil-Einfluss fragmentiert und zerstört wird. Während die Stressfasern bei den unbehandelten Kontrollzellen sowie den mit 4-AP, ETX und Verapamil beeinflussten HLE-B3 Zellen keine Änderung nach 24 h

zeigten, wurden sie unter Einfluss von 20 bzw. 30 μM Mibefradil deutlich fragmentiert und reduziert. Die Wirkmechanismen der Ionenkanalblocker wurden nicht nur auf intrazellulärer Ebene betrachtet, sondern es ist auch der Einfluss auf die Integrine als zentrales Bindeglied der Adhäsion der Zelle mit der ECM untersucht worden. Es wurde bereits in früheren Versuchen bewiesen, dass Leukozyten unter Mibefradil-Einfluss innerhalb von 90 min die Fähigkeit verlieren, an ICAM-1, einem wichtigen Adhäsionsmolekül, zu binden [90]. Da die GFP-Vinkulin-Versuche eine schnelle Reduktion der Zellflächen der hLEZ und HLE-B3 Zellen aufgrund des Adhäsionsverlustes zeigten, sollten die Integrine in diesen Prozess auch beeinflusst sein. In diesem Zusammenhang wurden die bei humanen Linsenepithelzellen häufig auftretenden Integrinuntereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 1$ untersucht [23]. Unter 24-stündigem Mibefradil-Einfluss (20 und 30 μM) konnte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie eine Verminderung der Fluoreszenzintensität dieser Integrinuntereinheiten beobachtet werden. Die durchflusszytometrische Quantifizierung konnte die mikroskopische Auswertung bestätigen. Die Expression der Integrinuntereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 1$ ist nach 24 h nur unter Mibefradil-Einfluss, jedoch nicht unter Einfluss der Vergleichsantagonisten signifikant reduziert. Riveline *et al.* (2001) konnten aufzeigen, dass die Integrität von Aktinfilamenten notwendig für die fokale Kontaktinduktion ist. Zerstörte Aktinfilamente führen somit zu einer Inhibierung der Integrinbildung [165].

In weiteren Analysen, wie den zeitabhängigen Adhäsionsmessungen, konnten in den HLE-B3 Zellen bei keinem weiteren getesteten Ionenkanalantagonisten Effekte wie unter Mibefradil-Einfluss beobachtet werden. Die Sensorchip-basierten zeitabhängigen Adhäsionsmessungen erwiesen sich als eine interessante Methode zur Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Ionenkanalblocker. Thedinga *et al.* (2007) konnten bereits die Adhäsionsmessung von Zellen mittels IDES auf den Bionas Sensorchips unter Einfluss von Pharmaka etablieren. Die gemessenen Zellimpedanzen, welche mit physikalischen Parametern erfasst werden, korrelieren mit der Adhäsion und Zellausbreitung [111, 166]. Die zeitabhängigen Adhäsionsversuche mit den Sensorchips zeigen eine deutliche Verminderung der relativen Zellimpedanz durch Mibefradil. Zwar kam es in Gegenwart von 4-AP ebenfalls zu einer schwachen Beeinflussung der relativen Zellimpedanz und somit in der Adhäsion, diese erwies sich jedoch nicht als signifikant.

Die Adhäsionsversuche korrelierten unter Einfluss der verschiedenen Antagonisten mit den Messungen zur metabolischen Aktivität (MTS-Test) der Linsenepithelzellen. Hier konnte ebenso der alleinige hemmende Einfluss von Mibefradil auf die metabolische Aktivität der Linsenepithelzellen festgestellt werden.

Bertolesi *et al.* (2002) beschrieben in ihrer Arbeit, dass Mibefradil zytotoxisch wirkt. Diese Aussage basiert größtenteils auf dem MTS-Test, welcher in der Arbeit verwandt wurde [167]. Der MTS-Test, vom Messprinzip dem bekannten MTT-Test vergleichbar, ist zwar allgemein als Zytotoxizitätstest bekannt, allerdings wird mit diesen Tests lediglich die mitochondriale Aktivität von Zellen gemessen. Die aktuellen Messungen mit Mibefradil und den weiteren Ionenkanalantagonisten zeigen, dass der Metabolismus bei den Linseneithelzellen unter Einfluss von 30 μM Mibefradil nach 24 h signifikant, jedoch nicht um mehr als 40 % sinkt. Obwohl zu diesem Versuchszeitpunkt kaum noch Zellen adhären waren, konnte eine bestimmte metabolische Aktivität gemessen werden. Selbst in Gegenwart von 30 μM Mibefradil war nach 48 h noch eine Aktivität messbar. Laut Meissner A. *et al.* (2008) soll Verapamil wie auch Mibefradil bereits in geringerer Konzentration (1 μM bzw. 10 μM) die Zellaktivität und die damit korrelierte Zellvitalität im MTT-Test signifikant hemmen. Diese Resultate sind laut eigenen Versuchen und Erfahrungen mit den getesteten Konzentrationen jedoch nicht nachvollziehbar.

Kalziumkanäle (T-Typ und L-Typ) spielen eine Rolle bei der Zellproliferation sowie dem Zellzyklusablauf [126, 168, 169]. Die durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen zeigen, dass nur die Beeinflussung der HLE-B3 Zellen mit Mibefradil einen signifikanten Unterschied in der G0/G1-Phase sowie in der proliferativen Phase G2/M bzw. Phase S bewirkt. Zudem steigt unter Mibefradil-Einfluss der Anteil der apoptotischen Zellen signifikant an. Der prozentuale Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen unter Einfluss der jeweiligen Vergleichsantagonisten ETX, 4-AP und Verapamil verändert sich gegenüber den unbehandelten Zellen nicht.

Eine weitere Überlegung in diesem Zusammenhang führte dazu, die Linseneithelzellen simultan mit den Vergleichsantagonisten zu inkubieren, um einen möglichen Effekt in den Zellzyklusphasen durch die theoretisch parallele Blockierung der T-Typ- und L-Typ-Kalziumkanälen sowie der Kaliumkanäle zu detektieren. Überraschenderweise zeigte sich auch in diesem Ansatz, dass selbst die mögliche komplexe Blockade durch den simultanen Einsatz aller Vergleichsantagonisten keinen Einfluss auf die humanen Linseneithelzellen hat. Allerdings kann nicht genau beurteilt werden, ob die jeweiligen Antagonisten interagieren. Es existieren Studien, in denen verschiedene Antagonisten simultan eingesetzt wurden. Die Auswirkungen unterscheiden sich je nach Kombination der einzelnen Ionenkanalblocker. Einerseits kann die Kombination schädlich sein. Zum anderen können auch keine schädigenden Effekte auftreten [164, 196]. Die in dieser Arbeit eingesetzte Kombination von

5 mM 4-AP, 10 mM ETX und 10 μ M Verapamil hat offensichtlich keine schädigende Wirkung auf die Linsenepithelzellen.

Möglicherweise ist der Wirkmechanismus von Mibefradil komplexer als bislang vermutet. So konnten Gomora *et al.* (1999) und Nilius *et al.* (1997) die Blockade von Cl⁻-Kanälen nachweisen [124, 168]. Es konnte gezeigt werden, dass Mibefradil kalziumaktivierte und volumenregulierte Cl⁻-Kanäle in Mikrogefäßzellen inhibiert [153]. Die Ionenkanäle sowie auch der Adhäsionskomplex sind eng mit intrazellulären Signalwegen verknüpft [169]. Einen Hinweis darauf, wie bestimmte Signalwege in humanen Linsenepithelzellen zeitabhängig auf die Antagonisten reagieren, sollten die Bio-Plex-Analysen geben. Die Proteine werden durch Phosphorylierungen und daraus oft resultierender Konformationsänderung aktiviert und steuern so weitere Signalkaskaden. Die zeitabhängigen Untersuchungen der phosphorylierten Signalproteine p38, ERK1/2 und AKT zeigen einen interessanten Verlauf. AKT ist bekannt als ein zentraler Mediator im Zellwachstum sowie in antiapoptotischen Signalwegen [170, 171, 172]. Mibefradil hemmt in der Konzentration von 30 μ M schon nach 1 h die Phosphorylierung von AKT. Damit werden bereits wesentliche antiapoptotische Signalwege inhibiert. Unter Einfluss der Vergleichsantagonisten ist keine Aktivierung von AKT nach 1 h zu beobachten. Nach 6 h Mibefradil-Einfluss war eine Erhöhung des phosphorylierten AKT zu beobachten, welche jedoch nicht signifikant war. Möglicherweise kann es sich um eine Gegensteuerung der Zelle auf den inhibierenden Einfluss von Mibefradil handeln. Unter Einfluss von 4-AP steigt die Menge an aktiviertem AKT nach 24 h signifikant an. Durch die Blockade der Kaliumkanäle wird AKT indirekt aktiviert und damit antiapoptotische Signalwege angesteuert [106,107].

Des Weiteren ist eine Aktivierung von p38 sowie ERK1/2 zu beobachten. Bei der Phosphorylierung des zentralen Signalproteins ERK1/2 wäre eine Verminderung zu erwarten gewesen, da ERK1/2 häufig mit proliferativen Prozessen in Verbindung gebracht wird [173, 174, 175, 177, 178]. Es wurden aber schon gegenteilige Vorgänge beobachtet. Sanchez *et al.* (2007) untersuchten Capsaicin an PC-3 Zellen. Die Komponente des roten Pfeffers induziert Apoptose nachweislich durch die Aktivierung von ERK1/2 [179]. Houben *et al.* (2007) konnten zeigen, dass eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges Apoptose in humanen Melanomzellen induziert. Dadurch änderte sich auch die Zellform. Eine andere Arbeit berichtet, dass eine erhöhte Aktivität des MAPK-Signalweges unter Einfluss von Tetradecanoylphorbolacetat Ursache für die Zerstörung von epithelialen Tight junctions ist [180]. Auch hier war eine Erhöhung des phosphorylierten ERK zu beobachten. Zudem konnte gezeigt werden, dass ERK durch pharmakologischen Einfluss an der

Proteinseite Thr202/Tyr204 phosphoryliert wurde [127]. In unseren aktuellen Experimenten wurde ein Antikörper eingesetzt, welcher das an der Proteinseite Thr202/Tyr204 aktivierte ERK1/2 detektiert. Der pharmakologische Einfluss von Mibefradil auf die ERK1/2-Phosphorylierung am gleichen Epitop ordnet sich somit in von anderen Autoren gefundene Erkenntnisse ein. Andrysik *et al.* konnten ebenfalls nachweisen, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 und auch p38 mit folgenden apoptotischen Vorgängen assoziiert sind [177]. Das Protein p38 aus dem MAPK-Signalweg wird unter Einfluss von 4-AP, ETX und 30 μM Mibefradil innerhalb 24 h verstärkt gegenüber der unbehandelten Kontrolle aktiviert. Wenn Kalziumkanäle blockiert sind, können MAPK-Kinasen aktiviert werden und die Zellmorphologie kann sich ändern [148]. Das Signalprotein p38 wird aktiviert durch Stress aus dem Milieu, ist in verschiedene Stressantworten aktiv involviert [182, 183] und kann Apoptose induzieren [181, 182]. Da der nonselektive Kaliumkanalblocker 4-AP zwar ähnliche Effekte in der Phosphorylierung von p38 und ERK1/2 zeigte, könnten diese unter anderem auf die Kaliumkanalblockade zurückgeführt werden. Äußerer sowie innerer Stress kann die MAPK-Kinasen wie ERK, JNK und p38 in Epithelzellen aktivieren. Hyperosmolarität, wie sie z.B. durch die Blockade von Ionenkanälen entstehen kann, induziert die Phosphorylierung von ERK1/2. Diese Blockierung der Kanäle führt zu einem inneren Stress für die Zell hinsichtlich ihrer Homöostase [184]. Es ist wahrscheinlich, dass die Blockade der Ionenkanäle durchaus einen Stress auf die Zellen ausübt und so mehr p38 phosphoryliert wird. Da Mibefradil in den untersuchten Konzentrationen mehrere verschiedene Ionenkanäle blockiert, erscheint die Aktivierung von p38 plausibel.

Erstaunlicherweise konnte der selektive L-Typ-Kalziumkanalblocker Verapamil keine gleichwertigen zellulären Effekte in allen bisherigen *in vitro*-Versuchen erzielen. Da die Substanz Mibefradil ausgehend von der Verapamil-Struktur entwickelt wurde [31, 141, 142, 143], sind ähnliche Effekte durch Verapamil in einer Konzentration von 10 μM erwartet worden. Eventuell müsste zusätzlich der Einfluss höherer Konzentrationen dieser Substanz auf humane Linsenepithelzellen untersucht werden.

Die Gesamtheit der Ergebnisse lässt die Vermutung zu, dass die Wirkungsweise von Mibefradil – Hemmung des Zellwachstums – nicht allein von der Blockade der T-Typ- bzw. L-Typ-Kalziumkanäle oder der Kaliumkanäle herrührt, da ETX, Verapamil wie auch 4-AP nicht die Effekte von Mibefradil auf humane Linsenepithelzellen zeigen. Es müssen noch weitere Mechanismen eine Rolle spielen. Mögliche Ursachen könnten z.B. in der inhibierenden Wirkung von Mibefradil auf andere Kanäle, wie N-Typ-, Q-Typ- oder R-Typ-Kalziumkanäle [185] sowie Natrium- oder Chloridkanäle, liegen [124, 126, 186]. Ob die

zusätzliche Inhibierung dieser Kanäle den Wirkmechanismus komplettiert oder zusätzlich noch ein bisher nicht vermuteter Mechanismus eine Schlüsselrolle spielt, könnten weitere Untersuchungen zeigen.

Für die spätere Therapie sollen durch Mibefradil nur aus der Äquatorialzone auswachsende, stärker proliferierende Linsenepithelzellen inhibiert werden. Existente andere Gewebe im Auge wie z.B. das Corneaepithel sollen nicht beeinflusst werden.

Durch die bisherigen Versuche konnte beobachtet werden, dass konfluent gewachsene Linsenepithelzellen widerstandsfähiger gegenüber Mibefradil waren als die subkonfluente Zellkultur. Die Untersuchungen zwischen konfluenten und subkonfluenten HLE-B3 Zellen sollten zeigen, wie sensitiv die HLE-B3 Zellen in unterschiedlicher Zelldichte auf geringere Konzentrationen von Mibefradil reagieren. In einer subkonfluenten Zellkultur haben die Linsenepithelzellen nur teilweise Zell-Zell-Verbindungen aufgebaut. Der Anteil der proliferierenden Zellen ist in diesem Zellkulturzustand höher als in einem konfluenten Zellrasen. Hier liegen die Zellen in einem engen Verband zusammen und haben feste Zell-Zell-Verbindungen zueinander. Nebe *et al.* (1998) haben festgestellt, dass der Hepatozyten-Wachstumsfaktor auf subkonfluente Hepatozyten einen stärkeren Einfluss hat als auf konfluente Zellen [187]. In neueren Arbeiten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass subkonfluent gewachsener Zellen sensitiver auf Reize reagieren [188, 189]. Wie in den lichtmikroskopischen Aufnahmen zu sehen, zeigte sich visuell schon nach 24 h Mibefradil-Einfluss ein Unterschied zwischen konfluenten und subkonfluenten humanen Linsenepithelzellen. Der feste Zellverband der konfluenten Zellkultur wird im Gegensatz zur subkonfluenten Zellkultur nicht durch 10 μM bzw. 20 μM Mibefradil beeinflusst. Dieses Resultat wurde daher weiter eingehend untersucht. In den durchgeführten zeitabhängigen Adhäsionsversuchen wurde gezeigt, dass die bei subkonfluenten Zellen inhibierenden Mibefradil-Konzentrationen nicht den gleichen Effekt auf konfluente Zellen besitzen. In den Versuchen mit den konfluent kultivierten HLE-B3 Zellen ist nur unter Einfluss von 30 μM Mibefradil ein inhibierender Effekt nach 18 h zu beobachten, während dieser bei den subkonfluenten Zellen sehr schnell und auch bei geringen Konzentrationen an Wirkstoff (10 μM) auftritt. Dieses Ergebnis konnte bei der Analyse der Zellzyklen sowie im MTS-Test untermauert werden. Auch hier zeigte sich eine höhere Sensitivität der subkonfluenten Linsenepithelzellen gegenüber der Mibefradil-Behandlung. Ein möglicher Grund könnte in den Zell-Zell-Kontakten liegen, welche in der subkonfluenten Zellkultur nicht in dem Maße ausgeprägt sind, wie in dem festen Zellverband bei konfluenten Bewachungszustand. Eine

andere Erklärung dafür könnte in der Rolle der T-Typ-Kalziumkanäle bei der Proliferation liegen. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei Fibroblasten und glatten Muskelzellen proliferierende Zellen mehr T-Typ-Kalziumkanäle besitzen als nichtproliferierende Zellen [121, 190, 191]. Weiterhin zeigten Wang Y *et al.* (2002), dass eine Überexpression einer Untereinheit des T-Typ-Kalziumkanals zum besseren Wachstum von HEK-293 Zellen führt. Da sowohl hLEZ als auch die Zelllinie HLE-B3 nachweislich Kalziumkanäle vom T-Typ exprimieren [23, 150], ergeben sich damit erste Hinweise darauf, dass geringe Konzentrationen von Mibefradil ausreichen, um die stärker proliferierenden und migrierenden Linsenepithelzellen wirkungsvoll zu eliminieren, ohne dass intakte umgebende Gewebe beeinflusst [192, 193]. Andere bereits untersuchte Pharmaka erwiesen sich spätestens im Tierversuch als nicht wirkungsvoll, da sie nicht die gleichen Effekte wie in den *in vitro*-Versuchen zeigen oder das umgebende Gewebe beeinträchtigen [1, 193, 194]. Allerdings ist die Frage nach der Schädigung von umgebendem Gewebe unter den getesteten Mibefradil-Konzentrationen eine erste Erkenntnis. Zur näheren Klärung müssten die entsprechenden Konzentrationen an Mibefradil *in vivo* im Tierversuch eingesetzt und beobachtet werden.

Für den Tierversuch und für die zukünftige praktische Anwendung wurde ein neues Freisetzungskonzept für die Applikation erarbeitet. In früheren Versuchen wurde versucht, den Ionenkanalblocker Mibefradil an Polymethylmethacrylat (PMMA) für eine spätere Applikation an PMMA-Intraokularlinsen zu binden. Der Einfluss der dann freigesetzten Substanz auf die Adhäsion von hLEZ wurde in *in vitro*-Versuchen analysiert [114]. Die ionische, nicht kovalente Bindung zeigte sich als nicht besonders geeignet, um eine zellbiologische Wirksamkeit auf die Hemmung der Adhäsion von hLEZ zu bewirken. Der Wirkstoff wurde zwar freigesetzt, allerdings nicht komplett innerhalb drei Tagen. So konnten die gewünschten inhibierenden Konzentrationen nicht in einem entsprechenden Zeitraum erreicht werden, um die Adhäsion der hLEZ zu inhibieren [114].

Die Weiterentwicklung der dissoziierten Form von Mibefradil in immobilisierter, verkapselter Form sollte ein wesentlicher Schritt für die mögliche praktische Anwendung sein. Für dieses Ziel wurde Mibefradil in dem Biomaterial Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) immobilisiert und verkapselt. Die Linkerchemie zwischen Substanz und PLGA basiert in diesem Ansatz auf der kovalenten Aminolyse von Epoxiden. Dieses ist grundsätzlich mit dem technologischen Knowhow der Warnemünder Firma Micromod GmbH gelungen. Die Entstehung der Partikel, wie in den REM- bzw. TEM-Aufnahmen zu sehen, wurde nach Rücksprache mit Experten der Firma wie folgt beschrieben: Die wässrige Wirkstofflösung wurde durch einen Emulgator in

Form von Vesikeln eingeschlossen. Dieser Emulgator scheidet beim Verdunsten der organischen Phase das PLGA ab. Beim anschließenden Gefriertrocknen der Partikel wird das restliche Wasser entzogen. Dadurch kommt es zu den auf dem TEM-Bild zu sehenden „Fransen“ (Abbildung 48). Das PLGA schließt den Wirkstoff komplett ein. Die Freisetzung des Wirkstoffs erfolgt durch Biodegradation des umgebenden PLGA. Dieses Biomaterial ist schon in anderen Applikationen zur Prävention des Nachstars angewandt worden. Es konnte gezeigt werden, dass PLGA biokompatibel ist und sich zum Verkapseln von Wirkstoffen besonders eignet. Xie *et al.* (2003) zeigten, dass in PLGA immobilisiertes Heparin in Kaninchenaugen gleichmäßig freigesetzt wird. Zudem trat keine Toxizität von PLGA für das umliegende Gewebe auf [21]. Vega *et al.* (2008) wiesen ebenfalls die Eignung der Immobilisierung eines Wirkstoffs in PLGA und die anschließenden Effekte auf die untersuchten Zellen nach. Die Substanz Flurbiprofen, ein in der Ophthalmologie bekannter Wirkstoff zur Behandlung von Entzündungen im vorderen Augenabschnitt, wurde in PLGA verkapselt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff aus den PLGA-Kapseln entsprechend freigesetzt und die Cornea nicht geschädigt wurde [195].

Die eigenen Zellkulturversuche mit immobilisiertem verkapseltem Mibefradil zeigten, dass die Freisetzung der verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffs aus den vorher berechneten Immobilisatmengen die gleichen Effekte auf Linsenepithelzellen ausübt wie die gelöste Substanz. Es konnte bewiesen werden, dass die Freisetzung *in vitro* funktioniert. Für zukünftige präklinische Tierversuche sollte die Realisierbarkeit, Eignung und Wirkung der Immobilisierung und Verkapselung der T-Typ-Kalziumkanalblockers Mibefradil getestet werden, um die Substanz lokal kontinuierlich in definierter Konzentration freizusetzen. Ob die Freisetzung *in vivo* ebenfalls in gleicher Weise wie in den *in vitro* Versuchen erfolgt, die Immobilisate verträglich sind, das umliegende Gewebe nicht geschädigt wird und vor allem der Nachstar wirkungsvoll verhindert werden kann, können nur weitergehende Tierversuche klären.

6. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien basierten auf den Erkenntnissen, dass der eingesetzte Ionenkanalblocker Mibefradil die Kalziumkanäle von Linsenepithelzellen schließt und somit die Mechanismen der Adhäsion sowie im Folgenden die Physiologie der Zelle inhibiert. Neben der Untersuchung der Wirkmechanismen war die Entwicklung für den möglichen therapeutischen Einsatz von besonderer Bedeutung.

Um diese bisher kaum verstandenen Wirkmechanismen zu untersuchen, wurden primäre humane Linsenepithelzellen und die humane Linsenepithelzelllinie HLE-B3 eingesetzt. In verschiedenen Experimenten konnte die adhäsionshemmende und proliferationsinhibierende Wirkung von Mibefradil an beiden Zelltypen gleichermaßen festgestellt werden.

Obgleich die Kalziumkanäle vom T- und L-Typ sowie auch der Kaliumkanal durch Mibefradil nachweislich geschlossen werden konnte, hatten selektiv eingesetzte typische T-Kanalblocker (Ethosuximid), L-Kanalblocker (Verapamil) und der Kaliumkanalblocker (4-Aminopyridin) keine vergleichbaren zellulären Effekte, wie Proliferationshemmung, Fragmentierung des Aktinzytoskeletts, Downregulation der Integrin- und ROCK-2-Expression. Somit muss ein weiterer Einflussfaktor in der dissoziierten Form der Substanz Mibefradil vermutet werden.

Die für eine mögliche Anwendung wichtigste Erkenntnis ist die spezifische Wirkung des T-Typ-Kalziumantagonisten auf noch proliferierende humane Linsenepithelzellen (Status in der Zellkultur entsprechend Subkonfluenz) im Vergleich zu Zellen, die sich im dichten Zellrasen befinden (konfluenter Status in der Zellkultur). Der therapeutische Hintergrund ist, dass nur die residualen Linsenepithelzellen, die aus der Äquatorialzone auswachsen, medikamentös inhibiert werden sollen und nicht das umliegende, intakte Gewebe im Auge mit beeinträchtigt wird. Die Wirkung beruht auf der höheren Sensitivität der noch auswachsenden Linsenepithelzellen auf den Kalziumkanalblocker Mibefradil auch aufgrund der möglicherweise höheren Expressionsdichte der T- und L-Typ-Kanäle.

Aufgrund der eindeutig adhäsionshemmenden Wirkung von Mibefradil auf Linsenepithelzellen hat der praktische Aspekt einen wichtigen Stellenwert. Es ist in Zusammenarbeit mit der Micromod Partikeltechnologie GmbH gelungen, die Substanz Mibefradil-Dihydrochlorid (1S,2S)-2-[2-[[3-(2-benzimidazolyl propyl) methyl amino] ethyl]-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphtyl-methoxy acetate dihydrochloride) in PLGA-Mikrokapseln zu immobilisieren. Die Releaserate von Mibefradil war effizient, um das Zellwachstum von humanen HLE-B3 Zellen *in vitro* zu hemmen.

Damit ist die Voraussetzung für weitergehende präklinische Untersuchungen im Tierexperiment geschaffen worden.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Rabsilber TM, Auffarth GU. (2006) Pharmacological Means to Prevent Secondary Cataract. *Klin Monatsbl Augenheilkd*; 223: 559-567
- [2] Menapace R. (2007) After-cataract: A solved problem? *Spektrum der Augenheilkunde*; ISSN: 1613-7523, Vol. 21, 166-178
- [3] Zaczek A, Laurell CG, Zetterstrom C. (2004) Posterior capsule opacification after phacoemulsification in patients with postoperative steroidal and nonsteroidal treatment. *J Cataract Refract Surg*; 30: 316-320
- [4] Mansfield KJ, Cerra A, Chamberlain CG. (2004) Effects of dexamethasone on posterior capsule opacification-like changes in a rat lens explant model. *Mol Vis*; 10: 728-737
- [5] Fernandez V, Fragoso MA, Billotte C, Lamar P, Orozco MA, Dubovy S, Willcox M, Parel JM. (2004) Efficacy of various drugs in the prevention of posterior capsule opacification: experimental study of rabbit eyes. *J Cataract Refract Surg*; 30: 2598-2605
- [6] Auffarth GU, Rabsilber TM, Reuland AJ. (2005) Neue Methoden der Nachstarprävention. *Ophthalmologe*; 102: 579-586
- [7] Nishi O, Nishi K. (2002) Preventive effect of a second-generation silicone intraocular lens on posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg*; 7, 1236-1240
- [8] Pandey SK, Apple DJ, Werner L, Maloof AJ, Milverton EJ. (2004) Posterior capsule opacification: a review of the aetiopathogenesis, experimental and clinical studies and factors for prevention. *Indian J Ophthalmol*; 52: 99-112
- [9] Buehl W, Findl O, Menapace R, Sacu S, Kriechbaum K, Koepl C, Wirtitsch M. (2005) Long-term effect of optic edge design in an acrylic intraocular lens on posterior capsule opacification. *J Cataract Refract Surg*; 31(5): 954-961

- [10] Jose RM, Bender LE, Boyce JF, Heatley C. (2005) Correlation between the measurement of posterior capsule opacification severity and visual function testing. *J Cataract Refract Surg*; 31(3): 534-542
- [11] Bertelmann E, Kojetinsky C. (2001) Posterior capsule opacification and anterior capsule opacification. *Curr Opin Ophthalmol*; 1: 35-40
- [12] Clark DS, Emery JM, Munsell MF. (1998) Inhibition of posterior capsule opacification with an immunotoxin specific for lens epithelial cells: 24 month clinical results. *J Cataract Refract Surg*; 24: 1614-1620
- [13] Cortina P, Gómez-Lechón MJ, Navea A, Menezo JL, Terencio MC, Diaz-Llopis M. (1997) Diclofenac sodium and cyclosporin A inhibit human lens epithelial cell proliferation in culture. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*; 235: 180-185
- [14] Nikonenko I, Bancila M, Bloc A, Muller D, Bijlenga P. (2005) Inhibition of T-type calcium channels protects neurons from delayed ischemia-induced damage. *Mol Pharmacol*; 68(1): 84-89
- [15] Aslam, TM, Dhillon B, Werghi N, Taguri A, Wadood A. (2002) Systems of analysis of posterior capsule opacification. *Br J Ophthalmol*; 86: 1181-1186
- [16] Maloof A, Neilson, Milverton EJ, Pandey SK. (2003) Selective and specific targeting of lens epithelial cells during cataract surgery using sealed-capsule irrigation. *J Cataract Refract Surg*; 29: 1566-1568
- [17] Duncan G, Wormstone IM, Liu CS, Marcantonio JM, Davies PD. (1997) Thapsigargin-coated intraocular lenses inhibit human lens cell growth. *Nat Med*; 3: 1026-1028

- [18] Fernandez V, Fragoso MA, Billotte C, Lamar P, Orozco MA, Dubovy S, Willcox M, Parel JM. (2004) Efficacy of various drugs in the prevention of posterior capsule opacification: experimental study of rabbit eyes. *J Cataract Refract Surg*; 30: 2598-2605
- [19] Flach AJ, Dolan BJ. (2000) Incidence of postoperative posterior capsular opacification following treatment with diclofenac 0.1 % and ketorolac 0.5 % ophthalmic solutions: 3-year randomized, double-masked, prospective clinical investigation. *Trans Am Ophthalmol Soc*; 98: 101-107
- [20] Moosmang S, Haider N, Bruderl B, Welling A, Hofmann F. (2006) Antihypertensive effects of the putative T-type calcium channel antagonist mibefradil are mediated by the L-type calcium channel Cav1.2. *Circ Res*; 6(98): 105-110
- [21] Xie L, Sun J, Yao Z. (2003) Heparin drug delivery system for prevention of posterior capsule opacification in rabbit eyes. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*; 241: 309-313
- [22] Crowston JG, Healey PR, Hopley C, Neilson G, Milverton EJ, Maloof A. (2004) Water-mediated lysis of lens epithelial cells attached to lens capsule. *J Cataract Refract Surg*; 30: 1102-1106
- [23] Nebe B, Kunz F, Peters A, Rychly J, Noack T, Beck R. (2004) Induction of apoptosis by the calcium antagonist mibefradil correlates with depolarization of the membrane potential and decreased integrin expression in human lens epithelial cells. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*; 7: 597-604
- [24] Greite JH, Freyler H, Skorpik C, Grasl M. (1990) Osmo-Lavage zur Nachstarverhütung. Springer-Verlag 3. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Intraokularlinsen Implantation (Wien 1989), 197-207

- [25] Beck R, Nebe B, Guthoff R, Rychly J. (2001) Inhibition of lens epithelial cell adhesion by the calcium antagonist Mibefradil correlates with impaired integrin distribution and organization of the cytoskeleton. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*; 6: 452-458
- [26] Rieck PW, Kriegsch J, Jaeckel C, Hartmann C. (2004) Effect von Suramin auf Proliferation und Migration von Linsenepithelzellen in vitro. *Ophthalmologe*; 52: 99-112
- [27] Agarwal A, Agarwal S, Agarwal A, Maloof A. (2003) Sealed-capsule irrigation device. *J Cataract Refract Surg*; 29: 2274-2276
- [28] Eberhard M, Miyagawa K, Hermsmeyer K, Erne P. (1995) Effects of mibefradil on intracellular Ca²⁺ release in cultured rat cardiac fibroblasts and human platelets. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 353: 94-101
- [29] Hahn M, Tkachuk VA, Bochkov VN, Cheglakov IB, Clozel JP. (1995) Blockade of receptor-operated calcium channels by mibefradil (Ro 40-5967): effects on intracellular calcium and platelet aggregation. *Cardiovasc Drugs Ther*; 9: 815-821
- [30] Davidson MG; Harned J; Grimes AM; Duncan G; Wormstone IM. (1998) Transferrin in after-cataract and as a survival factor for lens epithelium. *Exp Eye Res*; 66: 207-215
- [31] Barry M, Massie MD. (1997) Mibefradil: a selektive T-Type Calcium Antagonist. *The American Journal of Cardiology*; 80 (9A)
- [32] Inan UU, Oztürk F, Kaynak S, Kurt E, Emiroğlu L, Ozer E, Ilker SS, Güler C. (2001) Prevention of posterior capsule opacification by intraoperative single-dose pharmacologic agents. *J Cataract Refract Surg*; 27: 1079-1087
- [33] Inan UU, Oztürk F, Kaynak S, Ilker SS, Ozer E, Güler C. (2001) Prevention of posterior capsule opacification by retinoic acid and mitomycin. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*; 239: 693-697

- [34] Andley UP. (2007) Crystallins in the eye: Function and pathology. *Progress in Retinal and Eye Research*; 26: 78–98
- [35] Ismail MM, Alio JL, Ruiz Moreno JM. (1996) Prevention of secondary cataract by antimitotic drugs: experimental study. *Ophthalmic Res*; 28: 64-69
- [36] Kim JT, Lee DH, Chung KH, Kang IC, Kim DS, Joo CK. (2002) Inhibitory effects of salmosin, a disintegrin, on posterior capsular opacification in vitro and in vivo. *Exp Eye Res*; 74: 585-594
- [37] Kojetinsky C, Baatz H, Pleyer U, Hartmann C, Rieck P. (2001) In-vitro-Untersuchungen an bovinen und humanen Linsenepithelzellkulturen zur Nachstarhemmung mittels eines zyklischen RGD-Peptids. *Ophthalmologie*; 98: 731-735
- [38] Lee JH, Kang GH, Kim KC, Kim KM, Park DI, Choi BT, Kang HS, Lee YT, Choi YH. (2002) Tetrandrine-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *Int J Oncol*; 21: 1239-1244
- [39] Mishra SK, Hermsmeyer K. (1994) Selective inhibition of T-type Ca²⁺ channels by Ro 40-5967. *Circ Res.*; 75(1): 144-148
- [40] Matsushima H, Mukai K, Yoshida S, Obara Y. (2004) Effects of calcium on human lens epithelial cells in vitro. *Jpn J Ophthalmol*; 48(2): 97-100
- [41] Nishi O. (2005) Einfluss von Intraokularlinsenmaterial und -design auf die Nachstarentwicklung. *Ophthalmologie*; 102: 572-578
- [42] Anders N, Heuermann T, Rütter K, Hartmann C. (1999) Clinical and electrophysiologic results after intracameral lidocaine 1 % anesthesia: a prospective randomized study. *Ophthalmology*; 106: 1863-1868

- [43] Hartmann C, Wiedemann P, Gothe K, Weller M, Heimann K. (1990) Prevention of secondary cataract by intracapsular administration of the antimitotic daunomycin. *Ophthalmologie*; 4: 102-106
- [44] Sarsero D, Fujiwara T, Molenaar P, Angus JA. (1998) Human vascular to cardiac tissue selectivity of L- and T-type calcium channel antagonists. *Br J Pharmacol*; 125(1): 109-119
- [45] Richard S, Neveu D, Carnac G, Bodin P, Travo P, Nargeot J. (1992) Differential expression of voltage-gated Ca(2+)-currents in cultivated aortic myocytes. *Biochim Biophys Acta*;1160(1): 95-104
- [46] Schmitt R, Clozel JP, Iberg N, Bühler FR. (1996) Prevention of neointima formation by mibefradil after vascular injury in rats: comparison with ACE inhibition. *Cardiovasc Drugs Ther* ; 10(2): 101-105
- [47] Weller M, Wiedemann P, Fischbach R, Hartmann C, Heimann K. (1988) Evaluation of daunomycin toxicity on lens epithelium in vitro. *Int Ophthalmol*; 12: 127-130
- [48] Schaumberg DA, Dana MR, Christen WG, Glynn RJ. (1998) A systematic overview of the incidence of posterior capsule opacification. *Ophthalmology*; 105(7):1213-1221
- [49] Nishi O, Nishi K, Hikida M. (1993) Removal of lens epithelial cells following loosening of the junctional complex. *J Cataract Refract Surg*; 19: 56-61
- [50] Nishi O, Nishi K, Hikida M. (1995) Effects of diclofenac sodium and indomethacin on proliferation and collagen synthesis of lens epithelial cells in vitro. *J Cataract Refract Surg*; 21: 461-465
- [51] Zavadil J, Böttinger EP. (2005) TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*; 24(37): 5764-5774

- [52] Nishi O, Nishi K, Saitoh I, Sakanishi K. (1996) Inhibition of migrating lens epithelial cells by sustained release of ethylenediaminetetraacetic acid. *J Cataract Refract Surg*; 22 (Suppl 1): 863-868
- [53] Juliano RL. (2002) Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: Functions of integrin, cadherins, selectins and immunoglobulin-superfamily members. *Annu rev Pharmacol Toxicol*; 42: 283-323
- [54] Delon I, Brown NH. (2007) Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*; 19(1): 43-50
- [55] Oharazawa H, Ibaraki N, Ohara K, Reddy VN. (2005) Inhibitory effects of Arg-Gly-Asp (RGD) peptide on cell attachment and migration in a human lens epithelial cell line. *Ophthalmic Res*; 37: 191-196
- [56] Palmade F, Sechoy-Chambon O. (1994) Regnouf de Vains JB, Coquelet C, Bonne C. Inhibition of cell adhesion to lens capsule by LCM 1910, an RGD-derived peptide. *J Ocul Pharmacol*; 10: 623-632
- [57] Pandey SK, Cochener B, Apple DJ, Colin J, Werner L, Bougaran R, Trivedi RH, Macky TA, Izak AM. (2002) Intracapsular ring sustained 5-fluorouracil delivery system for the prevention of posterior capsule opacification in rabbits: a histological study. *J Cataract Refract Surg*; 28: 139-148
- [58] Bhermi GS, Spalton DJ, El-Osta AAR, Marshall J. (2002) Failure of a discontinuous bend to prevent lens epithelial cell migration in vitro. *J Cataract Refract Surg*; 7: 1256-1261
- [59] Olson, L. Anatomy and Embryology of the lens. (1989) In: Tasman, W., Jaeger, E.A. (eds) *Duane's Clinical Ophthalmology*. Lippincott Company, Philadelphia, Pennsylvania; p. 1-3

- [60] Shah GR, Gills JP, Durham DG, Ausmus WH. (1986) Three thousand YAG lasers in posterior capsulotomies: an analysis of complications and comparison to polishing and surgical discission. *Ophthalmic Surg*; 8: 473-477
- [61] Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. (2001) Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix – cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2: 793-805
- [62] Hollick EJ, Spalton DJ, Ursell PG. (1999) The effect of polymethacrylate, silicone, and polyacrylic intraocular lenses on posterior capsule opacification 3 years after cataract surgery. *Ophthalmology*; 106: 49-54
- [63] Tetz MR, Ries MW, Lucas C, Stricker H, Völcker HE. (1996) Inhibition of posterior capsule opacification by an intraocular-lens-bound sustained drug delivery system: an experimental animal study and literature review. *J Cataract Refract Surg*; 22: 1070-1078
- [64] Diener A, Nebe B, Lüthen F, Becker P, Beck U, Neumann HG, Rychly J. (2005) Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. *Biomaterials*; 26: 383-392
- [65] Zamir E, Geiger B. (2001) Molecular complexity and dynamics of cellmatrix adhesions. *J Cell Sci*; 114: 3583-3590
- [66] Hansen TJ, Tyndall R, Soll DB. (1987) Methotrexate-anticollagen conjugate inhibits in vitro lens cell outgrowth. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 28: 1206-1209
- [67] Jones BW, Marc RE. (2005) Retinal remodeling during retinal degeneration. *Exp Eye Res*; 81(2): 123-137
- [68] Tetz MR, Nimsgern C. (1999) Posterior capsule opacification. Part 2: Clinical findings. *J Cataract Refract Surg*; 25(12): 1662-1674

- [69] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*; 302(5651): 1704-1709
- [70] Apple DJ, Solomon KD, Tetz MR, Assia EI, Holland EY, Legler UF, Tsai JC, Castaneda VE, Hoggatt JP, Kostick AM. (1992) Posterior capsule opacification. *Surv Ophthalmol*; 37(2): 73-116
- [71] Wesendahl TA, Shalaby W, Corson DW, Auffarth GU, Apple DJ. (1996) Eignung von Polyvinylpyrrolidon als Material für Hydrogelintraokularlinsen. *Ophthalmologie*; 93: 22-28
- [72] Bolsover SR. (2005) Calcium signalling in growth cone migration. *Cell Calcium*; 37(5): 395-402
- [73] Chirila TV, Constable IJ, Vijayasekaran S, Ben-Hun J. (1995) Melanin-containing hydrogel intraocular lenses: a histopathological study in animal eyes. *J Biomater Appl*; 3: 262-274
- [74] Huttenlocher A, Palecek SP, Lu Q, Zhang W, Mellgren RL, Lauffenburger DA, Ginsberg MH, Horwitz AF. (1997) Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J Biol Chem*; 272(52): 32719-32722
- [75] Hynes RO. (1999) Cell adhesion: old and new questions, *trends Cell Biol*; 9: 33-37
- [76] Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*; 50: 197-263
- [77] Weller M, Heimann K, Wiedemann P. (1987) Cytotoxic effects of daunomycin on retinal pigment epithelium in vitro. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*; 225: 235-238

- [78] Kobrin I, Bieska G, Charlon V, Lindberg E, Pordy R. (1998) Anti-anginal and anti-ischemic effects of mibefradil, a new T-type calcium channel antagonist. *Cardiology*; 89 Suppl 1: 23-32
- [79] Opie LH. (1987) Calcium channel antagonists, Part I: Fundamental properties: mechanisms, classification, sites of action. *Cardiovasc Drugs Ther*; 1(4): 411-430
- [80] Tobari I, Iwaki Y, Miyake K. (1999) Effect of tranilast eyedrops in preventing posterior capsule opacification: preliminary report. *J Cataract Refract Surg*; 25: 1394-1399
- [81] Naumann GOH (1997) (Hrsg.): *Pathologie des Auges. Band II.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 845-894
- [82] Kim HC, Härtner S, Béhe M, Behr TM, Hampp NA. (2006) Two-photon-absorption controlled multi-dose drug release: A novel approach for secondary cataract treatment. *J Biomed Opt*, 11(3): 34024
- [83] Shah GR, Gills JP, Durham DG, Ausmus WH. (1986) Three thousand YAG lasers in posterior capsulotomies: an analysis of complications and comparison to polishing and surgical discission. *Ophthalmic Surg*; 17(8): 473-477
- [84] Perchenet L, Clément-Chomienne O. (2000) Characterization of mibefradil block of the human heart delayed rectifier hKv1.5. *J Pharmacol Exp Ther*; 295(2): 771-778
- [85] Wachsstock DH, Wilkins JA, Lin S. (1987) Specific interaction of vinculin with alpha-actinin. *Biochem Biophys Res Commun*; 146(2): 554-560
- [86] Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. (1988) Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*; 4: 487-525
- [87] Hofmann F, Lacinová L, Klugbauer N. (1999) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*; 139: 33-87

- [88] Bernink PJ, Prager G, Schelling A, Kobrin I. (1996) Antihypertensive properties of the novel calcium antagonist mibefradil (Ro 40-5967): a new generation of calcium antagonists? Mibefradil International Study Group. *Hypertension*; 27(3): 426-432
- [89] Greithe JH, Freyler H, Skorpik C, Grasl M. (1990) Osmo-Lavage zur Nachstarverhütung. Springer-Verlag 3.Kongress der Deutschen Gesellschaft für Intraokularlinsen Implantation (Wien 1989): 197-207
- [90] Nebe B, Holzhausen C, Rychly J, Urbaszek W. (2002) Impaired mechanisms of leukocyte adhesion in vitro by the calcium channel antagonist mibefradil. *Cardiovasc Drugs Ther*; 16(3): 183-193
- [91] Sastry SK, Burrige K. (2000) Focal adhesion: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp Cell Res*; 261: 25-36
- [92] Meissner A, Nebe B, Beck R, Guthoff R, Noack T. (2007) 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*; 24: 228-234
- [93] Yeung SYM, Greenwood IA. (2005) Electrophysiological and functional effects of the KCNQ channel blocker XE991 on murine portal vein smooth muscle cells *British Journal of Pharmacology*; 146: 585–595
- [94] Liu T, Fujita T, Kawasaki Y, Kumamoto E. (2004) Regulation by equilibrative nucleoside transporter of adenosine outward currents in adult rat spinal dorsal horn neurons. *Brain Research Bulletin*; 64: 75–83
- [95] Andley UP, Rhim JS, Chylack LT, Fleming TP. (1994) Propagation and immortalization of human lens epithelial cells in culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 35(7): 3094-3102
- [96] Andley UP, Fleming TP: (1997) Immortalized epithelial cell lines. US Patent 5, 643, 782

- [97] Lindl T. (2002) Zell-und Gewebekultur. Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Spektrum Akademischer Verlag, Auflage 5, ISBN-13: 978-3827411945
- [98] Robinson JP, Carter WO, Narayanan P. (1997) Functional assays by flow cytometry. Immune Cell Phenotyping and Flow Cytometric Analysis, Manual of Clinical Laboratory Immunology (5th ed.): Rose NR, de Marcarion E, Folds JD, Lane HC, Nakamura R (Eds) Am Soc Microbiology: 245-254
- [99] Carbone E, Lux HD. (1984) A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. Biophys J; 46(3): 413-418
- [100] Ruoslahti E, Pierschbacher MD. (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science; 238: 491-497
- [101] Buck Ca, Horwitz AF. (1987) Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. Annu Rev Cell Biol; 3: 179-205
- [102] Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. Annu Rev Cell Dev Biol; 12: 463-518
- [103] Lafrenie RM, Yamada KM. (1996) integrin-dependend signal transduction. J Cell Biochem; 61(4): 543-553
- [104] Yamada KM, Miyamoto S. (1995) Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. Curr Opin Cell Biol; 7(5): 681-689
- [105] Cary LA, Guan JL. (1999) Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. Front Biosci; 4: 102-113
- [106] Berridge MJ. (1984) Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. Biochem J; 220(2): 345-360

- [107] Berridge MJ. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*; 361(6410): 315-325
- [108] BD Bioscience. BD Power Blot instruction manual
- [109] Steinkamp JA. Flow Cytometers. (2001) In: *Encyclopedia of Life Sciences*. London. Nature Publishing Group. <http://www.els.net/>
- [110] D'Souza SE, Ginsberg MH, Plow EF. (1991) Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci*; 16: 246-250
- [111] Wolf B, Brischwein M, Baumann W, Ehret R, Kraus M. (1998) Monitoring of cellular signalling and metabolism with modular sensor-technique: the PhysioControl-Microsystem (PCM). *Biosens Bioelectron*; 13(5): 501-509
- [112] Parsons JT, Schaller MD, Hildebrand J, Leu TH, Richardson A, Otey C. (1994) Focal adhesion kinase: structure and signalling. *J Cell Sci Suppl*; 18: 109-113
- [113] Ehret R, Baumann W, Brischwein M, Schwinde A, Wolf B. (1998) On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures. *Med Biol Eng Comput*; 36(3): 365-370
- [114] Beck R, Kunz F, Nebe B, Sternberg K, Guthoff R. (2002) In-vitro-Versuche zum Einfluss von an PMMA gebundenem Mibefradil auf die Adhäsion humaner Linsenepithelzellen. DGII Band, Biermann Verlag GmbH Köln (Hrsg. Auffarth GU, Völcker HE, Kohnen T, Demeler U: 16. Kongress der Deutschsprachigen Gesellschaft für Intraokularlinsen-Implantation und refraktive Chirurgie: 255-260
- [115] Gilmore AP, Burridge K. (1996) Molecular mechanisms for focal adhesion assembly through regulation of protein-protein interactions. *Structure*; 4: 647-651
- [116] Gilmore AP, Jackson P, Waites GT, Critchley DR. (1992) Further characterisation of the talin-binding site in the cytoskeletal protein vinculin. *J Cell Sci*; 103(3): 719-731

- [117] Apple DJ, Werner L. (2001) Complications of cataract and refractive surgery: a clinicopathological documentation. *Trans Am Ophthalmol Soc*; 99: 95-107
- [118] Liekfeld A, Friederici L, Rieck P. (2008) Bioptics mit Multifokallinsen und Lasek. *Der Ophthalmologe*; 105(9): 832-835
- [119] Nishi O, Nishi K. (2002) Akura J. Speed of capsular bend formation at the optic edge of acrylic, silicone, and poly(methyl methacrylate) lenses. *J Cataract Refract Surg*; 28(3): 431-437
- [120] Schmitt R, Clozel JP, Iberg N, Bühler FR. (1995) Mibefradil prevents neointima formation after vascular injury in rats. Possible role of the blockade of the T-type voltage-operated calcium channel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 15(8): 1161-1165
- [121] Rodman DM, Reese K, Harral J, Fouty B, Wu S, West J, Hoedt-Miller M, Tada Y, Li KX, Cool C, Fagan K, Cribbs L. (2005) Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Circ Res*; 96(8): 864-872
- [122] Belkin AM, Koteliansky VE. (1987) Interaction of iodinated vinculin, metavinculin and alpha-actinin with cytoskeletal proteins. *FEBS Lett*; 220(2): 291-294
- [123] Burridge K, Mangeat P. (1984) An interaction between vinculin and talin. *Nature*; 308(5961): 744-746
- [124] Nilius B, Prenen J, Kamouchi M, Viana F, Voets T, Droogmans G. (1997) Inhibition by mibefradil, a novel calcium channel antagonist, of Ca²⁺- and volume-activated Cl⁻ channels in macrovascular endothelial cells. *Br J Pharmacol*; 121(3): 547-555
- [125] Kroemker M, Rüdiger AH, Jockusch BM, Rüdiger M. (1994) Intramolecular interactions in vinculin control alpha-actinin binding to the vinculin head. *FEBS Lett*; 355(3): 259-262

- [126] Lu F, Chen H, Zhou C, Liu S, Guo M, Chen P, Zhuang H, Xie D, Wu S. (2008) T-type Ca²⁺ channel expression in human esophageal carcinomas: a functional role in proliferation. *Cell Calcium*; 43(1): 49-58
- [127] Houben F, Ramaekers FC, Snoeckx LH, Broers JL. (2007) Role of nuclear lamina-cytoskeleton interactions in the maintenance of cellular strength. *Biochim Biophys Acta*; 1773(5): 675-686
- [128] Saunders RM, Holt MR, Jennings L, Sutton DH, Barsukov IL, Bobkov A, Liddington RC, Adamson EA, Dunn GA, Critchley DR. (2006) Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover. *Eur J Cell Biol*; 6: 487-500
- [129] Hermsmeyer K. (1996) Protein kinase C mechanism enhances vascular muscle relaxation by the CA²⁺ antagonist Ro-40-5967. *J Vasc Res*; 33: 71-77
- [130] Coll JL, Ben-Ze'ev A, Ezzell RM, Rodríguez Fernández JL, Baribault H, Oshima RG, Adamson ED. (1995) Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 92(20): 9161-9165
- [131] Volberg T, Geiger B, Kam Z, Pankov R, Simcha I, Sabanay H, Coll JL, Adamson E, Ben-Ze'ev A. (1995) Focal adhesion formation by F9 embryonal carcinoma cells after vinculin gene disruption. *J Cell Sci*; 108 (Pt 6): 2253-2260
- [132] Watabe-Uchida M, Uchida N, Imamura Y, Nagafuchi A, Fujimoto K, Uemura T, Vermeulen S, van Roy F, Adamson ED, Takeichi M. (1998) alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J Cell Biol*; 142(3): 847-857
- [133] Tozeren A, Wu S, Hoxter B, Xu W, Adamson ED, Byers SW. (1998) Vinculin and cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun*; 1: 49-59

- [134] Grosheva I, Vittitow JL, Goichberg P, Gabelt BT, Kaufman PL, Borrás T, Geiger B, Bershadsky AD. (2006) Caldesmon effects on the actin cytoskeleton and cell adhesion in cultured HTM cells *Exp Eye Res*; 82(6): 945-958
- [135] Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C. (2007) Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol*; 179(5): 1043-1057
- [136] Frisch SM, Francis H. (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*; 124(4): 619-626
- [137] Giancotti FG, Ruoslahti E. (1999) Integrin signaling. *Science*; 285(5430): 1028-1032
- [138] Ruoslahti E. (1991) Integrins. *J Clin Invest*; 87(1): 1-5
- [139] Wang-Su ST, McCormack AL, Yang S, Hosler MR, Mixon A, Riviere MA, Wilmarth PA, Andley UP, Garland D, Li H, David LL, Wagner BJ. (2003) Proteome Analysis of Lens Epithelia, Fibers, and the HLE-B3 Cell Line, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; 44(11): 4829-4836
- [140] Guignandon A, Usson Y, Laroche N, Lafage-Proust MH, Sabido O, Alexandre C, Vico L. (1997) Effects of intermittent or continuous gravitational stresses on cell-matrix adhesion: quantitative analysis of focal contacts in osteoblastic ROS 17/2.8 cells. *Exp Cell Res*; 236(1): 66-75
- [141] Clozel JP, Véniant M, Osterrieder W. (1990) The structurally novel Ca²⁺ channel blocker Ro 40-5967, which binds to the [3H] desmethoxyverapamil receptor, is devoid of the negative inotropic effects of verapamil in normal and failing rat hearts. *Cardiovasc Drugs Ther*; 4(3): 731-736
- [142] Clozel JP, Ertel EA, Ertel SI. (1997) Discovery and main pharmacological properties of mibefradil (Ro 40-5967), the first selective T-type calcium channel blocker. *J Hypertens Suppl*; 15(5): 17-25

- [143] Mullins ME, Horowitz BZ, Linden DH, Smith GW, Norton RL, Stump J. (1998) Life-threatening interaction of mibefradil and beta-blockers with dihydropyridine calcium channel blockers. *JAMA*; 280(2): 157-158
- [144] Weiss EE, Kroemker M, Rüdiger AH, Jockusch BM, Rüdiger M. (1998) Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J Cell Biol*; 141(3): 755-764
- [145] Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 4(7): 517-529
- [146] Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 1(1): 11-21
- [147] Berridge MJ. (1997) The AM and FM of calcium signalling. *Nature*; 386(6627): 759-760
- [148] Strobeck MW, Okuda M, Yamaguchi H, Schwartz A, Fukasawa K. (1999) Morphological transformation induced by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway requires suppression of the T-type Ca²⁺ channel. *J Biol Chem*; 274(22): 15694-15700
- [149] Xu W, Baribault H, Adamson ED. (1998) Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development*; 125(2): 327-337
- [150] Meissner A, Noack T. (2008) Proliferation of human lens epithelial cells (HLE-B3) is inhibited by blocking of voltage-gated calcium channels. *Pflugers Arch*; 457(1): 47-59
- [151] Bershadsky AD, Ballestrem C, Carramusa L, Zilberman Y, Gilquin B, Khochbin S, Alexandrova AY, Verkhovsky AB, Shemesh T, Kozlov MM. (2005) Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. *Eur J Cell Biol*; 85(3-4): 165-173

- [152] Sahai E, Olson MF, Marshall CJ. (2001) Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J*; 20(4): 755-766
- [153] Nishi M, Takeshima H, Houtani T, Nakagawara K, Noda T, Sugimoto T. (1999) RhoN, a novel small GTP-binding protein expressed predominantly in neurons and hepatic stellate cells. *Brain Res Mol Brain Res*; 67(1): 74-81
- [154] Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S. (1999) Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*; 1(3): 136-143
- [155] Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Goping IS, Opas M, Bleackley RC, Green DR, Michalak M. (2000) Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol*; 150(4): 731-740
- [156] Groenendyk J, Michalak M. (2005) Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochim Pol*; 52(2): 381-395
- [157] Arnaudeau S, Frieden M, Nakamura K, Castelbou C, Michalak M, Demarex N. (2002) Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Biol Chem*; 277(48): 696-705
- [158] Demarex N, Frieden M, Arnaudeau S. (2007) ER Calcium and ER Chaperones: New Players in Apoptosis? *Calreticulin Second Edition* ISBN: 0-306-47845-5
- [159] Kageyama K, Ihara Y, Goto S, Urata Y, Toda G, Yano K, Kondo T. (2002) Overexpression of calreticulin modulates protein kinase B/Akt signaling to promote apoptosis during cardiac differentiation of cardiomyoblast H9c2 cells. *J Biol Chem*; 277(22): 19255-19264
- [160] Lijnen P, Fagard R, Petrov V. (1999) Mibefradil-induced inhibition of proliferation of human peripheral blood mononuclear cells. *J Cardiovasc Pharmacol*; 33: 595-604

- [161] Lacinová L, Klugbauer N, Hofmann F. (2000) Low voltage activated calcium channels: from genes to function. *Gen Physiol Biophys*; 19(2): 121-136
- [162] Lacinová L, Klugbauer N, Hofmann F. (2000) Regulation of the calcium channel $\alpha(1G)$ subunit by divalent cations and organic blockers. *Neuropharmacology*; 39(7): 1254-1266
- [163] Rae JL, Shepard AR. (1998) Molecular biology and electrophysiology of calcium-activated potassium channels from lens epithelium. *Curr Eye Res*; 17(3): 264-275
- [164] Czuczwar SJ, Małek U, Kleinrok Z. (1990) Influence of calcium channel inhibitors upon the anticonvulsant efficacy of common antiepileptics against pentylenetetrazol-induced convulsions in mice. *Neuropharmacology*; 29(10): 943-948
- [165] Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD. (2001) Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDial-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol*; 153(6): 1175-1186
- [166] Thedinga E, Kob A, Holst H, Keuer A, Drechsler S, Niendorf R, Baumann W, Freund I, Lehmann M, Ehret R. (2007) Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects. *Toxicol Appl Pharmacol*; 220(1): 33-44
- [167] Bertolesi GE, Shi C, Elbaum L, Jollimore C, Rozenberg G, Barnes S, Kelly ME. (2002) The $Ca(2+)$ channel antagonists mibefradil and pimozide inhibit cell growth via different cytotoxic mechanisms. *Mol Pharmacol*; 62(2): 210-219
- [168] Gomora JC, Xu L, Enyeart JA, Enyeart JJ. (2000) Effect of mibefradil on voltage-dependent gating and kinetics of T-type $Ca(2+)$ channels in cortisol-secreting cells. *J Pharmacol Exp Ther*; 292(1): 96-103
- [169] Wang Y, Townsend C, Rosenberg RL. (1993) Regulation of cardiac L-type Ca channels in planar lipid bilayers by G proteins and protein phosphorylation. *Am J Physiol*; 264(6): 1473-1479

- [170] Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J*; 335(1): 1-13
- [171] Brazil DP, Hemmings BA. (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*; 26(11): 657-664
- [172] Song G, Ouyang G, Bao S. (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*; 9(1): 59-71
- [173] Pearson LL, Castle BE, Kehry MR. (2001) CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Int Immunol*; 13(3): 273-283
- [174] Ramos JW. (2008) The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*; 40(12): 2707-2719
- [175] Huang X, Zhao T, Zhao H, Xiong L, Liu ZH, Wu LY, Zhu LL, Fan M. (2008) Extracellular signal-regulated kinase 1/2 is essential for the proliferation of neural stem cells derived from embryonic cortex. *Sheng Li Xue Bao*; 60(3): 437-441
- [176] Jones P, Jackson P, Price GJ, Patel B, Ohanion V, Lear AL, Critchley DR. (1989) Identification of a talin binding site in the cytoskeletal protein vinculin. *J Cell Biol*; 109(6): 2917-2927
- [177] Andrysík Z, Machala M, Chramostová K, Hofmanová J, Kozubík A, Vondráček J. (2006) Activation of ERK1/2 and p38 kinases by polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells is associated with induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol*; 211(3): 198-208
- [178] Seger R, Krebs EG. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J*; 9(9): 726-735

- [179] Sánchez AM, Malagarie-Cazenave S, Olea N, Vara D, Chiloeches A, Díaz-Laviada I. (2007) Apoptosis induced by capsaicin in prostate PC-3 cells involves ceramide accumulation, neutral sphingomyelinase, and JNK activation. *Apoptosis*; 12(11): 2013-2024
- [180] Wang Y, Zhang J, Yi XJ, Yu FS. (2004) Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*; 78(1): 125-136
- [181] Herlaar E, Brown Z. (1999) p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today*; 5(10): 439-447
- [182] Hagemann C, Blank JL. (2001) The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal*; 13(12): 863-875
- [183] Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. (2006) Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*; 12(4): 446-451
- [184] Zhang Y, Li J, Xie Q, Bonanno JA. (2006) Molecular expression and functional involvement of the bovine calcium-activated chloride channel 1 (bCLCA1) in apical HCO₃⁻ permeability of bovine corneal endothelium. *Exp Eye Res*; 83(5): 1215-1224
- [185] Bezprozvanny I, Scheller RH, Tsien RW. (1995) Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. *Nature*; 378(6557): 623-626
- [186] McNulty MM, Hanck DA. (2004) State-dependent mibefradil block of Na⁺ channels. *Mol Pharmacol*; 66(6): 1652-1661
- [187] Nebe B, Sanfleben H, Pommerenke H, Peters A, Rychly J. (1998) Hepatocyte growth factor enables enhanced integrin-cytoskeleton linkage by affecting integrin expression in subconfluent epithelial cells. *Exp Cell Res*; 243(2): 263-273

- [188] Lee YC, Chuang CY, Lee PK, Lee JS, Harper RW, Buckpitt AB, Wu R, Oslund K. (2008) TRX-ASK1-JNK signaling regulation of cell density-dependent cytotoxicity in cigarette smoke-exposed human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 294(5): 921-931
- [189] McGuffie EM, Fraylick JE, Hazen-Martin DJ, Vincent TS, Olson JC. (1999) Differential sensitivity of human epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun*; 67(7): 3494-3503
- [190] Panner A, Wurster RD. (2006) T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell Calcium*; 40(2): 253-259
- [191] Wang Z, Fermini B, Nattel S. (1993) Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res*; 73(6): 1061-1076
- [192] Rabsilber TM, Limberger IJ, Reuland AJ, Holzer MP, Auffarth GU. (2007) Secondary cataract prevention. *Ophthalmology*; 114(2): 397-398
- [193] Behar-Cohen FF, David T, Buechler Y, Nova MP, Houston LL, Pouliquen YM, Courtois Y. (1995) Cytotoxic effects of FGF2-saporin on bovine epithelial lens cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 36(12): 2425-2433
- [194] Haus CM, Galand AL. (1996) Mitomycin against posterior capsular opacification: an experimental study in rabbits. *Br J Ophthalmol*; 80(12): 1087-1091
- [195] Vega E, Gamisans F, García ML, Chauvet A, Lacoulonche F, Egea MA. (2008) PLGA nanospheres for the ocular delivery of flurbiprofen: Drug release and interactions. *J Pharm Sci*; 97(12): 5306-5317
- [196] Spina E, Pisani F, Perucca E. (1996) Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with carbamazepine. An update. *Clin Pharmacokinet*; 31(3): 198-214

8. Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridine
AKT	Protein Kinase B
BSA	Bovine serum albumine
ca.	circa
Ca	Kalzium
Ca ²⁺	Kalziumionen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ETX	Ethosuximid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
hLEZ	primäre humane Linsenepithelzellen
IDES	Interdigitated Electrode Structure
IgG	Immunglobulin G
IOL	Intraokularlinse
ISFET	Ion-Sensitive Field Effect Transistor
LB-Medium	lysogeny broth-Medium
LEC	Linsenepithelzellen
keV	Kiloelektronenvolt
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Millimeter
mM	Millimolar
mm	Millimeter

Abkürzungsverzeichnis

NaCl	Natriumchlorid
nF	Nanofarad
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	phosphate buffered saline
PBS ^{Ca²⁺, Mg²⁺}	phosphate buffered saline mit Kalzium und Magnesium
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PMMA	Polymethylmethacrylat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
ROCK-2	Rho-associated Protein Kinase-2
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehung / Minute
UV	ultraviolett
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
z.B.	zum Beispiel

9. Anhang

9.1. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinischen Forschung/Arbeitsbereich Zellbiologie der Universität Rostock unter der Leitung von Prof. Dr. Joachim Rychly angefertigt.

Frau PD Dr. Barbara Nebe danke ich für die interessante Aufgabenstellung und die sehr gute Betreuung in dem Projekt. Vor allem die große wissenschaftliche Freiheit, das gute Arbeitsklima sowie die aufgeschlossene und konstruktive Kritikkultur trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Mein weiterer Dank gilt:

- meinen Laborkollegen Frau Dipl.-Ing. (FH) Annelie Peters, Frau Dipl.-Ing. (FH) Petra Seidel, Frau Dipl. Biol. Annika Kasten, Herrn Dr. Frank Lüthen, Frau Dr. Claudia Bergemann, Frau Dr. Annette Diener und Frau Dr. Ulrike Bulnheim für das ausgezeichnete Laborklima und ihre stete Hilfsbereitschaft,
- Frau Dr. Petra Müller für die zahlreiche Ideen und Problemlösungen
- Axel Kob, Sabine Drechsler und Ralf Ehret von der Bionas GmbH für die technische Hilfe zur Durchführung der Zelladhäsionsversuche
- Gerhard Fulda, Wolfgang Labs sowie Prof. Jonas vom EMZ Rostock für technische Unterstützung bei den REM- und TEM Aufnahmen

Ein besonderer Dank gilt Frau Dipl. Biol. Hendrikje Hildisch für ihre Unterstützung.

Abschließend bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, Familie und Freunden, die mich auf jede erdenkliche Weise unterstützt haben.

9.2. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Das bearbeitete Thema wurde von mir nicht schon früher im Rahmen einer anderen Arbeit behandelt oder anderswo als Arbeit abgegeben.

Rostock, 30.Januar 2009

Arne Weidmann

9.3. Publikationen und Präsentationen

Kwittner S, Weidmann A, Nebe B, Beck R. (2007) In-vitro-Inhibition von humanen Linseneithelzellen mittels pharmakologisch modifizierter Kapselspannrings zur Prävention der Cataracta secundaria 21. Kongressband der Deutschsprachigen Gesellschaft für Intraokularlinsen-Implantation, Interventionelle und Refraktive Chirurgie; Biermann Verlag; ISBN: 978-3-930505-52-4, S. 127 – 133

Weidmann A, Kwittner S, Nebe B, Teller J, Jonas L, Beck R. (2008) Prevention of lens epithelial cell growth using Mibefradil-containing PLGA micro particles fixed at a capsular tension ring in an organ culture model. The Open Ophthalmology Journal; 2(1): 112-118

Vortrag: Universitätsaugenklinik Rostock, März 2005

Projektvorstellung im Rahmen einer Ärztereweiterung: DFG-Projekt “Adhäsionsinhibition von humanen Linseneithelzellen durch den Kalziumkanalblocker Mibefradil”

Abstract: SOE/DOG Berlin, September 2005

Weidmann A, Nebe B, Beck R. Intervention into signalling pathways by the calcium channel blocker mibefradil causes inhibition of human lens epithelial cell adhesion

Vortrag (ausgewähltes Abstract): SOE/DOG Berlin, September 2005

Weidmann A

Intervention into signalling pathways by the calcium channel blocker mibefradil causes inhibition of human lens epithelial cell adhesion

Abstract und Poster: DGZ Braunschweig, März 2006

Weidmann A, Müller P, Beck R, Nebe B. Influence of the T-type calcium channel blocker Mibefradil into signaling pathways in human lens epithelial cells. Eur J Cell Biol 85S1, Suppl.56, 2006 51:

Vortrag: BMFZ Seminar, April 2006

Vortrag der bisherigen Projektergebnisse

Abstract und Poster: DGZ Frankfurt/Main, März 2007

Weidmann A, Beck R, Nebe B. Impaired GFP-vinculin adhesions in human lens epithelial cells due to the T-type calcium channel blocker Mibefradil. Eur J Cell Biol, 86S1, Suppl.57, 2007 48: ISSN 0171-9335

Vortrag: BMFZ Seminar “On-line Cell Monitoring” der Firma Bionas GmbH, 2007

Vortrag der Ergebnisse in Zusammenarbeit mit der Firma BIONAS GmbH

Adhäsionsinhibition von Linseneithelzellen durch den Kalziumkanalblocker Mibefradil

Vortrag: BMFZ Seminar, April 2007

Einfluss des Kalziumkanalblockers Mibefradil auf Linseneithelzellen

Vortrag: Universitätsaugenklinik Rostock, Mai 2007

Seminar im Rahmen einer Ärztereiberbildung

Einfluss des Kalziumkanalblockers Mibefradil auf Linseneithelzellen

Abstract und ePoster: SOE/AAO Wien, Juni 2007

Weidmann A, Teller J, Beck R, Nebe B. Immobilization of the calcium channel blocker mibefradil in spheric micro particles for lens cell's growth inhibition in vitro. Eur J Ophthalmol Suppl. Vol.17, 2007, ISSN: 1120-6721

Abstract und ePoster: SOE/AAO Wien, Juni 2007

Weidmann A, Beck R, Nebe B. The mode of action of the calcium channel blocker Mibefradil on human lens epithelial cells – first insights. Eur J Ophthalmol Suppl. Vol.17, 2007, ISSN: 1120-6721

Abstract, Poster und ePoster: DOG Berlin, September 2007

Kwittner S, Weidmann A, Nebe, B, Teller J, Beck R. In-vitro-Inhibition von humanen Linseneithelzellen (hLEZ) im Organkulturmodell mittels eines pharmakologisch modifizierten Kapselspannrings zur Prävention der Cataracta secundaria

Abstract und Poster: DGZ Marburg, März 2008

Weidmann A, Meissner A, Beck R, Nebe B. Sensitivity of lens epithelial cells to mibefradil depends on the state of confluence. Eur J Cell Biol, 87S1, Suppl.58, 2008 75: ISSN 0171-9335

Abstract und Poster: The 3rd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Zürich, Schweiz, September 2008

Weidmann A, Beck R, Nebe B. Vinculin mobility and organization in lens epithelial cells is impaired using a T-type calcium channel blocker